



UNIVERSITAT DE BARCELONA



**Paper de la proteïna HERC1 en la via de
senyalització de mTOR. Erk i p38
reguladors de la senyalització per
aminoàcids**

Tesi Doctoral presentada per

Eduard Casas Terradellas

L'Hospitalet de Llobregat, 2009



Memòria presentada per **Eduard Casas Terradellas** per optar al grau de
Doctor per la Universitat de Barcelona.

Programa de Doctorat de Biomedicina. Bienni 2004-2006.
Departament de Ciències Fisiològiques II. Facultat de Medicina.
Universitat de Barcelona.

Aquesta Tesi ha estat realitzada sota la direcció del Dr. José Luis Rosa López a la
Unitat de Bioquímica del Departament de Ciències Fisiològiques II de la Facultat de
Medicina (Campus de Bellvitge).

El director de la Tesi,

L'interessat,

Dr. José Luis Rosa López

Eduard Casas Terradellas

A en Josep i la Rosa.

Als avis Eduard, Montserrat,

Ramon i Vicenta

AGRAÏMENTS



Sense cap mena de dubte, aquesta tesi no hauria estat possible sense l'inestimable ajuda de moltes persones. D'entre totes elles, m'agradaria donar-li les gràcies en especial al meu director de tesi, el José Luis, per deixar-me començar a treure el cap pel seu laboratori quan encara no tenia massa clar si acabaria embrancant-me en aquest món ara fa gairebé sis anys i mig. També li vull agrair la seva ajuda i confiança en aquells inicis que han fet possible que a dia d'avui estigui escrivint els agraïments, amb els quals, a falta de la lectura, poso punt i final a aquesta tesi i a una etapa de la meua vida que vist amb la perspectiva del dia d'avui, ha estat sense cap dubte molt enriquidora. Durant aquests anys he après un munt de coses, i tot i que com en la vida mateixa hi ha hagut moments bons i moments no tant bons, em quedo amb tot el vagatge científic i el "savoir faire" que he après durant aquests anys al laboratori del José Luis.

En segon lloc vull donar-li les gràcies a en Ramon per obrir-me les portes del departament i per juntament amb en Santi, en Lisardo i el mateix José Luis, donar-me un cop de ma quan ho he necessitat per tal que aquesta tesi pogués tirar endavant.

També vull donar les gràcies a tots els companys del laboratori que han compartit amb mi aquests anys i que també formen part d'aquesta tesi. En primer lloc a en Ouadah, amb qui he compartit la majoria de temps, i les alegries pròpies de quan els experiments sortien o les petites decepcions quan aquests es resistien. En segon lloc, a en Francesc García i a l'Elena, les dues persones que em van acollir al laboratori quan vaig començar i que em van guiar en els meus primers passos donant-me sempre consells de gran vàlua. També vull donar les gràcies a la Roser, amb qui tot i que va estar poc temps al laboratori vàrem compartir molts bons moments i molts berenars a mitja tarda. Gràcies també a la Fabiola, per la simpatia i bon humor que va aportar al laboratori i amb qui he passat moments molt divertits durant l'últim tram d'aquesta tesi. Gracias Fabiola por enseñarme palabras en argot Venezolano como

“malandro” y muchas otras que mejor no poner en una tesis... (y otras que te inventabas para que no te entendiéramos, reconócelo 😊). Gràcies també a la Irantzu, la “post-doc” d’Euskal Herria del laboratori. Gracias Irantzu por tu ayuda y por dejarme estrenar tus DVDs de “Monster” (una sèrie Manga la qual recomano a tothom per cert). Gràcies també a la Mónica, la última incorporació del laboratori amb qui tot i que no hem coincidit massa, també he compartit bons moments i qui, a l’igual que a la Fabiola i a l’Irantzu, desitjo molts “èxits científics” d’ara en endavant.

La realització d’aquesta tesi a Bellvitge també m’ha permès conèixer a un grup de persones sense les quals aquests anys no haurien estat els mateixos i amb qui he compartit nombrosos dinars tant a la facultat com al Rias Baixas, i una infinitud de cafès i sobretauls; a l’Arnau, amb qui m’he sentit especialment identificat per ser gairebé de la mateixa generació que jo i perquè les nostres tesis han transcorregut amb cert paral·lelisme, per la seva amistat i sentit de l’humor, i per oferir-me casa seva per no haver de tornar cap a Tona per la nit després dels sopars de nadal de grup i en moltes altres ocasions. A la Carla, amb qui em vaig avenir de seguida que ens vàrem conèixer, per la seva amistat i complicitat i per fer-me companyia els calurosos mesos d’Agost que hem treballat al laboratori. A en Pere, amb qui vaig compartir els cursos de doctorat, les jornades doctorials a Collbató, la seva boda amb la Gemma, i incomptables cafès, per la seva amistat i confiança. A en Pol, per les nombroses converses “Techies” i cinèfiles entre d’altres i per la seva amistat. Per cert Pol, la velocitat màxima permesa en una via interurbana depèn del tipus de via (tu ja saps perquè ho dic 😊).

També li vull donar les gràcies als grups d’en Francesc Ventura i en Francesc Viñals; a en Francesc Ventura, pels reactius pels assajos luciferasa i juntament amb en Francesc Viñals (durant els primers anys) i el José Luis, per tots els consells i comentaris que ens han fet tant a mi com a la resta de companys durant els seminaris de grup. A en Francesc Viñals, per ajudar-me amb els experiments de diferenciació de cèl·lules C2C12. A en Nelson, pels seus seminaris tant didàctics. A l’Antonio, per la seva ajuda amb els assajos amb gens reporters i darrerament amb la paperassa burocràtica per al dipòsit de la tesi. Ya casi lo tenemos Antonio!! A la Cristina

Gamell, pel seu “salero” i per “recordar-nos” mútuament que teníem que treballar quan estàvem “distrets” pels passadissos del departament. A la Cristina Lacasa, per mantenir-me informat de tots els temes de la beca Idibell desde l’altre costat de la Gran Via. Gràcies també a la Raquel, a la Júlia, a la Maria José, a la Sílvia, a la Raisa, a la Bea i a l’Eddie.

A en Jordi Llorens, la segona persona del departament amb qui vaig parlar, per oferir-me la possibilitat de fer la tesi al seu grup, tot i que al final, el meu interès pel món de la bioquímica i la biologia molecular em va acabar de decantar pel laboratori del José Luis. A la Judith, per la seva manera de ser tant “pija” i tant autèntica i amb qui em vaig fer tants farts de riure. A la Núria, a la Sandra i a la Diana.

A la Cristina Gómez i a la Roser del grup d’en Santi. Al Jordi Bermúdez. A la Teresa, per la insulina que tant bé ens ha funcionat sempre. Al Jordi Boada, a l’Edu, i a la Roser. Al José Carlos. A la Maria, per la seva ajuda amb els cultius cel·lulars a l’inici d’aquesta tesi. A la Sandra, per estar sempre allà quan la necessitava (o en altres paraules, per estar sempre allà a la campana de cultius quan jo necessitava utilitzar-la ☺). Gracias Sandra por tu amistad y por pasarme el video de “El secreto”, nunca lo voy a olvidar ☺. A l’Anna Vidal, per la seva bondat. Ànims amb la tesi Anna que ja et queda menys!! A l’Àlícia, a en Francesc Xavier, a l’Andy i a la Jana.

A l’Àurea, pels consells sobre la manipulació d’isòtops radioactius. A l’Esther Adanero, per cuidar-nos tant a tots els becaris. A l’Anna Manzano, pels experiments de formació de focus en gels d’agarosa. A la Nieves i a la Marta, pels seus consells sobre la tesi. A la Mercè, a en Joan Duran, a la Laura i a en Miguel.

A en Joan Gil i a en Biel. A la Mercè i a l’Anna Maria, amb qui vaig compartir els cursos de doctorat. A la Clara, la Montse, en Llorenç, l’Antonio, en Dani, la Diana, l’Alba i la Camila.

A l’Esther Castaño i a en Benja per la seva gran ajuda amb els microscopis i amb les PCRs a temps real.

A la fundació IDIBELL, per concedir-me una de les seves beques. A l'empresa Productes del cinquè quart, per facilitar-me els cervells de vedella frescs per als experiments de purificació de vesícules amb coberta de clatrina i membranes LP2.

També vull donar les gràcies a l'Oriol, en Xavi, en David, a l'Elena, la Cristina, la Mireia, l'Alba i a en Jordi, per tot el temps compartit a les aules i laboratoris de la facultat de Química de Girona. A tota la gent de Bioquímica de l'Autònoma; en Dani, la Ingrid, l'Ignasi, en Guifré, en Xavi, la Rosa, la Sílvia i en Joan, i en especial a l'Esther; el destí va voler que la nostre amistat no es perdés i va fer que ens retrobéssim a l'Autònoma Esther. Gràcies per la teva amistat i per tots els moments que hem compartit, et desitjo el millor de tot cor i a veure quan em presentes al petit Alejandro per cert 😊.

I per últim, però no menys important, a la meva família; als meus pares Josep i Rosa, per haver-m'ho donat tot i per estar sempre allà. A l'àvia Vicenta, per cuidar-nos i mimar-nos tant a tots des de petits. A les meves "germanetes" Marta i Berta. A en Guillem. Al tiet Jordi, per donar-me un cop de ma als inicis d'aquesta tesi. A la tieta Roser, i als "cosinets" Jordi (i a la que en breu serà la seva dona, la Maria), Carles i Xavi.

Moltes gràcies a tots de tot cor!!!

Eduard

*"Mentre el riu corri, les montanyes
facin sombra i en el cel hi hagin
estrelles, ha de durar la memòria
del benefici rebut en la ment de
l'home agraït"*

Virgili (70 ac-19 ac)

Índex

	Pàgina
1 INTRODUCCIÓ	11
1.1 La família de proteïnes HERC	13
1.2 La via de senyalització de mTOR	51
1.3 Altres quinases activades per mitògens. Les MAPKs	83
2 OBJECTIUS	93
3 MATERIALS I MÈTODES	99
4 RESULTATS I DISCUSSIÓ	161
4.1 Anàlisi conjunta de proteïnes gegants i petites per PAGE/SDS. El sistema LAG (Low Acrylamide gradient)	163
4.2 Paper de la proteïna HERC1 en la via de senyalització de mTOR	169
4.3 Erk i p38, reguladors de la senyalització per aminoàcids	189
5 DISCUSSIÓ GENERAL	213
6 CONCLUSIONS	229
7 ANNEX	235
7.1 Estudi de la localització d'HERC1 en membranes cel·lulars internes	237
8 BIBLIOGRAFIA	245
9 ABREVIACIONS	271
10 LLISTAT FIGURES I TAULES	279
11 PUBLICACIONS	285

Taula de Continguts

	Pàgina
1 INTRODUCCIÓ	11
1.1 La família de proteïnes HERC	13
1.1.1 Definició	15
1.1.1.1 El domini RCC1 “like” o RLD	15
1.1.1.1.1 Estructura tridimensional	20
1.1.1.1.2 Localització subcel·lular i per teixits	21
1.1.1.1.3 Funcions	23
1.1.1.1.4 Relació RLD i malalties	26
1.1.1.1.5 Conclusions	28
1.1.1.2 El domini HECT	29
1.1.1.2.1 Subfamílies	30
1.1.1.2.2 La Família de proteïnes <i>Ubiquitin like</i> (Ubl)	31
1.1.1.2.3 El procés d’ubiquitinació	34
A) El sistema ubiquitina-proteasoma (UPS)	34
B) Ubiquitinació en la transcripció	36
C) Ubiquitinació en la reparació del dany a l’ADN	37
D) Ubiquitinació en l’endocitosis	37
1.1.2 Classificació i membres de la família	39
1.1.2.1 Proteïnes HERC gegants	40
1.1.2.1.1 HERC1	40
1.1.2.1.2 HERC2	44
1.1.2.2 Proteïnes HERC petites	46
1.1.2.2.1 HERC3	46
1.1.2.2.2 HERC4	47
1.1.2.2.3 HERC5	48
1.1.2.2.4 HERC6	49
1.2 La via de senyalització de mTOR	51
1.2.1 Introducció	53
1.2.2 Funcions fisiològiques regulades per mTOR	55
1.2.2.1 Funcions regulades pel complex mTORC1	56
1.2.2.1.1 Traducció (biosíntesi de proteïnes)	56
A) Quinasa de la proteïna ribosomal S6 (S6K)	56
B) eIF4E <i>binding protein</i> (4EBP1 o PHAS I)	58
1.2.2.1.2 Autofàgia	60
A) Nucleació dels autofagosomes	62
B) Elongació dels fagòfors i formació dels autofagosomes	62
C) Complex Atg1 (ULK1)	63
D) Complex Atg9	63
1.2.2.1.3 Biogènesi de Ribosomes	64
A) mTOR en la regulació de la transcripció de l’ADN ribosomal	66
B) mTOR en la regulació de la transcripció i traducció de proteïnes ribosomals	67
C) mTOR en la regulació de la síntesi de l’ARN 5S	68
1.2.2.2 Funcions regulades pel complex mTORC2	70
1.2.2.2.1 Creixement i supervivència cel·lular	70
1.2.3 Regulació de la via de senyalització de mTOR	72
1.2.3.1 Activació per factors de creixement (Insulina)	72
1.2.3.1.1 El complex Tuberina/Hamartina (TSC2/TSC1)	73
1.2.3.2 Activació per nutrients (aminoàcids)	78

	Pàgina
1.2.3.3 Altres	80
1.2.3.3.1 Estat energètic	80
1.2.3.3.2 Estrès cel·lular	80
1.3 Altres quinases activades per mitògens. Les MAPKs	83
1.3.1 Erk 1/2	85
1.3.2 p38	86
1.3.3 Quinases activades per MAPKs (MAPKAPKs o MKs)	87
1.3.3.1 RSKs (90 KDa ribosomal S6 kinases)	87
1.3.3.2 MSKs (<i>mitogen and stress activated kinases</i>)	89
2 OBJECTIUS	93
3 MATERIALS I MÈTODES	99
3.1 Electroforesi en gel de poliacrilamida/dodecil sulfat de sodi (PAGE/SDS)	101
3.2 Tinció de gels PAGE/SDS amb blau brillant de Coomassie	106
3.3 Western blot	107
3.4 Quantificació del contingut proteic. Mètode de l'àcid Bicinconínic (BCA)	110
3.5 Extracció d'ADN plasmídic de cultius bacterians	112
3.6 Preparació de cèl·lules competents i transformació	116
3.7 Cultius Cel·lulars	118
3.7.1 Congelació i descongelació de cèl·lules	119
3.7.2 Manteniment de cultius cel·lulars	120
3.7.3 Transfeccions d'ADN plasmídic	120
3.7.4 Silenciament de gens. ARN d'interferència	125
3.7.5 Activació i inhibició de vies metabòliques	128
3.7.6 Assajos amb gens reporters	131
3.7.7 RT-PCR a temps real	133
3.7.8 Purificació de proteïnes i assaigs quinasa	141
3.7.9 Anàlisi cel·lular per immunofluorescència	146
3.7.10 Immunoprecipitació de proteïnes	149
3.8 Purificació de vesícules amb coberta de clatrina	152
3.9 Assaigs d'acoblament de proteïnes de coberta en fraccions crues de vesícules sinàptiques (LP2)	154
3.9.1 Purificació de fraccions crues de vesícules sinàptiques (membranes LP2)	154
3.9.2 Purificació fracció citosòlica	155
3.9.3 Acoblament de proteïnes de coberta en membranes LP2	156
4 RESULTATS I DISCUSSIÓ	161
4.1 Anàlisi conjunta de proteïnes gegants i petites per PAGE/SDS. El sistema LAG (<i>Low Acrylamide Gradient</i>)	163
4.1.1 Resolució del LAG gel	165
4.1.2 LAG gel i western blot	166
4.1.3 LAG gel i immunoprecipitació	167
4.2 Paper de la proteïna HERC1 en la via de senyalització de mTOR	169
4.2.1 Antecedents	171
4.2.2 Interacció HERC1 amb el complex TSC (TSC2/TSC1)	173
4.2.2.1 Interacció HERC1 amb mutants de TSC2 (R611Q i R905Q)	175
4.2.2.2 Paper d'HERC1 en l'estabilitat de TSC2/TSC1	176

	Pàgina
4.2.3 HERC1 en la regulació de la via de senyalització de mTOR	177
4.2.3.1 Estudi de l'efecte de l'activació de mTOR en l'interacció HERC1-TSC2-TSC1	177
4.2.3.2 Estudi del paper d'HERC1 en la regulació de la S6K, l'Akt i 4EBP1	179
4.2.3.3 Estudi del paper d'HERC1 en l'Autofàgia	182
4.2.3.4 Estudi del paper d'HERC1 en en la biogènesi de ribosomes	185
4.3 Erk i p38, reguladors de la senyalització per aminoàcids	189
4.3.1 Detecció de la proteïna p85-S6K1 "like" en resposta a aminoàcids	191
4.3.2 Caracterització de l'activació de la proteïna p85 S6K1 "like" en resposta a aminoàcids	193
4.3.2.1 Inhibició de PI3K i mTOR	193
4.3.2.2 <i>Time course</i> d'activació amb aminoàcids	194
4.3.3 S6K en la senyalització per aminoàcids i insulina	195
4.3.3.1 S6K1	195
4.3.3.2 S6K2	196
4.3.3.3 Silenciament S6K i mTOR i assajos quinasa mTOR	196
4.3.3.4 Sobreexpressió S6K1 en cèl·lules HEK-293T	198
4.3.4 RSK i MSK en la senyalització per aminoàcids	199
4.3.4.1 Sobreexpressió RSK i MSK en cèl·lules HEK-293	199
4.3.4.2 Silenciament RSK en cèl·lules HeLa	200
4.3.5 Erk i p38 reguladors de la senyalització per aminoàcids	202
4.3.5.1 Fosforilació T421/S424 S6K1 via MAPKs	204
4.3.5.2 Erk en la senyalització per aminoàcids. Comparativa aminoàcids/PMA	206
4.3.5.3 p38 en la senyalització per aminoàcids. Sobreexpressió MKK6	207
4.3.5.4 Estrès osmòtic	208
4.3.5.5 Erk i p38 en l'Autofàgia	208
5 DISCUSSIÓ GENERAL	213
6 CONCLUSIONS	229
7 ANNEX	235
7.1 Estudi de la localització d'HERC1 en membranes cel·lulars internes	237
7.1.1 Experiments d'acoblament de la coberta de vesícules sinàptiques (LP2)	239
8 BIBLIOGRAFIA	245
9 ABREVIACIONS	271
10 LLISTAT FIGURES I TAULES	279
11 PUBLICACIONS	285



1 | *Introducció*

*“Sis honrats servidors em van
ensenyar tot el que sé. Els
seus noms són; com,
quan, on, què, qui
i perquè”*

*Rudyard Kipling
(1694-1778)*

1.1 | *La família de proteïnes HERC*

1.1 | La família de proteïnes HERC

1.1.1 | Definició

D'acord amb el comitè de nomenclatura gènica (HGNC) de l'organització del genoma humà (HUGO), es defineix com a proteïna HERC tota aquella proteïna que conté com a mínim i de forma conjunta un domini HECT i un domini RCC1 "like" (RLD) en la seva seqüència.

El domini RLD es caracteritza per presentar homologia amb el regulador de la condensació cromosòmica 1 o RCC1, una proteïna que fou identificada per primera vegada com a producte d'un gen de hamster que presentava dues funcions principals: prevenir la condensació cromosòmica durant la replicació de l'ADN (Ohtsubo *et al.*, 1987) i actuar com a factor bescanviador de nucleòtids (GEF) per a la "small" GTPasa nuclear encarregada del transport al nucli cel·lular de proteïnes que contenen un pèptid senyal de localització nuclear en la seva seqüència, Ran (Bischoff i Ponstingl, 1991; Ren *et al.*, 1995; Schlendstedt *et al.*, 1995). Tant Ran com RCC1 presenten també un paper en el processament de l'ARN i en la seva translocació de d'el nucli cap al citosol un cop ha finalitzat el procés de transcripció (Cheng *et al.*, 1995).

L'altre domini que defineix a la família de proteïnes HERC és el domini HECT. Aquest domini presenta homologia amb l'extrem carboxi terminal de la proteïna associada a la proteïna vírica E6, E6AP. Quan l'E6AP s'uneix a l'oncoproteïna E6 del virus del papiloma humà, actua com a E3 ubiquitina lligasa per a p53 entre d'altres, induint la seva degradació via proteosoma 26S (Scheffner *et al.*, 1993). El domini HECT es caracteritza en si mateix per presentar activitat E3 ubiquitina lligasa.

1.1.1.1 | El domini RCC1 like o RLD

A nivell estructural, RCC1 es caracteritza per la presència de varies repeticions (habitualment 7) de 51 a 68 aminoàcids que constitueixen un domini de fins a 400 residus. Tot i que no es coneix l'estructura tridimensional dels dominis RLD de les proteïnes HERC, si s'ha resolt mitjançant cristal·lografia de raigs X l'estructura en 3 dimensions de RCC1 (Renault *et al.*, 1998), observant-se que cadascuna de les 7 de repeticions de RCC1 s'organitzen en l'espai en forma d'hèlix de 7 aspes amb simetria heptagonal (Figura 1).

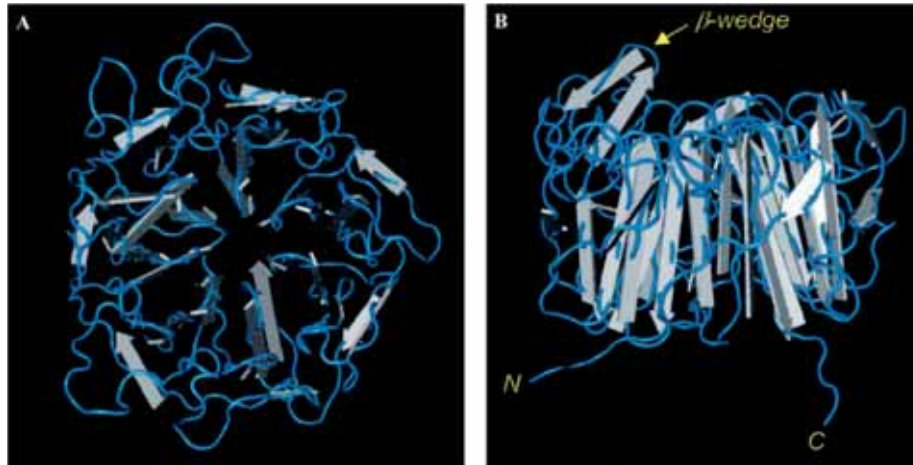


Figura 1. Estructura del Regulador de la condensació cromosòmica o RCC1 humà. Imatges obtingudes per cristal·lografia de Raigs X a 1,7 Å de resolució. A. Vista frontal de l'estructura on s'observen les 7 aspes de l'hèlix. B. Vista lateral on s'observa la cunya β (β -wedge) per on RCC1 actua com a GEF per a la proteïna Ran, i els extrems N i C terminals per on té lloc la interacció de RCC1 amb la cromatina (modificat de Garcia-Gonzalo i Rosa, 2005).

Actualment s'han descrit fins a 20 proteïnes amb dominis RLD. La primera que es va descriure i la més àmpliament estudiada és la pròpia RCC1 i la que defineix aquesta família de dominis. RCC1 va ser identificada per primera vegada en cèl·lules tsBN2 de ronyó de hamster que presentaven un al·lel de RCC1 mutat. Es va observar que quan aquestes cèl·lules s'incubaven a temperatures restrictives eren incapaces d'entrar en la fase S de la mitosi, o bé, aquelles que ja havien entrat en mitosi en el moment de la modificació de la temperatura, iniciaven la condensació dels seus cromosomes de forma precoç abans de la finalització del procés de replicació de l'ADN, abortant abortant d'aquesta manera la divisió mitòtica (Nishimoto *et al.*, 1978; Ohtsubo *et al.*, 1987), lo qual va suggerir un paper en la regulació de la condensació cromosòmica per aquesta proteïna. Experiments posteriors van demostrar que RCC1 era una proteïna nuclear que s'associava a les histones de la cromatina, i que actuava com a factor bescanviador de nucleòtids (GEF) per a Ran (una GTPasa monomèrica de la família de Ras, involucrada en la translocació de proteïnes citosòliques cap al nucli cel·lular, a través de la regulació d'exportines i importines). També es va descriure que RCC1 participava en altres processos com la formació del fus mitòtic a través de l'estabilització de la unió dels microtúbuls i els cromosomes, la formació de l'envoltura nuclear a través del recrutament de l'importina β i de nucleoporines (Quimby i Dasso, 2003) i en el processament i translocació dels ARNs des d'el nucli cap al citosol després de la transcripció (Cheng *et al.*, 1995).

Recentment s'ha descrit una possible relació de Ran en la facilitació de l'inducció de l'apoptosis (Wilde i Zheng, 2009; Wong *et al.*, 2009). Durant les fases inicials dels processos apoptòtics es produeix una condensació dels cromosomes provocada per la fosforil·lació de la serina 14 de l'histona H2B. Tot i que no s'han observat canvis en els nivells de RCC1 en aquesta etapa, si s'ha vist que aquesta proteïna es troba inactiva degut a que es troba unida als cromosomes en major grau que el que té lloc en cèl·lules no apoptòtiques. Aquesta major unió provoca un augment en la proporció de Ran citosòlic i per tant una disminució en el gradient de Ran GTP que impedeix la translocació de diversos factors de transcripció necessaris per a la viabilitat cel·lular, des d'el citosol cap al nucli.

A l'any 1993, en el laboratori del Dr. Mariano Barabaci, treballant en la caracterització de seqüències humanes amb propietats oncogèniques, varen identificar un nou oncogen designat inicialment com a *p619/p532* que contenia seqüències derivades d'un nou locus humà relacionat amb el regulador de la condensació cromosòmica o RCC1. Aquest gen codifica per a la proteïna actualment coneguda com a HERC1, el primer membre identificat d'aquesta família de proteïnes (Rosa *et al.*, 1996).

L'aïllament del cADN complert d'HERC1 a partir d'una llibreria de cADNs de cervell de fetus humà va permetre observar un únic "open reading frame" (ORF) format per 15171 parells de bases que codifica una proteïna "gegant" de 4861 aminoàcids. L'anàlisi de la seva seqüència d'aminoàcids va revelar la presència de varis dominis estructurals (dels que es parlarà més endavant) entre els quals hi havia dues regions d'elevada homologia entre elles així com amb RCC1, que es trobaven localitzades als extrems de la proteïna. Degut a la gran homologia amb RCC1 es van designar com a dominis RLD (*RCC1 Like Domains*).

Des d'aleshores s'han descrit 16 proteïnes humanes més que presenten almenys un domini RLD en la seva seqüència. En funció de les característiques estructurals i funcionals d'aquestes proteïnes, es poden classificar en 5 subgrups: 1. RCC1, 2. HERC, 3. RCBTB, 4. Quinases, 5. Miscel·lània (grup que inclou totes aquelles proteïnes amb dominis RLD que no pertanyen a cap dels quatre grups anteriors (Taula 1).

THE HUMAN RCC1 SUPERFAMILY

	PROTEIN NAMES	NUMBER OF RESIDUES	PROTEIN/ GENE ACCESSION NUMBER	Chromosomal location	KNOWN FUNCTION/INTERACTION	RLD FUNCTION	OTHER KNOWN DOMAINS
RCC1 SUBGROUP	RCC1 (Regulator of Chromosome Condensation 1), RanGEF (RLD: 18-421)	421	P18754/ NM_001269	1p36.1	Binds to chromatin and acts as a Guanine exchange factor (GEF) on Ras homologue Ran	G,P	Nuclear localization signal (NLS)
	TD-60 (Telophase disk 60), RCC2 (RLD: 121-507)	522	Q9P258/ NM_018715	1p36.13	Chromosomal passenger protein involved in mitotic progression	?	NLS
	DELGEF (Deafness Locus-associated putative Guanine nucleotide Exchange Factor), also called SERGEF. (RLD: 4-407)	458	Q9UGK8/ NM_012139	11p14.3	Modulates secretion of proteoglycans and interacts with Sec5 and DelGIP1	?	
	WBSR16 (William-Beuren Syndrome Critical Region 16), WBS16 (RLD: 56-454)	454	Q8N572/ NM_030798	7q11.23	Possible role in Williams-Beuren Syndrome	?	
HERC5s SUBGROUP	HERC1 (for HECT domain and RCC1) (RLD1: 361-749; RLD2: 3,990-4,366)	4861	Q15751/ NM_003922	15q22	Binds clathrin heavy chain, phosphoinositides, ARF/Rab proteins and TSC2. Ubiquitin ligase, no known targets	G,P,L	HECT, SPRY, WD 40, leucine zipper
	HERC2 (RLD1: 415-784; RLD2: 2,949-3,332; RLD3: 3,941-4,324)	4834	Q95714/ NM_004667	15q13	involved in murine rjs syndrome. ubiquitin ligase, no known targets	?	HECT, Mb-HERC2, DOC domain, ZZ type zinc finger, cyt b5 like region
	HERC3 (RLD: 1-371)	1050	Q15034/ NM_014606	4q21	ubiquitin ligase, no known targets	?	HECT
	HERC4 (RLD: 1-371)	1057	Q5GLZ8/ NM_015601 or NM_022079	10q21.3	ubiquitin ligase, no known targets	?	HECT
	HERC5 (previously known as Ceb1) (RLD: 1-367)	1024	Q9UIH/ NM_016323	4q22.1	Mediates ISGylation of natural ISG15 target proteins	?	HECT
	HERC6 (RLD: 1-355)	1022	Q8IVU3/ NM_017912	4q22.1	ubiquitin ligase, no known targets	?	HECT
RCBTBs SUBGROUP	RCBTB1 (RCC1 and BTB containing protein 1) or CLLD7 (RLD: 1-357)	531	Q8NDN9/ NM_018191	13q14	Possible tumor suppressor in chronic lymphocytic leukemia	?	BTB domain
	RCBTB2, also called CHC1L (RLD: 1-372)	551	Q95199/ NM_001268	13q14.3	Possible tumor suppressor in prostate cancer	?	BTB domain, BRCA domain
	Ibtk (Inhibitor of Bruton's tyrosine kinase) (RLD: 74-485)	1353	Q9P2D0/ NM_015525	6q14.1	Inhibits Btk	?	BTB, ANK
KINASES SUBGROUP	Nek9, also known as Nercc1 (RLD: 332-725)	979	Q8TD19/ NM_033116	14q24.3	Role in mitotic progression. Binds to Ran.	P	Protein Kinase, CC, PEST sequences
	Nek8 (RLD: 272-683)	692	Q86SG6/ NM_178170	17q11.1	Role in ciliary size and function	?	Protein Kinase
OTHERS SUBGROUP	ALSIN also called ALS2 (RLD: 110-633)	1657	Q96Q42/ NM_020919	2q33.1	Rab5-GEF and Rac1 effector, though not through RLD domain, binds to GRIP1	G,P	DH, PH, MORN, VPS9
	PAM (Protein Associated with Myc) also called Myc binding protein 2 (MYCB2) (RLD: 552-1030)	4640	Q75592/ NM_015057	13q22	Binds to Myc and inhibits adenylyl cyclase	P	RZF, 2 Zinc-fingers, Myc binding protein, NLS
	RPGR (Retinitis Pigmentosa GTPase Regulator), ORF15 (RLD: 1-372)	1020	Q92834/ NM_000328	Xp11.4	Role in ciliary function. Linked to Retinitis Pigmentosa, binds to PDEδ and RPGRIP1	P	

Taula 1. Característiques dels membres de la superfamília RCC1 organitzats en subgrups. En la columna de funció del domini RLD, G,P i L signifiquen “guanine nucleotide exchange factor” o “guanine nucleotide release factor”, “protein-protein interaction”, i “protein-lipid interaction” respectivament. Els interrogants signifiquen que encara no ha estat identificada la seva funció (adaptat de Hadjebi *et al.*, 2008).

L'estudi dels gens que codifiquen per a proteïnes que contenen dominis RLD ha permès observar que aquests gens es troben localitzats en cromosomes diferents, tot i que aquells que presenten homologia entre ells, tendeixen a localitzar-se de forma propera en el genoma. Per exemple, els gens humans que codifiquen per RCC1 i TD60 es troben localitzats propers en el cromosoma 1, els gens de HERC1 i HERC2 es troben en el braç llarg del cromosoma 15, i els gens de HERC3, HERC5 i HERC6 es troben situats en la mateixa regió del cromosoma 4 (Garcia-Gonzalo i Rosa, 2005). El mateix s'observa per als gens de RCBTB1 i RCBTB2 localitzats ambdós en el braç llarg del cromosoma 13. Altres gens d'aquesta família es localitzen al llarg de tot el genoma, com el gen RPGR situat en el cromosoma X.

Els components d'aquesta família de gens presenten diferent nombre d'exons i els seus productes proteics abarquen tamanys que van desde els 400 fins als 5000 residus aproximadament (Taula 1). Alguns d'ells posseïxen varies isoformes com a resultat d' "splicing"s alternatius com els gens de RCC1, DelGEF, RPGR, PAM i alguns membres de la família HERC. Les isoformes observades per RCC1, HERC6 i PAM no afecten al domini RLD, mentre que les que s'observen per DelGEF, RPGR i HERC4 presenten dominis RLD truncats (Uhlmann *et al.*, 1999; Hochrainer *et al.*, 2005; Santos *et al.*, 2006; Shu *et al.*, 2007; Hood i Clarke, 2007).

Dins la superfamília de proteïnes RCC1 existeixen casos on el domini RLD constitueix pràcticament tota la proteïna, com per exemple la pròpia RCC1, o les proteïnes TD-60, DelGEF i WBSR16 del subgrup RCC1. Però en d'altres casos, el domini RLD constitueix únicament una regió altament conservada de la proteïna (com per exemple en la RPGR), o bé es troba formant part de proteïnes que contenen altres dominis com en el cas de la família de les proteïnes HERC.

Els dominis RLD s'han identificat en proteïnes que presenten diferents funcions com per exemple en proteïnes amb activitat ubiquitina lligasa com HERC i PAM (que contenen dominis HECT i RING finger respectivament), en proteïnes amb activitat quinasa, i en proteïnes que contenen dominis d'interacció proteïna-proteïna com per exemple el domini BTB (*Broad complex, Tramtrack and Bric à Brac*) del subgrup RCBTB.

Pel que fa a les característiques dels diferents dominis RLD estudiats s'ha vist que estan formats generalment per 400 aminoàcids aproximadament però amb algunes excepcions, com per exemple els RLDs observats en les proteïnes PAM i Alsln que sobrepassen lleugerament aquesta xifra. Com s'ha comentat anteriorment, el domini RLD de RCC1 està format per set seqüències repetides d'entre 58 i 68 residus anomenades repeticions RCC1. No obstant, s'ha observat que no tots els dominis RLD estan formats per set repeticions RCC1. Així, mentre que els dominis RLD de les proteïnes RCC1, DelGEF, HERC1, els dos darrers RLDs d'HERC2, HERC3 i HERC4 presenten 7 repeticions RCC1, els corresponents RLDs d'altres proteïnes presenten tres repeticions (PAM i IBtk), quatre repeticions (RCBTB2, HERC5, i el primer RLD d'HERC2), cinc repeticions (TD-60, HERC6, RCBTB1, Nek8 i Alsln) i sis repeticions (WBSR16, Nek9, i RPGR). Aquesta diferència en el nombre de repeticions RCC1 no s'ha d'interpretar com que es tracta de RLDs amb una estructura diferent (en tots els casos el tamany i la seqüència és similar), sinó que estan formats per set repeticions igualment però que algunes d'elles no es poden classificar com a repeticions RCC1 d'acord amb la definició canònica d'aquestes seqüències (Stevens i Paoli, 2008).

Les repeticions dels dominis RLD s'han descrit en tot tipus d'organismes incloent procariotes, eucariotes unicel·lulars, plantes, fongs i animals (Bateman *et al.*, 2002). Això podria suggerir un origen previ a l'aparició d'organismes eucariotes per aquest domini però tampoc es pot descartar que la presència d'aquest domini en organismes procariotes fos introduït a posteriori a través de transferència gènica horitzontal per part d'organismes eucariotes. També es creu, tot i que no s'ha demostrat, que el domini RLD es podria haver originat per duplicació seqüencial d'un mòdul de repetició ancestral

(Ochman *et al.*, 2000; Stevens i Paoli, 2008). En qualsevol cas, es tracta d'un domini versàtil com es pot evidenciar en la seva àmplia distribució i conservació en diferents espècies.

1.1.1.1.1 | Estructura tridimensional

En l'actualitat existeixen únicament dues estructures tridimensionals publicades de dominis RLD, que són força similars; la proteïna RCC1 humana (Renault *et al.*, 1998 i 1999) i l'inhibidor II de la β Lactamasa (BLIP-II) de *Streptomyces exfoliatus* (Lim *et al.*, 2001).

Gràcies a l'estructura tridimensional de RCC1 es va observar que aquesta proteïna presentava una estructura terciària en forma d'hèlix de 7 aspes força anàloga a l'estructura del domini WD40 que es troba present en la subunitat β de proteïnes G heterotrimèriques (entre d'altres), tot i que ambdues proteïnes difereixen a nivell de la seva seqüència d'aminoàcids.

Cadascuna de les aspes de l'hèlix de RCC1 està formada per 4 fulls β antiparal·lels. L'estructura completa presenta simetria heptagonal i deixa un buit al centre que és ocupat per molècules d' H_2O (Renault *et al.*, 1998). Curiosament, a nivell de seqüència d'aminoàcids, les set repeticions no corresponen a les set aspes de l'hèlix, sinó que cada seqüència repetida conté el tercer i quart full β d'una aspa i el primer i segon full β de l'aspa següent, de manera que una de les aspes de l'hèlix està formada per la meitat de la setena repetició i la meitat de la primera, tancant d'aquesta manera l'estructura.

Si es comparen les seqüències de les set aspes de RCC1 s'observen semblances entre els tres primers fulls β de cada aspa, suggerint un possible paper essencial per aquests fulls β en el manteniment de l'estructura de l'hèlix. Per altre banda, els quarts fulls β de cada aspa difereixen més a nivell estructural, suggerint un paper d'aquests en la interacció de RCC1 amb altres molècules (Renault *et al.*, 1998). D'acord amb aquestes hipòtesis, la proteïna BLIP-II, que presenta un plegament també en forma d'hèlix de set aspes, està constituïda únicament per 3 fulls β en cada aspa (enloc de quatre) confirmant que el full β exterior no és necessari per al manteniment d'aquest tipus d'estructura (Lim *et al.*, 2001).

Cadascuna de les set aspes de RCC1 presenta varis residus altament conservats. Entre ells destaquen tres residus de glicina necessaris per a les zones amb elevada corbatura entre les diferents cadenes, i determinats residus hidrofòbics necessaris per a l'estabilització dels fulls β antiparal·lels. En la part exterior també s'observen residus conservats, entre els quals destaca una cis-prolina (Renault *et al.*, 1998).

L'extrem N terminal de RCC1 conté un pèptid senyal de localització nuclear (NLS) a més de varis llocs de fosforil·lació i metilació (Hutchins *et al.*, 2004; Li i Zeng, 2004; Friedrich *et al.*, 2006; Chen *et al.*, 2007) i juntament amb l'extrem C terminal, es troba localitzat fora del pla de l'hèlix, ambdós en la mateixa cara del pla. La metilació de l'extrem N terminal és necessària per a la unió d'aquest extrem amb l'ADN, que es produeix a través de les histones nucleosomals que s'uneixen a RCC1 per la mateixa cara on es troben els extrems C i N terminals (Seino *et al.*, 1992; Chen *et al.*, 2007).

En la cara oposada de l'hèlix de RCC1 es troben els múltiples llocs d'unió per a la proteïna Ran relacionats amb el bescanvi de nucleòtid (Renault *et al.*, 1998). D'entre tots ells destaca un full β que sobresurt del pla de l'hèlix, que es troba situat en la tercera aspa (residus 146-153) i que participa directament en la desestabilització de la unió Ran-GDP, afavorint la sortida de GDP i permetent la captació posterior d'una nova molècula de GTP (Renault *et al.*, 1998). Com és d'esperar, aquesta protrusió no es troba present en la proteïna BLIP-II (Lim *et al.*, 2001).

Degut a l'homologia de seqüència existent entre RCC1 i els altres dominis RLD, hom podria pensar que l'estructura tridimensional d'aquests dominis també es produeix en forma d'hèlix β de set aspes. La primera evidència en aquest sentit rau en el fet que la proteïna bacteriana BLIP-II, tot i que està formada únicament per 4 repeticions β canòniques (i tres no canòniques), adopta el mateix tipus de plegament tridimensional (Lim *et al.*, 2001), indicant que no és necessari que les repeticions β d'aquests dominis siguin canòniques per a l'organització dels fulls β antiparal·lels que constitueixen les aspes de l'hèlix. Per confirmar aquesta hipòtesi es van identificar els residus crítics necessaris per al correcte plegament de RCC1 i es va analitzar si es trobaven conservats en altres dominis RLD humans. Existeixen únicament quatre residus conservats en les set repeticions de RCC1: tres glicines necessàries per als girs entre fulls β , i una cis-prolina en l'última cadena de cada aspa (Renault *et al.*, 1998). A continuació es va analitzar la presència d'aquests 28 residus de RCC1 en diferents dominis RLD, tant en la mateixa posició com un o dos residus més amunt o més avall en la seva seqüència. Els resultats obtinguts van ser que 14 dels 20 RLDs analitzats contenien almenys un 80% d'aquests 28 residus. Per als sis RLDs restants, els percentatges van ser 70% (PAM, Nek8 i Nek9), 60% (IBtk), 50% (Alsin) i únicament un 35% per HERC5. D'acord amb aquestes dades semblaria que els RLDs d'HERC5, Alsin i IBtk són els residus amb menys probabilitat d'adoptar un plegament tridimensional anàleg al plegament de RCC1.

Una altre estratègia per comprobar si el plegament adoptat pels dominis RLD correpon a un plegament en forma d'hèlix de set aspes, va ser l'anàlisi de les seves estructures secundàries. Per fer-ho es va utilitzar el mètode de predicció d'estructures secundàries HNN (*Hierarchical Neural Network*) (<http://npsa-pbil.ibcp.fr>) per a cadascun dels dominis RLD. En tots els casos les estructures secundàries predites contenien múltiples cadenes β invariables seguit de varis residus glicina en les posicions esperades. Aquests resultats es complien fins i tot per les proteïnes HERC5, Alsin i IBtk suggerint que la no identificació de residus glicina en aquestes tres proteïnes podria ser degut a un alineament incorrecte amb altres dominis RLD. Totes aquestes observacions suggereixen que la majoria dels dominis RLDs presenten un plegament en forma d'hèlix de set aspes. No obstant, és necessari corroborar aquest extrem a partir de l'elucidació de la seva estructura tridimensional mitjançant cristal·lografia de raigs X.

El tipus de plegament que presenten aquests dominis es troba conservat. No obstant, existeixen certs nivells de variabilitat entre ells. Com s'ha comentat, la proteïna RCC1 presenta un full β de més que sobresurt del pla, conegut com a β -*wedge* (o cunya β), entre la tercera i la quarta cadena β de la tercera aspa de l'hèlix. Aquesta cunya és essencial per a la funció de RCC1 però en canvi no s'observa en la resta de dominis RLD. Aquest fet suggereix l'existència de motius específics intercalats entre les cadenes β de l'hèlix (almenys entre la tercera i quarta cadena de cada aspa) que no afecten el plegament, podrien aportar funcions específiques als RLDs que els contenen. És possible que altres RLDs continguin altres motius que els confereixen activitats específiques tot i que és necessària l'estructura tridimensional de cadascuna de les proteïnes per poder-ho confirmar.

1.1.1.1.2 | Localització subcel·lular i per teixits

Algunes de les proteïnes que contenen dominis RLD s'expressen en la majoria de tipus cel·lulars i presenten funcions essencials, com per exemple RCC1. D'altres, com la proteïna IBtk, presenten patrons d'expressió més restringits i la seva funció depèn del teixit en el qual es troben. En general la distribució cel·lular d'aquesta superfamília depèn de les proteïnes amb les quals interacciona cadascuna.

Dins el subgrup RCC1, tan RCC1 com TD-60 juguen un paper en el cicle cel·lular, s'expressen de forma ubicua i contenen pèptids senyal de localització nuclear (NLS) (Moore *et al.*, 2002; Mollinari *et al.*, 2003; Friedrich *et al.*, 2006). La seva localització subcel·lular és nuclear durant l'etapa d'interfase (TD-60

s'expressa únicament durant la fase G2 i M, mentre que els nivells de RCC1 són independents del cicle cel·lular) (Martineau-Thuillier *et al.*, 1998). Durant la divisió cel·lular RCC1 s'associa amb els cromosomes mitòtics a través del domini RLD (Moore *et al.*, 2002; Hutchins *et al.*, 2004), mentre que TD-60 s'associa a la cara interna dels centròmers (a través d'una interacció encara desconeguda) des d'on posteriorment migra cap a la zona mitja del fus mitòtic (Mollinari *et al.*, 2003). De la resta de membres del subgrup de RCC1 (DelGEF i WBSCR16) tot i que es desconeixen força, si se sap que DelGEF presenta dues isoformes, DelGEF1 i DelGEF2. La primera es localitza tant al nucli com al citoplasma, mentre que la segona, que presenta el domini RLD truncat, sembla localitzar-se en els mitocondris (Uhlmann *et al.*, 1999; Sjolinder *et al.*, 2002 i 2004).

Pel que fa al subgrup quinasa, Nek9 sembla ser un regulador ubicu de la mitosi. Conté un pèptid senyal de localització nuclear (NLS) i es troba tant al nucli com al citoplasma. s'ha vist que la ratio nucli/citoplasma d'aquesta proteïna depèn de la proteïna adenoviral E1A (Pelka *et al.*, 2007). Nek8 es troba en la majoria de teixits (localitzada en el citoplasma i en la regió proximal dels cilis primaris en cèl·lules epitelials de ronyó (Mahjoub *et al.*, 2005; Holland *et al.*, 2002)). Tot i això s'han detectat nivells d'ARNm més elevats en fetge, ronyons i testicles (Liu *et al.*, 2002).

Apart de l'expressió específica de IBtk just per sota de la membrana plasmàtica de limfòcits (Liu *et al.*, 2001), no es té massa informació sobre la localització dels diferents membres del subgrup RCBTB.

Del subgrup miscel·lània, destacar que s'han descrit varies isoformes per a RPGR (Kirschner *et al.*, 1999; Neidhardt *et al.*, 2007; Shu *et al.*, 2007). Una de les que s'ha identificat darrerament es troba de forma predominant en la cara interior dels cons de la retina i presenta el domini RLD lleugerament truncat (Neidhardt *et al.*, 2007). Les dues isoformes principals RPGR^{ext-19} i RPGR^{ORF15} presenten el mateix domini RLD però difereixen en el seu extrem C terminal ja que la segona conté un domini ric en àcid glutàmic i un domini d'unió de nucleofosmina que es troben absents en la primera (Shu *et al.*, 2005 i 2007). Ambdues isoformes s'associen a estructures que contenen microtúbuls com els cilis connectors dels fotoreceptors de la retina, on predomina l'isoforma RPGR^{ORF15}, o la zona de transició dels cilis de la via respiratòria, on únicament es troba RPGR^{ext-19}. RPGR^{ORF15} s'ha localitzat tant als centrosomes com als pols del fus mitòtic en cèl·lules en cultiu que no contenen cilis, així com en el cos de cèl·lules ciliades (Shu *et al.*, 2005) i en la punta de l'axonema dels flagels dels espermatozous (Khanna *et al.*, 2005).

Tot i que RPGR interacciona amb varies proteïnes diferents, s'ha descrit que la interacció a través del domini RLD amb RPGRIP és crítica per a la unió de RPGR amb els cilis connectors dels fotoreceptors (Zhao *et al.*, 2003).

Pel que fa a la proteïna Alsin, els seus nivells d'expressió més elevat s'han detectat en cervell (Yamanaka *et al.*, 2003). A nivell subcel·lular aquesta proteïna presenta múltiples ubicacions com el citosol, compartiments endocítics com els "early" endosomes i els macropinosomes, i estructures riques en actina com les zones arrugades de la membrana plasmàtica (membrane ruffles) i lamelipodis (Yamanaka *et al.*, 2003; Topp *et al.*, 2004; Kunita *et al.*, 2007). A través del seu domini RLD però, l'Alsin sembla evitar la seva interacció física amb aquests compartiments, potser mitjançant la unió intramolecular de l'extrem N terminal del domini RLD i l'extrem C terminal de la proteïna (Kunita *et al.*, 2007).

Finalment, la proteïna PAM s'expressa de forma ubiqua però especialment en cervell i timus (Guo *et al.*, 1998). En cervell de rata i ratolí, els nivells d'ARNm corresponents als ortòlegs d'aquesta proteïna es troben especialment elevats en les cèl·lules piramidals de l'hipocamp i en les cèl·lules granulars del girus dentat i el cerebel (Yang *et al.*, 2002). La seva expressió es troba regulada durant el

desenvolupament, observant-se en ratolins un increment del seu ARNm dues setmanes després del seu naixement. A nivell subcel·lular, PAM es localitza en el nucli, en el citosol i en les neurites de les cèl·lules nervioses (Guo *et al.*, 1998; Murthy *et al.*, 2004; Lewcock *et al.*, 2007).

1.1.1.1.3 | Funcions

RCC1 és el membre de la família més ben caracteritzat a nivell de funció. Com s'ha comentat anteriorment, RCC1 actua com a GEF (factor bescanviador de nucleòtids de guanina) per a Ran (*Ras related nuclear*). El fet que les proteïnes RCC1 i Ran es trobin al nucli mentre que la proteïna activadora de l'activitat GTPasa de Ran (Ran-GAP) es trobi al citoplasma, fa que s'origini un gradient de Ran actiu, que actua com a força motriu del transport de proteïnes entre el nucli i el citoplasma (Riddick i Macara, 2005). En canvi, durant la divisió cel·lular aquest mateix gradient s'estableix al voltant dels cromosomes mitòtics als quals RCC1 s'uneix mitjançant la seva interacció amb histones (que regulen la seva activitat GEF) i amb l'ADN (Ohtsubo *et al.*, 1989; Seino *et al.*, 1992; Nemergut *et al.*, 2001; Chen *et al.*, 2007). Aquest gradient mitòtic té un paper important tant en la formació del fus mitòtic, com en l'ensamblatge de la coberta nuclear (Askjaer *et al.*, 2002; Bamba *et al.*, 2002).

A diferència d'altres proteïnes que contenen dominis RLD, RCC1 sembla estar present en tots els organismes eucariotes. Els corresponents ortòlegs de RCC1 en determinats llevats semblen ser les úniques proteïnes que contenen dominis RLD en el seu proteoma i la seva funció és molt similar a la que presenta en mamífers (també presenten activitat GEF per al correponent ortòleg de Ran) (Aebi *et al.*, 1990; Matsumoto i Beach, 1991; Ohtsubo *et al.*, 1991; Schlenstedt *et al.*, 1995; Ryan *et al.*, 2003; Clement *et al.*, 2006; Hirose *et al.*, 2006). D'acord amb l'elevat grau de conservació evolutiva de la funció de RCC1, els ortòlegs de RCC1 en la mosca de la fruita Prp20p i Bj1 poden rescatar el fenotip de la mutació de RCC1 en cèl·lules de hamster (Ohtsubo *et al.*, 1991). Tot i que no s'ha demostrat, aquest fet suggereix que altres funcions assignades únicament a alguns ortòlegs de RCC1 com per exemple el paper de Prp20p en el control transcripcional mediada pel complex del porus nuclear (NPC), podrien trobar-se conservades també en altres organismes (Dilworth *et al.*, 2005).

La proteïna DelGEF regula la secreció de proteoglicans unint-se a DelGIP1 (*Del GEF Interacting Protein*) i a Sec5 (Sjolinder *et al.*, 2002 i 2004). La proteïna WBSR16 també coneguda com a WBS16 encara no ha estat estudiada. (Pel que fa a les funcions de les proteïnes HERC veure els apartats de cadascuna d'elles).

Dins el subgrup quinasa, la proteïna Nek9 és un substrat de p34/Cdc2 que juga un paper en la progressió del cicle cel·lular, tant durant l'interfase com en la mitosi (Roig *et al.*, 2002; Belham *et al.*, 2003; Tan i Lee, 2004). Nek9 s'uneix a Ran a través del seus dominis RLD i quinasa, tot i que no s'ha demostrat activitat GEF com la de RCC1 per aquesta proteïna, possiblement degut a la poca semblança entre els RLDs d'ambdues (Roig *et al.*, 2002). Es creu que el RLD de Nek9 en canvi, podria tenir un paper autoinhibidor a través de la interacció amb el seu propi domini quinasa (Nigg, 2001; Roig *et al.*, 2002; O'Connell *et al.*, 2003). Finalment, el domini C terminal de Nek9 s'ha vist que interacciona amb amb Nek6 i Nek7, dos membres de la família de quinases Nek que no contenen dominis RLD (Belham *et al.*, 2003). A diferència de la funció en el cicle cel·lular de Nek9, Nek8 sembla participar en el control de la llargada dels cilis primaris en cèl·lules epitelials de ronyó (Smith *et al.*, 2006) possiblement mitjançant la seva activitat quinasa sobre algunes proteïnes ciliars com per exemple la policistina-2 (Sohara *et al.*, 2008) o Bcd2, una proteïna involucrada en el transport via microtúbuls (Holland *et al.*, 2002; Hoogenraad *et al.*, 2003).

Dins el subgrup RCBTB, la única informació que es té és sobre la proteïna IBtk que actua com a inhibidor de la tirosina quinasa de Brunton (Btk) en limfòcits (Liu *et al.*, 2001).

Dins el cinquè subgrup (subgrup miscel·lània), la proteïna Alsin va ser inicialment descrita com a GEF per a Rab5 i Rac1 a través dels seus dominis Vps9 i DH-PH respectivament (Topp *et al.*, 2004). No obstant, mentre el possible paper de l'Alsin com a Rab5 GEF s'ha anat mantenint en la bibliografia amb el temps, el seu possible paper com a GEF de Rac1 ha originat certa controvèrsia. De fet, en un article recent es suggereix que l'Alsin actua per sota de Rac1 més que com a un seu activador (Kunita *et al.*, 2007). Segons aquest estudi, l'activació de Rac1 reclutaria a l'Alsin cap a zones arrugades de la membrana plasmàtica cel·lular (*membrane Ruffles*) i a macropinosomes, provocant l'activació de Rab5 i la posterior fusió dels macropinosomes amb altres endosomes de forma Rab5 dependent. Altres estudis aporten més evidències del paper de l'Alsin en el control de processos d'endocitosis (Devon *et al.*, 2006; Hadano *et al.*, 2006; Lai *et al.*, 2006). En concret, s'ha descrit que el domini RLD de l'Alsin s'uneix a la proteïna GRIP1 (*Glutamate Receptor Interacting Protein-1*) controlant l'expressió dels receptors glutamat de tipus AMPA en la superfície de cèl·lules neuronals (Lai *et al.*, 2006). A més a més, neurones de ratolins knockout per al gen de l'Alsin presenten defectes en l'endocitosis induïda per lligand de TrkB i IGF-1R, possiblement degut a la impossibilitat de que tingui lloc la fusió d'endosomes de forma Rab5 dependent (Devon *et al.*, 2006). Finalment, s'ha observat que el domini RLD de l'Alsin interacciona amb el seu propi extrem C terminal (que conté els dominis MORN i Vps9) i s'ha proposat, tot i que no ha estat demostrat, que aquesta interacció podria tenir un paper en la regulació de la translocació de l'Alsin cap a la membrana plasmàtica (Kunita *et al.*, 2007).

Pel que fa a la proteïna RPGR existeixen varis estudis que la relacionen amb el transport via microtúbuls que té lloc en els cilis (Shu *et al.*, 2007). Com s'ha comentat anteriorment, aquesta proteïna es troba present en els cilis de diferents teixits i interactua de forma directa o indirecta amb proteïnes del seu axonema i cos basal, així com amb proteïnes motores dels microtúbuls (Boylan i Wright *et al.*, 2000; Hong *et al.*, 2000; Roepman *et al.*, 2000; Hong *et al.*, 2001; Khanna *et al.*, 2005; Shu *et al.*, 2005 i 2007). Mutacions en el gen de RPGR provoquen mal funcionaments d'aquelles cèl·lules i teixits que depenen d'una funció ciliar correcta com per exemple els fororeceptors de la retina, que requereixen un transport entre els diferents cilis connectors per poder acoblar els discs que capturen la llum, o bé els epitelis del sistema respiratori o les cèl·lules sensorials de la còclea. Apart de tot això, s'ha vist que l'Alsin s'associa a través del seu domini RLD amb la subunitat delta de la fosfodiesterasa de GMP cíclic, tot i que l'implicació funcional d'aquesta interacció és encara desconeguda (Linari *et al.*, 1999).

La proteïna PAM (*Protein Associated with Myc*), va ser identificada gràcies a la seva capacitat d'unir-se al domini d'activació transcripcional de myc (Guo *et al.*, 1998). Recentment s'ha descrit que processos d' "splicing" alternatiu regulen l'afinitat de PAM per aquest factor de transcripció (Santos *et al.*, 2006). La interacció entre aquestes dues proteïnes té lloc en el nucli cel·lular (on PAM es troba enriquida) (Guo *et al.*, 1998), i tot i que es deconeix el paper funcional d'aquesta interacció, es creu que podria estar relacionada amb el fet que PAM es trobi desensibilitzada en fibroblasts quiescents i senescents (Semov *et al.*, 2002). A part de la seva localització principalment nuclear, PAM també es troba en el citoplasma on s'ha vist que actua com a potent inhibidor de certes isoformes d'adenilil ciclases (AC) (Scholich *et al.*, 2001). En concret, s'ha vist que quan es tracten cèl·lules HeLa amb esfingosina-1-fosfat, PAM es transloca desde el reticle endoplasmàtic cap a la membrana plasmàtica, provocant una inhibició de llarga durada en aquestes ciclases així com en l'acumulació d'AMPc mediada per agonistes (Pierre *et al.*, 2004). Cal remarcar que el domini RLD de PAM és suficient per produir aquesta inhibició (Scholich *et al.*, 2001) i que diferents residus del domini RLD s'han identificat com a llocs d'unió i d'inhibició d'adenilil ciclases (Gao i Patel, 2005). Apart de les funcions en el nucli i en el control de la senyalització mediada per AMP cíclic (AMPc), PAM presenta altres funcions que són

específiques de teixit. S'ha suggerit l'existència d'un ortòleg de PAM en la línia germinal masculina de murins on l'ARNm de PAM conté una seqüència de 26 nucleòtids que s'uneix a DAZL, una proteïna específica de cèl·lules germinals que té un paper essencial en la producció d'espermatozous (Jiao *et al.*, 2002). Aquest fet suggereix que la traducció de PAM podria estar regulada durant l'espermatogènesi (Collier *et al.*, 2005) tot i que això no ha estat demostrat. En canvi, existeixen moltes evidències que mostren que tant PAM com els seus ortòlegs tenen un paper àmpliament conservat en el desenvolupament i en la funció neuronal (Fulga i van Vactor, 2008).

En mamífers, apart d'observar-se nivells d'expressió més elevats en determinades zones específiques del cervell (Yang *et al.*, 2002) i el seu paper en el processament d'estímuls nocius a nivell de la columna vertebral (que podrien ser dependents de l'inhibició d'adenilil ciclases (Ehnert *et al.*, 2004), PAM (Phr1 en ratolí) ha estat recentment relacionada amb la navegació d'axons motors durant el desenvolupament embrionari. Aquesta funció podria tenir lloc gràcies a l'habilitat de Phr1 de desensibilitzar la MAPKKK, DLK, bloquejant la senyalització via p38 MAPK en els axons, que al seu torn controlen el citoesquelet de microtúbuls (Lewcock *et al.*, 2007). Aquestes dades estan d'acord amb resultats previs que suggereixen que la deleció de Phr1 comporta a una innervació defectuosa en el múscul respiratori que provoca la mort de ratolins recent nascuts (Burgess *et al.*, 2004).

També s'ha descrit que PAM col·localitza i interacciona amb el complex supressor de tumors TSC2/TSC1 en les neurites i en les neurones corticals del cervell (Murthy *et al.*, 2004). És probable que aquesta interacció hagi estat conservada durant l'evolució, ja que en ortòlegs de PAM en *Drosophila* i *Zebrafish*, també té lloc aquesta interacció (Murthy *et al.*, 2004; D'Souza *et al.*, 2005). En *Zebrafish* l'ortòleg de PAM, Esrom, és necessari per a la unió i posicionament dels axons de la retina (D'Souza *et al.*, 2005) així com per a la producció del pigment groc i la tetrahidrobiopterina (Le Guyader *et al.*, 2005).

Mutacions en l'ortòleg de PAM en *Drosophila*, Highwire, provoquen un increment en el creixement de les sinapsis que implica un pitjor funcionament d'aquesta funció (Wan *et al.*, 2000; Wu *et al.*, 2005). Aquest fenotip és semblant al que s'observa en *C. elegans* quan l'ortòleg de PAM, RPM-1, es troba mutat (Schaefer *et al.*, 2000; Zhen *et al.*, 2000). De fet, estudis recents han demostrat que tant Highwire com RPM-1 controlen en part la sinaptogènesi, induint la ubiquitinació i posterior degradació via proteosoma de proteïnes específiques en les sinapsis (DiAntonio *et al.*, 2001; Liao *et al.*, 2004; Nakata *et al.*, 2005; Collins *et al.*, 2006; Grill *et al.*, 2007; Wu *et al.*, 2007; Abrams *et al.*, 2008).

En *C. elegans* RPM-1 forma part del complex sinàptic ubiquitina lligasa SCF-like, juntament amb les proteïnes Skp1, Cullin i amb la proteïna F-box FSN-1 amb qui RPM-1 interacciona (Liao *et al.*, 2004). Aquest complex regula l'arquitectura de les sinapsis per mitjà de la degradació de la MAPKKK DLK-1, anulant la senyalització de la via de les MAPK que involucra DLK-1, MKK-4 (MAPKK) i PMK-3 (una p38 MAPK) (Nakata *et al.*, 2005). Gran part d'aquesta via de senyalització sembla que es troba conservada en *Drosophila* (i probablement en ratolí) on la proteïna Highwire col·labora amb DFsn (ortòleg de FSN-1) (Wu *et al.*, 2007) per induir la degradació de Wallenda/DLK (ortòleg de DLK-1) (Collins *et al.*, 2006). No obstant, enlloc d'induir la via de la MAPK p38 com ho fa RPM-1, Highwire anula l'activació de JNK i el factor de transcripció Fos (Collins *et al.*, 2006). S'ha vist però que la supressió de la senyalització via MAPK explica únicament en part els defectes sinàptics observats en mutants amb pèrdua de funció de RPM-1/Highwire (McCabe *et al.*, 2004; Wu *et al.*, 2005; Collins *et al.*, 2006; Grill *et al.*, 2007). Per tant, Highwire actua també anulant la senyalització via BMPs, probablement a través de la degradació mediada per ubiquitina de la proteïna co-smad, Medea (McCabe *et al.*, 2004). Per altre banda, RPM-1 actua també sobre altres proteïnes per sota d'ella com proteïnes de la via de senyalització GLO-4/GLO-1 (Grill *et al.*, 2007) i possiblement amb el receptor tirosina quinasa ALK (Liao *et al.*, 2004).

Curiosament, la meitat N terminal de RPM-1 (que inclou el seu domini RLD però no el domini RING finger necessari per a les funcions dependents d'ubiquitina) interacciona amb GLO-4, una proteïna que també conté un domini RLD i que regula la funció de GLO-1 (proteïna capaç d'unir-se a Rab-GTP). Aquesta via RPM-1/GLO-4/GLO-1 actua en paral·lel amb la via RPM-1/DLK-1/MKK-4/PMK-3 i regula la fisiologia sinàptica i la funcionalitat dels "late" endosomes. Tot i que no ha estat demostrat, GLO-4 podria actuar com a GEF per a GLO-1 (Grill *et al.*, 2007).

Existeixen proteïnes de la superfamília de RCC1 que no presenten ortòlegs en mamífer. GLO-4 és una proteïna que està relacionada amb la proteïna de *Drosophila*, Claret. S'ha descrit que ambdues actuen per sobre de les proteïnes Rab, GLO-1 i Lightoid i que són necessàries per a la formació d'òrgans relacionats amb els lisosomes (grànuls intestinals i grànuls de la pigmentació del ulls respectivament) (Ma *et al.*, 2004; Hermann *et al.*, 2005). També s'ha vist que el domini RLD de Claret s'uneix de forma preferencial a la forma lliure de nucleòtid de Lightoid, suggerint que Claret podria actuar com a GEF per aquesta proteïna. No obstant, no es coneix si el complex Claret/Lightoid té la mateixa funció que GLO-4/GLO-1 en les sinapsis.

PARF-1 és una proteïna present en *Arabidopsis thaliana* que presenta dominis PH, RLD i FYVE en la seva seqüència, i que s'uneix a fosfoinosítids monofosfat (Heras i Drobak, 2002). UVR8 (UV-resistance locus-8) és una altre proteïna d'*Arabidopsis thaliana* que presenta un alt grau d'homologia amb la proteïna de mamífer HERC4 (38% d'identitat amb el domini RLD de ratolí), que s'acumula en el nucli en resposta a radiació UV-B i que dirigeix la resposta a aquesta radiació en plantes, unint-se a la cromatina a través de les histones i induint l'expressió de gens com el de HY5 i gens involucrats en la biosíntesis de flavonoides (Kliebenstein *et al.*, 2002; Brown *et al.*, 2005; Kaiserli i Jenkins, 2007). La proteïna Nd6p (non-discharge protein-6) que es troba en el protozou *Paramecium tetraurelia*, presenta dos dominis RLD en el seu extrem N terminal que són essencials per la seva funció, l'exocitosis de grànuls de nucli dens (Gogendeau *et al.*, 2005).

En bacteris, mitjançant la base de dades pfam, hem identificat 65 proteïnes que presenten repeticions canòniques RCC1. Tot i que no se n'ha descrit cap a dia d'avui, serà d'un gran interès l'estudi a nivell d'estructura i de funció d'algunes d'elles com per exemple la proteïna Q74DR4 (*Swissprot accession number*) que conté més de 2000 residus i sis repeticions RCC1 en el seu extrem N terminal i que es troba en bacteris com el *Geobacter sulfurreducens* (Bateman *et al.*, 2000 i 2002).

També existeixen alguns virus que contenen proteïnes amb dominis RLD com per exemple les proteïnes neseORF72 i neseORF73 que es troben en el nucleopolihedrovirus *Neodiprion sertifer* (Bateman *et al.*, 2002 i 2000).

1.1.1.1.4 | Relació RLD i malalties

Mutacions en proteïnes de la superfamília RCC1 han estat relacionades amb diferents malalties. Entre elles, un dels casos més ben estudiats correspon al de la proteïna RPGR. Mutacions en RPGR són responsables d'un 70-80% dels casos de la malaltia retinitis pigmentosa lligada al cromosoma X (XLRP), una de les formes més severes de degeneració de la retina humana (Shu *et al.*, 2007). S'han descrit més de 200 mutacions d'aquesta proteïna que causen la malaltia, moltes d'elles en el domini XLRP. El 5% restant de mutacions s'han relacionat amb altres tipus de degeneració de la retina i amb la disquinèsia ciliar, una malaltia que provoca infeccions en el tracte respiratori superior i en l'orella mitjana així com la pèrdua d'oïda (Shu *et al.*, 2007). Tots aquests fenotips i funcions relacionades amb aquesta proteïna són consistents amb un paper de RPGR en el transport que té lloc a través dels microtúbuls en els cilis (Shu *et al.*, 2007).

El gen que codifica per a la proteïna Alsin va ser descobert com el gen codificat en el locus ALS2, el qual havia estat relacionat prèviament amb la forma autosòmica recessiva de l'esclerosi lateral amiotròfica juvenil (jALS) (Hadano *et al.*, 2001; Yang *et al.*, 2001). A dia d'avui s'han identificat fins a 10 mutacions en el gen de l'Alsin que causen aquesta malaltia i totes elles generen formes truncades de la proteïna (Gros-Louis *et al.*, 2006; Chandran *et al.*, 2007). Cal destacar que en aquells casos en els quals la truncació té lloc al principi de la proteïna i que afecta als dominis RLD, causen la malaltia jALS que es caracteritza per la degeneració de les motoneurons de la columna vertebral superior i inferior. En canvi, truncacions menys severes provoquen tant l'esclerosi lateral primària juvenil (jPLS), com la paraplàgia hereditària espàstica ascendent infantil (IAHSP), en les quals es veuen afectades les motoneurons superiors (Gros-Louis *et al.*, 2006). Sorprenentment, tot i que ratolins *knock out* per al gen de l'Alsin no mostren dèficits motors obvis (Cai *et al.*, 2005; Deng *et al.*, 2007), les seves neurones semblen presentar una major susceptibilitat a l'estrès oxidatiu (Cai *et al.*, 2005). En aquest sentit, la connexió entre l'Alsin i l'estrès oxidatiu podria residir en la capacitat de l'Alsin d'unir-se a la Cu/Zn Superòxid dismutasa 1 (SOD1), una proteïna codificada en el locus ALS1 involucrat en l'ALS autosòmica dominant (Kanekura *et al.*, 2004 i 2005). A més, s'ha observat que l'Alsin, a través del seu domini DH/PH, actua com a antagonista dels efectes neurotòxics causats per mutacions dominants en SOD1 (Kanekura *et al.*, 2004 i 2005). Finalment, ratolins *knock out* per al gen de l'Alsin han estat recentment descrits de presentar linfopènia i altres abnormalitats hematopoètiques que recorden a les observades en pacients d'ALS (Provinciali *et al.*, 1988; Erie *et al.*, 2007) i que apunten a un possible paper d'aquesta proteïna en l'etiopatogènesis de l'ALS.

Nek8 és una altre proteïna amb dominis RLD relacionada amb una malaltia. Aquesta proteïna es troba sobreexpressada en tumors de mama en humans (Bowers i Boylan, 2004). S'ha relacionat una mutació en el domini RLD de Nek8 (G448V), amb una forma autosòmica recessiva de la poliquistosi de ronyó en murins (PKD) coneguda com a ronyó quístic juvenil o *jck* (Liu *et al.*, 2002; Torres i Harris, 2006). Aquesta malaltia es caracteritza per la pèrdua de Nek8 en els cilis de l'epiteli renal que resulta en la formació de cilis amb una estructura anormal que provoca la formació de quists (Smith *et al.*, 2006; Trapp *et al.*, 2008). Tot i que no es coneix en massa detall els mecanismes que controlen la formació d'aquests quists, sembla que està regulada per la via de senyalització en la que participa Nek8 i Pkd1 (una altre proteïna involucrada en la PKD) (Natoli *et al.*, 2008). Per altra banda, recentment han estat identificades mutacions en la Nek8 humana com a les causants de la malaltia quística renal nefronoftisis tipus 9 (Otto *et al.*, 2008), i s'ha suggerit que Nek8 podria estar també relacionada amb la PKD humana (Cai i Somlo, 2008).

Les malalties associades amb les proteïnes HERC, s'han comentat en l'apartat de membres de la família de proteïnes HERC.

Apart de la possible presència d'autoanticossos anti PAM en alguns pacients esquizofrènics (Wang *et al.*, 2003), no existeixen més evidències de la relació d'aquesta proteïna amb cap malaltia en humans. No obstant, l'ortòleg en murins de PAM, Phr1, és el millor candidat per ser el responsable del síndrome de l'angoixa respiratòria que provoca la mort dels ratolins al néixer (Collier *et al.*, 2005). En els ratolins amb aquest símptoma, el nervi frènic no innerva el diafragma i si bé els músculs intercostals si que estan innervats, presenten terminals nervioses dismòrfiques (Collier *et al.*, 2005). Aquest fenotip correlaciona tant amb el paper conservat evolutivament dels ortòlegs de Phr1 en el desenvolupament sinàptic (DiAntonio *et al.*, 2001; Liao *et al.*, 2004; Nakata *et al.*, 2005; Collins *et al.*, 2006; Wu *et al.*, 2007) com amb el seus efectes en la navegació dels axons motors en embrions (Lewcock *et al.*, 2007). Curiosament, la malaltia de Hirschsprung en humans sovint ve acompanyada del síndrome de l'hiperventilació central congènita, i s'ha proposat que aquesta podria estar causada per deleccions

genòmiques tant en el gen *Ednrb* (responsable de la malaltia de Hirschsprung) com als voltants del gen de PAM (Collier *et al.*, 2005).

El gen que codifica per a la proteïna WBSCR16 es troba localitzat en la regió cromosòmica crítica per al síndrome de Williams-Beuren (WBS) i és un dels molts gens situats en la posició 7q11.23 que presenten una de les seves còpies delecionades en aquest tipus de desordre que afecta al desenvolupament neuronal. Es creu que el síndrome WBS apareix com a resultat de l'haplodeficiència de múltiples gens en aquesta regió, tot i que es desconeix si WBSCR16 té algun paper en el fenotip d'aquest síndrome (Merla *et al.*, 2002).

La nomenclatura de la proteïna DelGEF prové de la localització del seu gen en el locus de la sordesa DFNB18, així com del seu possible rol com a GEF. Tot i que no s'ha detectat activitat GEF per a DelGEF, s'ha demostrat que el gen responsable de la sordesa no sindròmica recessiva (DFNB18B) no correspon al gen de DelGEF sinó al de USH1C (Ouyang *et al.*, 2002). Per tant, en l'actualitat no s'ha associat cap malaltia en humans relacionada amb DelGEF.

Finalment, el gen de RCBTB1 i els gens de CLLD7 i CHC1L es troben localitzats propers entre ells en la posició 13q14 del genoma. RCBTB1 és possiblement un gen supressor de tumors per a la leucèmia linfocítica crònica de cèl·lules B (B-CCL) (Mabuchi *et al.*, 2001; Mertens *et al.*, 2002; Salomou *et al.*, 2003), mentre que el gen de RCBTB2 podria tenir la mateixa funció en càncers de pròstata esporàdics (Latil *et al.*, 2003).

1.1.1.1.5 | Conclusions

La identificació de RCC1 com a GEF per a Ran fa més de 20 anys, va suggerir que la presència d'aquest domini en altres proteïnes podria aportar-los activitat GEF per actuar sobre altres "small" GTPases. Tot i que això és cert per altres dominis amb activitat GEF (Bos *et al.*, 2007), no sembla complir-se pels dominis RLD. De fet, es pot concloure que aquests dominis més que compartir una mateixa funció, comparteixen una estructura conservada molt versàtil que ha estat adoptada per vàries proteïnes per realitzar diferents funcions.

Els dominis RLD participen en interaccions proteïna-proteïna. En alguns casos la interacció es produeix amb "small" GTPases, però únicament en el cas de RCC1 s'ha observat activitat GEF. Tot i que alguns membres d'aquesta superfamília són bons candidats per a poder actuar com a GEFs (Claret, GLO-4), el nombre de membres d'aquesta superfamília que presenten veritablement aquesta activitat segueix sent un misteri.

En altres casos, la unió d'aquests dominis a determinades proteïnes podria estar afectant a la localització o a l'activitat d'aquestes. Per exemple, la localització de RPGR en els cilis connectors depèn de la unió del seu domini RLD a la proteïna RPGRIP, mentre que el domini RLD de PAM inhibeix l'activitat de certes adenilil ciclasas. També s'ha descrit que els dominis RLD s'uneixen a lípids (cas d'HERC1). Totes aquestes dades posen de rellevància la gran versatilitat funcional que presenten el domini RLD.



1.1.1.2 | El domini HECT

L'altre tipus de domini que defineix a les proteïnes de la família HERC és el domini HECT (*homologous to E6AP COOH terminus domains*). Com el seu nom indica, es tracta d'un domini que es caracteritza a nivell estructural per presentar homologia amb l'extrem carboxi terminal de la proteïna associada a la proteïna vírica E6, E6AP (o UBE3A), una proteïna de 350 aminoàcids aproximadament.

En condicions patològiques, l'E6AP forma un complex estable amb l'oncoproteïna E6 del virus del papiloma humà d'alt risc (tipus 16 i 18), actuant com a E3 ubiquitina lligasa per al supressor tumoral p53, i induint la seva degradació via proteosoma 26S (Scheffner *et al.*, 1993). En condicions fisiològiques E6AP també es troba actiu, i catalitza la ubiquitinació d'altres substrats com per exemple Blk (tirosina quinasa de la família de Src) (Oda *et al.*, 1999), HHR23A (Kumar *et al.*, 1999) o la proteïna multicòpia de manteniment 7 (Kuhne i Banks, 1998).

Recentment s'ha descrit que l'E6AP intervé en la ubiquitinació i la degradació via proteosoma 26S de la tuberina (TSC2) (Zheng *et al.*, 2008), una proteïna que forma un complex amb l'hamartina (TSC1) que regula negativament el creixement i el tamany cel·lular a través de l'inhibició de mTOR (Inoki i Guan, 2006) (veure apartat via de senyalització de mTOR). A més, com es va descriure en el laboratori del Dr. Kun Liang Guan en col·laboració amb el nostre laboratori (Chong-Kopera *et al.*, 2006) (i com es mostrarà en l'apartat de resultats), TSC2 interacciona amb HERC1. S'ha descrit també que la proteïna E6AP induïx la ubiquitinació i la degradació via proteosoma 26S de p53, hScrib i E6TP1, així com de TSC2, tant en presència de la proteïna E6 del virus del papiloma humà (HPV16) (Scheffner *et al.*, 1993; Nakagawa i Huibregste, 2000; Lu *et al.*, 2004) com en absència d'aquesta proteïna, i que juga un paper fisiològic en el temps de vida mitja de TSC2 (Zheng *et al.*, 2008).

A nivell estructural, el domini HECT de la proteïna E6AP humana està format per una gran lòbul N terminal constituït majoritàriament per hèlixs α (residus 495-737), que es troba connectat mitjançant una frontissa de tres residus (residus 738-740) a un lòbul C terminal més petit amb estructura α/β que conté el residu cisteïna necessari per a la formació de l'enllaç tioester amb la ubiquitina (cisteïna 820). En la figura 2 es mostra l'estructura tridimensional del domini HECT corresponent a la proteïna E6AP humana associat amb l'E2 UbcH7.

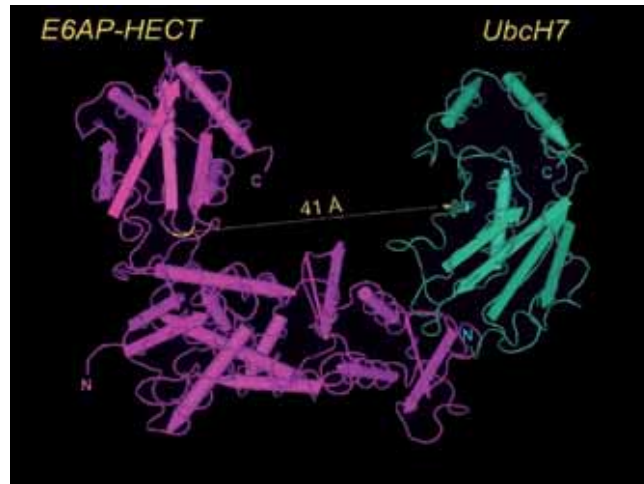


Figura 2. Estructura del domini HECT de la proteïna E6AP humana (en rosa) unit a l'E2 UbcH7 (en verd). UbcH7 s'associa al domini HECT de l'E6AP a través del de seu lòbul N, permetent l'encarament de la seva cisteïna catalítica (cisteïna 86) amb la cisteïna catalítica del domini HECT, separades a una distància de 41 Å (ambdues cisteïnes representades amb color groc) (modificat de Garcia-Gonzalo i Rosa, 2005).

Posterior a l'estudi i caracterització de l'E6AP, es van anar identificant diverses proteïnes que presentaven un extrem C terminal homòleg al d'aquesta proteïna, comprovant-se que moltes d'elles també eren capaces de formar enllaços tioester amb l'ubiquitina, lo qual suggeria que es tractava probablement de proteïnes amb activitat E3 ubiquitina lligasa (Huibregtse *et al.*, 1995; Schwarz *et al.*, 1998). Des de llavors i fins a dia d'avui, la presència d'aquest domini defineix un dels tres tipus d'E3 ubiquitina lligasa (juntament amb les E3 tipus RING finger (*really interesting new gene finger*) i el domini tipus U-box). Les E3 ubiquitina lligasa de tipus HECT es diferencien dels altres dos tipus per ser les úniques que estableixen un enllaç tioester amb la ubiquitina a través de la seva cisteïna catalítica, abans de que es produeixi la transferència de la ubiquitina als substrats corresponents. En canvi, les E3 tipus RING finger i U-box actuen únicament apropant els substrats als enzims E2 per tal que es pugui produir la transferència desde l'E2 als substrats.

Les proteïnes amb activitat HECT E3 ubiquitina lligasa (i en general totes les E3 ubiquitina lligases) són les responsables de l'especificitat de substrat en els processos d'ubiquitinació. S'assumeix que aquesta especificitat ve determinada per l'extrem N terminal d'aquestes proteïnes (mentre que el domini HECT es sol trobar en l'extrem C terminal).

1.1.1.2.1 | Subfamílies

En funció dels motius presents en l'extrem N terminal de les HECT E3 ubiquitina lligases aquestes es classifiquen en tres subfamílies (Scheffner i Staub, 2007):

- HECT E3 amb dominis RLD (família de proteïnes HERC)

(veure apartat 1.1.2 Classificació i membres de la família de proteïnes HERC).

- HECT E3 amb dominis WW (Nedd4/Nedd4-like E3s)

Aquesta subfamília està formada en humans per 9 membres que a part de presentar un domini HECT en l'extrem C terminal, comparteixen tots ells una estructura comú que consisteix amb un domini

C2 d'unió a fosfolípids de forma dependent de calci en el seu extrem N terminal, i d'entre dos i quatre dominis WW d'unió a regions riques en prolina. A nivell funcional aquest tipus de HECT E3s estan relacionades amb varis processos com ara l'endocitosi (Polo *et al.*, 2002), la degradació de proteïnes de membrana (Abriel *et al.*, 1999), el control del creixement cel·lular (Wang *et al.*, 2007) i l'acoblament de la càpside en virus (Blot *et al.*, 2004). A més, s'ha relacionat aquest tipus de proteïnes amb algunes malalties com ara l'hipertensió (Abriel *et al.*, 1999), el càncer (Fukuchi *et al.*, 2002), i defectes en el sistema immunològic (Fang *et al.*, 2002). Entre els seus membres es troben entre d'altres les proteïnes Nedd4-1, Nedd4-2 (relacionades amb la formació de la càpside de retrovirus i amb la senyalització cèl·lules T) smurf 1 i smurf 2 (relacionades amb la senyalització via TGF β /BMP) i Itch (relacionada amb la diferenciació de cèl·lules Th2, la senyalització via TNF α , el control del cicle cel·lular i l'apoptosi). Totes elles són principalment proteïnes citosòliques (Kumar *et al.*, 1997; Anan *et al.*, 1998), tot i que smurf per exemple s'ha pogut detectar en el nucli quan es troba sobreexpressada (Kavsak *et al.*, 2000). Aquest subtipus de proteïnes s'uneixen a la membrana plasmàtica a través del seu domini C2, com per exemple Nedd4-1 que pot interaccionar de manera dependent de calci amb l'anexina 13 i dirigir-se posteriorment a la membrana apical de les cèl·lules epitelials MDCK (Plant *et al.*, 2000).

- HECT E3 sense dominis RLD ni WW (SI(n)gle)-HECT E3s)

Dins d'aquest tipus d'HECT E3s s'hi inclouen les proteïnes E6AP (membre fundador de la família d'E3 ubiquitina lligases tipus HECT), EDD i HECTH9. La EDD es troba sobreexpressada en càncers de mama i d'ovaris i s'ha relacionat amb el desenvolupament tumoral (Callaghan *et al.*, 1998; Fuja *et al.*, 2004). També s'ha descrit que la EDD participa en diferents processos com la potenciació de la transactivació transcripcional mediada pel receptor de progesterona (Henderson *et al.*, 2002; Honda *et al.*, 2002), la regulació de la resposta al dany a l'ADN, i en el control de l'eficència de la traducció. La HECTH9 es troba també sobreexpressada en diferents tumors (Adhikary *et al.*, 2005), i mitjançant experiments de sobreexpressió s'ha observat que participa en la transactivació transcripcional mediada per p53 (Gu *et al.*, 1995), i en la ubiquitinació de proteïnes com la mateixa p53, les histones, la proteïna anti-apoptòtica Mcl-1 i la proto-oncoproteïna c-myc (Adhikary *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2005; Zhong *et al.*, 2005).

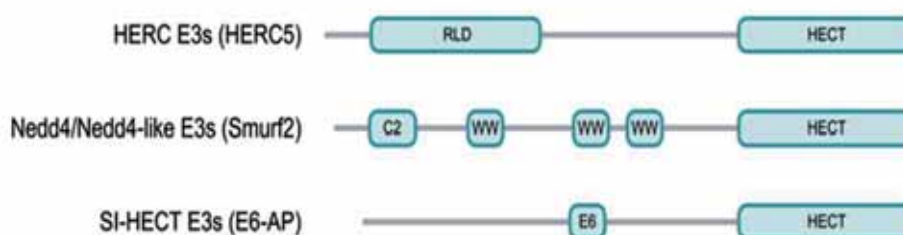


Figura 3. Família de les E3 ubiquitina lligases de tipus HECT. Tots els membres presenten el domini HECT a l'extrem N terminal. En funció de la resta de dominis que contenen es defineixen els tres subtipus: dominis RLD (família de proteïnes HERC), dominis WW (Nedd4/Nedd4-like E3s) o absència de dominis RLD i WW (SI(n)gle)-HECT E3s). En la figura es mostra de forma esquemàtica un dels membres de cada subfamília: HERC5, smurf2 i E6AP respectivament (adaptat de Scheffner i Staub, 2007).

1.1.1.2.2 | La Família de proteïnes Ubiquitin like (Ubl)

Després dels processos de transcripció i traducció necessaris per a la síntesis de proteïnes, aquestes poden ser objecte de diferents tipus de modificacions covalents post-traduccionals. En aquest tipus de modificació, les proteïnes recent sintetitzades poden incorporar desde grups químics de tamany relativament petit (com grups fosfat, metil o acetil) fins a proteïnes senceres (com ubiquitina o SUMO),

que afecten de diferent manera a la seva funcionalitat, estabilitat, localització, o interacció amb altres proteïnes. La transferència d'una o varies molècules de la família de proteïnes *Ubiquitin like* (Ubls) a diverses proteïnes substrat és un tipus de modificació post-traducciona comú en la regulació de diverses funcions cel·lulars on intervenen entre d'altres, proteïnes que presenten activitat HECT E3 ubiquitina lligasa.

La família de les Ubls està formada per diferents membres que tot i no presentar un alt grau d'homologia, presenten un mateix tipus d'estructura tridimensional que es coneix com a plegament tipus ubiquitina o plegament β -Grasp (Hochstrasser, 2000). A més, totes elles presenten una glicina en el seu extrem C terminal, que és per on té lloc la seva conjugació a les proteïnes substrat.

En la Taula 2 es mostren els principals membres de la família de les Ubls:

Membres família	Identitat de seqüència amb la ubiquitina (%)	Substrats coneguts	Funció
NEDD8	58	Cullins, p53, MDM2	Regulació d'E3s
SUMO-1	18	Molts	Localització nuclear, Regulació transcripció, ubiquitinació antagònica
SUMO-2 i 3	16	C/EBP β 1, topoisomerasa 2	Regulació transcripció, mitosi
ISG15/UCRP	~33	PLC γ 1, JAK1,STAT1,ERK1/2,Serpin2a	Resposta immune, transducció senyal interferó
FAT10	~33	-	Apoptosis, transducció de senyal de citoquines
FUB1	37	TCR α like protein Bcl-G	Activació cèl·lules T
UBL5	22	Desconeguts	<i>splicing</i> pre-ARN
URM1	12	Ahp1	Resposta a estrès oxidatiu, sensor de nutrients (a través de mTOR)
ATG8/LC3	10	Fosfatidiletanolamina	Autofàgia, vacuolització
ATG12	17	Atg5	Autofàgia, vacuolització

Taula 2. Membres de la família de proteïnes *ubiquitin like* (Ubl). Es mostra el percentatge d'identitat amb l'ubiquitina, els substrats sobre els quals es conjuguen i les funcions de cadascun dels membres de la família (modificat de Welchman *et al.*, 2005).

En el context d'aquest treball, a part de l'ubiquitina, cal destacar la modificació per ISG15 (*interferon stimulated gene product 15*) o ISGilació. La ISG15 o UCRP és una proteïna de 15 KDa que conté dos dominis ubiquitina en la seva seqüència i que s'ha descrit que es troba conjugada a diferents proteïnes en resposta a interferó, a lipopolisacàrids (LPS) i a d'altres senyals d'inflamació. En la seva conjugació en cèl·lules humanes participa de forma crítica el membre de la família de proteïnes HERC, HERC5, com a E3 ISG15 lligasa (Dastur *et al.*, 2005; Kroismayr *et al.*, 2005; Wong *et al.*, 2006)(veure apartat 1.1.2.2.3 HERC5).

• Mecanisme de conjugació de les Ubls

El procés de conjugació d'aquesta família de proteïnes als seus substrats té lloc a través d'un mecanisme enzimàtic en el qual hi participen diferents enzims. Tant la ubiquitina com la resta de Ubls són sintetitzades en les cèl·lules en forma de precursors inactius que requereixen d'un processament previ. Aquest processament té lloc per acció de proteases específiques i consisteix en una proteòlisi d'aquests precursors que genera els pèptids actius els quals es caracteritzen per la presència d'una glicina accessible en el seu extrem C terminal. A través del grup carboxil d'aquesta glicina és per on té lloc la seva conjugació als diferents substrats.

Abans de la seva conjugació però, les proteïnes Ubl requereixen ser activades (Haas i Rose *et al.*, 1982). Un enzim específic anomenat E1 o E1-like utilitza ATP per adenilar les Ubls en el seu extrem C terminal. A continuació, l'enllaç ric en energia format, és atacat pel grup sulfhidril de la cisteïna del centre actiu de l'E1 formant un enllaç tioester ric en energia amb l'Ubl, i alliberant una molècula d'AMP. Posteriorment, la Ubl és transferida a la cisteïna del centre actiu d'un enzim E2 o E2-like (o enzims conjugadors d'Ubl) i finalment, és transferida al seu substrat mitjançant la participació d'un enzim E3 (o enzim ubiquitina lligasa) establint-se un enllaç isopeptídic o amida entre el grup carboxil de la glicina C-terminal de la Ubl i un grup amino ϵ d'un residu lisina de la proteïna substrat (Figura 4) (Chau *et al.*, 1989; Ciechanover *et al.*, 2000). El procés de conjugació d'aquestes proteïnes presenta encara un grau més de regulació gràcies a l'existència dels anomenats enzims deubiquitinants o DUBs. Aquests enzims catalitzen el procés a la inversa, és a dir eliminant les Ubls d'aquelles proteïnes amb qui interaccionen (a més de regular altres processos cel·lulars com la senyalització, la reparació de l'ADN, i el transport vesicular (Amerik i Hochstrasser, 2004)).

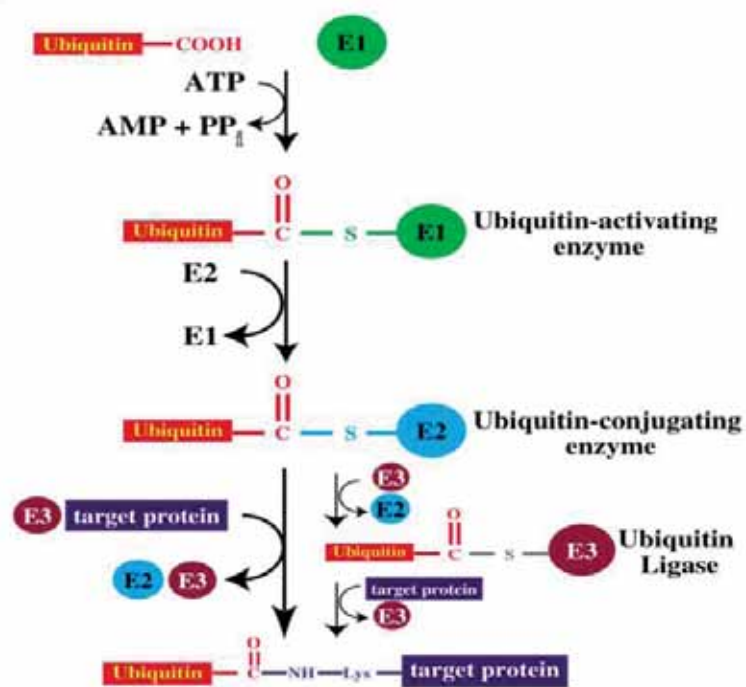


Figura 4. Esquema del mecanisme enzimàtic del procés d'ubiquitinació de proteïnes (vàlid també per la conjugació de Ubls). L'E3 de l'esquema representa un E3 de la família HECT ja que aquests són els únics que s'uneixen de forma covalent a la ubiquitina abans de transferir-la als substrats (veure tipus d'E3 ubiquitina lligases en text) (modificat de Belz *et al.*, 2002).

La conjugació d'Ubls als substrats té lloc majoritàriament a través dels residus lisina d'aquests, no obstant, en alguns casos té lloc a través del grup amino terminal de la proteïna (Ciechanover i Ben-Saadon, 2004) o en el cas de la ubiquitina a través de la cadena lateral d'una cisteïna, com s'ha descrit que succeeix per a la cadena pesada del complex major d'histocompatibilitat de classe I (MHC I) (Cadwell i Coscoy, 2005).

1.1.1.2.3 | El procés d'ubiquitinació

A l'any 2004, Avram Hershko, Aaron Ciechanover i Irwin Rose van ser galardonats amb el premi Nobel de química pel seu descobriment sobre les funcions d'una proteïna petita (76 residus) que s'expressava de forma ubícuca en cèl·lules eucariotes i que es va anomenar per aquest motiu ubiquitina (revisat en Welchmann *et al.*, 2005).

La ubiquitina és el membre fundador de la família de les Ubls. En el mecanisme enzimàtic de conjugació d'aquesta proteïna (o ubiquitinació) s'han descrit dos únics enzims E1 (UBE1 i recentment UBE1L2 (Pelzer *et al.*, 2007)). Aquests dos enzims presenten motius d'unió amb l'ATP (McGrath *et al.*, 1991), i un residu cisteïna en el seu centre actiu. En canvi, existeix un gran nombre d'E2 (uns 100 en humans), l'expressió dels quals és específica del tipus cel·lular (Pickart i Rose, 1985), i es caracteritzen per presentar dominis UBD (*ubiquitin binding domain*) a més d'un residu cisteïna essencial per a la conjugació amb la ubiquitina (Jentsch *et al.*, 1990; Sung *et al.*, 1990).

El nombre d'E3 ubiquitina lligases és encara major al nombre d'E2s (uns 1000 en humans) i són els responsables de l'especificitat de substrat (presenten diferents dominis d'interacció amb diferents proteïnes), de la velocitat de la reacció de la conjugació i del tipus de poli-ubiquitinació. En funció de la seva estructura i mecanisme d'actuació, els E3 es classifiquen en tres tipus: HECT, RING finger (*really interesting new genes finger*) i dominis U-box. Com s'ha comentat anteriorment, els E3 tipus HECT són els únics que formen un enllaç tioester amb la ubiquitina que ha estat prèviament incorporada als E2 just abans de transferir-la als substrats, mentre que els E3 tipus RING finger i tipus U-box no presenten propietats catalítiques i actuen únicament com a bastida apropant en l'espai l'E2 i la proteïna substrat, afavorint la transferència de la ubiquitina de l'un a l'altre (Zheng *et al.*, 2000 i 2002; Wang i Pickart, 2005). En la poli-ubiquitinació d'alguns substrats és necessari la participació d'un enzim més anomenat factor d'elongació de la cadena o E4, que s'encarrega de la formació de la cadena de poli-ubiquitina (Koepl *et al.*, 1999).

Existeixen diferents tipus d'ubiquitinació amb diferents funcions:

- La Poli-ubiquitinació o conjugació d'una cadena d'ubiquitines unides entre elles a través de la glicina C terminal i alguna de les lisines internes de la ubiquitina anterior.
- La Mono-ubiquitinació o conjugació d'una única molècula d'ubiquitina.
- La Multi-ubiquitinació o conjugació d'una molècula d'ubiquitina a diferents residus lisina de la mateixa proteïna substrat.

Els processos d'ubiquitinació s'han relacionat de forma més o menys directa amb la majoria de aconteixements que tenen lloc en la cèl·lula. Entre els més estudiats i dins el context d'aquesta tesi es troben el sistema ubiquitina proteasoma (UPS), la ubiquitinació en la transcripció i la ubiquitinació en la reparació del dany a l'ADN.

A) El sistema Ubiquitina-Proteasoma (UPS)

El primer procés al qual es va involucrar la conjugació de la ubiquitina va ser la poli-ubiquitinació com a senyalització per a la proteòlisi via proteasoma 26S. El sistema ubiquitina-proteasoma 26S (UPS) és el principal mecanisme mitjançant el qual les cèl·lules eucariotes

aconsegueixen eliminar ràpidament proteïnes amb temps de vida mitja baixos que no són funcionals (proteïnes velles o mal plegades). L'altre gran mecanisme cel·lular de degradació de proteïnes és l'autofàgia (del qual es parlarà més endavant), a través del qual té lloc l'eliminació via lisosoma de proteïnes amb temps de vida mitja alts.

El sistema UPS juga un paper essencial en molts processos cel·lulars com ara l'apoptosi, la presentació d'antigen, el cycle cel·lular, la transducció de senyal i l'expressió gènica entre d'altres (Kirschner *et al.*, 1999), i consisteix en l'addició d'una cadena d'ubiquitines a les proteïnes no funcionals, fet que és suficient perquè el proteasoma les reconegui i es produeixi la seva degradació.

El procés d'unió de diferents molècules d'ubiquitina que genera cadenes de poli-ubiquitina té lloc de la mateixa manera que es produeix la seva conjugació a les proteïnes substrat, és a dir a través de la formació d'un enllaç isopeptídic entre el grup carboxil de la glicina terminal d'una, i el grup ϵ amino d'un residu lisina de la ubiquitina anterior en la cadena. La ubiquitina conté 7 residus lisina en la seva seqüència, i tot i que tots ells han estat potencialment associats amb el procés de poli-ubiquitinació, les lisines 29, 48 i 63 són els tres residus més ben caracteritzats en la poli-ubiquitinació (Haglund i Dikic, 2005). L'intervenció d'un tipus de lisina o altre en la formació de les cadenes d'ubiquitina defineix un paper específic per aquest tipus de modificació; mentre que cadenes de poli-ubiquitina d'almenys quatre residus formades a través de lisines 29 o 48 han estat descrites com a senyals suficients per a direccionar a les proteïnes que les contenen cap al proteasoma 26S (Thrower *et al.*, 2000), les cadenes formades a través de lisines 63 participen en processos independents del proteasoma 26S com ara la reparació de l'ADN, la transducció de senyal, l'endocitosis i la funció ribosomal. També s'ha observat tant *in vitro* com *in vivo* l'existència de cadenes d'ubiquitina mixtes (amb unions a través de lisines 48 i lisines 63 en la mateixa cadena), tot i que es desconeix la freqüència i la funció d'aquest tipus de modificació *in vivo*.

Un cop s'ha produït la transferència d'una cadena d'ubiquitines (K48), les proteïnes substrat són reconegudes pel proteasoma 26S. El proteasoma 26S és una gran proteasa multicatalítica de 2000 kDa de pes molecular aproximadament (Baumeister *et al.*, 1998) que es troba tant en el citoplasma com en el nucli cel·lular (Reits *et al.*, 1997; Adori *et al.*, 2006). Està format per dos subcomplexes, un nucli 20S format per dos anells idèntics exteriors α i dos anells idèntics interiors β que conformen una cavitat central en forma de barril (Groll *et al.*, 1997), i dos complexos 19S (PA700 o PA28) orientats de forma inversa un respecte l'altre, que flanquegen el nucli 20S i que s'encarreguen de l'especificitat de substrat i possiblement del desplegament de les proteïnes abans de que puguin accedir al nucli del subcomplex 20S. Els dos anells centrals β del nucli 20S defineixen el centre actiu del proteasoma en forma de cambra central, que conté enzims proteolítics (tipus tripsina, quimiotripsina, etc.) que degraden a les proteïnes poli-ubiquitinades (K48) fins a pèptids d'entre 2 i 20 residus que posteriorment són alliberats a l'exterior (a l'igual que les molècules de ubiquitina que són reciclades). Els pèptids alliberats són degradats fins a aminoàcids lliures per mitjà d'altres peptidases (Tamura *et al.*, 1998), o bé escapen d'aquesta última proteòlisi i participen en el procés de presentació d'antigen per part del complex d'immunohistocompatibilitat de classe I (MHC I) (Rock *et al.*, 1994).

Els complexos 19S estan formats per aproximadament 20 subunitats d'entre 25 i 110 kDa que es poden classificar en dos subgrups: un subgrup format per 6 ATPases estructuralment similars entre elles, i un altre subgrup format per unes 14 subunitats heterogènies sense activitat ATPasa (Dubiel *et al.*, 1995; Coux *et al.*, 1996; Hochstrasser, 1996). Les ATPases actuen aportant energia per a l'ensamblatge del proteasoma 26S, per al desplegament de les proteïnes poli-ubiquitinades (K48) i per a la translocació d'aquestes cap a la cambra proteolítica del nucli 20S. Per a la majoria de les subunitats sense activitat ATPasa no es coneix la seva funció. En aquestes subunitats es troben el receptor de multi-ubiquitina així

com enzims deubiquitinants que participen en la captació de les proteïnes poli-ubiquitinades i en el reciclatge de la ubiquitina respectivament.

En el procés de transferència de les proteïnes poli-ubiquitinades (K48) cap al proteasoma 26S, aquestes s'uneixen a motius UIM (*ubiquitin interacting motif*), dominis UBD (*ubiquitin binding domain*), UBA (*ubiquitin associated domain*) o UBX (*ubiquitin like domain*) presents en proteïnes que formen part del proteasoma 26S com per exemple Rad23 o p47 (Buchberger, 2002).

B) Ubiquitinació en la transcripció

La ubiquitinació de proteïnes juga diversos papers en el procés de transcripció. La poli-ubiquitinació actua regulant la translocació al nucli de varis factors de transcripció a través de la degradació via proteasoma 26S dels seus inhibidors citoplasmàtics (Hay *et al.*, 1999; Karin i Ben-Neriah, 2000; Magnani *et al.*, 2000). També pot actuar activant o inhibint directament a diferents factors de transcripció (Hoppe *et al.*, 2000; Kaiser *et al.*, 2000) o bé marcant-los per a la seva degradació via proteasoma 26S (Desterro *et al.*, 2000; Blagosklonny, 2001). Per altre banda, la mono-ubiquitinació intervé en els processos de transcripció regulant l'estructura i l'accessibilitat de la cromatina a través de la modificació d'histones, permetent la unió de diferents factors a l'ADN.

La transcripció en cèl·lules eucariotes depèn de l'acoblament de certs complexos proteics en zones reguladores dels gens. Aquests complexos inclouen factors de transcripció, cofactors, així com la maquinària de transcripció (ARN polimerasa I, II i III, etc.) (Kornberg i Lorch, 1999; Lemon i Tjian, 2000). El procés de transcripció que origina la major part dels ARNm en les cèl·lules té lloc per acció de l'ARN polimerasa II, excepte la transcripció de l'ADN ribosomal que és portat a terme per l'ARN polimerasa I. Es coneixen molts E3 que actuen sobre diferents factors de transcripció d'aquestes ARN polimerases els quals han estat descrits d'estar sotmesos a una degradació mediada pel sistema UPS, com per exemple el supressor de tumors p53 i c-myc.

La regulació dels nivells de p53 a l'interior de les cèl·lules té lloc principalment a través de la E3 ubiquitina lligasa tipus RING finger, Mdm2, que s'uneix directament a p53 inhibint la seva activitat transcripcional i promovent la seva poli-ubiquitinació (K48) i degradació via proteasoma 26S. c-myc és un factor de transcripció que regula la transcripció de gens relacionats amb el creixement, la proliferació i l'apoptosis (Oster *et al.*, 2002). Aquest factor es troba modulats a l'interior de les cèl·lules pel sistema UPS. Quan s'inhibeix el proteasoma, c-myc passa al nuclèol on juntament amb la proteïna Max interacciona amb l'ADN ribosomal. Aquesta associació es veu incrementada en cèl·lules en fase exponencial de creixement, on a més de l'interacció, s'observa un reclutament del cofactor de myc TRRAP, un augment de l'acetilació de les histones, un reclutament de l'ADN polimerasa I i l'activació de la transcripció de l'ADN ribosomal (Arabi *et al.*, 2005).

Per tal de que els factors de transcripció es puguin acoblar a les zones adequades de l'ADN en el moment precís, és necessari un procés previ de descompactació de la cromatina en els llocs específics on s'ha de produir la transcripció en un moment determinat (a l'igual que succeeix en altres processos ADN dependents com la replicació, o la condensació dels cromosomes). En la regulació de la descompactació de la cromatina intervenen processos de mono-ubiquitinació de les histones. La modificació de les histones per ubiquitinació, metilació o acetilació, implica canvis en la seva estructura que permeten que els diferents processos dependents de l'ADN puguin tenir lloc. S'ha descrit que la mono-ubiquitinació de les histones H2A i H2B del nucli del nucleosoma juga un paper crític en les etapes d'iniciació i elongació de la transcripció (Pavri *et al.*, 2006), en la regulació d'altres tipus de modificacions

de les histones com l'acetilació o la metilació (Zhang, 2003) així com en la reparació de l'ADN (Osley, 2006).

C) Ubiquitinació en la reparació del dany a l'ADN

Quan es produeixen danys a l'ADN (ja sigui de forma espontània o induïda), les cèl·lules eucariotes poden respondre a aquestes lesions de tres maneres; aturant el procés de replicació de l'ADN i activant els mecanismes de reparació, saltant-se la zona de l'ADN danyada i continuar el procés de replicació de l'ADN, o bé, quan el dany és molt important, activant mecanismes de mort cel·lular. En el procés de decisió de quin tipus de resposta es produeix (*DNA damage response* o DDR) intervien diverses vies de transducció de senyal que involucren a diferents complexos proteics sensors, transductors i efectors de la reparació del dany a l'ADN (revisat en Harper i Elledge, 2007).

Un aconteixement crític en la DDR és la descompactació de la cromatina i el reclutament de diferents complexos proteics de reparació de l'ADN a la zona on s'ha produït el dany. Les cèl·lules eucariotes posseeixen diversos mecanismes per a l'acoblament d'aquests complexos, molts dels quals depenen de la mono-ubiquitinació i poli-ubiquitinació (K63) de proteïnes (Huang i D'Andrea, 2006). Un exemple de reclutament ràpid a la cromatina mediat per la ubiquitinació és el que sofreix el factor PCNA (*chromatin-bound processivity factor*) que és ràpidament mono-ubiquitinat en la seva lisina 164 a través de l'E2 RAD6 i l'E3 RAD18, o poli-ubiquitinat (K63) a través de l'E1 RAD5, l'E2 UBC13 i l'E3 MMS2 (revisat per Moldovan *et al.*, 2007). Aquestes modificacions permeten que la replicació no s'aturi gràcies al reclutament de noves ADN polimerases específiques com la ADN polimerasa η , que contenen dominis UBZ (*specialized ubiquitin binding domain*), que poden saltar-se aquestes zones errònies de l'ADN i continuar la replicació. El factor PCNA (antígen nuclear de cèl·lules en proliferació) també pot ser modificat per la UBI, SUMO (revisat en Moldovan *et al.*, 2007), inhibint el factor PCNA quan el procés de replicació transcorre correctament.

S'ha descrit que l'E3 ubiquitina lligasa supressora de tumors BRCA1 s'acumula a zones de l'ADN on s'han produït trencaments doble cadena (Scully *et al.*, 1997a i b) en resposta a l'activació de les proteïnes ATM, l'H2AX i l'MDC1 entre d'altres. Els trencaments doble cadena de l'ADN causats per l'exposició de cèl·lules a radiacions ionitzants activen a la proteïna ATM (*ataxia telangectasia mutated*) la qual fosforil·la a MDC1 i a H2AX provocant el reclutament de l'E3 ubiquitina lligasa de tipus RING finger RNF8. L'RNF8 junt amb l'E2 UBC13 medien la poli-ubiquitinació (K63) de l'histona H2AX, que actua com a recrutadora de RAP80 a través del motiu UIM d'aquesta, que a la vegada atrau a altres proteïnes de reparació de l'ADN com ABRA o BRCA1 (Huen *et al.*, 2007; Kolas *et al.*, 2007; Mailand *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2007).

També és conegut el paper d'enzims deubiquitinants (DUBs) en la reparació de l'ADN ja que diversos d'ells han estat descrits de ser substrats de les quinases ATM i ATR (Matsuoka *et al.*, 2007).

D) Ubiquitinació en l'endocitosis

El procés de mono-ubiquitinació principalment, però també el de multi-ubiquitinació o poli-ubiquitinació (K63) en residus lisina del domini citosòlic d'una gran varietat de proteïnes de la membrana plasmàtica com ara receptors, transportadors o canals iònics (Staub *et al.*, 1997), és suficient per a la seva internalització i degradació via lisosoma (Raiborg *et al.*, 2002; Di Fiore *et al.*, 2003; Haglund *et al.*, 2003; Mosesson *et al.*, 2003). Un gran nombre de proteïnes que participen com a adaptadors en processos d'endocitosis com l'Eps15 o l'Hrs presenten diversos dominis UBD (*ubiquitin binding domain*) que els permeten reconèixer proteïnes de membrana ubiquitinades i iniciar la seva internalització (Raiborg

et al., 2002) i posterior fusió als early endosomes. Un cop allà, les proteïnes poden ser reciclades i tornar a la superfície de la membrana plasmàtica o bé passar a l'interior d'aquests endosomes un cop aquests han madurat (*multi vesicular bodies* (MVB)). Els MVBs es fusionen posteriorment amb els lisosomes produint-se la proteòlisi i degradació del seu contingut.

La ubiquitinació d'aquest tipus de proteïnes de membrana actua com a senyal tant per promoure la seva internalització en vesícules primàries provinents de la membrana plasmàtica (especialment la mono-ubiquitinació i multi-ubiquitinació), com la sortida cap als *late* endosomes i posterior internalització en els multivesicular bodies (procés dependent del complex ESCRT (*endosomal sorting complex required for transport*)). Les proteïnes que no són ubiquitinades i que no poden passar a les vesícules del lumen dels MVB, són reciclades cap a la membrana plasmàtica altre cop, o bé poden escapar de la degradació via lisosomes .

Aquesta mateixa funció de la ubiquitina també té lloc a nivell del trans golgi *network* (TGN) on s'ha vist que el destí de les proteïnes recent sintetitzades que arriben a aquest orgànul (provinents tant de la membrana plasmàtica com dels endosomes de la via lisosomal), depèn també de la seva ubiquitinació (Helliwell *et al.*, 2001).

La ubiquitinació en la regulació de l'endocitosis també té lloc a través de la mono-ubiquitinació de la pròpia maquinària d'endocitosis com per exemple la β -arrestina, la CIN85, l'Eps15 o l'Hrs, ja que s'ha observat que alguns receptors de membrana, com el receptor de l'hormona de creixement, s'internalitzen sense ser objecte d'una ubiquitinació directa, però requereixen que la maquinària d'ubiquitinació sigui funcional per poder-ho fer (revisat en Strous i Grovers, 1999; van Kerkhof *et al.*, 2000).

A continuació a mode de resum, es mostren els diferents tipus d'ubiquitinació i la seva funció. S'inclouen altres tipus d'ubiquitinació menys freqüents així com altres processos en els quals també s'ha involucrat a la ubiquitina (Taula 3):

Tipus de modificació	Funcions
Mono-ubiquitinació	Endocitosis, sortida a endosomes, regulació histones, reparació ADN, acoblament càpsida virus, export nuclear, expressió gènica, localització subcel·lular.
Multi-ubiquitinació	Endocitosis.
Poli-ubiquitinació	
K48	Degradació via proteasoma 26S.
K63	Reparació ADN, endocitosis, activació de proteïnes quinasa, traducció, senyalització NFkB.
K6	Funció BRCA1?
K29	Degradació via proteasoma 26S?

Taula 3. Tipus de modificacions post-traduccionals per ubiquitina i funció implicada en cadascuna d'elles.

1.1.2 | Classificació i membres de la família de proteïnes HERC

En l'actualitat existeixen 6 membres en la família de proteïnes HERC humanes (Taula 4).

Family member	Chromosomal localization	Gene size (kb)	Exon number	Human-Mouse identity (%)	Protein size (kDa)
HERC1	15q22	225	78	96	532
HERC2	15q13	211	93	95	528
HERC3	4q21-22	116	26	92	117
HERC4	10q21	153	29	91	118
HERC5	4q22	49	23	n.a.	117
HERC6	4q22	64	25	66	115

Taula 4. Membres de la família de proteïnes HERC en humans. Es mostra la localització cromosòmica, el tamany del gen, el nombre d'exons, la identitat de seqüència entre el gen humà i el de ratolí, i el tamany de la proteïna, per a cadascun dels 6 membres de la família. n.a =no aplicable (ja que HERC5 no es troba en ratolí) (adaptat de Garcia-Gonzalo i Rosa, 2005).

Els membres de la família HERC es poden subclassificar en funció del seu tamany com a proteïnes HERC gegants i proteïnes HERC petites. Aquesta classificació correlaciona també amb la presència de més d'un domini RLD per a les proteïnes HERC grans, i un únic domini RLD per a les proteïnes HERC petites, apart d'un domini HECT únic present en totes elles (Figura 5).

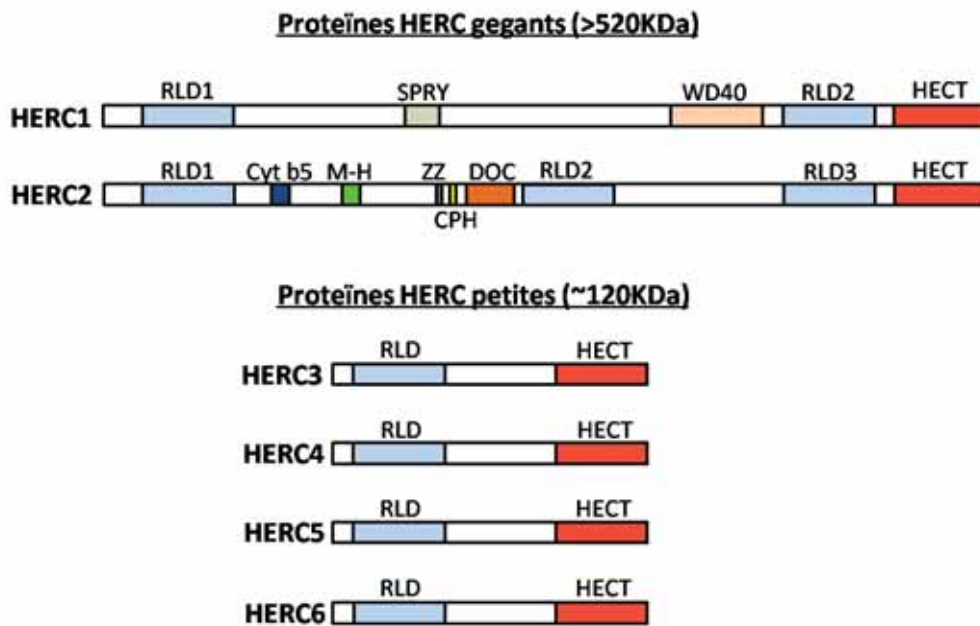


Figura 5. Classificació proteïnes de la família HERC agrupats en funció del seu tamany com a proteïnes HERC gegants (HERC1 i HERC2) i proteïnes HERC petites (HERC3, HERC4, HERC5 i HERC6). Es mostra de forma esquemàtica els dominis de cadascun dels membres de la família (veure text).

1.1.2.1 | Proteïnes HERC gegants

1.1.2.1.1 | HERC1

La proteïna HERC1 és el primer membre de la família de proteïnes HERC que va ser descobert i el membre fundador de la família. Anomenat originàriament p619 i posteriorment p532 d'acord a les diferents estimacions inicials del seu pes molecular, va ser descoberta durant la búsqueda de seqüències oncogèniques humanes a partir de cèl·lules de càncer de mama, i mitjançant assajos de tumorigenicitat en ratolins (Fasano et al., 1984). Com a resultat d'aquests experiments es va aïllar una seqüència d'ADN de 150 Kb (que contenia fragments de dos loci humans) que que era capaç d'induir tumors en ratolins immunosuprimits (Rosa et al., 1996). Aquest fragment d'ADN, anomenat *OncH*, es va utilitzar posteriorment per a la identificació de seqüències mitjançant la tècnica d'atrapament d'exons (*exon trapping*), obtenint-se com a resultat un únic exó, la seqüència del qual codificava per una part del regulador de la condensació cromosòmica 1 o RCC1, lo qual la situava com a bona candidata per actuar com a regulador del cicle cel·lular (Rosa et al., 1996).

L'aïllament del cADN complet d'aquest nou gen a partir d'una llibreria de cADNs de cervell de fetus humà va permetre obtenir 8 clons que contenien seqüències solapades i que configuraven un cADN de 15171 parells de bases amb un únic "open reading frame" (ORF) que predeïen una proteïna de 4861 aminoàcids i 532 KDa de pes molecular. A diferència del fragment original *oncH*, no s'han descrit però propietats oncogèniques per aquesta proteïna anomenada actualment HERC1.

L'anàlisi de la seqüència d'aminoàcids de la proteïna HERC1 (coneguda llavors com a p619) va revelar la presència de varis dominis estructurals (Figura 6):

- Dues regions d'elevada homologia entre elles així com amb la proteïna RCC1, formades per 7 repeticions de 50-56 aminoàcids localitzades als extrems de la proteïna. Degut a la gran homologia amb RCC1 es van designar com a dominis RLD (*RCC1 like domains*)(veure apartat domini RLD).
- Un domini WD40 format per set repeticions β degenerades (o repeticions WD) amb funcions d'interacció proteïna-proteïna i plegades en forma d'una hèlix de set aspes similar a la de RCC1 (Sondek et al., 1996) típica de la subunitat β de proteïnes G heterotrimèriques (Neer et al., 1994).
- Un domini HECT en l'extrem carboxi terminal característic de les proteïnes E3 ubiquitina lligasa (Huibregtse et al., 1995)(veure apartat domini HECT).

A més, també es van identificar altres motius menors com:

- Un domini d'interacció proteïna-proteïna o proteïna-ARN anomenat SPRY (*SPla and Ryanodin receptor*) (Woo et al., 2006) que presenta un plegament tipus immunoglobulina en forma de sandwich β (Seto et al., 1999; Rhodes et al., 2005) i que ha estat relacionat amb diferents processos com la senyalització per citoquines, la resposta immunològica innata, el metabolisme de l'ARN, l'alliberament de calci intracel·lular i el desenvolupament (Rhodes et al., 2005; Woo et al., 2006).
- Una zona rica en prolines semblant a les seqüències consens d'unió a SH3 de classe II (Feng et al., 1994).

- Una zona constituïda per un elevat nombre d'aminoàcids polars àcids.
- Un domini semblant al domini cremallera de leucina (*Leucine zipper*).
- Vàries zones consens de fosforil·lació per proteïnes quinasa dependents d'AMP cíclic (PKA) (Kennelly i Krebs, 1991).

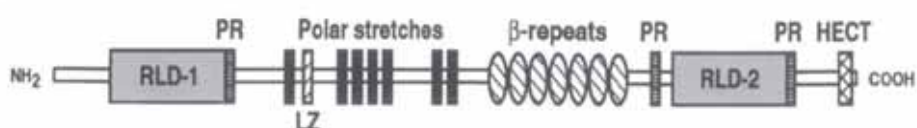


Figura 6. Esquema de l'estructura de la proteïna HERC1 inicialment anomenada p619. Es mostren els principals motius estructurals predits inicialment per aquesta proteïna. LZ: *Leucine zipper*, PR: regions riques en prolina (adaptat de Rosa *et al.*, 1996).

Mitjançant estudis de northern blot a partir d'extractes d'ARN totals de teixits de ratolí inicialment i d'humans posteriorment, s'ha constatat que HERC1 s'expressa de forma ubicua però especialment en testicles i cervell, i en menor grau en fetge. A més, s'ha pogut observar la sobreexpressió de la proteïna en diferents línies cel·lulars tumorals humanes tant a nivell d'ARNm com de proteïna (Rosa *et al.*, 1996; Garcia-Gonzalo i Rosa dades no publicades).

A nivell de distribució subcel·lular, HERC1 es troba localitzada exclusivament en el citoplasma tant en forma soluble com en fraccions de membranes internes com ara vesícules o l'aparell de Golgi. Pel que fa a l'aparell de Golgi, en cèl·lules de ronyó de rata (NRK) s'ha vist que el tractament amb el metabolít fúngic Brefeldina A provoca una modificació en el marcatge perinuclear d'HERC1 així com de la proteïna associada a l'aparell de Golgi p58 (Lippincott-Schwartz *et al.*, 1989; Rosa *et al.*, 1996). En canvi, no s'ha observat la presència d'HERC1 ni en el nucli ni en la membrana cel·lular.

A nivell de funció, degut a la similitat estructural entre HERC1 i RCC1 (i el paper d'aquesta darrera com a GEF per a Ran) i a la col·localització de la primera amb proteïnes marcadores de l'aparell de Golgi com p58, els primers treballs sobre la funcionalitat d'HERC1 es van orientar a l'estudi de la interacció i del possible paper d'HERC1 com a GEF per a "small" GTPases involucrades en el tràfic vesicular de l'aparell de Golgi, com ara membres de la família de les proteïnes ARF i Rab. A partir d'experiments d'immunoprecipitació en cèl·lules Sf9 que sobreexpressaven un pèptid dels darrers 1350 aminoàcids de l'extrem C terminal d'HERC1 (que incloïa part del domini de repeticions β , el domini RLD2 i el domini HECT) i diferents GTPases involucrades amb el tràfic vesicular, es va obtenir un únic resultat positiu per a la interacció d'HERC1 amb la proteïna ARF1. Aquest resultat va ser corroborat i acotat mitjançant la incubació dels dominis RLD1 i RLD2 purificats de cèl·lules Sf9 amb llisats del mateix tipus cel·lular en el qual s'havia transfectat prèviament ARF1, observant-se únicament la interacció d'ARF 1 miristoïlat amb el domini RLD2. A més, en experiments d'immunofluorescència en cèl·lules CCD45SK es va poder observar col·localització entre HERC1 i ARF1 en l'aparell de Golgi.

Per esbrinar si HERC1 presentava activitat GEF per a ARF1, es van purificar els dominis RLD1, RLD2 i la proteïna ARF1 a partir de cèl·lules Sf9, i es van realitzar experiments d'incorporació de GTP amb la proteïna ARF1 pre-incubada amb GDP marcat amb triti, en presència i/o absència dels dominis RLD1 i RLD2 o tots dos conjuntament. Els resultats que es van observar van ser els d'un major

alliberament de GDP marcat en presència del domini RLD1, de manera dependent de la concentració. Tot i que no s'havia observat interacció física d'HERC1 amb diferents membres de la família Rab, experiments del mateix tipus sobre algunes proteïnes d'aquesta família com Rab3a o Rab5, van revelar que RLD1 era capaç també d'estimular l'alliberament de GDP en aquestes proteïnes. En canvi, per altres proteïnes com Ran o R-Ras2/TC21 es van obtenir resultats negatius.

Tots aquests resultats suggerien un possible paper d'HERC1 com a proteïna de suport i com a GEF per a ARF1 (a través dels seus dominis RLD2 i RLD1 respectivament) i únicament com a GEF per algunes proteïnes Rab, i per extensió, un possible paper d'HERC1 en el tràfic vesicular de l'aparell de Golgi (ARF1), vesícules sinàptiques (Rab3A), membrana plasmàtica i vesícules amb coberta de clatrina (Rab5) (Rosa *et al.*, 1996). No obstant, posteriorment s'ha observat que HERC1 més que actuar com a GEF juga un paper com a factor alliberador de nucleòtids de guanina (GFR) ja que més que estimular el bescanvi GDP/GTP sobre les citades GTPases, afavoreix l'alliberament de GDP però no l'unió d'una nova molècula de GTP (Garcia-Gonzalo *et al.*, 2005). A més, s'ha vist que aquesta activitat d'HERC1 requereix la presència de PI(4,5)P₂ associat al domini RLD1 per a què pugui tenir lloc (Garcia-Gonzalo *et al.*, 2005).

A diferència del que s'ha observat pel domini RLD1, el domini RLD2 no presenta activitat GEF ni GFR sobre cap de les GTPases citades, però en canvi és capaç d'unir ARF1 i altres proteïnes com la cadena pesada i lleugera de la clatrina (CHC i CLC) (Rosa *et al.*, 1996; Rosa i Barbacid, 1997; Garcia-Gonzalo i Rosa, dades no publicades). La unió d'HERC1 amb aquestes proteïnes confirma el seu possible paper en el tràfic vesicular a nivell de l'aparell de Golgi i del citoplasma (la clatrina forma part de la coberta d'un gran nombre de vesícules intracel·lulars). És més, únicament la fracció citosòlica d'HERC1 és capaç d'unir-se a la cadena pesada de la clatrina (i també a la cadena lleugera (Garcia-Gonzalo i Rosa, dades no publicades)) i a la xaperona involucrada en el desacoblament de la coberta de vesícules amb coberta de clatrina (CCV), Hsp70 (*heat shock protein 70*) (Chappell *et al.*, 1986; Heymann *et al.*, 2005). S'ha descrit l'Hsp70 es dissocia del complex format amb HERC1 i la clatrina en presència d'ATP (Rosa i Barbacid, 1997).

Apart de les característiques funcionals dels dominis RLD d'HERC1, l'altre domini important i característic d'aquesta família de proteïnes és el domini HECT. En particular, el domini HECT d'HERC1 és capaç d'unir una molècula d'ubiquitina a través de la cisteïna del seu centre actiu en presència de l'E2 UbcH5 però no en presència d'altres E2 com l'UbcH1, l'UbcH6 o l'UbcH7, indicant que HERC1 presenta activitat E3 ubiquitina lligasa (Schwarz *et al.*, 1998) tot i que no es coneix el substrat/s sobre els quals l'exerceix. Mitjançant experiments de doble híbrid en llevat s'ha descrit que HERC1 interacciona amb l'enzim glicolític M2 piruvat quinasa a través del seu domini HECT (Garcia-Gonzalo *et al.*, 2003). Tot i que aquesta interacció s'ha confirmat tant *in vitro* com *in vivo*, no s'ha pogut establir però un efecte d'aquesta interacció ni en l'activitat d'aquest enzim ni en la seva possible ubiquitinació a través d'HERC1 (Garcia-Gonzalo *et al.*, 2003).

També és conegut el reclutament d'HERC1 a zones de la membrana plasmàtica on tenen lloc processos de polimerització d'actina induïts per l'activació de la GTPasa ARF6 (Garcia-Gonzalo *et al.*, 2004). Tot i que HERC1 pot actuar com a GRF per ARF6 *in vitro* (Garcia-Gonzalo *et al.*, 2005), no sembla que l'activitat d'ARF6 es trobi sotmesa a regulació per part d'HERC1 sinó que més aviat HERC1 actuaria per sota d'ARF6 sent reclutada als llocs de polimerització d'actina després de l'activació d'ARF6. Degut a que ARF6 activa la síntesis de PI(4,5)P₂ en la membrana plasmàtica (Honda *et al.*, 1999), es creu que HERC1 podria ser reclutada a les protrusions d'actina gràcies a la capacitat del seu domini RLD1 d'interaccionar amb aquests fosfoinosítids. A més, l'enzim PI(4)P-5-quinasa (catalitzador de la síntesi d'aquests fosfoinosítids) també es troba localitzat en aquestes estructures (Garcia-Gonzalo *et al.*, 2004).

Totes aquestes dades suggereixen un possible paper d'HERC1 en processos dependents d'actina en la membrana plasmàtica com la macropinositosis (Garcia-Gonzalo *et al.*, 2004).

S'ha observat que HERC1 es troba també en agregats proteics de la zona ventral de motoneurons en degeneració, característiques de malalts d'esclerosi lateral amiotròfica (ALS), on col·localitza amb marcadors del reticle endoplasmàtic (Tarabal *et al.*, 2005). També s'ha descrit una disminució dels nivells d'ARNm d'HERC1 en la zona del putamen del cervell de pacients addictes a l'heroïna, i una correlació entre l'expressió del gen que codifica per a HERC1 amb els nivells de morfina en sang (Drakenberg *et al.*, 2006). També s'ha observat en humans una disminució dels nivells d'HERC1 en cèl·lules humanes de l'epidermis causada per l'efecte que provoca la irradiació d'aquestes cèl·lules amb radiació UV, sobre el factor de transcripció p53 (Enk *et al.*, 2006).

Recentment, mitjançant experiments d'immunopurificació de TSC2 a partir de llisats de cervell de ratolí i anàlisis per espectrometria de masses s'ha descrit que HERC1 interacciona amb TSC2 (tuberina), una proteïna que ha estat involucrada amb la malaltia de l'esclerosi tuberosa (Chong-Kopera *et al.*, 2006). Aquesta interacció s'ha confirmat amb experiments de co-immunoprecipitació de TSC2 utilitzant anticossos contra HERC1, i el seu estudi ha estat una de les tasques realitzades en aquesta treball (veure apartat resultats i discussió).

La proteïna TSC2 forma un complex amb la hamartina (TSC1) que regula varis processos dependents de la via de senyalització de mTOR com el cycle, el creixement, l'adhesió cel·lular i el tràfic vesicular entre d'altres (van Slegtenhorst *et al.*, 1998). Les mutacions en TSC2 principalment, però també en TSC1, han estat descrites com a la causa principal de l'esclerosi tuberosa. Aquesta malaltia és una malaltia genètica autosòmica dominant que afecta a 1 de cada 6000 naixements (revisat en Cheadle *et al.*, 2000; Kwiatkowski *et al.*, 2003) i es caracteritza per la formació de tumors benignes en varis òrgans i teixits com el cervell i els ronyons, anomenats hamartomes, que poden acabar provocant insuficiència renal, retard mental, autisme i pèrdues de consciència. TSC2 actua com a proteïna activadora de l'activitat GTPasa (GAP) per a la GTPasa Rheb (*Ras homologue enriched in brain*) (Inoki *et al.*, 2003; Manning i Cantley, 2003; Li *et al.*, 2004) impeding l'activació de la via de senyalització de mTOR a través de Rheb. Rheb es troba localitzada en endomembranes cel·lulars i modula positivament mTOR i per extensió, proteïnes i processos regulats per mTOR com la quinasa p70 S6K, el factor 4EBP1, l'autofàgia i la biogènesis de ribosomes entre d'altres (veure apartat via mTOR). TSC1 per la seva banda actua com estabilitzador de TSC2 constituint el complex TSC necessari per a què l'activitat GAP de TSC2 pugui tenir lloc.

Utilitzant diferents formes truncades de TSC2 i una forma truncada d'HERC1 que contenia els darrers 3351 residus de l'extrem C terminal (dominis WD40, RLD2 i HECT), el grup del Dr. Kun Liang Guan en col·laboració amb el nostre laboratori varen observar que la interacció d'HERC1 i TSC2 tenia lloc entre l'extrem N terminal de TSC2 (la mateixa zona per on té lloc la seva unió amb TSC1) i dues possibles regions d'HERC1; la zona compresa entre els residus 3000 i 3900 i la zona compresa entre el residu 3901 i l'extrem C terminal. Aquesta interacció va suggerir un possible paper d'HERC1 com a modulador positiu de la via de senyalització d'mTOR en el creixement cel·lular, a través de la desestabilització via HERC1 del complex TSC2/TSC1 i posterior ubiquitinació i degradació de TSC2 via proteasoma 26S. Segons aquest model, en situacions no patològiques, TSC1 actuaria inhibint la interacció d'HERC1 amb TSC2 (essent la interacció entre TSC1 i TSC2 més estable que la interacció entre TSC2 i HERC1) (Chong-Kopera *et al.*, 2006).

1.1.2.1.2 | HERC2

La proteïna HERC2 constitueix juntament amb HERC1 la subfamília de proteïnes HERC gegants. El seu pes molecular és de 528 kDa i la seva distribució varia en funció del teixit, observant-se els nivells més elevats en el cervell i en els testicles (Lehman *et al.*, 1998). Mitjançant experiments de fraccionament subcel·lular s'ha detectat la presència d'HERC2 en el nucli.

HERC2 conté 3 dominis RLD i un domini HECT característics de la família de proteïnes HERC, a més dels següents dominis:

- Un domini DOC (*death on curing domain*) descrit originalment com una regió homòloga a la subunitat APC10/DOC1 del complex APC ubiquitina lligasa formada per 200 residus i que s'ha relacionat amb la mitosis (Grossberger *et al.*, 1999). Tot i que a l'igual que en HERC1 no es coneixen substrats per al domini HECT d'HERC2, el fet de que totes les proteïnes que posseeixen un domini DOC posseeixin també altres dominis involucrats en la ubiquitinació de proteïnes (dominis HECT o dominis Cullin), fa pensar que la funció del domini DOC d'HERC2 és la d'estabilitzar la interacció d'aquesta amb els seus possibles substrats (Garcia-Gonzalo i Rosa, 2005).

- Un domini Mib-Herc2 o M-H (*Mind Bomb HERC2*) que es troba també en la ubiquitina lligasa Mind Bomb (Mib) entre d'altres ubiquitina lligases, i que afavoreix aquesta activitat (Itoh *et al.*, 2003; Garcia-Gonzalo i Rosa, 2005).

- Una regió Cytochrome b5-like capaç d'unir grups hemo i participar en reaccions redox. Els residus essencials d'aquesta regió en HERC2 no es troben conservats i per tant és poc probable que HERC2 pugui unir grups hemo (Misfud i Bateman, 2002). La funció d'aquesta regió en HERC2 podria ser la d'actuar com a butxaca hidrofòbica per a la unió de determinats receptors tal com succeeix per als receptors de progesterona, que es troben units a la membrana plasmàtica a través d'aquest domini (Misfud i Bateman, 2002).

- Un possible motiu dits de Zinc tipus ZZ (*ZZ type zinc finger*) amb sis cisteïnes conservades i dues histidines perifèriques que podrien mediar la interacció d'aquest domini amb cations $Zinc^{2+}$ (Krishna *et al.*, 2003; Garcia-Gonzalo i Rosa, 2005).

- Un domini CPH (*Cul7, PARC, HERC2*) entre els residus 2554 i 2630. Aquest domini s'ha relacionat recentment amb la interacció que té lloc entre les proteïnes Cul7 i PARC i el domini de tetramerització de p53. Si bé HERC2 conté aquest domini, no ha estat descrita la seva interacció amb p53 a través d'ell tot i que és força probable que així pugui ser ja que és tracta d'un domini altament conservat (Kaustov *et al.*, 2007).

La identificació pròpiament dita de la proteïna HERC2, tot i que fou posterior a la d'HERC1, té un origen previ al descobriment d'HERC1. Els primers estudis relacionats amb HERC2 es basen en experiments de complementació realitzats amb al·lels mutants del locus *p* "pink eyed dilution" del cromosoma 7C de ratolí. Els primers animals descrits amb mutacions en aquest locus presentaven diferències en l'embolcall de l'ull així com diferents graus d'hipopigmentació en l'iris. A l'any 1960 es van descriure altres mutants que a més d'aquestes característiques presentaven també altres anormalitats més greus, com una viabilitat reduïda, un tamany major, un caminar característic en salts, esterilitat causada per una espermatogènesi i una morfologia dels espermatozoides anòmala, semiesterilitat en les femelles, i defectes en el comportament maternal (fenòmen que posteriorment es va conèixer com a

síndrome *rjs* (*runty*, *jerky*, *sterile syndrome*) (Hollander *et al.*, 1960; Hunt i Johnson, 1971; Meldvold, 1974; Lehman *et al.*, 1998).

Uns anys més tard, mitjançant experiments de complementació realitzats amb varis al·lells que presentaven el locus *p* recessiu, es va poder demostrar que les característiques que presentaven aquests animals tenien un origen en la disfunció d'un únic gen (Hollander *et al.*, 1960). Es va observar que tots els al·lells que provocaven el síndrome *rjs* en situacions d'homozigosi, no s'autocomplementaven en situacions d'heterozigosi, mentre que si que podien ser complementats per altres al·lells relacionats amb una pigmentació més suau (Lyon *et al.*, 1992). A més, experiments de mutagènesis amb N-etil-N-nitrosourea van permetre tres anys més tard generar mutacions d'un sol parell de bases en aquest locus que induïen completament el síndrome *rjs* (Rinchik *et al.*, 1995), i que confirmaven l'hipòtesi d'un origen monogènic per a aquest síndrome.

A l'any 1998 es va clonar el gen *rjs* per primer cop (Lehman *et al.*, 1998) i es va poder comprobar que tres dels mutants estudiats prèviament que presentaven aquest síndrome, mostraven delecions en un gen que codificava per una proteïna gegant de 528 KDa de pes molecular i que fou posteriorment anomenada HERC2. De les tres delecions d'HERC2 observades, dues generaven un ARNm i una proteïna HERC2 amb una truncació important, però degut al gran tamany de la delecio no es va poder descartar que aquesta pogués estar afectant també a algun gen veí. La tercera delecio consistia en una delecio intragènica que afectava únicament a HERC2 i que generava una proteïna sense 321 residus interns de la seva seqüència. No obstant, no es va poder descartar del tot que algun gen situat en algun intró d'HERC2 pogués estar vinculat al fenotip mostrat per aquests animals. L'acceptació de l'origen monogènic del síndrome *rjs* va arribar un any més tard amb la constatació que les mutacions d'alguns dels animals amb aquest fenotip estudiats prèviament, corresponien a mutacions en zones entre exons i introns que afectaven únicament a HERC2 (Ji *et al.*, 1999). També s'han descrit altres mutacions causants d'aquest síndrome (diferents a les estudiades pels grups citats anteriorment) que també afecten a l'estructura i als nivells de l'ARNm d'HERC2 (Walkowicz *et al.*, 1999).

El fet que dos dels mutants amb el síndrome *rjs* presenti una proteïna HERC2 amb una part del domini HECT truncat (aminoàcids 4428-4748), o bé un proteïna amb una delecio de 53 residus a la dreta del domini RLD2 (aminoàcids 3716-3768) respectivament, apunta a un possible defecte en la ubiquitinació d'algun/s substrat/s d'HERC2 com a la causa del fenotip d'aquests animals. Segons aquesta hipòtesis, els substrats s'unirien a HERC2 per la zona compresa per aquests 53 residus, i posteriorment serien ubiquitinats a través del domini HECT (Garcia-Gonzalo i Rosa, 2005). Els defectes en la ubiquitinació dels substrats d'HERC2 podrien ser la causa de la disfunció de les neurones neurosecretores de l'hipotàlem (s'ha observat degeneració en els axons d'aquestes neurones (Johnson *et al.*, 1975)) que provoquen defectes en la secreció hormonal de la glàndula pituïtària, i que podria explicar el creixement reduït, l'hipoplàsia genital i la formació anòmala de l'acrosoma dels espermatozoides causant dels defectes en l'espermatogènesi descrits per al síndrome *rjs* (Garcia-Gonzalo i Rosa, 2005).

El síndrome *rjs* no és l'únic fenotip que s'ha relacionat amb la proteïna HERC2. L'any passat es va relacionar el gen d'HERC2 amb el color de l'iris de l'ull en humans (Eiberg *et al.*, 2008; Kayser *et al.*, 2008; Sturm *et al.*, 2008). S'ha descrit que alguns introns d'HERC2 regulen l'expressió del gen *oca2* responsable de l'albinisme en l'iris de l'ull. Aquest gen es troba localitzat al costat del gen d'HERC2 en el cromosoma 15 i s'ha descrit que polimorfismes d'un sol nucleòtid (SNPs) en els introns 12 i 86 del gen d'HERC2 són responsables de la tonalitat del color de l'iris de l'ull (Eiberg *et al.*, 2008; Kayser *et al.*, 2008; Sturm *et al.*, 2008).

També s'ha relacionat HERC2 amb els síndromes de Prader-Willi (PWS) i d'Angelman. Fenòmens de duplicació i translocació gènica d'alguns fragments del gen ancestral d'HERC2 van originar repeticions de baix nombre de còpies (duplicons) en les bandes relacionades amb el PWS, 15q11 i 15q13 del cromosoma 15 humà. Aquest síndrome consisteix en un desordre d' "imprinting" genòmic causat per la no expressió d'un grup de gens que es troben situats entre aquestes bandes. En individus sans, aquest grup de gens s'expressen únicament a partir del cromosoma 15 del pare (ja que els corresponents en la mare es troben silenciats durant l'oogènesis o les etapes inicials del desenvolupament embrionari degut a l' "imprinting" genòmic). En individus amb PWS, l'expressió d'aquest grup de gens a partir del cromosoma 15 del pare tampoc pot tenir lloc degut a errors en la recombinació homòloga durant la profase I de la meiosi que provoquen en un 70% dels casos una deleció de 4 Mb durant l'espermatogènesi. S'ha descrit que els duplicons d'HERC2 afavoreixen aquesta deleció de 4 Mb responsable del PWS, no obstant, tot i que els símptomes del PWS recorden als del síndrome *rjs* en murins i que s'han observat formes anòmales d'HERC2 en pacients de PWS, recentment s'ha descartat l'idea de les mutacions en el gen d'HERC2 com a les responsables d'aquest síndrome ja que s'ha vist que el gen d'HERC2 en realitat no sofreix "imprinting" genòmic i per tant els pacients de PWS expressen el gen d'HERC2 correctament (Nicholls i Knepper *et al.*, 2001; Garcia-Gonzalo i Rosa, 2005).

1.1.2.2 | Proteïnes HERC petites

1.1.2.2.1 | HERC3

El cADN d'HERC3 va ser identificat a l'any 1994 durant una búsqueda aleatòria de cADNs majors de 2 Kb i es va anomenar originàriament D25215 (Nomura *et al.*, 1994). El producte proteic d'aquest cADN no va ser descrit fins al 2001 (Cruz *et al.*, 2001). HERC3 és un proteïna de 117 KDa de pes molecular que es troba localitzada en el citosol i en estructures de tipus vesicular en la majoria de línies cel·lulars, on col·localitza amb marcadors de tràfic de membrana intracel·lulars com la proteïna de coberta vesicular β -COP (marcador de vesícules de l'aparell de Golgi), Rab5 (marcador endosomal) i ARF. A diferència d'HERC1, HERC3 no col·localitza amb marcadors de lisosomes ni de l'aparell de Golgi com LIMP-II o GMPt1 respectivament (Cruz *et al.*, 2001). A diferència del domini RLD d'HERC1 per el qual s'havia descrit activitat GRF (inicialment activitat GEF) sobre algunes "small GTPases" com ARF1, Rab3a i Rab5 (Rosa *et al.*, 1996; Garcia-Gonzalo *et al.*, 2005), el domini RLD d'HERC3 no presenta activitat per cap d'aquestes GTPases, ni tampoc sobre Ran o Ras, per a les quals s'havien obtingut també resultats negatius amb HERC1, ni tampoc per Rab8, ARF6, Rac, o RhoA (Cruz *et al.*, 2001).

El domini HECT d'HERC3 és capaç de formar *in vitro* un enllaç tioester amb la ubiquitina a través de la seva cisteïna 1018, en presència dels E2 UbcH7 o UbcH5 (Schwarz *et al.*, 1998). A més, tot i que amb menor afinitat, HERC3 és capaç d'unir ubiquitina de forma no covalent quan es muta la cisteïna del seu domini HECT a alanina, possiblement a través d'algun domini d'unió a ubiquitina present en la seva seqüència. En experiments realitzats *in vitro* amb llisats de reticulòcits, s'ha observat que HERC3 també és capaç d'unir de forma covalent ubiquitina i cadenes de poli-ubiquitina a través de varis residus lisina, i ser degradada via proteasoma 26S (Cruz *et al.*, 2001). El fet que la mutació de la seva cisteïna catalítica no afecti a la seva capacitat d'unir ubiquitina suggereix que més que auto-ubiquitinar-se, és necessària l'acció d'una altre E3 ubiquitina lligasa encara no identificada, per a què això tingui lloc (Garcia-Gonzalo i Rosa, 2005). Pel que fa a la seva expressió, s'ha observat l'ARNm d'HERC3 en varis teixits entre els quals destaca el cervell, on es troba present en tot ell especialment en el cortex piriforme, l'hipocamp i l'amígdala (Schwarz *et al.*, 1998; Davies *et al.*, 2004).

Segons un treball utilitzant proteïnes sobreexpressades publicat l'any passat, HERC3 col·localitza amb la resta de proteïnes de la subfamília de proteïnes HERC petites (HERC4, 5 i 6) en endosomes i lisosomes (Hochrainer *et al.*, 2005 i 2008) però no en l'aparell de golgi on prèviament s'havia descrit que també es trobava HERC3 (Cruz *et al.*, 2001). Mitjançant experiments de coimmunoprecipitació en cèl·lules HEK293 es va observar que HERC3, HERC4, HERC5 i HERC6 no sols col·localitzaven sinó que existia una interacció entre totes elles que era independent de la seva activitat lligasa ja que mutacions en la cisteïna catalítica del domini HECT no modificava aquesta interacció (Hochrainer *et al.*, 2008). En aquest mateix treball, experiments de doble híbrid en llevat utilitzant una llibreria de cADNs de cèl·lules HeLa, va permetre observar que HERC3 interaccionava amb les proteïnes ubiquitin-like (Ubl) hPLIC-1 i hPLIC2 (*human proteins linking integrin-associated proteins and cytoskeleton*) (Hochrainer *et al.*, 2008). Aquestes dues proteïnes contenen un domini "ubiquitin like" (UBI) en el seu extrem N terminal i un domini d'associació a ubiquitina (UBA) en el seu extrem C terminal que els permet associar-se a proteïnes ubiquitinades, al proteasoma i a E3 ubiquitina lligases com l'E6AP, la β TRCP i la Nedd4, participant en la degradació via proteasoma 26S de proteïnes com p53, I κ B α , presenilina i el receptor GABA_A (Kleijnen *et al.*, 2000; Mah *et al.*, 2000; Bedford *et al.*, 2001; Murillas *et al.*, 2002). hPLIC1 també interacciona amb proteïnes endocítiques com l'Hrs i l'Eps15 (Regan-Klapisz *et al.*, 2005) i hPLIC2 participa en l'endocitosi de receptors acoblats a proteïnes G (N'Diaye *et al.*, 2008).

1.1.2.2.2 | HERC4

El cADN d'HERC4, a l'igual que el d'HERC3, va ser identificat durant la búsqueda de nous cADN que codifiquessin per proteïnes grans en cervell humà (Nagase *et al.*, 2000; Hochrainer *et al.*, 2005). La distribució per teixits del seu ARNm és ubícua, destacant en el cervell i en els testicles on es troba en major quantitat, i en el cor i en la placenta on es troba en menor quantitat. La seva distribució subcel·lular, a l'igual que la resta de membres de la família, és princiaplament citosòlica, trobant-se una part en forma soluble i una part associada a membranes internes.

El gen d'HERC4 està format per 29 possibles exons dels quals únicament 25 o 26 passen a formar part de l'ARNm madur (4,45 Kb). A partir d'aquest ARNm es poden generar dues proteïnes de 1049 i 1057 aminoàcids que són les formes més abundants d'HERC4 en la cèl·lula, però també es poden generar altres formes menys abundants d'HERC4 a partir de processos d' "splicing" alternatiu diferents als citats, que podrien implicar les següents situacions (Hochrainer *et al.*, 2005):

- La substitució dels 5 primers exons del gen per un altre exó que conté un inici de traducció alternatiu, generant una forma d'HERC4 amb el domini RLD incomplet.
- L'exclusió dels exons 24 i 25 generant una forma de la proteïna amb una deleció en el domini HECT.
- La inclusió d'un exó addicional amb un codó d'aturada de la traducció després dels exons 3 o 11, generant diferents formes truncades d'HERC4.
- L'exclusió dels exons 5 i 9 que modifica la pauta de lectura i origina una proteïna petita de 118 kDa.

La rellevància fisiològica de tots aquests processos d' "splicing" així com quina pot ser la funció d'HERC4 és a dia d'avui una incògnita. No obstant, recentment s'ha relacionat HERC4 amb la fertilitat. En experiments realitzats amb ratolins mutants per al gen d'HERC4 que generen una forma truncada que

sols conté la meitat C terminal de la proteïna (conté el domini RLD però no el domini HECT), s'ha observat que aquests animals són infèrtils degut a una maduració incompleta dels espermatozoides (Rodríguez i Stewart, 2007).

1.1.2.2.3 | HERC5

La proteïna HERC5 va ser descrita inicialment com a Ceb1 (*cyclin E-binding protein 1*) ja que es va identificar mitjançant experiments de doble híbrid utilitzant com a esquer la ciclina E (Mitsui *et al.*, 1999). Es tracta d'una proteïna de 117 KDa de pes molecular, l'ARNm de la qual es troba present en diferents òrgans especialment en els testicles, en el cervell de fetus, en la sang i en cèl·lules dendrítiques (Su *et al.*, 2002). En canvi, en altres òrgans com els ovaris, el pàncrees, el cor, la placenta o en múscul esquelètic els seus nivells són força menors. A l'igual que altres membres de la família, HERC5 és una proteïna citosòlica i es troba tant en forma soluble com associada a membranes internes (Mitsui *et al.*, 1999).

El gen d'HERC5 es troba dins un grup de gens que augmenten la seva expressió en resposta a tractaments pro-inflamatoris amb citoquines en cèl·lules de l'endoteli microvascular de la pell en humans (HSMECs) (Kroismayr *et al.*, 2004). En general, l'expressió del gen d'HERC5 es força baixa en la majoria de teixits però es veu incrementada de forma substancial quan es sotmet a les cèl·lules a certs tractaments com la sobreexpressió d'oncoproteïnes virals que inactiven supressors tumorals com p53 o Rb (Mitsui *et al.*, 1999), o bé en resposta a estímuls pro-inflamatoris com el tractament amb lipopolisacàrids bacterians (LPS), amb el factor de necrosi tumoral α (TNF α) o l'interleuquina 1 β (IL1 β) (Kroismayr *et al.*, 2004) els quals activen una via de transducció de senyal que s'inicia amb l'activació dels receptors "Toll like" (Akira *et al.*, 2001). Aquesta via de transducció de senyal té lloc principalment a través del factor nuclear kappa B (NFkB) (Li i Verma, 2002) i transcorre a través de la fosforil·lació de l'inhibidor del factor NFkB, I κ B (Ghosh i Karin, 2002). Quan aquest inhibidor és ubiquitinat i degradat via proteasoma 26S (Brown *et al.*, 1995) NFkB pot translocar-se al nucli on conjuntament amb altres factors de transcripció promou l'expressió de gens pro-inflamatoris.

Quan la síntesi de proteïnes o l'activació de NFkB es troba bloquejada, l'increment de l'expressió del gen d'HERC5 no succeeix, indicant que aquesta expressió és dependent d'algun/s factor/s de transcripció regulats per NFkB. Tot i que el promotor d'HERC5 no conté llocs d'unió per a NFkB, si conté en la seva regió proximal llocs consens d'unió d'altres factors de transcripció relacionats amb la inflamació (Kroismayr *et al.*, 2004). Els increments observats per a l'ARNm d'HERC5 en resposta a estímuls inflamatoris no es veuen reflectits però en un augment dels nivells de proteïna degut a que l'efecte d'aquests estímuls està relacionat també amb una disminució del temps de vida mitja d'HERC5 que té lloc de forma molt més ràpida que l'efecte sobre l'expressió del gen d'HERC5 (Kroismayr *et al.*, 2004). Tenint en compte el domini HECT E3 ubiquitina lligasa d'HERC5 i els alts nivells d'HERC5 en els testicles en comparació amb altres òrgans, una possible funció d'HERC5 podria ser la ubiquitinació massiva de proteïnes que té lloc durant l'espermatogènesis (Sutovsky, 2003; Haraguchi *et al.*, 2004; Garcia-Gonzalo i Rosa, 2005). Tenint en compte que HERC5 desapareix durant les fases inicials dels processos inflamatoris i que durant les etapes finals d'aquests processos és crítica la degradació de proteïnes via proteasoma 26S (Majetschak *et al.*, 2000) s'ha hipotetitzat que l'absència d'HERC5 podria provocar una estabilització dels seus possibles substrats a l'inici, participant únicament en la ubiquitinació i la degradació de proteïnes en les etapes finals de la inflamació (Garcia-Gonzalo i Rosa, 2005). La regulació d'HERC5 per p53 i Rb i la seva interacció amb ciclins també apunten a un possible paper d'HERC5 en la progressió del cicle cel·lular tot i que no s'han observat variacions en els nivells o activitat d'HERC5 durant aquest cicle (Garcia-Gonzalo i Rosa, 2005).

En els darrers anys s'han produït alguns descobriments que han permès aprofundir en el paper d'HERC5 en els processos inflamatoris; s'ha descrit que HERC5, a través de la cisteïna 994 del seu domini HECT, és necessària en cèl·lules humanes per a la conjugació de la proteïna de la família de les "ubiquitin like" ISG15 a diverses proteïnes substrat (Dastur *et al.*, 2006; Wong *et al.*, 2006). Aquesta conjugació succeeix durant l'activació de la resposta immune innata en resposta a infeccions virals i bacterianes però es desconeix quin és el seu paper en les proteïnes que modifica. El gen que codifica per a l'ISG15 és un dels gens que s'indueix de forma més important en resposta a l'interferó α/β (IFN α/β) (Korant *et al.*, 1984; Haas *et al.*, 1987), en resposta a infeccions víriques (Nicholl *et al.*, 2000; Kim *et al.*, 2002) i en resposta a tractaments amb lipopolisacàrids bacterians (LPS) (Ritchie *et al.*, 2002; Doyle *et al.*, 2002). El descobriment del paper d'HERC5 com a E3 ISG15 lligasa va tenir lloc mitjançant la purificació i la identificació per espectrometria de masses de possibles proteïnes ISGilades, entre les quals es va identificar apart d'HERC5, els corresponents E1 i E2 responsables del procés d'ISGilació (Ube1L i UbcH8 respectivament) (Zhao *et al.*, 2004).

Apart de l'observació que l'IFN provocava un augment en l'ARNm d'HERC5 i que HERC5 podia ser ISGilada, també es va comprovar que la silenciació d'HERC5 mitjançant ARN d'interferència inhibia l'ISGilació provocada per l'IFN i que la coexpressió d'HERC5, Ube1L i UbcH8 era capaç de restaurar els nivells cel·lulars de proteïnes modificades per ISG15 en absència de l'IFN (Wong *et al.*, 2006). A més, si es mutava la cisteïna 994 del domini HECT d'HERC5 no es produïa ISGilació (Dastur *et al.*, 2006).

Mitjançant experiments de co-immunoprecipitació s'ha descrit la interacció d'HERC5 amb algunes proteïnes ISGilades com l'Hsp70 i la Tioredoxina reductasa (Wong *et al.*, 2006) així com alguns substrats d'HERC5 com les proteïnes XPD (ERCC2), STK38, l'isoforma 1 de la RGS i la α -tubulina (Takeuchi *et al.*, 2006).

Com s'ha comentat en l'apartat d'HERC3, HERC5 col·localitza i interacciona amb la resta de proteïnes petites de la família HERC (HERC3,4 i 6) en endosomes i lisosomes (Hochrainer *et al.*, 2005 i 2008). Tot i això cadascuna d'aquestes proteïnes HERC interacciona amb un grup de proteïnes propi. Per exemple, no s'ha vist que HERC5 interaccioni amb hPLIC1 i 2 com si s'ha vist que ho fa HERC3 (veure apartat HERC3). Per contra s'ha descrit que HERC5 està relacionada amb la ubiquitinació del supressor de metastasis Nm23B, una proteïna amb activitat nucleòsid difosfat quinasa que juga un paper crític en la proliferació i diferenciació cel·lular (Hartsough i Steeg, 2000; Kimura *et al.*, 2000), en la transcripció de gens induïda per estrògens, la migració cel·lular (Rayner *et al.*, 2008) i en l'endocitosi mediada per la dinamina (Palacios *et al.*, 2002) entre altres.

1.1.2.2.4 | HERC6

HERC6 es troba únicament en primats, és a dir que la família de proteïnes HERC està formada únicament per 5 membres en algunes espècies com com per exemple en ratolins. A dia d'avui no es té massa informació sobre HERC6 ja que juntament amb HERC4 és un dels membres de la família HERC que ha estat descobert més recentment (Hochrainer *et al.*, 2005). La seva identificació va tenir lloc durant el clonatge d'HERC5 gràcies a la identificació d'un cADN que presentava un 50% d'identitat de seqüència amb HERC5 en la regió del domini HECT (Hochrainer *et al.*, 2005). El gen que codifica per a HERC6 es troba localitzat en el cromosoma 4 i s'ha descrit l'existència de múltiples formes d' "splicing" alternatiu per al seu pre-ARNm. El transcrit inicial d'HERC6 conté 25 exons potencials dels quals només 23 es troben en l'ARNm madur que codifica per a la forma més comú d'HERC6 que està constituïda per 1022 residus. De forma menys freqüent el transcrit primari d'HERC6 sofreix processos d' "splicing" alternatiu

que generen almenys tres ARNm diferents tot i que es desconeix si aquestes formes menors d'HERC6 tenen alguna rellevància funcional.

Pel que fa a la seva expressió, els nivells d'ARNm d'HERC6 es troben més elevats en el cervell i en els testicles que en la placenta i el cor, i a nivell subcel·lular, a l'igual que altres membres de la família HERC, es troba localitzada en el citoplasma i en estructures vesiculars (Hochrainer *et al.*, 2005). Recentment l'expressió del gen d'HERC6, i també el d'HERC5, ha estat lligada a la senyalització de la resposta immunològica via interferó β (IFN β), possiblement actuant com a *E3 ubiquitin-like* lligasa per a la Ubl ISG15 (Dastur *et al.*, 2006)(veure apartat HERC5). També s'ha descrit que HERC6 podria estar regulant els nivells de greix i de proteïna en la llet, ja que s'ha associat la zona del cromosoma 4 d'humans on es troba entre d'altres gens, HERC6, amb el polimorfisme observat en l'exó 8 del gen que codifica per a la DGAT1 (*diacylglycerol acyltransferase 1*) del cromosoma 14 de vaca, un gen relacionat amb els nivells de proteïna i de greixos de la llet en murins (Cohen-Zinder *et al.*, 2005).



1.2 | *La via de senyalització de mTOR*

1.2 | La via de senyalització de mTOR

1.2.1 | Introducció

A la dècada dels anys 70, a l'illa Xilena *Easter Island* del Sud de l'oceà Pacífic (coneguda també com *Rapa Nui* o illa de Pasqua), es va aïllar per primera vegada una soca bacteriana anomenada *Streptomyces higroscopicus* que era capaç de segregar una lactona macrocíclica que posseïa una potent activitat antifúngica i que avui en dia es coneix com a Rapamicina, en referència a l'origen del seu descobriment (Vézina *et al.*, 1975).

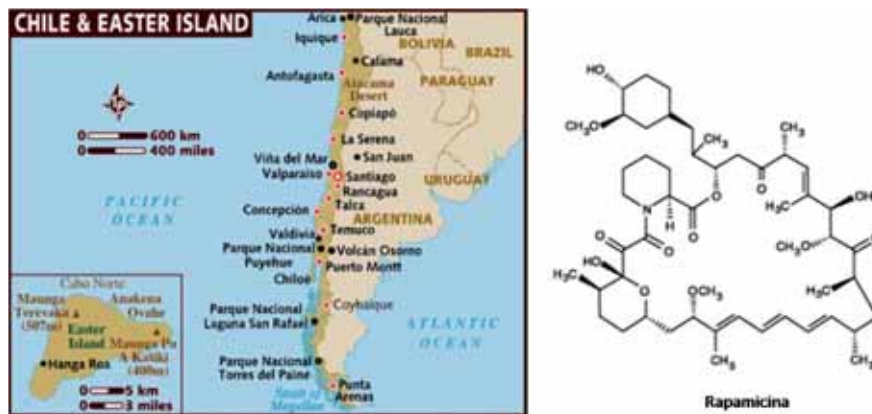


Figura 7. Illa xilena de Pascua (*Easter Island* o *Rapa Nui*) i estructura molecular de la Rapamicina.

La rapamicina, a part de tenir propietats antifúngiques, posseeix activitat immunosupressora i anticancerosa (inhibeix el creixement cel·lular) i actualment és una droga que s'utilitza com a immunosupressor en transplantaments d'òrgans, en la prevenció de restenosi en artèries coronàries i en quimioteràpia per al tractament del sarcoma ossi i el càncer de teixit tou (Morice *et al.*, 2002; Marks, 2003; Moses *et al.*, 2003). A partir del seu descobriment i mitjançant "screenings" genètics realitzats en llevat, es van identificar dos gens diana d'aquesta droga que es van anomenar "target of rapamycin 1 i 2" (*tor1* i *tor2*), i es va observar que mutacions en aquests gens permetien al llevat *Saccharomyces cerevisiae* escapar del bloqueig del cycle cel·lular que li causava el tractament amb rapamicina (Heitman *et al.*, 1991).

L'identificació d'aquests gens en llevat va propiciar el descobriment dels seus homòlegs en organismes eucariotes superiors, inclosos els mamífers, tot i que a diferència de en llevat, en la resta d'espècies, TOR es troba codificat per un únic gen (Oldham *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 2000; Long *et al.*, 2002; Menand *et al.*, 2002). En aquests estudis inicials es va demostrar també que la rapamicina (a l'igual que d'altres drogues immunosupressores), per exercir la seva toxicitat, s'unia al cofactor de la família de les immunofilines, peptidil-prolil- cis/trans isomerasa FKBP12, i que era en aquest estat que es podia unir a TOR i provocar la seva inhibició (revisat per Schreiber *et al.*, 1991; Abraham i Wiederrecht, 1996; Dumont i Su, 1996).

La proteïna TOR (també anomenada FRAP, RAFT, RAPT o SEP) és una serina/treonina quinasa multidomini de 290 KDa de pes molecular, que pertany a la família de les PIKKs (*phosphatidylinositol*

kinase-related kinase) (Fingar i Blenis, 2004; Wullschleger *et al.*, 2006). Aquesta família de quinases estan relacionades estructuralment amb les PIKs (*phosphatidyl inositol kinases*) però tot i la seva nomenclatura, no presenten activitat quinasa sobre lípids. Aquesta família la formen proteïnes involucrades en el control del creixement cel.lular, la regulació del cicle cel.lular i la regulació del dany a l'ADN, i entre els seu membres es troben les proteïnes ATM (*ataxia telangiectasia mutated*), ATR (*ataxia telangiectasia and Rad 3 related*) i DNAPK (*DNA dependent protein kinase*).

mTOR és principalment una proteïna citosòlica però es troba també associada a membranes internes com ara als mitocondris, al reticle endoplasmàtic i a l'aparell de Golgi (Withers *et al.*, 1997; Liu i Zheng, 2007). A més a més, una fracció de mTOR és capaç de translocar-se al nucli i associar-se al promotor de l'ADN ribosomal regulant la transcripció gènica mediada per l'ARN polimerasa I, així com l'expressió d'altres gens a través de les ARN polimerases II i III (Tsang i Zheng, 2007).

A nivell estructural, mTOR està formada pels següents dominis (revisat per Hay i Sonenberg, 2004) (Figura 8):

- 20 repeticions en tàndem tipus HEAT d'interacció proteïna-proteïna, localitzades en l'extrem N terminal.
- 2 dominis FAT (FAT i FATC), que actuen com a moduladors de l'activitat quinasa de mTOR a través d'un mecanisme encara no conegut.
- 1 domini FRB o domini d'unió del complex FKBP12/rapamicina.
- 1 domini serina/treonina quinasa en l'extrem C terminal.
- 1 domini regulador negatiu NRD.

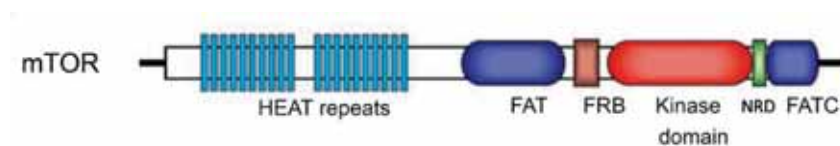


Figura 8. Esquema de l'estructura en dominis de la proteïna quinasa mTOR (modificat de Yang i Guan, 2007).

L'observació en experiments de cromatografia de gel filtració que mTOR s'el·luïa a una fracció corresponent a un pes molecular molt més elevat del seu tamany esperat va revelar que aquesta proteïna es trobava formant part de complexos multiproteics. L'existència de dos gens tor en llevat (*tor1* i *tor2*) així com l'introducció de la tecnologia de l'ARN d'interferència (fins aleshores tots els estudis es basaven en l'ús de la rapamicina), van permetre descobrir que mTOR es troba formant part de dos complexos dimèrics amb una composició i una distribució subcel.lular diferents; el complex mTORC1, que es caracteritza per la seva sensibilitat a la rapamicina i que es localitza al citosol tant en forma soluble com associat a membranes internes com l'aparell de Golgi, el reticle endoplasmàtic, mitocondris, i endosomes (Liu i Zheng, 2007) i el complex mTORC2, descrit inicialment com a complex insensible a la rapamicina i que es troba a la membrana plasmàtica. Actualment s'ha vist que en determinades línies cel.lulars i a determinades concentracions el complex mTORC2 també presenta

certa sensibilitat a la rapamicina, on s'ha descrit que actua promovent la dissociació del complex a través de la regulació de fosforilació dels membres de mTORC2, Rictor i mSin1 (Sarbasov *et al.*, 2006; Akcakanat *et al.*, 2007; Rosner i Hengstschläger, 2008).

S'han purificat i caracteritzat varis dels components dels complexos mTORC1 i mTORC2 entre els quals s'han identificat reguladors positius o negatius de l'activitat quinasa de mTOR, presentadors de substrat, estabilitzadors dels complexos i efectors de la via de senyalització de mTOR.

A la Taula 5 es mostren els components dels complexos mTORC1 i mTORC2 identificats (apart de mTOR) i la seva funció en el complex.

mTORC1		mTORC2	
Proteïna	Funció	Proteïna	Funció
Raptor (1335)	- Presentació de substrats a mTOR. S'Uneix a S6K1 i 4EBP1 a través d'un motiu TOS (<i>TOR signalling motif</i>) present en aquestes proteïnes. - Regulador positiu activitat quinasa mTOR.	Rictor (1708)	- Presentació de substrats a mTOR? - Regulació activitat quinasa mTOR. - Necessari per l'unió de mSin1 i mTOR.
mLST8 (o GβL) (326)	- Necessari per a l'unió de Raptor i mTOR. - Regulació activitat quinasa mTOR.	mLST8 (o GβL) (326)	- Regulació activitat quinasa mTOR. - Necessari per l'unió de Rictor amb mTOR.
PRAS40 (256)	- Substrat i regulador negatiu de mTOR al mateix temps. - S'uneix al complex a través de Raptor.	mSin1 (522)	- Presentació de substrats a mTOR. - Necessari per l'unió de Rictor amb mTOR.
		Protor PRR5 (o PRR5L) (368)	- Funció desconeguda. - S'uneix al complex a través de Rictor.

Taula 5. Components dels complexos mTORC1 i mTORC2 i funció de cadascun d'ells en el complex. Entre parèntesi es mostra el tamany de cada proteïna en nombre d'aminoàcids (Hara *et al.*, 2002; Loewith *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2003; Sarbasov *et al.*, 2004; Frias *et al.*, 2006; Pearce *et al.*, 2007; Sancak *et al.*, 2007; Martin *et al.*, 2008).

1.2.2 | Funcions fisiològiques regulades per mTOR

A través dels complexos mTORC1 i mTORC2, la proteïna mTOR regula diverses funcions fisiològiques relacionades amb el creixement cel·lular (tant en tamany com en nombre de cèl·lules), el cicle cel·lular, la morfologia, la mobilitat i la supervivència cel·lular. A la Taula 6 es mostren els principals processos mitjançant els quals mTOR regula totes aquestes funcions, així com els corresponents efectors relacionats de forma més o menys directa amb mTOR.

mTORC1		mTORC2	
Procés	Efectors	Procés	Efectors
Transcripció	HIF1α(a),STAT1,STAT3(b),URI(c)	Forma i mobilitat cel·lular	Rho,Rac(r),PKCα(s),CLIP170(t)
Autofàgia	ATG1/ATG13(d)	Creixement i supervivència cel·lular	Akt(u)
Endocitosi	Hsc70-4(e)		
Biogènesi Ribosomes	ARN polimerasa I,II i III(f),S6K(g),TIF1A(h),UBF(i),pRb,CDK4/Ciclina D(j)		
Traducció	S6K,4EBP1(g),eEF2K(k)		
Desenvolupament teixit adipós	Lipina(l),Rb(m),PPARγ(n)		
Respiració cel·lular Cicle cel·lular	Mitocondris(o) S6K1,4EBP1(p), CDK4/ciclina D, pRb(q)		

Taula 6. Principals funcions regulades per mTORC1 i mTORC2 i les seves proteïnes efectores. (a): Hudson *et al.*, 2002 Land i Tee, 2007. (b): Yokogami *et al.*, 2000; Kristof *et al.*, 2003. (c): Gstaiger *et al.*, 2003. (d): Abeliovich *et al.*, 2000; Kamada *et al.*, 2000. (e): Hennig *et al.*, 2006. (f): Mayer i Grummt, 2006. (g): Brunn *et al.*, 1997; Hara *et al.*, 1997; Isotani *et al.*, 1999; Fingar i Blenis, 2004; Hay i Sonenberg, 2004; Wang i proud, 2006; Wullschlegler *et al.*, 2006. (h): Buttgerit *et al.*, 1985; Bodem *et al.*, 2000; Mayer *et al.*, 2004. (i): Hannan *et al.*, 2003. (j): Nader *et al.*, 2005. (k): Browne i Proud, 2002. (l): Huffman *et al.*, 2002. (m): Usui *et al.*, 2000. (n): Kim i Chen, 2004. (o): Schieke *et al.*, 2006; Bonawitz *et al.*, 2007. (p): Fingar *et al.*, 2004. (q): Muise-Helmericks *et al.*, 1998. (r): Jacinto *et al.*, 2004; Sarbassov *et al.*, 2004. (s): Nakashima *et al.*, 2002; Jacinto *et al.*, 2004; Sarbassov *et al.*, 2004; Guertin *et al.*, 2006. (t): Choi *et al.*, 2000 i 2002. (u): Hresko i Mueckler, 2005; Sarbassov *et al.*, 2005; Jacinto *et al.*, 2006.

En el context d'aquest treball, d'entre tots aquests processos en destacarem la síntesi de proteïnes (traducció i biogènesi de ribosomes), l'autofàgia i la supervivència cel·lular.

1.2.2.1 | Funcions regulades pel complex mTORC1

1.2.2.1.1 | Traducció (biosíntesi de proteïnes)

El procés de traducció consisteix en la descodificació seqüencial de l'ARN missatger a proteïnes que té lloc en els ribosomes, i es pot dividir en tres etapes principals; iniciació, elongació i terminació. En cadascuna d'aquestes etapes són necessaris un determinat conjunt de factors proteics extrínscics al ribosoma, que són regulats a través de la modificació del seu grau de fosforilació.

La quinasa mTOR controla alguns dels factors involucrats en les etapes d'iniciació i elongació de la traducció. Concretament, el complex mTORC1 activa la quinasa de la proteïna ribosomal S6, S6K, i inhibeix el factor 4EBP1 (*eIF4E binding protein*) (Hay i Sonenberg, 2004; Tee i Blenis, 2005). Ambdues proteïnes presenten un motiu TOS (*TOR signalling*) en l'extrem N i C terminal de la seva seqüència respectivament, que els permet interaccionar amb la proteïna del complex mTORC1, Raptor, i ser fosforilades per mTOR (Schalm i Blenis, 2002; Choi *et al.*, 2003; Nojima *et al.*, 2003). Degut a l'alt grau de regulació que exerceix el complex mTORC1 sobre les proteïnes S6K i 4EBP1, la seva fosforilació es sol utilitzar sovint com a marcador d'activitat mTORC1.

A) Quinasa de la proteïna ribosomal S6 (S6K)

La proteïna S6K pertany a la família de les quinases AGC (*protein kinase A/protein kinase G/protein kinase C*) que inclou entre els seus membres a les proteïnes Akt (o PKB), RSK (*p90 ribosomal protein S6 kinase*), SGK (*serum and glucocorticoid induced protein kinase*) i PKC (*calcium activated protein kinase*) entre d'altres. Aquestes proteïnes regulen diferents processos fisiològics però totes elles

comparteixen grans semblances estructurals al voltant del seu domini quinasa. La seva activació té lloc a través de múltiples fosforilacions en diferents zones de la seva seqüència com el domini HM, el loop d'activació, i el mateix domini quinasa (Newton, 2003; Scheid i Woodgett, 2003).

En mamífers existeixen dues proteïnes S6K (S6K1 i S6K2) que presenten un elevat grau d'identitat de seqüència (70%) i que comparteixen un gran nombre de funcions però no totes (Shima *et al.*, 1998). Cadascuna presenta dues isoformes; p70 i p85 (S6K1), i p54 i p60 (S6K2) (Lee-Fruman *et al.*, 1999; Reinhard *et al.*, 1992). Les isoformes grans contenen una seqüència de localització nuclear (NLS) en l'extrem N terminal (Reinhard *et al.*, 1994) que permet la seva localització en el nucli cel·lular (Figura 9). La p54 també es troba localitzada en el nucli ja que conté seqüències NLS addicionals en el seu extrem C terminal, mentre que la p70 es troba principalment al citosol (Lee-Fruman *et al.*, 1999).

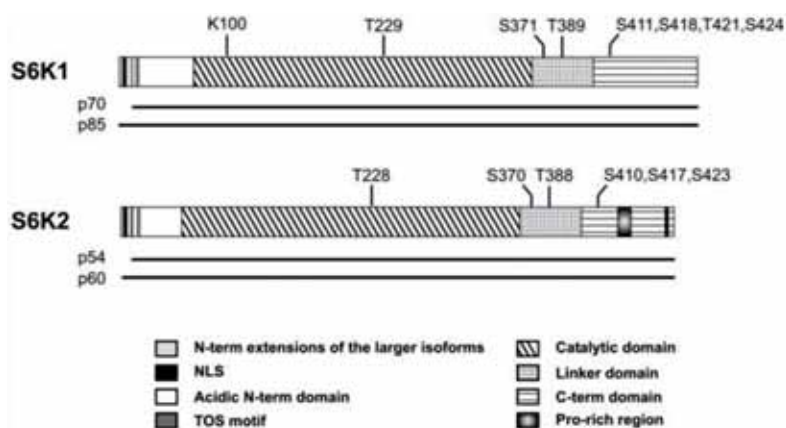


Figura 9. Esquema de l'estructura de les quinases S6K1 i S6K2 (isoformes grans i petites). Es mostren els principals dominis i motius estructurals així com els residus fosforilables involucrats en la seva activació (adaptat de Jastrzebski *et al.*, 2007).

De les dues proteïnes S6K, la S6K1 va ser el primer substrat de mTOR identificat sensible a la rapamicina (Pearson *et al.*, 1995; Burnett *et al.*, 1998) i és la que ha estat més àmpliament estudiada a nivell de la regulació de la seva activitat. Aquesta proteïna s'activa en resposta a senyals extracel·lulars com mitògens, factors de creixement i nutrients (dels quals es parlarà més endavant) a partir de la fosforilació seqüencial de varis dels seus residus (Hannan *et al.*, 2003b). La seva activació consisteix en una fosforilació inicial de 4 residus clau (S411, S418, T421 i S424) dels quals s'ha descrit que la fosforilació dels residus 421 i 424 es troba regulada per les MAPKs (Billington *et al.*, 2005) i que permeten un apropament amb mTOR. A continuació, en una segona etapa, es produeix la fosforilació dels residus S379 i T389 a través de mTOR (aquesta darrera situada al loop hidrofòbic característic de les quinases de la família de les AGC) que possibilita una última fosforilació via PDK1 en el loop d'activació (T229) (Isotani *et al.*, 1999; Hannan *et al.*, 2003b) que comporta el seu desplegament i grau d'activació màxim (Alessi *et al.*, 1998; Pullen *et al.*, 1998).

La proteïna S6K1 juga un paper crític en la regulació de la síntesi de proteïnes a diferents nivells:

- Inhibint la quinasa del factor regulador de l'elongació de la traducció 2 (eEF2K) (Wang *et al.*, 2001).
- Activant els factors d'iniciació de la traducció 3 i 4B (eIF3 i eIF4B) (Raught *et al.*, 2004; Holz *et al.*, 2005).
- Inhibint la proteïna de mort cel·lular programada 4 (PDCD4) permetent un increment en els nivells del factor d'iniciació de la traducció 4A (eIF4A) (Dorrello *et al.*, 2006).
- Regulant la biogènesi de ribosomes (veure apartat 1.2.2.1.3 Biogènesi de ribosomes) (Hannan *et al.*, 2003a).
- Activant la proteïna S6 de la subunitat ribosomal 40S, rpS6 (Gressner i Wool, 1974; Ferrari *et al.*, 1991; Ruvinsky *et al.*, 2005).

Cal remarcar que el paper de la proteïna rpS6 en la traducció (últim punt), ha estat origen de controvèrsia. Fins fa poc, aquesta proteïna havia estat associada amb el procés de traducció de gens que codifiquen per a proteïnes ribosomals i per a altres factors relacionats amb l'acoblament del complex de traducció (Meyuhas, 2000) els quals es caracteritzen tots ells per presentar un fragment d'oligopirimidines en l'extrem 5' del seu ARNm (TOP mARNs). No obstant, en varis articles recents s'ha demostrat mitjançant experiments amb ratolins doble knock out $S6K1^{-/-}$ i $S6K2^{-/-}$ (que presenten una rpS6 constitutivament defosforilada), així com amb ratolins $rpS6^{-/-}$, que la traducció dels TOP ARNs missatgers no depèn de la S6K ni de la fosforilació de la rpS6 (Ruvinsky *et al.*, 2005). Tot i això, el tractament amb rapamicina si afecta a aquest procés (Tang *et al.*, 2001; Stolovich *et al.*, 2002) i per tant, si sembla clar el paper de mTORC1 en la regulació de la traducció d'aquest tipus de ARNs missatgers.

La S6K1 també actua sobre altres proteïnes amb funcions no relacionades amb la traducció però també involucrades en el creixement i el tamany cel·lular. Entre aquestes funcions es troba la inactivació de la proteïna pro-apoptòtica BAD (Harada *et al.*, 2001), la inactivació del receptor d'insulina IRS1 i IRS2 (veure apartat 1.2.3.1 Activació mTOR per factors de creixement (insulina)), l'activació en el nucli del factor de transcripció CREM τ (*AMPC responsive element modulator τ*) (de Groot *et al.*, 1994) i l'activació de processos d'splicing alternatiu i de transport d'ARNs missatgers des de el nucli cap al citoplasma a través de l'activació de la proteïna nuclear SKAR (*S6K1 Aly/REF-like target*) (Richardson *et al.*, 2004) entre d'altres.

B) eIF4E binding protein (4EBP1 o PHAS I)

La proteïna 4EBP1 pertany a la família de proteïnes repressores de la traducció 4EBP (*eIF4E binding proteins*). Aquestes proteïnes competeixen amb el factor d'inici de la traducció eIF4G pel lloc d'unió al factor eIF4E, essent l'unió d'una o altre exclouent (Haghighat *et al.*, 1995; Mader *et al.*, 1995).

En mamífers, la família de proteïnes 4EBP1 està constituïda per 3 membres (4EBP1, 4EBP2 i 4EBP3) codificats per tres gens diferents que presenten diferents patrons d'expressió per teixits (Lin *et al.*, 1994; Poulin *et al.*, 1998; Tsukiyama-Kohara *et al.*, 2001). La proteïna 4EBP1 és el membre del qual es té més informació actualment; presenta dos motius reguladors, un motiu TOS en l'extrem C terminal

a través del qual es pot unir a raptor i ser fosforilada per mTORC1 (a l'igual que la S6K) (Tee i Proud, 2002) i un motiu RAIP en l'extrem C terminal (anomenat a partir del codi d'una lletra dels aminoàcids que el conformen) que està relacionat amb la fosforilació de forma independent de Raptor, de les treonines del seu extrem N terminal (Beugnet *et al.*, 2003) (Figura 10). S'han descrit 7 residus fosforilables en 4EBP1 (Thr 37,46,70 i Ser 65,83,101,112) d'entre els quals les fosforilacions en les treonines 37, 46 i 70 i en la Ser 65 són crítiques per a la ruptura de la seva interacció amb el factor eIF4E (Marcotrigiano *et al.*, 1999).

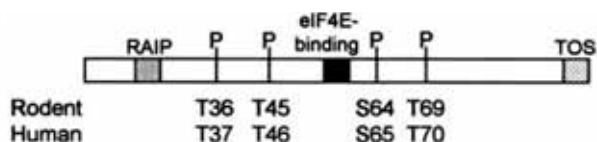


Figura 10. Esquema de la proteïna 4EBP1 humana i de ratolí. Es mostren els motius TOS i RAIP, el lloc d'unió amb el factor eIF4E, i els residus fosforilables involucrats amb la ruptura de l'interacció amb l'eIF4E (adaptat de Wang *et al.*, 2005).

El factor eIF4E participa en l'etapa d'iniciació de la traducció CAP dependent. La majoria dels ARNs missatgers de cèl·lules eucariotes contenen una 7-metil-guanosina (7-metil-GTP o CAP) en el seu extrem 5', que participa en el recrutament dels diferents factors d'iniciació que conformen el complex eIF4F, a l'ARNm (Miura, 1981; Pain, 1996; Gingras *et al.*, 1999). La unió de la proteïna 4EBP1 amb la subunitat eIF4E impedeix la formació del complex eIF4F bloquejant l'inici de la traducció. Quan mTORC1 s'activa fosforila a la proteïna 4EBP1 promovent la ruptura entre el 4EBP1 i l'eIF4E i permetent que l'eIF4E pugui unir-se a l'eIF4G. Per la seva banda, l'eIF4G recluta als factors eIF3, eIF4A i eIF4B, constituint el complex eIF4F el qual posteriorment recluta a la subunitat ribosomal 40S (Gingras *et al.*, 1999; Sonenberg i Dever, 2003).

A través del complex mTORC1, la proteïna mTOR juga un paper crucial en la fosforilació de 4EBP1. No obstant, s'han descrit altres quinases que poden estar també involucrades en la fosforilació d'aquest repressor de la traducció com per exemple la Erk (Herbert *et al.*, 2002; Gingras *et al.*, 2004; Tee i Blenis, 2005) que actua sobre l'eIF4B a través de l'activació de la RSK (Shahbazian *et al.*, 2006).

Apart d'aquest paper en l'inhibició de l'inici de la traducció, la proteïna 4EBP1 participa en altres processos cel·lulars com per exemple l'apoptosi (revisat en Proud, 2005).

En la Figura 11 es mostra de forma esquemàtica el paper del complex mTORC1 i de les proteïnes S6K i 4EBP1 en l'etapa d'iniciació de la traducció CAP dependent.

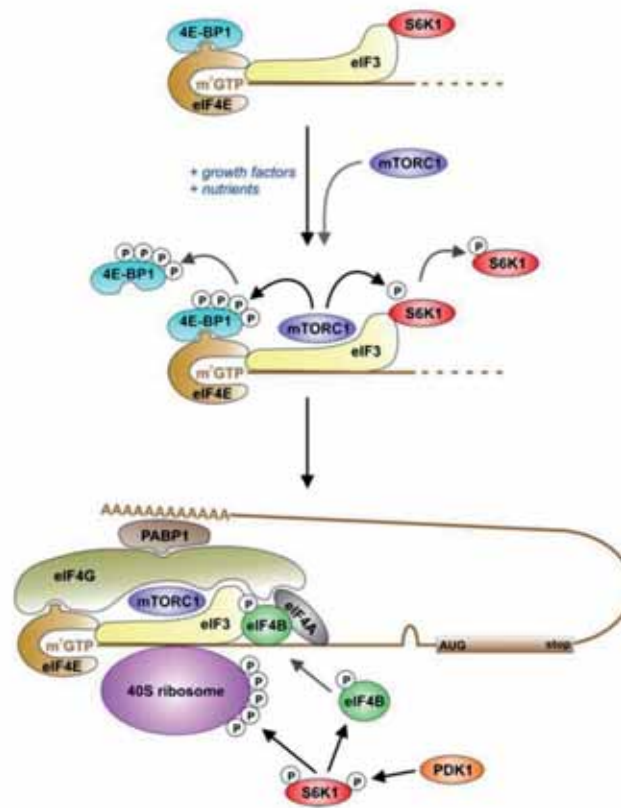


Figura 11. Paper de mTORC1 i dels seus substrats S6K1 i 4EBP1 en la traducció CAP dependent. Quan mTORC1 es troba inactiu, S6K1 i 4EBP1 es troben unides al CAP de l'ARNm a través de la seva interacció amb els factors eIF3 i eIF4E respectivament. Quan mTORC1 s'activa, és reclutat a l'ARNm pel factor eIF3 on fosforila a S6K1 i 4EBP1 promovent la seva sortida del complex. A continuació, i després de ser activada per la PDK1, la S6K1 fosforila a la proteïna de la subunitat 40S del ribosoma, S6, i a l'helicasa eIF4B la qual passa a unir-se a l'eIF3 i juntament amb els factors eIF4A, eIF4G, eIF4E i PABP1 constiueixen el complex de pre-iniciació de la traducció (eIF4F). La fosforilació de 4EBP1 per part de mTORC1 promou la ruptura de l'interacció entre el 4EBP1 i l'eIF4E i possibilita la interacció del darrer amb l'eIF4G que actua com a bastida per a la resta de factors. La S6K1 també inhibeix a la proteïna PDCD4 alliberant a l'eIF4A (no mostrat en la figura) (adaptat de Jastrzebski *et al.*, 2007).

1.2.2.1.2 | Autofàgia

L'autofàgia és una procés cel·lular conservat evolutivament a través del qual les cèl·lules poden degradar i reciclar diferents dels seus components com ara proteïnes amb temps de vida mitja elevats o orgànuls sencers (Seglen i Bohley, 1992; Dunn, 1994; Klionsky i Ohsumi, 1999). Aquest procés es desencadena quan les cèl·lules es troben sotmeses a diferents tipus d'estrès cel·lular com ara el dejuni, canvis en el volum cel·lular, estrès oxidatiu, acumulació de proteïnes mal plegades en el reticle endoplasmàtic, en resposta a la senyalització per algunes hormones, quan les cèl·lules es troben sotmeses a determinades radiacions o xenobiòtics, o bé en resposta a infeccions per microorganismes.

Quan les cèl·lules es troben en un entorn on els nivells de nutrients, factors de creixement, etc., són òptims, el complex mTORC1 s'activa i regula diferents processos fisiològics a favor del creixement cel·lular i en contra de l'autofàgia. mTOR inhibeix el procés d'autofàgia a través de la fosforilació de la proteïna Atg13 que impedeix la seva unió amb l'Atg1, una interacció que és necessària per a l'iniciació del procés autofàgic. En condicions de dejuni, mTORC1 es troba inactiu, de manera que es pot formar el complex Atg1-Atg13 i desencadenar-se l'autofàgia. No obstant, es desconeix quin és exactament la funció d'Atg1 en l'autofàgia (Abeliovich *et al.*, 2000 i 2003; Kamada *et al.*, 2000).

Existeixen tres grans formes d'autofàgia: la macroautofàgia, la microautofàgia, i l'autofàgia mediada per xaperones (Klionsky, 2005; Massey *et al.*, 2006). La microautofàgia i l'autofàgia mediada per xaperones consisteixen en el segrest per part dels lisosomes de petites porcions del citosol o bé de proteïnes associades a xaperones respectivament. La macroautofàgia consisteix en el segrest de proteïnes i d'òrgànuls per part d'un tipus de vesícules de doble membrana anomenades autofagosomes. A partir d'aquí s'utilitzarà el terme autofàgia per fer referència a la macroautofàgia.

Els autofagosomes s'originen a partir d'uns precursors de doble membrana d'origen no del tot conegut anomenats fagòfors (Fengsrud *et al.*, 1995). Aquests precursors experimenten un creixement pels seus dos extrems fins que s'acaben fusionant i atrapen al seu interior una part del citosol que inclou diferents components cel·lulars que han de ser degradats. A continuació, els autofagosomes viatgen a través del citoesquelet d'actina fins als lisosomes amb qui es fusionen formant una gran vesícula anomenada autofagolisosoma (o autolisosoma), on tant el seu contingut com les membranes que els formen són degradats fins a aminoàcids i altres compostos essencials que s'utilitzen posteriorment en el metabolisme anabòlic (Figura 12). La degradació de tots aquests compostos en l'autofagolisosoma té lloc gràcies als enzims hidrolítics dels lisosomes entre els quals es troben lipases, glucosidases, proteases i nucleases (revisat en Xie i Klionsky, 2007).

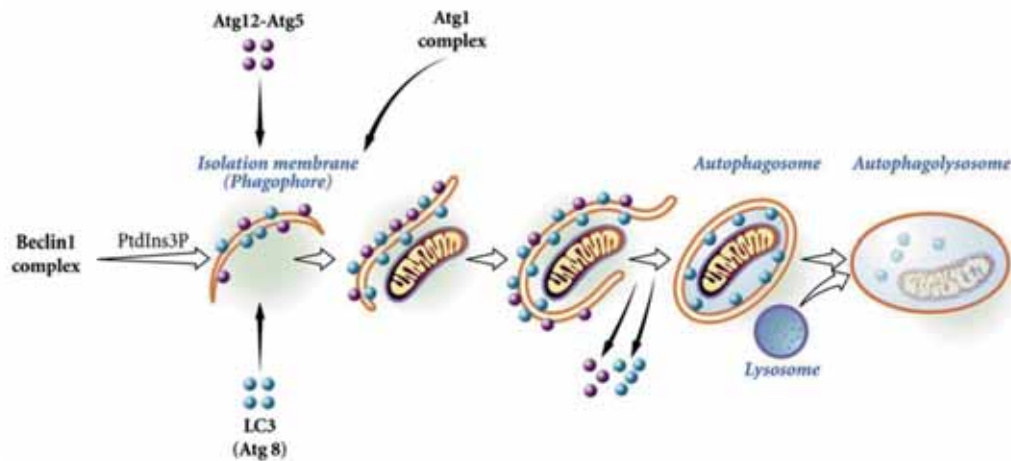


Figura 12. Esquema del procés de formació dels autofagosomes i autofagolisosomes. Es mostren diferents proteïnes involucrades en aquest procés com el complex format per la beclina1, el complex Atg1, i els sistemes Atg12-Atg5 i Atg8 (o LC3) (veure text) (adaptat de Pattingre *et al.*, 2008).

L'estudi dels gens que regulen l'autofàgia es va fer en el llevat *S. cerevisiae*. Per aquest motiu, tot i que s'han identificat la majoria dels seus gens homòlegs en mamífers, sovint s'utilitza la nomenclatura d'aquests gens en llevat. Els gens que intervien en l'autofàgia (*autophagy-related genes* o *Atg genes*) es poden classificar en quatre grups; el conjunt de gens que regulen l'etapa de nucleació dels autofagosomes, el conjunt de gens que regulen l'etapa d'elongació dels fagòfors i la formació dels autofagosomes, el conjunt de gens del complex Atg1 que regulen la senyalització via mTOR (del qual es parlarà més endavant), i el conjunt de gens que regulen l'entrada i la sortida de proteïnes de la membrana de l'autofagosoma. A més a més, durant el procés de maduració dels autofagosomes també participen algunes "small" GTPases com les proteïnes Rab7 i Rab 24 (Gutierrez *et al.*, 2004; Jager *et al.*, 2004) i altres factors involucrats en el tràfic vesicular (Nara *et al.*, 2002; Esselens *et al.*, 2004).

A) Nucleació dels autofagosomes

La nucleació dels autofagosomes s'inicia amb la fosforilació en la posició 3 dels fosfatidil inositols de la membrana dels fagòfors per acció d'un complex proteic format per les proteïnes PI3K de classe 3 (hVps34), la proteïna quinasa Vps15 (reguladora de l'activitat de la Vps34), l'Atg6 (Beclina 1), l'Atg1 (ULK1), Ambra, UVRAG i Bif-1. La generació dels fosfatidil inositols-3-fosfat en la membrana actua com a senyal de recrutament per a altres proteïnes Atg amb dominis FYVE o motius PX en la seva seqüència, que participen en el procés de formació i maduració dels autofagosomes.

B) Elongació dels fagòfors i formació dels autofagosomes

El procés d'elongació dels fagòfors i la formació dels autofagosomes té lloc a través de dos sistemes de conjugació coordinats que recorden el procés multienzimàtic de conjugació de la ubiquitina (Ohsumi, 2001; Suzuki i Ohsumi, 2007); el sistema Atg12-Atg5, i el sistema Atg8(LC3)-PE(fosfatidiletanolamina) (Figura 13) (Ichimura *et al.*, 2000).

- **El Sistema Atg12-Atg5**

Aquest sistema involucra a 5 proteïnes Atg; Atg5, Atg7, Atg10, Atg12 i Atg16L. Les proteïnes Atg7 i Atg10 actuen de forma similar als enzims E1 i E2 del procés d'ubiquitinació respectivament, transferint en últim terme una molècula Atg12 a la proteïna Atg5. A continuació, el dímer Atg12-Atg5 s'uneix de forma no covalent a la proteïna Atg16L formant un gran complex multimèric que participa en la unió de la proteïna Atg8-PE (o *microtubule associated protein light chain 3* (MAP1LC3)-fosfatidiletanolamina) a la membrana de l'autofagosoma.

- **El Sistema Atg8(LC3)-PE(fosfatidiletanolamina)**

Aquest sistema consta de 5 proteïnes Atg; Atg3, Atg7, Atg4C i Atg8. Les proteïnes Atg7 i Atg3 actuen de manera similar a com ho fan els enzims E1 i E2 en el procés d'ubiquitinació. El procés s'inicia a partir de la proteòlisi de l'Atg8 (o LC3) per acció de la proteasa Atg4C, que permet l'interacció entre la glicina de l'extrem C terminal de l'Atg8 i l'Atg7. A continuació, a través de l'Atg3 i del complex Atg12-Atg5 (que actua com un enzim E3 "like"), l'Atg8 és conjugada amb una molècula de fosfatidiletanolamina i passa a formar part de les membranes interna i externa dels autofagosomes. Aquesta modificació de la proteïna Atg8 permet monitoritzar el procés d'autofàgia ja que la forma conjugada amb la fosfatidiletanolamina (LC3 II) pot ser detectada mitjançant anticossos específics en experiments de PAGE/SDS-western blot o de immunocitoquímica.

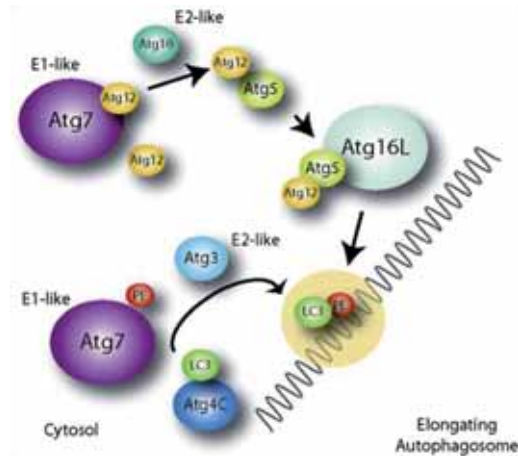


Figura 13. Esquema dels sistemes ubiquitin "like" Atg12-Atg5 i Atg8(LC3)-PE en l'etapa d'elongació dels autofagosomes (adaptat de Cecconi i Levine, 2008)

C) Complex Atg1 (ULK1)

La proteïna Atg1 és una serina/treonina quinasa que forma un complex amb altres proteïnes Atg reguladores de l'autofàgia com l'Atg13 i l'Atg17 (Kamada *et al.*, 2000). Quan les cèl·lules es troben en un entorn ric en nutrients, l'Atg13 és fosforilada per mTORC1 i no es pot associar amb Atg1 amb la conseqüent inhibició de l'autofàgia. En condicions de dejuni o quan les cèl·lules es tracten amb rapamicina, l'Atg13 es troba parcialment defosforilada i es pot produir aquesta interacció i desencadenar-se l'autofàgia. Actualment no és té massa clar quin és exactament el paper del complex Atg1-Atg13 però es creu que podria estar relacionat amb el transport retrògrad de l'Atg9 que té lloc en els autofagosomes no madurs (veure complex Atg9) (Kamada *et al.*, 2000; Abeliovich *et al.*, 2003; Reggiori *et al.*, 2004).

D) Complex Atg9

La proteïna Atg9 viatja de forma cíclica des de els fagòfors cap a altres orgànuls cel·lulars com mitocondris, "late" endosomes o el complex trans-golgi (TGN) per retornar als fagòfors aportant les membranes necessàries per al seu creixement (Reggiori *et al.*, 2004; Yen *et al.*, 2006; Young *et al.*, 2006). Durant aquest cicle, l'Atg9 s'uneix a diferents proteïnes; durant el transport anterògrad Atg9 es troba unida als factors de transport Atg23 i Atg27, mentre que durant el transport retrògrad, l'Atg9 es troba unida als complexos Atg1 i a les proteïnes Atg18 i Atg2.

Existeixen varis estímuls que activen diferents vies de senyalització involucrades en el bloqueig de la iniciació i maduració dels autofagosomes que convergeixen tots ells en l'activació del complex mTORC1. Entre aquests estímuls es troba la presència d'aminoàcids al medi cel·lular, els quals promouen l'activació de mTORC1 a través la PI3K de classe 3 (o hVps34)(veure apartat 1.2.3.2 Activació mTOR per nutrients (aminoàcids)), el tractament amb hormones com la insulina, que actuen a través de la via PI3K de classe I/Akt (veure apartat 1.2.3.1 Activació mTOR per factors de creixement (Insulina)), o nivells elevats d'ATP a l'interior de la cèl·lula, que activen mTORC1 a través de la inhibició de la AMPK (veure apartat 1.2.3.3.1 Regulació mTOR per segons l'estat energètic). No obstant, la via de senyalització de mTOR no és la única que regula l'autofàgia. S'ha descrit que l'estimulació de la Erk indueix l'autofàgia de manera independent de les PI3K (Meijer i Codogno, 2006; Zhu *et al.*, 2007) i que la MAPK p38 la inhibeix (Meijer i Codogno, 2006).

S'han associat defectes en l'autofàgia amb certes malalties neurodegeneratives (com la malaltia de Huntington, el Parkinson, l'esclerosi lateral amiotròfica o l'alzheimer), degut a que l'acumulació d'agregats proteics o la presència de proteïnes tòxiques en les neurones que caracteritzen aquestes malalties, no poden ser eliminades de forma eficient provoquen la seva mort (revisat en Rubinsztein, 2006). També s'han relacionat processos autofàgics defectuosos amb el càncer ja que varies de les proteïnes moduladores de l'autofàgia com la beclina1, Atg5, Bif1, Atg4C o UVRAG presenten activitat supressora de tumors i per tant mutacions en els seus gens poden provocar l'acumulació de danys a l'ADN i inestabilitat en el genoma (Mathew *et al.*, 2007). També és conegut que existeix una relació entre l'autofàgia i la mort cel·lular per apoptosi; la proteïna pro-apoptòtica Bcl-2 és capaç d'interaccionar i inhibir la Beclina1 quan les cèl·lules es troben en medis rics en nutrients (Patingre *et al.*, 2005; Maiuri *et al.*, 2007), en canvi, en condicions de dejuni, la interacció entre aquestes proteïnes és feble degut a que Bcl-2 es troba fosforilada via JNK. També s'ha descrit que formes citosòliques de p53, una altre proteïna crítica en la iniciació de la mort cel·lular per apoptosi, inhibeixen l'autofàgia (Tasdemir *et al.*, 2008).

1.2.2.1.3 | Biogènesi de Ribosomes

La formació de les dues subunitats que conformen els ribosomes de les cèl·lules eucariotes és un procés conservat evolutivament que consisteix en el correcte acoblament de quatre espècies diferents d'ARNs i unes 80 proteïnes ribosomals. Per a la síntesi, maduració i transport de les dues subunitats ribosomals des d'el nuclèol cap al citoplasma, on té lloc la traducció, són necessaris a més a més uns 150 factors no ribosomals.

Tres de les quatre espècies d'ARN ribosomal que conformen els ribosomes es troben codificades en l'ADN ribosomal, un gen per el qual existeixen centenars de repeticions al llarg del genoma organitzades en tàndems. Cadascuna d'aquestes repeticions està formada per un fragment que es transcriu de 13,7 Kb (en humans) i un fragment espaiador de 29,3 Kb entre repeticions que no es transcriu (Lewis *et al.*, 1966; Liau i Perry, 1969; Raska *et al.*, 2004). La transcripció del fragment de 13,7 Kb genera una fracció de pre-ARN ribosomal policistrònic 45S (una fracció no homogènia que en realitat està formada per les espècies 45S, 46S i 47S (Tiollais *et al.*, 1971)) que conté les seqüències corresponents a les espècies d'ARN 18S, 5,8S i 28S, separades per seqüències espaiadores internes (ITSs) i una seqüència espaiadora externa a cada extrem (ETSs)(Figura 14). La quarta espècie d'ARN ribosomal (ARNr 5S) es troba codificada apart, en un altre gen.

A la Taula 7 es mostra el contingut en ARN de cadascuna de les dues subunitats que conformen els ribosomes.

Cèl·lules procariotes			Cèl·lules eucariotes		
Ribosoma	Subunitats	ARN ribosomal	Ribosoma	Subunitats	ARN Ribosomal
70S (2700KDa)	50S	5S i 23S	80S (4200 KDa)	60S	5S, 28S i 5,8S
	30S	16S		40S	18S

Taula 7. Composició en ARN dels ribosomes de les cèl·lules procariotes i eucariotes.

En mamífers, les repeticions d'ADN ribosomal es troben localitzades en les constriccions secundàries de varis cromosomes acrocèntrics. Quan les cèl·lules surten de la mitosi, aquests loci s'incorporen al nuclèol on es produeix la seva transcripció i maduració. La maduració del precursor de l'ARN ribosomal (pre-ARNr 45S) (Figura 14) i l'acoblament dels diferents components dels ribosomes té

lloc mitjançant un procés complex en el qual hi participen diverses proteïnes tant ribosomals com no ribosomals, així com fragments petits d'ARN nucleolar (snoARNs) (Fatica i Tollervy, 2002; Tschochner i Hurt, 2003). De forma breu aquest procés consisteix en les següents etapes:

- Eliminació dels espaiadors interns i externs del pre-ARNr 45S abans o durant l'acoblament de les subunitats ribosomals 40S i 60S en el nuclèol, per mitjà de l'acció de nucleases.
- Modificacions de les diferents espècies d'ARNr per acció de pseudouridina sintases i metil transferases.
- Remodelatge i plegament de les diferents espècies d'ARN ribosomal i de les proteïnes ribosomals (RPs) per acció de múltiples proteïnes (helicases, xaperones, etc.).
- Associació i dissociació de proteïnes reguladores mediades per GTPases i ATPases.
- Reclutament al nuclèol i integració en les partícules pre-ribosomals de l'ARNr 5S (sintetitzat al nucleoplasma) i de les proteïnes ribosomals (RPs)(sintetitzades al citosol).
- Sortida al citoplasma dels ribosomes gairebé madurs amb l'ajuda de molècules adaptadores.

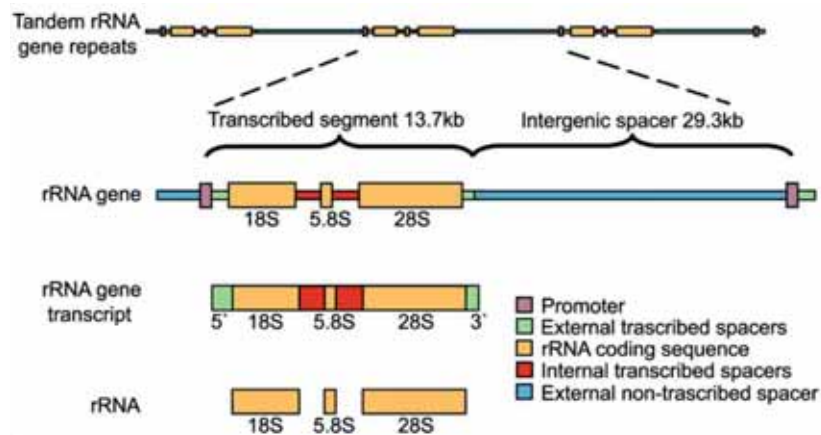


Figura 14. Esquema dels gens ribosomals humans i el dels seus transcrits primaris i secundaris. L'ARNr 18S, 5,8S i 28S s'obtenen a partir de la maduració del pre-ARNr 45S (adaptat de Râska *et al.*, 2004).

La regulació de la síntesi de l'ARN ribosomal en les cèl·lules té lloc a dos nivells; a llarg plaç, a través de la remodelació de la cromatina, i a curt plaç, a través de la regulació de la maquinària de transcripció. És conegut que en situacions normals, un gran nombre de gens ribosomals es troben formant part dels nucleosomes en un estat d'elevada compactació de la cromatina (heterocromatina) que els fa transcripcionalment inactius (Grummt, 2003), mentre que d'altres es troben en un estat de la cromatina menys compacta (eucromatina) i són transcripcionalment actius. El quocient entre el nombre de gens que es troben en una o altra forma és constant al llarg del cicle cel·lular i és independent de la maquinària de transcripció de l'ADNr (Santoro *et al.*, 2002; Grummt, 2003). Els gens ribosomals transcripcionalment actius són transcrits o no en funció de les necessitats de la cèl·lula en cada moment a través de la regulació de la maquinària de transcripció de l'ADN ribosomal.

Quan les cèl·lules es troben en condicions ambientals òptimes per al seu creixement, es desencadenen una sèrie d'aconteixements que provoquen un augment en la síntesi de proteïnes que és essencial per al creixement cel·lular però que sols pot tenir lloc si les cèl·lules disposen de tots els components que conformen els ribosomes. Quan les condicions ambientals són desfavorables, les cèl·lules redueixen la producció de nous ribosomes, un dels processos cel·lulars amb major cost energètic (la síntesi d'ARN ribosomal correspon a un 70-80% de la síntesi d'ARN total).

A través del complex mTORC1, mTOR actua com a sensor de nutrients i factors de creixement permetent, quan aquests es troben disponibles, l'activació de diversos mecanismes relacionats amb el creixement, entre els quals es troba la biogènesi de ribosomes (Schmelzle i Hall, 2000; Kim *et al.*, 2003). mTOR controla la biogènesi de ribosomes a través de la regulació de la transcripció i maduració de l'ADN ribosomal (ADNr), de la transcripció i traducció dels gens que codifiquen per a les proteïnes ribosomals (RPs) i de la transcripció de l'ARN 5S. Tots aquests processos tenen lloc a través de la regulació que exerceix mTOR sobre la maquinària de traducció dels TOP ARNs i de l'activitat de tres tipus d'ARN polimerases que s'encarreguen de la transcripció de diferents gens; l'ARN polimerasa I (transcripció de l'ADN ribosomal (ADNr) en el nucleòl), l'ARN polimerasa II (transcripció dels gens que codifiquen per a proteïnes ribosomals (RPs)), i l'ARN polimerasa III (transcripció de l'ADN 5S).

A) mTOR en la regulació de la transcripció de l'ADN ribosomal

La transcripció de l'ADN ribosomal és una de les etapes limitants en la biogènesi de ribosomes i és dut a terme en el nucleòl per l'ARN polimerasa I. Requereix d'almenys tres factors durant la seva etapa d'iniciació; el factor TIF-IA (*transcription initiation factor IA*), el factor SL1 (o TIF-IB) i el factor UBF (*upstream binding factor*) (Grummt, 2003). El factor TIF-IA interacciona directament amb l'ARN polimerasa I i amb el factor d'unió al promotor de l'ADN ribosomal, SL1, recrutant l'ARN polimerasa I al promotor de l'ADNr i facilitant la formació del complex de transcripció (Miller *et al.*, 2001; Cavanaugh *et al.*, 2002; Yuan *et al.*, 2002). A través de l'activació via múltiple fosforilació de TIF-IA per acció de diferents vies de senyalització entre les quals es troba la via de mTOR, aquesta proteïna participa en el creixement cel·lular i en la regulació de la transcripció de l'ADN ribosomal de manera dependent de nutrients (Bodem *et al.*, 2000; Moorefield *et al.*, 2000).

És conegut que la síntesi de l'ARN ribosomal en cèl·lules de mamífer es troba directament relacionada amb la disponibilitat de nutrients, especialment d'aminoàcids, ja que una disminució d'aquests en el medi cel·lular, especialment de l'aminoàcid leucina, provoca una ràpida disminució de la transcripció mediada per l'ARN polimerasa I (Grummt *et al.*, 1976). Aquest fet, junt amb l'observació que el tractament de les cèl·lules amb rapamicina afecta a la transcripció de l'ADN ribosomal d'una manera similar al dejuni d'aminoàcids, i que la sobreexpressió de les proteïnes mTOR o S6K (però no de mutants de la S6K amb activitat quinasa deficient) permeten recuperar els nivells normals de transcripció en cèl·lules tractades amb rapamicina, van permetre establir la via de senyalització de mTOR com una via reguladora de la transcripció de l'ADN ribosomal.

mTOR regula el factor TIF-IA de dues maneres; de forma indirecta regulant la fosforilació de la serina 44 i la defosforilació de la serina 199 d'aquest factor, a través de la quinasa S6K i de la fosfatasa PP2A respectivament, promovent l'associació entre els factors TIF-IA i SL1 i afavorint la formació del complex d'iniciació de la transcripció de l'ADN ribosomal (Mahajan, 1994), i de forma directa, regulant la localització subcel·lular de TIF-IA en el nucleòl quan mTOR es troba actiu, o segregant-lo en el citoplasma quan mTOR està inhibit (Beck i Hall, 1999).

L'activació de la S6K a través de mTOR provoca la fosforilació en l'extrem C terminal de UBF, un altre factor de transcripció de l'ARN polimerasa I que és necessari per a la interacció entre l'ARN polimerasa I i el factor SL1 (Hannan *et al.*, 2003). També s'ha descrit que mTOR és capaç d'incrementar els nivells de transcripció de l'ADN ribosomal en cèl·lules del múscul esquelètic a través de l'activació de la CDK4/ciclina D amb la conseqüent fosforilació de la proteïna supressora de tumors retinoblastoma (pRb), la ruptura de la interacció entre pRb i UBF, i l'augment dels nivells d'UBF lliure (Nader *et al.*, 2005). Per altre banda, s'ha descrit que l'activació de la via de la PI3K de classe I per mitjà de l'IGF1 (*insulin like growth factor 1*) regula la unió del factor SL1 amb el promotor de l'ADN ribosomal a través de les vies de mTOR i de les MAPKs (James i Zomerdijsk, 2004).

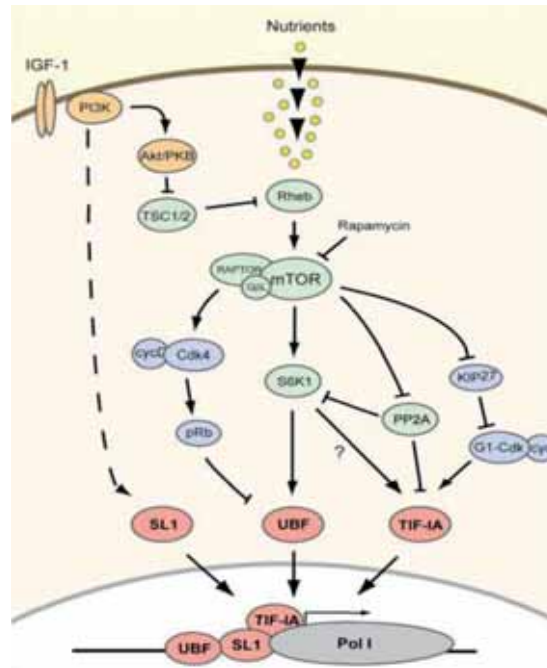


Figura 15. Via de senyalització de mTOR en la regulació de la transcripció mediada per l'ARN polimerasa I (adaptat de Mayer i Grummt, 2006).

B) mTOR en la regulació de la transcripció i la traducció de les proteïnes ribosomals

Els ribosomes de les cèl·lules de mamífers contenen unes 80 proteïnes diferents (unes 50 en la subunitat 60S i unes 30 en la subunitat 40S) que estan codificades en gens d'una sola còpia localitzats al llarg de tot el genoma. La transcripció de tots aquests gens, a l'igual que d'altres gens que codifiquen per a proteïnes relacionades amb el processament de l'ARN ribosomal i en l'acoblament dels ribosomes, està regulada per l'ARN polimerasa de tipus II. A través d'aquest enzim es generen els ARNm de les proteïnes ribosomals, els quals viatgen fins al citosol per ser traduïts i retornen al nucli ja com a proteïnes ribosomals on s'acumulen al nuclèol i passen a formar part de les subunitats ribosomals corresponents.

Aquestes proteïnes participen en el processament i el plegament del pre-ARNr 45S, en l'estabilització de les dues subunitats dels ribosomes, i interaccionen amb altres factors necessaris per a la traducció i el plegament de les proteïnes sintetitzades en el ribosoma (Kramer *et al.*, 2002). Un determinat nombre de proteïnes ribosomals però, no passen a formar part dels ribosomes i es troben

en forma lliure al nucli i al citosol on s'ha descrit que participen en funcions "extra-ribosomals" com ara l'apoptosi i la reparació de l'ADN entre d'altres (revisat en Wool, 1996).

Mitjançant experiments d'anàlisi de l'expressió gènica s'ha observat que el tractament amb rapamicina inhibeix l'expressió de molts gens, inclosos la majoria de gens que codifiquen per a les proteïnes ribosomals (RPs) (Cardenas *et al.*, 1999; Preiss *et al.*, 2003). En llevat, la via de senyalització de mTOR juntament amb la via de Ras/PKA, regula la transcripció d'aquests gens a través del factor de transcripció de l'ARN polimerasa II, FHL1 (Martin *et al.*, 2004; Schawalder *et al.*, 2004; Wade *et al.*, 2004) un factor que s'uneix al promotor dels gens de les proteïnes ribosomals i que és activat o inhibït a través de la seva associació amb IFH1 (coactivador) o CRF1 (corepressor) respectivament. Quan el complex mTORC1 es troba actiu manté al factor CRF1 en el citoplasma, en canvi, en presència de rapamicina o en cèl·lules dejunades, CRF1 es pot translocar al nucli on competeix amb l'IFH1 per unir-se amb FHL1, provocant una davallada en els nivells de transcripció de la cèl·lula (Martin *et al.*, 2004). mTOR també controla la transcripció dels gens de proteïnes ribosomals a través del factor tipus dits de Zinc, SFP1, el qual s'uneix al promotor d'aquests gens de manera mTOR dependent (Jorgensen *et al.*, 2004).

mTOR regula l'expressió de proteïnes ribosomals de dues maneres més; regulant factors modificadors de les histones que afecten a la compactació de la cromatina i per tant a l'expressió gènica, i regulant el procés de traducció; els ARNs missatgers de les proteïnes ribosomals es caracteritzen per presentar tots ells un fragment d'oligopirimidines en el seu extrem 5' (TOP mARNs), i és conegut que mTOR és determinant en la traducció d'aquest tipus d'ARNs missatgers (veure apartat 1.2.2.1.1).

C) mTOR en la regulació de la síntesi de l'ARN 5S

L'ARN polimerasa tipus III s'encarrega de la transcripció de l'ARN 5S i dels ARNs de transferència. L'ARN 5S juntament amb els ARNs 5,8S i 28S conformen la subunitat ribosomal 60S, però a diferència dels dos darrers, l'ARN 5S no es troba codificat en el gen de l'ADN ribosomal.

El paper que exerceix mTOR en la regulació de la síntesi de l'ARN 5S és força desconegut actualment. En llevat s'ha observat que el tractament amb rapamicina inhibeix l'inici de la transcripció mediada per l'ARN polimerasa III de gens com el de l'ARN 5S o dels ARNs de transferència (Zaragoza *et al.*, 1998). Anàlisis bioquímics realitzats en llevats sotmesos a un tractament amb rapamicina també han permès observar que mTOR actua modulant directament l'activitat de la ARN polimerasa III i el factor de l'inici de la transcripció TFIIB (Zaragoza *et al.*, 1998). En cèl·lules de mamífer s'ha descrit que la inhibició de la via de senyalització de mTOR provoca una disminució en la transcripció mediada per l'ARN polimerasa III i en l'associació dels factors de transcripció TFIIB i TFIIC amb el promotor del gen de l'ARN 5S (White, 2005), indicant que mTOR regula el reclutament de l'ARN polimerasa III al promotor dels seus gens diana tant en cèl·lules procariotes com eucariotes (Graham *et al.*, observacions no publicades).

La proteïna mTOR però no és l'única involucrada en aquest tipus de transcripció. A l'igual que en la transcripció mediada per l'ARN polimerasa I, s'ha descrit un possible paper de la Erk en la transcripció mediada per l'ARN polimerasa III (James i Zomerdijk, 2004; White, 2005).

Com s'ha comentat anteriorment, la via de mTOR no és l'única via reguladora del creixement cel·lular. La via de senyalització Ras/MEK/Erk convergeix amb la via PI3K/Akt/mTOR en la regulació del creixement cel·lular a través de la fosforilació de les proteïnes TSC2 i S6 via p90RSK (Proud, 2004 i 2007; Gomez Roman *et al.*, 2006). Concretament en la biogènesi de ribosomes, el factor de transcripció c-myc regula diferents processos involucrats en la síntesi de ribosomes com la transcripció dels gens de les

proteïnes ribosomals, dels ARNs de transferència, de l'ARN 5S i de l'ADN ribosomal (Kim *et al.*, 2000; Boon *et al.*, 2001; Gomez-Roman *et al.*, 2003; Schlosser *et al.*, 2003; Arabi *et al.*, 2005; Grandori *et al.*, 2005).

En condicions favorables per a la biosíntesi de ribosomes i el creixement cel·lular, el factor de transcripció c-myc es localitza en el nuclèol des d'on atrau complexos enzimàtics modificadors de les histones que alteren l'organització de la cromatina cap a una estructura transcripcionalment competent (Arabi *et al.*, 2005; Grandori *et al.*, 2005), i des d'on recruta també el factor de transcripció SL1 al promotor de l'ADN ribosomal. El substrat de c-myc, nucleolina, ha estat recentment descrit de ser necessari per a la transcripció mediada per l'ARN polimerasa I (Rickards *et al.*, 2007), i com a possible efector de mTOR en la regulació d'aquest tipus de transcripció (Grolleau *et al.*, 2002).

La transcripció de determinats gens, i en general, l'activació de la via de senyalització de mTOR, es troba incrementada durant el desenvolupament de diverses neoplàsies (Ruggero i Pandolfi, 2003). Canvis en la biogènesi de ribosomes mediat per mTOR no en són l'excepció i és conegut que contribueixen al creixement cel·lular descontrolat que té lloc en aquests processos (no d'extranyar per altre banda ja que la síntesi de proteïnes a través dels ribosomes és indispensable per al creixement cel·lular) (Ferrari *et al.*, 1990; Holland *et al.*, 2004). A més a més, a diferència del que succeeix en cèl·lules sanes, mutacions en els gens dels supressors tumorals pRb i p53 en cèl·lules canceroses impedeixen la unió d'aquestes proteïnes als factors UBF i SL1 respectivament, i inhibeixen el control negatiu que exerceixen pRb i p53 sobre la transcripció mediada per l'ARN polimerasa I.

A la Figura 16 es mostren de forma esquemàtica els diferents processos que tenen lloc en la biogènesi de ribosomes:

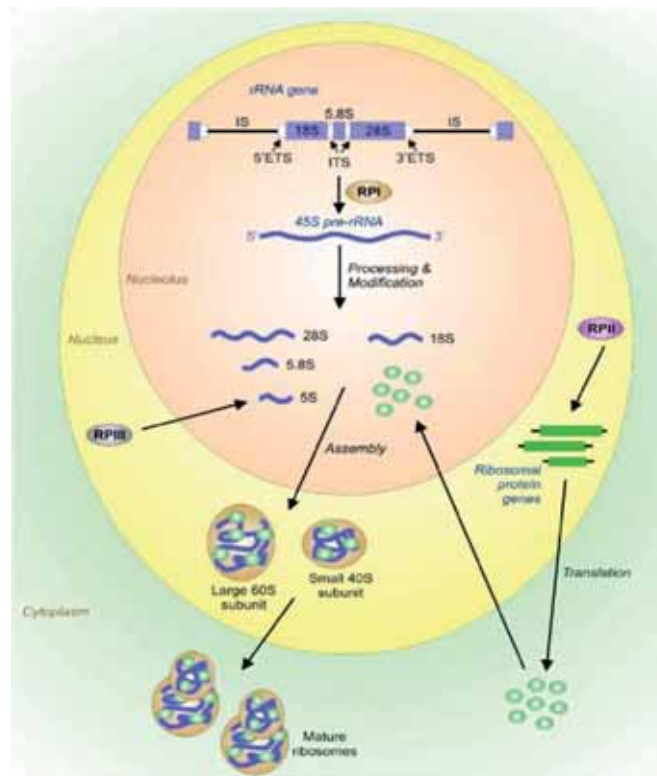


Figura 16. La biogènesi de ribosomes. RPI,II i III: ARN polimerasa I,II i III. ETS: *external transcribed spacer*. ITS: *Internal transcribed spacer* (adaptat de Jastrzebski *et al.*, 2007).

1.2.2.2 | Funcions regulades pel complex mTORC2

1.2.2.2.1 | Creixement i supervivència cel·lular

A nivell funcional, el coneixement que es té actualment sobre el complex mTORC2 és menor del que es té sobre el complex mTORC1. Entre les funcions en les que participa mTORC2 es troben la regulació del citoesquelet d'actina (Nakashima *et al.*, 2002; Jacinto *et al.*, 2004; Sarbassov *et al.*, 2004; Guertin *et al.*, 2006) i la regulació de l'activació de l'Akt (de la qual es parlarà en aquest apartat).

L'Akt (o PKB) és una serina/treonina quinasa que pertany a la família de les quinases AGC (proteïna quinasa A, proteïna quinasa G, proteïna quinasa C) que en mamífers inclou, a més de l'Akt, la S6K, la RSK i la SGK entre d'altres. La PDK1 (*phosphatidyl inositol dependent kinase 1*) és una de les proteïnes responsables de l'activació d'aquesta família de quinases, a través de la fosforilació d'un residu treonina en el "loop" d'activació present en totes elles (Mora *et al.*, 2004), i que en el cas de l'Akt correspon a la treonina 308. No obstant, per adoptar un grau d'activació màxim, les quinases AGC necessiten també ser fosforilades en un residu serina o treonina del motiu hidrofòbic (HM) present en el seu extrem C terminal i que permet la interacció entre el motiu HM i el lòbul N terminal de la proteïna. En el cas de l'Akt es va hipotetitzar l'existència d'una "PDK2" necessària per aquesta "segona" fosforilació (concretament en la serina 473), però la seva identificació no es va produir fins uns anys més tard.

El descobriment del complex mTORC2 i de les proteïnes que en formen part, així com la realització d'experiments d'ARN d'interferència (siRNA) contra la proteïna Rictor (mTORC2) en cèl·lules de mamífer i de *Drosophila*, van permetre observar una disminució de la fosforilació en la serina 473 de l'Akt que no succeïa quan es silenciava Raptor (mTORC1). El mateix passava en assaigs quinasa *in vitro* quan s'utilitzaven immunoprecipitats de TOR/Rictor però no de TORC/Raptor. Aquestes dades van permetre definir el complex mTORC2 com a la PDK2 responsable de la fosforilació de l'Akt (Sarbassov *et al.*, 2004 i 2005).

El complex mTORC2 regula per tant l'activitat de l'Akt i les seves funcions en el creixement, la supervivència i el metabolisme a través de l'activació o inhibició de les següents funcions cel·lulars (Figura 17) (revisat en Marte i Downward, 1997; Brazil i Hemmings, 2001; Manning i Cantley, 2007):

- Inhibició de l'apoptosi a través de l'inhibició de factors pro-apoptòtics com BAD i la caspasa 9, i de la regulació de la localització subcel·lular de factors de transcripció responsables de l'expressió de gens pro-apoptòtics, com les proteïnes de la família FOXO, o p53 (aquest darrer a través de l'activació per fosforilació de la E3 ubiquitina lligasa responsable de la seva degradació, Mdm2) i de l'inhibició de la GSK3 (quinasa responsable de l'inhibició del membre anti-apoptòtic de la família de Bcl-2, MCL-1).
- Activació del creixement cel·lular a través de l'activació del complex mTORC1 via inhibició per múltiple fosforilació de TSC2 i de la regulació de la seva localització subcel·lular, així com de la inhibició per fosforilació de l'inhibidor de mTORC1, PRAS40.
- Activació del cycle cel·lular a través de la inhibició de les quinases dependents de ciclines inhibidores del cycle cel·lular, p27^{Kip1} i p21^{Cip1}. L'Akt també impedeix l'expressió dels gens d'aquestes quinases a través de la inhibició de la família de factors de transcripció FOXO i de l'augment de la degradació via proteasoma 26S de p53 (a través de l'activació de Mdm2). També

inhibeix la GSK3 evitant la fosforilació i posterior degradació via proteasoma 26S de proteïnes involucrades en l'entrada al cycle cel·lular com les ciclines D i E, i els factors de transcripció c-jun i c-myc, i augmenta la traducció CAP dependent dels ARNm de la ciclina D1 i del factor c-myc, a través de l'activació de mTORC1.

- **Activació de l'angiogènesi.** Per mitjà de l'activació de mTORC1, l'Akt genera un augment en la síntesi d'òxid nítric en les cèl·lules a través de l'activació de la síntasa d'òxid nítric (eNOS) i de la traducció del factor de transcripció induït per hipòxia HIF α . L'augment d'òxid nítric estimula la vasodilatació i l'angiogènesi, mentre que l'HIF1 α indueix la secreció de VEGF i d'altres factors angiogènics en cèl·lules endotelials.
- **Regulació del metabolisme cel·lular.** L'Akt estimula la captació de glucosa en resposta a insulina a través de la translocació del transportador de glucosa Glut4 a la membrana plasmàtica mitjançant un mecanisme no del tot conegut però en el qual sembla participar-hi la GTPasa de la família Rab, AS160 (o TBC1D4). La inhibició via Akt de PRAS40 i TSC2 i la consegüent activació de mTORC1 també contribueix a la transcripció i traducció del gen Glut1 de forma HIF1 α dependent, així com de gens que codifiquen per a transportadors de nutrients (aminoàcids). L'Akt també altera el metabolisme de la glucosa estimulant l'associació de l'hexoquinasa amb els mitocondris, on té lloc la seva activitat, i la síntesi de glicògen a través de l'activació de la glicògen sintasa via inhibició de la GSK3.

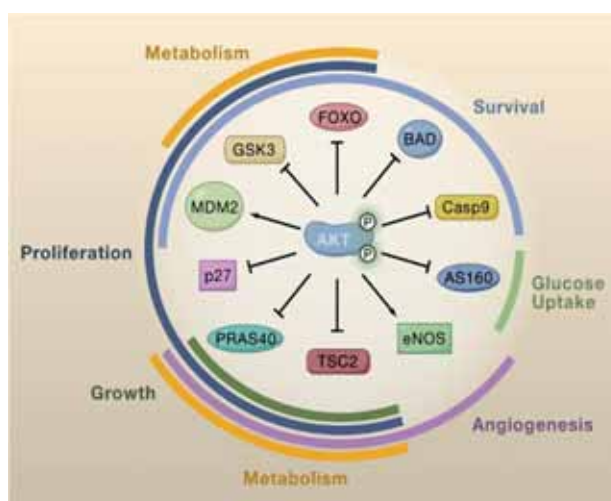


Figura 17. Principals substrats de l'Akt i la seva funció cel·lular (veure text) (adaptat de Manning i Cantley, 2007).

L'establiment de mTORC2 com a PDK2 per a l'Akt, situa a aquesta quinasa per sobre i per sota de la via de senyalització de mTOR. Aquest fet, ha originat certa controvèrsia en la bibliografia. Sembla acceptat que l'Akt adquireix el seu grau d'activació màxim *in vitro* quan es troba fosforilada tant en la treonina 308 com en la serina 473 (Alessi *et al.*, 1996a), però en canvi, *in vivo*, la fosforilació d'ambdós residus es mostra independent, ja que en experiments en els quals s'impedeix la fosforilació d'un d'ells, s'ha observat que la fosforilació de l'altre residu així com l'activitat Akt sobre determinats substrats no es veu afectada (Williams *et al.*, 2000; Guertin *et al.*, 2006; Jacinto *et al.*, 2006). Alguns autors suggereixen que la fosforilació de la serina 473 podria regular la selecció de substrats de l'Akt de manera que alguns d'ells podrien requerir un grau d'activació màxim de l'Akt, mentre que per altres no seria necessari (Jacinto *et al.*, 2006; Manning i Cantley, 2007). No obstant, a part de l'expressió específica de

certs substrats en determinades condicions o de la seva localització subcel·lular, els mecanismes de selecció de substrat de l'Akt, així com els estímuls i els mecanismes responsables de l'activació del complex mTORC2 són encara força desconeguts.

1.2.3 | Regulació de la via de senyalització de mTOR

Dels dos complexos que forma mTOR, poca és la informació que es té actualment sobre el mecanisme d'activació de mTORC2. Si es coneixen en canvi, varis dels estímuls i mecanismes que porten a l'activació del complex mTORC1 dels quals es parlarà a continuació.

Diferents tipus de senyals intra i extracel·lulars convergeixen en el complex mTORC1 que actua com a sensor de tots ells permetent el creixement i la proliferació cel·lular únicament quan les cèl·lules es troben en les condicions òptimes per poder-ho dur a terme amb èxit. Entre aquests senyals es troben l'estat energètic de la cèl·lula, l'estrès cel·lular i la presència o absència de factors de creixement i/o nutrients. A continuació es mostren els mecanismes o vies de transducció de senyal mitjançant les quals aquests estímuls provoquen l'activació o la inhibició de la via de senyalització de mTORC1.

1.2.3.1 | Activació per factors de creixement (Insulina)

El mecanisme d'activació de mTORC1 a través de factors de creixement és força conegut i té lloc a través de l'eix de transducció de senyal que formen les proteïnes PI3K(de classe I)/Akt/complexe TSC/Rheb/mTOR.

El receptor de l'insulina IR (Insulin receptor) pertany a la família dels receptors tirosina quinasa (RTKs), una família de receptors de membrana que presenten cues citosòliques amb activitat tirosina quinasa que s'activa quan es produeix l'unió entre el lligand corresponent i el receptor. Quan l'insulina s'uneix a l'IR aquest dimeritza i es produeix l'autofosforilació de varies tirosines dels seus dominis citoplasmàtics, que un cop fosforilades, recruta a les proteïnes adaptadores IRS1 i IRS2 (amb dominis PTB (*phosphotyrosine-binding domains*)), que també són fosforilades en varies tirosines pel receptor (White, 1998). Un determinat nombre d'aquestes fosfo-tirosines (tant del receptor IR com dels adaptadors IRS) actuen com a punts d'ancoratge per a la subunitat reguladora de la PI3K de classe I, p85, produint-se la translocació a la membrana plasmàtica de la subunitat catalítica p110 d'aquesta quinasa, des d'on catalitza la síntesi de fosfatidils inositol-3,4,5-trifosfat (PIP₃) a partir de fosfatidils inositol-4,5-bifosfat (PIP₂) (un procés que pot ser revertit per la fosfatasa lipídica i supressor tumoral PTEN (*phosphatase and tensin homolog*)). Els dominis homòlegs a la pleckstrina (dominis PH) presenten una gran afinitat pels PIP₃, i per tant, l'aparició d'aquests en la membrana plasmàtica promou el recrutament de proteïnes que contenen aquests dominis com la PDK1 i l'Akt. A continuació, l'Akt s'activa per mitjà de la fosforilació de la seva treonina 308 via PDK1 i inhibeix els reguladors negatius de mTORC1, PRAS40 i TSC (complex de l'esclerosi tuberosa) possibilitant l'activació de mTOR .

Aquesta via de transducció de senyal presenta un sistema de regulació negatiu per retroalimentació ("feed back") que és exercit pel substrat de mTOR, S6K, i que s'ha descrit que està relacionat amb l'obesitat i amb la resistència a la insulina (Um *et al.*, 2004). Quan l'insulina activa a mTOR es produeix l'activació de la quinasa S6K que a part d'exercir les funcions descrites anteriorment en l'apartat 1.2.2.1.1 A, realitza també les següents:

- Inhibició de la PI3K de classe I i per extensió l'activació de l'Akt, a través de la fosforilació en les serines 302 i 307 de IRS, amb la conseqüent ruptura de l'interacció entre aquesta i el receptor de la insulina (Tremblay i Marette, 2001; Harrington *et al.*, 2004). Aquesta ruptura provoca la degradació de IRS1 a través del proteasoma 26S, en un procés on intervé la proteïna 14-3-3 la qual mobilitza IRS1 cap al citosol on és degradat a través del sistema UPS (*ubiquitin proteasome system*) (Craparo *et al.*, 1997). En aquesta situació, la PI3K de classe I no es pot translocar a la membrana plasmàtica de manera que no es pot produir l'activació de l'Akt. Cal dir que la fosforilació de la serines 302 i 307 de IRS1 és necessària però no suficient per a la inhibició de l'Akt ja que s'ha descrit que la fosforilació d'altres residus a través d'altres quinases com la JNK, o la PKC, també són necessaris (Aguirre *et al.*, 2002; Moeschel *et al.*, 2004; Werner *et al.*, 2004).
- Inhibició de la transcripció de IRS1. En experiments realitzats amb cèl·lules deficientes per al complex TSC (TSC1/TSC2) s'ha observat que els nivells de l'ARNm de IRS1 són menors que en cèl·lules *wild type*. A més a més, quan es tracten aquestes cèl·lules amb rapamicina o es restableixen els nivells del complex TSC, o bé quan es silencia l'expressió de la S6K1 i la S6K2 mitjançant ARN d'interferència, els nivells de l'ARNm de IRS1 es recuperen (Harrington *et al.*, 2004; Shah *et al.*, 2004).

També s'ha descrit que quan es tracten cèl·lules dejunades prèviament de sèrum amb factors de creixement, es produeix un augment intracel·lular d'àcid fosfatídic (PA) degut a l'activació de la fosfolipasa D (PLD1) via Cdc42 (Fang *et al.*, 2001 i 2003), que estimula la fosforilació dels substrats de mTORC1, S6K1 i 4EBP1 de manera sensible a la rapamicina. Aquestes dades han permès situar l'àcid fosfatídic i la PLD1 per sobre de mTOR en el mecanisme d'activació de mTORC1 per factors de creixement. A més a més, estudis posteriors mitjançant la sobreexpressió o silenciament de Rheb han permès descriure l'existència d'una interacció directa entre Rheb i aquesta fosfolipasa i constatar que quan Rheb no es troba present, la fosforilació de la S6K via PLD1 es veu disminuïda (Sun *et al.*, 2008). També s'ha descrit que el domini FRB de TOR podria unir electrostàticament l'àcid fosfatídic, competint amb la rapamicina i contribuint a l'activació de TOR.

Recentment s'ha observat que el complex mTORC2 també és sensible a la rapamicina en determinades línies cel·lulars quan s'utilitzen dosis majors i es perllonga el tractament en el temps, possiblement degut a que aquest compost impedeix l'acoblament dels diferents membres del complex mTORC2 (Sarbasov *et al.*, 2006). Tenint en compte aquestes dades, i si tal com s'ha descrit l'àcid fosfatídic competeix amb la rapamicina pel lloc d'unió a mTOR (Fang *et al.*, 2001), no és descabellat pensar que l'àcid fosfatídic podria ser també necessari per l'activació del complex mTORC2. En aquest sentit, mitjançant experiments d'inhibició de la síntesi d'àcid fosfatídic, s'ha observat que la fosforilació de la serina 473 de l'Akt a través del complex mTORC2 o la co-immunoprecipitació de Rictor amb anticossos contra mTOR, depenen de la síntesi d'àcid fosfatídic via PLD, suggerint que tant l'acoblament com l'activació del complex mTORC1 però també mTORC2 depenen de la via PLD/PA (Toschi *et al.*, 2009).

1.2.3.1.1 | El complex Tuberina/Hamartina (TSC2/TSC1)

Als anys 1992 i 1997 es van identificar els gens que codifiquen per a les proteïnes TSC2 (tuberina) i TSC1 (hamartina) (Kandt *et al.*, 1992; van Slegtenhorst *et al.*, 1997), dues proteïnes de 200 i 130 kDa respectivament, que no presenten homologia amb cap tipus de proteïna coneguda ni tampoc entre elles i que l'únic domini que se'ls ha identificat és un domini homòleg al domini GAP (*GTPase activating protein*) de la proteïna Rap1GAP, que es troba en l'extrem C terminal de TSC2 (Figura 18), i un

domini amb estructura “coiled coil” en TSC1. El descobriment del domini GAP de TSC2 va tenir lloc gràcies a l’observació que aquesta proteïna presentava una lleu activitat GAP sobre les GTPases Rap1 i Rab5 (Wienecke *et al.*, 1995; Xiao *et al.*, 1997), però actualment s’ha descrit que la principal funció *in vivo* de TSC2 és l’estimulació de l’activitat GTPasa de Rheb (*Ras homologue enriched in brain*), una proteïna de la superfamília de Ras que es troba localitzada en endomembranes cel·lulars i que en la seva forma GTP modula positivament l’activitat de mTORC1 (Inoki *et al.*, 2003; Tee *et al.*, 2003).

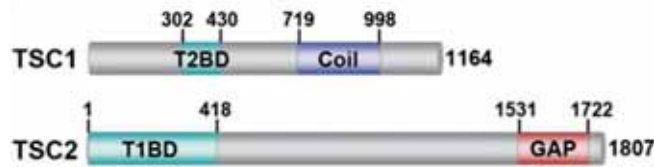


Figura 18. Esquema TSC1 i TSC2. Es mostra el domini GAP de TSC2 (residus 1531-1722), el domini d’unió de TSC1 en TSC2 (T2BD (residus 302-430) i T1BD (residus 1-418) respectivament), i el domini “coiled coil” en TSC1 (residus 719-998) (adaptat de Huang i Manning, 2008).

Les proteïnes TSC2 i TSC1 formen un complex heterodimèric (TSC) (van Slegtenhorst *et al.*, 1998; Hodges *et al.*, 2001) que permet l’activitat de TSC2, i on TSC1 juga un paper com a estabilitzador impeding la degradació de TSC2 a través del proteasoma 26S (Benvenuto *et al.*, 2000; Chong- Kopera *et al.*, 2006). El complex TSC2/TSC1 actua com a sensor de diferents estímuls regulant negativament, gràcies a l’estimulació de l’activitat GTPasa de Rheb, la via de senyalització de mTORC1 quan les cèl·lules no es troben en les condicions idònies per al creixement i la proliferació cel·lular (van Slegtenhorst *et al.*, 1998). Entre els estímuls que és capaç de sensar aquest complex es troben la presència de factors de creixement o nutrients a l’exterior cel·lular així com l’estrès energètic, l’hipòxia i determinades citoquines entre d’altres.

La forma Rheb-GTP activa el complex mTORC1 a través d’un mecanisme no del tot conegut però que tal com s’ha descrit recentment podria estar relacionat amb la capacitat de la forma GTP de Rheb d’unir-se a la proteïna de la família de les immunofilines, peptidil-prolil-cis/trans isomerasa FKBP38; quan les cèl·lules són sotmeses a un dejuni de sèrum o aminoàcids, aquesta proteïna (homòloga a la proteïna FKBP12 a través de la qual la rampamicina exerceix la seva toxicitat sobre mTOR), és capaç d’unir-se al domini FRB de mTOR i provocar la seva inhibició. La interacció de Rheb-GTP amb FKBP38 impedeix la unió d’aquesta darrera amb mTOR i evita la inhibició del complex mTORC1 (Bai *et al.*, 2007).

L’associació del complex TSC amb la via de senyalització de mTOR va tenir lloc gràcies a la búsqueda de gens reguladors del creixement d’òrgans mitjançant screenings genètics realitzats en *Drosophila*. En aquests estudis es va observar que mutacions en els gens de TSC2 o TSC1 causaven un creixement aberrant dels ulls i un augment en la proliferació cel·lular que era minimitzat quan es sobreexpressava TSC2 i TSC2 conjuntament (Gao i Pan, 2001; Potter *et al.*, 2001; Tapon *et al.*, 2001). A més a més, es va observar que les proteïnes TSC2 i TSC1 interaccionaven amb proteïnes implicades en el creixement cel·lular induït per la insulina com el propi receptor de l’insulina (IR), la fosfatasa PTEN, l’Akt, o la S6K (actualment totes elles presents en la via de transducció de senyal de mTORC1). Estudis posterior van acabar de situar el complex TSC per sota de l’Akt gràcies a l’observació que aquesta proteïna era la quinasa responsable de les fosforilacions en la serina 939 i en la treonina 1462 de TSC2

que provocaven la inhibició del complex TSC2/TSC1 i que permetien l'activació de mTORC1 i dels seus substrats en resposta a insulina (Manning *et al.*, 2002).

Mitjançant estudis realitzats tant en *Drosophila* com en mamífers, s'ha descrit que el complex TSC2/TSC1 també participa en la via de senyalització de mTORC1 en resposta a nutrients (aminoàcids) (Gao *et al.*, 2002). No obstant, mentre que si sembla acceptada la participació de Rheb en l'activació de mTORC1 per nutrients, també és cert que s'han descrit mecanismes d'activació per nutrients de mTORC1 que són independents del complex TSC2/TSC1 (veure apartat 1.2.3.2 Activació per nutrients (aminoàcids)) (Long *et al.*, 2005; Smith *et al.*, 2005).

• Moduladors del complex TSC2/TSC1

Com s'ha comentat anteriorment, existeixen diferents estímuls que activen o inhibeixen el complex mTORC1, generalment a través de l'activació en últim terme de diferents proteïnes quinasa que fosforilen directament TSC2 o TSC1 provocant la seva activació o inhibició (amb l'excepció de les proteïnes REDD que bloquegen el complex TSC2/TSC1 en resposta a hipòxia a través d'un mecanisme no del tot conegut (Brugarolas *et al.*, 2004))(Figura 19).

En aquest treball destacarem dues quinases que s'activen en resposta a factors de creixement i/o esters de forbol i que provoquen la inhibició de TSC2/TSC1 i l'activació de mTORC1, com són la Akt, i el substrat de la Erk, la RSK (*p90 KDa ribosomal S6 kinase*):

- **Akt:** Aquesta proteïna va ser la primera quinasa descrita de fosforilar TSC2 en resposta a factors de creixement. És la responsable de la fosforilació de cinc residus de TSC2 (serines 939, 981, 1130 i 1132, i la treonina 1462) dels quals la fosforilació de la serina 939 i la treonina 1462 són les que han estat més ben caracteritzades. Tot i que no es coneix amb detall el mecanisme, la fosforilació d'aquests dos residus provoca la inhibició de TSC2/TSC1 possiblement a través de la disrupció del complex i la posterior degradació de TSC2 i TSC1 (Plas i Thompson, 2003), o bé a través de l'alteració de la localització subcel·lular de TSC2 des d'endomembranes (on es troba la proteïna Rheb) cap al citosol (Cai *et al.*, 2006), dos compartiments cel·lulars on s'ha pogut detectar experimentalment la presència de TSC2 i TSC1 (Nellist *et al.*, 1999; Yamamoto *et al.*, 2002). La fosforilació de les serines 939 i/o 981, i de la treonina 1462 també generen un lloc d'unió en TSC2 per a proteïnes de la família 14-3-3, les quals podrien actuar desestabilitzant el complex TSC2/TSC1 (Cai *et al.*, 2006; Deyoung *et al.*, 2008).

- **Erk/RSK:** Els factors de creixement i l'ester de forbol PMA (o TPA) provoquen l'activació del complex mTORC1 a través de la inhibició per fosforilació del complex TSC2/TSC1 a través del substrat de la MAPK Erk, RSK (Tee *et al.*, 2003; Roux *et al.*, 2004). La RSK catalitza la fosforilació dels mateixos residus de TSC2 que l'Akt tot i que en menor grau (serina 939 i treonina 1462), però sobretot és la responsable de la modificació de la serina 1798 present en l'extrem C-terminal de la proteïna (Roux *et al.*, 2004). El PMA (o TPA) també estimula lleument la fosforilació d'alguns residus de TSC2 directament a través de la Erk, com les serines 540 i 664 (Ma *et al.*, 2005).

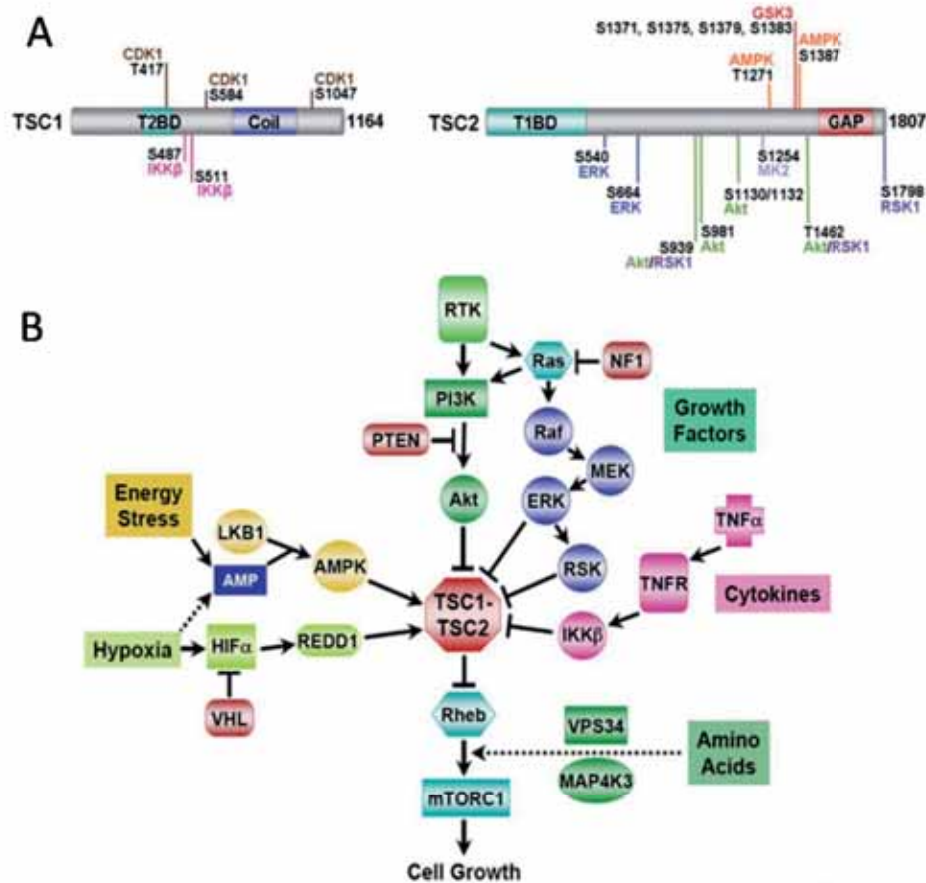


Figura 19. A. Residus de TSC2 i TSC1 diària per a diferents proteïnes quinasa (adaptat de Huang i Manning, 2008). B. Integració de diferents vies de transducció de senyal sobre el complex TSC2/TSC1 (modificat de Huang i Manning, 2008).

• **Mutants de TSC2 i TSC1. Esclerosi tuberosa**

S’han descrit les mutacions en els gens que codifiquen per a les proteïnes TSC2 i TSC1 com la causa principal de l’esclerosi tuberosa, una malaltia genètica autosòmica dominant que afecta a 1 de cada 6000 naixements i que provoca la formació de tumors benignes (hamartomes) en varis òrgans i teixits (cervell, ronyó, cor i pell) així com desordres neurològics severos com epilèpsia, autisme, retard mental, i dificultat en l’aprenentatge entre d’altres (Cheadle *et al.*, 2000; Yates, 2004; revisat en Crino *et al.*, 2006). A més a més, s’ha observat que dones adultes o de mitjana edat que desenvolupen aquesta malaltia són també susceptibles de desenvolupar limfangioleiomatosi (LAM), una malaltia també relacionada amb mutacions als gens de TSC2 i TSC1 i que es caracteritza per la formació de quists i la proliferació benigne de les cèl·lules de la musculatura llisa en els pulmons que provoquen una disminució de l’eficiència en l’intercanvi de gasos que té lloc als alvèols (Carsillo *et al.*, 2000; Yu *et al.*, 2001; Hancock *et al.*, 2002).

A partir d’estudis genètics d’individus que pateixen esclerosi tuberosa s’han identificat varies mutacions puntuals en els gens de TSC2 i TSC1 que provoquen un mal funcionament del complex TSC2/TSC1 i un augment descontrolat del creixement cel·lular degut a una activació constitutiva de mTOR i dels seus substrats (Benvenuto *et al.*, 2000). Les mutacions en el gen de TSC1 són menys freqüents que en el gen de TSC2 i s’han relacionat amb formes menys severes de l’esclerosi tuberosa i es caracteritzen majoritàriament per la generació de formes truncades de TSC1 que provoquen la disrupció

del complex TSC2/TSC1 (Niida *et al.*, 1999). La major part de les mutacions identificades responsables d'aquesta malaltia impliquen substitucions puntuals d'aminoàcids en la proteïna TSC2. S'han identificat mutacions tant en la zona del gen de TSC2 que codifica per el domini GAP com fora d'aquest domini, però tant les unes com les altres afecten al plegament de TSC2 i a la funció del complex TSC de diverses maneres (Nellist *et al.*, 2005).

Entre totes les mutacions identificades en el gen de TSC2, en destacarem dues, la que provoca la substitució de l'arginina 611 per una glutamina (TSC2 R611Q), i la que provoca la substitució de l'arginina 905 per una glutamina (TSC2 R905Q). A continuació es citen algunes de les característiques que s'han descrit per aquestes dues formes mutants de TSC2 (Taula 8) (Nellist *et al.*, 2001 i 2005):

- En experiments de immunoprecipitació de TSC1 en cèl·lules COS transfectades amb TSC2 R611Q i TSC1 es va observar que la presència de TSC2 R611Q disminuïa l'expressió de TSC1 i impedia la seva immunoprecipitació amb anticossos contra TSC1 amb els quals si immunoprecipitava TSC1 i TSC2 quan es transfectaven les cèl·lules amb la forma WT de TSC2. El mutant TSC2 R905 en canvi, si era capaç d'interaccionar amb TSC1. Aquestes dades van suggerir que la substitució R611Q, però no la R905Q, provoca la disrupció del complex de TSC2/TSC1.
- En experiments de co-transfecció d'aquests mutants amb formes d'Akt activades constitutivament es va observar que TSC2 R611Q no era fosforilada per aquesta quinasa mentre que tant la forma WT de TSC2 com el mutant TSC2 R905Q si que ho eren.
- En experiments de transfecció de les formes mutants de TSC2, junt amb TSC1 i S6K en cèl·lules HEK-293-T, es va observar que a diferència del que succeeix amb la forma WT de TSC2, ni TSC2 R611Q ni TSC2 R905Q tenien la capacitat de disminuir els nivells de fosforilació de la treonina 389 de la S6K.
- En experiments d'immunofluorescència realitzats en MEFS TSC2^{-/-} transfectats únicament amb aquests mutants, o bé conjuntament amb TSC1, i sotmesos posteriorment a un dejuni de sèrum, es va observar, a diferència del que succeïa quan s'utilitzava la forma WT de TSC2, que cap dels dos (però sobretot la forma TSC2 R611Q) era capaç de reduir els nivells de fosforilació de les serines 235 i 236 de la proteïna ribosomal S6.
- En experiments de quantificació d'activitat GAP (sobre la proteïna Rheb) d'immunoprecipitats de TSC2/TSC1 obtinguts a partir de cèl·lules HEK-293-T transfectades amb TSC1-myc i amb TSC2 R611Q-myc o TSC2 R905Q-myc, es va observar una disminució d'aquesta activitat en tots dos casos en comparació a la que s'obtenia quan s'utilitzava la forma WT de TSC2.

TSC2	Interacció amb TSC1	Inhibició S6Kp (T389)	Inhibició S6p	Activitat GAP sobre Rheb	Fosforilable per Akt
Wild type (WT)	+	+	+	+	+
R611Q	-	-	-	-	-
R905Q	+	-	-	-	+

Taula 8. Propietats dels mutants de TSC2 R611Q i R905Q (veure text) (modificat de Nellist *et al.*, 2005).

1.2.3.2 | Activació per nutrients (aminoàcids)

L'activació de mTORC1 per factors de creixement a través de la via PI3K/Akt/TSC2 no es pot produir en absència de nutrients fins i tot en cèl·lules amb el complex TSC no funcional o que expressen una forma constitutivament activa de Rheb (Nobukuni *et al.*, 2005; Sancak *et al.*, 2008).

La importància dels aminoàcids en la via de senyalització de mTOR es va evidenciar en estudis d'autofàgia en els quals es va observar que els aminoàcids per si sols eren capaços d'activar la S6K i inhibir l'autofàgia de manera mTOR dependent (Blommaert *et al.*, 1995; Hara *et al.*, 1998).

Quan les cèl·lules es troben en condicions en les que escassegen els nutrients, el complex mTORC1 es troba inactiu, impedit, entre d'altres processos, la síntesi de proteïnes per a la qual és essencial la disponibilitat d'aminoàcids. El mecanisme de regulació de mTORC1 a través dels aminoàcids transcorre per un mecanisme no del tot conegut que és diferent del que té lloc via factors de creixement. Existeixen estudis que apunten que el complex TSC participa en aquest mecanisme (Gao *et al.*, 2002) i estudis que indiquen que no i que l'activació es produeix per estimulació directa de Rheb (Saucedo *et al.*, 2003; Nobukuni *et al.*, 2005; Smith *et al.*, 2005). En els últims anys s'han descrit varies proteïnes que participen en l'activació de mTORC1 per aminoàcids de forma independent del complex TSC, entre les quals es troben la PI3K de classes 3 (o hVps34), les GTPases Rag, i la MAP4K3 (Figura 20).

- **PI3K de classe III (hVps34 (yacuolar protein sorting 34))**

La PI3K de classe III o hVps34 és un membre de la família de quinases lipídiques PI3K que es caracteritzen per fosforilar l'hidroxil en posició 3' d'anells fosfatidil-inositol. A diferència d'altres membres de la família, l'hVps34 actua únicament sobre fosfatidilinositols que no posseeixen cap altre grup fosfat, generant únicament fosfatidils inositol-3-fosfat (PI3P).

Aquesta quinasa va ser la primera proteïna que es va relacionar amb el paper de mTORC1 com a sensor d'aminoàcids. Es va observar que la seva sobreexpressió augmentava els nivells de la forma fosforilada del substrat de mTORC1, S6K1, de manera independent de la insulina (la seva silenciament no inhibia a l'Akt ni bloquejava la fosforilació de TSC2 induïda per aquesta hormona), i que l'absència de glucosa o aminoàcids provocaven una disminució dels nivells de PI3P a través de la inhibició de l'hVps34 via AMPK, en el cas de la glucosa, i a través d'un mecanisme desconegut en el cas dels aminoàcids. No obstant, la seva activitat no es va observar d'estar afectada per la rapamicina, amb lo qual es va suggerir que la hVps34 actuava per sobre de mTOR (Byfield *et al.*, 2005; Nobukuni *et al.*, 2005).

Recentment s'ha proposat que en cèl·lules de mamífer, l'estimulació amb aminoàcids provoca un augment en la concentració de calci citoplasmàtic que promou la translocació i activació de l'hVps34 a endosomes Rab5 i Rab7 positius (a través de la presència d'un motiu d'unió calci/calmodulina en la seva seqüència i de la seva subunitat reguladora hVps15), el posterior recrutament de proteïnes amb dominis FYVE, i l'acoblament i activació del complex mTORC1 (Stack *et al.*, 1993; Christoforidis *et al.*, 1999; Stein *et al.*, 2003; Klionsky, 2007; Gulati *et al.*, 2008).

L'hVps34 participa en altres processos apart de l'activació de mTORC1 per aminoàcids:

- En la regulació del tràfic vesicular del sistema endosoma/lisosoma, recrutant proteïnes amb dominis afins als PI3Ps (dominis FYVE, PX i Zinc finger) a membranes endosomals (Lindmo i Stenmark, 2006; Rutherford *et al.*, 2006).

- En l'autofàgia, formant un complex amb les proteïnes beclina 1, Atg1 (ULK1), Ambra, UVRAG i Bif-1, que catalitza la síntesi de PI3Ps en els fagòfors, promovent el recrutament d'altres proteïnes Atg i la formació i maduració dels autofagosomes (veure apartat 1.2.2.1.2 Autofàgia) (Kihara *et al.*, 2001a i b; Eskelinen *et al.*, 2002).

A priori, és sorprenent que l'hVps34 actui tant a favor com en contra de l'autofàgia (a través de l'activació de mTORC1). Alguns autors han intentat explicar aquesta paradoxa a través de l'existència de dos complexos diferents d'aquesta quinasa, un en els autofagosomes (autofàgia) i un altre en els endosomes (activació mTORC1). A més a més, s'ha descrit que en condicions de dejuni, el PI3P necessari per a la iniciació del procés autofàgic podria ser generat per altres quinases com per exemple la PI3K de classe II, i que la inhibició de l'hVps34 en aquestes condicions podria actuar com a fre de l'autofàgia per tal d'evitar danys a les cèl·lules per un excés d'autodegradació (Scott *et al.*, 2004 i 2007; Levine i Kroemer, 2008).

- **GTPases Rag (*Ras related small GTPases*)**

L'any passat es van publicar dos articles en els quals s'apuntava que aquesta família de proteïnes interaccionaven amb Raptor (mTORC1) en cèl·lules de mamífer, actuant com a importants mediadors de l'activació per aminoàcids del complex mTORC1 (Kim *et al.*, 2008; Sancak *et al.*, 2008).

Aquesta família de "small" GTPases relacionades amb Ras, està formada per 4 membres (A, B, C i D) que formen heterodímers entre ells (A o B amb C o D), essent la funció de les dues primeres dominant i independent de l'estat del nucleòtid (GTP o GDP) de RagC o RagD. Aquests autors van observar que l'expressió de formes mutants de RagA o B activades constitutivament provocaven la fosforilació de la S6K sense la necessitat de tractar les cèl·lules amb aminoàcids, mentre que l'expressió de mutants constitutivament inactius o bé la silenciació (mitjançant siRNA) de Rag, produïen la inhibició de mTOR tot i la presència d'aminoàcids. A més a més, el tractament amb rapamicina bloquejava la fosforilació de la S6K induïda per les proteïnes Rag, indicant que aquestes actuaven per sobre del complex mTORC1.

El mecanisme a partir del qual les proteïnes Rag activen mTORC1 consisteix en la regulació de localització subcel·lular de mTOR en resposta a aminoàcids; en condicions riques en aminoàcids RagA-GTP o RagB-GTP s'uneixen a Raptor i promouen la translocació de mTORC1 des de el citoplasma cap a una regió perinuclear on col·localitza amb el marcador endosomal/lisosomal Rab7 i amb Rheb, i on es produeix l'activació del complex (Sancak *et al.*, 2008).

- **MAP4K3 (o germinal centre-like kinase (GLK))**

Experiments recents de siRNA en *Drosophila* han permès l'identificació de l'homòleg de la proteïna de mamífer MAP4K3 (*mitogen activated protein kinase kinase kinase kinase 3*) com a un nou regulador positiu de la via de senyalització de mTORC1. S'ha descrit que la depleció de MAP4K3 en cèl·lules humanes disminueix l'activitat dels substrats de mTORC1, S6K i 4EBP1, induïda per aminoàcids, de manera sensible a la rapamicina, i que la seva sobreexpressió l'augmenta (Findlay *et al.*, 2007).

Com s'ha comentat anteriorment, el dejuni d'aminoàcids inhibeix el complex mTORC1 i causa una ràpida defosforilació dels seus substrats, S6K i 4EBP1. Curiosament, en molts dels treballs que s'han publicat al respecte, s'ha observat que l'absència o presència únicament de l'aminoàcid ramificat leucina o de l'arginina és gairebé tant efectiva en l'inhibició o activació de mTORC1 com el que provoca la

barreja completa d'aminoàcids essencials i no essencials. Durant l'escriptura d'aquest treball s'ha publicat un article en el qual s'ha associat l'entrada de leucina a l'interior cel·lular i l'activació del complex mTORC1 amb la captació de glutamina (Nicklin *et al.*, 2009), un aminoàcid que ja havia estat prèviament relacionat amb l'activació de mTORC1 tot i que es desconeixia exactament quin era el seu paper (Krause *et al.*, 2002).

La glutamina extracel·lular és captada per les cèl·lules a través del transportador d'alta afinitat per aminoàcids neutres sense ramificacions SLC1A5, mentre que la captació de leucina té lloc a través del sistema transportador heterodimèric antiporter SLC7A5-SLC3A2, el qual importa aminoàcids amb ramificacions com la leucina i exporta glutamina (Fuchs i Bode, 2005). El grup de Nicklin *et al.*, han demostrat que si s'inhibeix el transportador SLC1A5 durant la incubació de les cèl·lules amb glutamina, el tractament posterior amb leucina no produeix l'activació de mTORC1. En canvi, quan el transportador de glutamina es troba funcional, el tractament amb leucina produeix una ràpida fosforilació de S6K i 4EBP1 i una sortida a l'exterior cel·lular de glutamina. A més a més, la silenciació del gen del transportador de la leucina, però també del de la glutamina, provoquen un augment de l'autofàgia i una disminució en el tamany cel·lular (Nicklin *et al.*, 2009).

1.2.3.3 | Altres

1.2.3.3.1 | Estat energètic

El complex mTORC1 és sensible a petits canvis en la concentració d'ATP intracel·lular de manera independent a variacions en la disponibilitat de factors de creixement i/o nutrients que puguin tenir lloc en un moment determinat (Dennis *et al.*, 2001). Aquests petits canvis en l'estat energètic de les cèl·lules són sensats per la proteïna quinasa AMPK (*AMP activated kinase*) la qual és activada a través de la fosforilació de la treonina 172 present en el seu loop d'activació, per l'acció del supressor tumoral LKB1, i també, com el seu nom indica, a través de l'AMP quan la concentració d'aquest sobrepassa una determinada concentració llindar. En aquesta situació, l'AMPK activa mecanismes generadors d'ATP com l'oxidació d'àcids grassos, i inhibeix processos consumidors d'ATP com la síntesi de proteïnes a través de l'inhibició del complex mTORC1. La inhibició de mTORC1 a través de l'AMPK es produeix per fosforilació directa de la serina 1345 i la treonina 1227 de TSC2 que implica un augment de l'activitat GTPasa de TSC2 i per tant un increment de la forma inactiva de Rheb (Rheb-GDP) (Inoki i Guan, 2003; Corradetti *et al.*, 2004; Shaw *et al.*, 2004).

Recentment s'ha descrit que l'activació de TSC2 via AMPK no és suficient per a l'inhibició de mTORC1 i que l'AMPK també fosforila al membre del complex mTORC1, Raptor, provocant la unió d'aquest amb la proteïna 14-3-3 i el desacoblament i inactivació del complex mTORC1 (Gwinn *et al.*, 2008).

1.2.3.3.2 | Estrès cel·lular

Les cèl·lules també responen a diferents tipus d'estrès cel·lular (com l'hipòxia, danys a l'ADN o quan es troben en condicions ambientals reductores) inhibint els processos que requereixen el consum d'energia i aturant el creixement cel·lular a través de la regulació del complex mTORC1:

- **Hipòxia:** Quan la concentració d'oxígen intracel·lular disminueix, la via de senyalització de mTORC1 s'inhibeix gràcies a l'augment de l'expressió dels gens de les proteïnes REDD1 i REDD2 (a través del factor de transcripció HIF1 α) que activen el complex TSC mitjançant el segrest de la proteïna 14-3-3

(Brugarolas et al., 2004; Reiling i Hafen, 2004). En presència d'estímuls mitogènics, l'Akt fosforila a la proteïna TSC2 en les serines 939 i 981, permetent la unió de la proteïna 14-3-3 amb TSC2 i inhibint el complex TSC (Efe *et al.*, 2005). En condicions d'hipòxia però, la proteïna 14-3-3 s'uneix preferentment a REDD1, i per tant es pot produir la inhibició de mTORC1 via complex TSC.

La proteïna implicada en l'autofàgia i apoptosi Bnip3, i la quinasa AMPK també participen en la resposta cel·lular a l'hipòxia; quan la concentració d'oxigen intracel·lular disminueix, l'expressió de HIF1 α del gen de Bnip3 augmenta, provocant una disminució dels nivells de Rheb-GTP. A diferència de REDD1 però, que actua a través del complex TSC, Bnip3 interacciona directament amb Rheb (Sowter *et al.*, 2001; Li *et al.*, 2007; Maiuri *et al.*, 2007). En condicions perllongades d'hipòxia les cèl·lules passen a generar ATP a través de la respiració anaeròbia, un procés que és molt menys eficient que la cadena respiratòria mitocondrial, i per tant es produeix una disminució del quocient de concentracions intracel·lulars ATP/AMP que comporta l'activació de l'AMPK (veure apartat 1.2.3.3.1 Regulació mTOR segons l'estat energètic).

- **Dany a l'ADN:** Quan es produeixen danys a l'ADN, s'activa el supressor tumoral p53 el qual, entre d'altres funcions, inhibeix la via de mTOR a través de l'activació via AMPK del complex TSC (Feng *et al.*, 2005).

- **Condicions Reductores:** Quan les cèl·lules es troben en ambients reductors, s'inhibeix el complex mTORC1 a través d'un mecanisme no del tot conegut però que podria estar relacionat amb l'existència d'un sensor redox en el domini FATC de mTOR (Dames *et al.*, 2005; Sarbassov i Sabatini, 2005b).

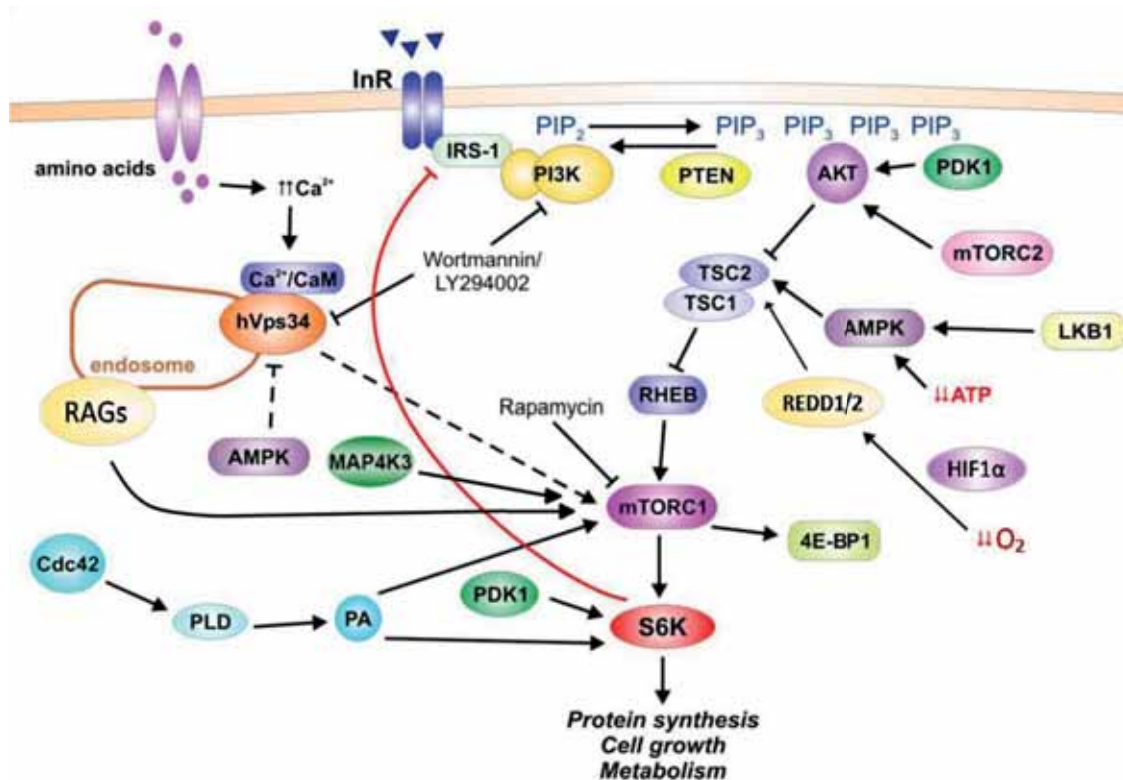


Figura 20. Esquema via d'activació de mTORC1 per nutrients (aminàcids) i factors de creixement (insulina). Es mostren també els mecanismes d'inhibició de mTORC1 per estrès o per inhibidors sintètics (veure text) (modificat de Jastrzebski *et al.*, 2007).

1.3 | Altres quinases activades per mitògens. Les MAPKs

1.3 | Altres quinases activades per mitògens. Les MAPKs

Les cèl·lules eucariotes posseeixen múltiples MAPKs (*mitogen activated protein kinases*) que regulen de forma coordinada diferents tipus de funcions biològiques a través de la fosforilació, en la majoria de compartiments cel·lulars, d'un gran nombre de proteïnes. Les MAPKs són serina/treonina quinases que regulen el creixement i proliferació cel·lular, l'expressió gènica, la mitosi, el metabolisme, la motilitat, la diferenciació, la supervivència i l'apoptosi, a través de la fosforilació de factors de transcripció, fosfolipases, proteïnes del citoesquelet i diferents tipus de proteïnes quinasa (*MAPK activated protein kinases* o MKs) entre d'altres.

L'activitat d'aquesta família de proteïnes es desencadena a través de l'activació seqüencial de tres tipus de proteïnes quinasa; les MAPKs pròpiament, les MAPKKs (o quinases de les MAPKs), i les MAPKKKs (o quinases de les MAPKKs). Les MAPKKKs són serina/treonina quinases que s'activen per fosforilació i/o com a resultat de la seva interacció amb "small" GTPases de la família de Ras/Rho en resposta a diferents estímuls extracel·lulars dels quals es parlarà més endavant (Kolch, 2000; Dan *et al.*, 2001). Un cop activades, les MAPKKKs fosforilen i activen a les MAPKKs, que al seu torn catalitzen l'activació de les MAPKs a través de la fosforilació d'alguns dels seus residus serina i/o treonina.

En mamífers s'han caracteritzat cinc grans grups de MAPKs: Les Erk1/2 (*extracelular signal regulated kinases 1 i 2*), les JNks (*c-jun N terminal kinases*), la p38, les Erk 3/4, i la Erk5. En aquest apartat ens centrarem únicament en la Erk1/2 i en la p38, així com en les MKs, RSK i MSK.

1.3.1 | Erk 1/2

Les Erk1 i 2 s'activen a partir de diferents estímuls mitogènics com ara factors de creixement, citoquines, i esters de forbol (TPA, PMA) (Figura 21), que modulen diferents tipus de receptors tirosina quinasa (RTKs) o receptors acoblats a proteïnes G, els quals transmeten la senyal d'activació cap a l'interior cel·lular a través de la "small" GTPasa Ras; l'activació dels RTKs provoca l'autofosforilació en residus tirosina de les seves cues citoplasmàtiques i la unió de la proteïna adaptadora Grb2, que per una banda s'uneix a les fosfo-tirosines d'aquests receptors i per l'altre s'uneix al factor bescanviador de GTP (GEF) de Ras, Sos (*son of sevenless*), recrutant-lo a la membrana plasmàtica des d'on catalitza el bescanvi de GDP per GTP de la proteïna Ras, i possibilita la interacció d'aquesta GTPasa amb un gran nombre de proteïnes efectores entre les quals es troba la serina/treonina quinasa Raf (MAPKKK) (Geyer i Wittinghofer, 1997). L'activació de Raf estimula la fosforilació i activació de les proteïnes MEK1/2 (MAPKK) que al seu torn activen a la Erk1/2 a través de la fosforilació d'un motiu treonina-glutamina-tirosina present en el seu loop d'activació (Kyriakis *et al.*, 1992). En cèl·lules en cultiu, aquesta via pot ser inhibida a través del compost químic U0126 que actua com a inhibidor no competitiu de les MEK1/2/5 implicant l'activació de la Erk1/2 i dels seus substrats (Favata *et al.*, 1998) (veure materials i mètodes apartat 3.7.5 Activació i inhibició de vies metabòliques).

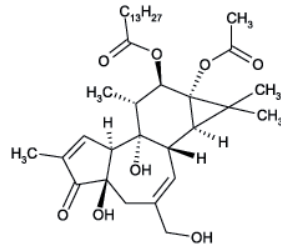


Figura 21. Estructura molecular del TPA (12-O-tetradecanoilforbol-13-acetat), també conegut com a PMA (forbol 12-miristat-13-acetat). Aquest diester de forbol s'utilitza en recerca biomedica per a l'activació de diverses isoformes de la PKC (ja que es anàleg a l'activador natural de la PKC, Diacilglicerol (DAG)). L'estimulació de la PKC activa la via Ras/Raf/Erk1/2.

Les Erk1/2 catalitzen la fosforilació de múltiples substrats en gairebé la majoria de compartiments cel·lulars (incloent el nucli), entre els quals es troben proteïnes de membrana com la calnexina, proteïnes nuclears com els factors de transcripció Elk-1, c-fos, c-myc i STAT3, proteïnes del citoesquelet com la paxilina, i diverses MKs com les RSKs (90 kDa *ribosomal S6 kinases*), les MSKs (*mitogen and stress activated kinases*) i les MNKs (*MAPK interacting kinases*) entre d'altres (revisat en Murphy i Blenis, 2006). No obstant, les RSKs són les úniques MKs que s'activen únicament a través de la via de Erk1/2, ja que els altres dos tipus poden ser activats també a través de la MAPK p38 (de la qual es parlarà a continuació) (Frodin i Gammeltoft, 1999).

1.3.2 | p38

Les MAPKs p38 tenen un paper crític en la resposta immunològica i en la resposta inflammatòria a través de l'activitat que exerceixen en cèl·lules del sistema immunològic com els macròfags, els neutròfils i els limfòcits T. Tot i que presenten força homologia amb la Erk, responen feblement a mitògens i s'activen principalment en resposta a diferents tipus d'estrès cel·lular com el xoc osmòtic, l'estrès per calor, radiacions ionitzants, lipopolisacàrids bacterians (LPS), i citoquines pro-inflamatòries com el factor de necrosi tumoral α (TNF α) o la interleuquina 1 (ILK1) entre d'altres (Han *et al.*, 1994; Rouse *et al.*, 1994; Ono i Han, 2000).

En mamífers existeixen 4 isoformes de p38 (α , β , γ i δ) amb diferents patrons d'expressió per teixits, entre les quals les isoformes α i β són les que es troben més àmpliament distribuïdes. Totes elles es troben presents tant en el citosol com en el nucli cel·lular, i s'activen a través d'un mecanisme que inclou diverses MAPKKKs (MEKK1-4, MLK2 i 3, DLK, ASK1) i MAPKKs (MEK 3 i 6 o MKK 3 i 6) que en resposta als estímuls citats activen a p38 a través de la fosforilació de la treonina 180 i la tirosina 182 del motiu treonina-glicina-tirosina present en el seu loop d'activació. En cèl·lules en cultiu, la p38 pot ser inhibida mitjançant el compost químic anti-inflamatori SB203580 (veure materials i mètodes apartat 3.7.5 Activació i inhibició de vies metabòliques) que actua com a inhibidor competitiu d'aquesta quinasa però no de les MAPKs JNK i Erk5, les quals poden ser també activades per estrès (Lee *et al.*, 1994; Cuenda *et al.*, 1995).

Tot i que el seu paper en el sistema immunològic no està del tot clar, si s'ha vist que és la responsable de la fosforilació de proteïnes citosòliques i nuclears com la fosfolipasa citosòlica A2, la proteïna dels microtúbuls Tau, i diferents factors de transcripció com ATF-1 i 2, Elk-1, NFKB, ETS-1 i p53 entre d'altres (Kyriakis i Avruch, 2001). A més a més, la p38 actua sobre diferents tipus de proteïnes quinasa (MKs) com les MSK 1 i 2 (de les quals es parlarà a continuació), les MNK 1 i 2 i les MK2 i 3. S'ha descrit que la MK2 actua com a nexa entre la via de p38 i la via de mTOR ja que és la responsable de la

fosforilació de la serina 1254 de TSC2 (tuberina) en cèl·lules activades amb sèrum o anisomicina (Li *et al.*, 2003).

1.3.3 | Quinases activades per MAPKs (MAPKAPKs o MKs)

1.3.3.1 | RSKs (90 KDa ribosomal S6 kinases)

La família de proteïnes RSK va ser descoberta inicialment com a la família de proteïnes responsable de la fosforilació de la proteïna de la subunitat ribosomal 40S, rpS6, ja que a l'igual que la S6K, catalitzen la fosforilació de la serines 235 i 236 d'aquesta proteïna ribosomal (Erikson i Maller, 1985; Erikson, 1991).

Les proteïnes RSK són serina/treonina quinases que contenen un domini d'unió per a la Erk1/2 en l'extrem N terminal i dos dominis quinasa (CTK i NTK) separats per un espaiador que conté un motiu hidrofòbic. El domini NTK (domini quinasa N terminal) és el responsable de la fosforilació dels substrats de les RSKs i permet classificar a les RSKs com a membres de la família de quinases AGC ja que presenta homologia amb el domini quinasa de proteïnes d'aquesta família (com per exemple la S6K). El domini CTK per altre banda, catalitza l'autofosforilació necessària per a l'activació de les RSKs i presenta homologia amb el domini quinasa de proteïnes calci/calmodulina dependents (CaMKs) (Blenis, 1993).

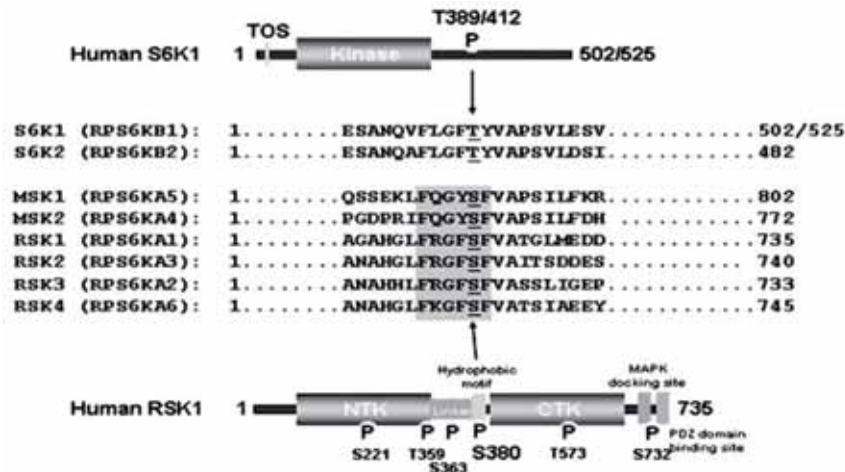


Figura 22. Esquema de l'estructura de la proteïna RSK1 humana i dels seus llocs de fosforilació (veure text). Es mostra també una comparació de seqüències del seu motiu hidrofòbic (crític per a la seva activació), amb regions equivalents per altres proteïnes quinasa de la família AGC (S6K1, MSK1 i 2), així com per a les isoformes RSK 2,3 i 4.

En humans existeixen 4 isoformes de la RSK (RSK 1-4) que presenten una identitat de seqüència entre elles del 75-80%, i que es troben localitzades tant al citosol com al nucli cel·lular. La seva activació té lloc en resposta a factors de creixement, hormones polipeptídiques, neurotransmissors, citoquines i esters de forbol, entre d'altres (Chen *et al.*, 1992). A l'igual com succeeix en altres quinases de la família AGC, per a l'activació de les RSKs, a part de la Erk1/2, és necessària la seva fosforilació a través de la PDK1 (Jensen *et al.*, 1999; Richards *et al.*, 1999).

Les RSK1 i 2 contenen 6 residus fosforilables dels quals 4 d'ells són essencials per la seva activació (serines 221, 363, 380 i treonina 573 en RSK1). L'activació de les RSKs es desencadena a través del següent mecanisme (Figura 23) (Fisher i Blenis, 1996; Dalby *et al.*, 1998; Richards *et al.*, 1999):

- Unió de la Erk1/2 al domini corresponent de la RSK i activació del domini CTK a través de la fosforilació de la treonina 573 del seu loop d'activació via Erk1/2. És possible que la Erk sigui també la responsable de la fosforilació de la serina 363 i la treonina 359 del linker de la RSK.
- Fosforilació de la serina 380 del motiu hidrofòbic de la RSK a través del domini CTK. Aquesta fosforilació genera un lloc d'unió per a la quinasa PDK1, l'activitat de la qual és crítica per a l'activació del domini NTK.
- Fosforilació de la serina 221 del loop d'activació del domini NTK via PDK1 i activació de la RSK.

A continuació es citen les principals funcions que s'han descrit d'estar regulades per les proteïnes RSK i alguns dels seus substrats implicats en cadascuna d'aquestes funcions (Sutherland *et al.*, 1993; Tan *et al.*, 1999; Shimamura *et al.*, 2000; Cohen i Frame, 2001; Wang *et al.*, 2001; Fujita *et al.*, 2003; Roux *et al.*, 2004; Woo *et al.*, 2004; Carrière *et al.*, 2008):

- Regulació de la transcripció: TIF-IA (biogènesi de ribosomes), ER81, ER α , Mi, NF κ B i CBP.
- (*) Traducció CAP dependent: proteïnes ribosomals (rpS6), GSK3 β (inhibidor de eIF2B), eIF4B, eF2K, TSC2, Raptor.
- Proliferació cel·lular: p27^{KIP1}, Myt1, Bub1.
- Expressió de gens "early": *c-fos*, *c-jun* (a través de CREB).
- Supervivència cel·lular: BAD (apoptosi), LKB1, GSK3 β (metabolisme glicògen).
- Altres: Filamina A (regulació del citoesquelet), Sos, L1, NHE.

(*): A través de la família de proteïnes RSK, la via Ras/Erk1/2 participa en la traducció de manera dependent i independent de mTORC1; per una banda aquesta via de senyalització convergeix amb la via de PI3K/Akt/TSC/mTORC1 a través de la fosforilació via RSK de la serina 1798 de TSC2 i de Raptor, inhibint el complex TSC i permetent l'activació de mTORC1 i la regulació d'aquest de la traducció CAP dependent (Roux *et al.*, 2004; Carrière *et al.*, 2008), i per altre banda, a través de l'activació via fosforilació de diverses proteïnes ribosomals i del factor d'iniciació de la traducció eIF4B (Shahbazian *et al.*, 2006), i a través de la inhibició via fosforilació de la serina 9 de la GSK3 β (que provoca l'alliberament del factor d'iniciació de la traducció eIF2B) (Cohen i Frame, 2001), i de la quinasa del factor d'elongació de la traducció eF2, eF2K (Wang *et al.*, 2001).

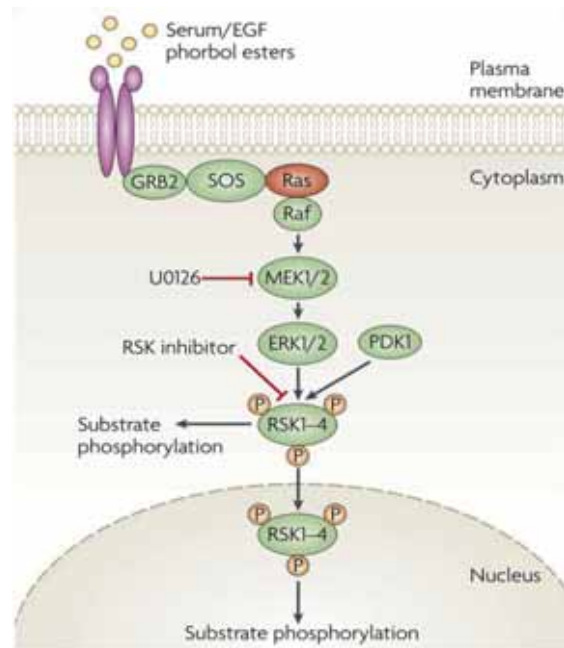


Figura 23. Via d'activació de les proteïnes RSK (adaptat de Anjum i Blenis, 2008).

1.3.3.2 | MSKs (*mitogen and stress activated kinases*)

Les proteïnes MSK (MSK1 i 2) són serina/treonina quinases que presenten varis punts en comú amb les RSKs; contenen dos dominis quinasa (CTK i NTK) separats per un espaiador d'uns 100 aminoàcids i un domini d'unió per a MAPKs en el seu extrem C terminal, que en aquest cas és capaç d'unir tant les Erk1/2 com la p38 (Tomas-Zuber *et al.*, 2001). A l'igual que en les RSKs, el domini NTK és el responsable de la fosforilació dels substrats i és el que permet classificar-les com a quinases de la família AGC. El domini CTK, per altre banda, presenta homologia amb el domini quinasa de proteïnes regulades per calci/calmodulina (CaMKs) i és el responsable de l'autofosforilació de les MSKs que desencadena la seva activitat sobre els substrats.

Com el seu nom indica, les MSKs poden ser activades tant per mitògens com per estrès a través de les MAPKs Erk1/2 i p38 respectivament (Figura 25). La seva activació té lloc a través de la fosforilació seqüencial de varis residus conservats equivalents als residus implicats en la fosforilació de les RSKs citats anteriorment; l'unió de la Erk1/2 o p38 al domini corresponent de la MSK provoca la fosforilació de la treonina 581 (domini CTK) i es creu que també de la serina 360 del linker (Arthur, 2008). A continuació, el domini CTK fosforila la serina 376 del linker i possiblement la serina 212 del loop d'activació del domini NTK promovent l'activació d'aquest i la fosforilació a través d'ell dels substrats de les MSKs. A diferència de les RSKs però, l'activació de les MSKs sembla independent de la PDK1 tot i que no es descarta que la fosforilació de la serina 212 pugui ser duta a terme per alguna quinasa anàloga a la PDK1 (Figura 24) (Frodin *et al.*, 2000; Williams *et al.*, 2000).

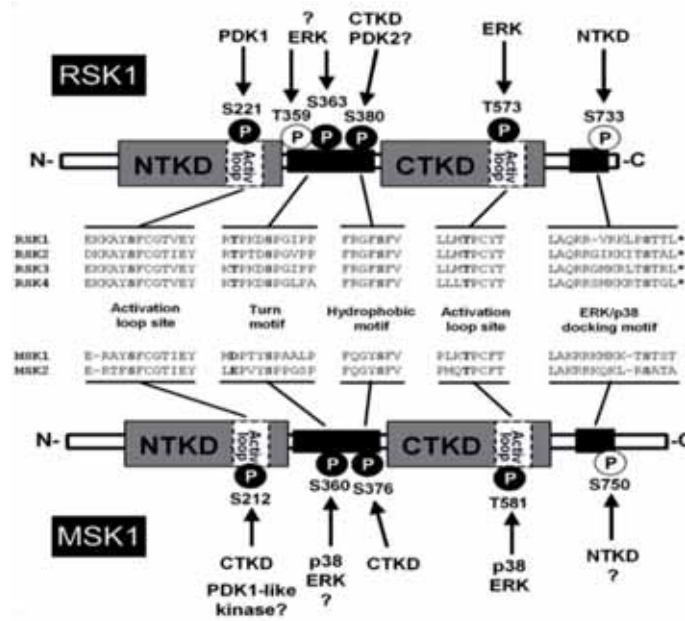


Figura 24. Comparativa MSKs i RSKs. Es mostren els llocs de fosforilació essencials i no essencials per a l'activació de la RSK1 i la MSK1 (en cercles negres i blancs respectivament) i la quinasa responsable de la fosforilació de cadascun d'ells. Els interrogants indiquen possibles responsables de la fosforilació de determinats residus però que encara no s'ha pogut demostrar. Es mostren també alineaments de seqüència d'algunes zones dels dominis NTK, CTK i del linker per a la RSK1, 2, 3 i 4, i la MSK1 i 2 (adaptat de Roux i Blenis, 2004).

Pel que fa a la funció, s'ha descrit que les MSKs participen en el remodelatge de la cromatina a través de la fosforilació de la histona H3, en la regulació de la transcripció a través de la fosforilació dels factors de transcripció CREB (relacionat amb la transcripció de gens "early" com *c-fos* i *junB*), ATF1, p65, ER81 i STAT3, i en l'apoptosi a través de la fosforilació de BAD. Entre els substrats de les MSKs es troben també l'Akt o el factor 4EBP1, tot i que actualment es desconeix la funció d'aquestes interaccions (Nomura *et al.*, 2001; Liu *et al.*, 2002; She *et al.*, 2002; Wiggin *et al.*, 2002).

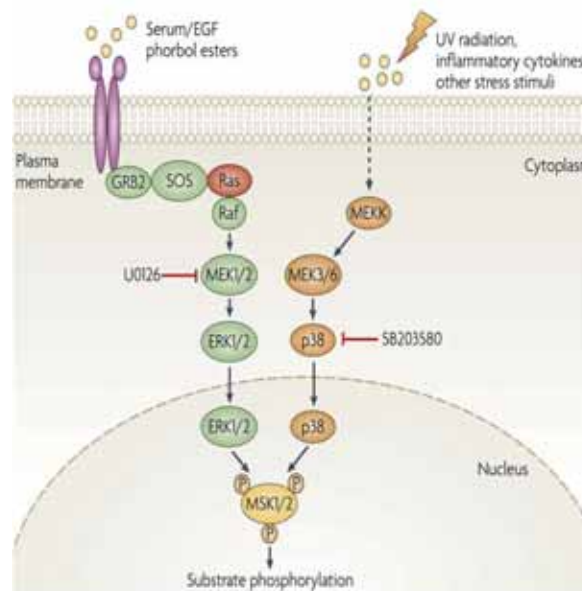
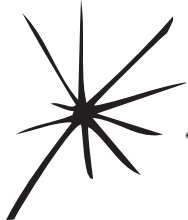


Figura 25. Vies d'activació de les proteïnes MSK 1 i 2 a través de les MAPKs Erk1/2 i p38 (adaptat de Anjum i Blenis, 2008).



2 | *Objectius*

*“Tot camí de mil milles comença
amb un sol pas”*

*Benjamin Franklin
(1706-1790)*

Objectius

La línia d'investigació principal del grup de recerca dirigit pel Dr. José Luis Rosa, on ha estat realitzat aquest treball, és l'estudi i caracterització de la família de proteïnes HERC. Dins aquest context, el nostre objectiu ha estat aprofundir en el coneixement sobre la proteïna gegant HERC1 i intentar aportar noves dades que ajudin a la comprensió de la funció fisiològica que desenvolupa aquesta proteïna en les cèl·lules humanes, concretament a nivell de la seva relació amb les proteïnes de l'esclerosi tuberosa TSC2 i TSC1 i amb la via de senyalització de mTOR. En aquest sentit, una de les primeres tasques que ens vàrem proposar va ser idear una nou sistema d'anàlisi per PAGE/SDS que ens permetés l'anàlisi simultani de la proteïna HERC1, juntament amb altres proteïnes de tamany menors, en un sol gel. Per últim, l'estudi de la relació de la proteïna HERC1 amb la via de senyalització de mTOR ens va portar a la realització d'experiments d'estimulació cel·lular mitjançant aminoàcids a través dels quals vàrem observar indicis de la participació de les proteïnes RSK i MSK en aquesta via de senyalització i que va obrir una nova línia d'investigació, l'estudi de la qual defineix l'últim dels objectius d'aquest treball.

Així doncs, podem resumir els objectius d'aquest treball en 3 punts:

1. Desenvolupar un sistema que faciliti l'anàlisi simultani en un sol gel, de proteïnes gegants i proteïnes de tamany diversos mitjançant PAGE/SDS (sistema LAG).
2. Estudiar la relació de la proteïna HERC1 amb les proteïnes del complex de l'esclerosi tuberosa TSC2 i TSC1 i amb la via de senyalització de mTOR.
3. Estudiar el mecanisme molecular involucrat en la senyalització per aminoàcids.





3 | *Materials i mètodes*

*“La casualitat no és ni pot ser més
que una causa ignorada d’un
efecte desconegut”*

*Voltaire
(1694-1778)*

3.1 | Electroforesi en gel de poliacrilamida/dodecil sulfat de sodi (PAGE/SDS)

La tècnica de l'electroforesi en gel de poliacrilamida (PAGE) va ser descrita per primera vegada al 1937 per (Tiselius,1937). Es tracta d'una eina àmpliament utilitzada en diverses disciplines com ara la bioquímica, la genètica i la biologia molecular entre d'altres que permet la separació i visualització de proteïnes, ADN i ARN de baix pes molecular. Com a tot mètode de separació electroforètic, es basa en l'aplicació d'un camp elèctric a través d'un suport insoluble i porós permeable a una dissolució tamponadora que provoca que totes les molècules amb càrrega experimentin una força que depèn de la diferència de potencial aplicada, de la distància entre els elèctrodes i de la seva càrrega neta. A l'aplicar la diferència de potencial en un gel per a PAGE, aquesta força és la que s'encarrega de que les proteïnes migrin més o menys a través d'ell, en funció del tamany dels porus del gel i d'alguna de les seves propietats intrínseques com per exemple la llargada de la seva cadena polipeptídica (pes molecular), modificacions post-traduccionals, càrrega elèctrica o plegament, entre d'altres.

Existeixen moltes variants d'aquesta tècnica que proporcionen diferent tipus d'informació sobre les proteïnes analitzades (massa, càrrega, puresa, punt isoelèctric etc.). Entre elles, la que possiblement ha estat més àmpliament utilitzada és l'electroforesi en gel de poliacrilamida en condicions reductores (PAGE/SDS). Descrita per primera vegada al laboratori de Maizel J.V. Jr. al 1967 com a eina per a la determinació del pes molecular de diversos polipèptids (Shapiro *et al.*, 1967), aquesta variant d'electroforesi es basa en l'utilització del detergent aniònic dodecil sulfat sòdic (SDS o NaDS), també conegut com a lauril sulfat sòdic (SLS), tant en l'elaboració del gel de poliacrilamida com en el tractament de les mostres a analitzar. Aquest detergent s'uneix a les proteïnes per la seva part hidrofòbica deixant el seu grup àcid a l'exterior, desacoblant les unions no covalents de les proteïnes i provocant que aquestes perdin la seva estructura secundària. El tampó de les mostres amb la barreja de proteïnes a separar inclou també agents reductors com el 2-mercaptoetanol o el ditiotreitòl (DTT) que redueixen ponts disulfur i juntament amb el xoc tèrmic a què es sotmet les proteïnes abans d'analitzar-les, provoca la pèrdua de la seva estructura terciària i quaternària (Figura 26).

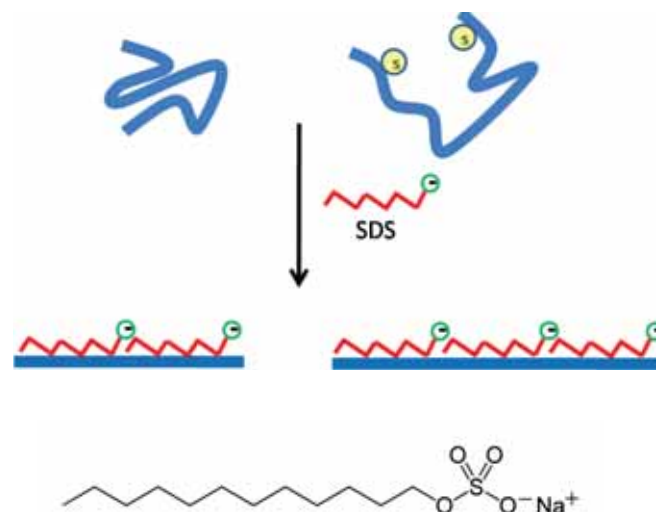


Figura 26. A la part superior, esquema de l'adopció de la configuració en forma de bastó per efecte de la interacció de les proteïnes amb el detergent SDS. A la part inferior, estructura molecular del detergent aniònic dodecil sulfat sòdic (SDS o NaDS) també anomenat lauril sulfat sòdic (SLS).

La quantitat de SDS que s'uneix per unitat de proteïna en pes és constant (1,4) de manera que la càrrega global de les proteïnes ve determinada per l' SDS unit i no per la càrrega de cadascun dels aminoàcids que les conformen.

La pèrdua de la configuració nativa de les proteïnes i la forma semblant que passen a adoptar totes elles al interaccionar amb l' SDS ("configuració bastó"), fa que totes presentin una mateixa relació càrrega/massa, i per tant, la variable determinant de la seva capacitat de migració a través del gel és únicament el seu pes molecular.

3.1.1 | Preparació del gel de poliacrilamida/SDS

La capacitat per suportar alts voltatges i l'àmplia diversitat de tamany de porus possible, fan dels gels de poliacrilamida un suport sòlid idoni per al seu ús en l'electroforesi. Aquests gels es formen per mitjà de la polimerització de monòmers d'acrilamida que generen llargues cadenes de poliacrilamida que al mateix temps són entrecruades entre elles a través de la bisacrilamida (N,N'-metilen-bisacrilamida) formant una estructura en xarxa. El procés de polimerització té lloc mitjançant una reacció radicalària que es desencadena amb l'addició de persulfat amònic (PSA) i N,N,N',N'-tetrametiletildiamina (TEMED) a una barreja habitualment 40:1 d'acrilamida/bisacrilamida. El PSA genera un radical lliure que activa el TEMED (deixant-lo amb un electró desaparellat) que actua com a transportador d'electrons activant monòmers d'acrilamida en forma de radicals lliures. Aquests, reaccionen amb altres monòmers no activats generant llargues cadenes de monòmers d'acrilamida que al mateix temps s'entrecruen entre elles per mitjà de la bisacrilamida (Figura 27). La combinació de totes dues reaccions porten a la formació de la malla sòlida i porosa que s'utilitza com a suport sòlid per a l'anàlisi electroforètic.

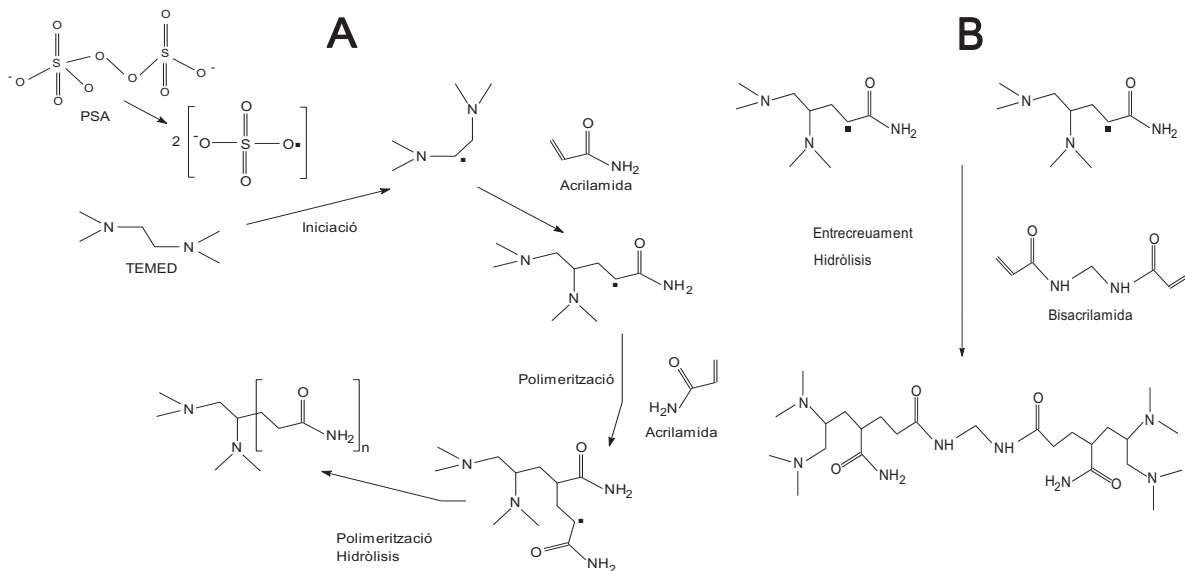


Figura 27. Reaccions de polimerització gel per a PAGE. Reacció de polimerització de monòmers d'acrilamida (A) i reacció d'entrecruament de cadenes de poliacrilamida per acció de la bisacrilamida (B) que tenen lloc simultàniament durant la polimerització d'un gel per a PAGE/SDS. Es mostren les estructures moleculars dels compostos que participen en el procés: TEMED (o N,N,N',N'-tetrametiletildiamina), PSA (o persulfat d'amoni), acrilamida (o 2-propenamida) i bisacrilamida (o N,N'-metilenbisacrilamida).

Per tal de que a l'aplicar una diferència de potencial es generi un corrent elèctric a través del gel és necessari que aquest sigui conductor. Això s'aconsegueix amb l'ús d'un tampó d'electroforesi que conté a més de SDS, tris (que proporciona la força iònica adequada) i glicina per mantenir el pH del tampó constant a 8,7 neutralitzant els protons i els hidroxils que s'alliberen tan en l'ànode com en el càtode, degut a l'electròlisi de l'H₂O per efecte del corrent elèctric (Figura 28).

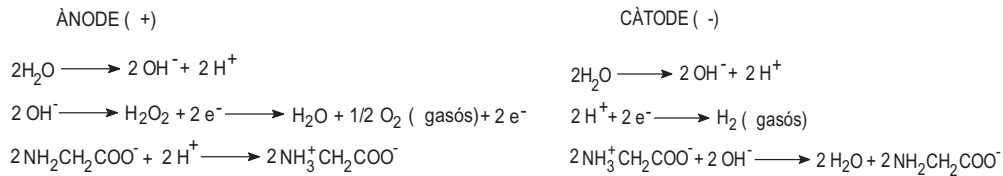


Figura 28. Electròlisi de l'H₂O que té lloc en els elèctrodes d'un aparell d'electroforesi. La glicina actua com a tampó de pH (PH=8,7), neutralitzant els protons i els hidroxils que s'alliberen. Cal notar que a PH=8,7 el grup carboxil de la glicina està permanentment desprotonat (PK=2), i que és el grup amí (PK=9,6) el que capta i cedeix protons.

Els gels per a PAGE/SDS consten de dues parts, un gel superior o gel concentrador i un gel inferior o gel separador. El gel concentrador conté una proporció d'acrilamida més baixa que el gel separador i es prepara amb un tampó a força iònica i pH més baixos (gel concentrador: pH=6,5; tris 31,25mM/gel separador: pH=8,8; tris 93,75mM). El tamny de porus en el gel separador és per tant major i això fa que les molècules trobin menys impediment a migrar a través de ell. Per altre banda, una força iònica inferior implica més resistència elèctrica i per tant un camp elèctric (V/cm) més elevat que permet que les molècules es moguin més ràpidament que en el gel de separació. La migració ràpida de les proteïnes a través del gel separador origina una acumulació d'aquestes en l'intersecció entre el gel concentrador i el gel separador de manera que les diferents proteïnes que componen la mostra entren successivament en el gel de separació concentrades en un espai molt petit, donant a lloc a bandes fines i incrementant la resolució de la separació.

Un dels paràmetres que s'ha de tenir en compte alhora de preparar un gel per a PAGE/SDS és el tamany de porus òptim necessari per aconseguir una bona separació. Això ve determinat pel pes molecular de les proteïnes que es vol analitzar, i s'aconsegueix ajustant el percentatge d'acrilamida del gel separador. En la taula següent es representa el percentatge d'acrilamida idoni en funció de l'interval de pesos moleculars de les proteïnes que es volen analitzar.

Concentració Acrilamida (%)	Pes Molecular (KDa)
8	25-200
10	15-100
12,5	10-70
15	12-45
20	4-40

Taula 9. Concentracions d'acrilamida de gels per a PAGE/SDS recomanades en funció de l'interval de pesos moleculars de les proteïnes a analitzar.

Per a l'anàlisi electroforètic de les proteïnes HERC1 es va posar a punt i es va patentar un mètode especial per a PAGE/SDS que combina un gel en gradient i un gel amb una menor proporció d'acrilamida/bisacrilamida que es va anomenar LAG gel i que permet analitzar proteïnes gegants i proteïnes de menor tamany en un únic gel. El desenvolupament d'aquesta tècnica s'ha inclòs en l'apartat 4.1 dels resultats (Anàlisi conjunta de proteïnes gegants i petites per PAGE/SDS. El sistema LAG

(*Low Acrylamide gradient*). A continuació s'indiquen els materials i reactius necessaris per l'anàlisi de proteïnes mitjançant PAGE/SDS (miniprotean i gels LAG).

3.1.2 | Materials i reactius PAGE/SDS i LAG gel

- Tampó de llisi cel·lular (emprat habitualment): 10 mM tris-HCl, pH 7.5, 100 mM NaCl, 1% nonidet P40, 50 mM NaF, 1 mM vanadat sòdic, 1 mM fluorur de fenilmetilsulfonil (PMSF), 5 µg/ml leupeptina, 5 µg/ml aprotinina, 1 µg/ml pepstatina A, 20 mM β-glicerolfosfat, 100 µg/ml benzamidina.
- Tampó de mostra 2X: 62,5mM tris-HCl PH=6,8; 2%SDS, 10% glicerol, 0,1M DTT, 0,001% blau de bromofenol.
- Sistema per escalfar les mostres fins a 100°C (bany sec, placa calefactora, etc).
- Aparell estàndard per a gels petits d'electroforesi miniprotean (BioRad).
- Solució acrilamida/bisacrilamida 40% (37,5:1) (BioRad).
- H₂O destil·lada.
- Tampó gel concentrador (upper buffer) 4X: 125mM tris-HCl pH=6,8 i 0,1%SDS.
- Tampó gel separador (gel separador) 4X: 375mM tris-HCl pH=8,8 i 0,1%SDS.
- TEMED 1000X (BioRad).
- PSA 10%: 0,05% final.
- Tampó d'electroforesi 10X: final 25mM tris pH=8,3 sense ajustar, 192mM glicina, 0,1% SDS.

El materials i reactius per a la realització d'un LAG gel (veure apartat 4.1 dels resultats), són els mateixos que els que s'utilitzen per als gels petits excepte que per generar la part superior del gel és necessari una solució d'acrilamida/bisacrilamida al 40% (80 :1) (Merck). També és necessari un aparell estàndard per a gels grans d'electroforesi (BioRad), i un aparell generador de gradient (BioRad). En aquest tipus de gel no s'utilitza l'*upper buffer*, les dues parts del gel es preparen en *lower buffer*.

Inhibidors de proteases

Inhibidors	Concentració final en tampó de lisis	Proteases inhibides
PMSF	1mM	Serin proteases: quimiotripsina, tripsina i trombina. També cistein proteases com la papaína.
Aprotinina	5µg/ml	Serin proteases: tripsina, quimiotripsina, plasmina, tripsinògen uroquinasa ,etc.
Leupeptina	5µg/ml	Serin i cistein proteases: tripsina, papaína, plasmina, i cathepsina B.
Pepstatina A	1µg/ml	Aspàrtic Proteases (proteases àcides): pepsina, renina, Catepsina D, quimosina, proteasa B i varies proteases àcides microbianes.
Benzamidina	100µg/ml	Serin proteases, tripsina i tripsin like proteases.
EDTA	1mM	Segresta cations divalents presents en el centre actiu de metal·loproteases (Ca ²⁺ ,Mn ²⁺ ,Zn ²⁺) mitjançant la formació d'un quelat amb el metall.
EGTA	1mM	Segresta cations divalents presents en el centre actiu de metal·loproteases. (Ca ²⁺ ,Mn ²⁺ ,Zn ²⁺) mitjançant la formació d'un quelat amb el metall.
Bestatina	4mM	Amino peptidases

Inhibidors de fosfatases

Inhibidors	Concentració final en tampó de lisis	Fosfatases inhibides
Ortovanadat sòdic activat*	1mM	Tirosin fosfatases, fosfatases bàsiques, ATPases i altres enzims que transfereixen grups fosfat.
Fluorur de sodi	1mM	Serin, treonin fosfatases, fosfatases àcides.
β -Glicerolfosfat	20mM	Serin, treonin fosfatases.
Pirofosfat sòdic	2mM	Serin, treonin fosfatases.
Molibdat sòdic	1mM	Fosfatases àcides.
Imidazol	2mM	Fosfatases bàsiques.

Taula 10. Llistat dels principals inhibidors de proteases i fosfatases emprats habitualment en la preparació de tampons d'homogeneïtzació de teixits i en tampons per a l'obtenció d'extractes cel·lulars. Cal tenir en compte que segons l'estudi que es vol fer, alguns d'ells poden interferir i s'han d'evitar.

En les Taules 11 i 12 es mostren els volums necessaris per a la preparació d'un gel separador al 3% i un gel concentrador a diferents percentatges d'acrilamida per a PAGE/SDS (miniprotean), i els reactius i volums necessaris per a la preparació d'un gel LAG respectivament:

Gel Concentrador (Acrilamida)	
(ml)	3%
H ₂ O milliQ	2,7
Tampó separador 4X	1
Acrilamida/Bisacrilamida (40:1)	0,3
TEMED (μ l)	5
PSA 10% (μ l)	20

Gel Separador								
(ml)	% Acrilamida							
	4	6	7	8	9	10	12	15
H ₂ O milliQ	9,75	9	3,62	8,25	7,87	7,5	6,75	5,62
Tampó separador 4X	3,75							
Acrilamida/Bisacrilamida (40:1)	1,5	2,25	2,62	3	3,37	3,75	4,5	5,62
TEMED (μ l)	25							
PSA 10% (μ l)	75							

Taules 11. Reactius i volums necessaris per a la preparació d'un gel concentrador al 3% (taula superior) i un gel separador als percentatges indicats (taula inferior) per a PAGES/SDS.

Gel LAG (Acrilamida)			
(ml)	% Acrilamida		
	4	6	15
H ₂ O milliQ	13	6	3,75
Tampó separador 4X	5	2,5	2,5
Acrilamida/Bisacrilamida	2 (80:1)	1,5 (40:1)	3,75 (40:1)
TEMED (μ l)	20 μ l	10 μ l	
PSA 10% (μ l)	100 μ l	50 μ l	

Taula 12. Reactius i volums necessaris per a la preparació d'un gel LAG (veure apartat 4.1 dels resultats).

3.2 | Tinció de gels PAGE/SDS amb blau brillant de Coomassie

L'ús del tint *Coomassie G-250* en un assaig colorimètric per a la quantificació dels nivells de proteïna totals va ser descrit per primera vegada per la Dra. Marion Bradford al 1976 (Bradford, 1976). Es va observar que en un entorn àcid, les proteïnes s'unien a aquest colorant per mitjà de forces de Van der Waal, interaccions hidrofòbiques i interaccions iòniques entre els grups SO_3^- i grups amb càrrega positiva de les proteïnes, i que aquesta unió provocava un canvi en l'espectre d'absorbància d'aquesta molècula de 465 a 610nm, essent a 595nm la longitud d'ona on es podien diferenciar millor les dues formes. Aquest canvi en l'espectre d'absorbància d'aquest tint permetia la quantificació dels nivells totals de proteïna mitjançant assajos colorimètrics (mètode Bradford de quantificació de proteïnes).

El *Coomassie G-250* pertany a una família de colorants coneguda com a tints brillants de Coomassie que són els mateixos que s'utilitzaven habitualment per tenyir proteïnes en gels de PAGE/SDS ja que poden difondre cap a l'interior dels gels de forma reversible i unir-se inespecíficament a les proteïnes. D'aquesta manera, la tinció i posterior destinció d'un gel per a electroforesi amb aquest colorant permet la visualització de les bandes que formen les diferents proteïnes, ja que el colorant no unit difon cap a l'exterior del gel durant l'etapa de destenyit.

Dins de la família d'aquests tints els dos que s'usen més habitualment al laboratori amb aquest objectiu són el R-250 que ofereix millors resolucions, i el G-250 que ofereix una millor sensibilitat. Aquesta tècnica permet visualitzar proteïnes en gels per a PAGE/SDS a partir de 0,5µg.

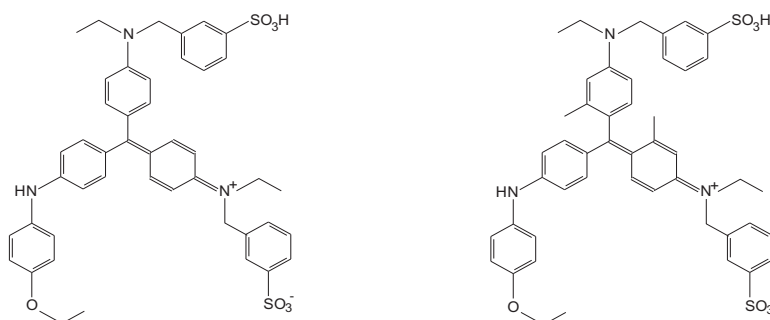


Figura 29. Estructura molecular del Blau Brillant de Coomassie R-250 (esquerra) i G-250 (dreta). El G250 conté dos metils més, situats en dos dels 6 anells fenil que formen el compost.

3.2.1 | Materials i Reactius

- Agitador de plaques.
- Solució de tinció: 0,1% blau brillant de Coomassie R-250 , 45%(v/v) Metanol, 10%(v/v) àcid acètic, H_2O milliQ. Cal filtrar la solució per eliminar impureses sòlides que puguin embrutir el gel.
- Solució de destenyit: 45% metanol, 10% àcid acètic en H_2O milliQ.

3.2.2 | Procediment

1. Afegir al gel que es vol tnyir un volum necessari de la solució de tinció perquè quedi cobert i es pugui bellugar lliurement en el recipient on l'hem col·locat. Incubar-lo durant 3 o 4 hores amb agitació vigorosa i a temperatura ambient.
2. Eliminar la solució de tinció i afegir-hi un volum necessari de la solució de destinció per cobrir el gel. Agitar vigorosament. Canviar la solució de destinció per una solució nova unes quantes vegades fins que es puguin distingir bé les bandes i el fons del gel estigui totalment destenyit.
3. Deshidratar el gel.

3.3 | Western blot

El nom de western blot a aquesta tècnica (Burnette *et al.*, 1981) li va ser posat continuant el joc de paraules iniciat amb la nomenclatura del Northern blot per a la tècnica emprada per a la detecció de seqüències específiques d'ARN que al seu torn es basava en el Southern blot, una tècnica per a la detecció de seqüències específiques d'ADN que havia estat posada a punt amb anterioritat per Edwin Southern al 1974 i s'havia anomenat així en referència al seu autor.

El western blot és un mètode per a la detecció de proteïnes en mostres de teixit homogeneïtzat o en extractes cel·lulars que consisteix en l'aplicació d'una diferència de potencial que provoca que les proteïnes prèviament separades en un gel d'electroforesi es transfereixin a una membrana de nitrocel·lulosa o PVDF en contacte amb el gel. Les proteïnes presenten una càrrega elèctrica neta negativa degut al SDS i migren cap a l'ànode fins que topen amb la membrana de PVDF on queden retingudes. A continuació, la membrana es bloqueja amb llet en pols en TBS-T per evitar les unions inespecífiques dels anticossos que s'utilitzaran posteriorment.

En primer lloc, la membrana s'incuba amb un anticòs específic per a la proteïna que es vol detectar (anticòs primari), que forma un complex proteïna-anticòs primari que es pot detectar mitjançant l'incubació de la membrana amb un altre anticòs (anticòs secundari) que reconeix una regió constant de l'anticòs primari i que porta unit covalentment un enzim. Finalment, la incubació de la membrana amb un substrat d'aquest enzim genera un producte (generalment un compost quimioluminiscent o colorejat) que permet la visualització i quantificació de les proteïnes en la zona de la membrana on s'ha unit l'anticòs primari (Figura 30). Per a realitzar la transferència és necessari un tampó que pugui conduir el corrent elèctric. Habitualment s'utilitza un tampó que conté tris per augmentar la força iònica, glicina com a sistema tamponador de pH i metanol que ajuda a mantenir les proteïnes unides a la membrana i a evitar que el gel augmenti de tamany per efecte de l'augment de temperatura causat per la resistència del gel al pas del corrent elèctric.

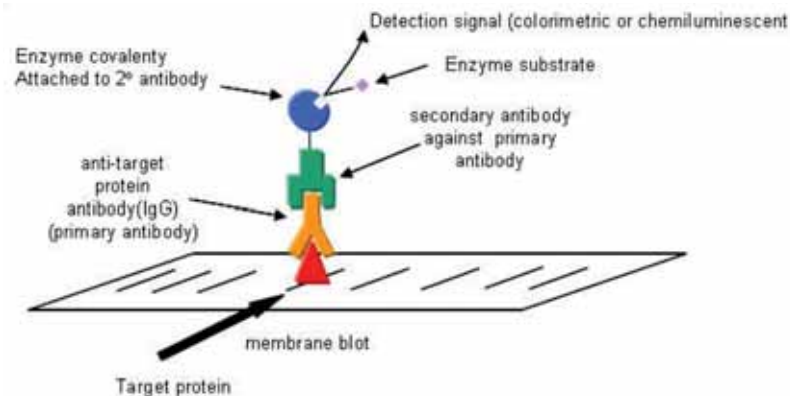


Figura 30. Esquema complex proteïna/anticòs primari/anticòs secundari en una membrana per a western blot (adaptat de pàgina web Henry Jakubowski, 2008)

Quan és vol reincubar una membrana amb un altre anticòs primari per detectar una altra proteïna de tamany similar a la que s'ha detectat prèviament, la senyal de l'anticòs primari utilitzat en primer lloc pot emascarar la senyal de la nova proteïna que es vol detectar. En aquest cas, es pot realitzar un "stripping" de la membrana que consisteix en tractar-la amb SDS i β -mercaptoetanol i que permet desnaturalitzar i eliminar de la membrana l'anticòs primari inicial.

3.3.1 | Materials i Reactius

- Aparell de transferència (BioRad), esponges, "sandwichs".
- Membranes PVDF Hybond-P (Amersham Biosciences).
- Paper Whatmann.
- Iman i agitador magnètic.
- Font de corrent elèctric.
- Tampó de transferència (western blot): final: tris 25mM, glicina 192mM, metanol 10%, pH=8,3 (sense ajustar).
- TBS i TBS-T 20X: final: 10mM tris-HCl, 150mM NaCl pH=7,5; (+0,1% Tween 20 en TBS-T).
- Solució de bloqueig: llet en pols 10% en TBS-T.
- Anticòs primari a la dilució recomanada (entre 1:100 i 1:3000)(veure Taula 13: anticòs primaris utilitzats). L'ús d'una excessiva concentració es tradueix en el reconeixement de bandes inespecífiques .
- Anticòs secundari anti-rabbit: ECL rabbit IgG, HRP linked whole antibody (Amersham Biosciences).
- Anticòs secundari anti-mouse: *anti mouse peroxidase linked species, specific whole antibody* (Amersham Biosciences).
- Kit de revelat western blot: *ECL plus western blotting detection system* (GE Healthcare).

Reutilització de membranes ("stripping")

- Solució de "stripping": 62,5mM tris-HCl pH=6,8; 2%SDS.
- β -mercaptoetanol 100 mM.

Anticòs	Origen	Companyia
Anti HERC1 410-5 (reconeix residus 4001-4385, domini RLD2 i equivalents RLD1)	Rabbit	Producció pròpia
Anti HERC2 Bvg 3.2 (reconeix residus 1-199 extrem Nt)	Rabbit	Producció pròpia
Anti CHC	Mouse	BD biosciences
Anti Hsp70	Mouse	Oncogene
Anti CLC	Mouse	Sigma
Anti HA	Mouse	Sigma i roche
Anti TSC2	Rabbit	Santa Cruz
Anti TSC1	Rabbit	Cell signalling tech
Anti mTOR	Rabbit	Cell signalling tech
Anti Actina	Rabbit	Roche/sigma
Anti c-myc	Mouse	Sigma
Anti P-T389-p70 S6K1	Mouse	Cell signalling tech
Anti P-S473-Akt	Mouse	Cell signalling tech
Anti p70 S6K1 total	Rabbit	Santa cruz
Anti P-T308-Akt	Rabbit	Cell signalling tech
Anti P-T421/424-p70 S6K	Rabbit	Cell signalling tech
Anti P-S235/236-S6	Rabbit	Cell signalling tech
Anti P-T37/46-4EBP1	Rabbit	Cell signalling tech
Anti LC3	Rabbit	Medical and biological labs
Anti GFP	Mouse	Roche
Anti Flag	Mouse	Sigma
Anti RSK	Rabbit	Santa cruz
Anti P-S9-GSK3β	Rabbit	Oncogene
GST	Mouse	Sigma
Anti P-S380-RSK	Rabbit	Cell signalling tech
Anti P-S376-MSK	Rabbit	Cell signalling tech
Anti P-T180/Y182-p38	Rabbit	Cell signalling tech
Anti P-Erk 1/2	Mouse	Sigma
Anti S6 total	Mouse	Cell signalling tech
Anti P-S133-CREB	Rabbit	Cell signalling tech
Anti MSK total	Rabbit	Santa cruz

Taula 13. Anticossos primaris utilitzats per a western blot.

3.3.2 | Procediment

1. Activar una membrana de PVDF amb metanol pur i a continuació rentar-la amb aigua milliQ i amb el tampó de transferència, evitant que s'assequi en tot moment. En el cas del LAG gel utilitzar dues membranes.
2. Impregnar el gel d'electroforesi amb el tampó de transferència fred durant uns 15 minuts.
3. Impregnar amb el tampó de transferència la/les membranes de PVDF, 4 papers Whatmann i dues esponges.
4. Muntar el "Sandwich" (en el cas del LAG gel posar una membrana PVDF a cada costat del gel).
5. Col·locar el "sandwich" a la cubeta de transferència amb l'orientació correcta, és a dir amb la membrana on es vol que es transfereixin les proteïnes "mirant" cap a l'ànode ja que les proteïnes (amb càrrega negativa degut al SDS) migraran cap al pol positiu de l'aparell. Afegir un agitador magnètic i omplir amb tampó de transferència fred.
6. Connectar la cubeta al corrent elèctric i realitzar la transferència a 4°C i amb agitació, a una intensitat de corrent i un temps segons la Taula 14.
7. Extreure la membrana i rentar-la amb TBS-T.
8. Bloquejar la membrana durant 1 hora a temperatura ambient amb una solució de llet en pols al 10% en TBS-T per bloquejar les unions inespecífiques de l'anticòs primari.

9. Rentar la membrana amb TBS-T i incubar-la amb l'anticòs primari durant una hora a temperatura ambient o tota la nit a 4°C i amb agitació suau per tal de que l'anticòs es pugui repartir de forma homogènia per tota la membrana.
10. Rentar la membrana amb TBS-T i incubar-la durant 1 hora amb l'anticòs secundari que porta unit covalentment l'enzim peroxidasa de rave (HRP) a 1:100000 (en el cas d'utilitzar com a reactiu de revelat l'ECL plus (Amersham)) en una solució de llet en pols al 10% en TBS-T. En cas de fer servir un altre reactiu de revelat, utilitzar la dilució recomanada. En cas de no tenir-la, utilitzar un rang de dilucions entre 1:1000 i 1:20000 tenint en compte que un excés d'anticòs secundari es traduirà també en el reconeixement de bandes inespecífiques.
11. Rentar la membrana amb TBS-T i posteriorment amb TBS.
12. Revelar la membrana amb *ECL plus western blotting detection system* (Amersham Biosciences) utilitzant el quimioluminòmetre (LAS 3000 FUJI film) que permet la detecció de la llum emesa per la membrana en les zones on es troba la proteïna d'interès. Agafar imatges a diferents exposicions evitant la saturació.

Reutilització de membranes ("stripping")

1. Incubar la membrana en la solució d' stripping entre 10 i 30 minuts a 50 °C i agitació.
2. Rentar la membrana amb TBS-T per eliminar completament el β-mercaptoetanol que aquest pot desnaturalitzar l'anticòs primari que s'afegirà a continuació.

En la Taula 14 s'indiquen les condicions de transferència per als diferents tipus de gel:

Condicions de transferència				
	LAG gel		Gels petits	
Intensitat (miliampers)	400	250	350	250
Temps (hores)	1-1,5	12-16	1-1,5	12-16

Taula 14. Intensitats i temps recomanats per a la transferència de gels LAG i gels petits per a western-blot.

3.4 | Quantificació del contingut proteic: Mètode de l'àcid Bicinconínic (BCA)

Existeixen diversos mètodes per a la quantificació dels nivells de proteïna totals d'una mostra; mètodes d'absorció, colorimètrics i fluorimètrics. Degut al seu relatiu baix preu i a la seva rapidesa, els mètodes colorimètrics són els que s'utilitzen habitualment. Es basen en la capacitat que tenen les proteïnes d'unir-se a certs reactius generant compostos colorejats. Entre aquests mètodes es troba el mètode de Biuret, el mètode Bradford, el mètode de Lowry i el mètode de l'àcid bicinconínic (BCA). El mètode més sensible i reproduïble i el que presenta menys interferències amb possibles components dels tampons en els quals pugui estar dissolta la mostra (SDS, Tritó X-100, EDTA, etc.) és el mètode de l'àcid bicinconínic o BCA que és el que s'ha utilitzat en aquest treball.

El mètode de l'àcid bicinconínic o BCA es basa en la capacitat que presenta aquest àcid de formar un complex de color porpra intens quan reacciona amb ions cuprosos, i en la capacitat que tenen els pèptids de tres residus o més de quelar i reduir ions cúprics a través dels seus enllaços peptídics, quan es troben en medi bàsic i en presència de tartrat potàssic (Smith *et al.*, 1985). El complex de color blau que es forma inicialment entre el coure i les proteïnes adquireix una intensitat de color que és proporcional al nombre d'enllaços peptídics presents.

Aquesta reacció es coneix com a reacció de Biuret ja que el complex que es forma entre els enllaços peptídics i el coure és similar al que es forma entre els grups amida del compost orgànic Biuret ($\text{NH}_2\text{-CO-NH-CO-NH}_2$) i el coure. En la formació d'aquest complex entre els ions cúprics i les proteïnes, els ions cúprics es redueixen a ions cuprosos que reaccionen amb l'àcid bicinconínic (estequiometria 1:2) formant el complex de color porpra intens que presenta una absorbància característica a 562nm (Figura 31). L'absorbància d'aquest complex pot ser mesurada a una longitud d'ona entre 550 i 570nm sense que es produeixi un error significatiu important.

Cal tenir en compte que les substàncies presents en el tampó de la mostra que puguin reduir l'ió cúpric augmentaran la quantitat de complex format entre l'ió cuprós i el BCA, mentre que substàncies quelants del coure la disminuiran. En ambdós casos s'introdueix un error a la quantificació de proteïna de les mostres per excés o per defecte respectivament. A més a més, certs aminoàcids presents en les proteïnes, com la cisteïna, la tirosina i el triptòfan, també interfereixen ja que influeixen en la reacció de reducció del coure.

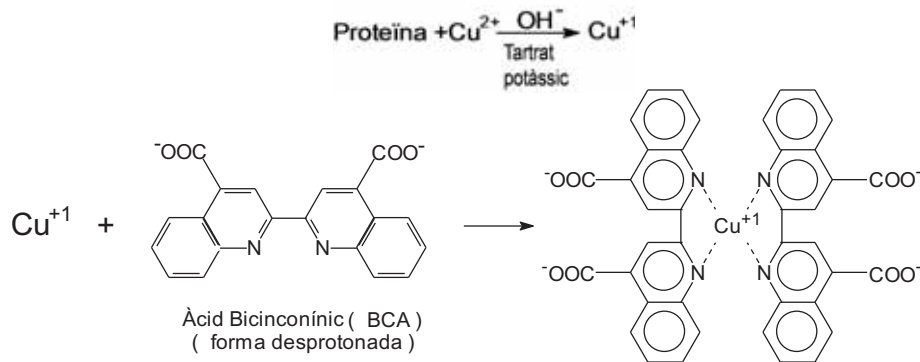


Figura 31. Mètode de l'àcid bicinconínic (BCA) per a la quantificació total de proteïna. Es mostra la reacció de reducció del Cu^{2+} al reaccionar amb els enllaços peptídics de les proteïnes en medi bàsic i en presència de tartrat potàssic, i la posterior formació del complex entre el Cu^{+1} amb l'àcid bicinconínic (modificat de Pierce Chemical).

3.4.1 | Materials i Reactius

- Plaques de 96 pous (TPA).
- Espectrofotòmetre de plaques.
- Dissolució stock d'albúmina de sèrum boví (BSA) a $1\mu\text{g}/\mu\text{l}$ en H_2O milliQ.
- H_2O milliQ.
- Reactius de BCA (Pierce).
- Incubador de plaques.

3.4.2 | Procediment

1. Preparar una recta patró amb diferents concentracions de BSA: Aplicar diferents quantitats de BSA entre 0 i $30\mu\text{g}$ aproximadament (unes 15 condicions) en un volum final de $30\mu\text{l}$, en els pous d'una placa de 96 .
2. Aplicar $30\mu\text{l}$ de cadascuna de les mostres (o d'una dilució d'aquestes) en els pous d'una placa de 96 pous (per triplicat).
3. Preparar una barreja dels reactius de BCA A i B (Pierce): $20\mu\text{l}$ reactiu B per cada ml de reactiu A.

4. Afegir 200µl de la barreja A+B a cada pou.
5. Incubar la placa a 37°C durant 20 minuts.
6. Llegir l'absorbància de cada pou a una λ entre 550 i 570nm (habitualment 550) en un espectrofotòmetre de plaques.
7. Calcular l'equació de la recta patró resultant de representar l'absorbància enfront de la concentració de BSA per a cada dilució de BSA.
8. Calcular la mitjana d'absorbància dels triplicats de cada mostra i determinar la concentració interpolant a la recta patró tenint en compte el factor de dilució de la mostra si és necessari.

3.5 | Extracció d'ADN plasmídic de cultius bacterians

El genoma dels bacteris està contingut en un únic cromosoma circular que codifica per a la majoria de funcions essencials per al seu creixement i reproducció. Gairebé tots els bacteris que es coneixen contenen també ADN en unes estructures anomenades plasmidis que tenen una estructura similar al cromosoma i es repliquen de la mateixa manera, però són unes 50 vegades més petits. Els plasmidis codifiquen per funcions no essencials que resulten beneficioses per als bacteris en determinats ambients (factors de resistència a antibiòtics, per exemple).

En les tècniques d'ADN recombinant s'aprofita l'existència dels plasmidis en els bacteris per utilitzar-los com a cèl·lules hostes de l'ADN recombinant, concretament, les soques d'*Escherichia coli* són les primeres que es van utilitzar amb aquesta finalitat i les més emprades habitualment. Mitjançant la transformació de bacteris amb un gen d'interès inserat en un vector de clonació i posterior selecció i cultiu d'aquests, es pot amplificar el nombre de còpies del gen d'interès, aïllar-lo i utilitzar-lo en altres procediments com ara la digestió amb enzims de restricció, l'inserció en un vector d'expressió, transfecció en cèl·lules eucariotes etc.

Existeixen varis mètodes d'aïllament de plasmidis de bacteris; electroforesi, clorur de cesi-bromur d'etidi, electroforesi en gel de camp pulsant, precipitació diferencial amb polietilenglicol, cromatografia de bescanvi iònic, filtració en gel o llisi alcalina, que és el mètode que s'ha utilitzat en aquesta treball.

- **Mètode de la llisi alcalina**

Aquest mètode (Sambrook, Fritsch i Maniatis, 1989) es basa en aprofitar el relatiu petit tamany que solen presentar la majoria de plasmidis per separar-los de l'ADN cromosòmic. Consisteix en la realització d'un llisat suau dels bacteris en medi bàsic que provoca la desnaturalització de les cadenes d'ADN plasmídic i cromosòmic, habitualment amb SDS, per trencar les membranes dels bacteris, i amb NaOH que actua formant ponts d'hidrògen amb les bases nitrogenades i competeix amb els ponts d'hidrògen que es formen entre elles, afavorint la desnaturalització. A continuació, es neutralitza el NaOH i s'augmenta la concentració de sals del medi, habitualment amb àcid acètic i acetat de potassi respectivament, provocant la precipitació de l'ADN genòmic degut al seu gran tamany i al fet que es troba unit a proteïnes que en aquestes condicions també precipiten. En canvi, l'ADN plasmídic al ser molt més petit, no precipita tan ràpid i es manté en el sobrenedant. Com que els plasmidis presenten una estructura circular covalent tancada, al desnaturalitzar-se les dues cadenes no es separen del tot i es tornen a hibridar ràpidament i adquireixen la seva estructura superenrotllada quan les condicions desnaturalitzants del medi desapareixen per efecte de la neutralització del medi amb àcid acètic. L'ADN genòmic en canvi, tot i ser també circular, no es pot renaturalitzar tan ràpidament i a més sofreix trencaments durant aquest procés degut al seu tamany major.

Finalment es separa el sobrenedant (amb els plasmidis) del precipitat, i es procedeix a la purificació. Actualment s'han substituït les etapes d'extracció d'impureses mitjançant fenol-cloroform i cloroform-alcohol isoamílic i posterior precipitació de l'àcid nucleic amb etanol, per l'ús de determinats reactius o resines que retenen l'ADN, i l'utilització de columnes en les quals es poden realitzar directament les etapes de rentat i posterior elució del plasmidi en aigua o tampó TE.

- **Determinació de la concentració de l'ADN i avaluació del grau de puresa de la preparació**

Un mètode ràpid per avaluar la puresa i concentració de les purificacions d'ADN plasmídic és la lectura de l'absorbància de les preparacions a la zona de l'UV proper (a 260 i 280nm). L'espectre d'absorció de l'ADN presenta un pic màxim característic a 260nm degut als anells purínics i pirimidínics de les bases nitrogenades. Concretament, una dissolució d'ADN de doble cadena de 50µg/ml absorbeix 1 unitat de densitat òptica (DO) a 260nm, amb lo qual la lectura de l'absorbància de la purificació a aquesta longitud d'ona permet determinar la concentració d'ADN.

L'ADN també absorbeix, tot i que en menor quantitat, a 280nm. A aquesta longitud d'ona, compostos no desitjats però que poden estar presents en la purificació com les proteïnes, presenten un pic màxim d'absorció degut a la presència d'aminoàcids aromàtics en la seva seqüència. Si es té en compte que les proteïnes també presenten certa absorbància a 260nm, és necessari assegurar que l'absorbància mesurada a 260nm correspon a l'ADN i no a les proteïnes, i això es pot aconseguir utilitzant el valor que s'obté de la relació absorbància (260nm)/absorbància (280nm). Aquest paràmetre s'utilitza com a índex de puresa de l'ADN essent 1,8 el valor que obtindria una dissolució d'ADN amb una contaminació per proteïnes menyspreable. Valors per sobre de 1,8 indiquen contaminació per ARN (que també absorbeix a 260nm) mentre que valors per sota de indiquen contaminació per proteïnes.

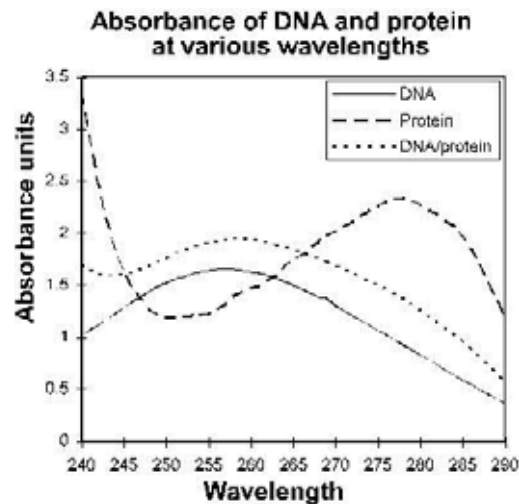


Figura 32. Espectres d'absorció de mostres pures d'ADN plasmídic (80mg/ml), proteïna (albúmina de sèrum boví (3mg/ml)) i d'una barreja 10:1 en pes de les dues anteriors (adaptat de Biotek).

3.5.1 | Materials i Reactius

Tot el material ha d'estar autoclavat i cal utilitzar guants durant la purificació, per tal d'evitar que les ADNases degradin l'ADN. Per a l'extracció d'ADN plasmídic es van utilitzar dos kits comercials diferents basats en el mètode de la llisi alcalina: per a les minipreps. es va utilitzar el kit de Biotools i per a les maxipreps. el de Sigma:

Minipreps (Biotools)	Maxipreps (Sigma)
<ul style="list-style-type: none"> - Clon d'<i>E. coli</i> (DH5α o XL1blue) prèviament transformat i seleccionat que conté el plasmidi que es vol purificar. - Medi de cultiu de bacteris LB (autoclavat): 1% NaCl, 1% bactotripton, 0,5% extracte de llevat (p/v). <ul style="list-style-type: none"> - Antibiòtics ampicilina i kanamicina a 50 μg/ml final. (es preparen en aigua milliQ i es filtren amb filtres de 0,4μm abans d'utilitzar). - Incubador de bacteris. - Espectrofotòmetre amb làmpada per a la zona UV (1-400nm). - Cubeta de quars. 	
<ul style="list-style-type: none"> - Centrífuga de Falcons de 10ml. - Centrífuga d'eppendorfs. - Aigua milliQ i bany per escalfar-la a 65$^{\circ}$C. - Solució I. - Solució II. - Solució III. - Solució de rentat. - Resina d'unió a l'ADN. - Columnnes de filtració per a eppendorfs. 	<ul style="list-style-type: none"> - Solució de preparació de la columna. - RNAase. - Solució de resuspensió. - Solució de lisis. - Solució de neutralització. - Solució de "binding". - Solució de rentat 1. - Solució de rentat 2. - Solució d'elució (10mM Tris-HCl, pH=8,5). - Xeringues amb filtre. - Columnnes. - Centrífuga de Falcons de 50ml (fins a 5000g). - Etanol 95-100%.

Taula 15. Materials i reactius per a l'extracció d'ADN plasmídic a partir de cultius bacterians (minipreps i maxipreps).

3.5.2 | Procediment

Minipreps (Biotools)	Maxipreps (Sigma)
<ol style="list-style-type: none"> 1. Inocular 5ml de LB+antibiòtic de selecció corresponent amb un clon d'<i>E. coli</i> que conté el plasmídic que es vol purificar. 2. Incubar tota la nit a 37°C i agitació (incubador de bacteris). 3. Centrifugar el cultiu a 2000g durant 10 minuts. i recuperar el pellet. 4. Resuspendre el pellet amb 300µl solució I, i transferir-ho a eppendorfs. 5. Afegir 300µl solució II i barrejar per inversió 5 vegades (NO DEIXAR ACTUAR LA LLISI MÉS DE 5 MINUTS). 6. Afegir la solució III, barrejar per inversió 5 vegades i posar-ho en gel durant 5 minuts. 7. Centrifugar eppendorfs a 18000g durant 10 minuts i recuperar el sobrenedant. 8. Afegir 10µl de resina ben resuspensa per eppendorf. 9. Deixar reposar a temperatura ambient durant 10 minuts, barrejant per inversió cada 2-3 minuts. 10. Carregar la barreja a les columnes i centrifugar a 18000g durant 5 minuts. 11. Buidar els eppendorfs i rentar les columnes amb 400µl de solució de rentat freda i centrifugar a 18000g durant 1 minut. 12. Repetir el pas anterior. 13. Centrifugar les columnes buides destapades a 18000g durant 1 minut. 14. Eluir l'ADN plasmídic en 50µl d'aigua milliQ escalfada a 65°C deixant a temperatura ambient 2 minuts. 15. Centrifugar a 18000g durant 2 minuts. Recollir l'ADN plasmídic i guardar a -20°C. 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Inocular 300ml de LB+antibiòtic de selecció corresponent amb un clon d'<i>E. coli</i> que conté el plasmídic que es vol purificar. 2. Incubar tota la nit a 37°C i agitació (incubador de bacteris) 3. Centrifugar el cultiu a 3000g durant 10 minuts i recuperar el pellet. 4. Resuspendre el pellet amb 12ml de la solució de resuspensió, a la qual s'ha afegit prèviament la RNAasa. 5. Afegir 12ml de solució de llisi i barrejar per inversió 7-8 vegades. 6. Deixar reposar la barreja 5 minuts fins que adquireix textura viscosa. (NO DEIXAR LA LLISI MÉS DE 5 MINUTS). 7. Neutralitzar la llisi afegint 12ml de solució de neutralització. Barrejar per inversió 5-6 vegades. 8. Afegir 9ml de la solució de "binding" i barrejar per inversió 1-2 vegades. 9. Passar la barreja a la xeringa i deixar reposar durant 5 minuts fins que el pellet es separi per gravetat. 10. Activar la columna amb 12 ml de solució de preparació de la columna. Centrifugar a 3000g durant 2 minuts. 11. Afegir l'èmbol la xeringa i filtrar tota la barreja de manera que el pellet es quedi retingut en el filtre de la xeringa i el sobrenedant passi a la columna. 12. Centrifugar la columna a 3000g durant dos minuts. 13. Afegir 12ml solució de rentat 1 a la columna i centrifugar a 3000g durant dos minuts. Descartar l'eluat. 14. Afegir 12ml solució de rentat 2 (a la qual s'ha afegit prèviament etanol) a la columna i centrifugar a 3000g durant cinc minuts. 15. Deixar reposar la columna de manera que s'evapori l'etanol. 16. Eluir l'ADN plasmídic afegint a la columna 3ml de solució d'elució. Esperar 5 minuts, i centrifugar a 3000g durant 5 minuts. 17. Quantificar la concentració d'ADN i guardar a 4°C.

Taula 16. Procediments per a l'extracció d'ADN plasmídic a partir de cultius bacterians (minipreps (Biotools) i maxipreps (Sigma)).

3.6 | Preparació de cèl·lules competents i transformació

Es coneix com a transformació el canvi heretable en les propietats d'una soca bacteriana (receptora), per l'ADN d'una altre soca (donant). La cèl·lula receptora que expressa el caràcter genètic de la donant s'anomena "transformant". Aquest fenomen succeeix de forma natural en diversos bacteris, durant el qual, entren en un estat de creixement que s'anomena competència i que consisteix en l'habilitat d'una soca de transportar ADN nu exògen (cromosòmic, plasmídic, etc.) des de el medi de cultiu cap a l'interior de la cèl·lula de manera que aquest pugui resistir a l'acció de nucleases endògenes.

La soca bacteriana *Escherichia coli* no posseeix un mecanisme natural de transformació, però al 1970 Mandel M. i Higa A. (Mandel i Higa, 1970) van descobrir que es podia induir artificialment aquest estat de competència exposant les cèl·lules a clorur de calci abans de l'addició de l'ADN. Breument, el procés d'inducció de la competència en soques d'*E. coli* descrit per aquests autors consisteix en resuspendre els bacteris en fase exponencial de creixement en una dissolució hipotònica (50-100mM) de clorur de calci a 0°C que fa que les cèl·lules s'inflin per l'entrada d'aigua al seu interior per efecte de la pressió osmòtica, i es formen esferoplasts (cèl·lules sense paret cel·lular). A continuació, s'afegeix l'ADN que forma complexos de fosfat càlcic resistent a les nucleases que s'adhereixen a la superfície cel·lular. Mitjançant un breu xoc tèrmic a 42°C els complexos poden passar a l'interior de les cèl·lules i es deixa que els esferoplasts es recuperin en un medi ric que també permet que s'expressin els gens transformats. Finalment, els transformants es poden aïllar mitjançant inoculació i creixement en un medi selectiu.

Els protocols per a la preparació de cèl·lules competents i transformació varien segons les soques bacterianes en quant als reactius i condicions físiques que s'utilitzen però tots ells es basen en la desestabilització de la membrana cel·lular de la soca receptora i la precipitació de l'ADN formant complexos resistent a l'acció de nucleases.

Amb el temps s'han anat elucidant més factors que afecten a la transformació com ara una incubació més prolongada dels bacteris en CaCl_2 , l'addició de múltiples cations a la barreja de transformació, el tractament dels bacteris amb dimetil sulfòxid (DMSO) en presència de cations mono i bivalents entre d'altres, que han fet augmentar considerablement l'eficiència d'aquest procés.

El mètode per a la preparació de cèl·lules competents i transformació que s'ha utilitzat en aquest treball és el mètode de preparació de cèl·lules competents en un sol pas de Chung C.T (Chung *et al.*, 1989) que utilitza polietilenglicol (PEG), DMSO i MgCl_2 per permeabilitzar les cèl·lules i facilitar l'entrada de l'ADN al seu interior. També presenta l'avantatge que permet induir la competència i emmagatzemar les cèl·lules competents en el mateix medi. En aquest mètode no és necessari realitzar el xoc tèrmic, tot i que en la majoria de casos sí que es va realitzar per millorar el rendiment de les transformacions.

3.6.1 | Materials i Reactius

Preparació Cèl·lules Competents	Transformació
<ul style="list-style-type: none"> - Stock original bacteris <i>E. coli</i> lliure de plasmidis: soca XL1blue o DH5α. - Medi de cultiu Luria Broth (LB) estèril: 10 gr/l NaCl, 10 g/l bacto triptona, 5 g/l extracte de llevat. - Tampó TSS. Composició: 10% (p/v) polietilenglicol (PEG 3350) en LB pH=6,5, 5% (v/v) DMSO, 50mM MgCl₂. Filtrat amb filtre de 0,2μm. - Incubador de bacteris. - Espectrofotòmetre. Cubeta de plàstic. 	<ul style="list-style-type: none"> - Cèl·lules competents. - ADN plasmídic. - Bany. - Medi Luria Broth (LB) estèril. - Incubador de bacteris. - Plaques d'LB-agar amb l'antibiòtic de selecció corresponent a 50μgr/ml. - Glicerol 80% (v/v) estèril.

Taula 17. Materials i reactius per a la preparació de cèl·lules competents i per a la seva transformació.

3.6.2 | Procediment

Les cèl·lules competents es solen preparar en excés, s'aliqüoten i es guarden a -80°C de manera que cada vegada que es necessita realitzar una transformació només cal realitzar el xoc tèrmic.

3.6.2.1 | Preparació de cèl·lules competents

1. Inocular cultiu LB sense antibiòtic amb l'stock original de bacteries *E. coli* sense plasmidi. Deixar créixer el cultiu tota la nit a 37°C i agitació (incubador de bacteris).
2. Fer una dilució 1:100 del cultiu crescut amb LB estèril a temperatura. Incubar el cultiu diluït en l'incubador de bacteris fins que arribi a una densitat òptica de 0,3-0,4 (mesurada en un espectrofotòmetre a 600nm amb una cubeta de plàstic).
3. Centrifugar el cultiu a 2500g durant 10 minuts a 4°C.
4. Resuspendre el pellet en 5ml de tampó TSS fred. Agitar durant 10 minuts a 4°C.
5. Comprobar la competència de les cèl·lules.
6. Aliqüotar (uns 200 μ l cèl·lules competents/ependorf) i guardar a -80°C.

3.6.2.2 | Transformació de cèl·lules competents

7. Atemptar el bany a 42°C.
8. Deixar descongelar les alíqüotes necessàries de cèl·lules competents en gel.
9. Afegir uns 100 μ l de cèl·lules competents en 1 eppendorf fred per cada transformació.
10. Afegir un excés de plasmidi (entre 1 i 10 ngr) a les cèl·lules competents i deixar-ho en repòs uns 10-15 minuts en gel.
11. Realitzar el xoc tèrmic: posar el/s eppendorf/s al bany a 42°C durant 45 segons exactes i després tornar-los a posar en gel ràpidament.
12. Deixar el/s eppendorf/s en repòs durant 2 minuts en gel.
13. Afegir 1ml de LB estèril sense antibiòtic a cada eppendorf i incubar-los durant 1 hora a 37°C amb agitació (incubador de bacteris).
14. Centrifugar el/s eppendorf/s a 18000g durant 1 minut i eliminar gairebé tot el sobrenedant deixant uns 100 μ l aproximadament en l'eppendorf.

15. Resuspendre les cèl·lules en els 100 µl i sembrar-los en una placa de LB-agar més l'antibiòtic de selecció corresponent a 50µgr/ml.
16. Incubar les plaques a 37°C durant tota la nit.
17. Seleccionar i analitzar els clons obtinguts mitjançant la purificació i l'anàlisi en gel d'agarosa – bromur d'etidi o l'anàlisi amb enzims de restricció del plasmidi etc.

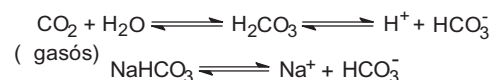
Un cop s'ha seleccionat i comprovat el clon d'interès, cal guardar 1ml d'un cultiu d'aquest clon en LB i 20-30% de glicerol a -80°C per tal de poder inocular nous cultius i obtenir més ADN quan sigui necessari.

3.7 | Cultius Cel·lulars

En aquesta tesis s'ha treballat amb cultius de tres línies cel·lulars humanes:

- Cèl·lules HeLa: Cèl·lules epitelials d'adenocarcinoma de cèrvix extretes en els seus orígens de la senyora Henrietta Lacks que va morir d'aquest càncer al 1951 (primera línia cel·lular d'origen humà que es va cultivar) (Eagle, 1955).
- Cèl·lules HEK-293 i HEK-293-T (*human embryonic kidney cells 293*): Cèl·lules de ronyó d'embrió transformades amb ADN de l'Adenovirus 5 (Graham *et al.*, 1977). Les HEK-293-T deriven de les HEK-293 però expressen de forma estable l'antigen T del virus SV40. Plasmidis que contenen l'origen de replicació SV40 es repliquen molt més en aquesta línia cel·lular obtenint-se nivells d'expressió majors.
- Cèl·lules MCF-7: Cèl·lules d'adenocarcinoma de mama.

Al laboratori es disposa de stocks conservats en nitrogen líquid, a partir dels quals es poden preparar cultius d'aquestes línies cel·lulars. Els stocks es descongelen i les cèl·lules es cultiven a 37°C amb atmosfera humida i 5% de CO₂. El diòxid de carboni gasós (CO₂) es dissol parcialment al medi de cultiu afectant al pH i per tant es té que ajustar en funció del contingut en bicarbonat (HCO₃⁻) del medi de cultiu per tal que actui com a sistema tamponador de pH=7,4 (PH fisiològic idoni per a la majoria de línies cel·lulars). Les reaccions que tenen lloc són les següents:



L'augment de la concentració de l'ió bicarbonat desplaça l'equilibri de la primera reacció cap a l'esquerra estabilitzant el pH a 7,4.

Les cèl·lules també necessiten oxigen, però en la majoria de cultius cel·lulars aquesta necessitat es cobreix amb la pressió atmosfèrica, i únicament en certs cultius com el cultiu d'òrgans requereixen una major quantitat d'oxigen ja que degut a la seva estructura, la difusió de l'oxigen cap a l'interior de les cèl·lules és menys eficient.

El medi de cultiu emprat per al cultiu d'aquestes línies cel·lulars és el Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) High glucose (Gibco) que conté aminoàcids, vitamines, sals inorgàniques a més de glucosa i de l'indicador de pH vermell de fenol (veure composició en taula 18):

COMPONENTS	Concentració (mg/L)	COMPONENTS	Concentració (mg/L)
L-Alanine	35.6	L-Valine	94
L-Arginine hydrochloride	84	D-Calcium pantothenate	4
L-Asparagine	60	Folic Acid	4
L-Aspartic acid	53	Niacinamide	4
L-Cystine 2HCl	63	Pyridoxine hydrochloride	4
L-Glutamic Acid	59	Riboflavin	0.4
L-Histidine hydrochloride-H2O	42	Thiamine hydrochloride	4
L-Isoleucine	105	i-Inositol	7.2
L-Leucine	105	Calcium Chloride (CaCl ₂ ·2H ₂ O)	264
L-Lysine hydrochloride	146	Ferric Nitrate (Fe(NO ₃) ₃ ·9H ₂ O)	0.1
L-Methionine	30	Magnesium Sulfate (MgSO ₄ ·7H ₂ O)	200
L-Phenylalanine	66	Potassium Chloride (KCl)	400
L-Proline	46	Sodium Bicarbonate (NaHCO ₃)	3700
L-Serine	42	Sodium Chloride (NaCl)	6400
L-Threonine	95	Sodium Phosphate monobasic (NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O)	141
L-Tryptophan	16	D-Glucose (Dextrose)	4500
L-Tyrosine	72	Phenol Red	17

Taula 18. Composició del medi de cultiu *Dulbecco's modified Eagle's medium* (DMEM) *High glucose* (GIBCO) (modificat de GIBCO).

Aquest medi però no conté tots els elements necessaris per a la viabilitat cel·lular i és necessari complementar-lo amb els següents components:

- **10% de sèrum fetal boví (FBS) (Biological Industries):** que aporta nutrients bàsics necessaris per al creixement cel·lular com proteïnes, factors de creixement, hormones, etc.
- **2mM L-glutamina (Biological Industries):** aminoàcid inestable que es guarda aliquidat a -20°C i s'afegeix al medi just abans del seu ús.
- **100U/ml penicilina i 100µg/ml estreptomina (Biological Industries):** antibiòtics per evitar contaminacions al medi.

Mitjançant cultius cel·lulars d'aquestes línies s'han realitzat diferents tipus d'assajos: transfeccions (amb polietilenimina (PEI), Lipofectamina 2000 (Invitrogen) o fosfat càlcic), silenciament de gens mitjançant ARN d'interferència, activació i inhibició específica de vies metabòliques, retro-transcripció i PCR a temps real, assajos amb gen reporter, immunoprecipitacions, assajos quinasa, estudis mitjançant immunofluorescència, i mesura del temps de vida mitja relatiu de proteïnes.

3.7.1 | Congelació i descongelació de cèl·lules

Les cèl·lules en cultiu s'han d'anar renovant ja que amb el temps poden acumular canvis genètics i/o perdre algunes de les seves propietats. Com a norma general es recomana no generar més de 50 subcultius (cadascun a partir del cultiu anterior) a partir d'un cultiu inicial.

Per preparar un stock cel·lular es parteix d'un cultiu en fase exponencial de creixement en una placa de 10cm de diàmetre a una confluència del 70-80% que es sotmet a un tractament enzimàtic durant 3 minuts a 37°C amb tripsina-EDTA 0,25%, 1:5000 (Biological Industries). Aquest tractament permet trencar la malla de proteïnes extracel·lulars que manté a les cèl·lules unides i adherides a la placa de cultiu, disgregant-les tot mantenint la seva viabilitat. A continuació s'afegeix medi de cultiu a la placa, es resuspenen les cèl·lules i es transfereixen a un Falcon de 10ml que es centrifuga a 300g durant

5 minuts. El pellet cel·lular obtingut es resuspèn amb 1ml de tampó de congelació (10% dimetil sulfòxid (DMSO), 20% sèrum fetal boví (FBS) i 70% de medi de cultiu DMEM complet (Biological Industries)) i es transfereix a un vial de congelació. Per tal d'evitar la formació de cristalls durant el procés de congelació (d'aquí l'ús del preservant DMSO en el tampó) aquest es té que congelar lentament fins -80°C abans de guardar-lo en nitrogen líquid. Això s'aconsegueix submergint parcialment els vials en isopropanol dins un contenidor per a congelació (Nalgene) que permet la disminució gradual de temperatura. Un cop els vials han assolit la temperatura de -80°C ja es poden transferir al contenidor de cèl·lules de nitrogen líquid.

Per a la preparació d'un nou cultiu a partir dels stocks en nitrogen, s'incuben els vials a 37°C fins que les cèl·lules estan totalment descongelades i es centrifuguen a 300g durant 5 minuts per poder eliminar el sobrenedant que conté DMSO que és tòxic per a les cèl·lules. El pellet cel·lular es resuspèn en 10 ml de medi de cultiu complet atemperat a 37°C i es sembra en una placa de cultiu.

3.7.2 | Manteniment de cultius cel·lulars

Les línies cel·lulars utilitzades creixen adherides al plàstic de la placa de cultiu fins que han cobert tota la superfície o bé es consumeixen tots els nutrients del medi. En aquest moment per tal d'evitar la seva mort és necessari realitzar un subcultiu en una placa amb medi de cultiu fresc. El grau d'adhesió de les cèl·lules a la placa de cultiu varia segons la línia cel·lular però generalment (i per a les línies cel·lulars utilitzades en aquest treball) per cultius en placa de 10cm de diàmetre això s'aconsegueix realitzant un parell de rentats amb 10ml de PBS seguit d'un tractament amb 1ml de tripsina-EDTA 0,25%, 1:5000 (Biological Industries) durant 2-3 minuts a 37°C que provoca la disgregació de les cèl·lules i el seu pas a un estat en suspensió. A continuació, s'afegeixen 9ml de medi complet per aturar per dilució l'efecte de la tripsina, i es transfereix un volum del cultiu a una placa nova a la qual s'ha afegit prèviament medi complet atemperat. La placa s'agita suaument per repartir les cèl·lules de forma homogènia per tota la seva superfície i evitar la formació d'agregats, i es disposa a l'incubador de cèl·lules.

3.7.3 | Transfeccions d'ADN plasmídic

El terme transfecció es diferencia del procés de transformació vist anteriorment en el tipus de cèl·lula on s'introdueix el material genètic. Tot i que el terme transfecció també engloba l'introducció d'ARN, proteïnes, oligonucleòtids o ARN d'interferència (siRNA), en aquest apartat es farà referència únicament a la transfecció d'ADN.

Es coneix com a transfecció l'introducció d'ADN mitjançant mètodes no virals a l'interior de cèl·lules eucariotes animals que els provoca un canvi en alguna de les seves propietats. El terme transformació en canvi, s'utilitza per definir el procés d'introducció d'ADN mitjançant mètodes no virals en bacteris i cèl·lules eucariotes no animals com fongs, algues i plantes.

Un cop l'ADN passa a l'interior de la cèl·lula i arriba al nucli, pot ser incorporat en algun cromosoma, lo qual permetrà la generació un clon estable a partir d'ella (transfecció estable), o bé no fer-ho, lo qual implica la pèrdua de l'ADN introduït durant la mitosi cel·lular (transfecció transitòria). En la transfecció transitòria, l'expressió del transgen sol durar entre 24 i 72 hores per a la majoria de línies cel·lulars, un temps que sol ser suficient per a moltes aplicacions.

Quan es vol que el gen perduri al llarg de successives divisions cel·lulars cal realitzar una selecció dels clons després de la transfecció per aconseguir aïllar aquells que han incorporat per atzar el transgen en el seu genoma. Això es sol fer habitualment mitjançant la co-transfecció amb un altre gen (en el mateix plasmidi) que confereix resistència a algun antibiòtic o toxina als clons que han incorporat el gen a l'ADN genòmic.

En ambdós tipus de transfeccions, el gen introduït es transcriu i es tradueix mitjançant la maquinària de la cèl·lula per a la transcripció i traducció de l'ADN genòmic, de manera que en funció del contingut de l'àcid nucleic transfectat es poden realitzar diferents estudis com l'anàlisi de l'efecte de la sobreexpressió específica de gens, l'estudi de promotors gènics i factors de transcripció i el processat d'ARN missatger entre d'altres.

Existeixen diferents mètodes de transfecció; mètodes físics, basats en l'introducció mecànica de les molècules a l'interior de la cèl·lula (com per exemple la microinjecció directa en cèl·lules embrionàries per a l'obtenció d'animals transgènics o l'electroporació en plantes) i mètodes químics que es basen en la neutralització de la càrrega negativa dels grups fosfat dels àcids nucleics per tal que puguin sobrepassar la membrana cel·lular carregada negativament i entrar a l'interior de la cèl·lula (com el mètode de transfecció amb DEAE-Dextrà, un dels primers mètodes químics utilitzat (Pagano i Vaheri, 1965).

En aquest treball s'han realitzat transfeccions transitòries mitjançant els tres mètodes químics següents:

- Transfecció amb Polietilenimina (PEI).
- Transfecció amb Fosfat Càlcic.
- Transfecció amb Liposomes.

• Transfecció amb Polietilenimina (PEI)

Aquest mètode va ser descrit per Boussif *et al.*, al 1995 i es basa en la formació d'un complex amb càrrega positiva entre l'àcid nucleic carregat negativament i els polímers catiónics de polietilenimina (PEI), unes molècules que presenten una gran densitat de càrregues positives degut a l'elevat nombre de nitrògens protonables que contenen en la seva estructura (Figura 33). El complex resultant es pot aproximar suficientment a la membrana cel·lular (carregada negativament) i pot ser endocitat per la cèl·lula cap al seu interior.

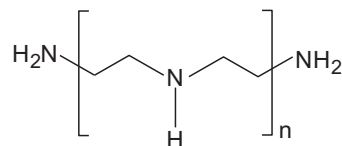


Figura 33. Estructura química de les polietilenimes.

Les polietilenimes també poden permeabilitzar la membrana cel·lular, i això fa que puguin arribar a ser tòxiques. Això s'ha solucionat amb l'ús polietilenimes de baix pes molecular que tenen menys capacitat per trencar la membrana cel·lular. La seva estructura, ja sigui lineal o amb ramificacions, també afecta a la toxicitat i a la seva eficiència en la transfecció. En aquest treball es va utilitzar el reactiu ExGen 500 (Euromedex) que conté polietilenimes lineals de baix pes molecular.

• Transfecció amb fosfat càlcic

Aquest mètode va ser posat a punt per Graham i Van der Eb a l'any 1973 (Graham i Van der Eb, 1973) durant l'estudi de l'efecte de la concentració de diferents cations, de grups fosfat i del pH en l'eficiència de la transfecció. És un mètode barat i àmpliament utilitzat que permet la transfecció de diferents línies cel·lulars. Consisteix en barrejar l'àcid nucleic amb clorur de calci i afegir a la barreja (de manera controlada) un tampó que conté fosfats. Al deixar reposar la barreja a temperatura ambient es genera un precipitat format pel complex calci/àcid nucleic que es dispersa sobre la superfície de les cèl·lules primer i a l'interior cel·lular després, a través de processos d'endocitosis o fagocitosis (no està massa clar quin és exactament el mecanisme). A més a més, el calci protegeix l'àcid nucleic de la degradació via nucleases cel·lulars o nucleases presents en el sèrum del medi de cultiu (Loyter *et al.*, 1982).

El tamany, quantitat i qualitat del precipitat que es forma depèn de les quantitats relatives d'ADN i fosfat càlcic, i el seu excés pot arribar a ser tòxic per a les cèl·lules. El pH també juga un paper crític en l'eficiència de la transfecció i és necessari identificar experimentalment el pH òptim per a cada línia cel·lular per obtenir bones eficiències de transfecció.

• Transfecció amb lípids catiónics

A l'any 1987 es van desenvolupar els primer lípids catiónics com a vehicles per a l'introducció d'ADN a l'interior de la cèl·lula (Felgner *et al.*, 1987). Aquests lípids posseeixen un cap catiónic que s'associa amb els àcids nucleics per interacció electrostàtica amb els grups fosfat de l'ADN. Els complexos resultants poden passar a formar part de la membrana cel·lular i posteriorment i mitjançant endocitosis o per fusió amb la membrana cel·lular, entregar l'àcid nucleic al citosol de la cèl·lula des d'on posteriorment pot viatjar fins al nucli.

Existeixen un gran nombre de lípids catiónics comercials que s'utilitzen per a la transfecció. La majoria d'ells són lípids que presenten una càrrega neta positiva a pH fisiològic. Sovint, aquest lípid es barreja amb un lípid neutre com per exemple el L-dioleoil-fosfatidiletanolamina (DOPE) (Figura 34) que ajuda a la fusió del complex amb la membrana cel·lular (Farhood *et al.*, 1995).

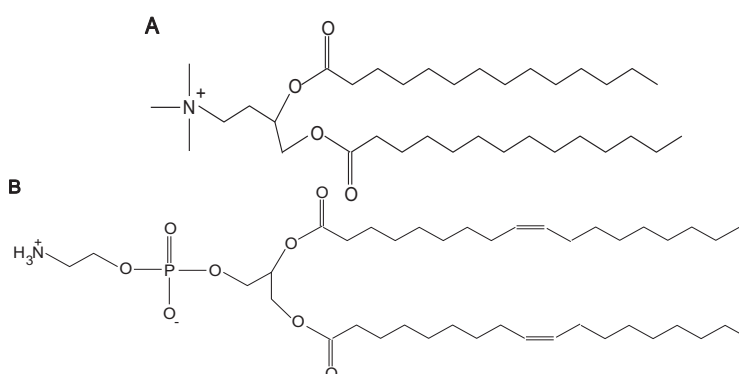


Figura 34. A. Estructura química general d'un lípid catiónic sintètic utilitzat per a transfecció. B. Estructura química del lípid neutre L-dioleoil-fosfatidiletanolamina (DOPE) (Adaptat de PROMEGA).

Aquest mètode de transfecció garanteix bones transfecció d'àcids nucleics i permet transfectar certes línies cel·lulars resistents a la transfecció amb altres mètodes (PEI, fosfat càlcic). No obstant, presenta alguns inconvenients com ara un preu elevat i certa toxicitat.

3.7.3.1 | Material i Reactius

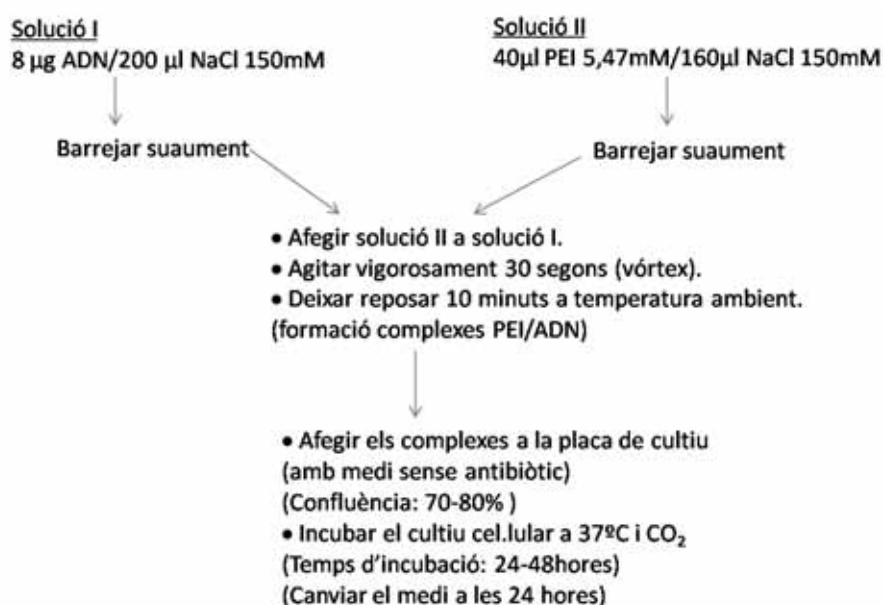
Transfecció PEI	Transfecció fosfat càlcic	Transfecció lípids catiónics
<ul style="list-style-type: none"> - Polietilenimina (PEI) 5,47mM (en residu de nitrògen). - NaCl 150mM. - H₂O milliQ. - Vórtex. 	<ul style="list-style-type: none"> - Solució de fosfats: 280mM NaCl, 0,75mM Na₂HPO₄, 0,75mM NaH₂PO₄, 50mM àcid N,N-bis(2-hidroxiètil)-aminoetasulfonic (BES), PH=6,8. - Solució de calci: 500mM CaCl₂, 100mM BES, pH=6,95 (esterilitzat per filtració). - H₂O milliQ. - Vórtex. - Sistema de bombolleig d'aire. 	<ul style="list-style-type: none"> - Opti-MEM I Reduced Serum Medium (Invitrogen). - Lipofectamine 2000 (Invitrogen). - Vórtex.

Taula 19. Materials i reactius utilitzats per a la transfecció amb PEI, fosfat càlcic i lípids catiónics.

3.7.3.2 | Procediment

A continuació es mostren de manera esquemàtica els procediments seguits per a la transfecció mitjançant els tres mètodes esmentats. La transfecció amb PEI i amb fosfat càlcic es va fer servir per les cèl·lules HEK293 i HEK293T mentre que la transfecció amb lípids catiónics es va fer servir únicament per a les cèl·lules HeLa. Els volums i quantitats indicades fan referència la transfecció de les cèl·lules contingudes en un well d'una placa de 6 wells (9,4cm² de superfície/well). Per a transfeccions en altres plaques és necessari realitzar l'escalat corresponent (sols mostrat en la transfecció amb PEI).

• Transfecció amb Polietilenimine (PEI)

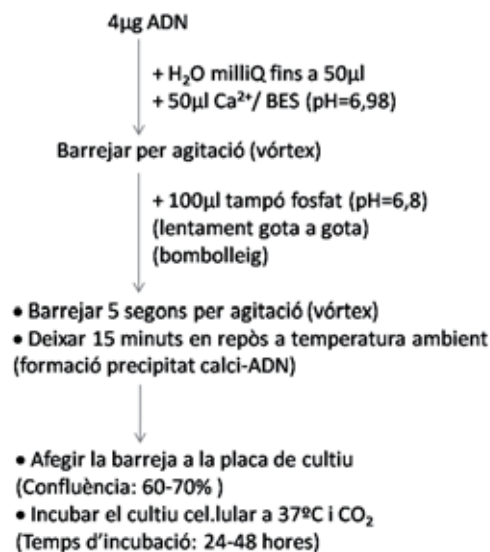


En la Taula 20 es mostren les proporcions d'ADN i PEI per a la transfecció de cultius cel·lulars en plaques de 10 cm, 6 i 24 wells.

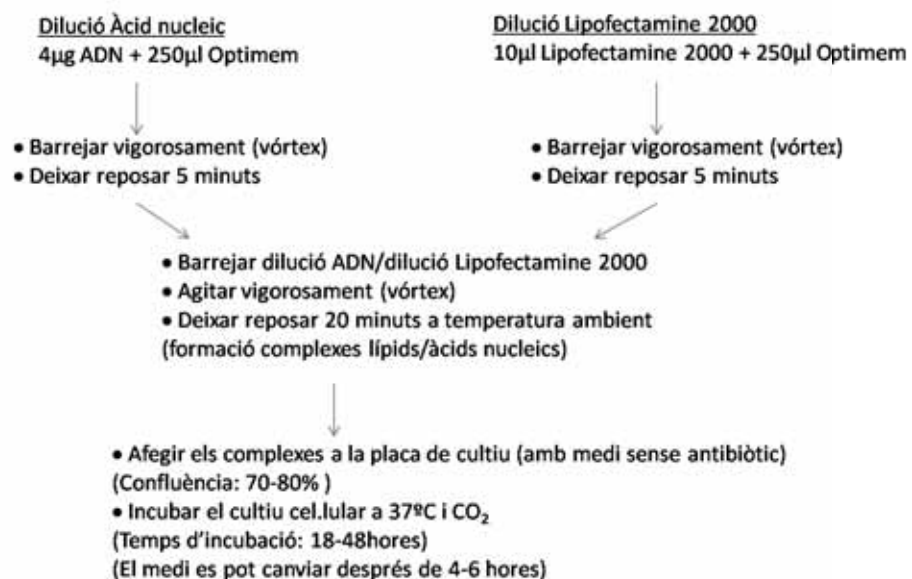
Transfecció amb Polietilenimina			
	Placa 24 wells	Placa 6 wells	Placa 10 cm
Solució I ($\mu\text{g ADN}/\mu\text{l NaCl } 150\text{mM}$)	2/50	8/200	12/200 o 20/500
Solució II ($\mu\text{l PEI } 5,47\text{mM}/\mu\text{l NaCl } 150\text{mM}$)	10/40	40/160	60/240 o 100/400

Taula 20. Composició solució I i solució II per a la transfecció de cèl·lules en diferents plaques de cultiu mitjançant polietilenimina (PEI).

• Transfecció amb Fosfat Càlcic



• Transfecció amb Lípids Catiónics



3.7.4 | Silenciament de gens. ARN d'interferència

La silenciament de gens per ARN d'interferència és un fenomen que succeeix de forma natural en una gran varietat d'organismes. Es desencadena quan un ARN de doble cadena (ds RNA) (l'origen del qual pot ser endogen, com per exemple transcrits generats a partir de seqüències repetides en tàndem, o bé exogen procedent de virus o transgens) entra a l'interior d'una cèl·lula provocant la silenciament específica d'un gen diana per degradació del seu ARN missatger que és complementari al dsRNA introduït.

Tot just fa tres anys, Andrew Fire i Craig C. Mello van compartir el premi Nobel en medicina per l'estudi d'aquest fenomen en el nemàtode *C. elegans* (Fire *et al.*, 1998). Els primers estudis de l'ARN d'interferència però van aparèixer al 1990 quan Rich Jorgensen tractant d'obtenir petúnies de color porpra més intens mitjançant la introducció de transgens, va obtenir inesperadament plantes que presentaven més d'una tonalitat i va anomenar a aquest fenomen co-supressió (Jorgensen, 1990). Al 1995 als laboratoris de Guo i Kempthues i de Fire i Mello van observar que les cadenes codificants d'ARN (RNA "sense") eren igual d'efectives o més que les cadenes no codificants (RNA "antisense") utilitzades fins aleshores en l'inhibició de l'expressió gènica en *C. elegans*. L'explicació d'aquest fet es va atribuir a la contaminació de l'ARN de cadena senzilla que utilitzaven, amb ARN de cadena doble (Guo *et al.*, 1995; Fire *et al.*, 1998).

L'entrada de fragments grans d'ARN de doble cadena (per sobre de 30 parells de bases) provoca una forta resposta antiviral en la majoria de cèl·lules de mamífer degut a l'activació de la PKR (*ds RNA-activated protein kinase*), una quinasa que inhibeix el procés de traducció a través de la inhibició del factor d'inici de la traducció eIF-2 α i de l'activació de l'interferó (IFN) que provoca un augment de l'expressió de gens com la 2'-5' oligoadenilat polimerase/RNasa L que activen la mort cel·lular per apoptosi via activació del factor I κ B (Gil i Esteban, 2000), o via Stat 1 (de la família de factors de transcripció *signal transducers and activators of transcription*).

Per aquest motiu no va ser fins a l'any 2001 que es va començar a aprofitar aquest fenomen natural com a eina per a la silenciament específica de gens, quan als laboratoris de Tuschl i Fire van descobrir que fragments més curts d'ARN sintetitzats químicament (*short interfering RNAs* o *siRNAs*) també podien silenciar gens de forma específica però sense induir resposta antiviral (Caplen *et al.*, 2001; Elbashir *et al.*, 2001).

En el fenomen natural d'ARN d'interferència, aquests fragments més curts d'ARN provenen de la degradació del dsRNA per acció de l'endonucleasa Dicer (ARNasa de la família III) i són aquests els veritables efectors de la silenciament que desencadena l'entrada del dsRNA a l'interior de la cèl·lula. La caracterització bioquímica dels siRNAs generats per acció de la ARNasa dicer ha permès determinar l'estructura necessària que han de tenir els siRNAs sintetitzats químicament per tal que al transfectar-los en cèl·lules puguin ser captats pel complex RISC i es puguin utilitzar per a la silenciament específica de gens.

Així, els siRNAs sintètics efectius en la silenciament de gens estan formats per dues cadenes d'ARN independents però complementàries de 21 a 23 nucleòtids de llargada, presenten els extrems 3' simètrics formats per 2 o 3 nucleòtids protuberants i amb els grups fosfat i hidroxil presents en els extrems 5' i 3' respectivament (Dykxhoorn *et al.*, 2003).

Mecanísticament el procés de l'ARN d'interferència es pot resumir de la següent manera (Figura 35); Un cop l'ARN de doble cadena ha entrat al citoplasma de la cèl·lula, és tallat per l'endonucleasa dicer en fragments petits d'entre 21 i 23 nucleòtids (siRNA). A continuació, per acció d'una helicasa del complex RISC (*RNA interfering silencing complex*) es desacoblen les dues cadenes del siRNA i la cadena no codificant es queda unida al complex (Chiu i Rana, 2002) mentre que la cadena codificant és degradada. El complex resultant és capaç d'identificar i fragmentar l'ARN missatger complementari a la cadena no codificant del siRNA, mitjançant la proteïna Argonaut 2, una altre proteïna del complex RISC (Liu *et al.*, 2004; Song *et al.*, 2004), impedit la síntesi de la proteïna corresponent.

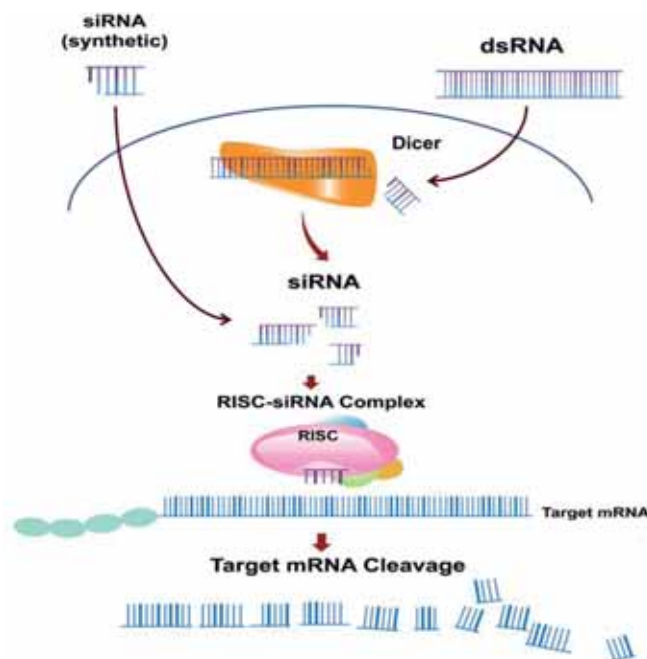


Figura 35. Mecanisme de l'ARN d'interferència. Els siRNAs generats per la fragmentació del dsRNA per acció de la ARNasa dicer o bé sintetitzats químicament i transfectats a l'interior de la cèl·lula, s'incorporen al complex RISC des d'on capten i degraden l'ARN missatger complementari a la seva seqüència, evitant la síntesi de la proteïna corresponent (modificat de Martineau i Pyrah, 2007).

Existeixen varis mètode per aconseguir generar siRNAs específics a l'interior de la cèl·lula:

- Transfecció directa dels dúplexs sintetitzats químicament.
- Transfecció de plasmidis amb promotors per a l'ARN polimerasa III (U6 o H1) que codifiquen per a les dues cadenes del siRNA en tàndem dins d'un mateix *cassette*.
- Transfecció de plasmidis que generen un sol transcrit que codifica per a les dues cadenes del siRNA separades per algunes bases de manera que es forma un loop (short hairpin RNA o sh RNA) que és processat per mitjà de l'ARNasa dicer generant els siRNAs corresponents. Aquests sistemes permeten generar una gran quantitat de siRNAs a l'interior de la cèl·lula durant llargs períodes de temps.

En aquest treball s'han realitzat diversos experiments de silenciament específica de gens tots ells mitjançant la transfecció directa dels dúplexs d'ARN d'interferència corresponents.

3.7.4.1 | Material i Reactius

- Dúplexs siRNA. Concentració stock 20-50µM.
- H₂O milliQ lliure d'ARNases.
- Tampó d' "annealing" 5X: Tris 250mM pH=7-8, NaCl 500mM.
- Transfecció amb lípids catiónics:
 - Lipofectamine 2000 (Invitrogen).
 - Opti-MEM I Reduced Serum Medium (Invitrogen).
- Transfecció amb fosfat càlcic:
 - H₂O milliQ (lliure d'ARNases).
 - Solució de fosfats: 280mM NaCl, 0,75mM Na₂HPO₄, 0,75mM NaH₂PO₄, 50mM àcid N,N-bis(2-hidroxietil)-aminoetasulfònic (BES), pH=6,8.
 - Solució de calci: 500mM CaCl₂, 100mM BES, pH=6,95 (esterilitzat per filtració).
- Vórtex.

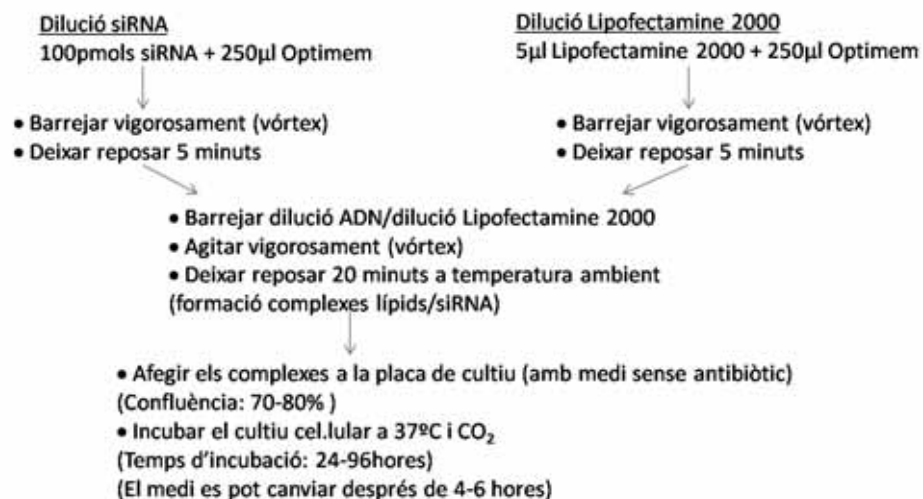
3.7.4.2 | Procediment

En alguns casos es van comprar les dues cadenes dels siRNA per separat i posteriorment es van hibridar per obtenir el dúplex funcionals. El procediment seguit per a l'hibridació és el següent:

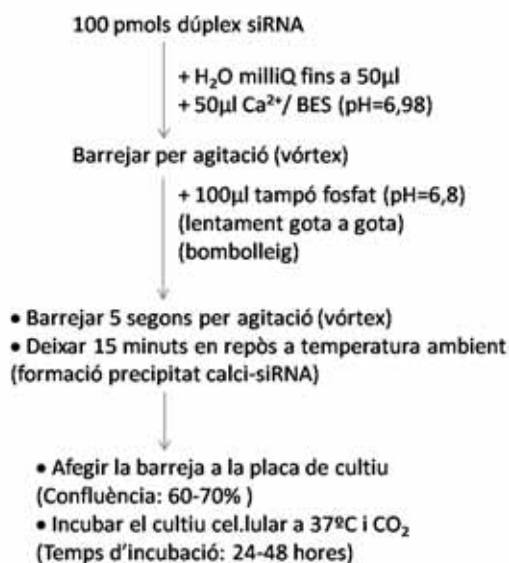
1. Diluir cada cadena liofilitzada d'ARN amb H₂O milliQ lliure de RNases, a una concentració final de 50µM.
2. Barrejar 30µl de cada cadena i afegir 15µl de tampó d' "annealing" 5X.
3. Incubar la barreja en un bany d'aigua a 90-95°C durant 1-2 minuts.
4. Deixar refredar la barreja fins a 30°C a temperatura ambient (45-60 minuts).
5. Aliquotar el siRNA ja hibridat i guardar-lo a -20°C.
(Concentració final dúplex siRNA 20µM)

La transfecció dels dúplexs per a ARN d'interferència es va realitzar en cèl·lules HeLa mitjançant lípids catiónics i en cèl·lules HEK-293 amb fosfat càlcic. El procediment seguit per als dos tipus de transfecció és el següent:

• Transfecció amb Lípids Catiónics



• Transfecció amb Fosfat Càlcic



En la Taula 21 es mostren els dúplexs de siRNA utilitzats en aquest treball i la seva seqüència.

Proteïna diana	Seqüència cadena codificant siRNA (5'-3')
mTOR	CCCUGCCUUUGUCAUGCCUdTdT
S6K1	GGGGGCUAUGGAAAGGUUUdTdT
RSK1	GCUAUACCGUCGUGAGAUCdTdT
HERC1	
Q1	CGGCAUGGAUGAACAAUUdTdT
Q2	GAGCUCCUCUGGGAGAAUdTdT
Q4	GGGCAGAACUUCGUUUAGAdTdT
Q5	UUCUUGAAUGGAUAGAAAUdTdT
HERC2	
1	AGAGGAUAAUUAAACCAAAdTdT
2	GACUGUAGCCAGAUUGAAAdTdT

Taula 21. Seqüències de la cadena codificant dels dúplexs per a siRNA utilitzats. Els siRNAs per a la silenciació de mTOR, S6K1 i RSK1 van ser cedits pel Dr. Sabatini. Els siRNAs per a la silenciació d'HERC1 i HERC2 van ser comprats a QIAGEN i STAB VIDA.

3.7.5 | Activació i inhibició de vies metabòliques

El metabolisme és la suma dels canvis químics que tenen lloc en una cèl·lula que converteixen els nutrients en energia i en altres productes cel·lulars químicament més complexos que permeten a les cèl·lules créixer, reproduir-se, mantenir les seves estructures i respondre a estímuls. Està format per centenars de reaccions enzimàtiques organitzades en diferents vies o rutes metabòliques a través de les quals determinats substrats són transformats en productes, passant per diversos compostos intermediaris. Aquestes reaccions estan altament regulades per tal d'assegurar el manteniment de l'homeòstasi cel·lular.

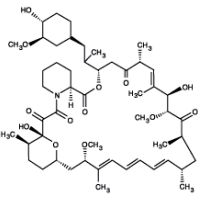
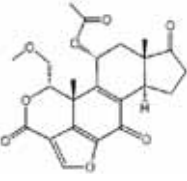
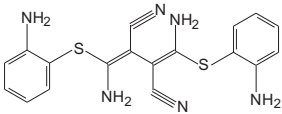
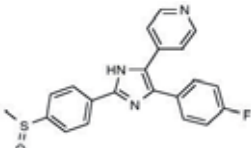
La regulació d'aquestes rutes en la cèl·lula es produeix a través de diferents mecanismes:

- Regulació mitjançant control al·lostèric o modificacions covalents de l'activitat de certs enzims que regulen les etapes limitants d'una via metabòlica (punts de control).
- Regulant la quantitat disponible d'enzims en un moment determinat (a nivell de transcripció, maduració i traducció del seu ADN, degradació de l'enzim, etc.).
- A través de la compartimentació. Les cèl·lules eucariotes contenen diversos compartiments (mitocondris, reticle endoplasmàtic, aparell de golgi, etc.) especialitzats cadascun d'ells en vies metabòliques específiques.

Per a l'estudi de les rutes metabòliques s'utilitzen diverses tècniques multidisciplinàries que actuen perturbant el sistema i posteriorment s'observa com aquest respon a la perturbació. En aquest treball s'han utilitzat activadors i/o inhibidors específics d'enzims reguladors de determinades vies metabòliques, que modifiquen els nivells de determinats intermediaris que posteriorment poden ser detectats (per exemple s'han realitzat anàlisis per PAGE/SD-western blot de formes fosforilades de determinades proteïnes).

Una altra tècnica per a l'estudi de la senyalització de vies metabòliques que s'ha utilitzat ha estat la purificació d'enzims reguladors o d'extractes cel·lulars que contenen aquests enzims a partir de cèl·lules sotmeses prèviament a tractaments que afecten a la via metabòlica d'estudi, per a continuació analitzar la seva activitat (per exemple mitjançant assajos d'activitat quinasa).

En aquest treball s'han estudiat bàsicament dues vies metabòliques de senyalització: la via de mTOR i la via de les MAP kinases Erk i p38. S'han realitzat assajos d'activació d'aquestes vies amb aminoàcids, insulina i/o PMA (veure introducció), utilitzant en alguns casos inhibidors específics com la rapamicina, la wortmannina, l'inhibidor U0126 i l'inhibidor SB203580. En la Taula 22 es mostra l'estructura química d'aquests inhibidors i l'enzim diana sobre el qual actuen.

Rapamicina	Wortmannina	U0126	SB203580
			
- Inhibidor de mTOR (mammalian target of Rapamycin)(Sehgal i Bansback, 1993).	- Inhibidor de les PI3K (fosfoinosítid-3-quinases) (Powis <i>et al.</i> , 1994).	- Inhibidor de la MEK o MAPKK (quinasa de les quinases activades per mitògens)(Favata <i>et al.</i> , 1998).	- Inhibidor de la proteïna quinasa activada per mitògens p38 (MAPK)(Cuenda <i>et al.</i> , 1995).

Taula 22. Estructura química i enzim diana sobre el qual actuen els inhibidors Rapamicina, Wortmannina, U0126 i SB203580.

Per a l'estudi de l'efecte de la silenciament de la proteïna HERC1 sobre el temps de vida mitja de la proteïna de la via de mTORC1, TSC2, s'ha utilitzat el reactiu cicloheximida, un inhibidor de la síntesi de proteïnes en cèl·lules eucariotes sintetitzat per pel bacteri *Streptomyces griseus* i que exerceix el seu efecte bloquejant el pas de la translocació que té lloc en els ribosomes durant la traducció (moviment de

dues molècules de ARN de transferència i de l'ARNm en la seva posició relativa en els ribosomes), impedit l'etapa d'elongació de la nova cadena polipeptídica que s'està generant.

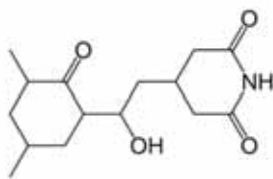


Figura 36. Estructura molecular de l'inhibidor de la síntesi de proteïnes Cicloheximida.

3.7.5.1 | Material i Reactius

- *Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) High glucose* (Gibco) suplementat amb 2mM L-glutamina, 100U/ml penicilina i 100µg/ml estreptomicina (Biological Industries), però sense sèrum.
- *Dulbecco's PBS* (Gibco). Composició (en mg/l): D-glucosa 1000, piruvat sòdic 36, CaCl₂ 100, MgCl₂ 100, KCl 200, KH₂PO₄ 200, NaCl 8000, NaH₂PO₄ 2160.
- Aminoàcids essencials (50X), aminoàcids no essencials (100X) i L-glutamina (100X) (Gibco)(Biological Industries). Les concentracions finals (mg/l) de cada aminoàcid a les quals es va sotmetre les cèl·lules són les següents: L-Arg, 126; L-Cys, 24; L-His, 42; L-Ile, 52; L-Leu, 52; L-Lys, 73; L-Met, 15; L-Phe, 33; L-Thr, 48; L-Trp, 10; L-Tyr, 36; L-Val, 47; L-Ala, 9; L-Asn, 13; L-Asp, 13; L-Glu, 15; Gly, 7; L-Pro, 11; L-Ser, 10; L-Gln, 292.
- Insulina (Sigma) en HCl 5mM, 200nM final.
- PMA (Biomol) 80nM final.
- L-Glutamina (Biological Industries) 10 mM final.
- Glicina (Sigma) a 10 mM final.
- Osmòlits betaïna i àcid γ-amino-n-butíric (AIB) (Sigma) a 10mM final.
- Inhibidors (concentracions finals): 20nM rapamicina (Sigma), 100nm wortmannina (Sigma), 5µM U0126 (Calbiochem), 10µM SB203580 (Calbiochem), 10 µg/ml cicloheximida (Sigma) .

3.7.5.2 | Procediment

Per a l'estudi de la senyalització de les rutes metabòliques de mTOR, ERK i P38 els tractaments realitzats com el dejuni de sèrum, la deprivació i activació amb aminoàcids, i l'activació amb insulina s'han realitzat com ha estat descrit prèviament (Hara *et al.*, 1998; Nobukuni *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2005). L'activació amb PMA es va dur a terme segons el protocol utilitzat per Roux *et al.* (Roux *et al.*, 2007). El tractament amb els osmòlits betaïna i àcid γ-amino-n-butíric (AIB) o amb els aminoàcids glutamina o glicina per separat, es van realitzar a 10mM.

En la Taula 23 s'expliquen els procediments seguits per a la realització dels tractaments esmentats:

Tractament amb aminoàcids o osmolits	Tractament amb Insulina o PMA
<ol style="list-style-type: none"> 1. Dejunar cèl·lules en cultiu amb medi Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) High glucose suplementat amb 2mM L-glutamina, 100U/ml penicilina i 100µgr/ml estreptomina però sense sèrum durant 24 hores. 2. Incubar les cèl·lules amb medi Dulbecco's phosphate-buffered saline (D-PBS) durant 2 hores. 3. Tractar les cèl·lules addicionant al medi D-PBS la barreja d'aminoàcids essencials+aminoàcids no-essencials+L-glutamina a una concentració final 1X o bé amb els osmolits betaína, àcid γ-amino-n-butíric (AIB) o els aminoàcids glutamina i glicina per separat a 10mM final, durant 30 minuts. 4. Processar les cèl·lules per al seu anàlisi (PAGE/SDS-western blot, microscopia). 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Dejunar cèl·lules en cultiu amb medi Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) High glucose suplementat amb 2mM L-glutamina, 100U/ml penicilina i 100µg/ml estreptomina però sense sèrum durant 24 hores. 2. Activació de les cèl·lules addicionant al medi sense sèrum Insulina 200nm o PMA 80nm final. 3. Processar les cèl·lules per al seu anàlisi (PAGE/SDS-western blot).

Taula 23. Procediments per al tractament de cèl·lules HeLa, HEK293 i MCF-7 amb aminoàcids, osmolits, insulina i PMA.

En les condicions on es van utilitzar els inhibidors rapamicina, wortmannina, U0126 i SB203580 aquests es van afegir al medi entre 30 i 60 minuts abans d'estimular les cèl·lules amb aminoàcids o insulina.

El procediment de l'estudi de l'efecte de la silenciació de l'expressió del gen d'HERC1 sobre el temps de vida mitja de proteïnes de la via de mTOR, és el següent:

1. Realitzar la silenciació d'HERC1 en cèl·lules HeLa en cultiu, durant 72 (temps final) (tal com s'ha descrit anteriorment).
2. Realitzar els tractaments amb cicloheximida a 10µgr/ml durant els temps següents 0,2,4,6,8,12,18,24 hores.
3. A les 72 hores de la transfecció dels siRNAs per a HERC1, processar les cèl·lules per al seu anàlisi per PAGE/SDS tal com s'ha descrit anteriorment.

3.7.6 | Assajos amb gens reporters

Es coneixen com a gens reporter aquells gens que codifiquen per algun producte que és fàcil de mesurar i quantificar. L'utilització d'aquests gens permet l'estudi d'un gran nombre de funcions cel·lulars tot i que el seu ús més habitual i per al que s'han utilitzat en aquest treball ha estat el de l'estudi de la regulació de l'expressió de gens el producte dels quals pot ser complex d'estudiar de forma directa.

Per tal que un gen pugui ser utilitzat com a gen reporter ha de complir els següents requisits:

- L'activitat del seu producte ha d'estar disponible immediatament després de la seva traducció sense la necessitat de requerir modificacions post-traduccional.
- La seva quantificació s'ha de poder dur a terme mitjançant un mètode que ofereixi una elevada sensibilitat.
- Les cèl·lules no transfectades amb el gen reporter han de presentar valors nuls d'activitat.
- L'assaig per a la quantificació de la senyal ha de ser el més ràpid possible.

Els gens reporters es preparen mitjançant tècniques d'ADN recombinant, generant una quimera entre la regió reguladora del gen del qual es vol estudiar la seva expressió o regulació i un gen reporter. La transfecció de la construcció resultant en cèl·lules permet l'estudi de la regulació del gen d'interès ja que els factors o condicions que regulen a aquest, afecten també a l'expressió del gen reporter.

Un dels gens que compleix millor aquestes característiques i que s'utilitza freqüentment com a gen reporter en cèl·lules eucariotes és el gen que codifica per a l'enzim luciferasa (*firefly luciferase*) (Wet *et al.*, 1985). Aquesta proteïna té un pes molecular de 61 kDa i catalitza la reacció d'oxidació de la luciferina utilitzant ATP·Mg²⁺ com a cosubstrat i generant un estat excitat del compost oxiluciferina que s'estabilitza ràpidament emetent radiació electromagnètica (REM) (Figura 37).

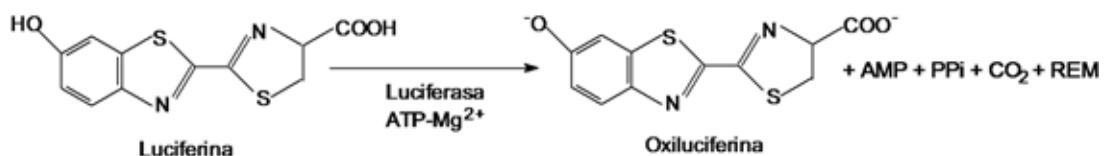


Figura 37. Reacció bioluminiscent de la luciferina catalitzada per l'enzim luciferasa.

En aquest tipus d'experiments és necessari l'utilització d'un segon gen reporter que no es vegi afectat pels factors que regulen el gen d'interès. D'aquesta manera aquest segon reporter permet normalitzar les variacions observades en la quantificació del gen reporter principal respecte a l'eficiència de la transfecció i respecte al nombre de cèl·lules presents en l'extracte cel·lular. Un gen àmpliament utilitzat amb aquesta finalitat és el gen lacZ unit al promotor constitutiu CMV (citomegalovirus). Aquest gen codifica per a la β-Galactosidasa, un enzim que catalitza la descomposició de derivats dels 1,2-dioxetans (anomenats comercialment "Galacton" (Applied Biosystems)) en productes quimioluminiscent que es poden quantificar (Bronstein *et al.*, 1989).

3.7.6.1 | Materials i Reactius

- Cèl·lules HeLa.
- Plasmidis:
 - **pHrd IRES Luc:** Conté el gen que codifica per a la luciferasa sota el control del promotor de l'ADN ribosomal humà amplificat a partir d'ADN genòmic de cèl·lules HeLa. Aquest plasmidi prové del plasmidi pGL3 al qual se li va reemplaçar la seqüència Kozak que dirigeix la transcripció via ARN polimerasa II, per un fragment IRES (*internal ribosome entry site*) amplificat d'un vector pCITE. La seva activitat reflexa únicament la transcripció de l'ARN ribosomal (ARN polimerasa I) i l'efecte de la transcripció de les proteïnes ribosomals (ARN polimerasa II) sobre l'activació del reporter és mínima (figura 38).



Figura 38. Esquema del gen reporter pHrd IRES Luc. Es mostra l'insert afegit al vector pGL3 al qual se li havia reemplaçat prèviament la seqüència Kozak per un fragment IRES.

- **CMV-β-Gal**: Conté el gen que codifica per a la β-Galactosidasa sota el control del promotor CMV.
- **pcDNA3**: plàsmid buit.
- Lipofectamina 2000 (Invitrogen).
- PBS 1X.
- **Kit per a la detecció de l'activitat Luciferasa (Promega)**. Conté el tampó de llisi 5X i el substrat de la luciferasa, luciferina.
- **Kit per a la detecció de l'activitat Galactosidasa (Applied Biosystems)**. Conté el substrat per a la Galactosidasa i el tampó adequat per què es produeixi la reacció luminiscent.
- Luminòmetre.

3.7.6.2 | Procediment

Els experiments d'utilització de gens reporters es van realitzar per a l'estudi de l'efecte de la silenciació de HERC1 sobre la transcripció de l'ADN ribosomal. siRNAs contra la proteïna HERC1 es van transfectar en cèl·lules HeLa mitjançant *Lipofectamin 2000* (100pmols/well placa de 6 wells). A les 24 hores es va canviar el medi de cultiu per medi complet fresc, i a les 48 hores es van transfectar els plasmidis pHrd IRES Luc i β-Gal mitjançant Lipofectamina 2000 (*Invitrogen*). Per a un cultiu de cèl·lules HeLa en una placa de 6 wells es va transfectar 4 µg d'ADN total: 1µg pHrd IRES Luc+400ng CMV-βGal+2,6µg pcDNA3.

A les 72 hores es va fer un triplicat de cada cultiu en plaques de 24 wells, i un cop les cèl·lules tornaven a estar adherides a la placa de cultiu es van lliar i es va quantificar l'activitat Luciferasa i β-Galactosidasa dels extractes cel·lulars mitjançant la lectura de la REM emesa (luminòmetre). En la Taula 24 s'ha resumit el procediment seguit per a la mesura d'aquestes activitats amb els kits comercials de *Promega* i d'*Applied Biosystems*.

Activitat Luciferasa (Promega)	Activitat β-Galactosidasa (Applied Biosystems)
<ul style="list-style-type: none"> - Rentar cèl·lules amb PBS fred dues vegades. - Afegir 100µl tampó de llisi 1X/well (placa 24 wells). - Agitar placa 10 minuts a temperatura ambient. - Per cada well barrejar en un eppendorf 50µl lliat + 50µl substrat luciferasa diluït en H₂O a la meitat. - Llegir al luminòmetre la llum emesa durant 15 segons/eppendorf. - Guardar les plaques a 4°C fins a la lectura de l'activitat β-Galactosidasa. 	<ul style="list-style-type: none"> - Per cada well de la placa de 24 wells que s'ha lliat per a la mesura de l'activitat luciferasa, barrejar en un eppendorf 20µl lliat+2µl substrat βGal+98µl tampó. - Tapar els eppendorfs amb paper de plata per evitar contacte amb la llum i deixar reposar a temperatura ambient durant 1 hora. - Llegir al luminòmetre la llum emesa durant 15 segons/eppendorf.

Taula 24. Procediments per a la mesura de l'activitat luciferasa i β-Galactosidasa.

3.7.7 | RT-PCR a temps real

L'extracció d'ARN total a partir de cèl·lules en cultiu sotmeses prèviament a algun tractament i el posterior anàlisi d'ARNs específics continguts en aquests extractes totals utilitzant tècniques com el Northern blot o la reacció en cadena de la polimerasa a temps real amb transcriptasa reversa (RT-PCR a temps real), permet l'estudi i quantificació dels gens que expressa una cèl·lula en un moment

determinat del seu cycle vital i en unes determinades condicions. Per l'estudi de l'efecte de la silenciació de la proteïna HERC1 sobre la transcripció de l'ADN ribosomal es va utilitzar la tècnica de la RT-PCR a temps real.

- **Extracció d'ARN total**

Per a l'extracció d'ARN total a partir de cèl·lules a les quals s'havia silenciats prèviament l'expressió del gen d'HERC1 mitjançant ARN d'interferència, es va utilitzar el kit comercial Ultraspect RNA isolation (Biotech) que es basa en el mètode descrit per Chomczynski *et al.*, a l'any 1987. Aquest mètode es basa en la separació en dues fases (fase aquosa i fase orgànica) que té lloc quan es centrifuga una barreja d'una dissolució de fenol saturat en aigua i cloroform, i en les diferències de solubilitat en dissolvents orgànics que existeixen entre proteïnes, lípids, ADN i ARN.

Quan es llisten les cèl·lules i es tracten amb una dissolució de fenol saturat en aigua a pH àcid i en presència de l'agent caotrópic tiocianat de guanidini (inhibeix també les ARNases), els lípids es solubilitzen en la fase orgànica (fenol) però l'ARN, les proteïnes desnaturalitzades i l'ADN al ser més solubles en la fase aquosa es queden en l'interfase. Quan s'addiciona cloroform i es centrifuga la barreja, les dues fases es separen i es pot recuperar la fase aquosa que conté l'ARN (fase superior).

A continuació s'afegeix isopropanol (soluble en aigua) que competeix amb l'ARN per les aigües de solvatació fent que l'ARN precipiti. El precipitat es renta amb etanol aquós per acabar d'extreure impureses que puguin haver passat a la fase aquosa, i finalment es resuspèn amb H₂O-DEPC. La quantificació d'ARN es pot fer de forma ràpida llegint l'absorbància a 260nm (a l'igual que els àcids nucleics les seves bases nitrogenades absorbeixen a aquesta longitud d'ona) però tenint en compte que l'ARN a l'igual que l'ADN monocadena absorbeix més que l'ADN de doble cadena degut a l'efecte hipercròmic (augment d'absorbància que experimenten els àcids nucleics quan es desnaturalitzen causat pel menor apilament de les seves bases nitrogenades).

Per a quantificar i avaluar la qualitat d'una purificació d'ARN a partir de la seva absorbància a 260 i a 280 cal tenir en compte el següent:

- Una dissolució de **40µg/ml** absorbeix **1 unitat de densitat òptica (UDO)** a 260nm.
- Valors del quocient de l'absorbància a 260nm respecte l'absorbància a 280nm entre 1,8 i 2 indiquen ARN de bona puresa.

- **Obtenció de cDNAs. retro-transcripció**

Una manera d'analitzar els ARN continguts en un extracte d'ARN total consisteix en transformar-los als seus corresponents cDNAs i amplificar mitjançant la reacció en cadena de la polimerasa (PCR) amb oligonucleòtids específics aquells que corresponen als gens dels quals que es vol estudiar la seva expressió.

El procés de transformació dels ARNs a ADNs o retro-transcripció va ser descrit al 1970 per Baltimore i Temim gràcies al descobriment en determinats virus de la retrotranscriptasa o transcriptasa reversa, un descobriment els hi va valer el premi nobel de medicina a l'any 1975 (Baltimore i Temim, 1970).

Aquests virus (retrovirus) pertanyen a una família de virus d'ARN que gràcies a la transcriptasa reversa són capaços d'integrar el seu genoma en els cromosomes d'organismes superiors ja que aquest enzim els permet transformar el seu ARN en ADN el qual es pot integrar en els cromosomes de la cèl·lula que han infectat i aprofitar la maquinària de transcripció i traducció d'aquestes per sintetitzar les proteïnes de la seva càpside i poder acoblar noves partícules víriques. La purificació de retrotranscriptases inverses a partir d'aquests virus ha permès desenvolupar mètodes per a la realització de la reacció de retro-transcripció *in vitro*. Comercialment les retrotranscriptases s'obtenen a partir de purificacions de dos retrovirus, el virus de la leucèmia murina de "moloney" i el virus de la mieloblastosis aviar, o bé a partir de l'expressió en *E. coli* de formes recombinants de l'enzim.

Per poder iniciar la reacció de retro-transcripció *in vitro* és necessari un "primer" o encebador. El mètode clàssic de síntesi de cDNA utilitza com a encebador un oligo-dT per a la retro-transcripció de mARNs que posseeixen cues de poli adenina (cues poli A). Aquest encebador s'uneix a l'extrem 3' dels ARNs monocadena marcant l'inici de la síntesi del cDNA. Un altre tipus d'encebador utilitzat són els anomenats "random hexamer primers" que estan constituïts per una barreja de hexanucleòtids monocatenaris d'ADN que representen totes les possibles seqüències d'un hexàmer i que contenen els grups hidroxil als extrems 5' i 3' de manera que s'uneixen de forma aleatòria a punts interns de les molècules d'ARN permetent la retro-transcripció de tots els tipus d'ARN: ARNs missatgers (ARNm), ARNs de transferència (ARNt) i ARNs ribosomal (ARNr).

La qualitat de la purificació d'ARN obtinguda és crítica per obtenir bones reaccions de retrotranscripció i bones PCRs o PCRs a temps real.

- **Reacció en cadena de la polimerasa a temps real (PCR real time)**

La reacció en cadena de la polimerasa clàssica (PCR) és un mètode que permet amplificar de forma selectiva seqüències específiques d'ADN. Concebuda pel Dr. Kerry Mullis *et al.* a l'any 1986, es basa en la capacitat natural dels enzims ADN polimerasa per replicar l'ADN. D'aquesta manera, si es barreja *in vitro* en un tampó amb magnesi un ADN motlle, una barreja de deoxiribonucleòtids (dNTPs), els encebadors adequats per a la seqüència d'ADN que es vol amplificar i una ADN polimerasa resistent a la temperatura (Taq polimerasa) i es col·loca la barreja en un termociclador (que genera de forma alternant cicles de temperatures altes i baixes) les dues cadenes d'ADN sintetitzades es poden deshibridar i unir-se a l'ADN polimerasa que realitza una nova etapa de replicació. Aquest procés es repeteix successivament de manera que la quantitat d'ADN va augmentant de forma exponencial fins que es comencen a esgotar els substrat i l'eficiència de l'enzim disminueix (fase plateau)(Figura 39).

Els productes de la PCR es solen analitzar en gels d'agarosa bromur-d'etidi. Aquest sistema de detecció permet únicament un anàlisi semiquantitatiu dels resultats degut a la baixa sensibilitat de la fluorescència del bromur d'etidi i al fet que la seva senyal és poc quantitativa. A més a més, l'anàlisi en gels d'agarosa es fa en el punt final de la reacció de PCR que és l'etapa de l'amplificació que presenta més baixa sensibilitat i precisió. Per tant, en la majoria de casos la quantitat de producte de PCR final no està estrictament relacionada amb la quantitat inicial d'ADN motlle.

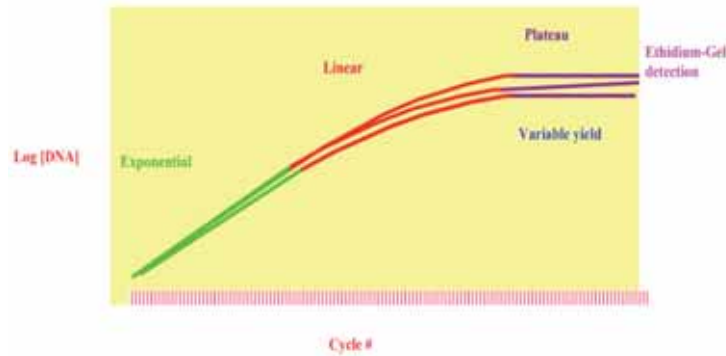


Figura 39. Etapes de l'amplificació de la reacció en cadena de la polimerasa (PCR). Es representa la quantitat d'ADN en forma logarítmica enfront del cicle de la PCR per a tres rèpliques hipotètiques d'una mateixa mostra amb igual quantitat d'ADN inicial.

Durant la fase exponencial la quantitat de ADN es duplica en cada cicle però a mesura que es van consumint els reactius l'eficiència de l'amplificació comença a disminuir i les quantitats d'ADN per a les tres rèpliques comencen a divergir durant l'etapa lineal. Cada rèplica arriba a la fase plateau a un cicle diferent degut a petites diferències en la cinètica de l'amplificació en cada tub de PCR (adaptat d'Applied Biosystems).

Per aquest motiu quan es vol analitzar de forma quantitativa una seqüència d'ADN o bé diferències en l'expressió de gens a partir dels seus cDNAs per exemple, la PCR clàssica no és un mètode útil i s'han d'utilitzar altres tècniques.

Aquesta limitació en la quantificació de la PCR tradicional es va començar a resoldre al 1992 per Higuchi *et al.*, amb l'addició de bromur d'etidi a la barreja de PCR que permetia seguir la quantitat d'ADN de doble cadena generat mitjançant la senyal de fluorescència que emetia el bromur d'etidi intercalat a l'ADN. Posteriorment, l'ús de fluoròfors més sensibles i específics va permetre l'aparició de la PCR a temps real tal i com es coneix avui en dia.

La PCR a temps real permet avaluar la quantitat d'ADN durant la fase exponencial de l'amplificació amb les avantatges en precisió i sensibilitat que això comporta. A diferència de la PCR tradicional, a part dels encebadors s'utilitzen sondes fluorescentes que emeten un senyal que és proporcional a la quantitat d'ADN present en el tub de PCR durant tota la reacció d'amplificació. En l'actualitat existeixen dos grans tipus de sondes per a PCR a temps real, les sondes *SYBR-green* i les sondes *Taqman* que són les que s'han utilitzat en aquest treball.

Les sondes *Taqman* estan constituïdes per fragments de 18 a 22 parells de bases d'ADN monocatenari que contenen una seqüència específica que els permet hibridar-se amb la zona que es vol amplificar de l'ADN motlle. A més a més, contenen un fluoròfor en l'extrem 5' i un "quencher" en l'extrem 3' de manera que quan s'exitja el fluoròfor amb una radiació de longitud d'ona determinada, l'emissió de radiació que emet el fluoròfor és anulada pel "quencher" degut al fenomen FRET (*fluorescent resonance energy transfer*), un fenomen que es basa en la transferència energètica de fluorescència per ressonància que té lloc de forma espontània entre un compost en un estat energètic elevat i un compost en un estat energètic baix, quan es troben suficientment propers en l'espai.

Durant l'etapa d'elongació de la PCR, i gràcies a l'activitat 5' exonucleasa de l'ADN polimerasa, la sonda és degradada, de manera que el fluoròfor i el quencher es separen en l'espai impossibilitant que tingui lloc el fenomen FRET. En aquesta situació, l'intensitat de fluorescència del reporter en el tub de PCR s'incrementa (Figura 40).

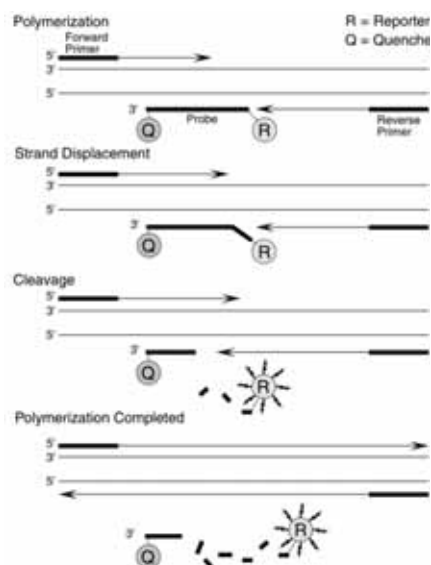


Figura 40. Esquema del mecanisme de les sondes Taqman per a PCR a temps real (adaptat d'Applied Biosystems).

Aquest procés es repeteix en cada cicle de manera que la senyal detectada en cada moment és proporcional a la quantitat d'ADN amplificat. A més a més, l'especificitat de la sonda permet que aquest senyal no es vegi afectat per amplifacions inespecífiques d'altres seqüències d'ADN que puguin tenir lloc al mateix temps.

Si es representa l'intensitat de fluorescència en escala logarítmica enfront els cicles de la PCR, a temps real, s'obtenen corbes com les de la Figura 41, que permeten establir una línia base o "treshold" que separa els valors de fons de fluorescència dels valors reals deguts a l'amplificació de l'ADN. Aquesta línia es calcula teòricament com a 10 vegades la desviació estàndard de la mitjana del soroll de fons tot i que a la pràctica es pot ajustar experimentalment. A partir d'aquesta línia base es defineixen els Ct.

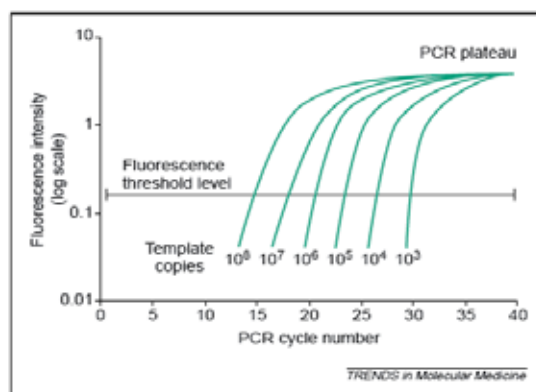


Figura 41. Corbes d'amplificació del gen de la β -actina per a diferents quantitats inicials d'ADN mitjançant PCR a temps real. Es representa el logaritme de l'intensitat de la fluorescència respecte el cicle de la PCR. Es mostra també la línia base o treshold de la reacció (adaptat de Mocellin *et al.*, 2003).

Es defineix com a **Ct** d'una mostra de PCR a temps real com la fracció de cicle de la PCR en el qual l'intensitat de la senyal de fluorescència és més gran que el mínim de detecció de l'aparell. Correspon a la fracció de cicle de PCR on es produeix l'intersecció de la línia de base i la corba

d'amplificació. A partir dels valors Ct del gen d'interès i els valors Ct d'un control endogen per una mateixa mostra i mitjançant el mètode de la corba estàndard o el mètode del $\Delta\Delta C_t$ es poden calcular les quantitats inicials relatives d'ADN o cADN motlle. Com a controls endògens s'utilitzen habitualment gens d'expressió elevada que no varien en les diferents condicions o tractaments de les cèl·lules en les que es vol fer l'estudi com ara gens del tipus *housekeeping*.

3.7.7.1 | Materials i Reactius

En la Taula 25 es mostren els materials i reactius per a la extracció d'ARN, les reaccions de retro-transcripció i la PCR a temps real.

Extracció d'ARN (Biotech)	Retrotranscripció (Applied Biosystems)	PCR a temps real (Applied Biosystems)
<ul style="list-style-type: none"> - Ultraspec. - Aigua DEPC estèril. - Cloroform pur (MERCK). - Isopropanol pur (MERCK). - Etanol 70% en aigua DEPC. - Centrifuga per a eppendorfs. - Espectrofotòmetre amb làmpada per llegir a la zona de l'UV o Nanodrop. 	<ul style="list-style-type: none"> - Tampó de retro-transcripció 10X. - "Random primers" 10X (Random Hexàmer). - dNTP mix (10mM) 10X. - Transcriptasa Reversa 50U/μl. - Termociclador. 	<ul style="list-style-type: none"> - "TaqMan gene expression assay" 20X per a la detecció de RNAr 18S eucariota (Assay ID Hs99999901_s1). - "TaqMan gene expression assay" per a la detecció de la GAPDH humana (Assay ID Hs99999905_m1). (contenen els oligonucleòtids a 18μM i la sonda amb el fluoròfor FAM en 5' i un "quencher" NFO no fluorescent en 3'a 5μM). - TaqMan Universal PCR master mix. - H₂O milliQ estèril. - Plaques per a PCR a temps real: Micro Amp Optical 96 wells reaction plate. - Centrifuga de plaques. - ABI PRISM 7700 Sequence Detection System.

Taula 25. Materials i reactius per a la realització de la RT-PCR a temps real.

3.7.7.2 | Procediment

• Extracció d'ARN

Per a l'extracció d'ARN és molt important treballar amb tot el material estèril i utilitzar guants durant tot el procediment per evitar l'acció de les ARNases. També cal mantenir les mostres en gel en tot moment.

Les extraccions d'ARN es van realitzar a partir de cèl·lules HeLa cultivades en plaques de 6 wells a les quals s'havia realitzat prèviament la silenciament d'HERC1 mitjançant siRNA. Els volums utilitzats en el procediment d'extracció d'ARN que es detalla a continuació corresponen als volums necessaris per un cultiu cel·lular en 1 well d'una placa de 6 wells.

1. Col·locar les plaques dels cultius cel·lulars en gel.
2. Rentar les cèl·lules dues vegades amb 2ml de PBS estèril fred.

3. Afegir 0,5 ml d'Ultraspec (Biotech) prèviament atemperat i ben barrejat (en la campana d'extracció de gasos) i deixar-lo actuar durant 5 minuts agitant suaument les plaques de tant en tant.
4. Repartir l'Ultraspec per tota la superfície del well aspirant-lo i tornant-lo a dipositar al well varies vegades amb la pipeta. Transferir-lo a eppendorfs freds.
5. Afegir 100µl de cloroform, barrejar bé (vòrtex) i deixar reposar durant 5 minuts en gel.
6. Centrifugar a 9000g durant 20 minuts. Recuperar la fase superior amb cura de no agafar gens d'interfase.
7. Afegir 0,8 volums del volum recuperat de la fase superior, d'isopropanol fred. Barrejar i col·locar els eppendorfs a -20°C durant 30 minuts.
8. Centrifugar els eppendorfs a 18000g durant 30 minuts a 4°C.
9. Eliminar l'isopropanol per decantació o aspiració (amb cura de no emportar-nos el pellet).
10. Rentar el pellet afegint 0,5ml d'etanol al 70% en H₂O DEPC freda. Es pot utilitzar el vòrtex per fer saltar el pellet.
11. Centrifugar a 18000g durant 3 minuts a 4°C.
12. Eliminar l'etanol i deixar assecar completament el pellet.
13. Resuspendre el pellet en 15µl d'H₂O DEPC. Escalfar a 55-60°C durant 5-10 minuts.
14. Deixar refredar fins a temperatura ambient i mesurar l'absorbància de les purificacions a 260 i a 280nm utilitzant l'espectrofotòmetre o el nanodrop. Determinar la concentració i la ratio 260/280 tenint en compte que:
 - Una dissolució d'ARN **40µg/ml** absorbeix **1 unitat de densitat òptica** (UDO) a 260nm.
 - Una ratio 260/280 per sobre d'**1,8** indica ARN poc contaminat per altres compostos.
15. Guardar les mostres a -80°C.

• Obtenció de cDNAs. retro-transcripció

Les reaccions de retro-transcripció a partir d'extractes d'ARN total es van realitzar amb el kit *High-Capacity c-DNA Reverse Transcription* (Applied Biosystems) utilitzant com a encebador un random hexàmer. Per a cada reacció de retro-transcripció es prepara la següent barreja en un tub per a PCR seguint el mateix ordre de la Taula 26:

Components	Volum (µl)
H ₂ O milliQ estèril (lliure de ARNases)	La necessària per arribar a 20
Tampó de retro-transcripció 10X	2,0
dNTP mix (10mM) 10X	0,8
"Random primers" 10X	2,0
Transcriptasa Reversa 50U/µl.	1,0
ARN	2 µg
TOTAL	20

Taula 26. Components i quantitats necessàries per a la reacció de retro-transcripció d'una mostra d'ARN total (Applied Biosystems).

Tot seguit es col·loquen els tubs de PCR al termociclador i s'inicia el següent programa de temps i temperatures per a la reacció de retro-transcripció:

	ETAPA 1	ETAPA 2	ETAPA 3	ETAPA 4
Temperatura	25°C	37°C	85°C	4°C
Temps	10min	120min	3seg	∞

Finalment es guarden el cDNAs a -80°C fins a la seva utilització.

• **Reacció en cadena de la polimerasa a temps real (PCR Real time)**

A continuació es detalla el protocol seguit per a l'anàlisi mitjançant PCR a temps real de l'expressió del gen 18S eucariota a partir de cADNs obtinguts de llisats de cèl·lules HeLa sotmeses prèviament a la silenciació del gen d'HERC1. Com a control endogen es va utilitzar el gen de la GAPDH humana (gliceraldehid 3-fosfat deshidrogenasa). Les PCRs es van realitzar en plaques de 96 wells fent duplicats o triplicats per a cada mostra a analitzar. Els volums que s'indiquen fan referència als volums necessaris per un well.

1. Diluir els cDNAs 1000 vegades en H₂O milliQ estèril.
2. Per cada rèplica de cada mostra carregar les següents barreges en dos wells (un per l'amplificació del 18S i un altre per a l'amplificació del GAPDH):
 - **18S:** 8,2 µl H₂O + 0,8 µl cDNA (1/1000) + 1 µl "gene expression assay" 18S + 10 µl *TaqMan Universal PCR master mix (2X)*(Vf=20µl).
 - **GAPDH:** 8,2 µl H₂O + 0,8 µl cDNA (1/1000) + 1 µl "gene expression assay" GAPDH + 10 µl *TaqMan Universal PCR master mix (2X)*(Vf=20µl).

(a la pràctica és preparen tres pre-mixs, una per cada cDNA amb l'aigua (tant per les rèpliques per a l'amplificació del gen 18S com per a les de l'amplificació del gen GAPDH), una altre amb els oligonucleòtids 18S amb la Taq-polimerasa, i una darrera amb els oligonucleòtids per a la GAPDH i la Taq-polimerasa)

3. Tapar la placa de PCR amb els tacs corresponents. Assegurant-nos que queden tots ben posats ja que la radiació de fluorescència emesa és mesurada per aquesta zona en l'aparell de PCR.
4. Embolicar la placa amb paper de plata per evitar el contacte amb el llum, ja que aquesta afecta negativament als fluoròfors de les sondes.
5. Centrifugar la placa 1 minut a 1200 rpm per fer baixar el contingut dels pous al fons i per eliminar possibles bombolles.
6. Col·locar la placa a l'aparell per a PCR a temps real *ABI PRISM_7700 Sequence Detection System*. Fer la plantilla i ajustar les condicions de tipus de suport, tipus de fluoròfors de les sondes, etc. amb el programa SDS 1.9.
7. Iniciar la PCR. Per a una reacció de PCR a temps real estàndard i per tots els aparells de PCR d'Applied Biosystems les rampes de temperatura que es fan servir normalment són les següents:
 - 2 minuts a 50°C.
 - 10 minuts a 95°C. (Activació Taq Polimerasa)
 - 40 cicles:
 - 15 segons a 95°C (desnaturalització).
 - 1 minut a 60°C (anellament/extensió).
 - ∞, 4°C.

8. Analitzar els resultats. Ajustar la línia de base i grabar els resultats dels valors Ct per a cada rèplica de cada mostra.
9. Calcular les quantitats relatives del gen d'interès a partir de les mitjanes dels valors Ct de cada rèplica per cada mostra i per al control endogen mitjançant el mètode de la corba estàndard si és el primer cop que es fa l'experiment, o amb el mètode del $\Delta\Delta Ct$ si aquest ja ha estat validat anteriorment.

3.7.8 | Purificació de proteïnes i Assaigs quinasas

• Purificació de proteïnes

Una de les primeres etapes presents en moltes tècniques de proteòmica consisteix en l'aïllament o purificació de proteïnes. Per a l'obtenció de grans quantitats de la proteïna d'interès i bons rendiments, habitualment s'utilitzen tècniques d'ADN recombinant i la transformació de bacteris. Una de les soques bacterianes més populars que s'utilitzen com a cèl·lules hostatjadores per a l'expressió heteròloga de proteïnes de mamífers és la soca d'*E. coli* BL21 i derivats (Stratagene) que presenten la característica que són deficientes per als gens *Lon* i *ompT* que codifiquen per a dues de les proteases més abundants en *E. coli*: la primera és una proteïna de la família de les proteïnes heat shock amb activitat proteolítica que catalitza el trencament de proteïnes danyades i proteïnes recombinants (Phillips *et al.*, 1984) i la segona és una proteasa de la membrana externa que catalitza la proteòlisi de l'ARN polimerasa T7 i de proteïnes recombinants durant la purificació (Grodberg i Dunn, 1988).

Existeixen molts sistemes de purificació de proteïnes, la majoria d'ells basats en quatre etapes: llisi cel·lular, unió a una matriu, rentat i elució.

Per a la llisi cel·lular existeixen mètodes enzimàtics com l'ús del lisozim que és capaç d'hidrolitzar els enllaços glucosídics dels polisacàrids de la paret cel·lular d'alguns bacteris, i mètodes no enzimàtics com l'ús de detergents i ultrasons (sonicació) a través dels quals també s'aconsegueix la ruptura dels bacteris i l'alliberament del seu contingut a l'exterior.

Una estratègia que facilita la separació de la proteïna que es vol purificar de la resta del llisat bacterià consisteix en afegir-li un "tag" (o etiqueta) mitjançant tècniques d'ADN recombinant, que permet la unió de la proteïna que es vol purificar, a determinats grups químics amb afinitat per als diferents "tags" (revisat per Nilsson *et al.*, 1997).

Existeixen diversos "tags" d'afinitat desenvolupats amb aquest objectiu, que consisteixen en polipèptids, proteïnes petites o enzims, que es fusionen a l'extrem C o N terminal de les proteïnes recombinants que es vol purificar, mitjançant la subclonació del seu cDNA en vectors d'expressió que inclouen aquests "tags" (revisat per Terpe, 2003).

Un cop la proteïna recombinant s'ha expressat, es llisen els bacteris i s'incuba el llisat amb una resina d'agarosa que conté grups químics o pèptids específics que presenten afinitat per al "tag" de la proteïna que es vol purificar. Un cop s'ha produït l'interacció entre el "tag" de la proteïna de fusió i el grup químic de la resina, es fa baixar aquest complex mitjançant una etapa de centrifugació que permet separar-lo de la resta de proteïnes del llisat. Seguidament es realitza una etapa de rentat per eliminar les proteïnes que es poden haver unit de forma inespecífica a la resina, i finalment i si és necessari, es pot separar la proteïna d'interès de la resina utilitzant diferents estratègies en funció de la naturalesa de l'interacció del "tag" amb els grups funcionals de la resina, com per exemple realitzant variacions del pH

que afecten a la força d'aquesta interacció, utilitzant reactius en excés que competeixen amb les proteïnes de fusió pels grups químics de la resina, o bé amb reactius que modifiquen químicament els grups funcionals de la resina fent que perdin la seva afinitat per els "tags".

Quan la proteïna de fusió presenta diferències d'antigenicitat, activitat enzimàtica, d'unió a altres proteïnes, etc., respecte a la proteïna nativa (no "taggada"), és possible eliminar aquest "tag" després de la purificació mitjançant l'incubació amb proteases específiques que tallen la proteïna de fusió per la zona entre el "tag" i la proteïna, gràcies a l'incorporació en el vector d'expressió de seqüències específiques diana per a determinades proteases.

En la purificació de la S6 i la p85 S6K1 per al seu ús com a substrat pels assaigs quinasa de les proteïnes RSK i mTOR, es van transformar soques BL21 d'*E. coli* amb vectors d'expressió pGEX (incorporen els "tags" d'afinitat Glutatió-S-transferasa (GST)) que contenen els inserts corresponents per a l'expressió d'aquestes proteïnes. La resina que es va utilitzar per a la separació de les proteïnes de la resta del llistat va ser la *Glutathione Sepharose 4B* (GE Healthcare) que conté grups glutatió (GSH) conjugats a una matriu insoluble d'agarosa. Les GST presenten una forta afinitat pel tripèptid glutatió (GSH) (Smith i Johnson, 1988), un pèptid de 26 kDa format pels aminoàcids glicina, àcid glutàmic i cisteïna amb la peculiaritat que l'enllaç peptídic entre l'àcid glutàmic i la cisteïna es produeix a través del grup carboxil γ de l'àcid glutàmic enlloc de l' α (Figura 42).

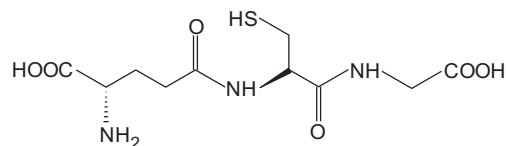


Figura 42. Estructura química del glutatió (GSH) o γ -glutamilcisteïnilglicina.

Les glutatió-S-transferases constitueixen una família d'enzims citosòlics multifuncionals presents en els organismes eucariotes (Mannervik i Danielson, 1988) que catalitzen la conjugació del grup glutatió a diferents compostos. Normalment no es troben en els bacteris lo qual s'aprofita per a la purificació de proteïnes, ja que les proteïnes bacterianes no competeixen amb la proteïnes d'interès "taggades" amb GST per unir-se a la resina. A més a més, les GST augmenten la solubilitat de moltes proteïnes eucariotes expressades en bacteris.

Una vegada les proteïnes de fusió s'han separat de la resta de les proteïnes del llistat bacterià es poden l'eluir de la resina glutatió incubant-les amb un excés de glutatió reduït que permet desplaçar les GST dels grups glutatió de la resina. Aquest tractament es pot dur a terme en condicions no desnaturant que permeten preservar l'antigenicitat i funcionalitat de les proteïnes.

Per a l'eliminació del "tag" ("cleavage"), es pot realitzar una digestió amb la proteasa trombina que reconeix una seqüència que es troba anterior al lloc de clonatge dels vectors pGEX, és a dir entre el gen de la GST i el gen de la proteïna d'interès.

• Assaigs quinasa

Les proteïnes quinasa són enzims capaços de modificar altres proteïnes (a més de lípids, hidrats de carboni, aminoàcids, i nucleòtids entre d'altres) transferint un o varis grups fosfat (PO_4^{3-}) a residus específics de les seves proteïnes diana (fosforilació). Aquest procés implica modificacions funcionals de les proteïnes com canvis en la seva localització subcel·lular, canvis en la seva associació amb altres proteïnes o canvis en la seva activitat. Mitjançant aquesta propietat, les proteïnes quinasa regulen un gran nombre de vies de senyalització metabòlica.

Els subministradors dels grups fosfat transferits per les proteïnes quinasa són les molècules d'adenosina tri-fosfat (ATP). Mitjançant el trencament d'un dels seus enllaços rics en energia adenosina-fosfat, les molècules d'ATP aporten l'energia necessària per a la formació del nou enllaç covalent que es produeix entre un grup hidroxil lliure d'un residu de la proteïna diana i el grup fosfat. Les proteïnes quinasa es poden classificar en funció del tipus de residu sobre el qual actuen específicament, com a tirosina quinases, serina/treonina quinases o histidina quinases entre d'altres.

Degut al seu paper crític en la regulació de les vies de senyalització, les proteïnes quinasa juntament amb la família de proteïnes fosfatasa (que catalitzen el mateix procés en sentit invers), es troben altament regulades en les cèl·lules mitjançant la seva pròpia fosforilació (autofosforilació), a través d'altres proteïnes quinasa o fosfatasa que actuen sobre elles activant-les o inhibint-les, o bé controlant la seva localització subcel·lular i afavorint o evitant el retrobament amb les seves proteïnes diana.

Una de les estratègies per a l'estudi de la senyalització de les rutes metabòliques consisteix en la purificació d'enzims reguladors o d'extractes cel·lulars que contenen aquests enzims a partir de cèl·lules sotmeses prèviament a tractaments que alteren la via metabòlica que es vol estudiar, per a continuació analitzar la variació de l'activitat d'aquests enzims.

En aquesta tesis s'han estudiat bàsicament dues vies metabòliques de senyalització: la via de mTOR i la via de les MAP kinases Erk i p38. Per observar l'efecte de l'activació d'aquestes quinases amb aminoàcids s'han realitzat assaigs quinasa basats en els protocols de Roux i col·laboradors (Roux *et al.*, 2007) per a la RSK, i Ali i Sabatini (Ali i Sabatini, 2005) per als de mTOR. Aquests procediments són aplicables únicament en assaigs en els quals la proteïna quinasa no requereix de la presència de cofactors solubles per a la seva activitat ja que aquests es poden perdre durant les etapes de rentat.

Aquests experiments van consistir en l'incubació dels immunoprecipitats de RSK i mTOR (obtinguts a partir de cèl·lules HEK293 i HEK 293T activades prèviament amb aminoàcids) amb substrats purificats d'aquestes quinases com la proteïna ribosomal S6 o la seva quinasa p85 S6K1, a 30 i 37°C respectivament durant 15 minuts i en presència o absència d'ATP. Després es va analitzar de forma indirecta l'activitat relativa de les quinases immunoprecipitades a través de l'anàlisi del grau de fosforilació dels substrats corresponents mitjançant PAGE/SDS i western blot utilitzant anticossos específics per a les formes fosforilades dels substrats.

3.7.8.1 | Materials i Reactius

Purificació proteïnes de fusió a GST	Assaigs quinasa RSK i mTOR
<ul style="list-style-type: none"> - Plasmidis d'expressió en procariotes pGEX fusionats en pauta amb el cADN per a la proteïna que es vol obtenir (p85 S6K1 i S6 (32 aminoàcids extrem C terminal que conté els residus fosforilables S235/S236). - Soca BL21 d'<i>E. coli</i>. - Reactius per a la transformació de bacteris (veure apartat 3.6). - LB amb ampicilina a 50µgr/ml final. - Incubador de bacteris. - Espectrofotòmetre. - Isopropil -β - D-1-tiogalactopiranosid (IPTG) 0,3mM final (sigma). - Tampó de lisis: 20mM tris-HCl pH=7,5; 150mM NaCl, 20mM EDTA, 5mM DTT, 1 mM vanadat sòdic, 1 mM PMSF, 5 µg/ml leupeptina, 5 µg/ml aprotinina, 1 µg/ml pepstatina A, 100 µg/ml benzamidina (i afegit després de sonicar 1% Tritó X-100). - Sonicador (Branson Sonifier 250). - Tampó de mostra 4X: final: 62,5mM tris-HCl pH=6,8; 2% SDS, 10% glicerol, 0,1M DTT, 0,001% blau de bromofenol. - Resina Glutathione-Sepharosa 4B (Amersham Biosciences). - BSA i reactius per a PAGE/SDS (per a la quantificació i anàlisi de la purificació). 	<ul style="list-style-type: none"> - Tampó per a l'assaig quinasa de RSK: 30mM tris-HCl pH=7,5; 10mM MgCl₂ amb i sense glicerol al 15% (i 1mM DTT afegit només per l'assaig quinasa). - Tampó per a l'assaig quinasa mTOR: 25mM Hepes-KOH pH=7,5; 100mM CH₃COOK, 1mM MgCl₂ amb i sense glicerol al 15% (i 1mM DTT afegit només per a l'assaig quinasa). - Substrats GST-S6 (extrem Ct) i GST-HA-P85-S6K1 purificats. - Immunoprecipitats RSK i mTOR. - ATP 500 µM final. - Bany de temperatura. - Tampó de mostra 4X: final: 62,5mM tris-HCl PH=6,8; 2% SDS, 10% glicerol, 0,1M DTT, 0,001% blau de bromofenol. - Reactius per a LAG gel. - Reactius per a western blot. (Anticossos primaris: anti mTOR, anti P-S235/236-S6, anti TSC1 i anti P-T389-S6K1 (1A5) (Cell Signalling Technology), anti RSK (C-21) i anti TSC2 (C-20)(Santa Cruz Biotechnology), anti HA i anti GST (Sigma)).

Taula 27. Materials i reactius per als experiments de purificació de proteïnes de fusió a GST i per als assaigs quinasa de les proteïnes RSK i mTOR.

3.7.8.2 | Procediment

Per comprobar si l'activitat de mTOR i de RSK es troben sotmeses a regulació per aminoàcids, es van realitzar immunoprecipitacions amb anticossos anti mTOR o anti RSK en llisats de HEK-293T i HEK-293 respectivament. Posteriorment els immunoprecipitats es van rentar i es van utilitzar per a la realització d'assaigs quinasa utilitzant com a substrats l'HA-GST-p85 S6K1 o la GST-S6. Els procediments seguits per aquests assaigs es detallen a continuació.

• Obtenció dels substrats per als assaigs quinasa. Purificació de proteïnes de fusió a GST

El següent protocol és útil per a la purificació de proteïnes recombinants els gens de les quals es troben sota el control del promotor induïble per IPTG (Isopropil-1-tio-β-DGalactopiranosid).

1. Obtenció del plasmidi d'expressió en cèl·lules procariotes amb la seqüència de les proteïnes HA-P85-S6K1 i S6 (32 aminoàcids de l'extrem C terminal que conté els residus fosforilables S235/S236) en pauta de lectura amb la glutatió-S-transferasa (GST) (vectors pGEX (Pharmacia)).
2. Transformar bacteris de la soca BL21 d'*E. coli* amb aquests plasmidis.
3. Inocular 10ml de LB amb Ampicilina a 50µg/ml i incubar a 37°C i agitació durant 24 hores.

4. Diluïr el cultiu 20 vegades amb 200ml de LB amb Ampicilina a 50 µg/ml i incubar a 37°C i agitació (incubador de bacteris) fins que el cultiu assoleixi una densitat òptica (DO) a 600nm de 0,5.
5. Inducció de l'expressió del gen que codifica per a la proteïna de fusió: Afegir al cultiu 0,3 mM d'IPTG i incubar a 37°C i agitació durant 2 hores.
6. Centrifugar el cultiu a 13000g durant 2-3 minuts.

A partir d'aquest moment és molt important mantenir en tot moment la temperatura baixa (treballar en gel i amb els reactius en fred) per evitar que les proteïnes es degradin.

7. Resuspendre el pellet amb 10ml de tampó de lisis.
8. Sonicar el cultiu resuspès 3 o 4 vegades durant 30 segons cadascuna, separades per incubacions de 1 minut en gel, amb el sonicador (Branson Sonifier 250). Observar el canvi en la turbidesa indicatiu del trencament de la membrana i la paret bacteriana .
9. Afegir el detergent tritó X-100 al 1% final, i deixar el cultiu en agitació suau durant 10 minuts per afavorir la ruptura dels bacteris.
10. Centrifugar el cultiu a 30000g durant 15 minuts. Separar el sobrenedant del pellet.
11. Separar 50µl del sobrenedant i afegir sample buffer a 1X final (per a la comprovació posterior mitjançant PAGE/SDS que les proteïnes de fusió s'han sintetitzat). A la resta afegir-hi 100µl de la resina *Glutathione-Sepharose* pre-rentada tres vegades amb el tampó de lisis, i incubar durant 1 hora amb agitació suau a 4°C.
12. Rentar la resina *Glutathione-Sepharose* tres vegades: una vegada amb el tampó de llisi amb tritó X-100, una amb el tampó de llisi sense tritó X-100 i una amb el tampó per a l'assaig quinasa de RSK o mTOR corresponent.
13. Resuspendre la resina amb 200 µl de tampó per a l'assaig quinasa corresponent amb 15% de glicerol.
14. Quantificar la concentració de proteïna per comparació amb estàndards de BSA mitjançant PAGE/SDS i tinció amb blau brillant de Coomassie. Carregar també al gel diferents fraccions de la purificació per comprovar l'expressió i solubilitat de la proteïna.
15. Aliquotar i guardar a -20°C fins a la realització dels assaigs quinasa.

• Determinació activitat quinasa mTOR i RSK

1. Rentar els immunoprecipitats de RSK i de mTOR (veure apartat immunoprecipitació) tres vegades amb el tampó de llisi i una vegada amb el tampó per a l'assaig quinasa corresponent.
2. Resuspendre els immunoprecipitats amb tampó per a l'assaig quinasa corresponent, i afegir els següents components (per condició):
 - 45 µl tampó assaig quinasa RSK o tampó assaig quinasa mTOR més 1mM DTT final.
 - 3-5 µg GST-S6 (extrem Ct) o GST-HA-P85-S6K1.
 - +/- ATP 500 µM final.
3. Incubar la barreja a 30 o 37°C durant 15 minuts per a l'assaig quinasa de RSK i mTOR respectivament.
4. Aturar la reacció en gel, afegir 25µl SB4X i guardar a -20°C.
5. Analitzar els resultats mitjançant LAG gel i western blot utilitzant anticossos específics per a la detecció de les formes fosforilades dels substrats (anti P-S235/236-S6 i P-T389-S6K1), per a la detecció de les proteïnes immunoprecipitades (anti RSK i anti mTOR) i per a la detecció dels nivells totals de substrat (anti GST i anti HA).

3.7.9 | Anàlisi cel·lular per immunofluorescència

L'immunofluorescència és una tècnica que permet la visualització subcel·lular d'antígens o proteïnes a partir de cèl·lules o seccions de teixit mitjançant l'utilització d'anticossos específics conjugats químicament a un fluoròfor i posterior anàlisi per microscopia de fluorescència o confocal utilitzant làmpades i filtres adequats que permeten l'excitació d'aquests fluoròfors.

L'utilització d'anticossos amb derivats fluorescents per a la detecció d'antígens va ser introduïda a cap als anys 50 per Coons i Kaplan (Coons i Kaplan, 1950) que van demostrar que els anticossos es podien conjuguar a molècules de β -antracè mantenint intacta la seva capacitat d'unir-se als seus antígens. Anys més tard, Riggs i col·laboradors (Riggs *et al.*, 1958) van introduir un compost fluorescent molt més estable, l'isotiocianat de fluoresceïna (FITC) un dels fluoròfors més utilitzats per a immunofluorescència encara a dia d'avui.

Existeixen dos mètodes d'immunofluorescència per a la tinció de cèl·lules fixades en cobreobjectes o en seccions de teixit, la immunofluorescència directa, en la qual el fluoròfor es troba directament conjugat a l'anticòs específic per a la proteïna que es vol visualitzar (anticòs primari), i la immunofluorescència indirecta, en la qual el fluoròfor l'aporta un altre anticòs (anticòs secundari) que reconeix a l'anticòs primari.

La tinció per a immunofluorescència consisteix en 4 etapes:

- Preparació de les cèl·lules.
- Fixació i permeabilització.
- Aplicació dels anticossos.
- Anàlisi microscòpic.

Per a poder realitzar aquest tipus de tinció és necessari que les cèl·lules creixin en suports adequats fàcils de manipular que permetin el seu anàlisi posterior al microscopi. Per a cèl·lules adherents és suficient en col·locar un cobreobjectes estèril en les plaques de cultiu abans de sembrar les cèl·lules. A continuació, i després de realitzar el tractament necessari per a l'estudi que es vol fer, es fixen les cèl·lules al cobreobjectes i es permeabilitza la seva bicapa lipídica per assegurar l'entrada dels anticossos i que aquests poden arribar i reconèixer els seus corresponents antígens. Per a la fixació es solen utilitzar dos tipus de reactius, dissolvents orgànics com alcohols o acetona que permeten deshidratar les cèl·lules i precipitar les proteïnes tot mantenint la seva localització i estructura, o bé reactius amb propietats d'entrecreuament com per exemple el paraformaldehid que forma ponts entre diferents molècules a través de grups amino lliures d'aquestes generant una estructura en xarxa. Aquests darrers preserven millor l'estructura cel·lular però poden fer disminuir la capacitat antigènica d'algunes proteïnes. Ambdós tipus de fixació poden desnaturalitzar les proteïnes i per tant, per obtenir millors tincions, és convenient utilitzar anticossos primaris generats a partir de les proteïnes desnaturalitzades si és possible.

La següent etapa consisteix en el tractament de les cèl·lules amb els anticossos primari i secundari i en la realització de rentats per eliminar la fracció d'anticossos no units. Finalment s'analitzen les cèl·lules al microscopi de fluorescència o confocal, excitant els fluoròfors a la longitud d'ona adequada per a la seva emissió de fluorescència utilitzant els filtres d'excitació i d'emissió adequats.

Com a anticòs secundari per a la visualització de la proteïna p85-“like” es van utilitzar fragments $F(ab)_2$ d'immunoglobulines generats en cabra, contra IgGs de ratolí (anticòs monoclonal P-T389-S6K1 (Cell Signalling) conjugats amb el fluorocrom Alexa-Fluor 488 (Invitrogen) a una dilució 1:200 en PBS amb 0,5% de BSA. L'espectre d'excitació d'aquest fluoròfor presenta un pic d'absorbància a 495nm i un pic en l'espectre d'emissió de fluorescència de 519nm (zona del verd). Aquestes molècules pertanyen a la família de fluoròfors Alexa Fluor (Invitrogen) que estàn sintetitzats a partir de la sulfonació de fluoròfors clàssics com la cumarina, rodamina o la fluoresceïna, que els fa més estables i brillants.

Per a la visualització dels filaments d'actina es va utilitzar la toxina Faloidina conjugada al fluoròfor Texas Red, un fluoròfor que emet a la zona del vermell i presenta un pic d'absorbància i un pic de fluorescència a 595 i 615nm respectivament. La faloidina està formada per un heptapèptid bicíclic, aïllat originàriament del fong *Amanita phalloides*, que s'uneix a les subunitats de F-actina i inhibeix la hidròlisi de l'ATP impedit la despolimerització dels filaments d'actina (Rebello *et al.*, 1998).

Per a la visualització dels nuclis cel·lulars es va utilitzar el TO-PRO3 (Invitrogen), un compost que pertany a la família de les carbocianines monomèriques i que experimenta un increment de fluorescència quan s'uneixen a l'ADN. El compost TO-PRO3 presenta un pic d'absorbància a 642nm i un pic d'emissió de fluorescència a 661nm.

En la Figura 43 es mostren les estructures químiques d'alguns d'aquests fluoròfors emprats per a immunofluorescència.

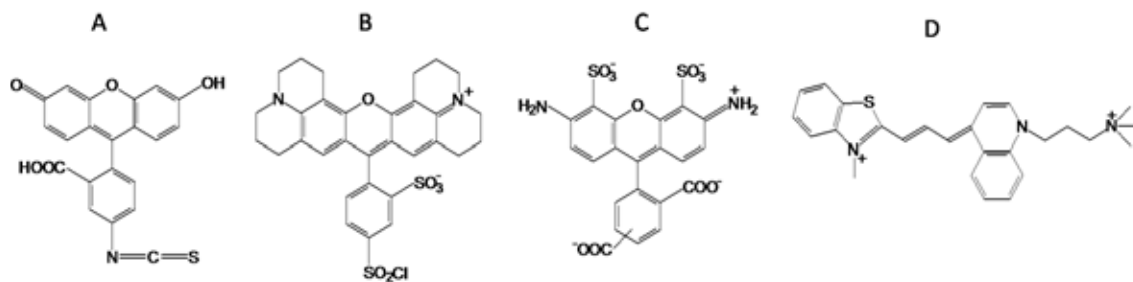


Figura 43. Estructura química d'alguns fluoròfors emprats per a immunofluorescència. A. Isotiocianat de fluoresceïna (FITC), B. Texas Red, C. Alexa Fluor 488, D. TO-PRO3.

3.7.9.1 | Materials i reactius

Els materials i reactius utilitzats en els experiments d'immunofluorescència són els següents:

- cobreobjectes estèrils i portaobjectes.
- PBS1X.
- Dissolució de fixació: paraformaldèhid al 4% en PBS.
- PBS amb BSA al 0,5% i al 4%.
- Dissolució de permeabilització: PBS amb 4% BSA i 0,15% Saponina (Sigma).
- Anticòs primari P-T389-S6K1 (Cell Signalling) diluït 1:60 en PBS amb BSA al 0,5%.
- Anticòs secundari: Fragments $F(ab)_2$ d'immunoglobulines de cabra generades contra IgGs de ratolí i conjugades amb el fluorocrom Alexa-Fluor 488 (Invitrogen) a una dilució 1:200 en PBS amb 0,5% BSA.
- Faloidina-texas red isotiocianat (TRITC) a 0.04 $\mu\text{g/ml}$ final en PBS amb BSA al 0,5%.
- TO-PRO3 a 0,3 μM final en PBS amb BSA al 0,5%.
- Moviol.
- Microscopi confocal espectral (Leica TCS-SL) equipat amb làser d'Argó.

3.7.9.2 | Procediment

Per a l'estudi de la cinètica de la fosforil·lació de la proteïna p85-“like” en resposta a aminoàcids es van realitzar experiments de *time course* d'activació amb aminoàcids en cèl·lules HeLa a temps 0,1,5,15 i 30 minuts, més una condició on després de 30 minuts de tractament amb aminoàcids les cèl·lules es van recuperar incubant-les una hora amb medi complet. Cadascuna d'aquestes condicions es va analitzar després per immunofluorescència, utilitzant l'anticòs anti P-T389-S6K1 per a la detecció de la proteïna p85-like, el TO-PRO3 com a marcador nuclear i la faloidina-texas red isotiocianat com a marcador de la F-actina.

Les cèl·lules es van sembrar en plaques de 24 wells sobre un cobreobjectes estèril i es va realitzar el *time course* d'activació amb aminoàcids. El tractament seguit per a l'anàlisi per immunofluorescència és el següent:

1. **Fixació:** aspirar el medi, rentar amb PBS 1X i fixar les cèl·lules als cobreobjectes amb 250 µl aproximadament de dissolució de fixació per well (placa de 24 wells) durant 20 minuts a temperatura ambient. A continuació rentar tres vegades durant 5 minuts amb PBS 1X sense agitació.

En aquest punt es poden guardar les plaques amb PBS a 4°C per seguir amb el procediment més endavant o fer-lo tot seguit.

2. Rentar dues vegades les cèl·lules amb PBS.
3. **Permeabilització:** Incubar les cèl·lules durant 1 hora amb la dissolució de permeabilització.
4. Aspirar el medi i fer un rentat amb la dissolució de permeabilització.
5. **Incubació amb l'anticòs primari:** Col·locar els cobreobjectes sobre parafilm en una caixa humida i incubar-los amb 50 µl de l'anticòs primari P-T389-S6K1 a una dilució 1:60 en PBS amb BSA al 0,5% durant 30-40 minuts a 37°C.
6. Aspirar el medi i rentar els cobreobjectes 3 vegades durant 10 minuts cadascuna amb la solució de permeabilització i 1 vegada amb BSA al 4% en PBS (sense agitar).
7. **Incubació amb l'anticòs secundari:** Incubar els cobreobjectes amb anticossos de cabra (fragments F(ab)₂ de les immunoglobulines) conjugats al fluorocrom Alexa-Fluor 488 (Invitrogen) a una dilució 1:200 en PBS amb BSA al 0,5% (sense agitació).

Per a la tinció de nuclis i de la F-actina incubar les cèl·lules amb phalloidin-texas red isothiocyanate (TRITC) a 0.04 µg/ml o TO-PRO3 a 0.3 µM en PBS amb BSA al 0,5% respectivament (sense agitació).

(Per a la tinció de nuclis i de F-actina no és necessari realitzar l'incubació amb un anticòs primari ja que la faloidina és una toxina que s'uneix a filaments d'actina que ja incorpora el fluoròfor TRITC, i el TO-PRO3 és una molècula fluorescent).

8. Aspirar el medi i rentar els cobreobjectes amb la solució de permeabilització 3 vegades durant 10 minuts i 1 vegada amb PBS amb BSA al 4% (sense agitar).
9. Rentar 2 vegades més amb PBS.
10. **Montatge:** Netejar els portaobjectes amb paper. Afegir 4-10 µl de moviol per portaobjectes i col·locar el cobreobjectes al damunt de manera que les cèl·lules estiguin encarades amb el moviol. Aspirar el moviol sobrant i deixar assecar a 4°C en una superfície llisa i sense que li toqui la llum.
11. Analitzar les cèl·lules al microscopi confocal espectral (Leica TCS-SL equipat amb làser d'Argó). L'excitació dels fluoròfors es va fer a les longituds d'ona adequades per a cadascun d'ells.

3.7.10 | Immunoprecipitació de proteïnes

En aquest treball s'han realitzat dos tipus d'experiments immunoprecipitació; per a l'obtenció de complexos de mTOR i RSK per a l'anàlisi de la seva activitat quinasa, i per a l'identificació de proteïnes associades a HERC1.

El procés d'immunoprecipitació consisteix en la separació d'un pèptid o proteïna i de les seves proteïnes associades d'una barreja complexa (lilisats de cèl·lules o homogenats de teixits entre d'altres), aprofitant l'especificitat antígen-anticòs. A part de l'anticòs específic per a la proteïna que es vol separar és necessari també l'utilització d'una proteïna insoluble que s'uneixi al complex antígen-anticòs i que permeti fer separar-lo de la resta de components de la barreja per centrifugació. Les proteïnes que s'utilitzen amb aquest objectiu són la proteïna A i la proteïna G. Actualment aquestes proteïnes s'obtenen per tècniques d'ADN recombinant, però són proteïnes originàries de la paret bacteriana del *Staphylococcus aureus* (Sjödahl, 1977) i el *Streptococcus β-hemolytic* (Björck i Kronvall, 1984) respectivament. Aquestes proteïnes tenen la capacitat d'unir-se a la zona constant de les immunoglobulines, i l'elecció d'una o altre depèn de l'espècie de la que procedeixen els anticossos utilitzats per a la immunoprecipitació. En la Taula 28 es mostra l'afinitat relativa de cadascuna per a diferents classes i subclasses d'immunoglobulines així com de l'espècie on s'han generat.

Species	Subclass	Protein G binding	Protein A binding
Human	IgA	-	Variable
	IgD	-	-
	IgE	-	-
	IgG ₁	++++	++++
	IgG ₂	++++	++++
	IgG ₃	++++	-
	IgG ₄	++++	++++
	IgM	-	Variable
Avian egg yolk	IgY	-	-
Cow		++++	++
Dog		+	++
Goat		++	-
Guinea-pig	IgG ₁	++	++++
Hamster		++	+
Horse		++++	++
Koala		+	-
Llama		+	-
Monkey (rhesus)		++++	++++
Mouse**	IgG ₁	++++	+
	IgG _{2a}	++++	++++
	IgG _{2b}	+++	+++
	IgG ₃	+++	++
	IgM	-	Variable
Pig		+++	+++
Rabbit		+++	++++
Rat*	IgG ₁	+	-
	IgG _{2a}	++++	-
	IgG _{2b}	++	-
	IgG ₃	++	+
Sheep	++		+/-

++++ = strong binding
 ++ = medium binding
 - = weak or no binding
 * Note that IgG from rat binds to protein G coupled to Sepharose 4 Fast Flow.
 ** IgG₁ from mouse binds more strongly to protein G than to protein A.

Taula 28. Afinitats relatives de les proteïnes A i G per regions Fc de diferents subclasses d'immunoglobulines, per a diferents espècies (adaptat de GE Healthcare).

Les proteïnes A i G són solubles i per aquest motiu s'utilitzen conjugades covalentment a resines per tal de poder aïllar posteriorment els complexos antígen-anticòs-proteïna A/G generats mitjançant una etapa de centrifugació. Per al seu ús en immunoprecipitacions aquestes proteïnes es troben conjugades a resines d'agarosa altament poroses del tipus Sepharose.

Abans de realitzar l'immunoprecipitació pròpiament dita, s'aconsella realitzar una etapa de *pre-clearing* que consisteix en addicionar al llisat cel·lular sèrum pre-immunitzat juntament amb la proteïna A/G sepharose per tal d'extreure aquelles proteïnes que es podrien unir de forma inespecífica amb l'anticòs d'immunoprecipitació, o amb la resina, disminuint la qualitat de l'immunoprecipitat.

• Tampons de llisi de cel·lular per a immunoprecipitació

En funció de la localització subcel·lular de la proteïna que es es vol immunoprecipitar és necessari utilitzar un tampó de llisi amb la força iònica i el pH adequats que garanteixi l'integritat de la proteïna d'estudi durant l'immunoprecipitació. Tampons de llisi lleugerament bàsics amb forces iòniques baixes afavoreixen la solubilització de proteïnes, mentre que tampons amb pHs àcids i altes concentracions de sal poden provocar la seva desnaturalització i precipitació.

El detergent del tampó de llisi també és crític en aquesta tècnica i la seva elecció ve determinada en funció de la localització subcel·lular de la proteïna d'interès i de si es vol preservar l'associació entre subunitats proteiques o les interaccions proteïna-proteïna durant l'extracció. Els detergents no iònics com el Tritó X-100 o l'NP40 en general tendeixen a preservar interaccions no covalents proteïna-proteïna, mentre que detergents iònics com el SDS desnaturalitzen les proteïnes, impedeixen les interaccions proteïna-proteïna i fins i tot poden afectar negativament al reconeixement de la proteïna d'interès per part de l'anticòs d'immunoprecipitació.

També és important que el tampó de llisi per a l'immunoprecipitació (i en general tots els tampons de llisi cel·lulars) contingui inhibidors de proteases i fosfatases ja que durant el trencament de les cèl·lules, proteïnes de diferents orgànuls (com per exemple les proteases lisosomals) s'alliberen i es barregen entre elles i poden degradar la proteïna d'interès.

En la Figura 44 es mostra de forma esquemàtica el procés d'immunoprecipitació i co-immunoprecipitació de proteïnes.

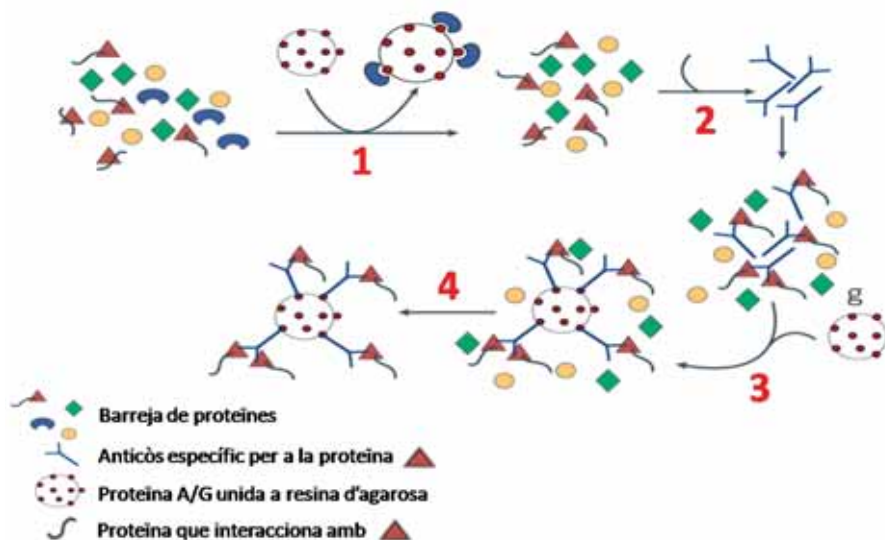


Figura 44. Esquema etapes immunoprecipitació i co-immunoprecipitació de proteïnes. 1. Pre-clearing, 2. Addició de l'anticòs primari al extracte cel·lular, 3. Addició de la proteïna A/G sepharose, 4. Centrifugació, separació del sobrenedant i rentats per a l'eliminació de proteïnes no retingudes (modificat de Peritz *et al.*, 2006).

En els experiments d'immunoprecipitació realitzats en aquest treball, els immunocomplexes precipitats amb l'antígen d'interès es van analitzar mitjançant LAG gels i western-blot, utilitzant anticossos específics per a l'estudi de la seva interacció amb altres proteïnes, o bé es va determinar la seva activitat enzimàtica sobre determinats substrats.

3.7.10.1 | Materials i reactius

Els materials i reactius per als experiment d'immunoprecipitació realitzats són els següents:

- Cèl·lules HEK-293 o HEK-293T.
- Tampó de llisi amb el detergent adequat.
 - Tampó de llisi experiments d'immunoprecipitació d'HERC1: 10 mM tris-HCl, pH 7.5, 100 mM NaCl, 1% Nonidet P40, 50 mM NaF, 1 mM vanadat sòdic, 1 mM fluorur de fenilmetilsulfonil (PMSF), 5 µg/ml leupeptina, 5 µg/ml aprotinina, 1 µg/ml pepstatina A, 20 mM β-glicerolfosfat, 100 µg/ml benzamidina.
 - Tampó de llisi experiments per immunoprecipitació de RSK o mTOR (assajos quinasa): 40 mM Hepes PH=7,5, 120 mM NaCl, 50mM NaF, 0,3% CHAPS. Inhibidors de proteases i fosfatases: 1 mM ortovanadat sòdic, 1 mM PMSF, 5 µg/ml leupeptina, 5 µg/ml aprotinina, 1 µg/ml pepstatin A, 20 mM β-glicerolfosfat i 100 µg/ml benzamidina.
- Materials i reactius per la quantificació dels nivells de proteïna totals en extractes cel·lulars mitjançant el mètode de l'àcid bicinonínic (BCA)(veure apartat 3.4).
- Anticossos primaris i sèrum pre-immune a les dilucions recomandes pel fabricant (per sèrums es sol utilitzar una dilució 1:100).
- Proteïna A o proteïna G (segons l'anticòs d'immunoprecipitació) unida a la resina Sepharosa CL-4B (GE Healthcare).
- Agitador d'ependorfs.
- Centrífuga d'ependorfs.
- Tampó de mostra (*Sample Buffer*) 4X: Final: 62,5mM tris-HCl pH=6,8; 2% SDS, 10% glicerol, 0,1M DTT, 0,001% blau de bromofenol.

Anticòs	Origen	Companyia
Anti HERC1 410-5 (Reconeix fragment residus 4001-4385, domini RLD2 (i equivalents RLD1))	Rabbit	Producció pròpia
Anti HERC1 Bvg6 (Reconeix residus 1-155, extrem Nt)	Rabbit	Producció pròpia
Anti HERC1 Bvg5 (Reconeix residus 1-155, extrem Nt)	Rabbit	Producció pròpia
Anti HERC1 363 (Reconeix residus 3684-3745, repeticions β)	Rabbit	Producció pròpia
Anti HERC1 417 (Reconeix residus 4408-4861, domini HECT)	Rabbit	Producció pròpia
Anti HA	Mouse	Sigma i roche
Anti TSC2	Rabbit	Santa Cruz
Anti mTOR	Rabbit	Cell signalling tech
Anti RSK	Rabbit	Santa cruz

Taula 29. Anticossos utilitzats per als experiments d'immunoprecipitació.

3.7.10.2 | Procediment

A continuació s'indica el procediment estàndard utilitzat per a la realització dels experiments d'immunoprecipitació. Tot el procediment s'ha de realitzar en fred per evitar que els anticossos i les proteïnes dels extractes cel·lulars es degradin.

1. Llisar les cèl·lules amb el tampó de llisi i el detergent adequats.
2. Determinar la concentració de proteïna dels extractes cel·lulars mitjançant el mètode de l'àcid Bicinonínic (BCA)(veure apartat 3.4).
3. Repartir els extractes cel·lulars a diferents eppendorfs. En cas de realitzar l'immunoprecipitació en diverses condicions, posar sempre la mateixa quantitat de proteïna a cada eppendorf i ajustar-los tots al mateix volum final amb tampó de llisi.
4. Pre-clearing: afegir a cada eppendorf 10 µl de sèrum pre-immunitzat i 50 µl de proteïna A o proteïna G (segons l'anticòs d'immunoprecipitació) unida a la resina Sepharosa CL-4B (GE Healthcare). La resina es té que rentar prèviament amb el tampó de llisi utilitzat i resuspendre-la bé abans d'afegir. Incubar els eppendorfs amb agitació suau durant 30 minuts. Centrifugar els eppendorfs a 13000g durant 30 segons i transferir el sobrenedant a eppendorfs nous amb cura de no agafar gens de resina.
5. Afegir l'anticòs d'immunoprecipitació o el sèrum pre-immunitzat a cada eppendorf (veure la dilució recomanda de l'anticòs en les instruccions del fabricant. Per sèrums es sol utilitzar una dilució 1:100). Incubar amb agitació suau durant 3-4 hores o tota la nit.
6. Afegir 50µl de proteïna A o proteïna G unida a la resina Sepharosa CL-4B (GE Healthcare) rentada amb el tampó de llisi i ben resuspesa. Incubar amb agitació suau durant 30 minuts.
7. Rentar l'immunoprecipitat 5 o 6 vegades amb el tampó de llisi. Fer cada rentat durant 10 minuts centrifugant els eppendorfs a 13000g durant 10-20 segons i aspirant el tampó amb cura de no agafar gens de resina.
8. Resuspendre l'immunoprecipitat amb el tampó de mostra per a PAGE/SDS o bé amb el tampó adequat per a l'assaig quinasa i guardar-lo a -20°C fins al seu anàlisi.

3.8 | Purificació de vesícules amb coberta de clatrina

La purificació de vesícules amb coberta de clatrina (CCV), es va realitzar d'acord amb el protocol descrit per Keen *et al.* al 1979. Aquest mètode consisteix en dues centrifugacions diferencials de l'homogenat de cervell boví a 20000 i 85000g respectivament que permeten eliminar la fracció mitocondrial i aïllar la fracció microsomal. A continuació es realitzen dues etapes de purificació de la fracció microsomal mitjançant gradients de flotació amb sacarosa, i finalment es concentra la fracció de vesícules amb coberta de clatrina realitzant una centrifugació a 100000g.

3.8.1 | Materials i Reactius

- Cervell de vedella fresc (Productes del Cinquè Quart, Mercabarna, Barcelona).
- Tampó PBS 1X: 140mM NaCl, 2,7mM KCl, 10mM Na₂HPO₄, 1,8mM KH₂PO₄, pH=7,2.
- Tampó d'homogeneïtzació (tampó A): 0,1M 2-(N-morfolino)etansulfonat sòdic (NaMES), 1mM àcid etilenglicol tetracètic (EGTA) (agent quelant de cations divalents, inhibidor de metal·loproteases), 0,5mM MgCl₂, 0,02% NaN₃, pH=6,5, inhibidors de proteases i fosfatases: 1 mM ortovanadat sòdic, 1 mM fluorur de fenilmetilsulfonil (PMSF), 5 µg/ml leupeptina, 5 µg/ml aprotinina, 1 µg/ml pepstatin A, 20 mM β-glicerolfosfat i 100 µg/ml benzamidina.

- Dissolucions de sucrosa en tampó A al 5, 10, 30, 40 i 50% amb 0,02% NaN_3 .
- Homogeneïtzador de vidre-tefló.
- Centrífuga Beckmann J2 HS.
- Ultracentrífuga Beckmann L-60.
- Rotors Beckmann 45 Ti, Beckmann SW28.
- Tubs de centrífuga de policarbonat.

(*) L' ortovanadat sòdic s'ha d'activar abans de ser utilitzat per assegurar que es troba majoritàriament en forma de monovanadat i es minimitza la presència de decavanadat. Aquest darrer es forma a pH àcid i s'ha descrit que inhibeix alguns processos cel·lulars com per exemple l'alliberament de calci en cèl·lules endocrines induït pel bloqueig dels inositols 1,4,5-trifosfat entre d'altres (Gordon, 1991). Per una dissolució stock d'ortovanadat sòdic 200mM (200X) l'activació es realitza de la següent manera:

1. Dissoldre 0,37g d'ortovanadat sòdic (Na_3VO_4 , pes molecular 183,9) en 10ml H_2O .
2. Ajustar el pH fins a 10 (la dissolució adquireix color groguenc (decavanadat)).
3. Bullir la dissolució fins que es torna incolora.
4. Refredar a temperatura ambient.
5. Repetir les etapes d'ajust del pH a 10 i d'ebullició fins que la dissolució es torna incolora definitivament i s'estabilitza el pH a 10.
6. Aliquotar l'ortovanadat activat i conservar a -20°C .

3.8.2 | Procediment

Tota la manipulació del cervell s'ha de realitzar en fred. Cal posar a refredar també els reactius i les centrífuges abans del seu ús per evitar la degradació de proteïnes durant el procediment.

1. Rentar el cervell amb PBS, separar les meninges de la resta del cervell (que es descarta).
2. Trossejar i homogeneïtzar 500g de meninges del cervell boví amb 500ml de tampó A (1:1) mitjançant un homogeneïtzador de vidre-Tefló (3 pujades i baixades de l'èmbol al màxim de rpms durant 10 segons cadascuna).
3. Centrífugació diferencial a 20000g durant 30 minuts. Recuperar el sobrenedant post-mitocondrial.
4. Centrífugació diferencial del pellet post mitocondrial a 85000g durant 1hora. Recuperar el pellet microsomal.
5. Resuspendre el pellet microsomal en 40ml tampó A i homogeneïtzar-lo amb l'homogeneïtzador de vidre-tefló. Centrífugar l'homogeneïtzat sobre un gradient de sacarosa 10/40/50% a 80000g durant 1 hora.
6. Recuperar la zona tèrbola del gradient, diluir-la tres vegades amb tampó A i centrífugar-la a 80000g durant 1 hora.
7. Resuspendre el pellet en 6ml de tampó A i centrífugar-lo sobre un gradient de sacarosa 5/30% a 50000g durant 45 minuts.
8. Recuperar la fracció tèrbola (zona 5%), diluir-la 2 vegades i centrífugar-la a 100000g durant 2 hores. Recuperar la **Fracció de vesícules amb coberta de clatrina** (pellet).
9. Resuspendre la fracció de vesícules amb coberta de clatrina amb un volum mínim de tampó A, quantificar la concentració de proteïna (mètode BCA), al·liquotar i guardar a -80°C .

3.9 | Assaigs d'acoblament de proteïnes de coberta en fraccions crues de vesícules sinàptiques (membranes LP2)

3.9.1 | Purificació de fraccions crues de vesícules sinàptiques (membranes LP2)

La purificació de la fracció crua de vesícules sinàptiques (membranes LP2) es va realitzar d'acord a una adaptació del protocol descrit per Huttner *et al.*, i Haucke i De Camilli al 1983 i 1999 respectivament, per a la purificació de vesícules sinàptiques a partir de cervell de mamífer. En aquest treball la purificació es va realitzar a partir cervells bovins proporcionats per l'empresa Productes del Cinquè Quart (Mercabarna, Barcelona). Aquest protocol es basa en la realització d'una centrifugació diferencial de l'homogenat de l'escorça del cervell que proporciona una fracció crua de sinaptosomes. A continuació es realitza un llisat d'aquests per xoc hipoosmòtic que permet l'alliberament de la fracció crua de vesícules sinàptiques de l'interior dels sinaptosomes (membranes LP2), i finalment es realitza una centrifugació diferencial a 165000g per separar les membranes LP2 de la resta.

3.9.1.1 | Materials i reactius

- Cervell boví fresc (Productes del cinquè Quart, Mercabarna).
- Tampó PBS 1X: 140mM NaCl, 2,7mMKCl, 10mM Na₂HPO₄, 1,8mM KH₂PO₄, pH=7,2.
- Tampó LP2: 320mM sacarosa, 4mM Hepes-NaOH PH=7,3; inhibidors de proteases i fosfatasas: 1 mM ortovanadat sòdic, 1 mM fluorur de fenilmetilsulfonil (PMSF), 5 µg/ml leupeptina, 5 µg/ml aprotinina, 1 µg/ml pepstatin A, 20 mM β-glicerolfosfat i 100 µg/ml benzamidina.
- Tampó de llisi sinaptosomes per xoc hipo-osmòtic: Hepes-NaOH 7,5mM pH=7,2.
- Homogeneïtzador de vidre-tefló.
- Centrífuga Beckmann J2 HS.
- Ultracentrífuga Beckmann L-60.
- Rotors Beckmann SW28 i 41Ti.
- Tubs de centrífuga de policarbonat.

3.9.1.2 | Procediment

Tota la manipulació del cervell s'ha de realitzar en fred. Cal posar a refredar també els reactius i les centrífuges abans del seu ús per evitar la degradació de proteïnes durant el procediment.

1. Rentar un fragment de cervell boví lliure de cerebel amb PBS, separar l'escorça cerebral de la resta .
2. Trossejar 15-20g d'escorça de cervell en fragments petits. Afegir 40 ml de tampó LP2 fred i homogeneïtzar mitjançant un homogeneïtzador de vidre-Tefló (12 pujades i baixades de l'èmbol a 900rpm).
3. Centrifugació diferencial de l'homogenat a 1000g durant 10 minuts. Recuperar el sobrenedant (S1).
4. Centrifugació S1 a 9200 g durant 15 minuts. Recuperar el pellet 2 (P2).
5. Resuspendre P2 amb 100 ml de tampó LP2 i centrifugar a 10000g durant 15 minuts. Recuperar el pellet P2' (fracció crua de sinaptosomes).
6. Resuspendre P2' amb 13ml tampó LP2. Afegir 117ml d'H₂O freda i homogeneïtzar mitjançant l'homogeneïtzador de vidre-tefló (3 pujades i baixades de l'èmbol a 3000rpm).

7. Llisat dels sinaptosomes: afegir 1ml de tampó de llisi de sinaptosomes i incubar 30 minuts en gel.
8. Centrifugació diferencial a 25000g durant 20 minuts. Recuperar el sobrenedant (LS1).
9. Centrifugar LS1 a 165000g durant 2 hores a 4°C. Recuperar el pellet **LP2 (fracció crua de vesícules sinàptiques)**.
10. Resuspendre LP2 amb un volum mínim de tampó LP2.
11. Determinar la concentració de proteïna (mètode BCA), aliquotar i guardar a -80°C.

3.9.2 | Purificació fracció citosòlica

La purificació de la fracció citosòlica cel·lular a partir de cervell boví per a la realització dels experiments d'acoblament de cobertes de vesícules sinàptiques sobre membranes LP2, es va realitzar també d'acord al protocol de Haucke i De Camilli, 1999, i consisteix en la realització de diferents centrifugacions diferencials de l'homogenat de l'escorça del cervell per tal de separar els òrgans cel·lulars del citosol. El cervell boví va ser proporcionat per l'empresa Productes del Cinquè Quart (Mercabarna, Barcelona).

Un cop purificat, el citosol es va dialitzar per extreure els nucleòtids que participen en el procés d'acoblament de les proteïnes de coberta d'aquestes membranes (ATP, GTP, etc.), i poder-los afegir *in vitro* en les condicions desitjades.

3.9.2.1 | Materials i reactius

- Cervell boví fresc (Productes del Cinquè Quart, Mercabarna, Barcelona).
- Tampó purificació citosol: 25mM tris-HCl PH=8, 500 mM KCl, 250 mM Sacarosa, 1 mM DTT, inhibidors de proteases i fosfatases: 1 mM ortovanadat sòdic, 1 mM PMSF, 5 µg/ml leupeptina, 5 µg/ml aprotinina, 1 µg/ml pepstatin A, 20 mM β-glicerolfosfat i 100 µg/ml benzamidina.
- Membranes de diàlisi.
- Tampó de diàlisi: 25mM HEPES-KOH PH=7,2, 25mM KCl, 2,5mM MgCl₂.
- Centrífuga Beckmann J2 HS.
- Ultracentrífuga Beckmann L-60.
- Rotors Beckmann JA20, SW28 i 41 Ti.
- Tubs de centrífuga de policarbonat.

3.9.2.2 | Procediment

Tota la manipulació del cervell s'ha de realitzar en fred. Cal posar a refredar també els reactius i les centrífugues abans del seu ús, per evitar la degradació de les proteïnes durant el procediment.

1. Rentar un fragment de cervell boví amb PBS, separar l'escorça cerebral de la resta.
2. Trossejar uns 10g d'escorça cerebral en fragments petits, afegir 30ml de tampó de llisi i homogeneïtzar-lo mitjançant l'homogeneïtzador de vidre-tefló.
3. Centrifugació a 3000g durant 10 minuts. Descartar el pellet.
4. Centrifugació del sobrenedant a 12000g durant 20 minuts. Descartar el pellet.
5. Centrifugació del sobrenedant a 150000g durant una hora. Descartar el pellet.
6. Dialitzar el sobrenedant (citosol) per extreure els nucleòtids (GTP, ATP...): introduir el citosol en una membrana per a diàlisi. Tancar-la hermèticament amb unes pinces i introduir-la en un

vas de precipitats de 2 litres o més ple de tampó de diàlisi. Dialitzar durant tota la nit a 4°C amb agitació.

7. Determinar la concentració de proteïna del citosol dialitzat mitjançant el mètode de l'àcid bicinonínic (BCA).
8. Aliquotar i guardar a -80°C.

3.9.3 | Experiments d'acoblament de proteïnes de coberta en membranes LP2

Els experiments d'acoblament es van realitzar segons el protocol descrit per Krauss M. i col·laboradors al 2003 que consisteix en l'eliminació de les proteïnes endògenes de la coberta mitjançant un rentat de les membranes LP2 amb carbonat de sodi a pH=9,5, seguit d'una incubació posterior amb citosol a 37 °C durant 15 minuts, en presència o absència d'ATP o de l'anàleg no hidrolitzable de GTP, GTPγS. Finalment les membranes es renten i s'analitzen les proteïnes que s'hi han incorporat mitjançant LAG gel i western blot.

3.9.3.1 | Materials i reactius

- Membranes LP2 bovines.
- Tampó de rentat membranes: 0,1M Na₂CO₃ a pH=9,5.
- Citosol de cervell boví dialitzat.
- Tampó de purificació del citosol: 25mM tris-HCl pH=8, 500 mM KCl, 250 mM sacarosa, 1 mM DTT, inhibidors de proteases i fosfatases: 1 mM ortovanadat sòdic, 1 mM PMSF, 5 µg/ml leupeptina, 5 µg/ml aprotinina, 1 µg/ml pepstatin A, 20 mM β-glicerolfosfat i 100 µg/ml benzamidina.
- Sistema regenerant d'ATP (Sigma): final en les reaccions d'acoblament: 2 mM ATP, 200 U/ml creatina quinasa, 500 mM fosfocreatina.
- 200 µM GTPγS final (Sigma).
- Bany de temperatura.
- Sacarosa 0,5M.
- Micro ultracentrífuga Sorvall RC-M150GX.
- Rotor Sorvall S100 AT4.
- Tubs de de centrífuga de 3ml de policarbonat.

3.9.3.2 | Procediment

1. Eliminar les proteïnes endògenes de la coberta de les membranes LP2 ("stripping"): Incubar uns 2mg de membranes LP2 amb 400 µl aproximadament de 0,1M Na₂CO₃ a pH=9,5 durant 15-30 minuts a 4°C amb agitació suau.
2. Centrifugació a 90000g durant 15 minuts. Recuperar el pellet (membranes LP2 "netes").
3. Resuspendre les membranes LP2 amb el volum necessari de tampó de purificació de citosol per a una concentració final de 1µg/µl.
4. Preparar en eppendorfs les barreges de reacció de la següent:

	1	2	3	4	5	6
LP2 "rentades" (µg)			Entre 50-100			-
Citosol dialitzat (µg)	-	500	500	500	500	500
Sistema regenerant d'ATP						
ATP (mM)	-	-	2	-	2	2
Creatina quinasa (U/ml)	-	-	200	-	200	200
Fosfocreatina (mM)	-	-	500	-	500	500
GTPγS (µM)	-	-	-	200	200	200
Volum final (µl) (en tampó citosol)			500			

Taula 30. Quantitats dels reactius indicats per als assaigs d'acoblament de proteïnes de coberta en membranes LP2.

5. Incubar les barreges de reacció a 37°C durant 15 minuts.
6. Centrifugar els eppendorfs a 150000g durant 15 minuts. Descartar el sobrenedant.
7. Rentar els pellets amb 500 µl de tampó citosòlic. Centrifugar a 150000g durant 1 hora sobre un coixí de sacarosa 0,5M. Descartar el sobrenedant.
8. Resuspendre el pellet amb tampó de mostra 4X i guardar a -20°C fins al seu anàlisi.
9. Analitzar els resultats mitjançant LAG-gel i western-blot de les 6 condicions, utilitzant com a control membranes LP2 amb les proteïnes de membrana endògenes (membranes LP2 no rentades).





4 | *Resultats i Discussió*

*“El dubte és el principi de la
sabiduria”*

*Aristòtil
(384 a.c.-322 a.c.)*

***4.1 | Anàlisi conjunta de
proteïnes gegants i petites per PAGE/SDS.
El sistema LAG (Low Acrylamide Gradient)***

4.1 | Anàlisi conjunta de proteïnes gegants i petites per PAGE/SDS. El sistema LAG (Low Acrylamide Gradient).

Un dels paràmetres que s'ha de tenir en compte alhora de preparar un gel per a PAGE/SDS és el tamany de porus òptim necessari per aconseguir una bona resolució en la separació. Això ve determinat pel pes molecular de les proteïnes que es vol analitzar, i s'aconsegueix ajustant el percentatge d'acrilamida del gel separador. Quan és necessari analitzar en un mateix experiment proteïnes d'elevat pes molecular i proteïnes de baix pes molecular, es pot utilitzar un gel amb un gradient de concentracions d'acrilamida/bisacrilamida en el qual no és necessari l'ús d'un gel concentrador ja que la disminució progressiva del tamany de porus de la malla d'acrilamida/bisacrilamida ja realitza aquesta funció.

No obstant, per separar i analitzar mitjançant PAGE/SDS proteïnes de pes molecular molt elevat o proteïnes gegants (>200-300 KDa) juntament amb proteïnes d'un tamany molt menor, els esmentats gels de gradient no són útils ja que les proteïnes gegants no poden ni tant sols entrar al gel (zona on el tamany de porus és major), i es queden acumulades al fons dels pous de càrrega. En aquests casos és convenient reduir l'entrecruament de les cadenes de poli(acrilamida) disminuint la quantitat de bisacrilamida, és a dir augmentant la proporció acrilamida/bisacrilamida fins a 80:1 (enlloc de l'habitual 40:1), i disminuir el percentatge d'acrilamida fins al 4-5%. Aquesta aproximació però té els seus inconvenients com són l'excessiva inconsistència que presenten aquests tipus de gels (presenten una textura molt tova i enganxosa) que els fa difícils de manipular alhora de tenyir-los o realitzar una transferència a una membrana.

Degut a l'enorme tamany de les proteïnes HERC1 i HERC2, i tenint en compte tota aquesta problemàtica, al laboratori es va posar a punt i es va patentar un gel especial que es va anomenar LAG gel (*low acrylamide gradient gel*), que ha estat utilitzat en la majoria d'electroforesis realitzades en aquest treball. Aquest sistema combina de forma contínua un gel de poli(acrilamida) de baix percentatge d'acrilamida (4%) i una proporció d'acrilamida:bisacrilamida de 80:1, amb un gel en gradient del 6 al 15% amb una proporció acrilamida/bisacrilamida de 40:1. Per tal de que el gel resultant sigui més fàcil de manipular és necessari iniciar la polimerització de les dues parts del gel al mateix temps, de manera que el resultat final és una única unitat i es pot agafar per la seva part més densa alhora de manipular-lo.

Aquest sistema permet separar amb bones resolucions, proteïnes des de 5 KDa fins a proteïnes gegants (>200-300 KDa) en únic gel (Figura 45), amb els avantatges que això comporta pel que fa al estalvi de temps i de reactius.

4.1.1 | Resolució del LAG gel

Durant el desenvolupament d'aquest sistema, per comprovar la seva capacitat de resolució i les seves possibles aplicacions, es va analitzar una purificació de vesícules amb coberta de clatrina (CCV) obtinguda a partir de cervell boví. Es va escollir aquest tipus de mostra ja que les vesícules amb coberta de clatrina estan constituïdes per relativament poques proteïnes però que engloben un ampli rang de pesos moleculars. 100 micrograms de la preparació de CCV es va resuspendre amb tampó Laemmli i es van carregar en un LAG gel generat prèviament entre dos vidres (16 x 18 cm) d'una aparell convencional per a gels grans d'electroforesi. L'electroforesi es va deixar córrer durant 16 hores a 45V a temperatura ambient i a continuació el gel es va tenyir amb blau brillant de Comassie. Tant en el carril dels marcadors de pesos moleculars com en el de les CCV s'observa una bona resolució en la separació de les proteïnes, que va ser confirmada posteriorment per proteòmica, al identificar-se en el mateix gel proteïnes

gegants com la cadena pesada de la dineïna (DYHC, 527KDa), proteïnes grans com la cadena pesada de la clatrina (CHC, 192 KDa), proteïnes mitjanes com la xaperona Hsc70 o la sinaptotagmina I (72 i 65 KDa respectivament) i proteïnes petites com el factor 1 de ribosilació de l'ADP (ARF1, 20KDa). Totes elles han estat descrites prèviament com a proteïnes constitutives d'aquest tipus de vesícules (Blondeau *et al.*, 2004).

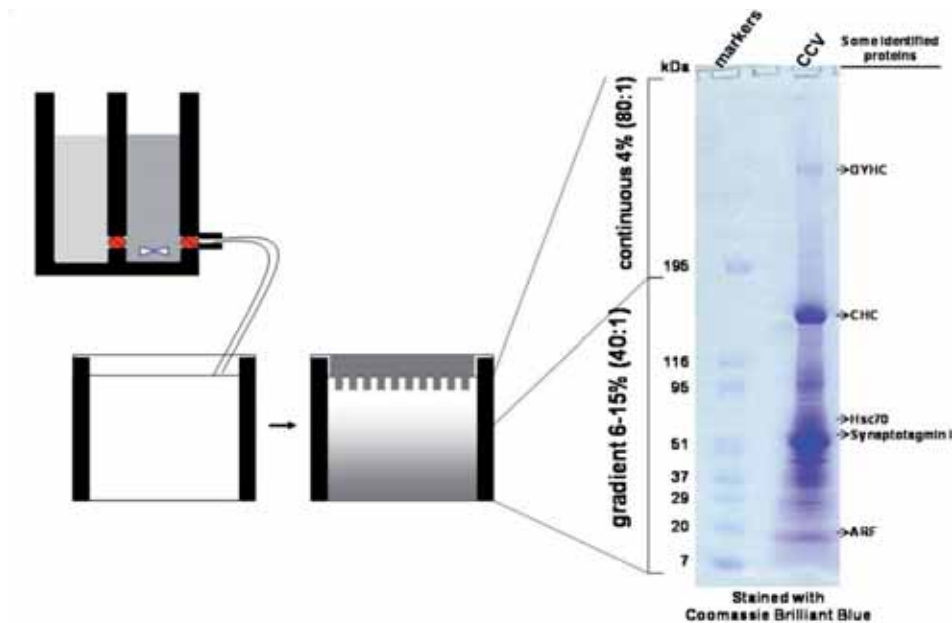


Figura 45. A l'esquerra, representació esquemàtica del procés de preparació d'un gel en gradient combinat amb un gel amb baixa proporció de bisacrilamida (gel LAG): Les solucions d'acrilamida(A)/bisacrilamida(B) (40:1) al 6% i al 15% s'afegeixen al mateix temps en l'aparell generador de gradient, cadascuna en un compartiment, i s'obren les claus de pas. Ràpidament i abans de que el gel polimeritzi s'afegeix la solució d'A/B (80:1) al 4%. Cal remarcar l'absència de gel concentrador en aquest sistema ja que la disminució progressiva del tamany de porus en aquests gels realitza la mateixa funció. A la dreta, exemple d'una aplicació del gel LAG: proteïnes de vesícules amb coberta de clatrina purificades a partir de cervell boví es van separar mitjançant aquest sistema. A continuació es va tenyir el gel amb blau brillant de Coomassie i es van identificar les proteïnes mitjançant espectrometria de masses i western blot.

4.1.2 | LAG gel i western blot

Una altre aplicació freqüent de l'electroforesi PAGE/SDS és l'anàlisi per immunoblot. Per aquest motiu es va comprovar si el sistema LAG era compatible amb aquesta tècnica. Els resultats obtinguts van ser positius i es va confirmar la major facilitat de manipulació del gel al polimeritzar de forma contínua la part superior del gel amb baix percentatge d'acrilamida i la part inferior (gradient). Per a la transferència es va emprar un aparell convencional (Biorad) i un protocol estàndard (Ausubel *et al.*, 1987) amb l'única modificació de l'augment del temps de transferència (fins a 4 hores) i de la intensitat (400mA), que van permetre millorar la transferència de les proteïnes de pes molecular elevat. Utilitzant aquestes condicions es va aconseguir també una transferència complerta dels marcadors de pes molecular (7-200 KDa aproximadament).

Per a la transferència dels gels LAG és recomanable l'ús de membranes de PVDF respecte les de nitrocel·lulosa ja que aquestes darreres s'enganxen molt més a la part superior del gel. A més a més, també es va observar que l'ús de dues membranes de PVDF (una a cada banda del gel) ajudava a disminuir significativament el fons en la zona d'elevat pes molecular quan s'anализava la membrana amb anticossos.

Seguint tots aquests paràmetres es van analitzar unes quantes proteïnes de fusió de la proteïna HERC1 (532 KDa) amb la proteïna GFP (*green fluorescent protein*) (Figura 46A); plasmidis que codifiquen per aquestes proteïnes es van transfectar durant 48 hores en cèl·lules de ronyó d'embrió humà (HEK-293) i posteriorment els llisats corresponents es van analitzar mitjançant un LAG gel i western-blot. La identificació de les proteïnes es va realitzar mitjançant un anticòs monoclonal contra la GFP (Roche Diagnostics).

Com s'observa en la Figura 46 B, totes les proteïnes de fusió es van poder detectar en la mateixa membrana observant-se, com era d'esperar, una disminució en l'expressió directament proporcional al tamany de cadascuna d'elles. Per exemple, la construcció pFG40 es va poder observar a temps d'exposició molt més curts que la proteïna de fusió gegant pFG43, que es va poder detectar clarament utilitzant un anticòs policlonal contra HERC1 (Figura 46 C).

4.1.3 | LAG gel i immunoprecipitació

Com a exemple d'una altra aplicació del LAG gel, es van realitzar experiments d'immunoprecipitació a partir de llisats de cèl·lules HEK-293 utilitzant anticossos específics contra HERC1, i es van analitzar algunes de les seves proteïnes associades com la cadena pesada i lleugera de la clatrina (CHC i CLC) i la xaperona Hsp70 (Figura 46 D).

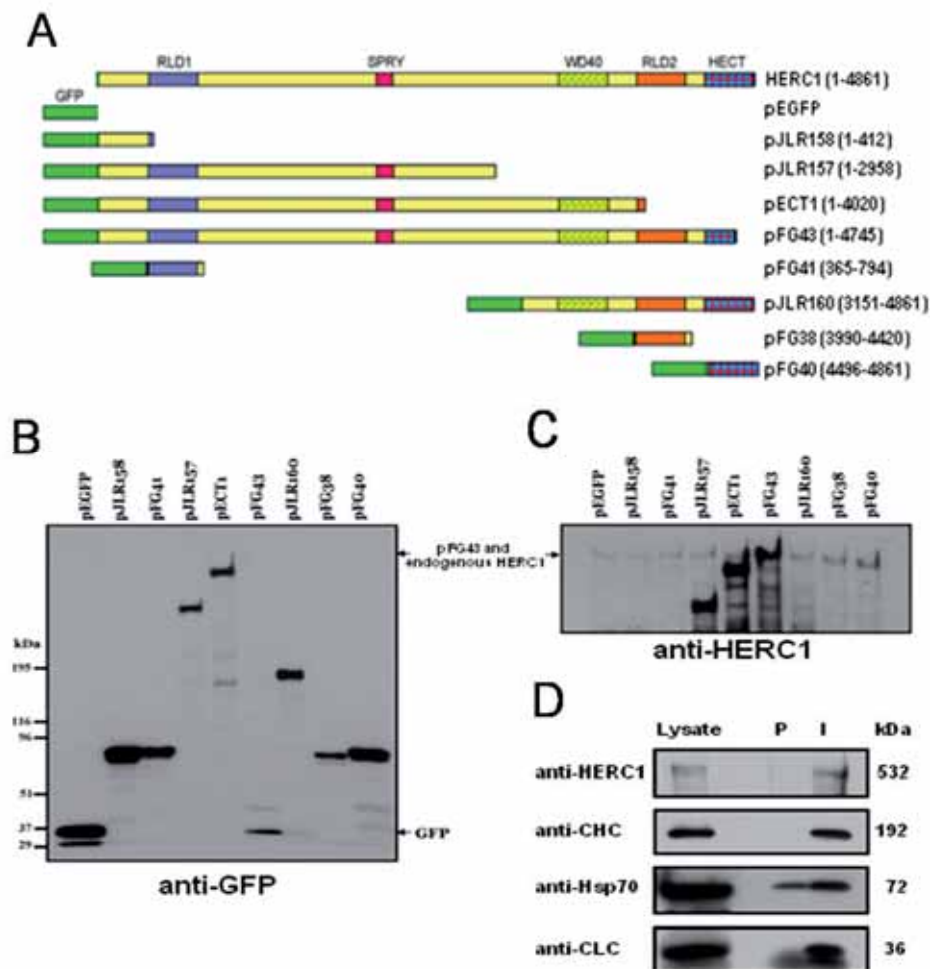


Figura 46. Algunes aplicacions dels gels LAG. A. Esquema d'algunes proteïnes de fusió amb la GFP de la proteïna gegant HERC1. Es mostren els diferents dominis d'HERC1, els aminoàcids de la seqüència d'HERC1 que inclou cadascuna de les construccions, així com el seu pes molecular en KDa. B i C. Plasmidis que codifiquen per a les proteïnes de fusió anteriors van ser transfectats en cèl·lules HEK-293 durant 48 hores, i els seus llistats van ser analitzats mitjançant un LAG gel i western blot utilitzant anticossos específics contra la GFP (B) o contra HERC1 (C). A l'esquerra es mostren els marcadors de pes molecular (Biorad). La proteïna HERC1 endògena i la pFG43 estan indicades amb fletxes. D. Immunoprecipitació d'HERC1 en llistats de cèl·lules HEK-293 amb sèrum pre-immunitzat (P) o immunitzat contra HERC1 (I). HERC1 i les seves proteïnes associades es van identificar utilitzant anticossos específics.

En resum, tots aquests exemples corroboren la capacitat dels LAG gel per analitzar simultàniament proteïnes gegants i proteïnes petites, obtenint bones resolucions i ampliant les utilitats de l'electroforesi PAGE/SDS.

(Els materials i reactius necessaris per l'anàlisi de proteïnes mitjançant el sistema LAG s'indica en l'apartat 3.1.2 de materials i mètodes).

4.2 | Paper de la proteïna HERC1 en la via de senyalització de mTOR

4.2 | Paper de la proteïna HERC1 en la via de senyalització de mTOR

4.2.1 | Antecedents

S'han descrit les mutacions en els gens que codifiquen per a les proteïnes tuberina i hamartina (TSC2 i TSC1) com la causa principal de l'esclerosi tuberosa, una malaltia genètica autosòmica dominant que afecta a 1 de cada 6000 naixements i que provoca la formació de tumors benignes (hamartomes) en varis òrgans i teixits (cervell, ronyó, cor i pell) així com desordres neurològics severos com epilèpsia, autisme, retard mental, i dificultat en l'aprenentatge entre d'altres (Cheadle *et al.*, 2000; Yates, 2004; revisat en Crino *et al.*, 2006). Aquestes dues proteïnes formen el complex de l'esclerosi tuberosa (TSC) (van Slegtenhorst *et al.*, 1998; Hodges *et al.*, 2001), un complex heterodimèric que impedeix el creixement cel·lular a través de l'activitat GAP (*GTPase activating protein*) de TSC2, sobre la GTPasa Rheb. L'altre membre del complex, la proteïna TSC1, actua com a estabilitzador de TSC2, tot i que actualment es desconeix el mecanisme a través del qual es produeix aquesta estabilització (Benvenuto *et al.*, 2000).

A l'any 2006, amb l'objectiu d'identificar noves proteïnes que interaccionessin amb TSC2, es va identificar la presència del fragment C terminal de la proteïna HERC1 al analitzar immunoprecipitats de TSC2 per PAGE/SDS i espectrometria de masses (Chong-Kopera *et al.*, 2006). A més a més, en col·laboració amb el nostre laboratori, mitjançant experiments de immunoprecipitació de HERC1 amb diferents anticossos contra aquesta proteïna, es va observar la co-immunoprecipitació de TSC2 tant endògena com sobreexpressada, lo qual va permetre confirmar l'existència d'una interacció entre les proteïnes HERC1 i TSC2 (Figura 47).

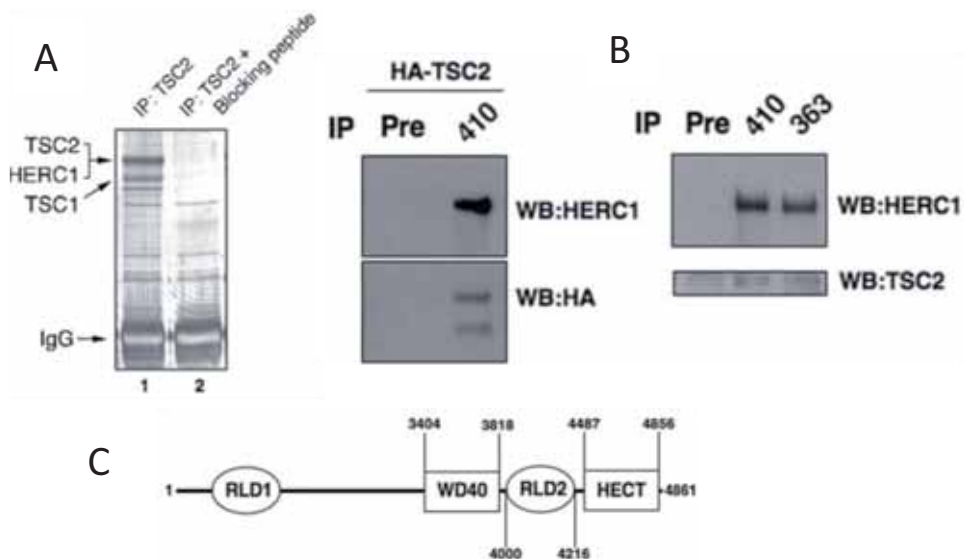


Figura 47. Interacció HERC1-TSC2. A. Anàlisi per PAGE/SDS dels immunoprecipitats de TSC2 obtinguts a partir de llisats de cervell de ratolí, en presència o absència d'un pèptid que bloqueja l'anticòs anti TSC2. S'indiquen les bandes corresponents a HERC1 (fragment C terminal), TSC2 i TSC1. B. Co-immunoprecipitació de TSC2 endògena o sobreexpressada en cèl·lules HEK-293 mitjançant els anticossos anti HERC1, 410 i 363. C. Esquema de la proteïna HERC1 on s'indiquen els dominis al voltant de la zona d'interacció amb TSC2 d'HERC1, WD40, RLD2 i HECT, i els residus que inclouen cadascun d'ells (Chong-Kopera *et al.*, 2006).

En aquest mateix treball es va iniciar la caracterització de la interacció entre aquestes dues proteïnes, obtenint els següents resultats (Chong-Kopera *et al.*, 2006):

- Mitjançant experiments d'immunoprecipitació d'HERC1 en cèl·lules HEK-293 co-transfectades amb plasmidis que codificaven per a diferents formes truncades de TSC2, més un plasmidi que codificava per al fragment C terminal d'HERC1 (residus 3351-C) (Figura 47C), varen observar que l'extrem N terminal de TSC2 (residus 1-608) era necessari i suficient per a l'interacció amb HERC1, i que tot i que el domini GAP no ho era, algunes zones de TSC2 compreses entre el residu 608 i l'extrem C terminal de la proteïna podien contribuir positivament en la interacció amb HERC1.
- En experiments del mateix tipus però sobreexpressant diferents fragments de HERC1 enloc de fragments de TSC2, varen observar que dues regions d'HERC1 (residus 3001-3900 i 3901-Ct) eren capaces de co-immunoprecipitar TSC2, i que per tant, la zona al voltant del residu 3900 d'HERC1 era crítica per a la unió d'HERC1 amb TSC2 (Figura 47 C).
- Com s'ha comentat en el primer punt, l'extrem N terminal de TSC2 semblava crític per a la interacció amb HERC1. Curiosament, en aquesta zona és on es troba el domini d'unió de TSC2 amb TSC1 (Krymskaya *et al.*, 2003). Mitjançant experiments d'immunoprecipitació de TSC2 en cèl·lules co-transfectades amb HERC1 (3901-Ct), TSC2, i/o TSC1 varen observar que la sobreexpressió de TSC1 abolia completament la interacció entre HERC1 i TSC2. A més a més, la sobreexpressió dels fragments d'HERC1, 3900-Ct i 3351-Ct no afectava a la interacció TSC2/TSC1, suggerint que la interacció HERC1/TSC2 era més feble que la interacció TSC2/TSC1, i que la unió de TSC1 amb TSC2 impedia la unió d'aquesta amb HERC1.
- De la mateixa manera, mitjançant experiments de sobreexpressió de TSC2 en presència o absència de HERC1 (3901-Ct), més un tractament posterior de les cèl·lules amb cicloheximida, varen observar que HERC1 disminuïa l'estabilitat de TSC2. No obstant, si es sobreexpressava al mateix temps TSC1, aquest efecte no es produïa. En canvi, amb mutants de TSC2 més inestables (TSC2R611Q i R905Q), la disminució de l'estabilitat de TSC2 provocada per la sobreexpressió de HERC1 era independent de TSC1.
- Mitjançant experiments d'immunoprecipitació de TSC2 en cèl·lules transfectades amb els mutants identificats en pacients d'esclerosi tuberosa TSC2 R611Q i R905Q (els quals s'ha descrit que són inestables o que mostren poca afinitat per TSC1 (Hodges *et al.*, 2001; Inoki *et al.*, 2002; Nellist *et al.*, 2005)), juntament amb el fragment d'HERC1 3901-Ct, van observar que aquests mutants interaccionaven amb HERC1 amb la mateixa intensitat que la forma *wild type* de TSC2, i que TSC1 no impedia la unió de HERC1 amb aquests mutants.

En resum, aquestes dades suggerien un model on TSC1 actuava com a estabilitzador de TSC2 impeding la seva interacció amb HERC1 i la seva degradació a través del sistema UPS (*ubiquitin proteasome system*), i on HERC1 podia estar actuant com a E3 ubiquitina lligasa per a TSC2 (Chong-Kopera *et al.*, 2006), una activitat descrita per a HERC1 gràcies a la presència d'un domini HECT en la seva seqüència, i a la capacitat d'unir molècules d'ubiquitina a través d'ell. No obstant, no s'ha demostrat que HERC1 sigui la responsable de l'ubiquitinació de TSC2, de fet, encara no s'ha pogut identificar cap dels substrats de l'activitat E3 ubiquitina lligasa d'HERC1 (Schwarz *et al.*, 1998; Garcia-Gonzalo i Rosa, 2005).

Tot i que era necessari aprofundir en aquests resultats per afinar i completar aquest model, donat el paper descrit per al complex TSC2/TSC1 en la regulació de mTOR (van Slegtenhorst *et al.*, 1998), la constatació de l'interacció entre HERC1 i TSC2 apuntava a un possible paper de la proteïna HERC1 en la regulació d'algun o alguns dels processos que transcorren a través de la via de senyalització de mTOR, com el creixement cel·lular, l'autofàgia o la biogènesi de ribosomes entre d'altres.

4.2.2 | Interacció HERC1 amb el complex TSC (TSC2/TSC1)

Amb l'objectiu de confirmar la interacció entre HERC1 i TSC2 descrita, vàrem realitzar experiments d'immunoprecipitació d'HERC1 utilitzant l'anticòs policlonal anti HERC1, Bvg6, en cèl·lules HEK-293T *wild type* i en cèl·lules que sobre-expressaven TSC2 i TSC1 (Figura 48). Per comprovar l'especificitat de l'immunoprecipitació d'HERC1 aquests experiments es van realitzar en presència de diferents quantitats d'un pèptid constituït per els 155 primers residus de l'extrem N terminal de la proteïna HERC1 el qual havia estat utilitzat com a immunogen per a la generació d'aquest anticòs. Al mateix temps, vàrem realitzar també l'experiment a l'inversa, és a dir immunoprecipitant TSC2, per determinar si la proteïna HERC1 co-immunoprecipitava (Figura 48).

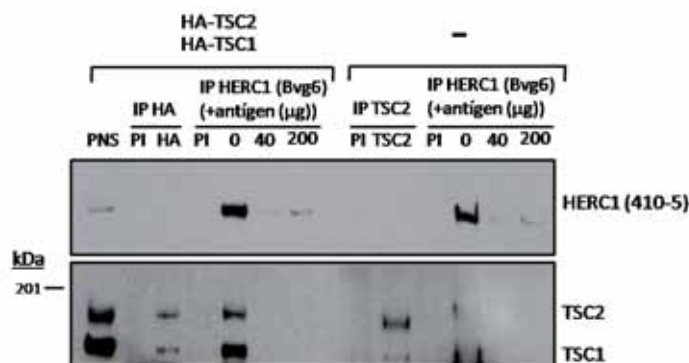


Figura 48. Interacció d'HERC1 amb el complex TSC2/TSC1 endògen o sobreexpressat. Cèl·lules HEK-293T van ser transfectades o no amb HA-TSC2 i HA-TSC1 durant 24 hores. A continuació, es van realitzar experiments d'immunoprecipitació (IP) d'HERC1 amb l'anticòs anti HERC1, Bvg6, en presència de 0, 40 o 200 µg de l'antigen utilitzat per a la generació d'aquest anticòs, o bé de TSC2 amb els anticossos anti TSC2 (cèl·lules *wild type*) o anti HA (cèl·lules transfectades), o bé amb sèrum pre-immunitzat (PI). Finalment es van analitzar les proteïnes immunoprecipitades per western blot mitjançant els anticossos anti HERC1, 410, anti TSC2 i anti TSC1. PNS: *post nuclear supernatant*.

Com es mostra en la Figura 48, tant a partir dels llisats de cèl·lules transfectades com dels llisats de cèl·lules *wild type*, únicament vàrem poder co-immunoprecipitar TSC2 en aquelles condicions en les quals no s'havia afegit antigen als llisats cel·lulars (condicions 0 µg). A més a més, vàrem observar que l'altre membre del complex de l'esclerosi tuberosa, la proteïna TSC1, també baixava associada a HERC1 en totes dues condicions, i tal com era d'esperar, la co-immunoprecipitació de totes dues proteïnes va ser major en els experiments realitzats a partir de cèl·lules que sobre-expressaven TSC2 i TSC1. En la IP de TSC2 realitzada mitjançant un anticòs específic contra aquesta proteïna (Figura 48, condició -), o bé amb un anticòs anti HA (Figura 48, condició TSC2 HA/TSC1 HA), es va produir la co-immunoprecipitació de TSC1, però en canvi, en cap cas vàrem poder observar la presència de HERC1 en els immunoprecipitats. Aquest fet podria ser degut a que únicament una petita fracció de la població de HERC1 interacciona amb TSC2, i per tant, els nivells d'HERC1 que co-immunoprecipiten amb TSC2 no arriben a ser suficients per a la seva detecció. Aquests experiments ens van confirmar l'existència de la interacció entre HERC1 i TSC2 que havia estat descrita prèviament, però a més a més, ens van permetre identificar la interacció d'HERC1 amb l'altre membre del complex de l'esclerosi tuberosa, la proteïna TSC1.

Donat que HERC1 era capaç d'interaccionar amb tots dos membres del complex TSC, i tenint en compte que l'associació entre TSC2 i TSC1 és crítica per a l'activitat GAP de TSC2 sobre Rheb (Benvenuto *et al.*, 2000), ens vàrem preguntar si la interacció d'HERC1 amb aquestes proteïnes depenia de l'associació entre TSC2 i TSC1, i si també tenia lloc amb la forma lliure d'aquestes proteïnes. Amb aquesta idea vàrem realitzar experiments de immunoprecipitació de HERC1 utilitzant diferents

anticossos contra HERC1, com el 363 que reconeix el fragment comprès entre els residus 3684 i 3745 de les repeticions β d'HERC1, el 410-5 que reconeix el fragment del domini RLD2 comprès entre els residus 4001 i 4385 (i l'equivalent en el domini RLD1), el 417 que reconeix el fragment del domini HECT comprès entre els residus 4408 i 4861, i els anticossos Bvg5 i Bvg6 que reconeixen el fragment comprès entre els residus 1 i 155 de l'extrem N terminal d'HERC1. Aquests experiments els vàrem realitzar en dues condicions; en cèl·lules transfectades únicament amb TSC2 i que per tant presentaven un excés d'aquesta proteïna en forma lliure, o bé en cèl·lules transfectades amb TSC2 i TSC1 simultàniament (Figura 49).

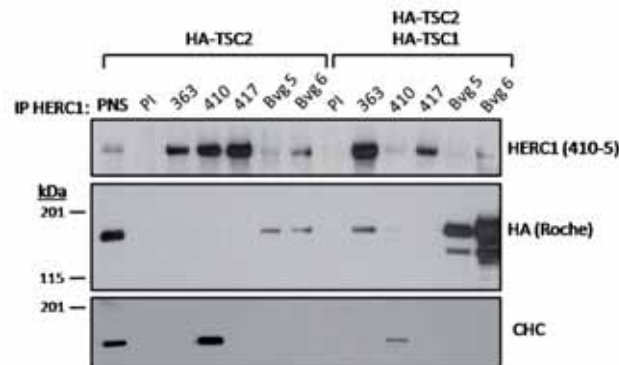


Figura 49. Interacció d'HERC1 amb TSC2 o TSC2/TSC1 sobreexpressat. Cèl·lules HEK-293T es van transfectar amb HA-TSC2, HA-TSC1 o bé únicament amb HA-TSC2 durant 24 hores. Posteriorment, amb els llisats d'aquestes cèl·lules es van realitzar experiments d'immunoprecipitació de HERC1 amb els anticossos anti HERC1, 363, 410, 417, Bvg5 i Bvg6, o bé amb sèrum pre-immune (PI). Finalment, es van analitzar per western blot les proteïnes immunoprecipitades utilitzant els anticossos anti HERC1 410-5, anti HA i anti CHC. Com a control d'aquests experiments es va analitzar la co-immunoprecipitació de la cadena pesada de la clatrina (CHC), una proteïna la interacció de la qual amb HERC1 ha estat descrita prèviament (Rosa *et al.*, 1996; Rosa i Barbacid, 1997).

En ambdues condicions, els cinc anticossos anti HERC1 emprats van ser capaços de immunoprecipitar HERC1 amb major o menor eficiència (Figura 49). No obstant, no en tots els casos vàrem observar la co-immunoprecipitació de TSC2 i TSC1; en els experiments realitzats a partir de cèl·lules que únicament sobre-expressaven TSC2, només els anticossos Bvg5 i Bvg6 van ser capaços d'immunoprecipitar TSC2. Aquests anticossos reconeixen un fragment de la proteïna HERC1 que correspon als residus més allunyats de la zona descrita de ser responsable de la interacció amb TSC2 (residus 3001-3900 i 3901-Ct) (Chong-Kopera *et al.*, 2006) i per tant, tot i que actualment no es té informació del plegament d'HERC1, és possible que la unió de la resta d'anticossos a HERC1 provoqués la dissociació de TSC2. En els experiments realitzats a partir de cèl·lules que sobre-expressaven TSC2 i TSC1 simultàniament, la co-immunoprecipitació de TSC2 va tenir lloc de forma notable amb els anticossos Bvg5 i Bvg6, però també, tot i que lleugerament (sobretot amb el 410), amb els anticossos 363 i 410. Aquest fet, juntament amb l'observació que en aquestes condicions la co-immunoprecipitació de TSC2 amb els anticossos Bvg5 i Bvg6 tenia lloc a uns nivells molt majors que en les cèl·lules que únicament sobre-expressaven TSC2, ens va suggerir que quan TSC2 i TSC1 es trobaven associades, la seva interacció amb HERC1 era major que quan es trobaven en forma lliure, i que d'alguna manera HERC1 podria actuar estabilitzant el complex TSC. A més a més, en l'immunoprecipitació d'HERC1 a partir de cèl·lules que sobre-expressaven TSC2 i TSC1 simultàniament, vàrem poder confirmar l'associació de HERC1 i TSC1 observada en els experiments anteriors (Figura 48). En aquesta condició, en l'immunoprecipitació d'HERC1 realitzada amb els anticossos 363 i 410 no vàrem poder detectar la co-immunoprecipitació de TSC1. Tal i com s'ha comentat anteriorment, els anticossos 363 i 410 reconeixen HERC1 per una zona que es troba propera a la zona d'HERC1 per on té lloc l'unió amb TSC2 i per tant és possible que l'unió d'aquests anticossos desplaçessin les molècules de TSC2 i TSC1 unides a HERC1 fins al punt que el nombre de molècules de TSC1 capaces de co-immunoprecipitar amb HERC1 no s'arriba a poder detectar. En aquest sentit, cal tenir en compte que els nivells de TSC1 que co-immunoprecipiten amb HERC1 són menors que els de TSC2. En aquestes condicions vàrem observar una quantitat molt

menor també de la co-immunoprecipitació de TSC2, en comparació a la que tenia lloc mitjançant els anticossos Bvg5 i Bvg6.

4.2.2.1 | Interacció HERC1 amb mutants de TSC2 (R611Q i R905Q)

A partir d'estudis genètics d'individus que pateixen la malaltia de l'esclerosi tuberosa s'han identificat diverses mutacions puntuals en els gens de TSC2 i TSC1 que provoquen un mal funcionament del complex TSC que implica un augment descontrolat del creixement cel·lular degut a una activació constitutiva de mTOR i dels seus substrats (Benvenuto *et al.*, 2000). La major part de les mutacions responsables d'aquesta malaltia identificades impliquen substitucions puntuals d'aminoàcids en la proteïna TSC2. D'entre totes elles, l'estudi de la mutació TSC2 R611Q ha permès observar que aquest mutant afecta a l'estabilitat de TSC1 i provoca la disrupció del complex. A més a més, aquest mutant, a diferència de la proteïna TSC2 *wild type*, no pot ser fosforilat a través de l'Akt, no és capaç de disminuir els nivells de fosforilació de la treonina 389 de la S6K ni de les serines 235 i 236 de la proteïna ribosomal S6, i no presenta activitat GAP sobre Rheb (Nellist *et al.*, 2001 i 2005). Una altra de les mutacions identificades, la TSC2 R905Q, presenta les mateixes característiques que la TSC2 R611Q excepte que si que és capaç d'associar-se a TSC1 i si pot ser fosforilat a través de l'Akt (Nellist *et al.*, 2001 i 2005).

Degut a la interacció observada entre HERC1 i les proteïnes TSC2 i TSC1, sobretot quan aquestes eren es trobaven formant un complex (Figures 48 i 49), ens vàrem preguntar si HERC1 era capaç d'interaccionar amb aquests mutants de TSC2 que impedeixen una correcta funcionalitat del complex TSC en la regulació de la via de senyalització de mTOR. Per fer-ho vàrem co-transfectar cèl·lules HEK-293 amb TSC1 i amb un d'aquests mutants de TSC2 o bé amb la forma *wild type* i vàrem realitzar experiments d'immunoprecipitació d'HERC1 mitjançant l'anticòs anti HERC1, Bvg6 (Figura 50).

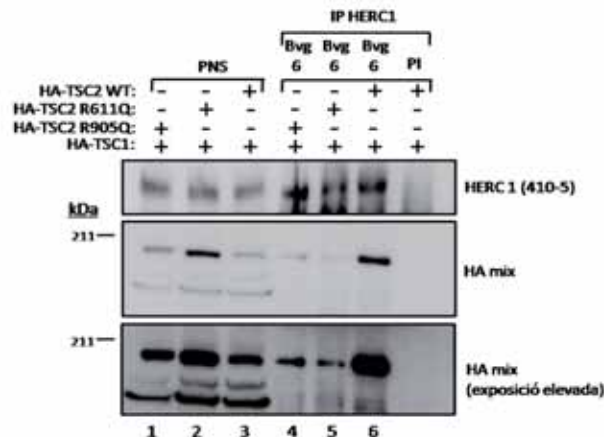


Figura 50. Interacció HERC1 amb mutants de TSC2. Cèl·lules HEK-293 van ser transfectades amb HA-TSC1 i amb HA TSC2 *wild type*, o bé amb les formes mutants de TSC2, R611Q o R905Q, durant 48 hores. A continuació, es van realitzar experiments d'immunoprecipitació d'HERC1 (IP) a partir dels llisats d'aquests cèl·lules, amb l'anticòs anti HERC1, Bvg6. Finalment es van analitzar les proteïnes immunoprecipitades amb els anticossos anti HERC1 410-5, o anti HA. PNS: *post nuclear supernatant*.

Com es mostra en la Figura 50, tots els plasmidis que codificaven per aquestes proteïnes es van expressar (carrils 1,2,3), i si bé l'expressió de la forma *wild type* de TSC2 ho va fer a uns nivells una mica inferiors als de la resta de proteïnes (carril 3), la seva co-immunoprecipitació amb HERC1 va tenir lloc en major grau que la observada per als mutants de TSC2 (carrils 4 i 5), indicant-nos que la interacció entre HERC1 i els mutants de TSC2 era feble. Tot i que no ha estat demostrat, aquest fet podria ser la causa de la major inestabilitat i a la incapacitat de generar complexos TSC funcionals que s'ha descrit per aquestes formes mutants de TSC2 (Hodges *et al.*, 2001; Inoki *et al.*, 2002; Nellist *et al.*, 2005).

4.2.2.2 | Paper d'HERC1 en l'estabilitat del complex TSC2/TSC1

Per tal de comprovar que realment HERC1 afectava a l'estabilitat de TSC2 vàrem mesurar el temps de vida mitja de TSC2 en cèl·lules *wild type* i en cèl·lules amb el gen d'HERC1 silenciats. Per fer-ho vàrem silenciar l'expressió de del gen d'HERC1 mitjançant ARN d'interferència en cèl·lules HeLa que posteriorment vàrem tractar amb l'inhibidor de la síntesi de proteïnes, cicloheximida, a diferents temps. A continuació, vàrem analitzar els nivells totals de TSC2 per western blot, així com els nivells de mTOR, actina i c-myc, les dues darreres com a control de càrrega i de l'efecte de la cicloheximida respectivament (Figura 51).

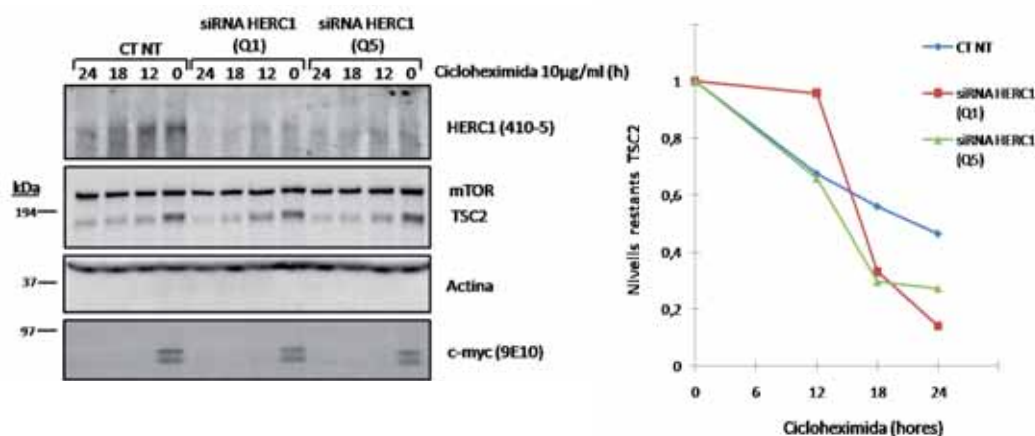


Figura 51. Efecte de la silenciació d'HERC1 en el temps de vida mitja de TSC2. Cèl·lules HeLa van ser transfectades amb els oligonucleòtids per ARN d'interferència contra HERC1, Q1 o Q5, o bé amb un oligonucleòtid *non targeting* (NT), a una concentració final de 50 nM durant 72 hores. Abans de processar les cèl·lules, aquestes es van tractar amb cicloheximida a una concentració final de 10 µg/ml, durant 0, 12, 18 o 24 hores. Finalment es van analitzar els nivells totals de HERC1, mTOR, TSC2, actina i c-myc per western blot mitjançant anticossos específics. Es mostra la quantificació relativa de TSC2 respecte el temps zero de tractament amb cicloheximida (el qual es va establir com a 1), per a cada condició. Per a la normalització de les bandes de TSC2 es van utilitzar els nivells de mTOR.

El tractament amb cicloheximida ens va permetre observar una disminució del temps de vida mitja de TSC2 en aquelles cèl·lules en les quals s'havia silenciat HERC1, tant amb l'oligonucleòtid Q1 com amb el Q5, tot i que aquest efecte era especialment notable en les cèl·lules transfectades amb l'oligonucleòtid Q1. En aquest cas, el temps de vida mitja de TSC2 va ser aproximadament de 16 hores, i a les 24 hores de tractament amb cicloheximida es va produir una disminució dels nivells de TSC2 de gairebé un 90% aproximadament que coincidia amb una absència gairebé del 100% dels nivells d'HERC1. En canvi, en les cèl·lules control, el temps de vida mitja aproximant de TSC2 era de 21 hores, i a les 24 hores del tractament amb cicloheximida, la reducció dels nivells de TSC2 va ser únicament del 50% aproximadament. Els nivells totals de mTOR es van mantenir constants durant tot el tractament tant en les cèl·lules en les quals s'havia silenciat HERC1 com en les cèl·lules control, indicant-nos que HERC1 no afectava a l'estabilitat d'aquesta proteïna. A les 12 hores del tractament amb cicloheximida, els nivells de c-myc, una proteïna amb un temps de vida mitja curt, van desaparèixer completament confirmant l'efecte de la cicloheximida en la inhibició de la síntesi de proteïnes. Com a control de càrrega en aquests experiments vàrem analitzar els nivells d'actina. Aquestes dades ens van permetre confirmar els resultats mostrats prèviament que indicaven que HERC1 estabilitzava TSC2 i el complex TSC. A més a més, el fet que en els experiments de siRNA de HERC1 sense cicloheximida no s'observessin variacions en els nivells totals de TSC2 (ni tampoc de TSC1, mTOR i p70S6K (Figura 53)), ens varen indicar que HERC1 més que actuar com a E3 ubiquitina lligasa per aquesta proteïna, tal i com havia estat proposat prèviament (Chong-Kopera *et al.*, 2006), podria estar influïent d'alguna manera en la síntesi de proteïnes.

4.2.3 | HERC1 en la regulació de la via de senyalització de mTOR

mTOR (també anomenada FRAP, RAFT, RAPTo SEP) és una serina/treonina quinasa multidomini de 290 kDa de pes molecular, que pertany a la família de les PIKKs (*phosphatidylinositol kinase-related kinase*) (Fingar i Blenis, 2004; Wullschleger *et al.*, 2006). Aquesta proteïna es troba en les cèl·lules formant part de dos complexos multimèrics, mTORC1 i mTORC2, que es diferencien per les proteïnes que els conformen, per la seva sensibilitat a la rapamicina i per les funcions que regulen. A través d'aquests complexos mTOR participa en diverses funcions fisiològiques relacionades amb el creixement, el cicle cel·lular, la morfologia, la mobilitat i la supervivència cel·lular entre d'altres (veure introducció apartat 1.2 La via de senyalització de mTOR).

Dels dos complexos que forma mTOR, poca és la informació que es té actualment sobre el mecanisme d'activació de mTORC2. Si es coneixen en canvi, varis dels estímuls i mecanismes que porten a l'activació del complex mTORC1. Els factors de creixement com la insulina i els nutrients com els aminoàcids activen mTOR a través de diferents mecanismes. El mecanisme d'activació de mTOR a través de factors de creixement és força conegut i té lloc a través de l'eix de transducció de senyal que formen les proteïnes PI3K (de classe I)/Akt/complex TSC/Rheb/mTOR. Quan la insulina s'uneix al receptor de l'insulina (IR) aquest forma un dímer i es produeix l'autofosforilació de diverses tirosines dels seus dominis citoplasmàtics que un cop fosforilades recluten a les proteïnes adaptadores IRS1 i IRS2 (amb dominis PTB (*phosphotyrosine-binding domains*)), que també són fosforilades en diverses tirosines pel receptor (White, 1998). Un determinat nombre d'aquestes fosfo-tirosines (tant del receptor IR com dels adaptadors IRS) actuen com a punts d'ancoratge per a la subunitat reguladora de la PI3K de classe I, p85, produint-se la translocació a la membrana plasmàtica de la subunitat catalítica p110 d'aquesta quinasa des d'on catalitza la síntesi de fosfatidils inositol-3,4,5-trifosfat (PIP₃) a partir de fosfatidils inositol-4,5-bifosfat (PIP₂) (un procés que pot ser revertit per la fosfatasa lipídica i supressor tumoral PTEN (*phosphatase and tensin homolog*)). Els dominis homòlegs a la pleckstrina (dominis PH) presenten una gran afinitat pels PIP₃, i per tant, l'aparició d'aquests en la membrana plasmàtica promou el reclutament de proteïnes que contenen aquests dominis com la PDK1 i l'Akt. A continuació, l'Akt s'activa per mitjà de la fosforilació de la seva treonina 308 via PDK1, i inhibeix els reguladors negatius de mTORC1, PRAS40 i TSC (complex de l'esclerosi tuberosa) possibilitant l'activació de mTOR.

El mecanisme d'activació de mTORC1 a través d'aminoàcids transcorre per un mecanisme no del tot conegut que és diferent al que té lloc via factors de creixement. Existeixen estudis que apunten que el complex TSC participa en aquest mecanisme (Gao *et al.*, 2002) i estudis que indiquen que no i que l'activació es produeix per estimulació directa de Rheb (Saucedo *et al.*, 2003; Nobukuni *et al.*, 2005; Smith *et al.*, 2005). En els últims anys s'han descrit diverses proteïnes que participen en l'activació de mTORC1 per aminoàcids de forma independent del complex TSC, entre les quals es troben la PI3K de classes 3 o hVps34, les GTPases Rag, i la MAP4K3. No obstant, si sembla acceptada la participació de Rheb en l'activació de mTORC1 per nutrients (Long *et al.*, 2005; Smith *et al.*, 2005) (veure introducció apartat 1.2.3.2 Activació mTOR per nutrients (aminoàcids)).

4.2.3.1 | Estudi de l'efecte de l'activació de mTOR en l'interacció HERC1-TSC2/TSC1

El complex TSC2/TSC1 actua com a regulador negatiu de mTOR en resposta a diferents estímuls extracel·lulars que provoquen la inactivació del complex TSC. El mecanisme d'inhibició del complex TSC ha generat força debat en la bibliografia. Mentre que en la majoria d'estudis no s'ha observat que la fosforilació de TSC2 a través de l'Akt afecti a la interacció entre TSC2 i TSC1, i tot i que alguns autors han descrit que la fosforilació de TSC2 via Akt implica la degradació de TSC2 i TSC1 a llarg

termini (fet que no explica els efectes immediats de l'Akt en l'activació de mTOR) (Plas i Thompson, 2003), altres autors han proposat el model contrari segons el qual la fosforilació de TSC2 si implicaria la disrupció del complex TSC (Potter *et al.*, 2002). D'acord amb aquest segon model, s'ha proposat que la fosforilació de la serina 939 i la treonina 1462 de TSC2 a través de la via PI3K/Akt en resposta a factors de creixement podria alterar la localització subcel·lular de TSC2 (però no de TSC1 ni de Rheb) desde membranes internes (on es trobaria TSC1 i Rheb) cap al citosol, impedit-li exercir la seva activitat GAP sobre Rheb (Cai *et al.*, 2006). Aquest model però implicaria una ràpida separació de TSC2 de TSC1 en resposta a la fosforilació de TSC2, fenòmen que no ha estat detectat en la majoria d'estudis realitzats fins a dia d'avui. També s'ha descrit que la fosforilació de les serines 939 i/o 981 i de la treonina 1462 de TSC2 en resposta a l'activació de la PI3K genera un lloc d'unió per a proteïnes de la família 14-3-3 i per tant és probable que la unió de proteïnes d'aquesta família, a formes fosforilades en els residus mencionats de TSC2 contribueixi a la inhibició de TSC2 via Akt (Cai *et al.*, 2006; Deyoung *et al.*, 2008). Per altre banda, també s'ha descrit que la fosforilació de les serines 540 i 664 (residus fosforilats directament a través de la Erk i que contribueixen a l'activació de mTORC a través d'aquesta MAPK) provoquen la disrupció de l'associació entre TSC2 i TSC1 (Ma *et al.*, 2005).

Donat que havíem observat que la interacció d'HERC1 amb TSC2 tenia lloc especialment quan TSC2 i TSC1 es trobaven formant un complex (Figures 48 i 49), vàrem voler estudiar la interacció d'aquestes proteïnes amb HERC1 en resposta a diferents estímuls que provoquen l'activació de mTOR com els aminoàcids i la insulina. Amb aquesta idea vàrem realitzar experiments d'immunoprecipitació de HERC1 a partir de llisats de cèl·lules HEK-293T a les quals prèviament havíem inhibït o activat la via de senyalització de mTOR (Figura 52).

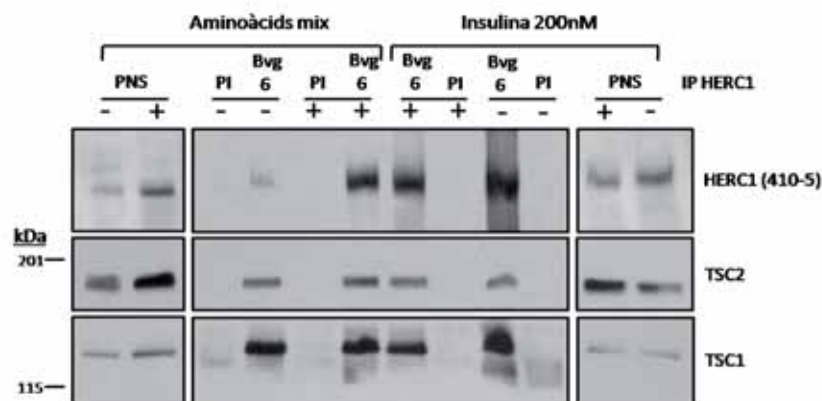


Figura 52. Efecte de l'activació o inhibició de mTOR en la interacció entre HERC1 i les proteïnes TSC2 i TSC1. Cèl·lules HEK-293T van ser dejunades de sèrum durant 24 hores i d'aminoàcids durant 2 hores, o bé únicament de sèrum (condicions -), i a continuació van ser estimulades amb una barreja d'aminoàcids o bé amb insulina a 200nM durant 30 minuts respectivament (condicions +). Seguidament es van realitzar experiments d'immunoprecipitació d'HERC1 amb l'anticòs anti HERC1, Bvg6, o bé amb sèrum pre-immune (PI), i es va analitzar la co-immunoprecipitació de TSC2 i TSC1 en les diferents condicions mitjançant western blot.

PNS: *post nuclear supernatant*.

Com es mostra en la Figura 52, en totes les condicions analitzades vàrem poder co-immunoprecipitar les proteïnes TSC2 i TSC1 endògenes amb l'anticòs anti HERC1, Bvg6. No obstant, no vàrem observar diferències entre els experiments realitzats a partir de cèl·lules amb la via de mTOR inhibida o activada amb aminoàcids o insulina, indicant que la interacció de TSC2 i TSC1 amb HERC1 era totalment independent de l'estat d'activació del complex TSC.

Tot i que aquestes dades podrien fer-nos pensar que l'activació de mTOR no implica un canvi en la interacció entre TSC2 i TSC1, cal tenir en compte que en aquest experiment es van analitzar els PNSs

(*post nuclear supernatants*), els quals contenen tant membranes internes com citosol, i per tant, tenint en compte que HERC1 es troba localitzada tant en el citosol com en membranes internes (Rosa *et al.*, 1996), no podem descartar que l'activació de mTOR impliqui un canvi en la localització subcel·lular del complex HERC1/TSC. Si això fos així, aquests resultats indicarien que l'interacció d'HERC1 i TSC2 es manté tot i la modificació de la localització subcel·lular de TSC2 en resposta a l'estimulació de les cèl·lules. Per altre banda, tot i que la interacció de TSC2 i TSC1 amb HERC1 té lloc preferentment quan aquestes es troben associades, hem observat que aquesta interacció també té lloc, tot i que en menor grau, quan es troben en la seva forma lliure, i per tant, podria ser que l'estimulació de les cèl·lules amb aminoàcids o insulina provoqués un augment de la interacció de HERC1 amb TSC2 en el citosol i amb TSC1 en membranes internes.

Tot i no observar diferències en la interacció de HERC1 amb TSC2 i TSC1 en resposta a l'activació de mTOR per aminoàcids o insulina, el fet que no es conegui exactament el mecanisme d'inactivació del complex TSC i que s'hagin identificat noves proteïnes que interaccionen amb TSC2 i que participen en la inactivació del complex, com les proteïnes de la família 14-3-3, i davant la possibilitat que HERC1 pogués participar en l'unió d'aquestes proteïnes al complex TSC, o bé facilitar la translocació de TSC2 des de endomembranes cap al citosol per exemple, ens vàrem plantejar l'estudi de la regulació de l'activitat de mTOR per part de HERC1.

4.2.3.2 | Estudi del paper d'HERC1 en la regulació de la S6K, l'Akt i 4EBP1

A través de mTORC1, mTOR regula varis processos fisiològics relacionats amb el creixement cel·lular entre els quals es troben la traducció d'ARNs missatgers (a través de l'activació de la proteïna S6K i la inhibició del factor 4EBP1 (*eIF4E binding protein*) (Hay i Sonenberg, 2004; Tee i Blenis, 2005)), l'autofàgia (a través de la fosforilació de la proteïna Atg13, impedit la unió d'aquesta amb l'Atg1 (Abeliovich *et al.*, 2000 i 2003; Kamada *et al.*, 2000)), i la biogènesi de ribosomes (a través de la regulació de la transcripció i maduració de l'ARN ribosomal (ARNr), de la transcripció i traducció dels gens que codifiquen per a les proteïnes ribosomals (RPs) i de la transcripció de l'ARN 5S (Schmelzle i Hall, 2000; Kim *et al.*, 2003)).

Per altre banda, el complex mTORC2 es localitza a la membrana plasmàtica, està constituït per les proteïnes Rictor, mLST8 (o GβL), mSin1, i Protor PRR5 (o PRR5L), i tot i que va ser descrit inicialment com a complex insensible a la rapamicina, actualment s'ha vist que en determinades línies cel·lulars i a determinades concentracions també presenta certa sensibilitat a aquest compost (Sarbasov *et al.*, 2006; Akcakanat *et al.*, 2007; Rosner i Hengstschlãger, 2008). Varis processos fisiològics depenen de mTORC2, com la regulació del citoesquelet d'actina a través de Rho i Rac (Nakashima *et al.*, 2002; Jacinto *et al.*, 2004; Sarbasov *et al.*, 2004; Guertin *et al.*, 2006) i la supervivència cel·lular a través de la regulació de l'activació de l'Akt (Sarbasov *et al.*, 2004 i 2005).

Per tal de determinar si HERC1 participava en la regulació d'algun d'aquests processos fisiològics esmentats vàrem analitzar per western blot l'activació en resposta a aminoàcids o insulina d'alguns dels substrats de mTOR com la fosforilació de la treonina 389 de la p70 S6K (indicativa d'activitat mTORC1) o la fosforilació de la serina 473 de l'Akt (indicativa d'activitat mTORC2) a partir de cèl·lules HeLa a les quals havíem silenciat prèviament el gen d'HERC1 mitjançant ARN d'interferència (Figura 53). Els tractaments realitzats com el dejuni de sèrum, la deprivació i activació amb aminoàcids, i

l'activació amb insulina es van realitzar tal i com ha estat descrit prèviament (Hara *et al.*, 1998; Nobukuni *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2005).

Com es mostra en la Figura 53 A i B, la silenciació d'HERC1 no va provocar alteracions significatives en els nivells de fosforilació de cap d'aquestes proteïnes en resposta a aminoàcids o insulina, ni tampoc en els nivells totals de mTOR, TSC2 o TSC1. A més a més, ni la silenciació d'HERC2 ni la silenciació conjunta de HERC1 i HERC2 (realitzada amb l'objectiu d'evitar una possible compensació de funció per part d'HERC2 al silenciar HERC1) van alterar els nivells de cap de les proteïnes analitzades. Aquestes dades ens van indicar que ni HERC1, ni tampoc HERC2, estaven exercint un paper regulador en l'activitat de mTORC1 ni mTORC2 almenys sobre aquests substrats.

Curiosament, en els experiments realitzats amb aminoàcids vàrem poder observar la fosforilació de la serina 473 de l'Akt (Figura 53 B), que indicava un paper de la senyalització per aminoàcids en l'activació del complex mTORC2 que no havia estat descrit. A més a més vàrem comprovar que l'activació per aminoàcids també era capaç d'induir la fosforilació de la treonina 308 de l'Akt (Figura 53 C), una fosforilació que té lloc a través de la PDK1 (Mora *et al.*, 2004) i que fins aleshores sols s'havia relacionat amb la senyalització per insulina (i que vàrem comprovar que també té lloc de forma independent d'HERC1). A més a més, a diferència de l'estimulació de les cèl·lules amb insulina, en l'anàlisi de la fosforilació de la treonina 389 de la p70 S6K1 en resposta a aminoàcids vàrem observar que l'anticòs anti T389 p70 S6K1 detectava una banda amb una mobilitat semblant a la isoforma p85 S6K1, però no la banda corresponent a la isoforma p70 de la S6K1. L'estudi i caracterització de la fosforilació d'aquesta proteïna en resposta a aminoàcids ha estat també tema d'estudi en aquest treball i es mostra en l'apartat 4.3 dels resultats.

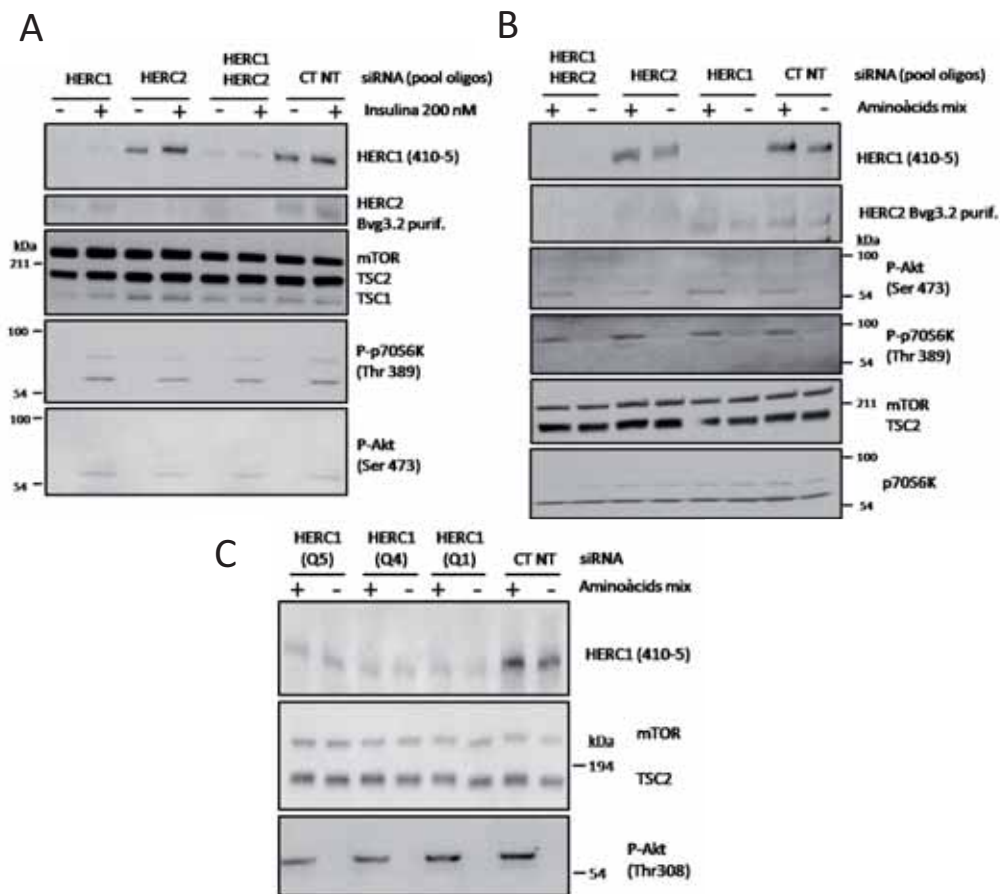


Figura 53. Efecte de la silenciació d'HERC1 en la fosforilació de la treonina 389 de la p70 S6K i de la serina 473 i la treonina 308 de l'Akt en resposta a insulina i/o aminoàcids. Cèl·lules HeLa van ser transfectades amb una barreja d'oligonucleòtids per ARN d'interferència contra HERC1, HERC2, o HERC1 i HERC2 (A i B), o bé amb els oligonucleòtids per separat Q1, Q4 i Q5 (C). Com a control es van transfectar les cèl·lules amb un oligonucleòtid *non targeting* (CT NT). Totes les transfeccions es van realitzar a una concentració final de 50nM, durant 72 hores. A. 24 abans del seu processament les cèl·lules es van dejunar de sèrum durant 24 hores (condicions -), i es van estimular amb insulina a 200nM durant 30 minuts (condicions +). B i C. 24 abans del seu processament les cèl·lules es van dejunar de sèrum durant 24 hores i d'aminoàcids durant 2 hores (condicions -), i es van estimular amb una barreja d'aminoàcids durant 30 minuts (condicions +). Finalment, es van analitzar per western blot els nivells de fosforilació de la treonina 389 de la p70 S6K i de la serina 473 i treonina 308 de l'Akt.

Per confirmar que HERC1 no regulava l'activació de la p70 S6K en resposta a insulina o aminoàcids vàrem analitzar també la fosforilació de les treonines 421/424 de la S6K a partir de cèl·lules HeLa amb el gen d'HERC1 silenciats per ARN d'interferència, ja que s'ha descrit que la fosforilació d'aquests residus també es crítica per a l'activació de la quinasa p70 S6K1 (Billington *et al.*, 2005; Fumarola *et al.*, 2005). Amb el mateix objectiu vàrem analitzar la fosforilació en les serines 235 i 236 del substrat de la p70S6K, la proteïna ribosomal S6 (rp S6) (Figura 54).

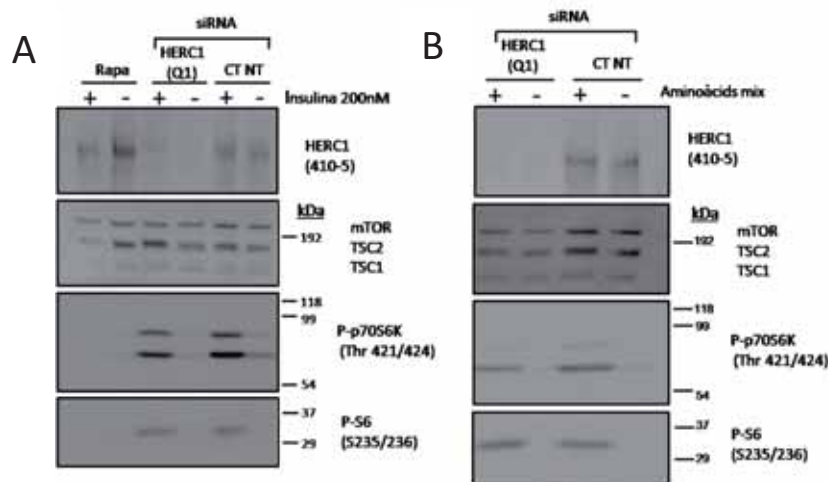


Figura 54. Efecte de la silenciació d'HERC1 en la fosforilació de la treonines 421 i 424 de la p70 S6K i de les serines 235 i 236 de la proteïna ribosomal S6. Cèl·lules HeLa van ser transfectades amb l'oligonucleòtid per ARN d'interferència d'HERC1, Q1, o bé amb un oligonucleòtid *non targeting* (NT), a una concentració final de 50nM durant 72 hores. A. 24 abans del seu processament les cèl·lules es van dejunar de sèrum durant 24 hores (condicions -), i es van estimular amb insulina a 200nM durant 30 minuts (condicions +). Com a control de l'activació de mTORC1, en una de les condicions en les quals no s'havia silenciats HERC1, les cèl·lules es van tractar amb l'inhibidor de mTOR rapamicina abans de l'estimulació, observant tal i com esperàvem, la no fosforilació de la p70 S6K ni de la rp S6 en aquestes condicions. B. 24 abans del seu processament les cèl·lules es van dejunar de sèrum durant 24 hores i d'aminoàcids durant 2 hores (condicions -), i es van estimular amb una barreja d'aminoàcids durant 30 minuts (condicions +). Finalment, es van analitzar per western blot els nivells de fosforilació de les treonines 421 i 424 de la p70 S6K i de les serines 235 i 236 de la proteïna ribosomal S6, així com els nivells totals de les proteïnes HERC1, mTOR, TSC2 i TSC1 mitjançant anticossos específics.

Com es mostra en la Figura 54, la disminució dels nivells d'HERC1 no van afectar la fosforilació dels residus T421/424 de la p70 S6K ni tampoc la fosforilació de les serines 235/236 de la proteïna rp S6, com si vàrem observar al tractar les cèl·lules amb rapamicina abans de la seva activació (Figura 54, A), confirmant-nos que HERC1 no participava en regulació de l'activació de la p70 S6K.

Donat que la silenciació d'HERC1 no modificava l'activació de la p70 S6K vàrem pensar que potser participava en la regulació de l'activació d'algun altre substrat de mTORC1. Una de les proteïnes fosforilades per mTOR àmpliament utilitzada també com a reporter de l'activitat de mTORC1 és el factor de la família de repressors de la traducció, 4EBP1 (Hay i Sonenberg, 2004; Tee i Blenis, 2005). Per intentar determinar si HERC1 regulava l'activació d'aquest factor vàrem analitzar el grau de fosforilació de les seves treonines 37 i 46 en resposta a insulina, en cèl·lules a les quals havíem silenciats prèviament

el gen d'HERC1 mitjançant ARN d'interferència. Com a control de la fosforilació mTOR dependent de 4EBP1, en una de les condicions vàrem tractar cèl·lules HeLa *wild type* amb rapamicina abans de l'estimulació amb insulina (Figura 55 A).

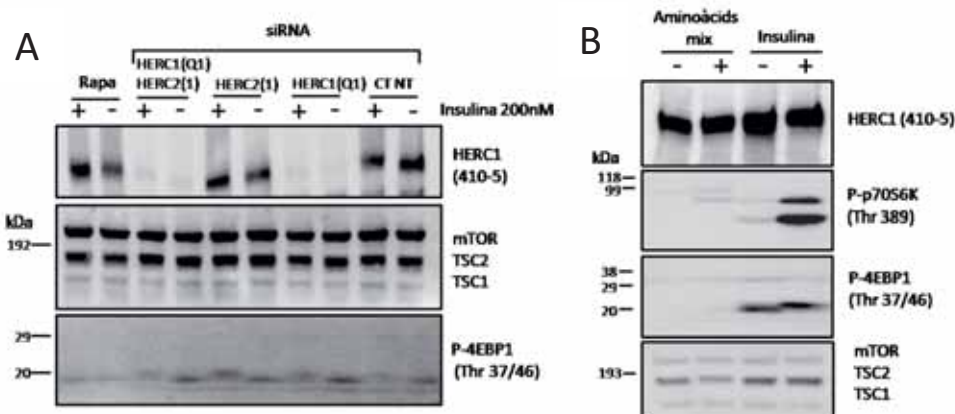


Figura 55. A. Efecte de la silenciació d'HERC1 en la fosforilació de les treonines 37 i 46 del factor 4EBP1. Cèl·lules HeLa van ser transfectades amb els oligonucleòtids d'ARN d'interferència contra HERC (Q1), contra HERC2 (H21), o contra HERC1 i HERC2 (Q1+H21), o bé amb un oligonucleòtid *non targeting* (NT), a una concentració final de 50nM, durant 72 hores. 24 hores abans de processar les cèl·lules, aquestes es van dejunar de sèrum durant 24 hores (condicions -), i es van estimular amb insulina a una concentració final de 200nM durant 30 minuts (condicions +). Finalment, es va analitzar per western blot els nivells de fosforilació de les treonines 37 i 46 del factor 4EBP1, així com els nivells totals de les proteïnes HERC1, mTOR, TSC2 i TSC1 mitjançant anticossos específics. Com a control de la fosforilació via mTOR del factor 4EBP1, en paral·lel es van tractar cèl·lules HeLa *wild type* amb rapamicina durant 30 minuts abans del tractament amb insulina, a una concentració final de 20nM.

B. Comparativa activació p70 S6K1 i 4EBP1 en resposta a aminoàcids i insulina. Cèl·lules HeLa van ser dejunades de sèrum durant 24 hores i estimulades amb insulina 200nM durant 30 minuts, o bé dejunades de sèrum durant 24 hores i d'aminoàcids durant dues hores i estimulades durant 30 minuts amb una barreja d'aminoàcids. A continuació es van analitzar per western blot les proteïnes indicades mitjançant anticossos específics. S'observa la fosforilació de la "p85 like" en resposta a aminoàcids i la no detecció de la proteïna 4EBP1 en els experiments de d'activació amb aminoàcids.

En aquest experiment no vàrem analitzar la fosforilació de 4EBP1 en resposta a aminoàcids ja que sorprenentment, tant en cèl·lules deprivades de sèrum i aminoàcids com en cèl·lules estimulades posteriorment amb aminoàcids d'acord amb els protocols descrits per Hara *et al.*, 1998, Nobukuni *et al.*, 2005 i Wang *et al.*, 2005, no vàrem poder detectar la fosforilació de 4EBP1 amb el mateix anticòs que s'havia utilitzat en els experiments amb insulina (Figura 55 B).

Com es mostra en la Figura 55A, en les cèl·lules tractades amb rapamicina no es va induir el "shift" característic de la fosforilació de 4EBP1, confirmant-nos la no fosforilació d'aquesta proteïna a través de mTOR en resposta a insulina. A l'igual que per a la p70 S6K, ni la silenciació d'HERC1, ni d'HERC2, ni de tots dos gens simultàniament ens va permetre observar cap alteració significativa en la fosforilació del factor 4EBP1, confirmant-nos que tot i la interacció observada entre HERC1 i el regulador negatiu de mTOR, TSC2/TSC1, HERC1 no semblava ser indispensable en la regulació de l'activitat de mTORC1 (Figures 53, 54 i 55) ni mTORC2 (Figura 53), almenys sobre aquests substrats de mTOR.

4.2.3.3 | Estudi del paper d'HERC1 en l'Autofàgia

Donat que la interacció entre HERC1 i el complex TSC2/TSC1 no semblava jugar un paper en la traducció d'ARNs missatgers, ja que no era indispensable per a l'activació de la p70 S6K per a la inhibició del factor 4EBP1 (dues proteïnes implicades en les etapes d'iniciació i elongació de la traducció CAP dependent (Hay i Sonenberg, 2004; Tee i Blenis, 2005)), vàrem pensar que la seva funció podria estar relacionada amb la regulació d'algun altre procés fisiològic dependent de la via de senyalització de mTOR.

Al laboratori disposem de varis plasmidis que codifiquen per a la proteïna HERC1 sencera o diferents fragments d'ella, fusionats en pauta amb la proteïna fluorescent verda (GFP) sota el control del promotor CMV (citomegalovirus), que permeten la sobreexpressió d'aquests pèptids en cèl·lules de mamífer (Figura 56). Donat que en treballs previs al laboratori s'havia observat que la transfecció d'alguns d'aquests plasmidis com el pJLR156, pJLR157, i pFG43 en cèl·lules HEK-293T generaven acumulacions citoplasmàtiques d'aquests pèptids que podien ser clarament observades a través de l'exitació i visualització de la GFP mitjançant microscòpia de fluorescència (Rosa i Garcia-Gonzalo, dades no publicades), i tenint en compte que HERC1 podia estar participant en algun dels processos fisiològics regulats per mTOR, vàrem pensar que aquestes acumulacions de proteïna observades podrien estar formant part de vacuoles autofàgiques i per tant que HERC1 podia estar relacionada amb el procés d'autofàgia.

L'autofàgia és un procés fisiològic a través del qual les cèl·lules degraden i poden reciclar diferents dels seus components com ara proteïnes amb temps de vida mitja elevats o fins i tot òrgans sencers (Seglen i Bohley, 1992; Dunn, 1994; Klionsky i Ohsumi, 1999). Quan les cèl·lules es troben en un entorn on els nivells de nutrients són òptims, el complex mTORC1 es troba actiu i regula diferents processos a favor del creixement cel·lular i en contra de l'autofàgia. La inhibició de l'autofàgia té lloc a través de la fosforilació de la proteïna Atg13 per part de mTOR, que impedeix la seva interacció amb la proteïna Atg1, una interacció necessària per a la formació dels autofagosomes (Blommaert *et al.*, 1995; Hara *et al.*, 1998).

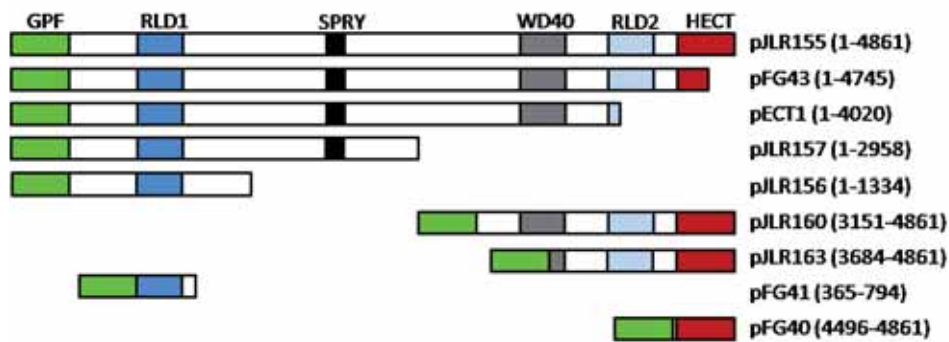


Figura 56. Esquema de proteïnes de fusió GFP-HERC1 utilitzades en els experiments d'anàlisi de l'autofàgia. Es mostren els dominis i els aminoàcids de la proteïna HERC1 (entre parèntesi) codificats en cadascun dels plasmidis.

Amb la idea de comprovar si HERC1 tenia un paper en la regulació de l'autofàgia vàrem transfectar plasmidis que codifiquen per a diferents proteïnes de fusió GFP-HERC1 en cèl·lules HEK-293 i vàrem analitzar per western blot els nivells del marcador d'autofàgia LC3-II en condicions basals. Com es mostra en la Figura 57A, mitjançant l'observació de la GFP per microscòpia de fluorescència vàrem comprovar que tots els plasmidis s'estaven expressant i ho vàrem corroborar per tots ells excepte per el pFG43 mitjançant western blot amb l'anticòs anti GFP (Figura 57 B). El pFG43 el vàrem detectar mitjançant l'anticòs anti HERC1, 410, observant un lleuger augment de la intensitat de la proteïna HERC1 (ja que aquest plasmidi codifica per a la proteïna HERC1 truncada per el seu domini HECT, i la seva migració electroforètica es gairebé la mateixa que la que presenta la proteïna HERC1 endògena). El plasmidi pJLR155 que codifica per a la proteïna HERC1 sencera, malauradament s'expressa molt poc degut al seu gran tamany i a la proteòlisi que sofreix la proteïna per la zona d'unió entre la GFP i HERC1, i tot i que seria una eina molt útil, no el vàrem poder utilitzar en aquests experiments. Com es mostra en la Figura 57 B cap dels plasmidis transfectats va modificar significativament els nivells de LC3-II ni tampoc els nivells totals de cap de les proteïnes analitzades de la via de senyalització de mTOR com

TSC2, TSC1 o la pròpia mTOR, suggerint que les acumulacions observades no corresponien a autofagosomes i que HERC1 no semblava estar jugant un paper en la regulació de l'autofàgia.

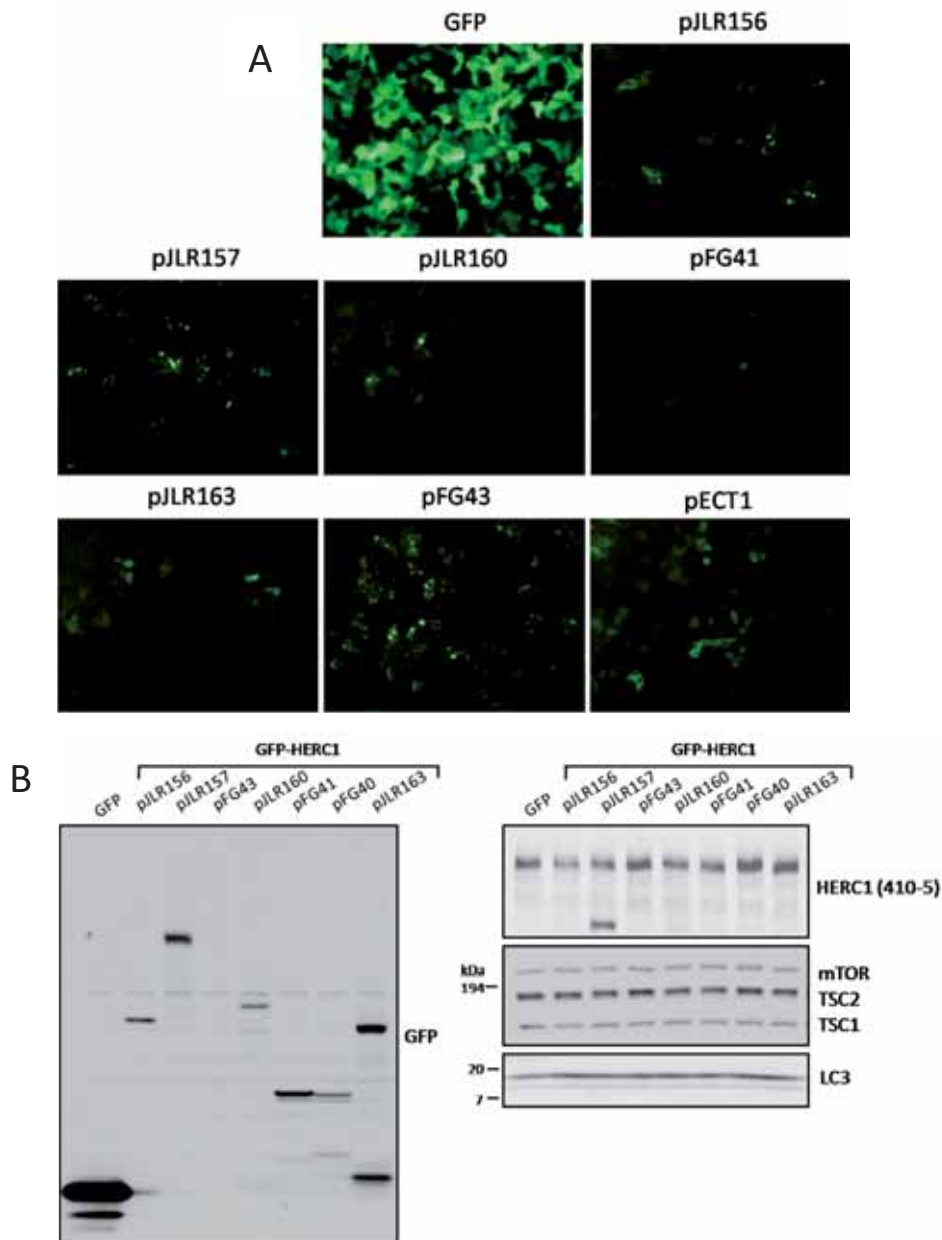


Figura 57. Estudi de la sobrexpressió de les proteïnes de fusió GFP-HERC1 per microscopia de fluorescència i del seu efecte en l'autofàgia per western blot. A. Visualització de la GFP de les proteïnes de fusió GFP-HERC1 per microscòpia de fluorescència. Cèl·lules HEK-293 van ser transfectades amb els plasmidis que codifiquen per a les proteïnes de fusió GFP-HERC1 indicats, durant 48 hores. A continuació, es va analitzar la seva expressió a través de la visualització de la proteïna fluorescent verda (GFP) al microscopi de fluorescència. Es poden observar les acumulacions de proteïna en les cèl·lules que van ser transfectades amb els plasmidis pJLR156, pJLR157 i pFG43. B. Efecte de la sobrexpressió de les proteïnes de fusió GFP-HERC1 en l'autofàgia. Cèl·lules HEK-293 van ser tractades com en A, i posteriorment es va analitzar l'expressió de les proteïnes de fusió GFP-HERC1 per western blot amb anticossos contra la GFP o contra HERC1 (410-5), i els nivells totals de les proteïnes LC3-II (banda inferior), mTOR, TSC2 i TSC1, mitjançant anticossos específics.

Per confirmar que HERC1 no regulava l'autofàgia vàrem mesurar també per western blot els nivells de LC3-II en cèl·lules HEK-293 en les quals havíem silenciat prèviament el gen d'HERC1 mitjançant diferents oligonucleòtids per ARN d'interferència, i a les que havíem induït l'autofàgia abans del seu processament, deprivant les cèl·lules de sèrum i aminoàcids (Figura 58).

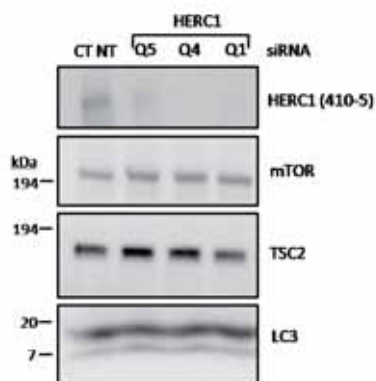


Figura 58. Efecte de la silenciació d'HERC1 en l'autofàgia. Cèl·lules HEK-293 van ser transfectades amb els oligonucleòtids per a ARN d'interferència contra HERC1, Q1, Q4 i Q5, o bé amb un oligonucleòtid *non targeting* (NT), a una concentració final de 50nM durant 72 hores. Abans del processament de les cèl·lules aquestes van ser dejunades de sèrum durant 24 hores i d'aminoàcids durant 2 hores. Finalment es van analitzar per western blot els nivells totals de les proteïnes LC3-II (banda inferior), mTOR i TSC2, mitjançant anticossos específics.

Com es mostra en la Figura 58, tots els oligonucleòtids d'ARN d'interferència utilitzats van disminuir els nivells d'HERC1 (el Q5 va ser el menys eficient) però en cap cas vàrem poder observar variacions en els nivells de LC3-II, lo qual, juntament amb els experiments mostrats en la Figura 57, indicaven que la interacció entre HERC1 i el complex TSC2/TSC1 no estava afectant el procés d'autofàgia ja que ni la sobreexpressió de diferents fragments d'HERC1 ni la silenciació d'HERC1 van modificar significativament els nivells del marcador autofàgic LC3-II, ni en condicions basals (Figura 57) ni en cèl·lules a les quals s'havia induït l'autofàgia (Figura 58).

4.2.3.4 | Estudi del paper d'HERC1 en la biogènesi de ribosomes

Un altre dels processos fisiològics regulats per mTOR és la biogènesi de ribosomes. Aquest procés consisteix en la síntesi i acoblament dels ARNs i de les proteïnes que constitueixen els ribosomes necessaris per a la síntesi de proteïnes (Schmelzle i Hall, 2000; Kim *et al.*, 2003). Una de les etapes limitants d'aquest procés és la transcripció de l'ARN ribosomal, la qual es troba regulada a dos nivells; a llarg plaç, a partir de la remodelació de la cromatina, i a curt plaç, a partir de la regulació de la maquinària de transcripció de l'ARN ribosomal a través de mTOR.

Existeixen centenars de repeticions del gen que codifica per a l'ARN ribosomal al llarg del genoma organitzades en tàndems. Cadascuna d'aquestes repeticions està formada per un fragment que es transcriu de 13,7 Kb (en humans) i un fragment espaiador de 29,3 Kb entre repeticions que no es transcriu (Lewis *et al.*, 1966; Liau i Perry, 1969; Raska *et al.*, 2004). La transcripció del fragment de 13,7 Kb genera un pre-ARN ribosomal policistrònic 45S que conté les seqüències corresponents a les espècies d'ARN 18S, 5,8S i 28S, separades per seqüències espaiadores internes (ITSs) i una seqüència espaiadora externa a cada extrem (ETSs). Durant la maduració del pre-ARN ribosomal 45S, les seqüències espaiadores externes i internes són eliminades, i es generen les espècies 18S, 5,8S i 28S que juntament amb l'espècie 5S, codificada en un gen a part, constitueixen la part no proteica dels ribosomes (Fatica i Tollervey, 2002; Tschochner i Hurt, 2003).

Degut a la interacció observada entre HERC1 i el complex regulador de mTOR, TSC2/TSC1, ens vàrem preguntar si HERC1 regulava la biogènesi de ribosomes. Per respondre a aquesta pregunta vàrem quantificar els nivells d'ARN ribosomal 18S per RT-PCR a temps real en cèl·lules HeLa *wild type* o bé en cèl·lules HeLa a les quals prèviament havíem silenciat el gen d'HERC1 mitjançant diferents oligonucleòtids per a ARN d'interferència (Figura 59). Com a control de la regulació de la síntesi de l'ARN 18S per part de la via de senyalització de mTOR, vàrem mesurar en els mateixos experiments els nivells

relatius de l'ARN ribosomal 18S en cèl·lules a les quals prèviament havíem silenciats l'expressió del gen de mTOR. Com a control endògen, varem mesurar en totes les condicions els nivells d'expressió del gen de la GAPDH humana (gliceraldehid 3-fosfat deshidrogenasa) (Figura 59).

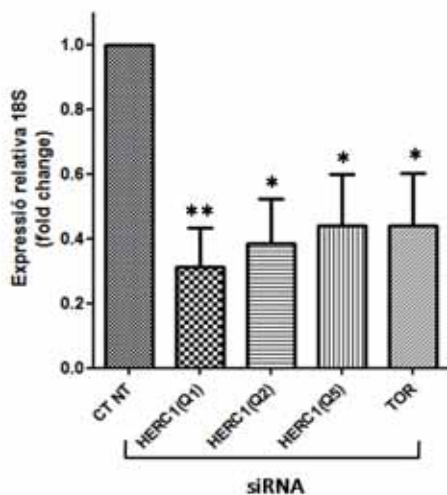


Figura 59. Efecte de la silenciació d'HERC1 en els nivells d'ARN ribosomal 18S. Cèl·lules HeLa van ser transfectades amb oligonucleòtids per ARN d'interferència contra HERC1 (Q1, Q2, Q4 i Q5), contra mTOR, o amb un oligonucleòtid *non targeting* (NT), a una concentració final de 50nM durant 72 hores. A continuació, es va extreure l'ARN total d'aquestes cèl·lules i es van quantificar els nivells d'ARN 18S per RT-PCR a temps real mitjançant oligonucleòtids específics per a l'amplificació d'aquest gen (*TaqMan 18S gene expression assay*, Applied Biosystems). Els resultats s'han expressat com a nombre de còpies d'ARN 18S en cada condició respecte al nombre de còpies en les cèl·lules control, el valor per a les quals es va establir com a 1, i representen la mitjana +/- SEM (n=4). **p<0,005, *p<0,05. Els valors d'ARN 18S es van corregir a partir dels nivells de mRNA de la GAPDH humana.

Com es mostra en la Figura 59, la silenciació d'HERC1 realitzada amb tots els oligonucleòtids utilitzats van provocar una disminució significativa en el nombre de còpies de l'ARN ribosomal 18S en condicions basals. Aquest efecte va ser especialment significatiu en cèl·lules transfectades amb l'oligonucleòtid Q1. Tal com esperavem, la silenciació de mTOR també va produir una disminució significativa en el nombre de còpies de l'ARN 18S en aquestes condicions.

Per tal de determinar si la disminució del nombre de còpies de l'ARN ribosomal 18S al silenciar el gen d'HERC1 es devia a una disminució de la transcripció de l'ADN ribosomal a través de l'ARN polimerasa I, i no a un augment de la degradació o desestabilització d'aquests ARNs, varem mesurar l'activitat del promotor del gen de l'ARN ribosomal utilitzant un gen reporter d'aquest promotor associat al gen de la luciferasa (Figura 60). Per fer-ho, varem silenciar l'expressió del gen HERC1 (o de mTOR com a control) per ARN d'interferència en cèl·lules HeLa, i 24 hores abans del seu processament les varem transfectar amb dos gens reporters; el pHrd IRES Luc, que codifica per al gen de la luciferasa sota el control del promotor de l'ADN ribosomal, i un plasmidi que codificava per a la β -galactosidasa sota el promotor CMV (citomegalovirus) per a la normalització de l'activitat luciferasa. A partir dels llisats d'aquestes cèl·lules varem mesurar les activitats luciferasa i β -galactosidasa i varem calcular l'activitat relativa del promotor de l'ADN ribosomal per a cadascuna de les condicions experimentals respecte a les cèl·lules control (Figura 60).

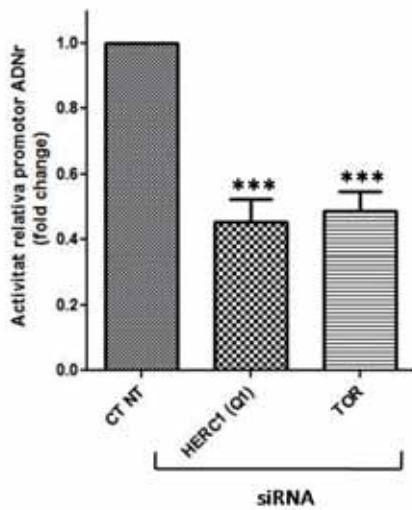


Figura 60. Efecte de la silenciació d'HERC1 en la transcripció de l'ADN ribosomal. Cèl·lules HeLa van ser transfectades amb un oligonucleòtid d'ARN d'interferència contra HERC1 (Q1), contra mTOR, o amb un oligonucleòtid *non targeting* (NT), a una concentració final de 50nM durant 72h. 24 hores abans del seu processament les cèl·lules es van transfectar amb el gen reporter de l'activitat del promotor de l'ADN ribosomal pHRd IRES Luc, i amb el gen β gal com a control intern. A continuació, es va mesurar l'activitat luciferasa (Promega) i β -galactosidasa (Applied Biosystems). Els resultats s'han expressat com a activitat del promotor de l'ADN ribosomal en cada condició respecte a l'activitat mesurada en les cèl·lules control, el valor de la qual va ser establert com a 1, i representen la mitjana \pm SEM (n=5). ***p<0,0001. Els valors d'activitat luciferasa es van corregir a partir dels valors d'activitat β -galactosidasa.

Mitjançant aquests experiments vàrem observar que la silenciació d'HERC1 amb l'oligonucleòtid Q1, amb el qual ja havíem observat una major disminució dels nivells de l'ARN ribosomal 18S per RT-PCR a temps real (Figura 59), va provocar una disminució significativa en l'activitat del promotor de l'ADN ribosomal (Figura 60). Donat el paper de mTOR en la regulació de la transcripció de l'ADN ribosomal (Beck i Hall, 1999; Bodem *et al.*, 2000; Moorefield *et al.*, 2000; Hannan *et al.*, 2003), vàrem poder observar, tal i com esperàvem, una disminució en l'activitat del promotor de l'ADN ribosomal en aquelles cèl·lules en les quals havíem silenciat el gen de mTOR.

Aquestes dades ens van indicar que la disminució del nombre de còpies de l'ARN ribosomal 18S observat al silenciar l'expressió del gen d' HERC1, podria estar relacionada amb la transcripció de l'ADN ribosomal, un procés que depèn de la regulació de l'ARN polimerasa I per part de la quinasa mTOR.

4.3 | *Erk i p38, reguladors de la senyalització per aminoàcids*

4.3 | Erk i p38, reguladors de la senyalització per aminoàcids

El creixement cel·lular és un procés biològic fonamental regulat per la disponibilitat de nutrients, a través del qual les cèl·lules augmenten en nombre i en tamany. En cèl·lules eucariotes, aquest procés es troba regulat per la serina/treonina quinasa mTOR, una proteïna que es troba formant part de dos complexos multiproteïcs diferents (mTORC1 i mTORC2), que es caracteritzen per les proteïnes que els conformen, per presentar diferent sensibilitat a la rapamicina (veure apartat 1.2 Introducció) i per les funcions fisiològiques que regulen. El complex mTORC1 connecta diferents estímuls extracel·lulars com la presència en el medi de factors de creixement o nutrients, amb l'activació o inhibició per fosforilació de proteïnes responsables del creixement cel·lular com la S6K1 i el factor 4EBP1, dos substrats directes d'aquest complex (veure apartat 1.2.3 introducció).

L'activació de la quinasa S6K1 té lloc a través d'un procés seqüencial de fosforilació de varis dels seus residus entre els quals destaca el de la treonina 389, una fosforilació crítica per a l'activació d'aquesta quinasa (Dennis *et al.*, 1996; Weng *et al.*, 1998). L'utilització d'anticossos que detecten la fosforilació d'aquest residu ha estat una eina útil per a la detecció de l'activació d'aquesta proteïna en molts treballs, de fet, va ser mitjançant aquests anticossos que es va descriure per primera vegada l'activació de la S6K1 via aminoàcids (Nobukuni *et al.*, 2005), una via el mecanisme de la qual encara no es coneix amb detall però en el que intervenen proteïnes com la PI3K de classe III (hVps34 (*vacuolar protein sorting 34*)), les GTPases Rag (*Ras related small GTPases*), la MAP4K3 (o *germinal centre-like kinase* (GLK)) (veure apartat 1.2.3.2 introducció).

Processos fisiològics com la proliferació, la migració i la diferenciació cel·lular són regulats per proteïnes de la família de les MAPKs (quinases activades per mitògens) com la Erk (*extracellular signal regulated kinases*) o la p38, en resposta a senyals extracel·lulars com factors de creixement, estrès o citoquines (veure apartat 1.3 introducció). Aquestes quinases, a part d'activar factors de transcripció, són les responsables de l'activació de les quinases activades per MAPKs (o MKs), RSK1, 2, 3 i 4 (via Erk), i la MSK1 i 2 (via Erk o p38) (veure apartat 1.3.3 introducció).

4.3.1 | Detecció de la proteïna p85-S6K1 “like” en resposta a aminoàcids

En els primers estudis que es van realitzar sobre el mecanisme de senyalització dels aminoàcids es va comprovar que aquests induïen la fosforilació de la treonina 389 de la S6K1 a través del complex mTORC1 (Hara *et al.*, 1998; Kim *et al.*, 2002; Nobukuni *et al.*, 2005). No obstant, en l'estudi de la funció de la proteïna HERC1 en la via de senyalització de mTOR (apartat 4.2 dels resultats) vàrem observar que a diferència de l'estimulació de cèl·lules amb insulina, en l'estimulació amb aminoàcids de cèl·lules HeLa o HEK-293 (dues línies cel·lulars que han estat àmpliament utilitzades per a l'estudi de la via de senyalització de mTOR), l'anticòs monoclonal anti T389-p70 S6K1 (1A5, Cell Signalling Technology) reconeixia una proteïna amb una mobilitat d'aproximadament 90 KDa (la qual vàrem anomenar p85 S6K1 “like” degut a que inicialment vàrem pensar que es podia tractar de la isoforma p85 de la S6K1) i una altre proteïna amb menor intensitat de 110 KDa. A més a més, aquest anticòs no reconeixia la isoforma p70 de la S6K1 en aquestes condicions (figura 61).

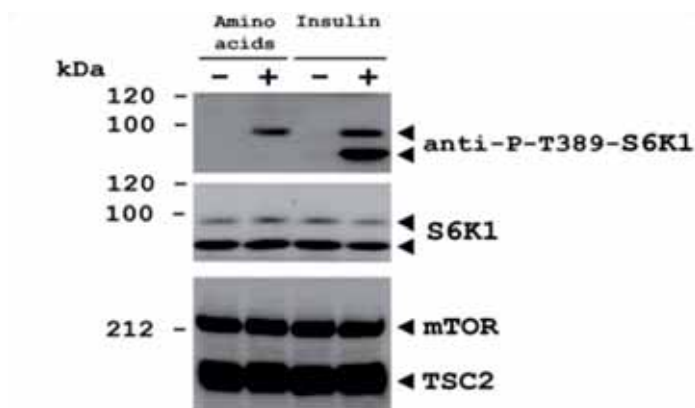


Figura 61. Detecció de la p85 S6K “like” mitjançant l’anticòs anti P-T389 S6K1 en cèl·lules HEK-293 estimulades amb aminoàcids. Per a l’activació amb aminoàcids, les cèl·lules es van dejunar de sèrum durant 24 hores i es van incubar durant dues hores a 37°C amb el medi D-PBS (Dulbecco’s phosphate-buffered saline) que conté glucosa, piruvat sòdic, calci i magnesi però no conté aminoàcids, abans d’activar-les durant 30 minuts amb una barreja d’aminoàcids essencials i no essencials (Gibco) més L-glutamina (Biological industries). Per a l’activació amb insulina, les cèl·lules es van dejunar de sèrum durant 24 hores i es van activar amb insulina a 200nM durant 30 minuts. Finalment, els extractes cel·lulars corresponents es van analitzar per western blot mitjançant l’anticòs anti P-T389 S6K1.

Com es mostra en la Figura 61, l’activació amb insulina ens va permetre detectar la fosforilació de la treonina 389 de les isoformes p70 i p85 de la S6K1. En canvi, en l’activació amb aminoàcids vàrem detectar una banda amb una mobilitat semblant a la isoforma p85 S6K1 (d’ara en endavant anomenada p85 S6K1 “like”), però no la banda corresponent a la isoforma p70 de la S6K1. En alguns casos, en altres experiments al mostrat, quan revelàvem la membrana a exposicions elevades vàrem poder observar també una altra banda menys intensa amb una mobilitat una mica inferior a la de la p85 S6K1 “like”. Tant el tractament amb aminoàcids com amb insulina no van modificar els nivells totals de la S6K1 ni tampoc d’altres proteïnes de la via de senyalització de mTOR com la pròpia mTOR o TSC2. Aquests mateixos resultats els vàrem poder observar en altres línies cel·lulars com les HEK-293 o les MCF-7 (Figura 62).

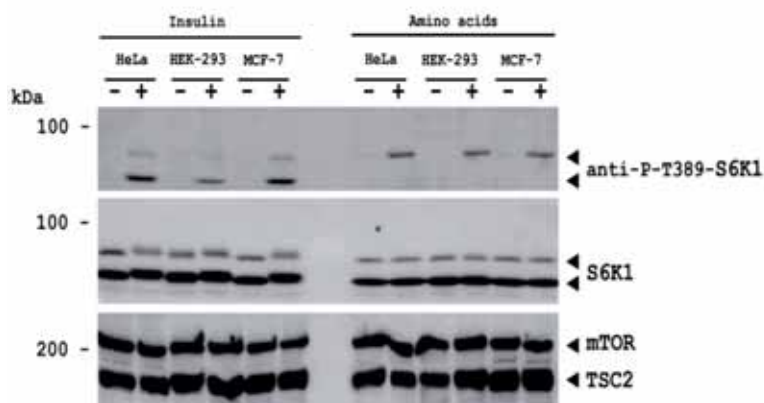


Figura 62. Detecció de la p85 S6K “like” mitjançant l’anticòs anti P-T389 S6K1 en cèl·lules HeLa, HEK-293 i MCF-7 estimulades amb aminoàcids. Com a control es va realitzar en paral·lel l’estimulació amb insulina. L’Activació amb aminoàcids o insulina es va realitzar com s’ha descrit en la Figura 61 (i en l’apartat de materials i mètodes).

4.3.2 | Caracterització de l'activació de la proteïna p85 S6K1 "like" en resposta a aminoàcids

4.3.2.1 | Inhibició de PI3K i mTOR

Per tal de confirmar i caracteritzar la fosforilació de la p85 S6K1 "like" en resposta a aminoàcids, vàrem repetir aquest tipus d'experiments utilitzant inhibidors coneguts de la via d'activació de la S6K1. Per comprovar la funcionalitat d'aquests inhibidors, es van realitzar experiments en paral·lel d'activació amb insulina, la qual ha estat descrita de ser dependent de rapamicina i wortmannina (Avruch *et al.*, 2006; Wullschleger *et al.*, 2006) (Figura 63, A i B).

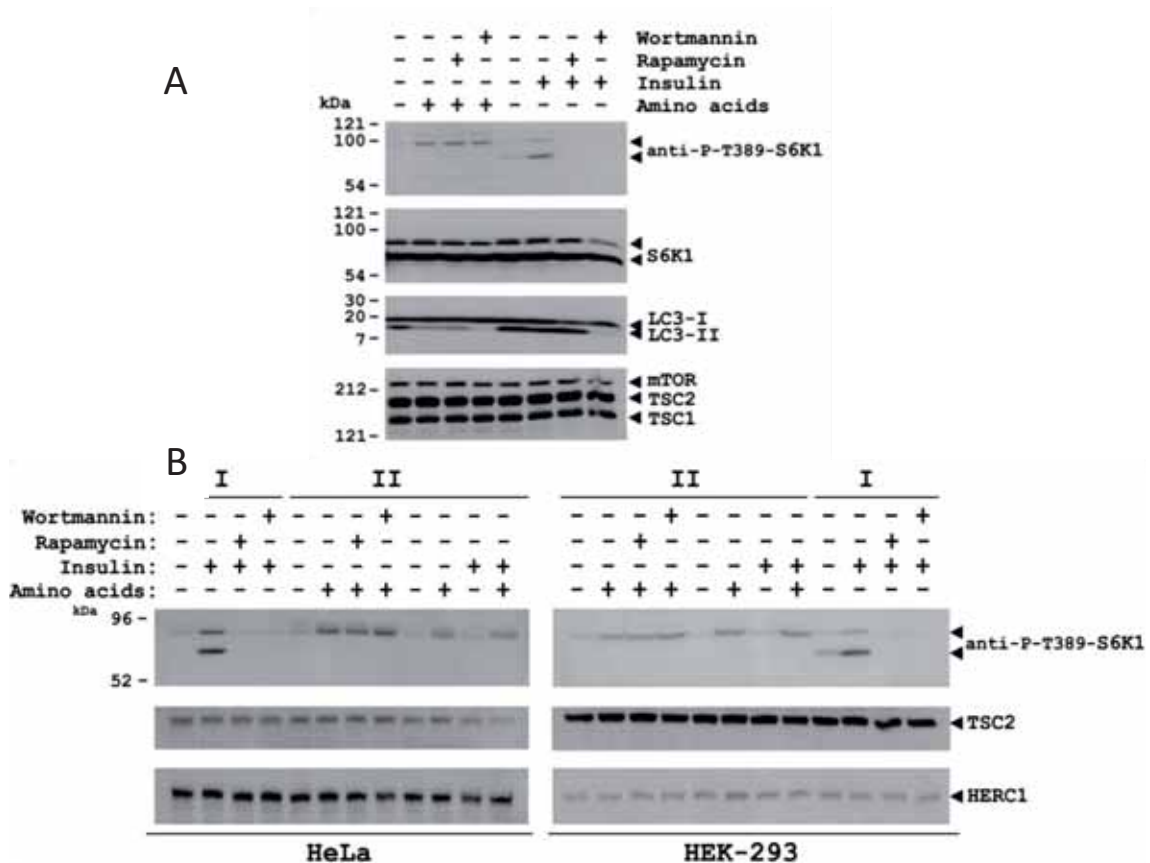


Figura 63. Detecció de la p85 S6K1 "like" en resposta a aminoàcids en presència de rapamicina o wortmannina. 30 minuts abans d'activar cèl·lules HEK293 (A i B) o HeLa (B) amb aminoàcids o insulina, es van tractar amb rapamicina o wortmannina a 20nM o 100 nM respectivament. En l'experiment A, com a control positiu de l'activació per aminoàcids es van mesurar els nivells del marcador de l'autofàgia LC3 II. En la figura B, I, indica cèl·lules dejunades únicament de sèrum, i II, cèl·lules dejunades de sèrum i aminoàcids abans de realitzar l'activació.

Com es mostra en la Figura 63A i B, l'activació de la p85 S6K1 "like" es va mostrar independent de l'inhibidor de mTOR, rapamicina (Sehgal i Bansback, 1993) i de l'inhibidor de les PI3Ks, wortmannina (Powis *et al.*, 1994). A més a més, l'activació simultània de les cèl·lules amb aminoàcids i insulina no va incrementar el grau de fosforilació de la p85 S6K1 "like" endògena, indicant que la seva activació era independent d'aquesta hormona (Figura 63B, experiments II).

Com a control de l'efecte dels aminoàcids en les cèl·lules a les quals s'havia induït prèviament l'autofàgia amb un dejuni previ, vàrem analitzar els nivells del marcador d'autofàgia LC3-II (Kabeya *et al.*, 2000), observant una disminució de LC3-II en aquelles condicions en les quals s'havia realitzat el

tractament amb una barreja d'aminoàcids essencials i no essencials (però no en les que es van tractar amb insulina), que indicava una disminució en el nombre d'autofagosomes (Figura 63A). En les condicions en les que es van realitzar aquests experiments, el tractament de les cèl·lules amb rapamicina no va afectar als nivells d'autofàgia (ni en cèl·lules activades amb aminoàcids ni en cèl·lules activades amb insulina). En canvi, en ambdós tipus d'activació, quan vàrem tractar les cèl·lules amb wortmannina es va produir una disminució dels nivells de LC3-II encara major que l'observat per l'efecte de l'activació amb insulina o aminoàcids, probablement degut a l'inhibició de la PI3K de classe III, hVps34, la qual s'ha descrit de ser necessària per al procés de formació i maduració dels autofagosomes (Kihara *et al.*, 2001a i b; Eskelinen *et al.*, 2002) (figura 63 A).

4.3.2.2 | Time course d'activació amb aminoàcids

El següent que ens vàrem plantejar va ser l'estudi de la cinètica d'activació per aminoàcids de la p85 S6K1 "like". Per fer-ho vàrem realitzar experiments d'activació amb aminoàcids a diferents temps i els vàrem analitzar per western-blot i per microscopia de immunofluorescència, utilitzant l'anticòs anti P-T389 S6K1 amb el qual havíem identificat prèviament aquesta proteïna (Figura 64). Aquests experiments ens van permetre observar que la proteïna p85-S6K1 "like" s'activava ràpidament en resposta a aminoàcids (1-5 minuts) (Figura 64A), i que si bé es tractava d'una proteïna principalment citosòlica a temps zero, l'addició de la barreja d'aminoàcids al medi de cultiu provocava la seva translocació cap al nucli on es podia detectar clarament transcorreguts 15 minuts des de l'estimulació (Figura 64 B). A més a més, aquesta translocació al nucli era transitòria ja que el tractament posterior de les cèl·lules amb medi de cultiu complet permetia recuperar la distribució subcel·lular inicial de la proteïna (Figura 64B).

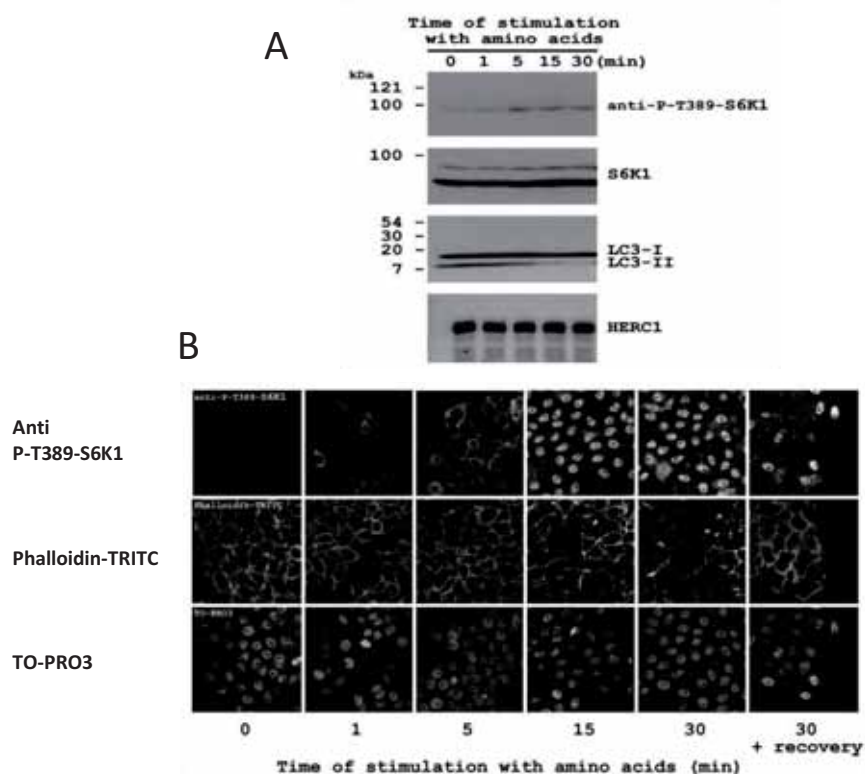


Figura 64. Time course d'estimulació amb aminoàcids en cèl·lules HEK-293 (A) i HeLa (B). Les cèl·lules es van activar amb aminoàcids als temps indicats. A. Els llistats cel·lulars es van analitzar mitjançant western-blot amb els anticòsos corresponents. B. Anàlisi per immunofluorescència mitjançant l'anticòs anti P-T389-S6K1, faloidina-TRITC (per a la visualització de la F-actina) i TO-PRO3 (per a la tinció nuclear). Per a la condició de recuperació, als 30 minuts de l'activació amb aminoàcids, les cèl·lules es van rentar amb PBS i es van incubar amb medi complet durant 1 hora abans del seu processament.

4.3.3 | S6K en la senyalització per aminoàcids i insulina

4.3.3.1 | S6K1

L'ARN missatger del gen que codifica per a la proteïna S6K1 (RPS6KB1) conté dos inicis de traducció alternatius que generen dues isoformes; la p85 ($\alpha 1$) i la p70 ($\alpha 2$). Ambdues presenten una seqüència d'aminoàcids gairebé idèntica però es diferencien pel fet que la isoforma p85 conté 23 aminoàcids més en el seu extrem N terminal en els quals es troba present un senyal de localització nuclear o NLS que li permet translocar-se al nucli cel·lular (Figura 65A) (Reinhard *et al.*, 1994), mentre que la isoforma p70 es troba principalment en el citoplasma (Lee-Fruman *et al.*, 1999; Coffey *et al.*, 1994).

Tenint en compte aquestes dades vàrem pensar que la proteïna p85 S6K1 "like" observada en els experiments anteriors podria correspondre a la isoforma p85 de la S6K1. Per confirmar-ho vàrem transfectar cèl·lules HEK 293 amb plasmidis que codificaven per a una o altre isoforma de la S6K1 etiquetats amb un epítip Flag en un dels seus extrems, i continuació vam realitzar el mateix tipus d'experiment d'activació amb aminoàcids i insulina tal i com s'havia realitzat anteriorment (Figura 65 B).

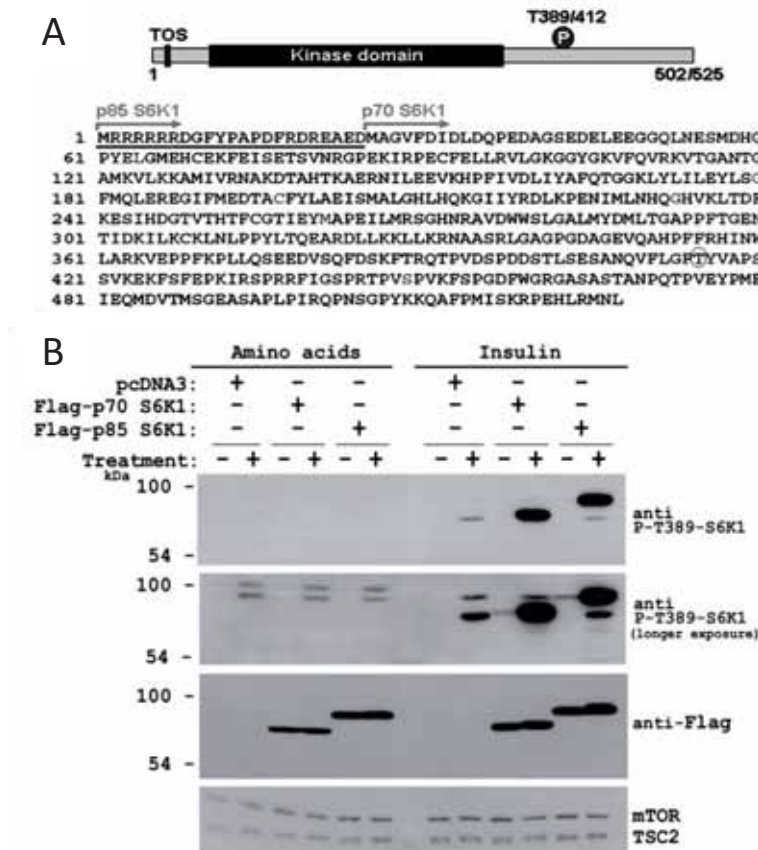


Figura 65. Isoformes p70 i p85 de la S6K1. A. Estructura i seqüència de la proteïna S6K1 humana. Es mostren els dos inicis de traducció alternatius responsables de la generació de les dues isoformes de la proteïna. B. Activació amb aminoàcids i insulina de cèl·lules HEK 293 transfectades amb Flag-p70 S6K1 o Flag p85-S6K1 24 hores abans del dejuni de sèrum.

Aquest experiment ens va permetre observar que el tractament amb aminoàcids no provocava la fosforilació de cap de les dues isoformes de la S6K1 transfectades (p70 i p85), però sí de la proteïna endògena p85 S6K1 “like”, mentre que el tractament realitzat amb insulina sí que induïa una clara fosforilació de la p70 i p85 S6K1 la qual ens va permetre confirmar la funcionalitat de les construccions utilitzades.

4.3.3.2 | S6K2

Existeix un segon gen per a la proteïna S6K que codifica per a la proteïna S6K2 (RPS6KB2). Aquesta proteïna presenta un elevat grau d'identitat de seqüència amb la S6K1 (70%) i tot i que s'ha descrit que comparteixen un gran nombre de funcions, cadascuna realitza també algunes funcions úniques (Shima *et al.*, 1998). Per tal d'esbrinar si la p85 S6K1 “like” corresponia a la proteïna S6K2 vàrem analitzar la regulació d'aquesta proteïna per aminoàcids tal com havíem fet per a les dues isoformes de la S6K1 però utilitzant en aquest cas un plasmidi que codificava per a la S6K2 etiquetada amb un epítot HA (Figura 66). Com a control vàrem realitzar el mateix experiment en cèl·lules que sobreexpressaven la Flag-p70 S6K1.

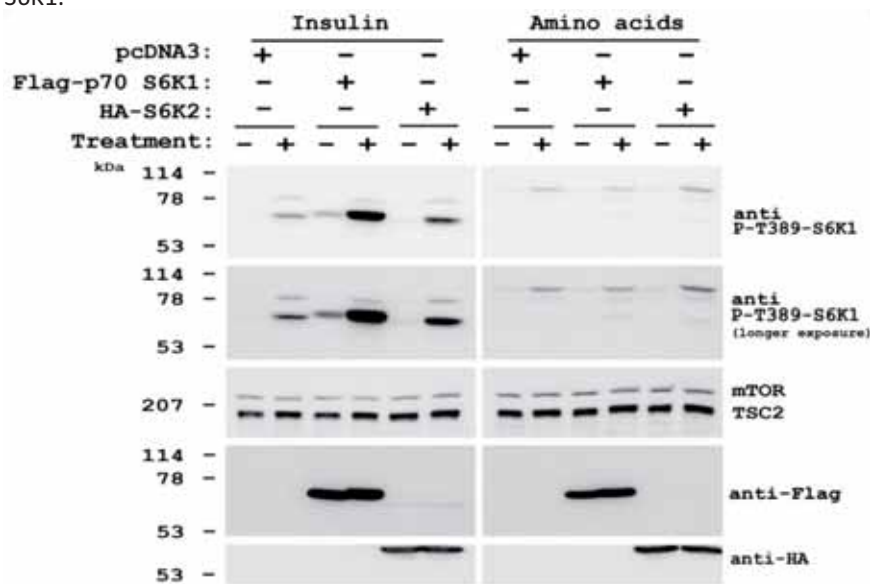


Figura 66. Activació S6K2 per aminoàcids o insulina. Cèl·lules HeLa es van transfectar amb HA-S6K2 o Flag p70 S6K1 24 hores abans del dejuni de sèrum. Posteriorment es va realitzar l'estimulació de les cèl·lules amb aminoàcids o insulina tal i com s'ha descrit anteriorment.

A l'igual que havíem vist per la S6K1, el tractament amb aminoàcids no va induir la fosforilació de la S6K2 sobreexpressada. En canvi, el tractament amb insulina va induir la fosforilació tant de la S6K1 com la S6K2, suggerint-nos que la proteïna p85 S6K1 “like” no era una S6 quinasa tot i ser reconeguda per l'anticòs anti T389-p70 S6K1.

4.3.3.3 | Silenciament S6K i mTOR i assaigs quinasa mTOR

Per acabar de confirmar aquest punt vàrem realitzar experiments d'estimulació amb aminoàcids en cèl·lules HeLa a les quals havíem silenciat prèviament els gens de les proteïnes S6K1 o mTOR mitjançant ARN d'interferència (siRNA) (Figura 67). Com a control de la silenciació de mTOR es van mesurar els nivells del marcador d'autofàgia LC3-II, observant com era d'esperar (degut al paper inhibidor de mTOR en l'autofàgia mTOR (Abeliovich *et al.*, 2000; Kamada *et al.*, 2000)) un augment en els nivells de LC3-II en les condicions on s'havia silenciat mTOR.

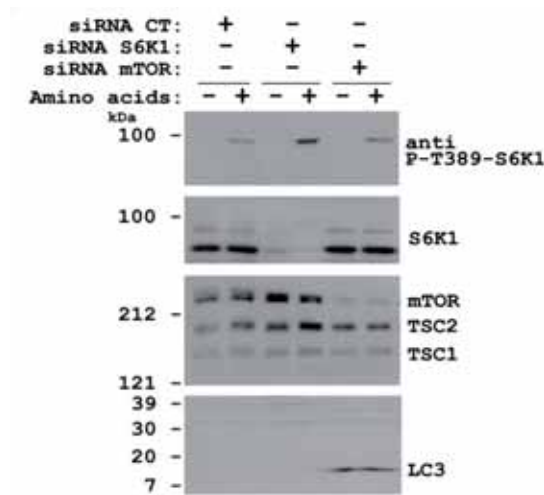


Figura 67. Efecte de la silenciació de mTOR i S6K en l'activació de p85 S6K "like" en resposta a aminoàcids. La transfecció dels dúplexs de siRNA per a la silenciació d'aquests gens es va realitzar a una concentració final de 50nM. 48 hores després de la transfecció es van dejunar les cèl·lules de sèrum i es va procedir a l'activació amb aminoàcids com s'ha descrit anteriorment. Com a control positiu de la silenciació de mTOR es van mesurar els nivells del marcador d'autofàgia LC3.

Tant en la silenciació del gen de la S6K com en el de mTOR vàrem poder observar l'activació de la proteïna p85 S6K "like", lo qual, apart de confirmar-nos la hipòtesi de que la p85 S6K "like" no corresponia a la S6K i que l'anticòs P-T389-S6K1 estava reconeixent una altre proteïna, ens va fer pensar que l'activació per aminoàcids d'aquesta altre proteïna era independent de la via de senyalització de mTOR. A més a més, en cap dels experiments d'activació per aminoàcids realitzats vàrem poder detectar la fosforilació de la treonina 389 de la S6K1, en contra del que s'havia descrit en la bibliografia prèviament sobre el paper de mTOR en l'activació de la S6K per aminoàcids (Blommaart *et al.*, 1995; Kim *et al.*, 2002; Hara *et al.*, 1998). Tot i que no podíem descartar les diferents condicions experimentals utilitzades en alguns dels experiments respecte els descrits en la bibliografia, la reacció de creuament de l'anticòs anti P-T389-p70 S6K1 ens permetia explicar també els resultats obtinguts.

Per tal de demostrar l'activació de mTOR per aminoàcids, en alguns dels experiments descrits en la bibliografia s'han realitzat assaigs quinasa *in vitro* utilitzant com a substrat la proteïnes HA-GST-S6K1 purificada (Kim *et al.*, 2002; Findlay *et al.*, 2007). Per tal d'intentar clarificar les discrepàncies que existien entre aquests experiments i els nostres resultats vàrem realitzar assaigs quinasa *in vitro* per esbrinar si en les condicions en les que estàvem realitzant els experiments d'activació amb aminoàcids tenia lloc l'activació de mTOR tal i com ha estat descrit. Com es mostra en la Figura 68, mTOR immunoprecipitat partir d'extractes de cèl·lules dejunades d'aminoàcids prèviament va ser capaç de fosforilar la proteïna purificada HA-GST-S6K1. A més a més, aquesta fosforilació es veia incrementada quan realitzàvem l'immunoprecipitació de mTOR a partir de llisats de cèl·lules que havien estat estimulades amb aminoàcids prèviament, lo qual ens va permetre explicar els resultats descrits en la bibliografia sobre l'activació de mTOR per aminoàcids.

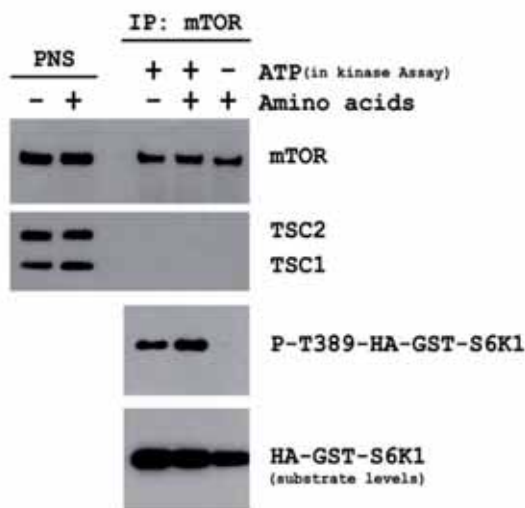


Figura 68. Assaig quinasa de l'immunoprecipitat de mTOR sobre la proteïna HA-GST-S6K1 purificada. Cèl·lules HEK 293T es van dejunar de sèrum i posteriorment es van activar o no amb aminoàcids. L'assaig quinasa es va realitzar a partir dels immunocomplexes de mTOR obtinguts a partir del sobrenadant postnuclear d'aquestes cèl·lules (PNS), incubant durant 30 minuts a 37°C en presència d'ATP els immunocomplexes amb la proteïna HA-GST-S6K1 purificada. Com a control negatiu de l'assaig quinasa es va realitzar el mateix assaig en absència d'ATP. La reacció de fosforilació *in vitro* es va aturar afegint tampó per a PAGE/SDS a les mostres i posant-les en gel. Finalment es van analitzar els resultats per PAGE/SDS utilitzant l'anticòs anti P-T389-p70 S6K1 per mesurar el grau de fosforilació del substrat i l'anti HA per mesurar-ne els nivells totals.

4.3.3.4 | Sobrexpressió S6K1 en cèl·lules HEK-293T

Una possible explicació que reconcilia aquests resultats amb els mostrats anteriorment és que l'activació amb aminoàcids provocava una lleugera però significativa activació de mTOR (1,26 vegades +/- 0,26) (com es mostra en l'experiment *in vitro* de la Figura 68), però que *in vivo*, aquesta activitat no era suficient per fosforilar la treonina 389 de la S6K endògena (Figures 61-67). D'acord amb aquesta hipòtesi, no vàrem detectar tampoc fosforilació de les treonines 37 i 46 del factor 4EBP1 endogen en resposta a aminoàcids (dades no mostrades), lo qual ens va permetre confirmar resultats existents previs respecte la fosforilació de 4EBP1 en resposta a aminoàcids (Wang *et al.*, 2005). Tenint en compte tot això, vàrem pensar que si podíem sobreexpressar el gen de la proteïna S6K1 a nivells majors, possiblement una petita fracció de la població d'aquesta proteïna podria ser fosforilada per mTOR en resposta a aminoàcids. Per aquest motiu vàrem realitzar un experiment d'activació amb aminoàcids utilitzant cèl·lules HEK 293T enlloc de les que havíem utilitzat fins aleshores (HeLa o HEK 293). Aquesta línia cel·lular conté l'antigen SV40 T i permet una gran ampliació dels plasmidis que contenen l'origen de replicació SV40 T. Utilitzant aquesta línia cel·lular vàrem comprovar com efectivament una petita part de la Flag-p85 S6K1 sobreexpressada era fosforilada en la seva treonina 389 després del tractament amb aminoàcids (Figura 69). A més a més, la transformació de cèl·lules amb l'antigen SV40 provoca l'activació de les quinases PI3K i Akt, i per tant, la sobreexpressió de S6K1 i/o l'activació d'aquestes quinases podria explicar l'activació de mTOR per aminoàcids descrita en la bibliografia i el perquè de les discrepàncies observades entre uns experiments i altres.

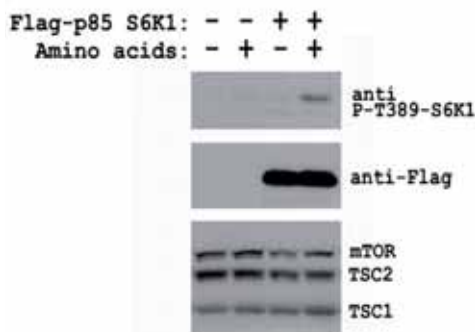


Figura 69. Activació de la p85 S6K1 en resposta a aminoàcids en cèl·lules HEK-293T. Cèl·lules HEK 293T (amb l'antigen SV40T) es van transfectar amb un plasmidi que codifica per a la proteïna Flag-p85-S6K1 24 hores abans de dejunar-les de sèrum. Posteriorment es van activar amb aminoàcids tal com s'ha descrit anteriorment i es van analitzar per western blot mitjançant l'anticòs anti P-T389 p70 S6K1.

4.3.4 | RSK i MSK en la senyalització per aminoàcids

Les dades obtingudes que ens suggerien que la senyalització per aminoàcids no transcorria a través de la fosforilació de la treonina 389 de la S6K1 ni de la S6K2, ens va portar a buscar possibles candidats per a la p85 S6K “like”. Així doncs, vàrem buscar proteïnes que continguessin una seqüència similar a la seqüència de les zones contigües al residu treonina 389 de la S6K1 que podien ser susceptibles de ser reconegudes per l'anticòs anti T389-p70 S6K1.

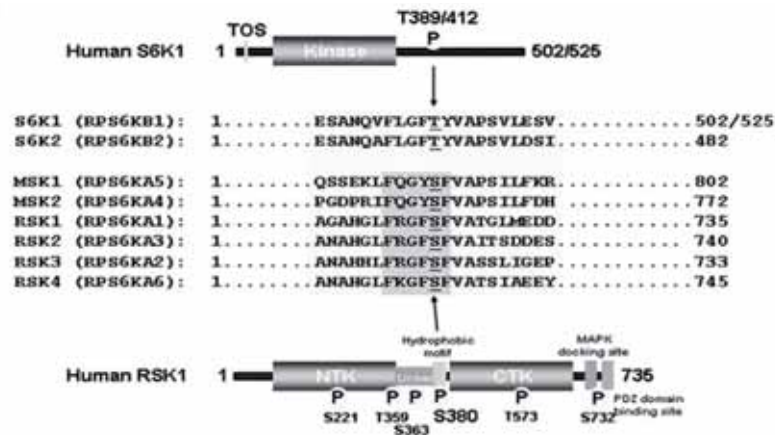


Figura 70. Estructura i dianes de fosforilació de les proteïnes S6K1 i RSK1 humanes, i comparació de seqüències de la regió que inclou la treonina 389/412 de la S6K1 amb les regions equivalents dels membres de les famílies RSK i MSK. La serina del motiu hidrofòbic de les RSK i MSKs que podria estar sent reconeguda per l'anticòs anti P-T389-p70 S6K1 es mostra subratllada.

NTK: domini quinasa N terminal, CTK: domini quinasa C terminal.

Els membres de la família de quinases AGC, RSK i MSK, presenten un elevat grau d'homologia amb aquesta regió de les S6K (Figura 70). A més a més, la seva mobilitat electroforètica és semblant a la de la p85 S6K, i la seva regulació té lloc de manera independent de mTOR. En particular, un residu serina present en el motiu hidrofòbic dels membres de la família de quinases RSK i MSK podria ser el que estava sent reconegut per l'anticòs anti P-T389-p70 S6K1 (Hauge *et al.*, 2006).

4.3.4.1 | Sobrexpressió RSK i MSK en cèl·lules HEK-293

Per determinar si alguna d'aquestes dues proteïnes era la que estàvem detectant amb l'anticòs anti P-T389 p70 S6K, vàrem transfectar cèl·lules HEK 293 amb plasmidis que codificaven per un membre de cadascuna d'aquestes famílies de proteïnes, etiquetats amb epitops Flag. Com es mostra en la Figura 71A i B, després d'estimular les cèl·lules amb aminoàcids, l'anticòs anti P-T389-p70 S6K1 ens va reconèixer tant la proteïna Flag-RSK1 com la Flag-MSK1. Per comprobar que la fosforilació que ens estava reconeixent l'anticòs corresponia a la serina del motiu hidrofòbic de la RSK1, vàrem transfectar també una forma mutant inactiva de RSK1 (RSK1 NA) (generada a partir de la substitució de la serina 380 per una lisina (Silverman *et al.*, 2004)). Com es mostra en la Figura 71A, aquest mutant no va ser reconegut per l'anticòs anti T389-p70 S6K1, indicant que la fosforilació de la serina 380 de RSK1 és essencial per al reconeixement d'aquesta proteïna amb aquest anticòs. Aquests resultats no eren exclusius de RSK1 i MSK1 ja que vàrem comprovar com altres membres d'aquestes famílies, com les proteïnes RSK2 o MSK2, es comportaven de la mateixa manera (Figura 71B i dades no mostrades).

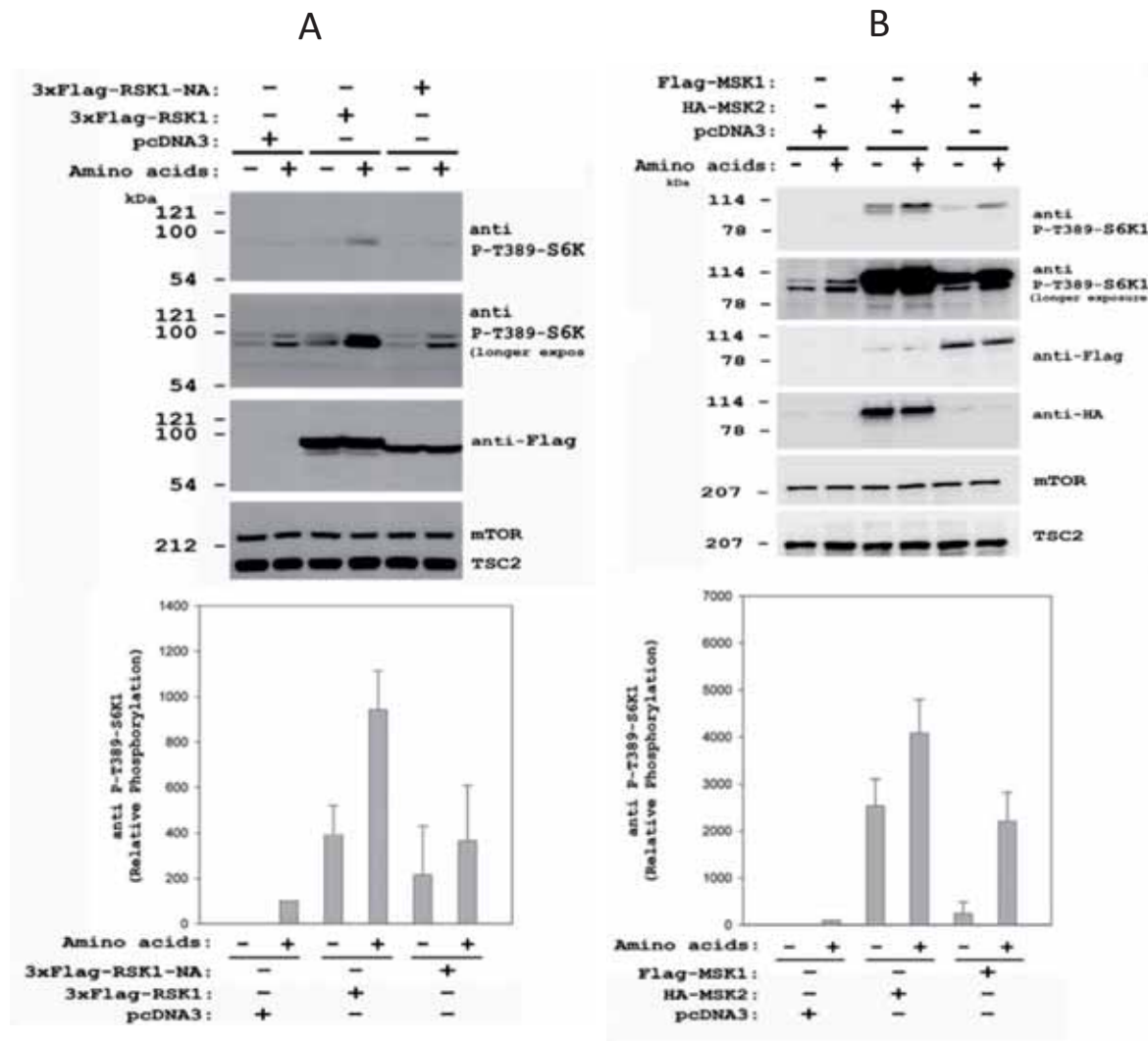


Figura 71. Activació de la RSK1, d'una forma no activa de la RSK1 (RSK1-NA), i de les MSK 1 i 2 en resposta a aminoàcids. Cèl·lules HEK 293 van ser transfectades amb els plasmidis indicats 24 hores abans de ser dejunades de sèrum. A continuació, les cèl·lules es van estimular amb aminoàcids com s'ha descrit prèviament. Es mostren els histogrames corresponents a la mitjana de la fosforilació relativa de la RSK o MSK detectada amb l'anticòs anti P-T389 p70 S6K en cada condició respecte al control +/- SEM (n=3). Per a la quantificació de les bandes es van utilitzar els nivells de TSC2 o mTOR.

4.3.4.2 | Silenciament RSK en cèl·lules HeLa

Per confirmar que la proteïna RSK1 estava involucrada en la via de senyalització per aminoàcids, vàrem realitzar experiments de silenciament per siRNA del gen de RSK1. Aquests experiments ens van permetre observar una disminució de l'inducció de la fosforilació de RSK per aminoàcids (detectada mitjançant l'anticòs anti P-T389-p70 S6K1) (Figura 72). Com a control positiu de la silenciament de RSK1 vàrem mesurar els nivells de fosforilació del substrat de la RSK, la glicògen sintasa 3 β (GSK3 β) (Hauge i Frödin, 2006). En canvi, en experiments silenciament de la S6K1 realitzats en paral·lel, cap d'aquestes fosforilacions va resultar afectada.

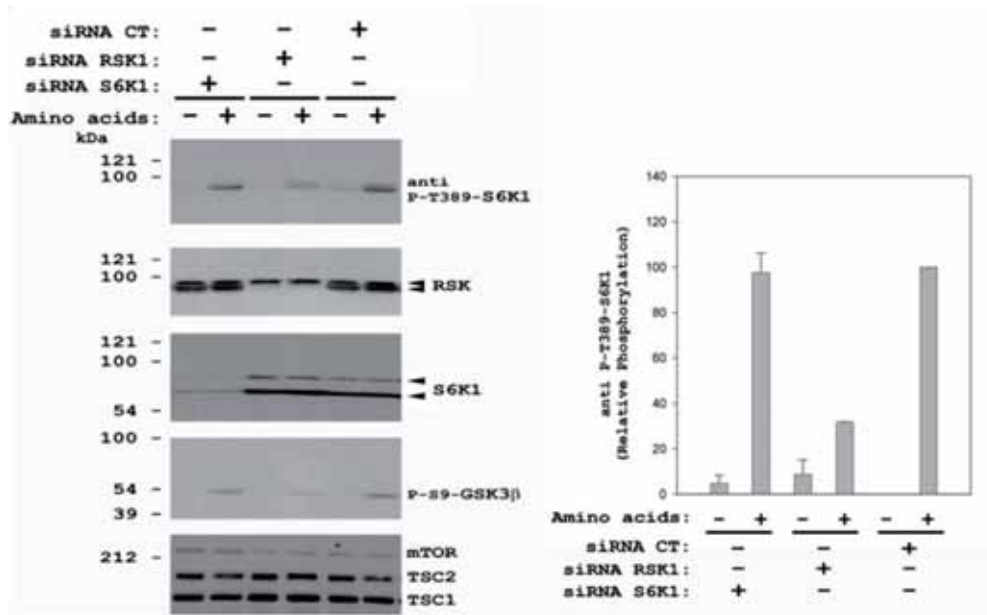


Figura 72. Estimulació amb aminoàcids de cèl·lules HeLa amb el gen de RSK1 o S6K1 silenciats. 48 hores abans del dejuni de sèrum, les cèl·lules es van transfectar amb els dúplexs per a ARN d'interferència contra RSK1 o S6K1 a una concentració final de 50nM. Es mostren els histogrammes corresponents a la mitjana de la fosforilació relativa de la RSK1 detectada amb l'anticòs anti P T389 p70 S6K1 en cada condició, respecte al control +/- SEM (n=3).

Tot i que possiblement una disminució total de la fosforilació detectada amb l'anticòs anti P-T389 p70 S6K1 requeriria una silenciació simultània dels gens de tots els membres de les famílies RSK (RSK1-4) i/o MSK (MSK1 i 2), la reducció en la fosforilació induïda per aminoàcids observada quan silenciàvem el gen de RSK1 (Figura 72) ens va suggerir que realment la proteïna RSK1 era una diana important en la via de senyalització per aminoàcids.

S'ha descrit que la MSK és una proteïna nuclear i que la RSK és citoplasmàtica però que quan s'activa, una fracció de la seva població es transloca al nucli (Hauge i Frödin, 2006). Aquestes dades juntament amb els resultats que havíem obtingut ens van suggerir que la proteïna que havíem observat translocar-se al nucli en resposta a aminoàcids mitjançant l'anticòs P-T389-p70 S6K1 en els experiments d'immunofluorescència (Figura 64B), corresponia a la proteïna RSK (RSK1-4).

Tots els resultats mostrats fins ara apuntaven a un possible paper de les proteïnes RSK i MSK en la regulació de la senyalització per aminoàcids. No obstant, en tots ells s'havia utilitzat l'anticòs anti P-T389 p70 S6K1 però no anticossos específics per a les proteïnes RSK o MSK. Per aquest motiu vàrem voler utilitzar anticossos contra els residus equivalents a la treonina 389 de la S6K (S380 (RSK) i S376 (MSK)) per veure si eren capaços de reconèixer les mateixes proteïnes detectades amb l'anticòs anti P-T389 p70 S6K. En la Figura 74 es mostra com utilitzant aquests anticossos vàrem poder detectar les formes fosforilades de les proteïnes RSK i MSK endògenes en cèl·lules estimulades amb aminoàcids. En canvi, com era d'esperar, l'estimulació de les cèl·lules amb insulina no va induir la fosforilació de cap d'aquestes proteïnes (Figura 74) (Um *et al.*, 2006; Wullschleger *et al.*, 2006). En el mateix context, assajos quinasa *in vitro* realitzats sobre el substrat de la RSK, la proteïna ribosomal S6, fusionada a GST, ens va permetre confirmar un cop més l'activació de la proteïna RSK endògena en resposta a aminoàcids (Figura 73).

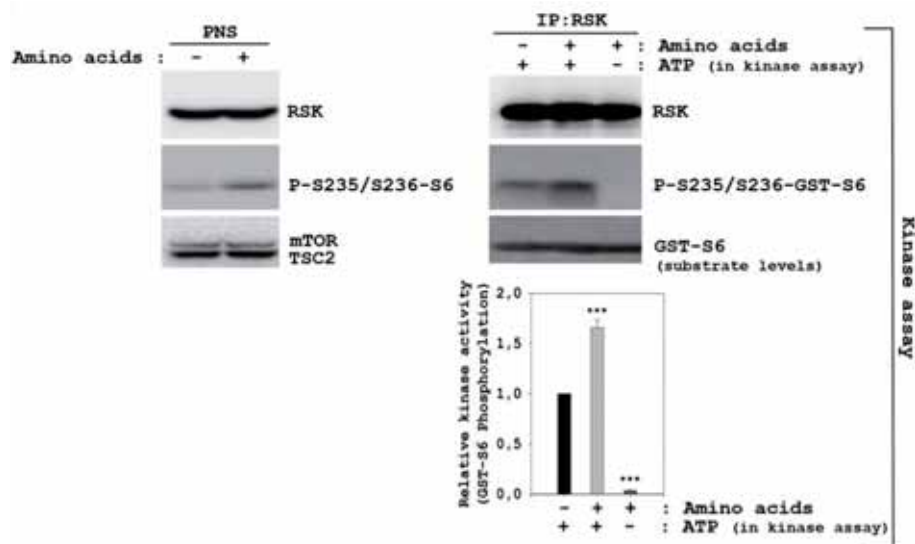


Figura 73. Assaig quinasa *in vitro* de l'immunoprecipitat de RSK1 sobre la proteïna GST-S6 purificada. Cèl·lules HEK 293 es van dejunar de sèrum i aminoàcids, i posteriorment es van activar o no amb aminoàcids durant 30 minuts. L'assaig quinasa es va realitzar a partir dels immunocomplexes de RSK1 obtinguts a partir sobredants postnuclears d'aquestes cèl·lules (PNS) (esquerra) incubant els immunocomplexes resuspendos en el tampó per a l'assaig quinasa amb la proteïna GST-S6 purificada, durant 15 minuts a 30°C en presència d'ATP. Com a control negatiu de l'assaig quinasa es va realitzar el mateix assaig en absència d'ATP. La reacció de fosforilació *in vitro* es va aturar afegint tampó per a PAGE/SDS a les mostres i posant-les en gel. Finalment es van analitzar els resultats per PAGE/SDS utilitzant l'anticòs anti P-S235/236-S6 per mesurar el grau de fosforilació del substrat i l'anti GST per mesurar-ne els nivells totals. Es mostren els histogrames corresponents a la mitjana de l'activitat quinasa relativa de RSK1 immunoprecipitat en cada condició respecte el control +/- SEM (n=4). Totes les bandes es van normalitzar respecte els nivells totals de GST-S6. ***p<0,001.

4.3.5 | Erk i p38 reguladors de la senyalització per aminoàcids.

És conegut que les proteïnes RSK s'activen a través de la família de les MAPKs, Erk (*extracellular signal regulated kinase*) en resposta a diferents estímuls com factors de creixement, hormones o neurotransmissors, i que les proteïnes MSK també s'activen via Erk a través d'aquests estímuls, però a més a més, poden ser activades per la família de MAPKs, p38, en resposta a diferents tipus d'estrès cel·lular i factors pro-inflamatoris (Hauge i Frödin, 2006). Per analitzar l'activació d'aquestes MAPKs sovint s'utilitzen anticossos que reconeixen formes fosforilades d'aquestes proteïnes. Així doncs, vàrem utilitzar aquests anticossos per analitzar la possible activació d'aquestes MAPKs en resposta a aminoàcids. Com es mostra en el carril 5 de la Figura 74, la proteïna Erk es troba fosforilada en cèl·lules dejunades de sèrum i aminoàcids, i aquesta fosforilació disminueix quan s'addicionen aminoàcids al medi. El fet que en cèl·lules dejunades de sèrum i aminoàcids les proteïnes RSK i MSK es trobessin defosforilades però que en canvi la Erk es trobés activa, ens va fer pensar que l'activació de la RSK i la MSK per aminoàcids no tenia lloc a través de la Erk. Per altre banda, l'activació de p38 per aminoàcids apuntava a un possible paper d'aquesta quinasa en l'activació de la RSK i MSK en resposta a aminoàcids. L'especificitat d'aquestes fosforilacions es va comprovar realitzant al mateix temps una activació amb insulina, en la qual tal com esperàvem, únicament es va produir l'activació de la Erk però no de la p38 (Figura 74, carril 4).

Per tal d'elucidar els rols d'aquestes MAPKs en la senyalització per aminoàcids, vàrem utilitzar inhibidors específics de les seves vies d'activació com el U0126, que inhibeix la quinasa que activa a la Erk, MEK1/2, i el SB203580 que bloqueja l'activitat de p38. En aquests experiments vàrem comprovar que l'activació de RSK i MSK per aminoàcids únicament s'inhibia completament quan utilitzàvem tots dos reactius de forma simultània (Figura 74 carril 12). Aquest fet ens va fer plantejar la hipòtesi de que

aquestes dues MAPKs actuaven a través d'un mecanisme compensatori en el qual la Erk provocava l'activació de la RSK i la MSK quan p38 es trobava inactiu, mentre que aquest paper podia ser dut a terme per la p38 en absència d'una Erk funcional. A més a més, s'ha descrit que la via de senyalització de la p38 exerceix un efecte inhibidor sobre la via de senyalització de la Erk (Zhang *et al.*, 2001) lo qual valida aquesta hipòtesi i que a més a més ens permet explicar l'activació de la Erk en resposta a aminoàcids que tenia lloc en presència de l'inhibidor de p38, SB203580 (Figura 74 carril 10). En les mateixes condicions, la presència de rapamicina o wortmannina en cèl·lules HeLa tampoc va afectar significativament a la fosforilació de les proteïnes Erk, p38, RSK o MSK (Figura 75).

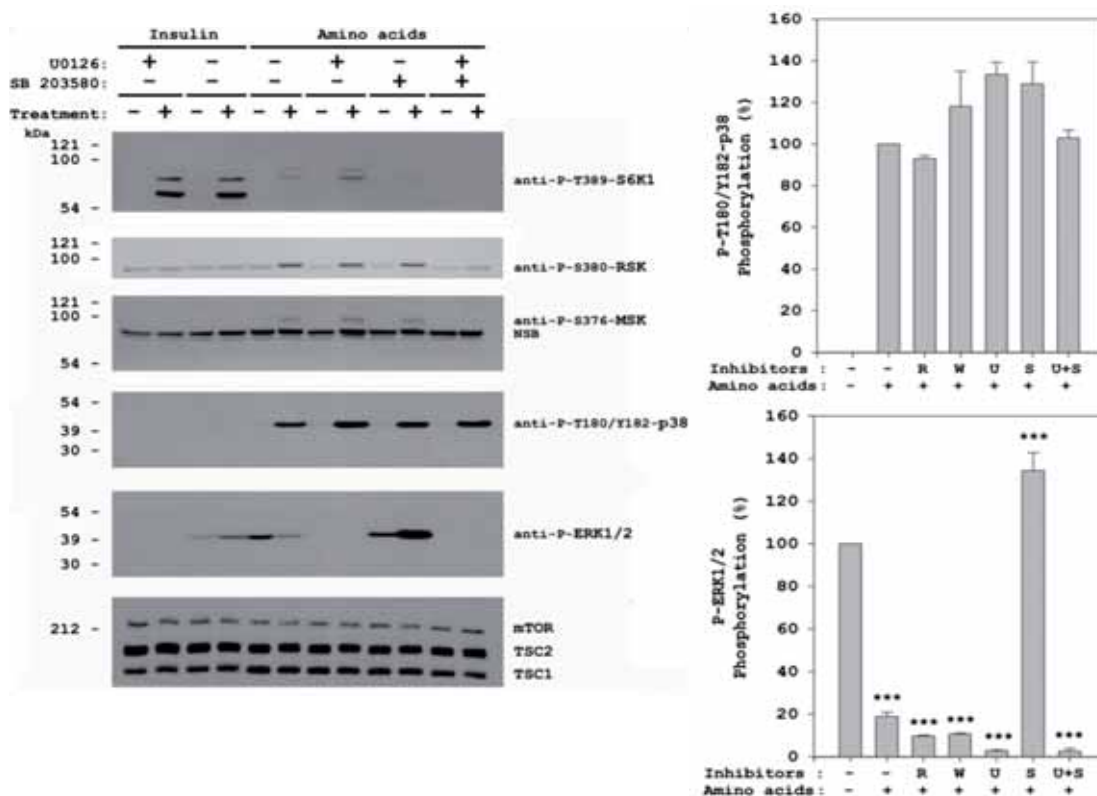


Figura 74. Estimulació de cèl·lules HEK-293 amb aminoàcids o insulina en presència dels inhibidors U0126 o SB203580. Les cèl·lules es van tractar amb els inhibidors U0126 a 5 μ M i/o SB203580 a 10 μ M durant 1 hora abans d'activar-les amb aminoàcids o insulina. Es mostren els histogrames corresponents a la mitjana de la fosforil·lació relativa de p38 i Erk en les diferents condicions, respecte al control +/- SEM (n=3). Totes les bandes van ser normalitzades respecte als nivells totals de mTOR.

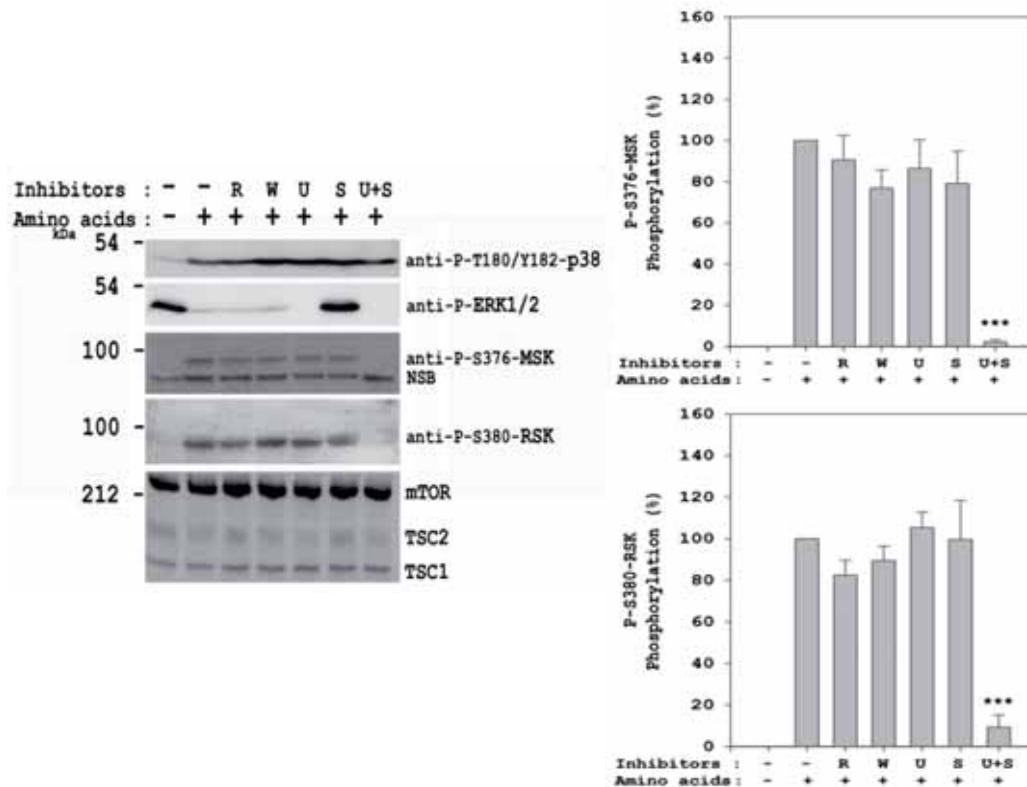


Figura 75. Estimulació de cèl·lules HeLa amb aminoàcids en presència dels inhibidors rapamicina, wortmannina, U0126 o SB203580. Les cel·lules es van tractar amb els inhibidors indicats durant 1 hora abans de realitzar l'estimulació amb aminoàcids a les següents concentracions: rapamicina (R) 20nM, wortmannina (w) 100nM, U0126 (U) 5µM, SB203580 (S) 10 µM. NBS indica banda inespecífica reconeguda per l'anticòs. Es mostren els histogrames corresponents a la mitjana de la fosforil·lació relativa de la MSK i la RSK en les diferents condicions respecte al control +/- SEM (n=3). Totes les bandes van ser normalitzades respecte els nivells totals de mTOR.

4.3.5.1 | Fosforilació T421/S424 S6K1 via MAPKs

Varis autors han observat l'activació de la S6K1 en resposta a aminoàcids mitjançant assajos quinasa *in vitro* (Hara *et al.*, 1998; Liboshi *et al.*, 1999). Tot i que els nostres resultats mostraven que la S6K endògena no és fosforilada en la treonina 389 en resposta a aminoàcids, no es pot descartar la possibilitat que aquesta via de senyalització indueixi l'activació de la S6K a través de la fosforilació d'altres residus (Pende *et al.*, 2004; Avruch *et al.*, 2006; Um *et al.*, 2006; Wullschleger *et al.*, 2006). Els resultats mostrats fins ara així com estudis previs on es descriu la fosforilació de la treonina 421 i la serina 424 en resposta a EGF o a aminoàcids (Billington *et al.*, 2005; Fumarola *et al.*, 2005) ens van fer plantejar analitzar la fosforilació d'aquests residus en resposta a aminoàcids. Com es mostra en la Figura 76 (carrils 5 i 6), l'activació amb aminoàcids va induir la fosforilació de la treonina 421 i la serina 424 de la S6K tal i com s'havia descrit. A més a més, vàrem observar una major fosforilació d'aquests residus en la isoforma p70 de la proteïna, mentre que amb insulina, la fosforilació d'aquests residus es va poder observar clarament i de forma més intensa tant en la isoforma p70 com en la p85 (Figura 76).

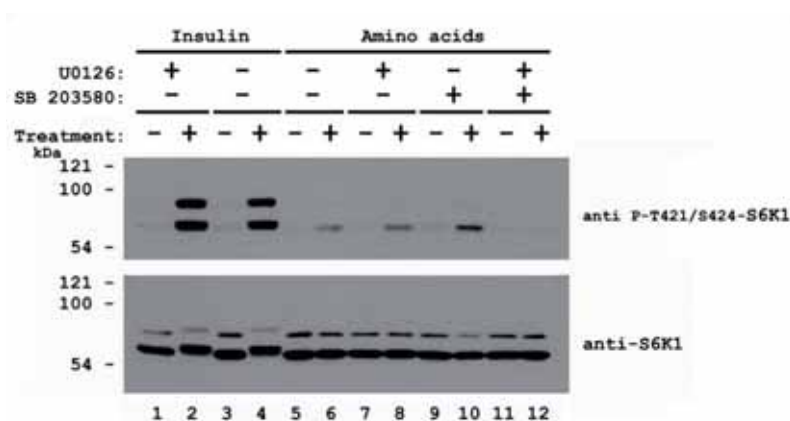


Figura 76. Fosforilació de la treonina 421 i la serina 424 de la S6K1 en cèl·lules HEK-293 estimulades amb aminoàcids o insulina en presència dels inhibidors U0126 o SB203580. Les activacions es van realitzar com s'ha descrit anteriorment. Els tractaments amb els inhibidors U0126 i SB203580 es van realitzar durant 1 hora a 5mM i 10 µM respectivament abans de l'activació amb aminoàcids o insulina. Per a la determinació de la fosforilació d'aquests residus es va utilitzar l'anticòs anti P-T421/S424-S6K1 (Cell signalling technology).

Per tal d'esbrinar si les MAPKs jugaven algun paper en la fosforilació d'aquests residus de la S6K1 en resposta a aminoàcids, vàrem realitzar l'activació en presència dels inhibidors U0126 i SB203580 (Figura 76, carrils 5-12). Únicament quan vàrem tractar les cèl·lules amb tots dos inhibidors simultàniament vàrem observar la inhibició de la fosforilació d'aquests residus en resposta a aminoàcids (carril 12). Per analitzar si aquesta fosforilació depenia de mTOR o de les PI3Ks, vàrem realitzar també aquest experiment en presència de rapamicina o wortmannina, observant tal i com es mostra en la Figura 77, que la fosforilació de la T421/S424 de la S6K1 era independent d'aquestes quinases, i sols es trobava regulada per les MAPKs, Erk i p38.

Per determinar les conseqüències de les fosforilacions T421/S424 induïdes per aminoàcids vàrem analitzar en el mateix experiment la fosforilació de la proteïna ribosomal S6, observant que (a l'igual que la fosforilació en la T421/426 de la S6K1), aquesta també era clarament activada en resposta a aminoàcids de manera dependent de l'activitat de les MAPKs Erk i p38 (Figura 77), i observant una inhibició parcial de la fosforilació de la proteïna S6 en presència de l'inhibidor U0126. Tot i que aquesta disminució va ser inferior a l'observada a quan vàrem addicionar de forma conjunta els inhibidors U0126 i SB203580, aquests resultats ens van fer pensar que alguna altre quinasa regulada per la Erk podria estar participant en la fosforilació de la S6 per aminoàcids, tal i com succeeix en la seva activació per factors de creixement o sèrum a través de la RSK (Roux *et al.*, 2007).

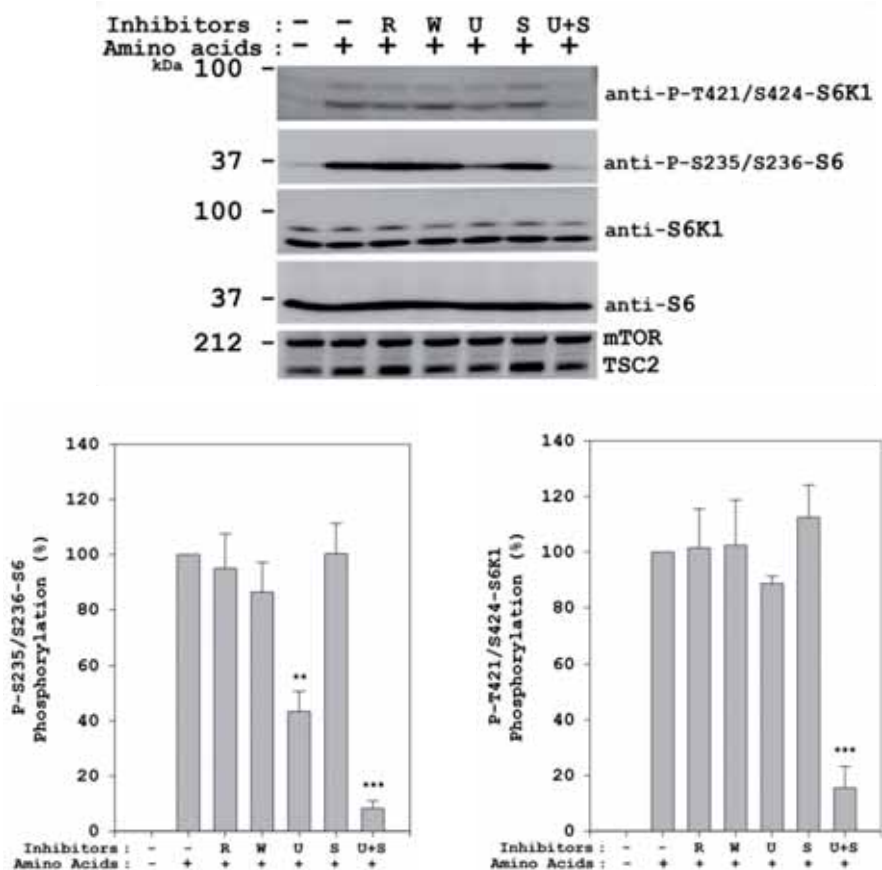


Figura 77. Fosforilació de la treonina 421 i la serina 424 de la S6K1 i de les serines 235 i 236 de la rpS6 en cèl·lules HeLa estimulades amb aminoàcids en presència dels inhibidors rapamicina, wortmannina, U0126 o SB203580. Les activacions es van realitzar com s'ha descrit anteriorment. Els tractaments amb els inhibidors es van realitzar durant 1 hora abans de l'activació amb aminoàcids a les següents concentracions: rapamicina (R) 20nM, wortmannina (W) 100nM, U0126 (U) 5mM, SB203580 (S) 10µM. Es mostren els histogrames corresponents a la mitjana de les fosforilacions relatives de S6K1 i S6 respecte al control +/- SEM (n=3). Totes les bandes es van normalitzar respecte els nivells totals de mTOR. ***: p<0,001, **: p<0,01.

4.3.5.2 | Erk en la senyalització per aminoàcids. Comparativa aminoàcids/PMA

Per determinar la importància d'aquestes MAPKs i dels seus substrats en la via de senyalització per aminoàcids, vàrem voler comparar els seus nivells de fosforil·lació en cèl·lules tractades amb l'ester de forbol PMA (o TPA), un potent inductor de l'activació de la via Ras/Erk però no de la via PI3K/Akt. Els experiments amb aquest reactiu ens van permetre constatar l'activació de les proteïnes Erk, p38, RSK i MSK, així com la fosforilació de les serines 235 i 236 de la proteïna ribosomal S6, de la serina 133 del factor de transcripció CREB i la serina 9 de la GSK3β, tots ells substrats de les quinases RSK/S6K, MSK i RSK respectivament (Figura 78). En aquests experiments només es va produir la fosforilació de la Erk amb el tractament de les cèl·lules amb PMA, ja que el tractament amb aminoàcids, tal com ja havíem vist, provocava una disminució dels seus nivells de fosforilació respecte a la condició de dejuni (Figures 74 i 78). Aquestes dades ens van confirmar el paper d'aquestes proteïnes en la senyalització per aminoàcids, i que tot i que els seus mecanismes de regulació semblaven ser diferents, existia una convergència de la senyalització de RSK i MSK tant en resposta a PMA com en resposta a aminoàcids.

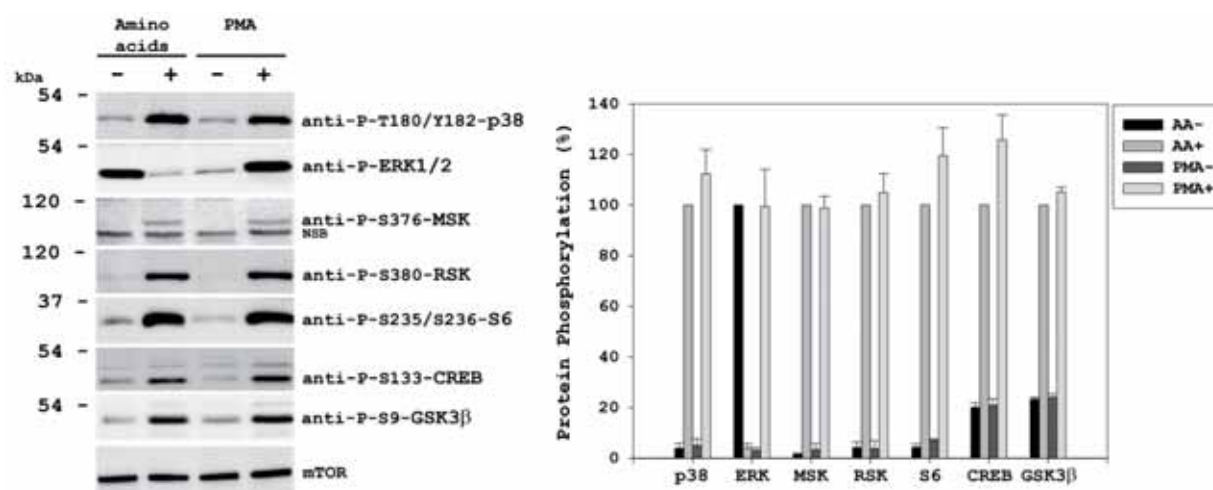


Figura 78. Comparativa estimulació de cèl·lules HeLa amb aminoàcids o PMA. L'activació amb aminoàcids es va realitzar com s'ha descrit prèviament. L'activació amb PMA es va realitzar durant 30 minuts a una concentració de 80nM final en cèl·lules dejunades de sèrum prèviament durant 24 hores. NSB: banda inespecífica reconeguda per l'anticòs. Es mostra l'histograma corresponent a la mitjana de la fosforilació relativa de les proteïnes indicades respecte el control corresponent (en tots els casos la condició d'activació amb aminoàcids, excepte per la Erk que es va quantificar respecte la condició sense aminoàcids) +/- SEM (n=3). Totes les bandes es van normalitzar respecte els nivells totals de mTOR.

4.3.5.3 | p38 en la senyalització per aminoàcids. Sobreexpressió MKK6

El paper de p38 en la regulació de la senyalització per aminoàcids ens va fer preguntar-nos si l'activació constitutiva de d'aquesta quinasa era suficient per induir la fosforilació de la proteïna ribosomal S6. Per aquest motiu vàrem transfectar cèl·lules HeLa amb una forma constitutivament activa de l'activador de p38, la MAPKK6 (MKK6 o MEK6), i a continuació vàrem analitzar els nivells de fosforilació de la proteïna S6 en cèl·lules sotmeses prèviament a un dejuni de sèrum i aminoàcids (Figura 79).

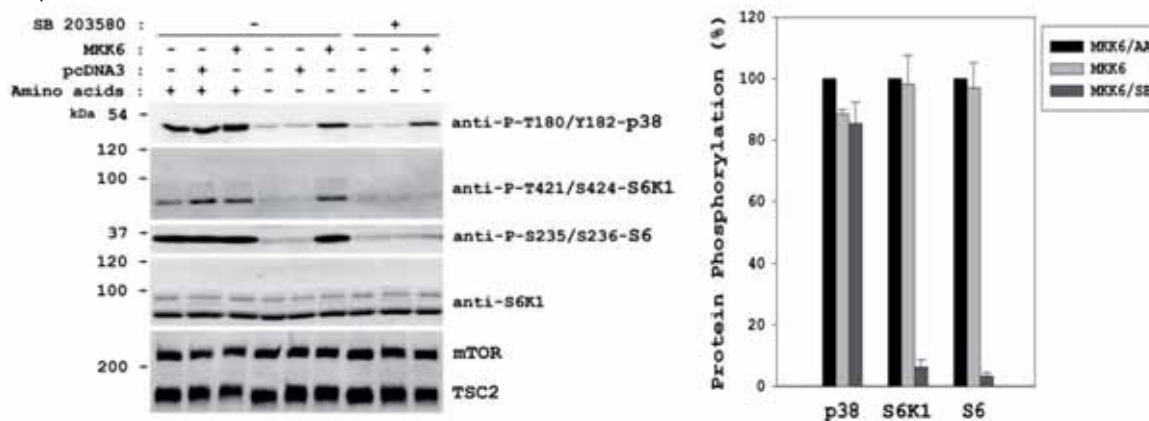


Figura 79. Fosforilació de la treonina 421 i la serina 424 de la S6K1 i de les serines 235 i 236 de la rpS6 en cèl·lules HeLa amb la via de p38 activada constitutivament i estimulades amb aminoàcids en presència o absència de l'inhibidor SB203580. 24 hores abans de dejunar cèl·lules HeLa de sèrum aquestes van ser transfectades amb l'activador de p38, MKK6, o bé amb el plasmidi buit pcDNA3. Posteriorment es va realitzar l'activació amb aminoàcids tal com s'ha descrit anteriorment. L'experiment es va realitzar en presència i en absència de l'inhibidor de p38, SB203580 el qual va ser afegit 1 hora abans de l'activació amb aminoàcids a una concentració final de 10 μM. Es mostra l'histograma corresponent a la mitjana de la fosforilació relativa de les proteïnes p38, S6K1 i S6 respecte el control corresponent +/- SEM, (n=3), en les diferents condicions. Totes les bandes es van normalitzar respecte els nivells totals de mTOR.

Mitjançant aquests experiments vàrem poder observar que en aquestes condicions, l'activació de p38 via MKK6 era suficient per induir la fosforilació de la treonina 421 i la serina 424 de la S6K1, i de les serines 235 i 236 de la proteïna ribosomal S6. A més a més, aquest efecte era totalment bloquejat per l'inhibidor de p38, SB203580 (Figura 79), lo qual ens va confirmar el paper de p38 en la via de senyalització per aminoàcids.

4.3.5.4 | Estrès osmòtic

La MAPK p38 s'activa per diferents estímuls d'estrès entre els quals es troben l'estrès per xoc osmòtic, l'estrès per calor, radiacions ionitzants, lipopolisacàrids bacterians (LPS), així com citoquines pro-inflamatòries com el factor de necrosi tumoral α (TNF α) o la interleuquina 1 (ILK1) entre d'altres (Han *et al.*, 1994; Rouse *et al.*, 1994; Ono i Han, 2000). També s'ha descrit que l'estrès per xoc osmòtic a part d'activar la p38 inhibeix la Erk (Nagata *et al.*, 1999). Com que havíem vist que l'activació de les cèl·lules amb aminoàcids provocava l'activació de la p38 i la inhibició de la Erk (Figures 74, 75 i 78), vàrem voler comprovar que els efectes observats corresponien a la senyalització per aminoàcids i que no eren deguts a l'estrès osmòtic que pogués ocasionar la barreja completa d'aminoàcids. Per aquest motiu vàrem tractar cèl·lules HeLa amb osmolits o nutrients com la betaïna o l'àcid γ -amino-n-butíric, o amb aminoàcids com la glicina o la glutamina, a una concentració final similar a la concentració total d'aminoàcids utilitzada en els experiments anteriors. Com es mostra en la Figura 80, cap d'aquests compostos va ser capaç de reproduir la regulació de les proteïnes p38, Erk, S6K1 o S6 observada en els experiments d'activació amb la barreja completa d'aminoàcids.

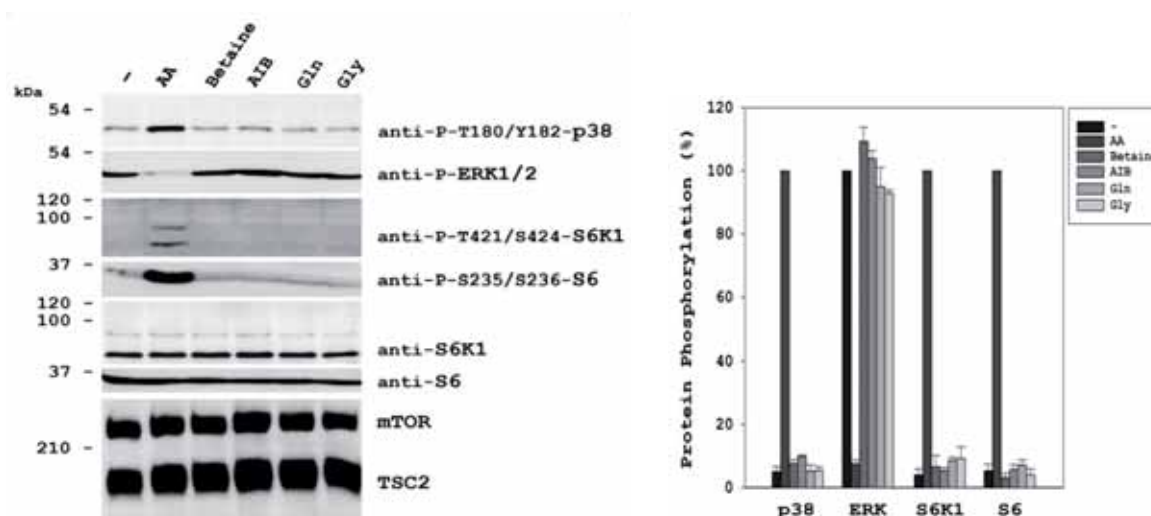


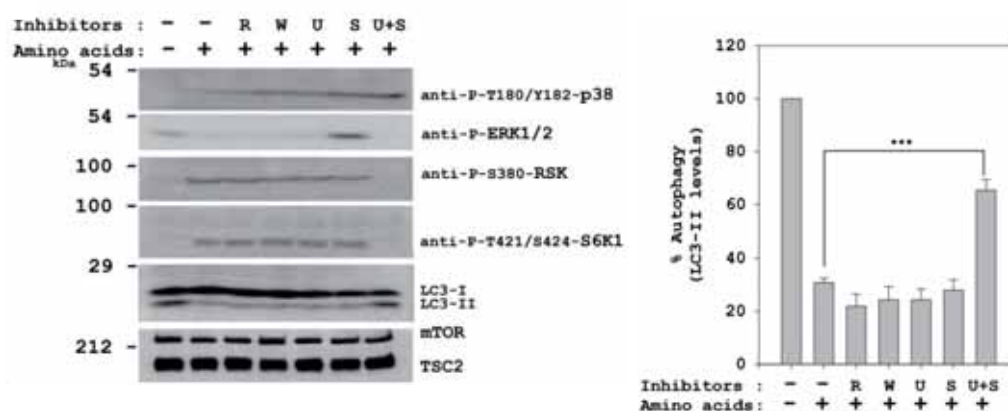
Figura 80. Tractament de cèl·lules HeLa amb els osmolits betaïna, àcid γ -amino-n-butíric (AIB), i els aminoàcids glutamina (Gln) i glicina (Gly). Les cèl·lules HeLa es van dejunar de sèrum i aminoàcids i es van tractar durant 30 minuts amb els osmolits indicats a una concentració final de 10 mM. Com a control es va realitzar una activació amb la barreja completa d'aminoàcids essencials i no essencials (AA) tal com s'ha descrit prèviament. Es mostren els histogrames corresponents a la mitjana de la fosforilació relativa de les proteïnes p38, Erk, S6K1 i S6 en cada condició, respecte el seu respectiu control +/- SEM (n=3).

4.3.5.5 | Erk i p38 en l'Autofàgia

L'augment dels nivells d'autofàgia induït a través de la depleció d'aminoàcids del medi de cultiu, i la recuperació dels seus nivells basals al adicionar aminoàcids al medi de cultiu, va ser una de les primeres observacions en el camp de la via de senyalització per aminoàcids (Klionsky, 2007).

Els experiments de monitorització de l'autofàgia mitjançant el marcador LC3-II mostrats en les Figures 63A i 64A ens van permetre confirmar aquestes dades. A més a més, per tal d'estudiar si les MAPKs, Erk i p38 participaven en la regulació de l'autofàgia per aminoàcids vàrem utilitzar els inhibidors específics de la via de Erk i p38, U0126 i SB203580 respectivament. Com es mostra en la Figura 81A, la presència d'aminoàcids al medi de cultiu va inhibir l'autofàgia induïda pel dejuni, i únicament vàrem poder observar una disminució de la inhibició de l'autofàgia per aminoàcids quan vàrem tractar les cèl·lules amb tots dos inhibidors simultàniament (U0126 i SB203580) (Figura 81 A). Igualment, vàrem poder observar que el tractament de les cel·lules amb rapamicina o wortmannina tampoc va modificar el grau d'inhibició de l'autofàgia en aquestes condicions (Figura 81B), confirmant-nos el paper de les proteïnes Erk i 38 en la via de senyalització per aminoàcids.

A



B

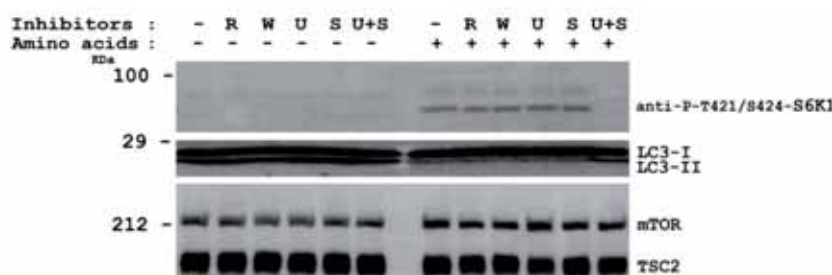


Figura 81. Paper de les MAPKs, Erk i p38 en l'autofàgia. A. Cèl·lules HEK 293 dejunades de sèrum i aminoàcids, es van tractar amb els inhibidors indicats durant 1 hora abans de l'activació amb aminoàcids a les següents concentracions: rapamicina (R) 20nM, wortmannina (W) 100nM, U0126 (U) 5mM, SB203580 (S) 10µM. Es mostren els histogrames corresponents a la mitjana dels nivells de LC3-II relatiu respecte al control respectiu +/- SEM (n=5), *** P<0,001. Totes les bandes es van normalitzar respecte els nivells totals de mTOR. B. Cèl·lules HEK 293 dejunades o estimulades amb aminoàcids en presència dels inhibidors indicats.



5 | *Discussió general*

*“El triomf no està en vèncer sempre,
sinó en no desanimar-se mai”*

*Napoleon Bonaparte
(1769-1821)*

5 | Discussió general

5.1 | Anàlisi conjunta de proteïnes gegants i petites per PAGE/SDS. El sistema LAG (Low Acrylamide gradient)

L'anàlisi per PAGE/SDS de mostres que contenen proteïnes amb un ampli rang de pesos moleculars es pot realitzar amb gels amb un gradient continu de poliacrilamida. Aquests gels permeten obtenir bones resolucions de separació de totes les proteïnes analitzades, no obstant, no són útils per a l'estudi de proteïnes gegants (>200-300 KDa) com per exemple les proteïnes HERC1 i HERC2 (532 i 528 KDa respectivament), ja que aquestes, degut al seu gran tamany, són incapaces d'entrar en aquest tipus de gels (ni tampoc en els gels convencionals) i es queden acumulades al fons dels pous de càrrega fins i tot quan s'utilitzen gels amb percentatges d'acrilamida baixos.

Amb l'objectiu de poder analitzar les proteïnes HERC1 i HERC2 per PAGE/SDS hem ideat un sistema per a l'estudi de proteïnes gegants per PAGE/SDS que al mateix temps ens permet l'anàlisi de proteïnes amb pesos moleculars menors en un sol gel. Aquest sistema el vàrem anomenar LAG gel (*Low Acrylamide Gradient gel*), va ser patentat pel nostre laboratori, i ha estat utilitzat en la majoria d'experiments d'electroforesi mostrats en aquest treball.

El LAG gel consisteix en un gel que combina de forma contínua un gel de poliacrilamida de baixa percentatge d'acrilamida (4%) i una proporció menor de l'habitual d'acrilamida:bisacrilamida (80:1) (que permet l'entrada de les proteïnes gegants al gel) amb un gel en gradient del 6 al 15% amb una proporció acrilamida/bisacrilamida de 40:1. Hem comprovat que aquest sistema permet separar proteïnes des de 5 KDa fins a proteïnes gegants en únic gel, amb els avantatges que això comporta pel que fa al estalvi de temps i de reactius.

Durant el desenvolupament d'aquest sistema, per comprovar la seva capacitat de resolució i les seves possibles aplicacions, vàrem analitzar una purificació de vesícules amb coberta de clatrina (CCV) obtinguda a partir de cervell boví ja que aquestes vesícules estan constituïdes per relativament poques proteïnes que engloben un ampli rang de pesos moleculars. Com es mostra en la figura 45, mitjançant aquest sistema vàrem poder observar una bona resolució tant en el carril dels marcadors de pesos moleculars com en el de les CCV en el qual vàrem poder identificar per espectrometria de masses la presència de proteïnes gegants com la cadena pesada de la dineïna (DYHC, 527KDa), proteïnes grans com la cadena pesada de la clatrina (CHC, 192 KDa), proteïnes mitjanes com la xaperona Hsp70 o la sinaptotagmina I (72 i 65 KDa respectivament) i proteïnes petites com el factor 1 de ribosilació de l'ADP (ARF1, 20KDa). Per comprovar l'aplicabilitat del LAG gel amb la tècnica de western-blot vàrem analitzar per LAG gel i western-blot llisats de cèl·lules HEK-293 que prèviament havien estat transfectades amb plasmidis que codifiquen per proteïnes de fusió de la proteïna HERC1 amb la proteïna GFP (*green fluorescent protein*). Com es mostra en la figura 46 B, vàrem poder identificar en la mateixa membrana totes les proteïnes de fusió utilitzades. Per últim, també vàrem comprovar l'aplicabilitat del LAG en gel en l'anàlisi per western blot d'experiments d'immunoprecipitació obtenint bons resultats en l'anàlisi de proteïnes associades a HERC1 com les cadenes pesada i lleugera de la clatrina (CHC i CLC) i la xaperona Hsp70 (Figura 46 D).

En resum, podem afirmar que el sistema LAG gel ha estat una eina molt útil per als anàlisis simultanis per PAGE/SDS de les proteïnes HERC1 i HERC2 i de proteïnes amb tamany menors que s'han realitzat en aquest treball, i per tant, podem concloure que es tracta d'un sistema altament

recomanable per a l'estudi de proteïnes gegants, que amplia les utilitats de la tècnica de l'electroforesi per PAGE/SDS.

5.2 | Paper de la proteïna HERC1 en la via de senyalització de mTOR

La proteïna HERC1 va ser descoberta durant la búsqueda de seqüències oncogèniques humanes a partir de cèl·lules de càncer de mama mitjançant assajos de tumorigenicitat en ratolins (Fasano *et al.*, 1984). A diferència del fragment d'ADN del gen d'HERC1 aïllat inicialment en aquests assaigs, no s'han descrit propietats oncogèniques per aquesta proteïna (Rosa *et al.*, 1996), però si s'ha pogut observar la seva sobreexpressió en diferents línies cel·lulars tumorals humanes tant a nivell d'ARNm com de proteïna (Rosa *et al.*, 1996).

A nivell estructural, la proteïna HERC1 és una proteïna que conté varis dominis. Entre ells destaca la presència de dos dominis RCC1 "like" (RLD1 i RLD2) i un domini HECT, dos tipus de dominis, la presència simultània en una mateixa proteïna d'almenys un de cadascun d'ells defineix la família de proteïnes HERC. El domini RLD es caracteritza per presentar homologia amb el regulador de la condensació cromosòmica 1 o RCC1, una proteïna que participa en la prevenció de la condensació cromosòmica durant la replicació de l'ADN (Ohtsubo *et al.*, 1987) i que actua com a factor bescanviador de nucleòtids (GEF) per a la "small" GTPasa nuclear Ran, una proteïna que s'encarrega del transport al nucli cel·lular de proteïnes que contenen un pèptid senyal de localització nuclear en la seva seqüència (Bischoff i Ponstingl, 1991; Ren *et al.*, 1995; Schlendstedt *et al.*, 1995), i que participa en el processament i en la translocació des d'el nucli cap al citosol de l'ARN (Cheng *et al.*, 1995).

El domini HECT presenta homologia amb l'extrem carboxil terminal de la proteïna associada a la proteïna vírica E6, E6AP. Aquesta proteïna unida a l'oncoproteïna E6 del virus del papiloma humà actua com a E3 ubiquitina lligasa per al factor de transcripció p53, induint la seva degradació a través del proteosoma 26S (Scheffner *et al.*, 1993). En condicions fisiològiques, l'E6AP també es troba activa i catalitza l'ubiquitinació d'altres substrats com per exemple les proteïnes Blk (tirosina quinasa de la família de Src) (Oda *et al.*, 1999), HHR23A (Kumar *et al.*, 1999), la proteïna multicòpia de manteniment 7 (Kuhne i Banks, 1998), hScrib, E6TP1 o la tuberina (TSC2) (Scheffner *et al.*, 1993; Nakagawa i Huijbregste, 2000; Lu *et al.*, 2004; Zheng *et al.*, 2008). Aquesta darrera forma un complex amb l'hamartina (TSC1) que regula negativament el creixement, el tamany, la forma i la supervivència cel·lular a través de l'inhibició de la serina/treonina quinasa mTOR (Inoki *et al.*, 2003; Tee *et al.*, 2003). Tot i que encara no s'ha identificat el/s substrat/s que HERC1 és capaç d'ubiquitar, s'ha comprovat que el seu domini HECT és capaç d'unir una molècula d'ubiquitina a través de la cisteïna del seu centre actiu en presència de l'E2 UbcH5, i per tant, és lògic pensar que HERC1, a l'igual que la proteïna E6AP, presenta activitat E3 ubiquitina lligasa (Schwarz *et al.*, 1998).

Degut a la similitud estructural que existeix entre els dominis RLD d'HERC1 i la proteïna RCC1, i tenint en compte el paper d'aquesta darrera com a GEF per a Ran, i la col·localització de HERC1 amb proteïnes marcadores de l'aparell de Golgi com p58, els primers treballs dirigits a la caracterització funcional d'HERC1 es van orientar a l'estudi de la interacció i del possible paper d'HERC1 com a GEF per a "small" GTPases involucrades en el tràfic vesicular com ara membres de la família de proteïnes ARF i Rab. En aquests treballs es va observar una interacció entre el domini RLD2 d'HERC1 i la proteïna ARF1, així com la col·localització de totes dues en l'aparell de Golgi. Igualment es va observar que el domini RLD1 d'HERC1 era capaç d'estimular l'alliberament de GDP de les GTPases ARF1, Rab3a i Rab5 (Rosa *et al.*, 1996). En estudis posteriors però es va comprovar que més que actuar com a GEF per aquestes proteïnes, HERC1 actuava com a factor alliberador de nucleòtids de guanina (GFR), ja que més que

estimular el bescanvi GDP/GTP sobre les citades GTPases, facilitava l'alliberament de GDP però no afavoria l'incorporació d'una nova molècula de GTP al centre actiu d'aquestes proteïnes. A més a més, es va observar que aquesta activitat requeria l'associació de PI(4,5)P₂ al domini RLD1 (Garcia-Gonzalo *et al.*, 2005). També es va descriure que el domini RLD2 de la fracció citosòlica d'HERC1 era capaç d'unir ARF1 i altres proteïnes com les cadenes pesada i lleugera de la clatrina (CHC i CLC) així com la xaperona involucrada en el desacoblament de la coberta de vesícules de clatrina, Hsp70 (*heat shock protein 70*) (Rosa *et al.*, 1996; Rosa i Barbacid, 1997; Garcia-Gonzalo i Rosa, dades no publicades). Totes aquestes dades apuntaven una funció fisiològica d'HERC1 relacionada amb el tràfic vesicular.

En treballs posteriors es va descriure que HERC1 podia participar també en processos dependents d'actina com la macropinosi, ja que es va observar que HERC1 era reclutada a zones de la membrana plasmàtica on tenien lloc processos de polimerització d'actina induïts per l'activació de la GTPasa ARF6 (Garcia-Gonzalo *et al.*, 2004). No obstant, tot i que es va comprovar que HERC1 podia actuar com a factor alliberador de nucleòtids (GRF) per a l'ARF6 *in vitro*, no semblava que l'activitat d'aquesta GTPasa es trobés sotmesa a regulació per part d'HERC1 *in vivo*, sinó que més aviat HERC1 semblava actuar per sota d'ARF6, sent reclutada als llocs de polimerització d'actina en resposta a l'activació d'aquesta GTPasa. Degut a que ARF6 activa la síntesis de PI(4,5)P₂ en la membrana plasmàtica (Honda *et al.*, 1999) es va hipotetitzar que HERC1 devia ser reclutada a les protrusions d'actina gràcies a la capacitat del seu domini RLD1 d'interaccionar amb aquests fosfoinosítids. A més a més, en aquestes estructures es va poder identificar la PI(4)P-5-quinasa, un enzim que catalitza la síntesi d'aquests fosfoinosítids (Garcia-Gonzalo *et al.*, 2004).

A l'any 2006, en col·laboració amb el nostre laboratori, es va descriure que HERC1 interaccionava amb la tuberina (TSC2) (Chong-Kopera *et al.*, 2006), una proteïna que juntament amb l'hamarina (TSC1) forma el complex de l'esclerosi tuberosa (TSC) (van Slegtenhorst *et al.*, 1998). Aquest complex actua com a regulador negatiu de la via de senyalització de mTOR, estimulant l'activitat GTPasa de Rheb a través del domini GAP present en TSC2. La descripció de la interacció de HERC1 amb TSC2 va obrir una nova línia d'investigació en l'estudi de la funció de la proteïna HERC1, els resultats preliminars de la qual s'han recollit en aquest treball.

Com es mostra en la Figura 48, hem demostrat que HERC1 és capaç d'interaccionar amb la tuberina (TSC2), però també amb l'altre component del complex de l'esclerosi tuberosa, la proteïna hamartina (TSC1). A més a més, hem observat que aquesta interacció té lloc especialment en cèl·lules que sobre-expressen TSC2 i TSC1 simultàniament (Figura 49), lo qual ens fa pensar que l'associació d'HERC1 amb aquestes proteïnes té lloc principalment quan TSC2 i TSC1 es troben formant un complex. Aquestes dades estan en desacord amb el que s'havia descrit anteriorment en el treball realitzat al laboratori del Dr. Kun Liang Guan, en el qual varen observar que TSC2 únicament era capaç d'interaccionar amb HERC1 quan es trobava en forma lliure (Chong-Kopera *et al.*, 2006). No obstant, cal tenir en compte que en aquell treball es van realitzar experiments d'immunoprecipitació de TSC2 en cèl·lules que sobre-expressaven únicament un fragment de HERC1 (3900-Ct) i per tant, és possible que sigui necessària la proteïna sencera per a l'estabilització de l'interacció entre HERC1, TSC2 i TSC1. De fet, els propis autors varen observar que almenys dos fragments d'HERC1 (3900-Ct i 3001-3901) són capaços d'interaccionar amb TSC2 (Chong-Kopera *et al.*, 2006).

Degut al paper descrit per a la proteïna E6AP en l'ubiquitinació i degradació de TSC2 a través del proteasoma 26S (Lu *et al.*, 2004; Zheng *et al.*, 2008) i a l'elevada homologia que presenta el domini HECT d'HERC1 amb aquesta proteïna, hom podria pensar, tal i com s'ha hipotetitzat en el treball mencionat anteriorment, que HERC1 podria estar actuant com a E3 ubiquitina lligasa per a TSC2,

participant en la seva degradació a través del proteasoma 26S, un paper que fins ara s'ha atribuït a PAM, una proteïna amb un domini E3 ubiquitina lligasa de tipus RING finger i que a l'igual que HERC1 posseeix també dominis RLD (un en aquest cas) (Murthy *et al.*, 2004). No obstant, gràcies a experiments de silenciament del gen d'HERC1 mitjançant ARN d'interferència o de sobreexpressió de diferents fragments d'HERC1 fusionats a la proteïna GFP, hem observat que ni la disminució dels nivells d'HERC1 (Figures 53, 54 i 55), ni la sobreexpressió de diferents fragments d'HERC1 (figura 57 B) provoquen variacions dels nivells de TSC2. És més, mitjançant experiments de silenciament d'HERC1 en cèl·lules tractades posteriorment amb l'inhibidor de la síntesi de proteïnes cicloheximida a diferents temps, hem observat que la silenciament del gen d'HERC1 provoca una disminució en el temps de vida mitja de TSC2 (Figura 51), suggerint un paper de HERC1 en la síntesi de TSC2 més que no pas en la seva degradació via proteasoma. Igualment, hem comprovat que la interacció de HERC1 amb dos mutants inestables de TSC2 que són ràpidament ubiquitinats i degradats a través del proteasoma 26S (TSC2 R611Q i R905), té lloc amb menor grau que la que s'observa per a la forma *wild type* de TSC2 (Figura 51), indicant que HERC1 actua com a estabilitzador del complex de TSC2 i TSC1, i fins i tot que potser la ràpida degradació que sofreixen aquests mutants de TSC2 és degut a la seva menor capacitat d'interacció amb HERC1. Aquestes dades també topen amb el treball de Chong-Kopera *et al.*, 2006, en el qual els autors varen observar que HERC1 disminuïa l'estabilitat de TSC2, i que els mutants de TSC2 R611Q i R905Q eren capaços d'interaccionar amb HERC1 amb la mateixa intensitat que la forma *wild type* de TSC2. No obstant, a l'igual que s'ha comentat anteriorment, aquestes dades es basen en experiments realitzats a partir de cèl·lules que sobre-expressaven únicament un fragment d'HERC1 i per tant és possible que aquests estiguessin actuant com a dominants negatius de HERC1.

El complex TSC actua com a regulador negatiu de mTOR (Inoki *et al.*, 2003; Tee *et al.*, 2003), estimulant l'activitat GTPasa de Rheb quan les cèl·lules es troben en absència de nutrients o factors de creixement. Quan el medi és ric en nutrients i factors de creixement, el complex TSC és inhibït a través d'un mecanisme desconegut que ha generat força debat en la bibliografia. Tot i que en la majoria d'estudis no s'ha observat que la fosforilació de TSC2 via Akt afecti a la interacció entre TSC2 i TSC1, alguns autors han descrit que la fosforilació de TSC2 via Akt implica la degradació de TSC2 i TSC1 a llarg plaç (Plas i Thompson, 2003). No obstant, cal tenir en compte que aquest fet no permet explicar els efectes immediats que s'observen en relació a l'activació de mTOR, quan s'activa la via PI3K/Akt.

Altres autors han proposat un model contrari al citat segons el qual la fosforilació de TSC2 si implicaria la disrupció del complex TSC (Potter *et al.*, 2002). Aquest model suggereix que la fosforilació de la serina 939 i de la treonina 1462 de TSC2 via PI3K/Akt en resposta a factors de creixement altera la localització subcel·lular de TSC2 (però no de TSC1 ni de Rheb) desde membranes internes (on es trobaria TSC1 i Rheb de forma independent a l'activació de la via PI3K/Akt) cap al citosol, impeding a TSC2 exercir l'activitat GAP sobre Rheb (Cai *et al.*, 2006). Aquest model però implica una ràpida separació de TSC2 i TSC1 en resposta a la fosforilació de TSC2, un fet que no s'ha observat en la majoria d'estudis realitzats fins a dia d'avui. També s'ha descrit que la fosforilació de les serines 939 i/o 981 i de la treonina 1462 de TSC2 en resposta a l'activació de la PI3K genera un lloc d'unió per a proteïnes de la família 14-3-3 i per tant és probable que la unió d'aquestes proteïnes a formes fosforilades de TSC2 en els residus mencionats contribueixi a la inhibició de TSC2 via Akt (Cai *et al.*, 2006; Deyoung *et al.*, 2008). Cal dir però que en experiments de *pull down* de la proteïna 14-3-3, no s'han observat variacions en l'associació entre TSC2 i TSC1 (Nellist *et al.*, 2002; Shumway *et al.*, 2003). També s'ha descrit que la fosforilació de les serines 540 i 664 (residus fosforilats directament a través de la Erk i que contribueixen a l'activació de mTOR a través d'aquesta MAPK) provoquen la disrupció de l'associació entre TSC2 i TSC1 (Ma *et al.*, 2005). A favor d'aquest model cal dir que tot i que s'han observat diferències en els nivells de fosforilació de la serina 939 i de la treonina 1462 de TSC2 entre complexos TSC immunoprecipitats a

partir de cèl·lules dejunades de sèrum o a partir de cèl·lules estimulades amb factors de creixement, no s'han observat diferències d'activitat GAP sobre Rheb *in vitro*, suggerint que la fosforilació de TSC2 a través de l'Akt inhibeix la regulació de Rheb a través d'un mecanisme que no afecta a l'activitat GAP de TSC2 (Manning, dades no publicades).

En aquest sentit, en cèl·lules dejunades o estimulades amb insulina o aminoàcids no hem observat variacions en el grau d'interacció d'HERC1 amb les proteïnes TSC2 i TSC1 (Figura 52), indicant que aquesta interacció era totalment independent de l'estat d'activació del complex TSC. Tot i que aquestes dades podrien fer-nos pensar que l'activació de mTOR no implica un canvi en la interacció entre TSC2 i TSC1, cal tenir en compte que en aquest experiment, es van analitzar els PNSs (*post nuclear supernatants*), els quals contenen tant membranes internes com citosol, i per tant, tenint en compte que HERC1 es troba localitzada tant en el citosol com en membranes internes (Rosa *et al.*, 1996), no podem descartar que l'activació de mTOR impliqui un canvi en la localització subcel·lular de TSC2. Si això fos així, aquests resultats indicarien que l'interacció d'HERC1 i TSC2 es manté tot i la modificació de la localització subcel·lular de TSC2 en resposta a l'estimulació de les cèl·lules. Per altre banda, tot i que la interacció de TSC2 i TSC1 amb HERC1 té lloc preferentment quan aquestes es troben associades, hem observat que aquesta interacció també té lloc, tot i que en menor grau, quan es troben en forma lliure, i per tant, és possible que l'estimulació de les cèl·lules amb aminoàcids o insulina provoqui un augment de la interacció d'HERC1 amb TSC2 en el citosol i amb TSC1 en membranes internes.

Tot i no observar diferències en la interacció de HERC1 amb TSC2 i TSC1 en resposta a l'activació de mTOR per aminoàcids o insulina, el fet que no es conegui exactament el mecanisme d'inactivació del complex TSC i que s'hagin identificat noves proteïnes que interaccionen amb TSC2 i que participen en la inactivació del complex TSC, com les proteïnes de la família 14-3-3, podria ser de gran interès l'estudi de la distribució subcel·lular d'HERC1, TSC2 i TSC1, per determinar si existeix menor col·localització entre elles en cèl·lules estimulades amb aminoàcids o insulina, així com si existeix col·localització d'HERC1 amb la proteïna 14-3-3 i si aquesta depèn de l'estat d'activació del complex TSC.

Per tot això, tot i no observar diferències en la interacció d'HERC1 amb TSC2 i TSC1 en cèl·lules deprivades de sèrum o de sèrum i aminoàcids, o bé estimulades amb insulina o aminoàcids respectivament (Figura 52), davant la possibilitat que HERC1 pogués participar en l'unió de les proteïnes de la família 14-3-3 al complex TSC, o bé facilitar la translocació de TSC2 des de endomembranes cap al citosol per exemple, i participar per tant en la inactivació del complex TSC, ens vàrem plantejar l'estudi de la regulació de l'activitat de mTOR per part de HERC1.

mTOR és una serina/treonina quinasa que es troba en les cèl·lules formant part de dos complexos heterodimèrics, mTORC1 i mTORC2. El complex mTORC1 regula varis processos fisiològics com la traducció d'ARNs missatgers (Hay i Sonenberg, 2004; Tee i Blenis, 2005), l'autofàgia (Abeliovich *et al.*, 2000 i 2003; Kamada *et al.*, 2000), i la biogènesi de ribosomes (Schmelzle i Hall, 2000; Kim *et al.*, 2003) entre d'altres. Mitjançant experiments de silenciament d'HERC1 no hem observat cap paper de la proteïna HERC1 en l'activació per insulina de la p70 S6K (ni en la fosforilació de la treonina 389, ni de les treonines 421 i 424), ni tampoc en la fosforilació de les serines 235 i 236 del seu substrat, la proteïna ribosomal S6 (Figura 53A i B). Curiosament, en l'anàlisi de la fosforilació de la T389 de la p70 S6K1 en resposta a aminoàcids mitjançant el mateix anticòs utilitzat en els experiments amb insulina, hem observat que aquest anticòs no reconeix la proteïna corresponent a la isoforma p70 de la S6K1, i a més a més, reconeix una proteïna amb una mobilitat semblant a la p85 S6K1 (Figura 53 B) però que tal i com s'ha demostrat en l'apartat 4.3 dels resultats, no correspon a aquesta proteïna. En cèl·lules amb el gen

d'HERC1 silenciada, en cèl·lules estimulades amb aminoàcids (Figura 54 B) tampoc hem observat diferències en la fosforilació de les treonines 421 i 424 de la p70 S6K1 ni en la fosforilació de la S6.

Amb la idea de comprovar si HERC1 regulava la fosforilació d'algun altre substrat de mTORC1, vàrem realitzar el mateix tipus d'experiment analitzant la fosforilació de les treonines 37 i 46 del factor 4EBP1. En aquests experiments no hem pogut observar cap efecte de la silenciació d'HERC1 en la fosforilació d'aquesta proteïna en resposta a insulina (Figura 55 A). Curiosament, aquests experiments únicament els vàrem poder dur a terme estimulants les cèl·lules amb insulina ja que l'activació amb aminoàcids realitzada segons els protocols descrits per Hara *et al.*, 1998; Nobokuni *et al.*, 2005 i Wang *et al.*, 2005, no ens va permetre detectar 4EBP1 fosforilat amb el mateix anticòs utilitzat per als experiments amb insulina (Figura 55 B).

Vist que HERC1 no participava en la fosforilació de cap d'aquests substrats de mTORC1, vàrem pensar que potser la seva funció estava relacionada amb la regulació de l'activitat del complex mTORC2, un complex a través del qual mTOR regula el citoesquelet d'actina (Nakashima *et al.*, 2002; Jacinto *et al.*, 2004; Sarbassov *et al.*, 2004; Guertin *et al.*, 2006) i la supervivència cel·lular (Sarbassov *et al.*, 2004 i 2005). Amb aquest objectiu vàrem analitzar la fosforilació de la serina 473 de l'Akt en resposta a insulina o aminoàcids en cèl·lules a les quals havíem silenciada l'expressió del gen d'HERC1 prèviament. Com es mostra en la Figura 53, no hem apreciat diferències en els nivells de fosforilació de l'Akt al silenciar HERC1 lo qual sembla indicar que HERC1 no participa en la regulació de l'activació de l'Akt a través de mTORC2. A més a més, tot i que no ha estat descrit, hem observat que el tractament amb aminoàcids també és capaç d'estimular la fosforilació d'aquest residu de l'Akt, indicant que el complex mTORC2 també s'activa en resposta a aminoàcids (Figura 53 B). A més a més, hem comprovat que el tractament de les cèl·lules amb aminoàcids induïx la fosforilació de la treonina 308 de l'Akt, un procés catalitzat per la PDK1 (Mora *et al.*, 2004) que únicament s'havia observat en la senyalització per insulina, i que hem vist que també té lloc de forma independent de HERC1 (Figura 53 C).

Tenint en compte que s'ha descrit que HERC1 és recrutada a zones de la membrana plasmàtica on tenen lloc processos de polimerització d'actina induïts per l'activació de la GTPasa ARF6 (lo qual suggereix un possible paper d'HERC1 en la macropinosi (Garcia-Gonzalo *et al.*, 2004)), seria interessant l'estudi del paper d'HERC1 en la regulació del citoesquelet d'actina a través del complex mTORC2. Tot i que inicialment es creia que tant la regulació del citoesquelet d'actina com l'activació de l'Akt a través de mTORC2 tenia lloc de forma independent del complex de l'esclerosi tuberosa TSC, recentment s'ha descrit que l'activitat de mTORC2 també depèn de Rheb i del complex TSC. No obstant, a diferència de en mTORC1 on el complex TSC actua com a regulador negatiu de l'activitat quinasa de mTOR, en mTORC2 el complex TSC juga un paper com a regulador positiu d'aquesta quinasa (Yang *et al.*, 2006; Huang *et al.*, 2008). A més a més, s'ha descrit que mTORC2 interacciona amb la xaperona Hsp70 (Martin *et al.*, 2008), una proteïna de la família de les *heat shock proteins* que s'ha descrit prèviament que es troba associada amb HERC1 (Rosa *et al.*, 1996; Rosa i Barbacid, 1997).

Donat que HERC1 no semblava regular cap dels substrats de mTORC1 i mTORC2 analitzats, vàrem estudiar el possible paper d'HERC1 en altres processos fisiològics relacionats amb la via de senyalització de mTOR. Una d'aquestes funcions es l'autofàgia, un procés a través del qual les cèl·lules reciclen diferents dels seus components com ara proteïnes amb temps de vida mitja elevats o fins i tot orgànuls sencers (Seglen i Bohley, 1992; Dunn, 1994; Klionsky i Ohsumi, 1999). Quan les cèl·lules es troben en un entorn on els nivells de nutrients són òptims, el complex mTORC1 es troba actiu i regula diferents processos a favor del creixement cel·lular i en contra de l'autofàgia. El mecanisme d'inhibició de l'autofàgia a través de mTOR no és conegut en molt detall però es creu que té lloc a través de la

fosforilació de la proteïna Atg13 per part de mTOR, que impedeix la interacció entre ella i la proteïna Atg1, necessària per a la formació dels autofagosomes (Blommaert *et al.*, 1995; Hara *et al.*, 1998). Mitjançant experiments de sobreexpressió de diferents fragments d'HERC1 fusionats a la proteïna GFP (alguns dels quals generen acumulacions citoplasmàtiques de proteïna que pensàvem que podien estar formant part d'autofagosomes) no hem observat cap variació en els nivells del marcador de l'autofàgia LC3 II entre les cèl·lules transfectades amb aquests plasmidis i cèl·lules transfectades amb altres plasmidis que no generen aquestes acumulacions, ni tampoc en comparació amb cèl·lules que sobre-exprimen únicament la GFP (Figura 57 B). Per tant, podem dir que aquestes acumulacions de proteïna no corresponen a autofagosomes i que HERC1 no sembla tenir un paper en la regulació de l'autofàgia. A més a més, hem confirmat mitjançant experiments d'inducció de l'autofàgia en cèl·lules amb el gen d'HERC1 silenciats, que HERC1 no afecta a aquest procés ja que hem observat que els nivells de LC3-II en aquestes condicions no difereixen dels nivells observats en cèl·lules *wild type* (Figura 58).

Una altre de les funcions regulades per mTOR és la biogènesi de ribosomes. La proteïna mTOR controla la biogènesi de ribosomes a través de la regulació de la transcripció i maduració de l'ADN ribosomal (ADNr), de la transcripció i traducció dels gens que codifiquen per a les proteïnes ribosomals (RPs), i de la transcripció de l'ARN 5S. Tots aquests processos tenen lloc a través de la regulació que exerceix mTOR sobre la maquinària de traducció dels TOP ARNs, i de l'ARN polimerasa I,II i III, les quals s'encarreguen de la transcripció de l'ADN ribosomal, dels gens que codifiquen per a proteïnes ribosomals (RPs) i de l'ADN 5S respectivament. Degut a que no havíem observat cap paper de HERC1 en la regulació de la fosforilació de les proteïnes involucrades en la traducció, p70S6K i 4EBP1, ens vàrem centrar en l'estudi de la transcripció de l'ADN ribosomal. Aquest gen codifica per a tres de les quatre espècies d'ARN ribosomal que conformen els ribosomes (18S, 5,8S i 28S). La transcripció de l'ADNr genera un pre-ARN ribosomal policistrònic 45S que conté aquestes tres seqüències d'ARN ribosomal, les quals passen a formar part dels ribosomes després de la maduració del pre-ARN. Per tal de comprovar si HERC1 participava en la biogènesi de ribosomes vàrem analitzar per RT-PCR a temps real els nivells d'ARN 18S en cèl·lules en les quals prèviament havíem silenciats l'expressió del gen d'HERC1 mitjançant la transfecció de diferents oligonucleòtids per ARN d'interferència contra HERC1. A partir d'aquests experiments hem observat que la silenciació d'HERC1 realitzada amb tres oligonucleòtids diferents (Q1, Q2, Q5) provoca una disminució significativa en el nombre de còpies d'ARN ribosomal 18S, especialment en aquelles cèl·lules en les quals vàrem silenciar l'expressió del gen d'HERC1 mitjançant l'oligonucleòtid Q1 (Figura 59). Aquestes dades ens suggereixen que HERC1 podria estar participant d'alguna manera en la biogènesi de ribosomes.

Per tal de determinar si l'efecte observat en la disminució dels nivells d'ARN 18S es devia a una disminució de la transcripció de l'ADN ribosomal i no a una degradació de l'ARN, vàrem analitzar l'efecte de la silenciació d'HERC1 en l'activitat del promotor d'aquest gen, mitjançant un assaig amb un gen reporter que contenia el promotor de l'ADN ribosomal associat al gen de la luciferasa. En aquests experiments hem observat que la silenciació d'HERC1 amb el mateix oligonucleòtid amb el qual havíem observat una disminució més significativa dels nivells d'ARN 18S (Q1), també provoca una disminució de l'activitat relativa del promotor de l'ADN ribosomal (Figura 60), suggerint que el paper d'HERC1 en la biogènesi de ribosomes podria estar relacionat amb la transcripció de l'ADN ribosomal.

L'ARN polimerasa I requereix d'almenys tres factors durant l'etapa d'iniciació de transcripció de l'ADN ribosomal; el factor TIF-IA (*transcription initiation factor IA*), el factor SL1 (o TIF-IB) i el factor UBF (*upstream binding factor*) (revisat en Grummt, 2003). El factor TIF-IA interacciona directament amb l'ARN polimerasa I i amb el factor d'unió al promotor de l'ADN ribosomal, SL1, recrutant l'ARN polimerasa I al promotor del gen i facilitant la formació del complex de transcripció (Miller *et al.*, 2001;

Cavanaugh *et al.*, 2002; Yuan *et al.*, 2002). mTOR regula el factor TIF-IA de dues maneres, de forma indirecta, a través de la regulació de la fosforilació de la serina 44 per mitjà de la quinasa S6K, i la defosforilació de la serina 199 a través de la fosfatasa PP2A, promovent l'associació entre els factors TIF-IA i SL1 i afavorint la formació del complex d'iniciació de la transcripció (Mahajan, 1994), i de forma directa, regulant la localització subcel·lular de TIF-IA en el nuclèol quan mTOR es troba actiu, o segregant-lo en el citoplasma quan mTOR està inhibit (Beck i Hall, 1999). A través de la S6K, mTOR també estimula la fosforilació de l'extrem C terminal de UBF, un altre factor de transcripció de l'ARN polimerasa I necessari per a la interacció entre l'ARN polimerasa I i el factor SL1 (Hannan *et al.*, 2003).

Tenint en compte que no hem observat cap efecte d'HERC1 en l'activació de la S6K, el fet que els factors de transcripció TIF-IA i UBF siguin regulats per mTOR a través d'aquesta quinasa, ens fa descartar la possibilitat de que HERC1 estigui participant en la transcripció de l'ADN ribosomal a través de la regulació de la S6K via mTOR. No obstant, s'ha descrit que mTOR també és capaç d'incrementar els nivells de transcripció de l'ADN ribosomal a través de la regulació del cycle cel·lular. mTOR activa la CDK4/ciclina D provocant la fosforilació de la proteïna supressora de tumors retinoblastoma, pRb, la ruptura de la interacció entre aquesta i el factor UBF, i incrementant els nivells d'UBF lliure (Nader *et al.*, 2005). En aquest sentit, el fet que a diferència del que succeeix en cèl·lules sanes, mutacions en el gen del supressor tumoral pRb, i també de p53 (p53 provoca l'aturada del cycle cel·lular i de la transcripció de l'ADN ribosomal (Budde i Grummt, 1999)) en cèl·lules canceroses impedeixen l'unió d'aquestes proteïnes als factors UBF i SL1 respectivament, així com el control negatiu que exerceixen en la transcripció mediada per l'ARN polimerasa I, pensem que l'efecte observat per HERC1 en la transcripció de l'ADN ribosomal podria estar relacionat amb aquesta via. Per altre banda, el fet que el complex TSC2/TSC1 sigui també capaç d'inhibir el cycle cel·lular a través de l'activació de l'inhibidor de la quinasa dependent de ciclina, p27 (TSC2 impedeix la degradació de p27 a través del proteasoma unint-se a aquesta proteïna (Soucek *et al.*, 1997; revisat en Rosner *et al.*, 2006)), i que aquesta funció sigui independent del paper de TSC2 en la regulació de la S6K a través de mTOR (Rosner *et al.*, 2007), ens suggereix que HERC1 podria estar modulant p27 a través de TSC2, afavorint, quan el gen d'HERC1 es troba silenciada, la no degradació de p27, i per tant la disminució de la transcripció de l'ADN ribosomal provocada per un alentiment del cycle cel·lular. En aquesta línia s'ha descrit que el membre de la família de proteïnes HERC, HERC5 (inicialment descrita com com Ceb1 (*cyclin E-binding protein 1*) degut a la capacitat d'unir-se a aquesta ciclina), es troba regulada per p53 i pRb i per tant s'ha hipotetitzat un possible paper d'aquesta proteïna en en la progressió del cycle cel·lular (tot i que no s'han observat variacions en els nivells o activitat d'HERC5 durant aquest cycle (Garcia-Gonzalo i Rosa, 2005)).

La regulació dels nivells de p53 a l'interior de les cèl·lules té lloc principalment a través de la E3 ubiquitina lligasa tipus RING finger, Mdm2, però també de la proteïna que defineix el domini HECT de les proteïnes HERC, E6AP, dues proteïnes que s'uneixen directament a p53 inhibint la seva activitat transcripcional i promovent la seva poliubiquitinació i degradació a través del proteasoma 26S (Scheffner *et al.*, 1993). La silenciació d'HERC1 per tant podria provocar també un augment de la inhibició de la transcripció a través de p53. En aquest sentit, recentment s'ha descrit que la irradiació de cèl·lules amb radiació UVB (que estimula l'activació de p53) provoca una disminució en els nivells de la proteïna HERC1 (Enk *et al.*, 2006) lo qual podria ser un mecanisme de la cèl·lula per tal de disminuir la transcripció de l'ADN ribosomal quan s'han produït danys a l'ADN.

Un altre proteïna relacionada amb TSC2 i en la transcripció de l'ADN ribosomal és el factor de transcripció c-myc. c-myc és una proteïna que és traduïda de forma CAP dependent (de manera sensible a la rapamicina) que regula la transcripció de gens relacionats amb el creixement, la proliferació i l'apoptosis i que es troba sobre-expressada en nombrosos càncers (Oster *et al.*, 2002). c-myc participa en la transcripció dels gens de les proteïnes ribosomals, dels ADNs de transferència, de l'ADN 5S i de

l'ADN ribosomal (Kim *et al.*, 2000; Boon *et al.*, 2001; Gomez-Roman *et al.*, 2003; Schlosser *et al.*, 2003; Arabi *et al.*, 2005; Grandori *et al.*, 2005), i s'ha descrit també que regula negativament la transcripció de TSC2 (Ravitz *et al.*, 2007). En condicions favorables per el creixement cel·lular i la biosíntesi de ribosomes, c-myc es localitza en el nuclèol des d'on atrau complexos enzimàtics modificadors de les histones que alteren l'organització de la cromatina cap a una estructura transcripcionalment competent (Arabi *et al.*, 2005; Grandori *et al.*, 2005), i des d'on recluta també el factor de transcripció SL1 al promotor de l'ADN ribosomal. El substrat de c-myc, nucleolina, ha estat descrit de ser necessari per a la transcripció mediada per l'ARN polimerasa I (Rickards *et al.*, 2007), i com a possible efector de mTOR en la regulació d'aquest tipus de transcripció (Grolleau *et al.*, 2002).

El fet que la silenciació d'HERC1 afecti al nombre de còpies de l'ARN ribosomal 18S i a l'activitat del promotor de l'ADN ribosomal, i donat que la proteïna RCC1 (la qual defineix els dominis RLD presents en la família de proteïnes HERC) és capaç d'unir-se a les histones (Ohtsubo *et al.*, 1989; Seino *et al.*, 1992; Nemergut *et al.*, 2001; Chen *et al.*, 2007), juntament amb el fet que altres proteïnes amb dominis RLD com la proteïna PAM (*protein associated with myc*) siguin capaces de regular la transcripció gènica a través de la seva unió a determinats promotors (al gen de c-myc en el cas de PAM (Guo *et al.*, 1998)), podria fer-nos pensar que HERC1 actua modulant directament el promotor de l'ADN ribosomal en el nuclèol. No obstant, HERC1 es troba localitzada al citosol en forma soluble o associada a membranes internes però no al nucli cel·lular (Lippincott-Schwartz *et al.*, 1989; Rosa *et al.*, 1996), i per tant, no sembla factible que la regulació de la transcripció de l'ADN ribosomal tingui lloc de forma directa.

Tenint en compte que molts factors de transcripció, com per exemple els citats p53 i c-myc, es troben regulats en el citosol a través de la seva ubiquitinació, i que s'han descrit diversos rols de la ubiquitinació de proteïnes en la transcripció, com per exemple en la regulació de la translocació al nucli de varis factors de transcripció a través de la degradació via proteasoma 26S dels seus inhibidors citoplasmàtics (Hay *et al.*, 1999; Karin i Ben-Neriah, 2000; Magnani *et al.*, 2000), o en l'activació o inhibició dels propis factors de transcripció (Hoppe *et al.*, 2000; Kaiser *et al.*, 2000), així com en la modificació d'algunes de les propietats dels factors de transcripció com per exemple l'estabilitat (Desterro *et al.*, 2000), i tenint en compte també que recentment s'ha descrit que la inhibició del proteasoma 26S provoca una disminució en la transcripció de l'ADN ribosomal (Stavreva *et al.*, 2006; Fátýol i Grummt, 2008), pensem que és possible que HERC1 participi en algun d'aquests processos gràcies a la seva activitat E3 ubiquitina lligasa. En aquest sentit, s'ha descrit que la transcripció, exportació i maduració de l'ADN ribosomal desde el nuclèol cap al citoplasma és un procés complex en el qual també té lloc la ubiquitinació de proteïnes (Fatica i Tollervey, 2002; Tschochner i Hurt, 2003).

Donat que el complexe de l'esclerosi tuberosa actua com a regulador negatiu de la biogènesi de ribosomes a través de la inhibició de la via de senyalització de mTOR, els resultats obtinguts en aquest treball suggereixen que HERC1 podria estar actuant com a regulador negatiu d'aquest complex. No obstant, el fet que HERC1 no reguli l'activitat de cap dels altres processos fisiològics estudiats dependents de la via de senyalització de mTOR, com la iniciació de la traducció CAP dependent, o l'autofàgia, i degut a que l'activació de mTOR a través de Rheb-GTP s'ha descrit com un mecanisme genèric d'activació d'aquesta via de senyalització, i no pas com un mecanisme específic de la regulació de la biogènesi de ribosomes a través de mTOR, fa que a dia d'avui no puguem concloure quina és exactament la funció de la interacció entre HERC1 i les proteïnes TSC2 i TSC1. Tot i que falten encara molts punts per aclarir, els experiments mostrats en aquest treball aporten noves dades per a la comprensió de la funció fisiològica que desenvolupa la proteïna HERC1 en la cèl·lula i suggereixen un paper de HERC1 en la biogènesi de ribosomes que podria estar relacionat amb la regulació de la

transcripció de l'ADN ribosomal, per part de mTOR, que al seu torn podria estar relacionat amb el paper que exerceix mTOR en el control del cicle cel·lular.

5.3 | Erk i p38 reguladors de la senyalització per aminoàcids

Algunes hormones com la insulina i nutrients com els aminoàcids regulen certs processos fisiològics com el creixement i el desenvolupament cel·lular a través de la modulació de la via de senyalització de mTOR (Avruch *et al.*, 2006; Wullschleger *et al.*, 2006). Un dels substrats de mTOR és la p70 S6K1, una quinasa la fosforilació de la qual s'ha utilitzat en molts treballs com a indicador de l'activitat de mTOR. Des de la descripció de mTOR com a la quinasa responsable de la fosforilació de la treonina 389 de la p70 S6K1 i del important paper fisiològic en la senyalització a través de la insulina d'aquesta fosforilació, el seu anàlisi mitjançant un anticòs que reconeix la fosforilació en aquest residu ha estat freqüentment utilitzat en molts experiments descrits en la bibliografia (Avruch *et al.*, 2006; Wullschleger *et al.*, 2006).

Durant l'estudi del paper de la proteïna HERC1 en la via de senyalització de mTOR (apartat 4.2 dels resultats), utilitzant aquest anticòs vàrem detectar que als 30 minuts de tractament de les cèl·lules amb aminoàcids es produïa la fosforilació d'una proteïna endògena de 80-90 KDa, però no de la isoforma p70 de la S6K1, la qual, com era d'esperar, si tenia lloc en cèl·lules estimulades amb insulina. Aquesta observació ens va portar a l'estudi de l'activació de la p70 S6K1 en resposta a aminoàcids, i que es recull en l'apartat 4.3 dels resultats d'aquesta tesi.

Curiosament, vàrem observar que la fosforilació d'aquesta proteïna de 80-90 KDa en resposta a aminoàcids era insensible als inhibidors de mTOR i de les PI3Ks, rapamicina i wortmannina respectivament, indicant-nos que l'activació d'aquesta proteïna era independent de la via de senyalització de mTOR (Figures 61, 62 i 63). Una primera explicació per aquesta observació va ser que aquesta proteïna que havíem detectat corresponia a la isoforma menys abundant de la S6K1, la p85 S6K1 (Coffer *et al.*, 1994; Reinhardt *et al.*, 1994). Per comprovar-ho vàrem analitzar la fosforilació de la treonina 412 d'aquesta isoforma en resposta a aminoàcids, ja que aquest residu és equivalent a la treonina 389 de la p70 S6K1. L'estudi mitjançant la transfecció de plasmidis que codifiquen per a aquestes dues isoformes de la S6K1 o fins i tot de la S6K2 ens van permetre comprovar que la fosforilació que havíem observat no corresponia a cap d'aquestes proteïnes (Figura 65 B), i ho vàrem poder demostrar definitivament mitjançant experiments de silenciament dels gens de les dues isoformes de la S6K1 (Figura 67).

Aquests resultats contradiuen altres treballs previs en els quals s'havia descrit que la fosforilació de la T389 de la p70 S6K1 també tenia lloc en resposta a aminoàcids (Um *et al.*, 2006). En alguns casos, les diferències entre aquests treballs i els nostres resultats es podien explicar a partir de les diferents aproximacions utilitzades en uns i altres. Per exemple, mitjançant assajos quinasa *in vitro* vàrem demostrar que mTOR si s'activava lleugerament en resposta a aminoàcids (Figura 68) tal i com havia estat descrit prèviament (Kim *et al.*, 2002; Findlay *et al.*, 2007). A més a més, en resposta a aminoàcids vàrem poder detectar la fosforilació de la T389 en la S6K1 sobreexpressada (Figura 69). D'acord amb els nostres resultats per a proteïnes endògenes obtinguts en cèl·lules HeLa, HEK-293 i MCF-7, també s'ha demostrat la no fosforilació de la treonina 389 de la S6K1 en cèl·lules de múscul L6, adipòcits 3T3-L1, i cèl·lules d'hepatoma FAO, tractades amb aminoàcids en absència d'insulina (Tremblay *et al.*, 2007).

La búsqueda en bases de dades de seqüències d'aminoàcids semblants a la que reconeix l'anticòs anti T389 p70 S6K1 ens va portar a centrar-nos en les proteïnes RSK i MSK com a possibles candidats de ser susceptibles a l'activació per aminoàcids. Aquestes proteïnes, a l'igual que la S6K1, pertanyen a la família de les serina/treonina quinases AGC, presenten una mobilitat electroforètica semblant a la de la p85 S6K1, i la seva regulació és independent de mTOR (Hauge *et al.*, 2006). A més a més, vàrem poder demostrar que membres d'aquestes famílies de proteïnes eren reconeguts per l'anticòs anti T389 p70 S6K1 quan les cèl·lules eren estimulades amb aminoàcids (Figures 71 i 72). Aquesta observació va ser molt important ja que ens va permetre l'estudi de la regulació de la senyalització per aminoàcids a través de les MAPKs, d'entre les quals s'ha descrit que l'activació de les proteïnes Erk i p38 juga un paper clau en la regulació del creixement, la diferenciació i l'estrès cel·lular (Avruch, 2007).

Els resultats presentats en aquest treball són compatibles amb un model en el qual els aminoàcids, almenys en part, actuen activant la MAPK, p38, o bé la Erk quan la p38 es troba inactiva, que al seu torn provoquen l'activació de les quinases RSK i MSK, i per tant involucren a la p38 en l'activació de la RSK, suggerint que les proteïnes RSK són regulades per les MAPKs Erk o p38, d'una manera semblant a la que ha estat descrita per la MSK (Hauge *et al.*, 2006). El fet que tant la Erk com la p38 puguin fosforilar la RSK i la MSK reflecteix un mecanisme cel·lular robust per mantenir la regulació per nutrients de les proteïnes RSK i MSK fins i tot quan alguna de les dues MAPKs es troba inactiva. A més a més, aquesta redundància funcional també permet explicar perquè en treballs previs no s'havia pogut identificar el paper de les MAPKs en la senyalització per aminoàcids, ja que en aquests treballs es van utilitzar inhibidors específics únicament per una d'aquestes quinases (Hara *et al.*, 1998). Durant l'escriptura d'aquesta tesi es va publicar un treball que describia la regulació de les proteïnes RSK per part de la Erk i la p38 en resposta a l'activació del receptor Toll-like en cèl·lules dendrítiques (Zaru *et al.*, 2007) i per tant, tot i que en una gran majoria de treballs s'ha demostrat que la RSK és activada principalment per la Erk, els experiments realitzats en aquest treball evidencien que la MAPK p38 és també un activador de la RSK. La comparació entre l'estimulació cel·lular amb l'ester de forbol PMA (un establert activador de la via Erk/RSK-MSK (Hauge *et al.*, 2006)) i amb aminoàcids ens ha permès confirmar l'eficàcia de la senyalització per aminoàcids en aquestes condicions experimentals (Figura 78).

Una observació interessant en aquests resultats és que la privació d'aminoàcids provocava un increment en la fosforilació de la Erk i per tant de la seva activitat, però no dels seus substrats RSK i MSK. Aquesta fet probablement és indicatiu de l'existència d'un mecanisme desconegut que perjudica l'activació de la RSK i MSK a través de la Erk en resposta a la privació d'aminoàcids. En aquest sentit, s'ha descrit recentment que l'activació de la Erk en aquestes condicions en cèl·lules d'hepatoma requereix l'activitat quinasa de la proteïna GCN2 així com la fosforilació del factor eIF2 α (Thiaville *et al.*, 2008). El fet que les MAPKs estiguin involucrades en la senyalització per aminoàcids ens va portar a analitzar la fosforilació de la S6K1 en altres residus que han estat descrits prèviament d'estar regulats per les MAPKs (Billington *et al.*, 2005). De fet, en aquestes condicions vàrem poder detectar la fosforilació de la treonina 421 i la serina 424 de la S6K1, mitjançant el mateix anticòs utilitzat en treballs previs (Fumarola *et al.*, 2005). La fosforilació d'aquests residus a través de les MAPKs Erk i p38 correlaciona amb un increment en la fosforilació del substrat de la S6K1, la proteïna ribosomal S6 (Figures 76, 77, 79 i 80). La fosforilació de la S6 en resposta a aminoàcids podria ser catalitzada per la S6K1 fosforilada en la T421/S424 i en la T389 a nivells no detectables així com per la RSK (Cohen *et al.*, 2007) (Figura 73). L'activació de la S6K1 per aminoàcids és compatible amb el paper que s'ha assignat a la S6K1 com a sensor de insulina i nutrients (Um *et al.*, 2006; Roux *et al.*, 2007).

En cèl·lules de mamífer, la deprivació de nutrients estimula l'autofàgia a través de la inhibició de mTOR i d'altres mecanismes no del tot coneguts que impliquen l'activació de la PI3K de classe III de manera independent de mTOR (Klionsky, 2007). El paper regulador dels aminoàcids en l'autofàgia va ser descrit per primera vegada a partir de experiments en fetge de rata mitjançant els quals es va observar que la deprivació d'aminoàcids induïa l'autofàgia (Mortimore i Schworer, 1977). Des d'aleshores, l'autofàgia ha estat utilitzada àmpliament com un indicador fisiològic de la senyalització per aminoàcids (Klionsky, 2007). Recentment, s'ha involucrat a les MAPKs Erk i p38 en la regulació de l'autofàgia en resposta a altres estímuls (Corcelle *et al.*, 2006 i 2007). En els resultats mostrats en aquest treball hem demostrat que aquestes quinases també participen en la regulació de la l'autofàgia per aminoàcids (Figura 81). En canvi, les dades obtingudes mitjançant els inhibidors de mTOR i de les PI3Ks suggereixen que aquestes dues quinases no estan involucrades en la inhibició de l'autofàgia provocada per l'estimulació amb aminoàcids després de la deprivació de nutrients i per tant, calen més experiments per a la comprensió del mecanisme de la senyalització per aminoàcids i l'autofàgia.





6 | *Conclusions*

*“En el cor de tots els hiverns hi viu
una primavera palpitant, i
darrera de cada nit, ve
una aurora somrient”*

*Khalil Gibran
(1883-1931)*

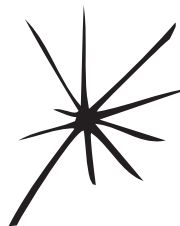
Conclusions

De les dades presentades en aquest treball se'n poden extreure les següents conclusions:

- El sistema LAG gel és una eina útil per a la separació simultània per PAGE/SDS de proteïnes gegants (>200 KDa) i proteïnes petites en un únic gel (amb l'estalvi de temps i reactius que això comporta), que garanteix bones resolucions de separació per a totes elles. A més a més, aquest sistema és compatible amb altres tècniques sovint associades a l'anàlisi per PAGE/SDS com són la tinció d'aquests gels amb colorants o el western blot.
- La proteïna HERC1 s'associa als dos components del complex de l'esclerosi tuberosa (TSC), tuberina (TSC2) i hamartina (TSC1), estabilitzant el complex. Aquesta interacció té lloc en menor grau amb els mutants de TSC2 identificats en pacients d'esclerosi tuberosa, TSC2 R611Q i R905Q.
- La silenciació per RNAi del gen d'HERC1 provoca una disminució del temps de vida mitja de la proteïna TSC2, en cèl·lules HeLa tractades amb l'inhibidor de la síntesi de proteïnes, cicloheximida.
- El grau d'associació d'HERC1 amb les proteïnes TSC2 i TSC1 és independent de l'activació o inhibició de la via de senyalització de mTOR induïdes mitjançant el dejuni o el tractament amb aminoàcids o insulina respectivament.
- La silenciació per RNAi dels gens d'HERC1 o HERC2, o de tots dos simultàniament, no provoca alteracions significatives en els nivells totals de les proteïnes implicades en la via de senyalització de mTOR, com la pròpia mTOR, TSC2, TSC1, p70 S6K o S6, ni tampoc de les formes fosforilades de les proteïnes p70 S6K1 (T389), i Akt (S473), en cèl·lules estimulades amb insulina, ni tampoc de les formes fosforilades de l'Akt (S473) i Akt (T308), en cèl·lules estimulades amb aminoàcids. La fosforilació d'aquests dos residus de l'Akt en resposta aminoàcids suggereix un paper per aquests en l'activació del complex mTORC2 i la participació de l'Akt en l'activació del complex mTORC1.
- La silenciació per RNAi del gen d'HERC1 no provoca alteracions significatives en la fosforilació de les treonines 421 i 424 de la p70 S6K1 ni de les serines 235 i 236 de la S6 en cèl·lules HeLa estimulades amb insulina o aminoàcids.
- La silenciació per RNAi dels gens que codifiquen per a les proteïnes HERC1 o HERC2, o de tots dos simultàniament, no provoquen alteracions significatives en la fosforilació de les treonines 37 i 46 del factor 4EBP1 en cèl·lules HeLa estimulades amb insulina.
- Ni la sobreexpressió de diferents fragments de la proteïna HERC1 fusionats per el seu extrem amino terminal a la proteïna fluorescent verda (GFP), ni la silenciació per RNAi del gen d'HERC1, provoquen variacions en els nivells del marcador d'autofàgia LC3-II en cèl·lules HEK-293 en condicions basals o amb l'autofàgia induïda mitjançant la privació de sèrum respectivament.
- La silenciació per RNAi del gen d'HERC1 provoca una disminució significativa en el nombre de còpies de l'ARN ribosomal 18S en condicions basals.
- La silenciació per RNAi del gen d'HERC1 provoca una disminució significativa de l'activitat del promotor de l'ADN ribosomal en condicions basals.
- En cèl·lules HEK-293, HeLa i MCF-7 estimulades amb aminoàcids, l'anticòs monoclonal anti T389 p70 S6K1 (*1A5 Cell Signalling Technology*) reconeix una banda d'aproximadament 90 KDa i una altre de menor intensitat d'aproximadament 110 KDa, que corresponen a les quinases activades per MAPKs (MKs), RSK i MSK respectivament. En aquestes condicions l'anticòs no reconeix les isoformes fosforilades en la treonina 389, p70 i p85 de la S6K1 i S6K2, ni endògenes ni sobreexpressades però si que té lloc la fosforilació de les treonines 421 i 424 de les isoformes p70 (especialment) i p85 de la S6K1 endògena.

- L'anticòs monoclonal anti T389 p70 S6K1 (*1A5 Cell Signalling Technology*) reconeix a les proteïnes RSK, MSK1 i MSK2 sobreexpressades però no al mutant inactiu de la RSK1 obtingut per la substitució de la serina 380 per una lisina, en cèl·lules HEK 293 estimulades amb aminoàcids, indicant que aquest anticòs és capaç de reconèixer la forma fosforilada en la serina 380 de la RSK1.
- Tot i l'activació de mTOR en resposta a aminoàcids, la fosforilació de la RSK en aquestes condicions és independent de mTOR i de les PI3Ks.
- La silenciació per RNAi del gen de la RSK1, però no el del gen de la S6K1, disminueix parcialment els nivells de la banda de 90 kDa detectada amb l'anticòs anti T389 p70 S6K1 (*1A5 Cell Signalling Technology*), i de la forma fosforilada en la serina 9 del substrat de la RSK, la glicògen sintasa 3 β (GSK3 β), en cèl·lules HEK 293 estimulades amb aminoàcids. Igualment, assaigs quinasa *in vitro* d'immunoprecipitats de RSK1 obtinguts a partir de cèl·lules HEK 293 estimulades amb aminoàcids, sobre el substrat purificat de la RSK, S6, provoca la fosforilació de les serines 235 i 236 d'aquesta proteïna, indicant que la RSK1 i possiblement altres membres de la família de les RSKs (RSK 2-4) són dianes importants en la senyalització per aminoàcids.
- L'estimulació de cèl·lules HEK 293 amb aminoàcids però no amb insulina permet la detecció de la fosforilació de la serina 380 de la RSK1 i de la serina 376 de la MSK mitjançant anticossos específics, confirmant la seva activació en resposta a aminoàcids detectada mitjançant l'anticòs monoclonal anti T-389 p70 S6K1 (*1A5 Cell Signalling Technology*).
- En la senyalització per aminoàcids, les MAPKs Erk i p38 actuen a través d'un mecanisme compensatori en el qual la Erk activa a la RSK i MSK quan p38 es troba inactiu, i viceversa.
- La fosforilació de les treonines 421 i 424 de les isoformes p70 (especialment) i p85 de la S6K1 en resposta a aminoàcids es troba regulada per les MAPKs, Erk i p38. El mateix succeeix en la fosforilació de la serina 235 i 236 del substrat de la S6K1, S6, tot i que en aquest cas sembla ser necessària la participació d'alguna altre quinasa regulada per la Erk, d'una manera anàloga a la que té lloc a través de la RSK en l'activació de la S6 per factors de creixement.
- A l'igual que l'estimulació cel·lular per aminoàcids, l'estimulació amb l'inductor de la via de Ras/Erk però no de la via PI3K/Akt, TPA (o PMA), provoca l'activació de les proteïnes Erk, p38, RSK, MSK, del substrat de la S6K1 i RSK, S6, del substrat de la MSK, CREB, i del substrat de la RSK, GSK3 β , confirmant el paper de la MAPK, Erk, en la senyalització per aminoàcids.
- La sobreexpressió d'una forma constitutivament activa de l'activador de p38, MKK6 (o MEK6), és suficient per induir la fosforilació de les treonines 421 i 424 de la p70 S6K1 i de les serines 235 i 236 de la proteïna ribosomal S6, en cèl·lules HeLa dejunades de sèrum i aminoàcids, confirmant el paper de la MAPK p38, en la senyalització per aminoàcids.
- Els tractaments de cèl·lules HeLa amb els osmòlits no nutrients betaína, àcid γ -amino-n-butíric (AIB), o amb els aminoàcids glutamina i glicina, no són capaços de reproduir la regulació de les proteïnes p38, Erk, S6K1 o S6 observades en l'estimulació per aminoàcids, descartant que l'activació de la Erk i la inhibició de la p38 observada en els tractaments amb aminoàcids sigui degut a una resposta cel·lular a l'estrès causat per un xoc osmòtic.
- Únicament el tractament simultani amb els inhibidors U0126 i SB203580 però no amb aquests inhibidors per separat o amb els inhibidors rapamicina o wortmannina, provoca una disminució de la inhibició de l'autofàgia al estimular amb aminoàcids cèl·lules HEK 293 prèviament dejunades de sèrum i aminoàcids, confirmant el paper de les MAPKs, Erk i p38 en la senyalització per aminoàcids.





7 | *Annex*

*“La vida és com un viatge pel mar;
hi ha dies de calma i dies de
tempesta. Lo important
és ésser bon capità del
nostre vaixell”*

*Jacinto Benavente
(1866-1954)*

7.1 | Estudi de la localització d'HERC1 en membranes cel.lulars internes

Com s'ha comentat en l'apartat 1.1.2.1.1 de la introducció, la localització subcel.lular de la proteïna HERC1 és principalment citosòlica on s'ha vist que es troba tant en forma soluble com associada a membranes internes com l'aparell de Golgi (Rosa *et al.*, 1996). Amb l'objectiu d'intentar acotar la localització subcel.lular d'HERC1 vàrem realitzar purificacions de diferents tipus de membranes internes a partir de cervell boví tals com vesícules amb coberta de clatrina (CCV) i una fracció crua de vesícules sinàptiques (membranes LP2) i les vàrem analitzar per PAGE/SDS (LAG gel) i western blot per tal de determinar si HERC1 es trobava present en aquest tipus de membranes (figures A1 i A2).

La purificació de CCV es va realitzar d'acord amb el protocol descrit per J. Keen *et al.* al 1979. Aquest mètode consisteix en dues centrifugacions diferencials de l'homogenat del córtex de cervell boví fresc (Productes del cinquè Quart, Mercabarna) a 20000 i a 85000g respectivament, les quals permeten eliminar la fracció mitocondrial i microsomal de la preparació. Acte seguit es realitzen dues etapes de purificació mitjançant gradients de sacarosa. Finalment, es realitza una centrifugació a 100000g per baixar les CCV (veure apartat 3.8 dels materials i mètodes).

La purificació de membranes LP2 es va realitzar a partir del córtex de cervell boví fresc (Productes del cinquè Quart, Mercabarna) d'acord amb el protocol descrit per Haucke and De Camilli al 1999. Aquest protocol es basa en la realització d'una centrifugació diferencial de l'homogenat de cervell, que permet l'obtenció d'una fracció crua de sinaptosomes. A continuació, es realitza un llisat d'aquests mitjançant un xoc hipo-osmòtic, el qual permet l'alliberament de la fracció crua de vesícules sinàptiques (membranes LP2) dels sinaptosomes. Finalment, es realitza una última centrifugació diferencial a 165000g per separar les membranes LP2 de la resta de membranes (veure apartat 3.9.1 dels materials i mètodes).

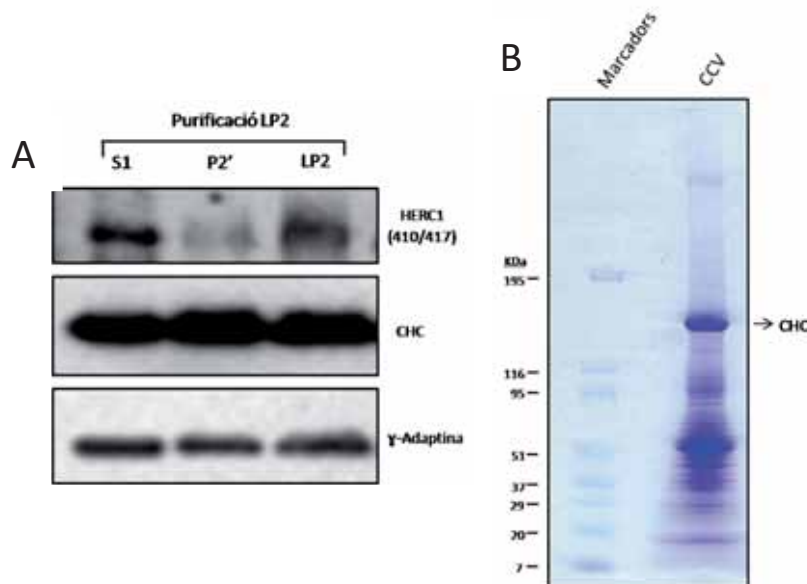


Figura A1. Purificació d'una fracció crua de vesícules sinàptiques (membranes LP2) i de vesícules amb coberta de clatrina (CCV). 200 µg de cadascuna de les fraccions indicades es van analitzar per PAGE/SDS (LAG gel) i western blot amb els anticossos indicats (A), o bé per PAGE/SDS (LAG gel) i tinció amb blau brillant de Comassie (B). A. Anàlisi de la presència d'HERC1, la cadena pesada de la clatrina (CHC) i de la gamma adaptina (subunitat gamma del complex adaptador de la clatrina (AP1) en l'aparell de Golgi) en 100 µg de diferents fraccions obtingudes durant la purificació de membranes LP2. S1: sobrenedant remanent després de la centrifugació de l'homogenat de cervell a 1000g, P2': fracció crua de sinaptosomes, LP2: fracció crua de vesícules sinàptiques. B. Anàlisi per PAGE/SDS (LAG gel) i tinció amb Comassie blue de 200µg de la purificació de vesícules amb coberta de clatrina (CCV). S'indica amb una fletxa la banda que correspon a la cadena pesada de la clatrina (CHC) (comprobat posteriorment mitjançant western blot (veure figura A2)).

Com es mostra en la figura A1, A, HERC1 es troba present en la fracció crua de vesícules sinàptiques (LP2), i a més a més, es troba enriquida en relació als nivells d'HERC1 que s'observen en la fracció crua de sinaptosomes (P2'). En totes les fraccions analitzades (S1, P2' i LP2), vàrem poder comprovar també la presència de la cadena pesada de la clatrina, i de la gamma adaptina (subunitat gamma del complex adaptador de la clatrina (AP1) en l'aparell de Golgi), indicatives de la presència de vesícules amb coberta de clatrina en aquestes preparacions.

En l'anàlisi mitjançant LAG gel i tinció amb blau brillant de Commassie de la purificació de membranes amb coberta de clatrina (CCV) vàrem poder observar la presència d'una banda molt intensa que per la seva migració en el LAG gel podia correspondre a de la cadena pesada de la clatrina (CHC) (figura A1, B).

Per tal de determinar si HERC1 es trobava present en les CCVs i si la banda d'intensitat elevada observada corresponia realment a la cadena pesada de la clatrina, i amb l'objectiu de caracteritzar les purificacions de CCVs i de les membranes LP2, vàrem analitzar mitjançant western blot ambdues purificacions utilitzant diferents anticossos específics que reconeixen diferents tipus de proteïnes marcadores de membranes cel·lulars internes com la proteïna de la matriu de l'aparell de Golgi, GM130 i el receptor KDEL (dues proteïnes presents en l'aparell del Golgi), les GTPases Rab5 i ARF6, i el receptor d'EGF (proteïnes que es troben presents en els "early" endosomes, o que participen en l'endocitosi que té lloc en la membrana plasmàtica respectivament), la sinaptotagmina (una proteïna transmembrana marcador de vesícules sinàptiques), i la proteïna Hsp70 (una xaperona de la família de les *heat shock proteins* que s'ha descrit que interacciona amb HERC1 (Rosa i Barbacid, 1997) i que juga un paper en el desacoblament de la coberta de clatrina en vesícules amb aquest tipus de coberta (Chappell *et al.*, 1986; Heymann *et al.*, 2005)). Com a controls positius d'aquests experiments vàrem analitzar en paral·lel purificacions d' "early" endosomes (EE) i de membranes de l'aparell de Golgi obtingudes a partir de cervell de rata (realitzades per Ouadah Hadjebi).

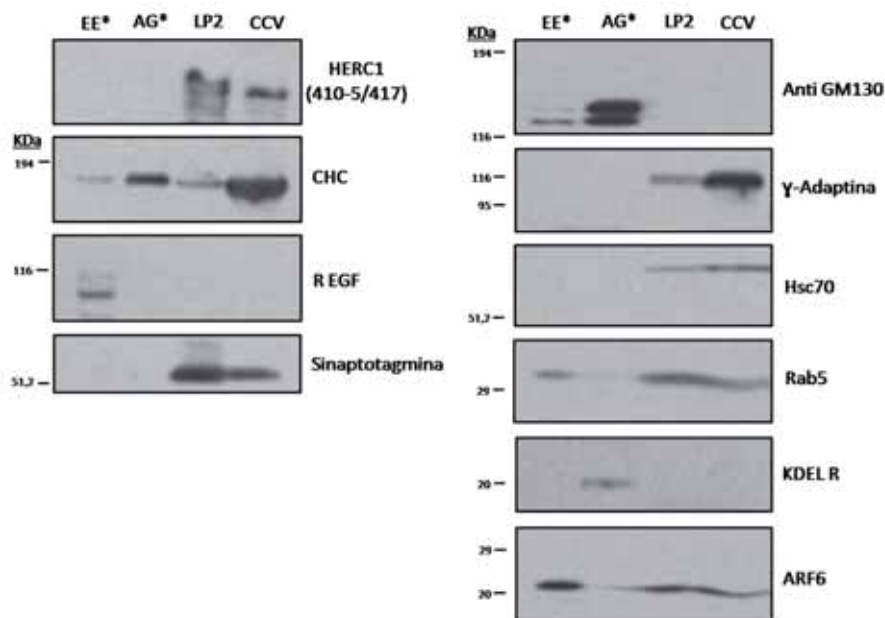


Figura A2. Caracterització vesícules amb coberta de clatrina (CCV) i fracció crua de vesícules sinàptiques (LP2) mitjançant western blot. 100 µg de cadascuna de les purificacions es van analitzar per PAGE/SDS (LAG gel) i western blot amb els anticossos indicats. EE: purificació d'endosomes "early", AG: purificació d'aparell de Golgi, LP2: purificació fracció crua de vesícules sinàptiques, CCV: purificació de vesícules amb coberta de clatrina. (*: purificacions realitzades a partir de cervell de rata per Ouadah Hadjebi).

Com es mostra en la figura A2, la proteïna HERC1 es troba present tant en les vesícules amb coberta de clatrina (CCV) com en la fracció crua de vesícules sinàptiques (LP2). A més a més, tal i com esperàvem, únicament aquests dos tipus de membranes van donar positiu per al marcador de vesícules sinàptiques, sinaptotagmina (especialment les membranes LP2), confirmant-nos la presència d'aquest tipus de vesícules en ambdues purificacions. Sorprenentment, a diferència del que s'havia descrit prèviament (Rosa *et al.*, 1996), no vàrem detectar la presència d'HERC1 en la fracció corresponent a l'aparell de Golgi (AG), no obstant, cal tenir en compte que la presència d'HERC1 en aquest orgànu lloc especialment en vesícules amb coberta de tipus COP I involucrades en el tràfic vesicular que té lloc desde l'aparell de Golgi cap al reticle endoplasmàtic (potser HERC1 juga en participa en aquest procés) (Hadjebi i Rosa, dades no publicades), i per tant, és possible que la purificació d'aparell de Golgi utilitzada en aquests experiments no contingui aquest tipus de vesícules.

En els quatre tipus de membranes internes analitzades vàrem poder observar també la presència de la cadena pesada de la clatrina, de forma especialment notable en la fracció de CCVs tal com era d'esperar. En canvi, únicament les fraccions CCV i LP2 van donar positiu per a la gamma adaptina (especialment les CCV), indicant-nos que almenys una part d'aquestes vesícules tenien un origen en l'aparell de Golgi. Igualment, únicament les purificacions CCV i LP2 van donar positiu per a la xaperona Hsp70.

Cal notar que tant les membranes CCV i LP2, així com la purificació d'endosomes "early" (EE), tot i que van donar negatiu per al receptor d'EGF, van donar positiu per a les GTPases ARF6 i Rab5, indicant-nos que una part de les vesícules CCV provenien també de la membrana plasmàtica i d'endosomes "early", així com que les membranes LP2 apart de vesícules sinàptiques contenen també en part aquest tipus d'endosomes (lo qual no és d'extranyar al tractar-se d'una fracció no purificada de vesícules sinàptiques). En canvi, tant les membranes LP2 com les CCV van donar negatiu per als marcadors de l'aparell de Golgi KDEL i GM130, indicant l'absència de membranes d'aquest orgànu lloc en les purificacions, tot i que, com s'ha comentat anteriorment arran del seu positiu per a la gamma adaptina, si que contenen vesícules amb coberta de clatrina provinents de l'aparell de Golgi (especialment les CCVs).

7.1.1 | Experiments d'acoblament de la coberta de vesícules sinàptiques (LP2)

Donat que HERC1 es trobava present en la purificacions de la fracció crua de vesícules sinàptiques i de vesícules amb coberta de clatrina, i tenint en compte que HERC1 interacciona amb la xaperona Hsp70 (Rosa i Barbacid, 1997), una proteïna que juga un paper en el procés dependent d'ATP del desacoblament de la coberta de clatrina en aquest tipus de vesícules (Chappell *et al.*, 1986; Heymann *et al.*, 2005) i tenint en compte que en presència d'ATP l'Hsp70 es dissocia del complex ternari que forma amb HERC1 i amb la clatrina (Rosa i Barbacid, 1997), ens vàrem preguntar si HERC1 es trobava de formant part d'aquestes membranes de forma constitutiva o si per contra únicament es trobava unida a elles transitòriament com succeeix en proteïnes de la coberta d'aquests tipus de vesícules.

Amb aquesta idea vàrem posar a punt experiments de recrutament de proteïnes de coberta sobre membranes LP2 (veure llegenda de la figura A3 i l'apartat 3.9.3 dels materials i mètodes per veure en detall el procediment, i l'apartat 3.9.2 per veure el procediment seguit per a la purificació i diàlisi del citosol de cervell boví utilitzat en aquests experiments).

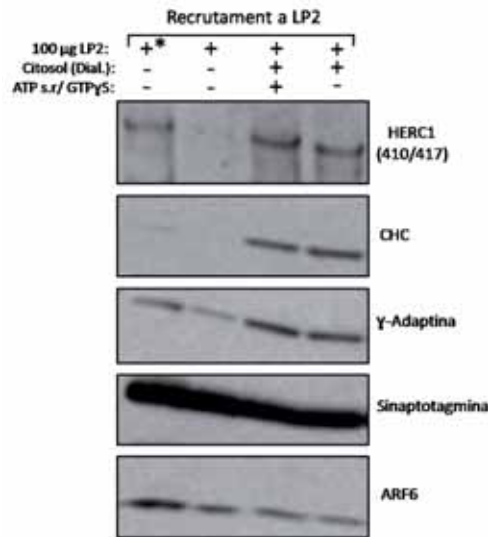


Figura A3. Experiments de recrutament de proteïnes de coberta sobre membranes LP2. 300 µg de membranes LP2 es van rentar amb un tampó de carbonat sòdic 0,5M a PH=9,5 durant 30 minuts per tal d'eliminar les proteïnes de la coberta d'aquestes vesícules. A continuació, tres alíquotes de 100µg de les membranes després del rentat es van incubar durant 15 minuts a 37°C en presència de 500 µg de citosol de cervell boví prèviament dialitzat (citosol (Dial)) per tal d'eliminar la presència de nucleòtids (ATP, GTP, etc) (carril 4), en presència de 500 µg citosol boví prèviament dialitzat i de un sistema regenerant d'ATP (ATP s.r), i de GTPγS (GTP no hidrolitzable que impedeix la reacció de desacoblament de la coberta i retrasa el procés de fisió de la vesícula, i per tant facilita l'anàlisi de les vesícules durant la seva formació) (carril 3), o bé únicament les membranes LP2 soles (carril 2). A continuació, vàrem separar per centrifugació la fracció soluble (citosol) de la insoluble (membranes LP2), i vàrem analitzar aquesta darrera mitjançant PAGE/SDS (LAG gel) i western blot amb els anticossos indicats. En el mateix experiment vàrem analitzar també una fracció de membranes LP2 abans dels seu rentat (indicat amb un asterisc) per tal de comprovar la presència de les proteïnes de coberta endògenes (carril 1).

Com es pot observar en la figura A3, el rentat de les membranes LP2 amb tampó carbonat va provocar una disminució en els nivells de les proteïnes de coberta CHC (especialment), gamma-adaptina i ARF 6, en comparació amb els nivells observats en membranes LP2 que no s'havien sotmès al procés de rentat (*). En canvi, tal i com era d'esperar, els nivells de la proteïna transmembrana sinaptotagmina, no van variar en cap de les condicions analitzades.

Pel que fa a la proteïna HERC1 vàrem observar una disminució notable dels seus nivells d'una manera anàloga a la observada per a les proteïnes CHC, gamma-adaptina i ARF6. A més a més, la incubació de les membranes amb citosol boví va permetre el recrutament de HERC1, CHC i gamma-adaptina, tot i que tal i com es mostra en el carril 4 però, en contra del que s'ha descrit (Krauss *et al.*, 2003), aquest reclutament va tenir lloc de forma independent de la presència d'un sistema regenerant d'ATP i de GTPγS (carril 4). És conegut que la formació de la coberta de clatrina depèn de la presència d'ATP, i per tant és possible que el citosol boví utilitzat, tot i que va ser dialitzat, contingui encara traces d'aquest nucleòtid. En aquest sentit, pensem que és possible que sigui necessari optimitzar la diàlisi del citosol realitzada o bé utilitzar un sistema més efectiu que millori l'eliminació de nucleòtids del citosol, com podria ser l'utilització de columnes de gel filtració.

Curiosament, els nivells de la GTPasa ARF6, tot i que van disminuir al tractar les membranes LP2 amb el tampó de rentat, ho van fer lleugerament, quedant força proteïna unida a les membranes després del rentat (carril 2). A més a més, no vàrem observar el seu recrutament a les membranes després de la seva incubació amb citosol. Tot i que es tracta d'un experiment preliminar i que és necessària la realització de més experiments en aquesta direcció, és possible que l'eliminació d'aquesta GTPasa de les membranes LP2 requereixi un rentat més agressiu per tal d'eliminar-la en major grau de la superfície d'aquestes membranes i poder observar el seu recrutament a aquestes estructures tal i com

ha estat descrit (Krauss *et al.*, 2003). No obstant, les dades mostrades en aquest annex indiquen que HERC1 es troba present tant en vesícules amb coberta de clatrina com en vesícules sinàptiques, i suggereixen, almenys en aquestes darreres, que més que tractar-se d'un component constitutiu d'aquestes estructures, es troba present de forma transitòria en la seva escorça, potser participant en l'acoblament o desacoblament de la coberta d'aquestes vesícules.





8 | *Bibliografia*

*“La lectura és una conversa amb
els homes més il·lustres dels
segles passats”*

*René Descartes
(1596-1650)*

Bibliografia

A

1. Abeliovich, H., Dunn, W. A., Jr., Kim, J., and Klionsky, D. J. (2000) *The Journal of cell biology* **151**(5), 1025-1034
2. Abeliovich, H., Zhang, C., Dunn, W. A., Jr., Shokat, K. M., and Klionsky, D. J. (2003) *Molecular biology of the cell* **14**(2), 477-490
3. Abraham, R. T., and Wiederrecht, G. J. (1996) *Annual review of immunology* **14**, 483-510
4. Abrams, B., Grill, B., Huang, X., and Jin, Y. (2008) *Dev Dyn* **237**(3), 630-639
5. Abriel, H., Loffing, J., Rebhun, J. F., Pratt, J. H., Schild, L., Horisberger, J. D., Rotin, D., and Staub, O. (1999) *The Journal of clinical investigation* **103**(5), 667-673
6. Adhikary, S., Marinoni, F., Hock, A., Hulleman, E., Popov, N., Beier, R., Bernard, S., Quarto, M., Capra, M., Goettig, S., Kogel, U., Scheffner, M., Helin, K., and Eilers, M. (2005) *Cell* **123**(3), 409-421
7. Adori, C., Low, P., Moszkovkin, G., Bagdy, G., Laszlo, L., and Kovacs, G. G. (2006) *J Histochem Cytochem* **54**(2), 263-267
8. Aebi, M., Clark, M. W., Vijayraghavan, U., and Abelson, J. (1990) *Mol Gen Genet* **224**(1), 72-80
9. Aguirre, V., Werner, E. D., Giraud, J., Lee, Y. H., Shoelson, S. E., and White, M. F. (2002) *The Journal of biological chemistry* **277**(2), 1531-1537
10. Akcakanat, A., Singh, G., Hung, M. C., and Meric-Bernstam, F. (2007) *Biochemical and biophysical research communications* **362**(2), 330-333
11. Akira, S., Takeda, K., and Kaisho, T. (2001) *Nat Immunol* **2**(8), 675-680
12. Alessi, D. R., Andjelkovic, M., Caudwell, B., Cron, P., Morrice, N., Cohen, P., and Hemmings, B. A. (1996) *The EMBO journal* **15**(23), 6541-6551
13. Alessi, D. R., Kozlowski, M. T., Weng, Q. P., Morrice, N., and Avruch, J. (1998) *Curr Biol* **8**(2), 69-81
14. Ali, S. M., and Sabatini, D. M. (2005) *The Journal of biological chemistry* **280**(20), 19445-19448
15. Amerik, A. Y., and Hochstrasser, M. (2004) *Biochimica et biophysica acta* **1695**(1-3), 189-207
16. Anan, T., Nagata, Y., Koga, H., Honda, Y., Yabuki, N., Miyamoto, C., Kuwano, A., Matsuda, I., Endo, F., Saya, H., and Nakao, M. (1998) *Genes Cells* **3**(11), 751-763
17. Anjum, R., and Blenis, J. (2008) *Nature reviews* **9**(10), 747-758
18. Arabi, A., Wu, S., Ridderstrale, K., Bierhoff, H., Shiue, C., Fatyol, K., Fahlen, S., Hydbring, P., Soderberg, O., Grummt, I., Larsson, L. G., and Wright, A. P. (2005) *Nature cell biology* **7**(3), 303-310
19. Arthur, J. S. (2008) *Front Biosci* **13**, 5866-5879
20. Askjaer, P., Galy, V., Hannak, E., and Mattaj, I. W. (2002) *Molecular biology of the cell* **13**(12), 4355-4370
21. Ausubel, F. M. (1988) *Current protocols in molecular biology*, Published by Greene Pub. Associates and Wiley-Interscience : J. Wiley, New York
22. Avruch, J. (2007) *Biochimica et biophysica acta* **1773**(8), 1150-1160
23. Avruch, J., Hara, K., Lin, Y., Liu, M., Long, X., Ortiz-Vega, S., and Yonezawa, K. (2006) *Oncogene* **25**(48), 6361-6372

B

24. Bai, X., Ma, D., Liu, A., Shen, X., Wang, Q. J., Liu, Y., and Jiang, Y. (2007) *Science (New York, N. Y)* **318**(5852), 977-980
25. Baltimore, D. (1970) *Nature* **226**(5252), 1209-1211
26. Bamba, C., Bobinsec, Y., Fukuda, M., and Nishida, E. (2002) *Curr Biol* **12**(6), 503-507
27. Bateman, A., Birney, E., Cerruti, L., Durbin, R., Etwiller, L., Eddy, S. R., Griffiths-Jones, S., Howe, K. L., Marshall, M., and Sonnhammer, E. L. (2002) *Nucleic Acids Res* **30**(1), 276-280
28. Bateman, A., Birney, E., Durbin, R., Eddy, S. R., Howe, K. L., and Sonnhammer, E. L. (2000) *Nucleic Acids Res* **28**(1), 263-266
29. Baumeister, W., Walz, J., Zuhl, F., and Seemuller, E. (1998) *Cell* **92**(3), 367-380
30. Beck, T., and Hall, M. N. (1999) *Nature* **402**(6762), 689-692

31. Bedford, F. K., Kittler, J. T., Muller, E., Thomas, P., Uren, J. M., Merlo, D., Wisden, W., Triller, A., Smart, T. G., and Moss, S. J. (2001) *Nature neuroscience* **4**(9), 908-916
32. Belham, C., Roig, J., Caldwell, J. A., Aoyama, Y., Kemp, B. E., Comb, M., and Avruch, J. (2003) *The Journal of biological chemistry* **278**(37), 34897-34909
33. Belz, T., Pham, A. D., Beisel, C., Anders, N., Bogin, J., Kwozynski, S., and Sauer, F. (2002) *Methods (San Diego, Calif)* **26**(3), 233-244
34. Benvenuto, G., Li, S., Brown, S. J., Braverman, R., Vass, W. C., Cheadle, J. P., Halley, D. J., Sampson, J. R., Wienecke, R., and DeClue, J. E. (2000) *Oncogene* **19**(54), 6306-6316
35. Beugnet, A., Wang, X., and Proud, C. G. (2003) *The Journal of biological chemistry* **278**(42), 40717-40722
36. Billington, C. K., Kong, K. C., Bhattacharyya, R., Wedegaertner, P. B., Panettieri, R. A., Jr., Chan, T. O., and Penn, R. B. (2005) *Biochemistry* **44**(44), 14595-14605
37. Bischoff, F. R., and Ponstingl, H. (1991) *Nature* **354**(6348), 80-82
38. Bjorck, L., and Kronvall, G. (1984) *J Immunol* **133**(2), 969-974
39. Blenis, J. (1993) *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **90**(13), 5889-5892
40. Blommaart, E. F., Luiken, J. J., Blommaart, P. J., van Woerkom, G. M., and Meijer, A. J. (1995) *The Journal of biological chemistry* **270**(5), 2320-2326
41. Blondeau, F., Ritter, B., Allaire, P. D., Wasiak, S., Girard, M., Hussain, N. K., Angers, A., Legendre-Guillemain, V., Roy, L., Boismenu, D., Kearney, R. E., Bell, A. W., Bergeron, J. J., and McPherson, P. S. (2004) *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**(11), 3833-3838
42. Blot, V., Perugi, F., Gay, B., Prevost, M. C., Briant, L., Tangy, F., Abriel, H., Staub, O., Dokhelar, M. C., and Pique, C. (2004) *Journal of cell science* **117**(Pt 11), 2357-2367
43. Bodem, J., Dobрева, G., Hoffmann-Rohrer, U., Iben, S., Zentgraf, H., Delius, H., Vingron, M., and Grummt, I. (2000) *EMBO reports* **1**(2), 171-175
44. Bonawitz, N. D., Chatenay-Lapointe, M., Pan, Y., and Shadel, G. S. (2007) *Cell metabolism* **5**(4), 265-277
45. Boon, K., Caron, H. N., van Asperen, R., Valentijn, L., Hermus, M. C., van Sluis, P., Roobeek, I., Weis, I., Voute, P. A., Schwab, M., and Versteeg, R. (2001) *The EMBO journal* **20**(6), 1383-1393
46. Bos, J. L., Rehmann, H., and Wittinghofer, A. (2007) *Cell* **129**(5), 865-877
47. Boussif, O., Lezoualc'h, F., Zanta, M. A., Mergny, M. D., Scherman, D., Demeneix, B., and Behr, J. P. (1995) *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **92**(16), 7297-7301
48. Bowers, A. J., and Boylan, J. F. (2004) *Gene* **328**, 135-142
49. Boylan, J. P., and Wright, A. F. (2000) *Human molecular genetics* **9**(14), 2085-2093
50. Bradford, M. M. (1976) *Analytical biochemistry* **72**, 248-254
51. Brazil, D. P., and Hemmings, B. A. (2001) *Trends in biochemical sciences* **26**(11), 657-664
52. Bronstein, I., Edwards, B., and Voyta, J. C. (1989) *Journal of bioluminescence and chemiluminescence* **4**(1), 99-111
53. Brown, B. A., Cloix, C., Jiang, G. H., Kaiserli, E., Herzyk, P., Kliebenstein, D. J., and Jenkins, G. I. (2005) *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**(50), 18225-18230
54. Brown, K., Gerstberger, S., Carlson, L., Franzoso, G., and Siebenlist, U. (1995) *Science (New York, N.Y)* **267**(5203), 1485-1488
55. Browne, G. J., and Proud, C. G. (2002) *European journal of biochemistry / FEBS* **269**(22), 5360-5368
56. Brugarolas, J., Lei, K., Hurley, R. L., Manning, B. D., Reiling, J. H., Hafen, E., Witters, L. A., Ellisen, L. W., and Kaelin, W. G., Jr. (2004) *Genes & development* **18**(23), 2893-2904
57. Brunn, G. J., Hudson, C. C., Sekulic, A., Williams, J. M., Hosoi, H., Houghton, P. J., Lawrence, J. C., Jr., and Abraham, R. T. (1997) *Science (New York, N.Y)* **277**(5322), 99-101
58. Buchberger, A. (2002) *Trends in cell biology* **12**(5), 216-221
59. Budde, A., and Grummt, I. (1999) *Oncogene* **18**(4), 1119-1124
60. Burgess, R. W., Peterson, K. A., Johnson, M. J., Roix, J. J., Welsh, I. C., and O'Brien, T. P. (2004) *Molecular and cellular biology* **24**(3), 1096-1105
61. Burnett, P. E., Barrow, R. K., Cohen, N. A., Snyder, S. H., and Sabatini, D. M. (1998) *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**(4), 1432-1437
62. Burnette, W. N. (1981) *Analytical biochemistry* **112**(2), 195-203

63. Buttgereit, D., Pflugfelder, G., and Grummt, I. (1985) *Nucleic Acids Res* **13**(22), 8165-8180
64. Byfield, M. P., Murray, J. T., and Backer, J. M. (2005) *The Journal of biological chemistry* **280**(38), 33076-33082

C

65. Cadwell, K., and Coscoy, L. (2005) *Science (New York, N.Y)* **309**(5731), 127-130
66. Cai, H., Lin, X., Xie, C., Laird, F. M., Lai, C., Wen, H., Chiang, H. C., Shim, H., Farah, M. H., Hoke, A., Price, D. L., and Wong, P. C. (2005) *J Neurosci* **25**(33), 7567-7574
67. Cai, S. L., Tee, A. R., Short, J. D., Bergeron, J. M., Kim, J., Shen, J., Guo, R., Johnson, C. L., Kiguchi, K., and Walker, C. L. (2006) *The Journal of cell biology* **173**(2), 279-289
68. Cai, Y., and Somlo, S. (2008) *J Am Soc Nephrol* **19**(3), 418-420
69. Callaghan, M. J., Russell, A. J., Woollatt, E., Sutherland, G. R., Sutherland, R. L., and Watts, C. K. (1998) *Oncogene* **17**(26), 3479-3491
70. Caplen, N. J., Parrish, S., Imani, F., Fire, A., and Morgan, R. A. (2001) *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**(17), 9742-9747
71. Cardenas, M. E., Cutler, N. S., Lorenz, M. C., Di Como, C. J., and Heitman, J. (1999) *Genes & development* **13**(24), 3271-3279
72. Carriere, A., Cargnello, M., Julien, L. A., Gao, H., Bonneil, E., Thibault, P., and Roux, P. P. (2008) *Curr Biol* **18**(17), 1269-1277
73. Carsillo, T., Astrinidis, A., and Henske, E. P. (2000) *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**(11), 6085-6090
74. Cavanaugh, A. H., Hirschler-Laszkiewicz, I., Hu, Q., Dundr, M., Smink, T., Misteli, T., and Rothblum, L. I. (2002) *The Journal of biological chemistry* **277**(30), 27423-27432
75. Cecconi, F., and Levine, B. (2008) *Developmental cell* **15**(3), 344-357
76. Chandran, J., Ding, J., and Cai, H. (2007) *Molecular neurobiology* **36**(3), 224-231
77. Chappell, T. G., Welch, W. J., Schlossman, D. M., Palter, K. B., Schlesinger, M. J., and Rothman, J. E. (1986) *Cell* **45**(1), 3-13
78. Chau, V., Tobias, J. W., Bachmair, A., Marriott, D., Ecker, D. J., Gonda, D. K., and Varshavsky, A. (1989) *Science (New York, N.Y)* **243**(4898), 1576-1583
79. Cheadle, J. P., Reeve, M. P., Sampson, J. R., and Kwiatkowski, D. J. (2000) *Human genetics* **107**(2), 97-114
80. Chen, D., Kon, N., Li, M., Zhang, W., Qin, J., and Gu, W. (2005) *Cell* **121**(7), 1071-1083
81. Chen, H., McCaffery, J. M., and Chan, D. C. (2007) *Cell* **130**(3), 548-562
82. Chen, T., Muratore, T. L., Schaner-Tooley, C. E., Shabanowitz, J., Hunt, D. F., and Macara, I. G. (2007) *Nature cell biology* **9**(5), 596-603
83. Cheng, Y., Dahlberg, J. E., and Lund, E. (1995) *Science (New York, N.Y)* **267**(5205), 1807-1810
84. Chiu, Y. L., and Rana, T. M. (2002) *Molecular cell* **10**(3), 549-561
85. Choi, J. H., Adames, N. R., Chan, T. F., Zeng, C., Cooper, J. A., and Zheng, X. F. (2000) *Curr Biol* **10**(14), 861-864
86. Choi, J. H., Bertram, P. G., Drenan, R., Carvalho, J., Zhou, H. H., and Zheng, X. F. (2002) *EMBO reports* **3**(10), 988-994
87. Choi, K. M., McMahon, L. P., and Lawrence, J. C., Jr. (2003) *The Journal of biological chemistry* **278**(22), 19667-19673
88. Chomczynski, P., and Sacchi, N. (1987) *Analytical biochemistry* **162**(1), 156-159
89. Chong-Kopera, H., Inoki, K., Li, Y., Zhu, T., Garcia-Gonzalo, F. R., Rosa, J. L., and Guan, K. L. (2006) *The Journal of biological chemistry* **281**(13), 8313-8316
90. Christoforidis, S., Miaczynska, M., Ashman, K., Wilm, M., Zhao, L., Yip, S. C., Waterfield, M. D., Backer, J. M., and Zerial, M. (1999) *Nature cell biology* **1**(4), 249-252
91. Chung, C. T., Niemela, S. L., and Miller, R. H. (1989) *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **86**(7), 2172-2175
92. Ciechanover, A., and Ben-Saadon, R. (2004) *Trends in cell biology* **14**(3), 103-106
93. Ciechanover, A., Orian, A., and Schwartz, A. L. (2000) *J Cell Biochem* **77**(S34), 40-51
94. Clement, M., Deshaies, F., de Repentigny, L., and Belhumeur, P. (2006) *Molecular microbiology* **62**(2), 453-468

95. Coffey, P. J., and Woodgett, J. R. (1994) *Biochemical and biophysical research communications* **198**(2), 780-786
96. Cohen, M. S., Hadjivassiliou, H., and Taunton, J. (2007) *Nature chemical biology* **3**(3), 156-160
97. Cohen, P., and Frame, S. (2001) *Nature reviews* **2**(10), 769-776
98. Cohen-Zinder, M., Seroussi, E., Larkin, D. M., Loo, J. J., Everts-van der Wind, A., Lee, J. H., Drackley, J. K., Band, M. R., Hernandez, A. G., Shani, M., Lewin, H. A., Weller, J. I., and Ron, M. (2005) *Genome research* **15**(7), 936-944
99. Collier, B., Gorgoni, B., Loveridge, C., Cooke, H. J., and Gray, N. K. (2005) *The EMBO journal* **24**(14), 2656-2666
100. Collins, C. A., Wairkar, Y. P., Johnson, S. L., and DiAntonio, A. (2006) *Neuron* **51**(1), 57-69
101. Coons, A. H., and Kaplan, M. H. (1950) *The Journal of experimental medicine* **91**(1), 1-13
102. Corcelle, E., Djerbi, N., Mari, M., Nebout, M., Fiorini, C., Fenichel, P., Hofman, P., Poujeol, P., and Mograbi, B. (2007) *Autophagy* **3**(1), 57-59
103. Corcelle, E., Nebout, M., Bekri, S., Gauthier, N., Hofman, P., Poujeol, P., Fenichel, P., and Mograbi, B. (2006) *Cancer research* **66**(13), 6861-6870
104. Corradetti, M. N., Inoki, K., Bardeesy, N., DePinho, R. A., and Guan, K. L. (2004) *Genes & development* **18**(13), 1533-1538
105. Coux, O., Tanaka, K., and Goldberg, A. L. (1996) *Annual review of biochemistry* **65**, 801-847
106. Craparo, A., Freund, R., and Gustafson, T. A. (1997) *The Journal of biological chemistry* **272**(17), 11663-11669
107. Crino, P. B., Nathanson, K. L., and Henske, E. P. (2006) *The New England journal of medicine* **355**(13), 1345-1356
108. Cruz, C., Nadal, M., Ventura, F., Bartrons, R., Estivill, X., and Rosa, J. L. (1999) *Cytogenet Cell Genet* **87**(3-4), 263-264
109. Cruz, C., Paladugu, A., Ventura, F., Bartrons, R., Aldaz, M., and Rosa, J. L. (1999) *Cytogenet Cell Genet* **86**(1), 68-69
110. Cruz, C., Ventura, F., Bartrons, R., and Rosa, J. L. (2001) *FEBS letters* **488**(1-2), 74-80
111. Cuenda, A., Rouse, J., Doza, Y. N., Meier, R., Cohen, P., Gallagher, T. F., Young, P. R., and Lee, J. C. (1995) *FEBS letters* **364**(2), 229-233

D

112. Dalby, K. N., Morrice, N., Caudwell, F. B., Avruch, J., and Cohen, P. (1998) *The Journal of biological chemistry* **273**(3), 1496-1505
113. Dames, S. A., Mulet, J. M., Rathgeb-Szabo, K., Hall, M. N., and Grzesiek, S. (2005) *The Journal of biological chemistry* **280**(21), 20558-20564
114. Dan, I., Watanabe, N. M., and Kusumi, A. (2001) *Trends in cell biology* **11**(5), 220-230
115. Dastur, A., Beaudenon, S., Kelley, M., Krug, R. M., and Huibregtse, J. M. (2006) *The Journal of biological chemistry* **281**(7), 4334-4338
116. Davies, W., Smith, R. J., Kelsey, G., and Wilkinson, L. S. (2004) *Gene Expr Patterns* **4**(6), 741-747
117. de Groot, R. P., Ballou, L. M., and Sassone-Corsi, P. (1994) *Cell* **79**(1), 81-91
118. Deng, H. X., Zhai, H., Fu, R., Shi, Y., Gorrie, G. H., Yang, Y., Liu, E., Dal Canto, M. C., Mugnaini, E., and Siddique, T. (2007) *Human molecular genetics* **16**(23), 2911-2920
119. Dennis, P. B., Jaeschke, A., Saitoh, M., Fowler, B., Kozma, S. C., and Thomas, G. (2001) *Science (New York, N.Y.)* **294**(5544), 1102-1105
120. Dennis, P. B., Pullen, N., Kozma, S. C., and Thomas, G. (1996) *Molecular and cellular biology* **16**(11), 6242-6251
121. Desterro, J. M., Rodriguez, M. S., and Hay, R. T. (2000) *Cell Mol Life Sci* **57**(8-9), 1207-1219
122. Devon, R. S., Orban, P. C., Gerrow, K., Barbieri, M. A., Schwab, C., Cao, L. P., Helm, J. R., Bissada, N., Cruz-Aguado, R., Davidson, T. L., Witmer, J., Metzler, M., Lam, C. K., Tetzlaff, W., Simpson, E. M., McCaffery, J. M., El-Husseini, A. E., Leavitt, B. R., and Hayden, M. R. (2006) *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**(25), 9595-9600
123. DeYoung, M. P., Horak, P., Sofer, A., Sgroi, D., and Ellisen, L. W. (2008) *Genes & development* **22**(2), 239-251
124. Di Fiore, P. P., Polo, S., and Hofmann, K. (2003) *Nature reviews* **4**(6), 491-497

125. DiAntonio, A., Haghghi, A. P., Portman, S. L., Lee, J. D., Amaranto, A. M., and Goodman, C. S. (2001) *Nature* **412**(6845), 449-452
126. Dilworth, D. J., Tackett, A. J., Rogers, R. S., Yi, E. C., Christmas, R. H., Smith, J. J., Siegel, A. F., Chait, B. T., Wozniak, R. W., and Aitchison, J. D. (2005) *The Journal of cell biology* **171**(6), 955-965
127. Dong, J., and Pan, D. (2004) *Genes & development* **18**(20), 2479-2484
128. Dorrello, N. V., Peschiaroli, A., Guardavaccaro, D., Colburn, N. H., Sherman, N. E., and Pagano, M. (2006) *Science (New York, N.Y)* **314**(5798), 467-471
129. Doyle, S., Vaidya, S., O'Connell, R., Dadgostar, H., Dempsey, P., Wu, T., Rao, G., Sun, R., Haberland, M., Modlin, R., and Cheng, G. (2002) *Immunity* **17**(3), 251-263
130. Drakenberg, K., Nikoshkov, A., Horvath, M. C., Fagergren, P., Gharibyan, A., Saarelainen, K., Rahman, S., Nylander, I., Bakalkin, G., Rajs, J., Keller, E., and Hurd, Y. L. (2006) *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**(20), 7883-7888
131. D'Souza, J., Hendricks, M., Le Guyader, S., Subburaju, S., Grunewald, B., Scholich, K., and Jesuthasan, S. (2005) *Development* **132**(2), 247-256
132. Dubiel, W., Ferrell, K., and Rechsteiner, M. (1995) *Molecular biology reports* **21**(1), 27-34
133. Dumont, F. J., and Su, Q. (1996) *Life sciences* **58**(5), 373-395
134. Dunn, W. A., Jr. (1994) *Trends in cell biology* **4**(4), 139-143
135. Dykxhoorn, D. M., Novina, C. D., and Sharp, P. A. (2003) *Nature reviews* **4**(6), 457-467

E

136. Eagle, H. (1955) *The Journal of experimental medicine* **102**(5), 595-600
137. Efe, J. A., Botelho, R. J., and Emr, S. D. (2005) *Current opinion in cell biology* **17**(4), 402-408
138. Ehnert, C., Tegeder, I., Pierre, S., Birod, K., Nguyen, H. V., Schmidtko, A., Geisslinger, G., and Scholich, K. (2004) *J Neurochem* **88**(4), 948-957
139. Eiberg, H., Troelsen, J., Nielsen, M., Mikkelsen, A., Mengel-From, J., Kjaer, K. W., and Hansen, L. (2008) *Human genetics* **123**(2), 177-187
140. Elbashir, S. M., Harborth, J., Lendeckel, W., Yalcin, A., Weber, K., and Tuschl, T. (2001) *Nature* **411**(6836), 494-498
141. Enk, C. D., Jacob-Hirsch, J., Gal, H., Verbovetski, I., Amariglio, N., Mevorach, D., Ingber, A., Givol, D., Rechavi, G., and Hochberg, M. (2006) *Oncogene* **25**(18), 2601-2614
142. Erie, E. A., Shim, H., Smith, A. L., Lin, X., Keyvanfar, K., Xie, C., Chen, J., and Cai, H. (2007) *Journal of neuroimmunology* **182**(1-2), 226-231
143. Erikson, E., and Maller, J. L. (1985) *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **82**(3), 742-746
144. Erikson, R. L. (1991) *The Journal of biological chemistry* **266**(10), 6007-6010
145. Eskelinen, E. L., Prescott, A. R., Cooper, J., Brachmann, S. M., Wang, L., Tang, X., Backer, J. M., and Luocq, J. M. (2002) *Traffic (Copenhagen, Denmark)* **3**(12), 878-893
146. Esselens, C., Oorschot, V., Baert, V., Raemaekers, T., Spittaels, K., Serneels, L., Zheng, H., Saftig, P., De Strooper, B., Klumperman, J., and Annaert, W. (2004) *The Journal of cell biology* **166**(7), 1041-1054

F

147. Fang, D., Elly, C., Gao, B., Fang, N., Altman, Y., Joazeiro, C., Hunter, T., Copeland, N., Jenkins, N., and Liu, Y. C. (2002) *Nat Immunol* **3**(3), 281-287
148. Fang, Y., Park, I. H., Wu, A. L., Du, G., Huang, P., Frohman, M. A., Walker, S. J., Brown, H. A., and Chen, J. (2003) *Curr Biol* **13**(23), 2037-2044
149. Fang, Y., Vilella-Bach, M., Bachmann, R., Flanigan, A., and Chen, J. (2001) *Science (New York, N.Y)* **294**(5548), 1942-1945
150. Farhood, H., Serbina, N., and Huang, L. (1995) *Biochimica et biophysica acta* **1235**(2), 289-295
151. Fasano, O., Birnbaum, D., Edlund, L., Fogh, J., and Wigler, M. (1984) *Molecular and cellular biology* **4**(9), 1695-1705

152. Fatica, A., and Tollervey, D. (2002) *Current opinion in cell biology* **14**(3), 313-318
153. Fatyol, K., and Grummt, I. (2008) *Biochimica et biophysica acta* **1779**(12), 850-859
154. Favata, M. F., Horiuchi, K. Y., Manos, E. J., Daulerio, A. J., Stradley, D. A., Feeser, W. S., Van Dyk, D. E., Pitts, W. J., Earl, R. A., Hobbs, F., Copeland, R. A., Magolda, R. L., Scherle, P. A., and Trzaskos, J. M. (1998) *The Journal of biological chemistry* **273**(29), 18623-18632
155. Felgner, P. L., Gadek, T. R., Holm, M., Roman, R., Chan, H. W., Wenz, M., Northrop, J. P., Ringold, G. M., and Danielsen, M. (1987) *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **84**(21), 7413-7417
156. Feng, S., Chen, J. K., Yu, H., Simon, J. A., and Schreiber, S. L. (1994) *Science (New York, N.Y)* **266**(5188), 1241-1247
157. Feng, Z., Zhang, H., Levine, A. J., and Jin, S. (2005) *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**(23), 8204-8209
158. Fengsrud, M., Roos, N., Berg, T., Liou, W., Slot, J. W., and Seglen, P. O. (1995) *Exp Cell Res* **221**(2), 504-519
159. Ferrari, S., Bandi, H. R., Hofsteenge, J., Bussian, B. M., and Thomas, G. (1991) *The Journal of biological chemistry* **266**(33), 22770-22775
160. Ferrari, S., Manfredini, R., Tagliafico, E., Rossi, E., Donelli, A., Torelli, G., and Torelli, U. (1990) *Cancer research* **50**(18), 5825-5828
161. Findlay, G. M., Yan, L., Procter, J., Mieulet, V., and Lamb, R. F. (2007) *The Biochemical journal* **403**(1), 13-20
162. Fingar, D. C., and Blenis, J. (2004) *Oncogene* **23**(18), 3151-3171
163. Fingar, D. C., Richardson, C. J., Tee, A. R., Cheatham, L., Tsou, C., and Blenis, J. (2004) *Molecular and cellular biology* **24**(1), 200-216
164. Fire, A., Xu, S., Montgomery, M. K., Kostas, S. A., Driver, S. E., and Mello, C. C. (1998) *Nature* **391**(6669), 806-811
165. Fisher, T. L., and Blenis, J. (1996) *Molecular and cellular biology* **16**(3), 1212-1219
166. Frias, M. A., Thoreen, C. C., Jaffe, J. D., Schroder, W., Sculley, T., Carr, S. A., and Sabatini, D. M. (2006) *Curr Biol* **16**(18), 1865-1870
167. Friedrich, B., Quensel, C., Sommer, T., Hartmann, E., and Kohler, M. (2006) *Molecular and cellular biology* **26**(23), 8697-8709
168. Frodin, M., and Gammeltoft, S. (1999) *Molecular and cellular endocrinology* **151**(1-2), 65-77
169. Frodin, M., Jensen, C. J., Merienne, K., and Gammeltoft, S. (2000) *The EMBO journal* **19**(12), 2924-2934
170. Fuchs, B. C., and Bode, B. P. (2005) *Seminars in cancer biology* **15**(4), 254-266
171. Fuja, T. J., Lin, F., Osann, K. E., and Bryant, P. J. (2004) *Cancer research* **64**(3), 942-951
172. Fujita, N., Sato, S., and Tsuruo, T. (2003) *The Journal of biological chemistry* **278**(49), 49254-49260
173. Fukuchi, M., Fukai, Y., Masuda, N., Miyazaki, T., Nakajima, M., Sohda, M., Manda, R., Tsukada, K., Kato, H., and Kuwano, H. (2002) *Cancer research* **62**(24), 7162-7165
174. Fulga, T. A., and Van Vactor, D. (2008) *Neuron* **57**(3), 339-344
175. Fumarola, C., La Monica, S., and Guidotti, G. G. (2005) *Journal of cellular physiology* **204**(1), 155-165

G

176. Gao, X., and Pan, D. (2001) *Genes & development* **15**(11), 1383-1392
177. Gao, X., and Patel, T. B. (2005) *Mol Pharmacol* **67**(1), 42-49
178. Gao, X., Zhang, Y., Arrazola, P., Hino, O., Kobayashi, T., Yeung, R. S., Ru, B., and Pan, D. (2002) *Nature cell biology* **4**(9), 699-704
179. Garcia-Gonzalo, F. R., Bartrons, R., Ventura, F., and Rosa, J. L. (2005) *FEBS letters* **579**(2), 343-348
180. Garcia-Gonzalo, F. R., Cruz, C., Munoz, P., Mazurek, S., Eigenbrodt, E., Ventura, F., Bartrons, R., and Rosa, J. L. (2003) *FEBS letters* **539**(1-3), 78-84
181. Garcia-Gonzalo, F. R., Munoz, P., Gonzalez, E., Casaroli-Marano, R. P., Vilaro, S., Bartrons, R., Ventura, F., and Rosa, J. L. (2004) *FEBS letters* **559**(1-3), 77-83
182. Garcia-Gonzalo, F. R., and Rosa, J. L. (2005) *Cell Mol Life Sci* **62**(16), 1826-1838
183. Geyer, M., and Wittinghofer, A. (1997) *Current opinion in structural biology* **7**(6), 786-792
184. Ghosh, S., and Karin, M. (2002) *Cell* **109** Suppl, S81-96
185. Gil, J., and Esteban, M. (2000) *Apoptosis* **5**(2), 107-114

186. Gingras, A. C., Raught, B., and Sonenberg, N. (1999) *Annual review of biochemistry* **68**, 913-963
187. Gingras, A. C., Raught, B., and Sonenberg, N. (2004) *Current topics in microbiology and immunology* **279**, 169-197
188. Gogendeau, D., Keller, A. M., Yanagi, A., Cohen, J., and Koll, F. (2005) *Eukaryot Cell* **4**(12), 2129-2139
189. Gomez-Roman, N., Felton-Edkins, Z. A., Kenneth, N. S., Goodfellow, S. J., Athineos, D., Zhang, J., Ramsbottom, B. A., Innes, F., Kantidakis, T., Kerr, E. R., Brodie, J., Grandori, C., and White, R. J. (2006) *Biochemical Society symposium* (73), 141-154
190. Gomez-Roman, N., Grandori, C., Eisenman, R. N., and White, R. J. (2003) *Nature* **421**(6920), 290-294
191. Gordon, J. A. (1991) *Methods in enzymology* **201**, 477-482
192. Graham, F. L., Smiley, J., Russell, W. C., and Nairn, R. (1977) *The Journal of general virology* **36**(1), 59-74
193. Graham, F. L., and van der Eb, A. J. (1973) *Virology* **52**(2), 456-467
194. Grandori, C., Gomez-Roman, N., Felton-Edkins, Z. A., Ngouenet, C., Galloway, D. A., Eisenman, R. N., and White, R. J. (2005) *Nature cell biology* **7**(3), 311-318
195. Gressner, A. M., and Wool, I. G. (1974) *The Journal of biological chemistry* **249**(21), 6917-6925
196. Grill, B., Bienvenut, W. V., Brown, H. M., Ackley, B. D., Quadroni, M., and Jin, Y. (2007) *Neuron* **55**(4), 587-601
197. Grodberg, J., and Dunn, J. J. (1988) *Journal of bacteriology* **170**(3), 1245-1253
198. Groll, M., Ditzel, L., Lowe, J., Stock, D., Bochtler, M., Bartunik, H. D., and Huber, R. (1997) *Nature* **386**(6624), 463-471
199. Grolleau, A., Bowman, J., Pradet-Balade, B., Puravs, E., Hanash, S., Garcia-Sanz, J. A., and Beretta, L. (2002) *The Journal of biological chemistry* **277**(25), 22175-22184
200. Gros-Louis, F., Gaspar, C., and Rouleau, G. A. (2006) *Biochimica et biophysica acta* **1762**(11-12), 956-972
201. Grossberger, R., Gieffers, C., Zachariae, W., Podtelejnikov, A. V., Schleiffer, A., Nasmyth, K., Mann, M., and Peters, J. M. (1999) *The Journal of biological chemistry* **274**(20), 14500-14507
202. Grummt, I. (2003) *Genes & development* **17**(14), 1691-1702
203. Grummt, I., Smith, V. A., and Grummt, F. (1976) *Cell* **7**(3), 439-445
204. Gstaiger, M., Luke, B., Hess, D., Oakeley, E. J., Wirbelauer, C., Blondel, M., Vigneron, M., Peter, M., and Krek, W. (2003) *Science (New York, N.Y)* **302**(5648), 1208-1212
205. Gu, J., Dubner, R., Fornace, A. J., Jr., and Iadarola, M. J. (1995) *Oncogene* **11**(10), 2175-2178
206. Guertin, D. A., Stevens, D. M., Thoreen, C. C., Burds, A. A., Kalaany, N. Y., Moffat, J., Brown, M., Fitzgerald, K. J., and Sabatini, D. M. (2006) *Developmental cell* **11**(6), 859-871
207. Gulati, P., Gaspers, L. D., Dann, S. G., Joaquin, M., Nobukuni, T., Natt, F., Kozma, S. C., Thomas, A. P., and Thomas, G. (2008) *Cell metabolism* **7**(5), 456-465
208. Guo, Q., Xie, J., Dang, C. V., Liu, E. T., and Bishop, J. M. (1998) *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**(16), 9172-9177
209. Guo, S., and Kempfues, K. J. (1995) *Cell* **81**(4), 611-620
210. Gutierrez, M. G., Munafo, D. B., Beron, W., and Colombo, M. I. (2004) *Journal of cell science* **117**(Pt 13), 2687-2697
211. Gwinn, D. M., Shackelford, D. B., Egan, D. F., Mihaylova, M. M., Mery, A., Vasquez, D. S., Turk, B. E., and Shaw, R. J. (2008) *Molecular cell* **30**(2), 214-226



212. Haas, A. L., Ahrens, P., Bright, P. M., and Ankel, H. (1987) *The Journal of biological chemistry* **262**(23), 11315-11323
213. Haas, A. L., and Rose, I. A. (1982) *The Journal of biological chemistry* **257**(17), 10329-10337
214. Hadano, S., Benn, S. C., Kakuta, S., Otomo, A., Sudo, K., Kunita, R., Suzuki-Utsunomiya, K., Mizumura, H., Shefner, J. M., Cox, G. A., Iwakura, Y., Brown, R. H., Jr., and Ikeda, J. E. (2006) *Human molecular genetics* **15**(2), 233-250
215. Hadano, S., Hand, C. K., Osuga, H., Yanagisawa, Y., Otomo, A., Devon, R. S., Miyamoto, N., Showguchi-Miyata, J., Okada, Y., Singaraja, R., Figlewicz, D. A., Kwiatkowski, T., Hosler, B. A., Sagie, T., Skaug, J., Nasir, J., Brown, R. H., Jr., Scherer, S. W., Rouleau, G. A., Hayden, M. R., and Ikeda, J. E. (2001) *Nat Genet* **29**(2), 166-173

216. Hadjebi, O., Casas-Terradellas, E., Garcia-Gonzalo, F. R., and Rosa, J. L. (2008) *Biochimica et biophysica acta* **1783**(8), 1467-1479
217. Haghghat, A., Mader, S., Pause, A., and Sonenberg, N. (1995) *The EMBO journal* **14**(22), 5701-5709
218. Haglund, K., and Dikic, I. (2005) *The EMBO journal* **24**(19), 3353-3359
219. Haglund, K., Sigismund, S., Polo, S., Szymkiewicz, I., Di Fiore, P. P., and Dikic, I. (2003) *Nature cell biology* **5**(5), 461-466
220. Han, J., Lee, J. D., Bibbs, L., and Ulevitch, R. J. (1994) *Science (New York, N.Y)* **265**(5173), 808-811
221. Hancock, E., Tomkins, S., Sampson, J., and Osborne, J. (2002) *Respiratory medicine* **96**(1), 7-13
222. Hannan, K. M., Brandenburger, Y., Jenkins, A., Sharkey, K., Cavanaugh, A., Rothblum, L., Moss, T., Poortinga, G., McArthur, G. A., Pearson, R. B., and Hannan, R. D. (2003) *Molecular and cellular biology* **23**(23), 8862-8877
223. Hannan, K. M., Thomas, G., and Pearson, R. B. (2003) *The Biochemical journal* **370**(Pt 2), 469-477
224. Hara, K., Maruki, Y., Long, X., Yoshino, K., Oshiro, N., Hidayat, S., Tokunaga, C., Avruch, J., and Yonezawa, K. (2002) *Cell* **110**(2), 177-189
225. Hara, K., Yonezawa, K., Kozlowski, M. T., Sugimoto, T., Andrabi, K., Weng, Q. P., Kasuga, M., Nishimoto, I., and Avruch, J. (1997) *The Journal of biological chemistry* **272**(42), 26457-26463
226. Hara, K., Yonezawa, K., Weng, Q. P., Kozlowski, M. T., Belham, C., and Avruch, J. (1998) *The Journal of biological chemistry* **273**(23), 14484-14494
227. Harada, H., Andersen, J. S., Mann, M., Terada, N., and Korsmeyer, S. J. (2001) *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**(17), 9666-9670
228. Haraguchi, C. M., Mabuchi, T., Hirata, S., Shoda, T., Hoshi, K., and Yokota, S. (2004) *J Histochem Cytochem* **52**(11), 1393-1403
229. Harper, J. W., and Elledge, S. J. (2007) *Molecular cell* **28**(5), 739-745
230. Harrington, L. S., Findlay, G. M., Gray, A., Tolkacheva, T., Wigfield, S., Rebholz, H., Barnett, J., Leslie, N. R., Cheng, S., Shepherd, P. R., Gout, I., Downes, C. P., and Lamb, R. F. (2004) *The Journal of cell biology* **166**(2), 213-223
231. Hartsough, M. T., and Steeg, P. S. (2000) *Journal of bioenergetics and biomembranes* **32**(3), 301-308
232. Haucke, V., and De Camilli, P. (1999) *Science (New York, N.Y)* **285**(5431), 1268-1271
233. Hauge, C., and Frodin, M. (2006) *Journal of cell science* **119**(Pt 15), 3021-3023
234. Hay, N., and Sonenberg, N. (2004) *Genes & development* **18**(16), 1926-1945
235. Hay, R. T., Vuillard, L., Desterro, J. M., and Rodriguez, M. S. (1999) *Philosophical transactions of the Royal Society of London* **354**(1389), 1601-1609
236. Heitman, J., Movva, N. R., and Hall, M. N. (1991) *Science (New York, N.Y)* **253**(5022), 905-909
237. Helliwell, S. B., Losko, S., and Kaiser, C. A. (2001) *The Journal of cell biology* **153**(4), 649-662
238. Henderson, M. J., Russell, A. J., Hird, S., Munoz, M., Clancy, J. L., Lehrbach, G. M., Calanni, S. T., Jans, D. A., Sutherland, R. L., and Watts, C. K. (2002) *The Journal of biological chemistry* **277**(29), 26468-26478
239. Hennig, K. M., Colombani, J., and Neufeld, T. P. (2006) *The Journal of cell biology* **173**(6), 963-974
240. Heras, B., and Drobak, B. K. (2002) *J Exp Bot* **53**(368), 565-567
241. Herbert, T. P., Tee, A. R., and Proud, C. G. (2002) *The Journal of biological chemistry* **277**(13), 11591-11596
242. Hermann, G. J., Schroeder, L. K., Hieb, C. A., Kershner, A. M., Rabbitts, B. M., Fonarev, P., Grant, B. D., and Priess, J. R. (2005) *Molecular biology of the cell* **16**(7), 3273-3288
243. Heymann, J. B., Iwasaki, K., Yim, Y. I., Cheng, N., Belnap, D. M., Greene, L. E., Eisenberg, E., and Steven, A. C. (2005) *The Journal of biological chemistry* **280**(8), 7156-7161
244. Higuchi, R., Dollinger, G., Walsh, P. S., and Griffith, R. (1992) *Bio/technology (Nature Publishing Company)* **10**(4), 413-417
245. Hirose, E., Mukai, M., Shimada, A., Nishitani, H., Shibata, Y., and Nishimoto, T. (2006) *Genes Cells* **11**(1), 29-46
246. Hochrainer, K., Kroismayr, R., Baranyi, U., Binder, B. R., and Lipp, J. (2008) *Cell Mol Life Sci* **65**(13), 2105-2117
247. Hochrainer, K., Mayer, H., Baranyi, U., Binder, B., Lipp, J., and Kroismayr, R. (2005) *Genomics* **85**(2), 153-164
248. Hochstrasser, M. (1996) *Annual review of genetics* **30**, 405-439
249. Hochstrasser, M. (2000) *Nature cell biology* **2**(8), E153-157
250. Hodges, A. K., Li, S., Maynard, J., Parry, L., Braverman, R., Cheadle, J. P., DeClue, J. E., and Sampson, J. R. (2001) *Human molecular genetics* **10**(25), 2899-2905
251. Holland, E. C., Sonenberg, N., Pandolfi, P. P., and Thomas, G. (2004) *Oncogene* **23**(18), 3138-3144

252. Holland, P. M., Milne, A., Garka, K., Johnson, R. S., Willis, C., Sims, J. E., Rauch, C. T., Bird, T. A., and Virca, G. D. (2002) *The Journal of biological chemistry* **277**(18), 16229-16240
253. Hollander, W. F., Bryan, J. H., and Gowen, J. W. (1960) *Genetics* **45**(4), 413-418
254. Holz, M. K., Ballif, B. A., Gygi, S. P., and Blenis, J. (2005) *Cell* **123**(4), 569-580
255. Honda, A., Nogami, M., Yokozeki, T., Yamazaki, M., Nakamura, H., Watanabe, H., Kawamoto, K., Nakayama, K., Morris, A. J., Frohman, M. A., and Kanaho, Y. (1999) *Cell* **99**(5), 521-532
256. Honda, Y., Tojo, M., Matsuzaki, K., Anan, T., Matsumoto, M., Ando, M., Saya, H., and Nakao, M. (2002) *The Journal of biological chemistry* **277**(5), 3599-3605
257. Hong, D. H., Pawlyk, B. S., Shang, J., Sandberg, M. A., Berson, E. L., and Li, T. (2000) *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**(7), 3649-3654
258. Hong, D. H., Yue, G., Adamian, M., and Li, T. (2001) *The Journal of biological chemistry* **276**(15), 12091-12099
259. Hood, F. E., and Clarke, P. R. (2007) *Journal of cell science* **120**(Pt 19), 3436-3445
260. Hoogenraad, C. C., Wulf, P., Schiefermeier, N., Stepanova, T., Galjart, N., Small, J. V., Grosveld, F., de Zeeuw, C. I., and Akhmanova, A. (2003) *The EMBO journal* **22**(22), 6004-6015
261. Hoppe, T., Matuschewski, K., Rape, M., Schlenker, S., Ulrich, H. D., and Jentsch, S. (2000) *Cell* **102**(5), 577-586
262. Hresko, R. C., and Mueckler, M. (2005) *The Journal of biological chemistry* **280**(49), 40406-40416
263. Huang, J., and Manning, B. D. (2008) *The Biochemical journal* **412**(2), 179-190
264. Huang, T. T., and D'Andrea, A. D. (2006) *Nature reviews* **7**(5), 323-334
265. Hudson, C. C., Liu, M., Chiang, G. G., Otterness, D. M., Loomis, D. C., Kaper, F., Giaccia, A. J., and Abraham, R. T. (2002) *Molecular and cellular biology* **22**(20), 7004-7014
266. Huen, M. S., Grant, R., Manke, I., Minn, K., Yu, X., Yaffe, M. B., and Chen, J. (2007) *Cell* **131**(5), 901-914
267. Huffman, T. A., Mothe-Satney, I., and Lawrence, J. C., Jr. (2002) *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**(2), 1047-1052
268. Huibregtse, J. M., Scheffner, M., Beaudenon, S., and Howley, P. M. (1995) *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **92**(7), 2563-2567
269. Hunt, D. M., and Johnson, D. R. (1971) *Journal of embryology and experimental morphology* **26**(1), 111-121
270. Hutchins, J. R., Moore, W. J., Hood, F. E., Wilson, J. S., Andrews, P. D., Swedlow, J. R., and Clarke, P. R. (2004) *Curr Biol* **14**(12), 1099-1104
271. Huttner, W. B., Schiebler, W., Greengard, P., and De Camilli, P. (1983) *The Journal of cell biology* **96**(5), 1374-1388

I

272. Ichimura, Y., Kirisako, T., Takao, T., Satomi, Y., Shimonishi, Y., Ishihara, N., Mizushima, N., Tanida, I., Kominami, E., Ohsumi, M., Noda, T., and Ohsumi, Y. (2000) *Nature* **408**(6811), 488-492
273. Iiboshi, Y., Papst, P. J., Kawasome, H., Hosoi, H., Abraham, R. T., Houghton, P. J., and Terada, N. (1999) *The Journal of biological chemistry* **274**(2), 1092-1099
274. Inoki, K., and Guan, K. L. (2006) *Trends in cell biology* **16**(4), 206-212
275. Inoki, K., Li, Y., Xu, T., and Guan, K. L. (2003) *Genes & development* **17**(15), 1829-1834
276. Inoki, K., Li, Y., Zhu, T., Wu, J., and Guan, K. L. (2002) *Nature cell biology* **4**(9), 648-657
277. Inoki, K., Zhu, T., and Guan, K. L. (2003) *Cell* **115**(5), 577-590
278. Isotani, S., Hara, K., Tokunaga, C., Inoue, H., Avruch, J., and Yonezawa, K. (1999) *The Journal of biological chemistry* **274**(48), 34493-34498
279. Itoh, M., Kim, C. H., Palardy, G., Oda, T., Jiang, Y. J., Maust, D., Yeo, S. Y., Lorick, K., Wright, G. J., Ariza-McNaughton, L., Weissman, A. M., Lewis, J., Chandrasekharappa, S. C., and Chitnis, A. B. (2003) *Developmental cell* **4**(1), 67-82

J

280. Jacinto, E., Facchinetti, V., Liu, D., Soto, N., Wei, S., Jung, S. Y., Huang, Q., Qin, J., and Su, B. (2006) *Cell* **127**(1), 125-137
281. Jacinto, E., Loewith, R., Schmidt, A., Lin, S., Ruegg, M. A., Hall, A., and Hall, M. N. (2004) *Nature cell biology* **6**(11), 1122-1128

282. Jager, S., Bucci, C., Tanida, I., Ueno, T., Kominami, E., Saftig, P., and Eskelinen, E. L. (2004) *Journal of cell science* **117**(Pt 20), 4837-4848
283. James, M. J., and Zomerdijk, J. C. (2004) *The Journal of biological chemistry* **279**(10), 8911-8918
284. Jastrzebski, K., Hannan, K. M., Tchoubrieva, E. B., Hannan, R. D., and Pearson, R. B. (2007) *Growth factors (Chur, Switzerland)* **25**(4), 209-226
285. Jensen, C. J., Buch, M. B., Krag, T. O., Hemmings, B. A., Gammeltoft, S., and Frodin, M. (1999) *The Journal of biological chemistry* **274**(38), 27168-27176
286. Jentsch, S., Seufert, W., Sommer, T., and Reins, H. A. (1990) *Trends in biochemical sciences* **15**(5), 195-198
287. Ji, Y., Walkowicz, M. J., Buiting, K., Johnson, D. K., Tarvin, R. E., Rinchik, E. M., Horsthemke, B., Stubbs, L., and Nicholls, R. D. (1999) *Human molecular genetics* **8**(3), 533-542
288. Jiao, X., Trifillis, P., and Kiledjian, M. (2002) *Biology of reproduction* **66**(2), 475-485
289. Johnson, D. R., and Hunt, D. M. (1975) *Journal of reproduction and fertility* **42**(1), 51-58
290. Jorgensen, P., Rupes, I., Sharom, J. R., Schneper, L., Broach, J. R., and Tyers, M. (2004) *Genes & development* **18**(20), 2491-2505
291. Jorgensen, R. (1990) *Trends in biotechnology* **8**(12), 340-344

K

292. Kabeya, Y., Mizushima, N., Ueno, T., Yamamoto, A., Kirisako, T., Noda, T., Kominami, E., Ohsumi, Y., and Yoshimori, T. (2000) *The EMBO journal* **19**(21), 5720-5728
293. Kaiser, P., Flick, K., Wittenberg, C., and Reed, S. I. (2000) *Cell* **102**(3), 303-314
294. Kaiserli, E., and Jenkins, G. I. (2007) *The Plant cell* **19**(8), 2662-2673
295. Kamada, Y., Funakoshi, T., Shintani, T., Nagano, K., Ohsumi, M., and Ohsumi, Y. (2000) *The Journal of cell biology* **150**(6), 1507-1513
296. Kandt, R. S., Haines, J. L., Smith, M., Northrup, H., Gardner, R. J., Short, M. P., Dumars, K., Roach, E. S., Steingold, S., Wall, S., and et al. (1992) *Nat Genet* **2**(1), 37-41
297. Kanekura, K., Hashimoto, Y., Kita, Y., Sasabe, J., Aiso, S., Nishimoto, I., and Matsuoka, M. (2005) *The Journal of biological chemistry* **280**(6), 4532-4543
298. Kanekura, K., Hashimoto, Y., Niikura, T., Aiso, S., Matsuoka, M., and Nishimoto, I. (2004) *The Journal of biological chemistry* **279**(18), 19247-19256
299. Karin, M., and Ben-Neriah, Y. (2000) *Annual review of immunology* **18**, 621-663
300. Kaustov, L., Lukin, J., Lemak, A., Duan, S., Ho, M., Doherty, R., Penn, L. Z., and Arrowsmith, C. H. (2007) *The Journal of biological chemistry* **282**(15), 11300-11307
301. Kavsak, P., Rasmussen, R. K., Causing, C. G., Bonni, S., Zhu, H., Thomsen, G. H., and Wrana, J. L. (2000) *Molecular cell* **6**(6), 1365-1375
302. Kayser, M., Liu, F., Janssens, A. C., Rivadeneira, F., Lao, O., van Duijn, K., Vermeulen, M., Arp, P., Jhamai, M. M., van Ijcken, W. F., den Dunnen, J. T., Heath, S., Zelenika, D., Despriet, D. D., Klaver, C. C., Vingerling, J. R., de Jong, P. T., Hofman, A., Aulchenko, Y. S., Uitterlinden, A. G., Oostra, B. A., and van Duijn, C. M. (2008) *American journal of human genetics* **82**(2), 411-423
303. Keen, J. H., Willingham, M. C., and Pastan, I. H. (1979) *Cell* **16**(2), 303-312
304. Kennelly, P. J., and Krebs, E. G. (1991) *The Journal of biological chemistry* **266**(24), 15555-15558
305. Khanna, H., Hurd, T. W., Lillo, C., Shu, X., Parapuram, S. K., He, S., Akimoto, M., Wright, A. F., Margolis, B., Williams, D. S., and Swaroop, A. (2005) *The Journal of biological chemistry* **280**(39), 33580-33587
306. Kihara, A., Kabeya, Y., Ohsumi, Y., and Yoshimori, T. (2001) *EMBO reports* **2**(4), 330-335
307. Kihara, A., Noda, T., Ishihara, N., and Ohsumi, Y. (2001) *The Journal of cell biology* **152**(3), 519-530
308. Kim, D. H., Sarbassov, D. D., Ali, S. M., King, J. E., Latek, R. R., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., and Sabatini, D. M. (2002) *Cell* **110**(2), 163-175
309. Kim, D. H., Sarbassov, D. D., Ali, S. M., Latek, R. R., Guntur, K. V., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., and Sabatini, D. M. (2003) *Molecular cell* **11**(4), 895-904
310. Kim, E., Goraksha-Hicks, P., Li, L., Neufeld, T. P., and Guan, K. L. (2008) *Nature cell biology* **10**(8), 935-945
311. Kim, J. E., and Chen, J. (2004) *Diabetes* **53**(11), 2748-2756
312. Kim, M. J., Latham, A. G., and Krug, R. M. (2002) *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**(15), 10096-10101

313. Kim, S., Li, Q., Dang, C. V., and Lee, L. A. (2000) *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**(21), 11198-11202
314. Kimura, N., Shimada, N., Fukuda, M., Ishijima, Y., Miyazaki, H., Ishii, A., Takagi, Y., and Ishikawa, N. (2000) *Journal of bioenergetics and biomembranes* **32**(3), 309-315
315. Kirschner, R., Rosenberg, T., Schultz-Heienbrok, R., Lenzner, S., Feil, S., Roepman, R., Cremers, F. P., Ropers, H. H., and Berger, W. (1999) *Human molecular genetics* **8**(8), 1571-1578
316. Kleijnen, M. F., Shih, A. H., Zhou, P., Kumar, S., Soccio, R. E., Kedersha, N. L., Gill, G., and Howley, P. M. (2000) *Molecular cell* **6**(2), 409-419
317. Kliebenstein, D. J., Lim, J. E., Landry, L. G., and Last, R. L. (2002) *Plant physiology* **130**(1), 234-243
318. Klionsky, D. J. (2005) *Journal of cell science* **118**(Pt 1), 7-18
319. Klionsky, D. J. (2007) *Nature reviews* **8**(11), 931-937
320. Klionsky, D. J., and Ohsumi, Y. (1999) *Annual review of cell and developmental biology* **15**, 1-32
321. Koegl, M., Hoppe, T., Schlenker, S., Ulrich, H. D., Mayer, T. U., and Jentsch, S. (1999) *Cell* **96**(5), 635-644
322. Kolas, N. K., Chapman, J. R., Nakada, S., Ylanko, J., Chahwan, R., Sweeney, F. D., Panier, S., Mendez, M., Wildenhain, J., Thomson, T. M., Pelletier, L., Jackson, S. P., and Durocher, D. (2007) *Science (New York, N.Y.)* **318**(5856), 1637-1640
323. Kolch, W. (2000) *The Biochemical journal* **351 Pt 2**, 289-305
324. Korant, B. D., Blomstrom, D. C., Jonak, G. J., and Knight, E., Jr. (1984) *The Journal of biological chemistry* **259**(23), 14835-14839
325. Kornberg, R. D., and Lorch, Y. (1999) *Cell* **98**(3), 285-294
326. Kramer, G., Rauch, T., Rist, W., Vorderwulbecke, S., Patzelt, H., Schulze-Specking, A., Ban, N., Deuerling, E., and Bukau, B. (2002) *Nature* **419**(6903), 171-174
327. Krause, U., Bertrand, L., Maisin, L., Rosa, M., and Hue, L. (2002) *European journal of biochemistry / FEBS* **269**(15), 3742-3750
328. Krauss, M., Kinuta, M., Wenk, M. R., De Camilli, P., Takei, K., and Haucke, V. (2003) *The Journal of cell biology* **162**(1), 113-124
329. Krishna, S. S., Majumdar, I., and Grishin, N. V. (2003) *Nucleic Acids Res* **31**(2), 532-550
330. Kristof, A. S., Marks-Konczalik, J., Billings, E., and Moss, J. (2003) *The Journal of biological chemistry* **278**(36), 33637-33644
331. Kroismayr, R., Baranyi, U., Stehlik, C., Dorfleutner, A., Binder, B. R., and Lipp, J. (2004) *Journal of cell science* **117**(Pt 20), 4749-4756
332. Kuhne, C., and Banks, L. (1998) *The Journal of biological chemistry* **273**(51), 34302-34309
333. Kumar, S., Harvey, K. F., Kinoshita, M., Copeland, N. G., Noda, M., and Jenkins, N. A. (1997) *Genomics* **40**(3), 435-443
334. Kumar, S., Talis, A. L., and Howley, P. M. (1999) *The Journal of biological chemistry* **274**(26), 18785-18792
335. Kunita, R., Otomo, A., Mizumura, H., Suzuki-Utsunomiya, K., Hadano, S., and Ikeda, J. E. (2007) *The Journal of biological chemistry* **282**(22), 16599-16611
336. Kwiatkowski, D. J. (2003) *Annals of human genetics* **67**(Pt 1), 87-96
337. Kyriakis, J. M., App, H., Zhang, X. F., Banerjee, P., Brautigan, D. L., Rapp, U. R., and Avruch, J. (1992) *Nature* **358**(6385), 417-421
338. Kyriakis, J. M., and Avruch, J. (2001) *Physiological reviews* **81**(2), 807-869

L

339. Lai, C., Xie, C., McCormack, S. G., Chiang, H. C., Michalak, M. K., Lin, X., Chandran, J., Shim, H., Shimoji, M., Cookson, M. R., Haganir, R. L., Rothstein, J. D., Price, D. L., Wong, P. C., Martin, L. J., Zhu, J. J., and Cai, H. (2006) *J Neurosci* **26**(45), 11798-11806
340. Land, S. C., and Tee, A. R. (2007) *The Journal of biological chemistry* **282**(28), 20534-20543
341. Latil, A., Chene, L., Mangin, P., Fournier, G., Berthon, P., and Cussenot, O. (2003) *Prostate* **57**(1), 39-50
342. Le Guyader, S., Maier, J., and Jesuthasan, S. (2005) *Dev Biol* **277**(2), 378-386
343. Lee, J. C., Laydon, J. T., McDonnell, P. C., Gallagher, T. F., Kumar, S., Green, D., McNulty, D., Blumenthal, M. J., Heys, J. R., Landvatter, S. W., and et al. (1994) *Nature* **372**(6508), 739-746
344. Lee-Fruman, K. K., Kuo, C. J., Lippincott, J., Terada, N., and Blenis, J. (1999) *Oncogene* **18**(36), 5108-5114

345. Lehman, A. L., Nakatsu, Y., Ching, A., Bronson, R. T., Oakey, R. J., Keiper-Hrynko, N., Finger, J. N., Durham-Pierre, D., Horton, D. B., Newton, J. M., Lyon, M. F., and Brilliant, M. H. (1998) *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**(16), 9436-9441
346. Lemon, B., and Tjian, R. (2000) *Genes & development* **14**(20), 2551-2569
347. Levine, B., and Kroemer, G. (2008) *Cell* **132**(1), 27-42
348. Lewcock, J. W., Genoud, N., Lettieri, K., and Pfaff, S. L. (2007) *Neuron* **56**(4), 604-620
349. Lewis, H., Birnstiel, M., Brown, D., Gall, J., Penman, S., Perry, R., and Vincent, W. (1966) *National Cancer Institute monograph* **23**, 547-561
350. Li, H. Y., and Zheng, Y. (2004) *Genes & development* **18**(5), 512-527
351. Li, Q., and Verma, I. M. (2002) *Nat Rev Immunol* **2**(10), 725-734
352. Li, Y., Corradetti, M. N., Inoki, K., and Guan, K. L. (2004) *Trends in biochemical sciences* **29**(1), 32-38
353. Li, Y., Inoki, K., Vacratsis, P., and Guan, K. L. (2003) *The Journal of biological chemistry* **278**(16), 13663-13671
354. Li, Y., Wang, Y., Kim, E., Beemiller, P., Wang, C. Y., Swanson, J., You, M., and Guan, K. L. (2007) *The Journal of biological chemistry* **282**(49), 35803-35813
355. Liao, D., Gregersen, H., Hausken, T., Gilja, O. H., Mundt, M., and Kassab, G. (2004) *Neurogastroenterol Motil* **16**(3), 315-324
356. Liao, E. H., Hung, W., Abrams, B., and Zhen, M. (2004) *Nature* **430**(6997), 345-350
357. Liao, M. C., and Perry, R. P. (1969) *The Journal of cell biology* **42**(1), 272-283
358. Lim, D., Park, H. U., De Castro, L., Kang, S. G., Lee, H. S., Jensen, S., Lee, K. J., and Strynadka, N. C. (2001) *Nature structural biology* **8**(10), 848-852
359. Lin, T. A., Kong, X., Haystead, T. A., Pause, A., Belsham, G., Sonenberg, N., and Lawrence, J. C., Jr. (1994) *Science (New York, N.Y)* **266**(5185), 653-656
360. Linari, M., Ueffing, M., Manson, F., Wright, A., Meitinger, T., and Becker, J. (1999) *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**(4), 1315-1320
361. Lindmo, K., and Stenmark, H. (2006) *Journal of cell science* **119**(Pt 4), 605-614
362. Lippincott-Schwartz, J., Yuan, L. C., Bonifacino, J. S., and Klausner, R. D. (1989) *Cell* **56**(5), 801-813
363. Liu, G., Zhang, Y., Bode, A. M., Ma, W. Y., and Dong, Z. (2002) *The Journal of biological chemistry* **277**(11), 8810-8816
364. Liu, J., Carmell, M. A., Rivas, F. V., Marsden, C. G., Thomson, J. M., Song, J. J., Hammond, S. M., Joshua-Tor, L., and Hannon, G. J. (2004) *Science (New York, N.Y)* **305**(5689), 1437-1441
365. Liu, S., Lu, W., Obara, T., Kuida, S., Lehoczy, J., Dewar, K., Drummond, I. A., and Beier, D. R. (2002) *Development* **129**(24), 5839-5846
366. Liu, W., Quinto, I., Chen, X., Palmieri, C., Rabin, R. L., Schwartz, O. M., Nelson, D. L., and Scala, G. (2001) *Nat Immunol* **2**(10), 939-946
367. Liu, X., and Zheng, X. F. (2007) *Molecular biology of the cell* **18**(3), 1073-1082
368. Liu, Z., Oughtred, R., and Wing, S. S. (2005) *Molecular and cellular biology* **25**(7), 2819-2831
369. Loewith, R., Jacinto, E., Wullschlegel, S., Lorberg, A., Crespo, J. L., Bonenfant, D., Oppliger, W., Jenoe, P., and Hall, M. N. (2002) *Molecular cell* **10**(3), 457-468
370. Long, X., Ortiz-Vega, S., Lin, Y., and Avruch, J. (2005) *The Journal of biological chemistry* **280**(25), 23433-23436
371. Long, X., Spycher, C., Han, Z. S., Rose, A. M., Muller, F., and Avruch, J. (2002) *Curr Biol* **12**(17), 1448-1461
372. Loyter, A., Scangos, G. A., and Ruddle, F. H. (1982) *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **79**(2), 422-426
373. Lu, Z., Hu, X., Li, Y., Zheng, L., Zhou, Y., Jiang, H., Ning, T., Basang, Z., Zhang, C., and Ke, Y. (2004) *The Journal of biological chemistry* **279**(34), 35664-35670
374. Lyon, M. F., King, T. R., Gondo, Y., Gardner, J. M., Nakatsu, Y., Eicher, E. M., and Brilliant, M. H. (1992) *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **89**(15), 6968-6972

M

414. Mifsud, W., and Bateman, A. (2002) *Genome biology* **3**(12), RESEARCH0068
415. Miller, G., Panov, K. I., Friedrich, J. K., Trinkle-Mulcahy, L., Lamond, A. I., and Zomerdijk, J. C. (2001) *The EMBO journal* **20**(6), 1373-1382

416. Mitsui, K., Nakanishi, M., Ohtsuka, S., Norwood, T. H., Okabayashi, K., Miyamoto, C., Tanaka, K., Yoshimura, A., and Ohtsubo, M. (1999) *Biochemical and biophysical research communications* **266**(1), 115-122
417. Miura, K. (1981) *Advances in biophysics* **14**, 205-238
418. Mocellin, S., Rossi, C. R., Pilati, P., Nitti, D., and Marincola, F. M. (2003) *Trends in molecular medicine* **9**(5), 189-195
419. Moeschel, K., Beck, A., Weigert, C., Lammers, R., Kalbacher, H., Voelter, W., Schleicher, E. D., Haring, H. U., and Lehmann, R. (2004) *The Journal of biological chemistry* **279**(24), 25157-25163
420. Moldovan, G. L., Pfander, B., and Jentsch, S. (2007) *Cell* **129**(4), 665-679
421. Mollinari, C., Reynaud, C., Martineau-Thuillier, S., Monier, S., Kieffer, S., Garin, J., Andreassen, P. R., Boulet, A., Goud, B., Kleman, J. P., and Margolis, R. L. (2003) *Developmental cell* **5**(2), 295-307
422. Moore, W., Zhang, C., and Clarke, P. R. (2002) *Curr Biol* **12**(16), 1442-1447
423. Moorefield, B., Greene, E. A., and Reeder, R. H. (2000) *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**(9), 4724-4729
424. Mora, A., Komander, D., van Aalten, D. M., and Alessi, D. R. (2004) *Seminars in cell & developmental biology* **15**(2), 161-170
425. Morice, M. C., Serruys, P. W., Sousa, J. E., Fajadet, J., Ban Hayashi, E., Perin, M., Colombo, A., Schuler, G., Barragan, P., Guagliumi, G., Molnar, F., and Falotico, R. (2002) *The New England journal of medicine* **346**(23), 1773-1780
426. Mortimore, G. E., and Schworer, C. M. (1977) *Nature* **270**(5633), 174-176
427. Moses, J. W., Leon, M. B., Popma, J. J., Fitzgerald, P. J., Holmes, D. R., O'Shaughnessy, C., Caputo, R. P., Kereiakes, D. J., Williams, D. O., Teirstein, P. S., Jaeger, J. L., and Kuntz, R. E. (2003) *The New England journal of medicine* **349**(14), 1315-1323
428. Mosesson, Y., Shtiegman, K., Katz, M., Zwang, Y., Vereb, G., Szollosi, J., and Yarden, Y. (2003) *The Journal of biological chemistry* **278**(24), 21323-21326
429. Muise-Helmericks, R. C., Grimes, H. L., Bellacosa, A., Malstrom, S. E., Tschlis, P. N., and Rosen, N. (1998) *The Journal of biological chemistry* **273**(45), 29864-29872
430. Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., and Erlich, H. (1986) *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* **51 Pt 1**, 263-273
431. Murillas, R., Simms, K. S., Hatakeyama, S., Weissman, A. M., and Kuehn, M. R. (2002) *The Journal of biological chemistry* **277**(4), 2897-2907
432. Murphy, L. O., and Blenis, J. (2006) *Trends in biochemical sciences* **31**(5), 268-275
433. Murthy, V., Han, S., Beauchamp, R. L., Smith, N., Haddad, L. A., Ito, N., and Ramesh, V. (2004) *The Journal of biological chemistry* **279**(2), 1351-1358

N

434. Nader, G. A., McLoughlin, T. J., and Esser, K. A. (2005) *Am J Physiol Cell Physiol* **289**(6), C1457-1465
435. Nagase, T., Kikuno, R., Nakayama, M., Hirose, M., and Ohara, O. (2000) *DNA Res* **7**(4), 273-281
436. Nagata, Y., and Todokoro, K. (1999) *Blood* **94**(3), 853-863
437. Nakagawa, S., and Huijbregtse, J. M. (2000) *Molecular and cellular biology* **20**(21), 8244-8253
438. Nakashima, S. (2002) *Journal of biochemistry* **132**(5), 669-675
439. Nakata, K., Abrams, B., Grill, B., Goncharov, A., Huang, X., Chisholm, A. D., and Jin, Y. (2005) *Cell* **120**(3), 407-420
440. Nara, A., Mizushima, N., Yamamoto, A., Kabeya, Y., Ohsumi, Y., and Yoshimori, T. (2002) *Cell structure and function* **27**(1), 29-37
441. Natoli, T. A., Gareski, T. C., Dackowski, W. R., Smith, L., Bukanov, N. O., Russo, R. J., Husson, H., Matthews, D., Piepenhagen, P., and Ibraghimov-Beskrovnaya, O. (2008) *American journal of physiology* **294**(1), F73-83
442. N'Diaye, E. N., Hanyaloglu, A. C., Kajihara, K. K., Puthenveedu, M. A., Wu, P., von Zastrow, M., and Brown, E. J. (2008) *Molecular biology of the cell* **19**(3), 1252-1260
443. Neer, E. J., Schmidt, C. J., Nambudripad, R., and Smith, T. F. (1994) *Nature* **371**(6495), 297-300
444. Neidhardt, J., Glaus, E., Barthelmes, D., Zeitz, C., Fleischhauer, J., and Berger, W. (2007) *Human mutation* **28**(8), 797-807
445. Nellist, M., Sancak, O., Goedbloed, M. A., Rohe, C., van Netten, D., Mayer, K., Tucker-Williams, A., van den Ouweland, A. M., and Halley, D. J. (2005) *Eur J Hum Genet* **13**(1), 59-68

446. Nellist, M., van Slegtenhorst, M. A., Goedbloed, M., van den Ouweland, A. M., Halley, D. J., and van der Sluijs, P. (1999) *The Journal of biological chemistry* **274**(50), 35647-35652
447. Nellist, M., Verhaaf, B., Goedbloed, M. A., Reuser, A. J., van den Ouweland, A. M., and Halley, D. J. (2001) *Human molecular genetics* **10**(25), 2889-2898
448. Nemergut, M. E., Mizzen, C. A., Stukenberg, T., Allis, C. D., and Macara, I. G. (2001) *Science (New York, N.Y)* **292**(5521), 1540-1543
449. Newton, A. C. (2003) *The Biochemical journal* **370**(Pt 2), 361-371
450. Nicholl, M. J., Robinson, L. H., and Preston, C. M. (2000) *The Journal of general virology* **81**(Pt 9), 2215-2218
451. Nicholls, R. D., and Knepper, J. L. (2001) *Annual review of genomics and human genetics* **2**, 153-175
452. Nicklin, P., Bergman, P., Zhang, B., Triantafellow, E., Wang, H., Nyfeler, B., Yang, H., Hild, M., Kung, C., Wilson, C., Myer, V. E., MacKeigan, J. P., Porter, J. A., Wang, Y. K., Cantley, L. C., Finan, P. M., and Murphy, L. O. (2009) *Cell* **136**(3), 521-534
453. Nigg, E. A. (2001) *Nature reviews* **2**(1), 21-32
454. Niida, Y., Lawrence-Smith, N., Banwell, A., Hammer, E., Lewis, J., Beauchamp, R. L., Sims, K., Ramesh, V., and Ozelius, L. (1999) *Human mutation* **14**(5), 412-422
455. Nilsson, J., Stahl, S., Lundeberg, J., Uhlen, M., and Nygren, P. A. (1997) *Protein expression and purification* **11**(1), 1-16
456. Nishimoto, T., Eilen, E., and Basilico, C. (1978) *Cell* **15**(2), 475-483
457. Nobukuni, T., Joaquin, M., Roccio, M., Dann, S. G., Kim, S. Y., Gulati, P., Byfield, M. P., Backer, J. M., Natt, F., Bos, J. L., Zwartkuis, F. J., and Thomas, G. (2005) *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**(40), 14238-14243
458. Nojima, H., Tokunaga, C., Eguchi, S., Oshiro, N., Hidayat, S., Yoshino, K., Hara, K., Tanaka, N., Avruch, J., and Yonezawa, K. (2003) *The Journal of biological chemistry* **278**(18), 15461-15464
459. Nomura, M., Kaji, A., Ma, W. Y., Zhong, S., Liu, G., Bowden, G. T., Miyamoto, K. I., and Dong, Z. (2001) *The Journal of biological chemistry* **276**(27), 25558-25567
460. Nomura, N., Miyajima, N., Sazuka, T., Tanaka, A., Kawarabayasi, Y., Sato, S., Nagase, T., Seki, N., Ishikawa, K., and Tabata, S. (1994) *DNA Res* **1**(1), 27-35



461. Ochman, H., Lawrence, J. G., and Groisman, E. A. (2000) *Nature* **405**(6784), 299-304
462. O'Connell, M. J., Krien, M. J., and Hunter, T. (2003) *Trends in cell biology* **13**(5), 221-228
463. Oda, H., Kumar, S., and Howley, P. M. (1999) *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**(17), 9557-9562
464. Ohsumi, Y. (2001) *Nature reviews* **2**(3), 211-216
465. Ohtsubo, M., Kai, R., Furuno, N., Sekiguchi, T., Sekiguchi, M., Hayashida, H., Kuma, K., Miyata, T., Fukushige, S., Murotsu, T., and et al. (1987) *Genes & development* **1**(6), 585-593
466. Ohtsubo, M., Okazaki, H., and Nishimoto, T. (1989) *The Journal of cell biology* **109**(4 Pt 1), 1389-1397
467. Ohtsubo, M., Yoshida, T., Seino, H., Nishitani, H., Clark, K. L., Sprague, G. F., Jr., Frasch, M., and Nishimoto, T. (1991) *The EMBO journal* **10**(5), 1265-1273
468. Oldham, S., Montagne, J., Radimerski, T., Thomas, G., and Hafen, E. (2000) *Genes & development* **14**(21), 2689-2694
469. Ono, K., and Han, J. (2000) *Cellular signalling* **12**(1), 1-13
470. Osley, M. A. (2006) *Briefings in functional genomics & proteomics* **5**(3), 179-189
471. Oster, S. K., Ho, C. S., Soucie, E. L., and Penn, L. Z. (2002) *Advances in cancer research* **84**, 81-154
472. Otto, E. A., Trapp, M. L., Schultheiss, U. T., Helou, J., Quarmby, L. M., and Hildebrandt, F. (2008) *J Am Soc Nephrol* **19**(3), 587-592
473. Ouyang, X. M., Xia, X. J., Verpy, E., Du, L. L., Pandya, A., Petit, C., Balkany, T., Nance, W. E., and Liu, X. Z. (2002) *Human genetics* **111**(1), 26-30



474. Pagano, J. S., and Vaheri, A. (1965) *Archiv fur die gesamte Virusforschung* **17**(3), 456-464
475. Pain, V. M. (1996) *European journal of biochemistry / FEBS* **236**(3), 747-771

476. Palacios, F., Schweitzer, J. K., Boshans, R. L., and D'Souza-Schorey, C. (2002) *Nature cell biology* **4**(12), 929-936
477. Pattingre, S., Espert, L., Biard-Piechaczyk, M., and Codogno, P. (2008) *Biochimie* **90**(2), 313-323
478. Pattingre, S., Tassa, A., Qu, X., Garuti, R., Liang, X. H., Mizushima, N., Packer, M., Schneider, M. D., and Levine, B. (2005) *Cell* **122**(6), 927-939
479. Pavri, R., Zhu, B., Li, G., Trojer, P., Mandal, S., Shilatifard, A., and Reinberg, D. (2006) *Cell* **125**(4), 703-717
480. Pearce, L. R., Huang, X., Boudeau, J., Pawlowski, R., Wullschleger, S., Deak, M., Ibrahim, A. F., Gourlay, R., Magnuson, M. A., and Alessi, D. R. (2007) *The Biochemical journal* **405**(3), 513-522
481. Pearson, R. B., Dennis, P. B., Han, J. W., Williamson, N. A., Kozma, S. C., Wettenhall, R. E., and Thomas, G. (1995) *The EMBO journal* **14**(21), 5279-5287
482. Pelka, P., Scime, A., Mandalfino, C., Joch, M., Abdulla, P., and Whyte, P. (2007) *Journal of cellular physiology* **212**(1), 13-25
483. Pelzer, C., Kassner, I., Matentzoglou, K., Singh, R. K., Wollscheid, H. P., Scheffner, M., Schmidtke, G., and Groettrup, M. (2007) *The Journal of biological chemistry* **282**(32), 23010-23014
484. Pende, M., Um, S. H., Mieulet, V., Sticker, M., Goss, V. L., Mestan, J., Mueller, M., Fumagalli, S., Kozma, S. C., and Thomas, G. (2004) *Molecular and cellular biology* **24**(8), 3112-3124
485. Peritz, T., Zeng, F., Kannanayakal, T. J., Kilk, K., Eiriksdottir, E., Langel, U., and Eberwine, J. (2006) *Nature protocols* **1**(2), 577-580
486. Phillips, T. A., VanBogelen, R. A., and Neidhardt, F. C. (1984) *Journal of bacteriology* **159**(1), 283-287
487. Pickart, C. M., and Rose, I. A. (1985) *The Journal of biological chemistry* **260**(13), 7903-7910
488. Pierre, S. C., Hausler, J., Birod, K., Geisslinger, G., and Scholich, K. (2004) *The EMBO journal* **23**(15), 3031-3040
489. Plant, P. J., Lafont, F., Lecat, S., Verkade, P., Simons, K., and Rotin, D. (2000) *The Journal of cell biology* **149**(7), 1473-1484
490. Plas, D. R., and Thompson, C. B. (2003) *The Journal of biological chemistry* **278**(14), 12361-12366
491. Polo, S., Sigismund, S., Faretta, M., Guidi, M., Capua, M. R., Bossi, G., Chen, H., De Camilli, P., and Di Fiore, P. P. (2002) *Nature* **416**(6879), 451-455
492. Potter, C. J., Huang, H., and Xu, T. (2001) *Cell* **105**(3), 357-368
493. Potter, C. J., Pedraza, L. G., and Xu, T. (2002) *Nature cell biology* **4**(9), 658-665
494. Poulin, F., Gingras, A. C., Olsen, H., Chevalier, S., and Sonenberg, N. (1998) *The Journal of biological chemistry* **273**(22), 14002-14007
495. Powis, G., Bonjouklian, R., Berggren, M. M., Gallegos, A., Abraham, R., Ashendel, C., Zalkow, L., Matter, W. F., Dodge, J., Grindey, G., and et al. (1994) *Cancer research* **54**(9), 2419-2423
496. Preiss, T., Baron-Benhamou, J., Ansorge, W., and Hentze, M. W. (2003) *Nature structural biology* **10**(12), 1039-1047
497. Promega Corporation. Reporter and transfection systems, 1995:193
498. Promega Corporation. Technical Bulletin (1995); 216: 53
499. Promega Notes (1995); 56:58
500. Proud, C. G. (2004) *Cardiovascular research* **63**(3), 403-413
501. Proud, C. G. (2005) *Cell death and differentiation* **12**(6), 541-546
502. Proud, C. G. (2007) *The Biochemical journal* **403**(2), 217-234
503. Provinciali, L., Laurenzi, M. A., Vesprini, L., Giovagnoli, A. R., Bartocci, C., Montroni, M., Bagnarelli, P., Clementi, M., and Varaldo, P. E. (1988) *Acta neurologica Scandinavica* **78**(6), 449-454
504. Pullen, N., Dennis, P. B., Andjelkovic, M., Dufner, A., Kozma, S. C., Hemmings, B. A., and Thomas, G. (1998) *Science (New York, N.Y)* **279**(5351), 707-710



505. Quimby, B. B., and Dasso, M. (2003) *Current opinion in cell biology* **15**(3), 338-344

R

506. Raiborg, C., Bache, K. G., Gillooly, D. J., Madshus, I. H., Stang, E., and Stenmark, H. (2002) *Nature cell biology* **4**(5), 394-398
507. Raska, I., Koberna, K., Malinsky, J., Fidlerova, H., and Masata, M. (2004) *Biology of the cell / under the auspices of the European Cell Biology Organization* **96**(8), 579-594
508. Raught, B., Peiretti, F., Gingras, A. C., Livingstone, M., Shahbazian, D., Mayeur, G. L., Polakiewicz, R. D., Sonenberg, N., and Hershey, J. W. (2004) *The EMBO journal* **23**(8), 1761-1769
509. Ravitz, M. J., Chen, L., Lynch, M., and Schmidt, E. V. (2007) *Cancer research* **67**(23), 11209-11217
510. Rayner, K., Chen, Y. X., Hibbert, B., White, D., Miller, H., Postel, E. H., and O'Brien, E. R. (2008) *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* **108**(1-2), 72-81
511. Rebello, C. A., and Ludescher, R. D. (1998) *Biochemistry* **37**(41), 14529-14538
512. Regan-Klapisz, E., Sorokina, I., Voortman, J., de Keizer, P., Roovers, R. C., Verheesen, P., Urbe, S., Fallon, L., Fon, E. A., Verkleij, A., Benmerah, A., and van Bergen en Henegouwen, P. M. (2005) *Journal of cell science* **118**(Pt 19), 4437-4450
513. Reggiori, F., Tucker, K. A., Stromhaug, P. E., and Klionsky, D. J. (2004) *Developmental cell* **6**(1), 79-90
514. Reiling, J. H., and Hafen, E. (2004) *Genes & development* **18**(23), 2879-2892
515. Reinhard, C., Fernandez, A., Lamb, N. J., and Thomas, G. (1994) *The EMBO journal* **13**(7), 1557-1565
516. Reinhard, C., Thomas, G., and Kozma, S. C. (1992) *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **89**(9), 4052-4056
517. Reits, E. A., Benham, A. M., Plougastel, B., Neefjes, J., and Trowsdale, J. (1997) *The EMBO journal* **16**(20), 6087-6094
518. Ren, M., Villamarin, A., Shih, A., Coutavas, E., Moore, M. S., LoCurcio, M., Clarke, V., Oppenheim, J. D., D'Eustachio, P., and Rush, M. G. (1995) *Molecular and cellular biology* **15**(4), 2117-2124
519. Renault, L., Nassar, N., Vetter, I., Becker, J., Klebe, C., Roth, M., and Wittinghofer, A. (1998) *Nature* **392**(6671), 97-101
520. Renault, L., Nassar, N., Wittinghofer, A., Roth, M., and Vetter, I. R. (1999) *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **55**(Pt 1), 272-275
521. Rhodes, D. A., de Bono, B., and Trowsdale, J. (2005) *Immunology* **116**(4), 411-417
522. Richards, S. A., Fu, J., Romanelli, A., Shimamura, A., and Blenis, J. (1999) *Curr Biol* **9**(15), 810-820
523. Richardson, C. J., Broenstrup, M., Fingar, D. C., Julich, K., Ballif, B. A., Gygi, S., and Blenis, J. (2004) *Curr Biol* **14**(17), 1540-1549
524. Rickards, B., Flint, S. J., Cole, M. D., and LeRoy, G. (2007) *Molecular and cellular biology* **27**(3), 937-948
525. Riddick, G., and Macara, I. G. (2005) *The Journal of cell biology* **168**(7), 1027-1038
526. Riggs, J. L., Seiwald, R. J., Burckhalter, J. H., Downs, C. M., and Metcalf, T. G. (1958) *The American journal of pathology* **34**(6), 1081-1097
527. Rinchik, E. M., Carpenter, D. A., and Handel, M. A. (1995) *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **92**(14), 6394-6398
528. Ritchie, K. J., Malakhov, M. P., Hetherington, C. J., Zhou, L., Little, M. T., Malakhova, O. A., Sipe, J. C., Orkin, S. H., and Zhang, D. E. (2002) *Genes & development* **16**(17), 2207-2212
529. Rock, K. L., Gramm, C., Rothstein, L., Clark, K., Stein, R., Dick, L., Hwang, D., and Goldberg, A. L. (1994) *Cell* **78**(5), 761-771
530. Rodriguez, C. I., and Stewart, C. L. (2007) *Dev Biol* **312**(2), 501-508
531. Roepman, R., Bernoud-Hubac, N., Schick, D. E., Maugeri, A., Berger, W., Ropers, H. H., Cremers, F. P., and Ferreira, P. A. (2000) *Human molecular genetics* **9**(14), 2095-2105
532. Roig, J., Mikhailov, A., Belham, C., and Avruch, J. (2002) *Genes & development* **16**(13), 1640-1658
533. Rosa, J. L., and Barbacid, M. (1997) *Oncogene* **15**(1), 1-6
534. Rosa, J. L., Casaroli-Marano, R. P., Buckler, A. J., Vilaro, S., and Barbacid, M. (1996) *The EMBO journal* **15**(16), 4262-4273
535. Rosner, M., Freilinger, A., and Hengstschlager, M. (2006) *Mutation research* **613**(1), 10-16
536. Rosner, M., Freilinger, A., and Hengstschlager, M. (2007) *Oncogene* **26**(4), 521-531
537. Rosner, M., and Hengstschlager, M. (2008) *Human molecular genetics* **17**(19), 2934-2948

538. Rouse, J., Cohen, P., Trigon, S., Morange, M., Alonso-Llamazares, A., Zamanillo, D., Hunt, T., and Nebreda, A. R. (1994) *Cell* **78**(6), 1027-1037
539. Roux, P. P., Ballif, B. A., Anjum, R., Gygi, S. P., and Blenis, J. (2004) *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**(37), 13489-13494
540. Roux, P. P., and Blenis, J. (2004) *Microbiol Mol Biol Rev* **68**(2), 320-344
541. Roux, P. P., Shahbazian, D., Vu, H., Holz, M. K., Cohen, M. S., Taunton, J., Sonenberg, N., and Blenis, J. (2007) *The Journal of biological chemistry* **282**(19), 14056-14064
542. Rubinsztein, D. C. (2006) *Nature* **443**(7113), 780-786
543. Ruggero, D., and Pandolfi, P. P. (2003) *Nat Rev Cancer* **3**(3), 179-192
544. Rutherford, A. C., Traer, C., Wassmer, T., Pattni, K., Bujny, M. V., Carlton, J. G., Stenmark, H., and Cullen, P. J. (2006) *Journal of cell science* **119**(Pt 19), 3944-3957
545. Ruvinsky, I., Sharon, N., Lerer, T., Cohen, H., Stolovich-Rain, M., Nir, T., Dor, Y., Zisman, P., and Meyuhos, O. (2005) *Genes & development* **19**(18), 2199-2211
546. Ryan, K. J., McCaffery, J. M., and Wenthe, S. R. (2003) *The Journal of cell biology* **160**(7), 1041-1053

S

547. Sancak, Y., Peterson, T. R., Shaul, Y. D., Lindquist, R. A., Thoreen, C. C., Bar-Peled, L., and Sabatini, D. M. (2008) *Science (New York, N.Y)* **320**(5882), 1496-1501
548. Sancak, Y., Thoreen, C. C., Peterson, T. R., Lindquist, R. A., Kang, S. A., Spooner, E., Carr, S. A., and Sabatini, D. M. (2007) *Molecular cell* **25**(6), 903-915
549. Santoro, R., Li, J., and Grummt, I. (2002) *Nat Genet* **32**(3), 393-396
550. Santos, T. M., Han, S., Bowser, M., Sazani, K., Beauchamp, R. L., Murthy, V., Bhide, P. G., and Ramesh, V. (2006) *J Neurosci Res* **83**(2), 222-232
551. Sarbassov, D. D., Ali, S. M., Kim, D. H., Guertin, D. A., Latek, R. R., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., and Sabatini, D. M. (2004) *Curr Biol* **14**(14), 1296-1302
552. Sarbassov, D. D., Ali, S. M., Sengupta, S., Sheen, J. H., Hsu, P. P., Bagley, A. F., Markhard, A. L., and Sabatini, D. M. (2006) *Molecular cell* **22**(2), 159-168
553. Sarbassov, D. D., Guertin, D. A., Ali, S. M., and Sabatini, D. M. (2005) *Science (New York, N.Y)* **307**(5712), 1098-1101
554. Sarbassov, D. D., and Sabatini, D. M. (2005) *The Journal of biological chemistry* **280**(47), 39505-39509
555. Saucedo, L. J., Gao, X., Chiarelli, D. A., Li, L., Pan, D., and Edgar, B. A. (2003) *Nature cell biology* **5**(6), 566-571
556. Schaefer, A. M., Hadwiger, G. D., and Nonet, M. L. (2000) *Neuron* **26**(2), 345-356
557. Schalm, S. S., and Blenis, J. (2002) *Curr Biol* **12**(8), 632-639
558. Schwalder, S. B., Kabani, M., Howald, I., Choudhury, U., Werner, M., and Shore, D. (2004) *Nature* **432**(7020), 1058-1061
559. Scheffner, M., Huibregtse, J. M., Vierstra, R. D., and Howley, P. M. (1993) *Cell* **75**(3), 495-505
560. Scheffner, M., and Staub, O. (2007) *BMC biochemistry* **8 Suppl 1**, S6
561. Scheid, M. P., and Woodgett, J. R. (2003) *FEBS letters* **546**(1), 108-112
562. Schieke, S. M., Phillips, D., McCoy, J. P., Jr., Aponte, A. M., Shen, R. F., Balaban, R. S., and Finkel, T. (2006) *The Journal of biological chemistry* **281**(37), 27643-27652
563. Schlenstedt, G., Saavedra, C., Loeb, J. D., Cole, C. N., and Silver, P. A. (1995) *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **92**(1), 225-229
564. Schlosser, I., Holzel, M., Murnseer, M., Burtscher, H., Weidle, U. H., and Eick, D. (2003) *Nucleic Acids Res* **31**(21), 6148-6156
565. Schmelzle, T., and Hall, M. N. (2000) *Cell* **103**(2), 253-262
566. Scholich, K., Pierre, S., and Patel, T. B. (2001) *The Journal of biological chemistry* **276**(50), 47583-47589
567. Schreiber, S. L., Liu, J., Albers, M. W., Karmacharya, R., Koh, E., Martin, P. K., Rosen, M. K., Standaert, R. F., and Wandless, T. J. (1991) *Transplantation proceedings* **23**(6), 2839-2844
568. Schwarz, S. E., Rosa, J. L., and Scheffner, M. (1998) *The Journal of biological chemistry* **273**(20), 12148-12154
569. Scott, R. C., Juhasz, G., and Neufeld, T. P. (2007) *Curr Biol* **17**(1), 1-11
570. Scott, R. C., Schuldiner, O., and Neufeld, T. P. (2004) *Developmental cell* **7**(2), 167-178

571. Scully, R., Chen, J., Ochs, R. L., Keegan, K., Hoekstra, M., Feunteun, J., and Livingston, D. M. (1997) *Cell* **90**(3), 425-435
572. Scully, R., Chen, J., Plug, A., Xiao, Y., Weaver, D., Feunteun, J., Ashley, T., and Livingston, D. M. (1997) *Cell* **88**(2), 265-275
573. Seglen, P. O., and Bohley, P. (1992) *Experientia* **48**(2), 158-172
574. Sehgal, S. N., and Bansbach, C. C. (1993) *Annals of the New York Academy of Sciences* **685**, 58-67
575. Seino, H., Hisamoto, N., Uzawa, S., Sekiguchi, T., and Nishimoto, T. (1992) *Journal of cell science* **102 (Pt 3)**, 393-400
576. Semov, A., Marcotte, R., Semova, N., Ye, X., and Wang, E. (2002) *Analytical biochemistry* **302**(1), 38-51
577. Seto, M. H., Liu, H. L., Zajchowski, D. A., and Whitlow, M. (1999) *Proteins* **35**(2), 235-249
578. Shah, O. J., Wang, Z., and Hunter, T. (2004) *Curr Biol* **14**(18), 1650-1656
579. Shahbazian, D., Roux, P. P., Mieulet, V., Cohen, M. S., Raught, B., Taunton, J., Hershey, J. W., Blenis, J., Pende, M., and Sonenberg, N. (2006) *The EMBO journal* **25**(12), 2781-2791
580. Shapiro, A. L., Vinuela, E., and Maizel, J. V., Jr. (1967) *Biochemical and biophysical research communications* **28**(5), 815-820
581. Shaw, R. J., Bardeesy, N., Manning, B. D., Lopez, L., Kosmatka, M., DePinho, R. A., and Cantley, L. C. (2004) *Cancer cell* **6**(1), 91-99
582. She, Q. B., Ma, W. Y., Zhong, S., and Dong, Z. (2002) *The Journal of biological chemistry* **277**(27), 24039-24048
583. Shima, H., Pende, M., Chen, Y., Fumagalli, S., Thomas, G., and Kozma, S. C. (1998) *The EMBO journal* **17**(22), 6649-6659
584. Shimamura, A., Ballif, B. A., Richards, S. A., and Blenis, J. (2000) *Curr Biol* **10**(3), 127-135
585. Shu, X., Black, G. C., Rice, J. M., Hart-Holden, N., Jones, A., O'Grady, A., Ramsden, S., and Wright, A. F. (2007) *Human mutation* **28**(4), 322-328
586. Shu, X., Fry, A. M., Tulloch, B., Manson, F. D., Crabb, J. W., Khanna, H., Faragher, A. J., Lennon, A., He, S., Trojan, P., Giessl, A., Wolfrum, U., Vervoort, R., Swaroop, A., and Wright, A. F. (2005) *Human molecular genetics* **14**(9), 1183-1197
587. Silverman, E., Frodin, M., Gammeltoft, S., and Maller, J. L. (2004) *Molecular and cellular biology* **24**(24), 10573-10583
588. Sjodahl, J. (1977) *European journal of biochemistry / FEBS* **73**(2), 343-351
589. Sjolinder, M., Uhlmann, J., and Ponstingl, H. (2002) *FEBS letters* **532**(1-2), 211-215
590. Sjolinder, M., Uhlmann, J., and Ponstingl, H. (2004) *Exp Cell Res* **294**(1), 68-76
591. Smith, D. B., and Johnson, K. S. (1988) *Gene* **67**(1), 31-40
592. Smith, E. M., Finn, S. G., Tee, A. R., Browne, G. J., and Proud, C. G. (2005) *The Journal of biological chemistry* **280**(19), 18717-18727
593. Smith, L. A., Bukanov, N. O., Husson, H., Russo, R. J., Barry, T. C., Taylor, A. L., Beier, D. R., and Ibraghimov-Beskrovnaya, O. (2006) *J Am Soc Nephrol* **17**(10), 2821-2831
594. Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., Fujimoto, E. K., Goeke, N. M., Olson, B. J., and Klenk, D. C. (1985) *Analytical biochemistry* **150**(1), 76-85
595. Sohara, E., Luo, Y., Zhang, J., Manning, D. K., Beier, D. R., and Zhou, J. (2008) *J Am Soc Nephrol* **19**(3), 469-476
596. Solomou, E. E., Sfrikakis, P. P., Kotsi, P., Papaioannou, M., Karali, V., Vervessou, E., Hoffbrand, A. V., and Panayiotidis, P. (2003) *Leukemia & lymphoma* **44**(9), 1579-1585
597. Sondek, J., Bohm, A., Lambright, D. G., Hamm, H. E., and Sigler, P. B. (1996) *Nature* **379**(6563), 369-374
598. Sonenberg, N., and Dever, T. E. (2003) *Current opinion in structural biology* **13**(1), 56-63
599. Song, J. J., Smith, S. K., Hannon, G. J., and Joshua-Tor, L. (2004) *Science (New York, N.Y)* **305**(5689), 1434-1437
600. Soucek, T., Pusch, O., Wienecke, R., DeClue, J. E., and Hengstschlager, M. (1997) *The Journal of biological chemistry* **272**(46), 29301-29308
601. Sowter, H. M., Ratcliffe, P. J., Watson, P., Greenberg, A. H., and Harris, A. L. (2001) *Cancer research* **61**(18), 6669-6673
602. Stack, J. H., Herman, P. K., Schu, P. V., and Emr, S. D. (1993) *The EMBO journal* **12**(5), 2195-2204
603. Staub, O., Gautschi, I., Ishikawa, T., Breitschopf, K., Ciechanover, A., Schild, L., and Rotin, D. (1997) *The EMBO journal* **16**(21), 6325-6336

604. Stavreva, D. A., Kawasaki, M., Dundr, M., Koberna, K., Muller, W. G., Tsujimura-Takahashi, T., Komatsu, W., Hayano, T., Isobe, T., Raska, I., Misteli, T., Takahashi, N., and McNally, J. G. (2006) *Molecular and cellular biology* **26**(13), 5131-5145
605. Stein, M. P., Feng, Y., Cooper, K. L., Welford, A. M., and Wandinger-Ness, A. (2003) *Traffic (Copenhagen, Denmark)* **4**(11), 754-771
606. Stevens, T. J., and Paoli, M. (2008) *Proteins* **70**(2), 378-387
607. Stolovich, M., Tang, H., Hornstein, E., Levy, G., Cohen, R., Bae, S. S., Birnbaum, M. J., and Meyuhas, O. (2002) *Molecular and cellular biology* **22**(23), 8101-8113
608. Strous, G. J., and Govers, R. (1999) *Journal of cell science* **112** (Pt 10), 1417-1423
609. Sturm, R. A., Duffy, D. L., Zhao, Z. Z., Leite, F. P., Stark, M. S., Hayward, N. K., Martin, N. G., and Montgomery, G. W. (2008) *American journal of human genetics* **82**(2), 424-431
610. Su, A. I., Cooke, M. P., Ching, K. A., Hakak, Y., Walker, J. R., Wiltshire, T., Orth, A. P., Vega, R. G., Sapinoso, L. M., Moqrich, A., Patapoutian, A., Hampton, G. M., Schultz, P. G., and Hogenesch, J. B. (2002) *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**(7), 4465-4470
611. Sun, Y., Fang, Y., Yoon, M. S., Zhang, C., Roccio, M., Zwartkruis, F. J., Armstrong, M., Brown, H. A., and Chen, J. (2008) *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**(24), 8286-8291
612. Sung, P., Prakash, S., and Prakash, L. (1990) *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **87**(7), 2695-2699
613. Sutherland, C., Leighton, I. A., and Cohen, P. (1993) *The Biochemical journal* **296** (Pt 1), 15-19
614. Sutovsky, P. (2003) *Microscopy research and technique* **61**(1), 88-102
615. Suzuki, K., and Ohsumi, Y. (2007) *FEBS letters* **581**(11), 2156-2161

T

616. Takeuchi, T., Inoue, S., and Yokosawa, H. (2006) *Biochemical and biophysical research communications* **348**(2), 473-477
617. Tamura, N., Lottspeich, F., Baumeister, W., and Tamura, T. (1998) *Cell* **95**(5), 637-648
618. Tan, B. C., and Lee, S. C. (2004) *The Journal of biological chemistry* **279**(10), 9321-9330
619. Tan, Y., Ruan, H., Demeter, M. R., and Comb, M. J. (1999) *The Journal of biological chemistry* **274**(49), 34859-34867
620. Tang, H., Hornstein, E., Stolovich, M., Levy, G., Livingstone, M., Templeton, D., Avruch, J., and Meyuhas, O. (2001) *Molecular and cellular biology* **21**(24), 8671-8683
621. Tapon, N., Ito, N., Dickson, B. J., Treisman, J. E., and Hariharan, I. K. (2001) *Cell* **105**(3), 345-355
622. Tarabal, O., Caldero, J., Casas, C., Oppenheim, R. W., and Esquerda, J. E. (2005) *Molecular and cellular neurosciences* **29**(2), 283-298
623. Tasdemir, E., Maiuri, M. C., Galluzzi, L., Vitale, I., Djavaheri-Mergny, M., D'Amelio, M., Criollo, A., Morselli, E., Zhu, C., Harper, F., Nannmark, U., Samara, C., Pinton, P., Vicencio, J. M., Carnuccio, R., Moll, U. M., Madeo, F., Paterlini-Brechot, P., Rizzuto, R., Szabadkai, G., Pierron, G., Blomgren, K., Tavernarakis, N., Codogno, P., Cecconi, F., and Kroemer, G. (2008) *Nature cell biology* **10**(6), 676-687
624. Tee, A. R., Anjum, R., and Blenis, J. (2003) *The Journal of biological chemistry* **278**(39), 37288-37296
625. Tee, A. R., and Blenis, J. (2005) *Seminars in cell & developmental biology* **16**(1), 29-37
626. Tee, A. R., Manning, B. D., Roux, P. P., Cantley, L. C., and Blenis, J. (2003) *Curr Biol* **13**(15), 1259-1268
627. Tee, A. R., and Proud, C. G. (2002) *Molecular and cellular biology* **22**(6), 1674-1683
628. Terpe, K. (2003) *Applied microbiology and biotechnology* **60**(5), 523-533
629. Thiaville, M. M., Pan, Y. X., Gjymishka, A., Zhong, C., Kaufman, R. J., and Kilberg, M. S. (2008) *The Journal of biological chemistry* **283**(16), 10848-10857
630. Thrower, J. S., Hoffman, L., Rechsteiner, M., and Pickart, C. M. (2000) *The EMBO journal* **19**(1), 94-102
631. Tiollais, P., Galibert, F., and Boiron, M. (1971) *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **68**(6), 1117-1120
632. Tiselius, A. (1937) *The Biochemical journal* **31**(2), 313-317
633. Tomas-Zuber, M., Mary, J. L., Lamour, F., Bur, D., and Lesslauer, W. (2001) *The Journal of biological chemistry* **276**(8), 5892-5899

634. Topp, J. D., Gray, N. W., Gerard, R. D., and Horazdovsky, B. F. (2004) *The Journal of biological chemistry* **279**(23), 24612-24623
635. Torres, V. E., and Harris, P. C. (2006) *Nature clinical practice* **2**(1), 40-55; quiz 55
636. Toschi, A., Lee, E., Xu, L., Garcia, A., Gadir, N., and Foster, D. A. (2009) *Molecular and cellular biology* **29**(6), 1411-1420
637. Trapp, M. L., Galtseva, A., Manning, D. K., Beier, D. R., Rosenblum, N. D., and Quarmby, L. M. (2008) *Pediatric nephrology (Berlin, Germany)* **23**(3), 377-387
638. Tremblay, F., Brule, S., Hee Um, S., Li, Y., Masuda, K., Roden, M., Sun, X. J., Krebs, M., Polakiewicz, R. D., Thomas, G., and Marette, A. (2007) *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**(35), 14056-14061
639. Tremblay, F., and Marette, A. (2001) *The Journal of biological chemistry* **276**(41), 38052-38060
640. Tsang, C. K., and Zheng, X. F. (2007) *Cell cycle (Georgetown, Tex)* **6**(1), 25-29
641. Tschochner, H., and Hurt, E. (2003) *Trends in cell biology* **13**(5), 255-263
642. Tsukiyama-Kohara, K., Poulin, F., Kohara, M., DeMaria, C. T., Cheng, A., Wu, Z., Gingras, A. C., Katsume, A., Elchebly, M., Spiegelman, B. M., Harper, M. E., Tremblay, M. L., and Sonenberg, N. (2001) *Nature medicine* **7**(10), 1128-1132

u

643. Uhlmann, J., Wiemann, S., and Ponstingl, H. (1999) *FEBS letters* **460**(1), 153-160
644. Um, S. H., D'Alessio, D., and Thomas, G. (2006) *Cell metabolism* **3**(6), 393-402
645. Usui, I., Haruta, T., Iwata, M., Takano, A., Uno, T., Kawahara, J., Ueno, E., Sasaoka, T., and Kobayashi, M. (2000) *Biochemical and biophysical research communications* **275**(1), 115-120

v

646. van Kerkhof, P., Govers, R., Alves dos Santos, C. M., and Strous, G. J. (2000) *The Journal of biological chemistry* **275**(3), 1575-1580
647. van Slegtenhorst, M., de Hoogt, R., Hermans, C., Nellist, M., Janssen, B., Verhoef, S., Lindhout, D., van den Ouweland, A., Halley, D., Young, J., Burley, M., Jeremiah, S., Woodward, K., Nahmias, J., Fox, M., Ekong, R., Osborne, J., Wolfe, J., Povey, S., Snell, R. G., Cheadle, J. P., Jones, A. C., Tachataki, M., Ravine, D., Sampson, J. R., Reeve, M. P., Richardson, P., Wilmer, F., Munro, C., Hawkins, T. L., Sepp, T., Ali, J. B., Ward, S., Green, A. J., Yates, J. R., Kwiatkowska, J., Henske, E. P., Short, M. P., Haines, J. H., Jozwiak, S., and Kwiatkowski, D. J. (1997) *Science (New York, N.Y)* **277**(5327), 805-808
648. van Slegtenhorst, M., Nellist, M., Nagelkerken, B., Cheadle, J., Snell, R., van den Ouweland, A., Reuser, A., Sampson, J., Halley, D., and van der Sluijs, P. (1998) *Human molecular genetics* **7**(6), 1053-1057
649. Vezina, C., Kudelski, A., and Sehgal, S. N. (1975) *The Journal of antibiotics* **28**(10), 721-726

w

650. Wade, J. T., Hall, D. B., and Struhl, K. (2004) *Nature* **432**(7020), 1054-1058
651. Walkowicz, M., Ji, Y., Ren, X., Horsthemke, B., Russell, L. B., Johnson, D., Rinchik, E. M., Nicholls, R. D., and Stubbs, L. (1999) *Mamm Genome* **10**(9), 870-878
652. Wan, H. I., DiAntonio, A., Fetter, R. D., Bergstrom, K., Strauss, R., and Goodman, C. S. (2000) *Neuron* **26**(2), 313-329
653. Wang, B., and Elledge, S. J. (2007) *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**(52), 20759-20763
654. Wang, M., and Pickart, C. M. (2005) *The EMBO journal* **24**(24), 4324-4333
655. Wang, X., Beugnet, A., Murakami, M., Yamanaka, S., and Proud, C. G. (2005) *Molecular and cellular biology* **25**(7), 2558-2572

656. Wang, X., Li, W., Williams, M., Terada, N., Alessi, D. R., and Proud, C. G. (2001) *The EMBO journal* **20**(16), 4370-4379
657. Wang, X., and Proud, C. G. (2006) *Physiology (Bethesda, Md)* **21**, 362-369
658. Wang, X., Trotman, L. C., Koppie, T., Alimonti, A., Chen, Z., Gao, Z., Wang, J., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Cordon-Cardo, C., Pandolfi, P. P., and Jiang, X. (2007) *Cell* **128**(1), 129-139
659. Wang, X. F., Wang, D., Zhu, W., Delrahim, K. K., Dolnak, D., and Rapaport, M. H. (2003) *Biological psychiatry* **53**(5), 361-375
660. Welchman, R. L., Gordon, C., and Mayer, R. J. (2005) *Nature reviews* **6**(8), 599-609
661. Weng, Q. P., Kozlowski, M., Belham, C., Zhang, A., Comb, M. J., and Avruch, J. (1998) *The Journal of biological chemistry* **273**(26), 16621-16629
662. Werner, E. D., Lee, J., Hansen, L., Yuan, M., and Shoelson, S. E. (2004) *The Journal of biological chemistry* **279**(34), 35298-35305
663. White, M. F. (1998) *Molecular and cellular biochemistry* **182**(1-2), 3-11
664. White, R. J. (2005) *Nature reviews* **6**(1), 69-78
665. Wienecke, R., Konig, A., and DeClue, J. E. (1995) *The Journal of biological chemistry* **270**(27), 16409-16414
666. Wiggan, G. R., Soloaga, A., Foster, J. M., Murray-Tait, V., Cohen, P., and Arthur, J. S. (2002) *Molecular and cellular biology* **22**(8), 2871-2881
667. Wilde, A., and Zheng, Y. (2009) *Nature cell biology* **11**(1), 11-12
668. Williams, M. R., Arthur, J. S., Balendran, A., van der Kaay, J., Poli, V., Cohen, P., and Alessi, D. R. (2000) *Curr Biol* **10**(8), 439-448
669. Withers, D. J., Ouwens, D. M., Nave, B. T., van der Zon, G. C., Alarcon, C. M., Cardenas, M. E., Heitman, J., Maassen, J. A., and Shepherd, P. R. (1997) *Biochemical and biophysical research communications* **241**(3), 704-709
670. Wong, C. H., Chan, H., Ho, C. Y., Lai, S. K., Chan, K. S., Koh, C. G., and Li, H. Y. (2009) *Nature cell biology* **11**(1), 36-45
671. Wong, J. J., Pung, Y. F., Sze, N. S., and Chin, K. C. (2006) *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**(28), 10735-10740
672. Woo, J. S., Suh, H. Y., Park, S. Y., and Oh, B. H. (2006) *Molecular cell* **24**(6), 967-976
673. Woo, M. S., Ohta, Y., Rabinovitz, I., Stossel, T. P., and Blenis, J. (2004) *Molecular and cellular biology* **24**(7), 3025-3035
674. Wool, I. G. (1996) *Trends in biochemical sciences* **21**(5), 164-165
675. Wu, C., Daniels, R. W., and DiAntonio, A. (2007) *Neural development* **2**, 16
676. Wu, C., Wairkar, Y. P., Collins, C. A., and DiAntonio, A. (2005) *J Neurosci* **25**(42), 9557-9566
677. Wullschlegel, S., Loewith, R., and Hall, M. N. (2006) *Cell* **124**(3), 471-484

X

678. Xiao, G. H., Shoarinejad, F., Jin, F., Golemis, E. A., and Yeung, R. S. (1997) *The Journal of biological chemistry* **272**(10), 6097-6100
679. Xie, Z., and Klionsky, D. J. (2007) *Nature cell biology* **9**(10), 1102-1109

Y

680. Yamamoto, Y., Jones, K. A., Mak, B. C., Muehlenbachs, A., and Yeung, R. S. (2002) *Archives of biochemistry and biophysics* **404**(2), 210-217
681. Yamanaka, K., Vande Velde, C., Eymard-Pierre, E., Bertini, E., Boespflug-Tanguy, O., and Cleveland, D. W. (2003) *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**(26), 16041-16046
682. Yang, H., Scholich, K., Poser, S., Storm, D. R., Patel, T. B., and Goldowitz, D. (2002) *Brain research* **136**(1), 35-42
683. Yang, Q., and Guan, K. L. (2007) *Cell research* **17**(8), 666-681

684. Yang, Y., Hentati, A., Deng, H. X., Dabbagh, O., Sasaki, T., Hirano, M., Hung, W. Y., Ouahchi, K., Yan, J., Azim, A. C., Cole, N., Gascon, G., Yagmour, A., Ben-Hamida, M., Pericak-Vance, M., Hentati, F., and Siddique, T. (2001) *Nat Genet* **29**(2), 160-165
685. Yates, J. R. (2006) *Eur J Hum Genet* **14**(10), 1065-1073
686. Yen, W. L., Legakis, J. E., Nair, U., and Klionsky, D. J. (2007) *Molecular biology of the cell* **18**(2), 581-593
687. Yokogami, K., Wakisaka, S., Avruch, J., and Reeves, S. A. (2000) *Curr Biol* **10**(1), 47-50
688. Young, A. R., Chan, E. Y., Hu, X. W., Kochl, R., Crawshaw, S. G., High, S., Hailey, D. W., Lippincott-Schwartz, J., and Tooze, S. A. (2006) *Journal of cell science* **119**(Pt 18), 3888-3900
689. Yu, J., Astrinidis, A., and Henske, E. P. (2001) *American journal of respiratory and critical care medicine* **164**(8 Pt 1), 1537-1540
690. Yuan, X., Zhao, J., Zentgraf, H., Hoffmann-Rohrer, U., and Grummt, I. (2002) *EMBO reports* **3**(11), 1082-1087

Z

691. Zaragoza, D., Ghavidel, A., Heitman, J., and Schultz, M. C. (1998) *Molecular and cellular biology* **18**(8), 4463-4470
692. Zaru, R., Ronkina, N., Gaestel, M., Arthur, J. S., and Watts, C. (2007) *Nat Immunol* **8**(11), 1227-1235
693. Zhang, H., Shi, X., Hampong, M., Blanis, L., and Pelech, S. (2001) *The Journal of biological chemistry* **276**(10), 6905-6908
694. Zhang, H., Stallock, J. P., Ng, J. C., Reinhard, C., and Neufeld, T. P. (2000) *Genes & development* **14**(21), 2712-2724
695. Zhang, Y. (2003) *Genes & development* **17**(22), 2733-2740
696. Zhao, C., Beaudenon, S. L., Kelley, M. L., Waddell, M. B., Yuan, W., Schulman, B. A., Huibregtse, J. M., and Krug, R. M. (2004) *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**(20), 7578-7582
697. Zhao, Y., Hong, D. H., Pawlyk, B., Yue, G., Adamian, M., Grynberg, M., Godzik, A., and Li, T. (2003) *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**(7), 3965-3970
698. Zhen, M., Huang, X., Bamber, B., and Jin, Y. (2000) *Neuron* **26**(2), 331-343
699. Zheng, L., Ding, H., Lu, Z., Li, Y., Pan, Y., Ning, T., and Ke, Y. (2008) *Genes Cells* **13**(3), 285-294
700. Zheng, N., Schulman, B. A., Song, L., Miller, J. J., Jeffrey, P. D., Wang, P., Chu, C., Koepf, D. M., Elledge, S. J., Pagano, M., Conaway, R. C., Conaway, J. W., Harper, J. W., and Pavletich, N. P. (2002) *Nature* **416**(6882), 703-709
701. Zheng, N., Wang, P., Jeffrey, P. D., and Pavletich, N. P. (2000) *Cell* **102**(4), 533-539
702. Zhong, Q., Gao, W., Du, F., and Wang, X. (2005) *Cell* **121**(7), 1085-1095
703. Zhu, J. H., Horbinski, C., Guo, F., Watkins, S., Uchiyama, Y., and Chu, C. T. (2007) *The American journal of pathology* **170**(1), 75-86



Abreviacions

<u>Abreviacions</u>	<u>Significat</u>
4EBP1	Proteïna que s'uneix al factor eIF4E, 1
AA	Barreja d'aminoàcids essencials i no essencials
AC	Adenilil ciclases
ADN	Àcid desoxiribonucleic
ADNr	ADN ribosomal
ADP	Adenosina-5'-bifosfat
AG	Purificació aparell de Golgi
AGC	Família proteïna quinasa A/proteïna quinasa G/proteïna quinasa C
AIB	Àcid γ -amino-n-butíric
AMP	Adenosina-5'- monofosfat
AMPc	AMP cíclic
ARNm	ARN missatger
ARNr	ARN ribosomal
ARNt	ARN de transferència
Atg	Gen relacionat amb l'autofàgia
ATM	Proteïna ataxia telangiectasia mutada
ATP	Adenosina-5'-trifosfat
ATPasa	ATP hidrolasa
ATR	Proteïna ataxia telangiectasia relacionada amb Rad 3
BCA	Àcid bicinconínic
BES	Àcid N,N-bis(2-hidroxiètil)-aminoetà-sulfònic
BLIP-II	Inhibidor II de la β -lactamasa de l' <i>Streptomyces exfoliatus</i>
BMP	Proteïna morfogenètica d'òs
cADN	ADN complementari al ARNm
CaMK	Proteïna quinasa dependent de calci/calmodulina
CAP	7-metil-guanosina trifosfat (7-metil-GTP) present en el l'extrem 5' de la majoria de ARNm
CCV	Vesícules amb coberta de clatrina
Cdc42	Proteïna del cicle de divisió cel·lular 42
Ceb1	Proteïna associada a la ciclina E, 1
CLC	Cadena lleugera de la clatrina
CMV	Citomegalovirus
c-myc	Oncoproteïna p62 c-myc
CPH	Domini proteic Cul7, PARC, HERC2
CREB/CREM	Factors de transcripció que s'uneixen a seqüències de l'ADN que responen a AMPc
Ct	Extrem carboxil terminal
CTK	Domini quinasa C terminal de la RSK i MSK
CTNT	Oligonucleòtid "non targeting" per a siRNA utilitzat com a control
CHC	Cadena pesada de la clatrina
DAG	Diacilglicerol
DDR	Resposta al dany a l'ADN
DelGEF	GEF associat al locus de la sordesa
DelGIP1	Proteïna que interacciona amb DelGEF, 1
DGAT1	Acil CoA di-acilglicerol acil-transferasa
DMSO	Dimetil sulfòxid
DNAPK	Proteïna quinasa dependent d'ADN
dNTP	Deoxiribonucleòtid trifosfat
DOC	Domini proteic death on curing
DO	Densitat òptica
DOPE	L-dioleoïl-fosfatidiletanolamina
DTT	Ditiotreitòl
DUB	Enzim deubiquitinant
DYHC	Cadena pesada de la dineïna
E6AP	Proteïna associada a la proteïna E6
E6	Oncoproteïna del virus del papiloma humà HPV-16
EE	Purificació d'endosomes "early"
EDTA	Àcid etilendiaminotetraacètic
eEF2K	Quinasa del factor regulador de l'elongació de la traducció, 2

<u>Abreviacions</u>	<u>Significat</u>
EGTA	Àcid d'etilè glicol tetraacètic
eIF	Factor d'iniciació de la traducció
eNOS	Proteïna síntasa d'òxid nítric
Erk	Proteïna quinasa regulada per senyals extracel·lulars
ESCRT	Complex endosomal classificador necessari per el transport
ETS	Seqüència espaiadora externa del pre-ARNr 47S
FBS	Sèrum fetal boví
FITC	Isotiocianat de fluoresceïna
FKBP12	Proteïna que s'associa al FK506 (tacrolimus o rapamicina), 12
FKBP38	Proteïna que s'associa al domini FRB de mTOR
Flag	Epítip Flag (residus DYKDDDDK)
FRB	Domini de mTOR d'unió al complex FKBP12/rapamicina
FRET	Fenòmen de transferència d'energia per ressonància fluorescent
FYVE	Fab1p, YOTB, Vac1p i EEA1
GAPDH	Gliceraldehid 3-fosfat deshidrogenasa
GAP	Proteïna activadora de l'activitat GTPasa
GDP	Guanosina-5'- difosfat
GEF	Factor bescanviador de nucleòtids de guanina
GFP	Proteïna fluorescent verda
GMP	Guanosina monofosfat
GRF	Factor alliberador de nucleòtids de guanina
GSH	Tripèptid glutatí (γ-glutamilmisteinilglicina)
GSK3β	Quinasa de la glicògen sintasa, 3β
GST	Glutatí-S-transferasa
GTPasa	GTP hidrolasa
GTP	Guanosina-5'- trifosfat
GTPγS	Guanosina 5'-(γ-tio)-trifosfat
H21,H22	Oligonucleòtids per a siRNA contra HERC2, 1 i 2
HA	Residus 98-106 de la hemaglutina del virus de la grip humana
HECT	Domini homòleg a l'extrem carboxil terminal de la proteïna E6AP
HEK-293	Cèl·lules de ronyó d'embrió humà 293
HEK-293T	Cèl·lules de ronyó d'embrió humà 293, transformades amb ADN de l'adenovirus 5
HeLa	Cèl·lules epitelials humanes d'adenocarcinoma de cèrvix
Hepes	Àcid 4-(2-hidroxiètil)piperazina-1-etanosulfònic
HERC	Gen o proteïna amb dominis RLD i HECT
HIF1α	Factor de transcripció induït per hipòxia, 1α
HM	Motiu proteic hidrofòbic
hPLIC	Proteïna humana que uneix associa proteïnes unides a l'integrina amb el citoesquelet
HSMEC	Cèl·lula de l'endoteli microvascular de la pell humana
Hsp70	Proteïna de xoc per calor 70
HUGO	Organització del genoma humà
IAHSP	Paraplègia hereditària espàstica ascendent infantil
IBtk	Inhibidor de la tirosina quinasa de Brunton
IFN α/β	interferó α/β
IGF1	Factor de creixement homòleg a la insulina, 1
IgG	Immunoglobulines G
IκB	Inhibidor del factor NFκB
IL1β	Interleuquina 1 β
IP	Immunoprecipitació
IPTG	Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosid
IRES	Seqüència interna d'alguns ARNm que permet l'acoblament dels ribosomes
IR	Receptor d'insulina
IRS	Proteïna adaptadora del receptor d'insulina
ISG15	Producte gènic estimulat per l'interferó, 15
ITS	Seqüència espaiadora interna del pre-ARNr 47S
jALS	Esclerosi lateral amiotròfica juvenil
Jck	Ronyó quístic juvenil
JNk	Quinasa de l'extrem N terminal de c-jun entre d'altres

<u>Abreviacions</u>	<u>Significat</u>
jPLS	Esclerosi lateral primària juvenil
Kb	Quilo base
KDa	Quilo dalton
LAG gel	Gel per a PAGE/SDS que combina un gel en gradient i un gel amb baix percentatge d'acrilamida
LAM	Limfangioleiomatosi
LB	Medi de cultiu bacterià luria
LC3 (o MAP1LC3)	Cadena lleugera de la proteïna associada a microtúbuls, 3
LP2	Fracció crua de vesícules sinàptiques
LPS	Lipopolisacàrid
Luc	Luciferasa
MAP4K3	<i>Mitogen activated protein kinase kinase kinase kinase 3</i>
MAPK	Proteïna quinasa activada per mitògens
MAPKAPK (o MK)	Quinasa activada per MAPKs
MAP2K (MEK, MKK)	Proteïna quinasa de MAPKs
MAP3K (MKKK)	Proteïna quinasa de MAPKs
MCF-7	Cèl·lules humanes d'adenocarcinoma de mama
MHC	Complex major d'histocompatibilitat
Mib-HERC2 o M-H	Domini <i>Mind Bomb</i> HERC2
MNK	Quinasa que interacciona amb MAPKs
MSK	Proteïna quinasa activada per estrès i mitògens
mTORC	Complex format per la proteïna mTOR i altres proteïnes
mTOR	Proteïna diana de la rapamicina en mamífers
MVB	Cossos multivesiculars
Myc	Epítip Myc (residus 408-439 de la proteïna p62 c-myc humana)
NA	Forma no activa
NBS	Banda inespecífica reconeguda per l'anticòs
NFκB	Factor nuclear kappa B
NLS	Pèptid senyal de localització nuclear
NRD	Domini regulador negatiu
NRK	Cèl·lules de ronyó de rata
Nt	Extrem amino terminal
NTK	Domini quinasa amino terminal de la RSK i MSK
ORF	Marc obert de lectura (open reading frame)
PA	Àcid fosfatídic
PAGE	Electroforesi en gel de poliacrilamida
PAM	Proteïna associada a c-myc
PBS	Dissolució salina tamponada amb fosfats
PCNA	Antígen nuclear de cèl·lules en proliferació
PCR	Reacció en cadena de la polimerasa
PDCD4	Proteïna de mort cel·lular programada 4
PDK1	Quinasa dependent de fosfoinosítids, 1
PE	fosfatidil-etanolamina
PEG	Polietilenglicol
PEI	Polietilenimina
PH	Domini proteic homòleg a la pleckstrina
PI(4,5)P ₂ (o PIP ₂)	Fosfatidil-inositol-4,5-bisfosfat
PI3K	Quinasa de la posició 3 de fosfatidils inositols
PI3P	Fosfatidil-inositol-3-fosfat
PIKK	Quinasa homòloga a les fosfatidil-inositol quinases
PIP ₃	fosfatidils-inositol-3,4,5-trifosfat
PI	Sèrum pre-immune
PKA	Proteïna quinasa dependent d'AMP cíclic
PKC	Proteïna quinasa activada per calci
PKD	Poliquistosi de ronyó
PKR	Proteïna quinasa activada per RNA doble cadena
PLD	Fosfolipasa D
PMA	Forbol 12-miristat-13-acetat
PMSF	Fluorur de fenilmetilsulfonil

<u>Abreviacions</u>	<u>Significat</u>
p	Nivell de significança estadística
PNS	Sobrenedant postnuclear
pRb	Proteïna del retinoblastoma
PSA	Persulfat amònic
PTB	Dominis proteics amb afinitat a fosfotirosines
PTEN	Proteïna homòloga a la fosfatasa i a la tensina
PVDF	Fluorur de polivinilidè
PWS	Síndrome de Prader-Willi
Q1,Q2,Q4,Q5	Oligonucleòtids per a siRNA contra HERC1
RAGs	GTPases petites relacionades amb Ras
RAIP	Motiu proteic format pels aminoàcids R,A,I,P
RCBTB	Proteïna amb dominis homòlegs a RCC1 i BTB
RCC1	Regulador de la condensació cromosòmica 1
REM	Radiació electromagnètica
Rheb	GTPasa homòloga a Ras enriquida en el cervell
RING	Dit de Zinc de tipus RING (<i>really interesting new gene</i>)
R (o Rapam)	Inhibidor de mTOR, Rapamicina
RISC	Complex de silenciament de l'ARN d'interferència
rjs	Síndrome <i>runty, jerky, sterile</i>
RLD	Domini proteic amb homologia a la proteïna RCC1
RPGR	Regulador de la GTPasa associada a la retinitis pigmentosa
rpS6	Proteïna ribosomal S6
RSK	p90 ribosomal S6 quinasa
RTK	Receptor tirosina quinasa
RT-PCR	Reacció en cadena de la polimerasa amb transcripció reversa
S (o SB)	Inhibidor de la p38, SB203580
S6K	Proteïna quinasa de la rpS6
SDS/SLS/NaDS	Dodecil sulfat sòdic o lauril sulfat sòdic
SEM	Error estàndard de la mitjana
SGK	Proteïna quinasa induïda per sèrum i glucocorticoides
siRNA	RNA d'interferència
SKAR	Proteïna homòloga a S6K1 i Aly/REF
Smurf	Factor regulador de la ubiquitinació d'smads
snoARN	RNA nucleolar petit
SNPs	Polimorfismes d'un sol nucleòtid
SOD1	Superòxid dismutasa 1
SPRY	Receptor SPLa i Ryanodin
STAT	Transductors de senyal i activadors de la transcripció
TD-60	Telofase disc 60
TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletildiamina
TGFβ	Factor de creixement tumoral β
TGN	Complex trans-golgi
TIF	Factor d'inici de la transcripció
TNFα	Factor de necrosi tumoral α
TOP ARNm	ARNm amb un fragment d'oligopirimidines en l'extrem 5'
TOS	Motiu proteic de senyalització a través de mTOR
TPA	12-o-tetradecanoilforbol-13-acetat
TRITC	Isotiocianat de vermell de Texas
TSC1	Hamartina
TSC2	Tuberina
TSC	Complex de l'esclerosi tuberosa
UBA	Domini associat a la ubiquitina
UBD	Domini proteic d'unió a ubiquitina
UBF	<i>Upstream binding factor</i>
Ubl	Proteïna homòloga a la ubiquitina
UBX	Domini homòleg a la ubiquitina
UBZ	Dominis especialitzats en l'unió d'ubiquitina
UDO	Unitat de densitat òptica
UIM	Motiu proteic que interacciona amb l'ubiquitina
U	Inhibidor de la MEK1/2, U0126

Abreviacions

UPS

UV

WBSCR16

WD40

W

WT

XLRP

 β -Gal**Significat**

Sistema ubiquitina-proteosoma

Radioació ultravioleta

Regió crítica 16 del síndrome de William Beuren

Domini proteic homòleg a la subunitat β de les proteïnes G heterotrimèriques

Inhibidor de les PI3Ks wortmannina

Tipus salvatge

Retinitis pigmentosa lligada al cromosoma X

 β -Galactosidasa

Llistat Figures

	Pàgina
Figura 1. Estructura del Regulador de la condensació cromosòmica o RCC1 humà	16
Figura 2. Estructura del domini HECT de la proteïna E6AP humana unida a l'E2 UbCH7	30
Figura 3. Família de les E3 ubiquitina lligases de tipus HECT	31
Figura 4. Esquema del mecanisme enzimàtic del procés d'ubiquitinació de proteïnes	33
Figura 5. Classificació proteïnes de la família HERC en funció del seu tamany	39
Figura 6. Esquema de l'estructura en dominis de la proteïna HERC1	41
Figura 7. Illa xilena de Pasqua i estructura molecular de la Rapamicina	53
Figura 8. Esquema de l'estructura en dominis de la proteïna quinasa mTOR	54
Figura 9. Esquema de l'estructura en dominis de les quinases S6K1 i S6K2	57
Figura 10. Esquema en dominis de la proteïna 4EBP1	59
Figura 11. Paper de mTORC1 i dels seus substrats S6K1 i 4EBP1 en la traducció CAP dependent	60
Figura 12. Esquema del procés de formació dels autofagosomes i autofagolisosomes	61
Figura 13. Esquema dels sistemes ubiquitin like Atg12-Atg5 i Atg8(LC3)-PE	63
Figura 14. Esquema dels gens ribosomals humans i el dels seus transcrits primaris i secundaris	65
Figura 15. Via de senyalització de mTOR en la regulació de la transcripció mediada per l'ARN polimerasa I	67
Figura 16. La biogènesi de ribosomes	69
Figura 17. Principals substrats de l'Akt i la seva funció cel·lular	71
Figura 18. Esquema estructura en dominis de TSC1 i TSC2	74
Figura 19. Residus diana de TSC2 i TSC1 per a diferents proteïnes quinasa i integració de vies de transducció de senyal sobre el complex TSC	76
Figura 20. Esquema via d'activació de mTORC1 per nutrients i factors de creixement	81
Figura 21. Estructura molecular del TPA (o PMA)	86
Figura 22. Esquema de l'estructura de la proteïna RSK1 humana i dels seus llocs de fosforilació i comparativa del seu motiu hidrofòbic amb les regions equivalents de les proteïnes S6K1, MSK1 i 2, RSK 2,3 i 4	87
Figura 23. Via d'activació de les proteïnes RSK	89
Figura 24. Comparativa MSKs i RSKs	90
Figura 25. Vies d'activació de les proteïnes MSK 1 i 2 a través de les MAPKs Erk1/2 i p38	90
Figura 26. Esquema de la configuració bastó per efecte de la interacció de les proteïnes amb el detergent SDS i estructura molecular del detergent aniónic dodecil sulfat sòdic (SDS)	101
Figura 27. Reaccions de polimerització gels de poliacrilamida	102
Figura 28. Electròlisi de l'H ₂ O en els elèctrodes d'un aparell d'electroforesi	103
Figura 29. Estructura molecular del Blau Brillant de Coomassie R-250 i G-250	106
Figura 30. Esquema complex proteïna/anticòs primari/anticòs secundari en una membrana per a western blot	108
Figura 31. Mètode de l'àcid bicinonínic (BCA) per a la quantificació total de proteïna	111
Figura 32. Espectres d'absorció de mostres pures d'ADN plasmídic (80mg/ml), proteïna (3mg/ml) i d'una barreja 10:1 en pes de les dues anteriors	113
Figura 33. Estructura química de les polietilenimines	121
Figura 34. Estructura química general d'un lípid catiònic sintètic utilitzat per a transfecció i del lípid neutre L-dioleoil-fosfatidiletanolamina (DOPE)	122
Figura 35. Esquema del mecanisme de l'ARN d'interferència	126
Figura 36. Estructura molecular de l'inhibidor de la síntesi de proteïnes, cicloheximida	130
Figura 37. Reacció bioluminiscent de la luciferina catalitzada per l'enzim luciferasa	132
Figura 38. Esquema del gen reporter del promotor de l'ADN ribosomal, pHrd IRES Luc	132
Figura 39. Etapes de l'amplificació de la reacció en cadena de la polimerasa (PCR)	136
Figura 40. Esquema del mecanisme de les sondes Taqman per a PCR a temps real	137
Figura 41. Corbes d'amplificació del gen de la β -actina per a diferents quantitats inicials d'ADN motlle mitjançant PCR a temps real	137
Figura 42. Estructura química del glutatí (GSH)	142
Figura 43. Estructura química d'alguns fluoròfors emprats per a immunofluorescència	147
Figura 44. Esquema etapes immunoprecipitació i co-immunoprecipitació de proteïnes	150
Figura 45. Representació esquemàtica del procés de preparació d'un LAG gel i aplicació del gel LAG en la separació de proteïnes de vesícules amb coberta de clatrina purificades a partir de cervell	166
Figura 46. Esquema d'algunes proteïnes de fusió amb la GFP de la proteïna gegant HERC1 i aplicacions del gel LAG per a western blot i per a l'anàlisi d'experiments d'immunoprecipitació d'HERC1	167
Figura 47. Interacció HERC1-TSC2. Anàlisi per PAGE/SDS dels immunoprecipitats de TSC2 obtinguts a partir de llisats de cervell de ratolí. Co-immunoprecipitació de TSC2 endògena o sobreexpressada mitjançant els anticossos anti HERC1 i esquema de la zona d'HERC1 responsable de la interacció amb TSC2	171
Figura 48. Interacció HERC1 amb el complex TSC2/TSC1 endògen o sobreexpressat	173
Figura 49. Interacció d'HERC1 amb TSC2 o TSC2/TSC1 sobreexpressat	174
Figura 50. Interacció HERC1 amb mutants de TSC2	175

	Pàgina
Figura 51. Efecte de la silenciació d'HERC1 en el temps de vida mitja de TSC2	176
Figura 52. Efecte de l'activació o inhibició de mTOR en la interacció entre HERC1 i les proteïnes TSC2 i TSC1	178
Figura 53. Efecte de la silenciació d'HERC1 en la fosforilació de la treonina 389 de la p70 S6K i de la serina 473 i la treonina 308 de l'Akt en resposta a insulina i/o aminoàcids	180
Figura 54. Efecte de la silenciació d'HERC1 en la fosforilació de la treonines 421 i 424 de la p70 S6K i de les serines 235 i 236 de la proteïna ribosomal S6 en resposta a aminoàcids o insulina	181
Figura 55. Efecte de la silenciació d'HERC1 en la fosforilació de les treonines 37 i 46 del factor 4EBP1 en resposta a insulina i comparativa activació p70 S6K1 i 4EBP1 en resposta a aminoàcids o insulina	182
Figura 56. Esquema proteïnes de fusió GFP-HERC1 utilitzades per als experiments d'anàlisi de l'autofàgia	183
Figura 57. Estudi de la sobreexpressió de les proteïnes de fusió GFP-HERC1 per microscopia de fluorescència i del seu efecte en l'autofàgia per western blot	184
Figura 58. Efecte de la silenciació d'HERC1 en l'autofàgia	185
Figura 59. Efecte de la silenciació d'HERC1 en els nivells d'ARN ribosomal 18S	186
Figura 60. Efecte de la silenciació d'HERC1 en la transcripció de l'ADN ribosomal	187
Figura 61. Detecció de la p85 S6K "like" mitjançant l'anticòs anti P-T389 S6K1 en cèl·lules HEK-293 activades per aminoàcids	192
Figura 62. Detecció de la p85 S6K "like" mitjançant l'anticòs anti P-T389 S6K1 en cèl·lules HeLa, HEK-293 i MCF-7 estimulades amb aminoàcids	192
Figura 63. Detecció de la p85 S6K "like" en cèl·lules estimulades amb aminoàcids i/o insulina en presència de rapamicina o wortmannina	193
Figura 64. Time course d'estimulació amb aminoàcids i anàlisi per immunofluorescència i western blot mitjançant l'anticòs anti P-T389-S6K1	194
Figura 65. Isoformes p70 i p85 de la S6K1. Seqüència i estudi de la seva activació en resposta a aminoàcids o insulina	195
Figura 66. Activació S6K2 per aminoàcids o insulina	196
Figura 67. Efecte de la silenciació de mTOR i S6K en l'activació de la p85 S6K "like" en resposta a aminoàcids	197
Figura 68. Assaig quinasa in vitro de l'immunoprecipitat de mTOR sobre la proteïna HA-GST-S6K1 purificada	198
Figura 69. Activació de la p85 S6K1 en resposta a aminoàcids en cèl·lules HEK 293T	198
Figura 70. Estructura i dianes de fosforilació de les proteïnes S6K1 i RSK1 humanes, i comparació de seqüències de la regió que inclou la treonina 389/412 de la S6K1 amb les regions equivalents dels membres de les famílies RSK i MSK	199
Figura 71. Activació de la RSK1, d'una forma no activa de la RSK1 (RSK1-NA), i de la MSK 1 i 2 en resposta a aminoàcids	200
Figura 72. Estimulació amb aminoàcids de cèl·lules HeLa amb el gen de RSK1 o S6K1 silenciats	201
Figura 73. Assaig quinasa in vitro de l'immunoprecipitat de RSK1 sobre la proteïna GST-S6 purificada	202
Figura 74. Estimulació de cèl·lules HEK-293 amb aminoàcids o insulina en presència dels inhibidors U0126 o SB203580	203
Figura 75. Estimulació de cèl·lules HeLa amb aminoàcids en presència dels inhibidors rapamicina, wortmannina, U0126 o SB203580	204
Figura 76. Fosforilació de la treonina 421 i la serina 424 de la S6K1 en cèl·lules HEK-293 estimulades amb aminoàcids o insulina en presència dels inhibidors U0126 o SB203580	205
Figura 77. Fosforilació de la treonina 421 i la serina 424 de la S6K1 i de les serines 235 i 236 de la rpS6 en cèl·lules HeLa estimulades amb aminoàcids en presència dels inhibidors rapamicina, wortmannina, U0126 o SB203580	206
Figura 78. Comparativa estimulació de cèl·lules HeLa amb aminoàcids o PMA	207
Figura 79. Fosforilació de la treonina 421 i la serina 424 de la S6K1 i de les serines 235 i 236 de la rpS6 en cèl·lules HeLa amb la via de p38 activada constitutivament i estimulades amb aminoàcids en presència o absència de l'inhibidor SB203580	207
Figura 80. Tractament de cèl·lules HeLa amb els osmolits betaïna, àcid γ -amino-n-butíric (AIB), i els aminoàcids glutamina (Gln) i glicina (Gly)	208
Figura 81. Paper de les MAPKs, Erk i p38 en l'autofàgia	209
Figura A1. Purificació de una fracció crua de vesícules sinàptiques (membranes LP2) i de vesícules amb coberta de clatrina (CCV)	237
Figura A2. Caracterització vesícules amb coberta de clatrina (CCV) i fracció crua de vesícules sinàptiques (LP2) mitjançant western-blot	238
Figura A3. Experiments de recrutament de proteïnes de coberta sobre membranes LP2	240

Llistat Taules

	Pàgina
Taula 1. Característiques dels membres de la superfamília RCC1 organitzats en subgrups	18
Taula 2. Membres de la família de proteïnes <i>ubiquitin like</i> (Ubl)	32
Taula 3. Tipus de modificacions post-traduccionals per ubiquitina i funció implicada en cadascuna d'elles	38
Taula 4. Membres de la família de proteïnes HERC humanes	39
Taula 5. Components dels complexos mTORC1 i mTORC2 i funció de cadascun d'ells	55
Taula 6. Principals funcions regulades per mTORC1 i mTORC2 i les seves proteïnes efectores	56
Taula 7. Composició en ARN dels ribosomes de les cèl·lules procariotes i eucariotes	64
Taula 8. Propietats dels mutants de TSC2 R611Q i R905Q	77
Taula 9. Concentracions d'acrilamida recomanades per als gels de PAGE/SDS segons l'interval de pesos moleculars de les proteïnes a analitzar	103
Taula 10. Llistat dels principals inhibidors de proteases i fosfatases	105
Taules 11. Reactius i volums necessaris per a la preparació d'un gel concentrador al 3% d'acrilamida i un gel separador a diferents percentatges d'acrilamida per a PAGES/SDS	105
Taula 12. Reactius i volums necessaris per a la preparació d'un gel LAG	105
Taula 13. Llistat d'anticossos primaris utilitzats per a western blot	109
Taula 14. Intensitats i temps recomanats per a la transferència de gels LAG i gels petits per a western blot	110
Taula 15. Materials i reactius per a l'extracció d'ADN plasmídic a partir de cultius bacterians (minipreps i maxipreps)	114
Taula 16. Procediments per a l'extracció d'ADN plasmídic a partir de cultius bacterians (minipreps i maxipreps)	115
Taula 17. Materials i reactius per a la preparació de cèl·lules competents i per a la seva transformació	117
Taula 18. Composició del medi de cultiu cel·lular Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) High glucose (GIBCO)	119
Taula 19. Materials i reactius per a la transfecció amb PEI, fosfat càlcic i lípids catiónics	123
Taula 20. Composició solucions I i II per a la transfecció de cèl·lules mitjançant polietilenimina (PEI)	124
Taula 21. Llistat del oligonucleòtids per a siRNA utilitzats i la seva seqüència	128
Taula 22. Estructura química i enzim diana sobre el qual actuen els inhibidors rapamicina, wortmannina, U0126 i SB203580	129
Taula 23. Procediments per al tractament de cèl·lules HeLa, HEK293 i MCF-7 amb aminoàcids, osmòlits, insulina i PMA	131
Taula 24. Procediments per a la mesura de l'activitat luciferasa i β -Galactosidasa	133
Taula 25. Materials i reactius per a la realització de RT-PCR a temps real	138
Taula 26. Components i quantitats necessàries per a la reacció de retro-transcripció d'una mostra d'ARN total	139
Taula 27. Materials i reactius per als experiments de purificació de proteïnes de fusió a GST i per als assajos quinasa de les proteïnes RSK i mTOR	144
Taula 28. Afinitats relatives de les proteïnes A i G per regions Fc de diferents subclasses d'immunoglobulines, per a diferents espècies	149
Taula 29. Llistat anticossos usats per immunoprecipitació	151
Taula 30. Reactius i quantitats utilitzades per als assaigs d'acoblament de proteïnes de coberta en membranes LP2	157





11 | *Publicacions*

*“La vida és allò que et va succeïnt
mentre tu t’empenyes en
fer altres plans”*

*John Lennon
(1940-1980)*

Eduard Casas-Terradellas
Francesc R. Garcia-Gonzalo
Ouadah Hadjebi
Ramon Bartrons
Francesc Ventura
Jose Luis Rosa

Departament de Ciències
Fisiològiques II, IDIBELL,
Campus de Bellvitge,
Universitat de Barcelona,
L'Hospitalet de Llobregat,
Barcelona, Spain

Received March 10, 2006

Revised April 5, 2006

Accepted April 19, 2006

Short Communication

Simultaneous electrophoretic analysis of proteins of very high and low molecular weights using low-percentage acrylamide gel and a gradient SDS-PAGE gel

To be able to separate and analyze giant proteins and small proteins in the same electrophoretic gel, we have used a continuous SDS-PAGE gel formed by the combination of a low-percentage acrylamide gel and a gradient SDS-PAGE gel that we have named LAG gel. To get a good resolution for proteins of more than 200 kDa, we used an acrylamide/bisacrylamide ratio of 80:1 in the low-percentage acrylamide gel. To successfully resolve proteins in the 5–200 kDa range, we used a conventional 6–15% SDS-PAGE gradient gel with the standard acrylamide/bisacrylamide ratio of 40:1. We show that the LAG system can be successfully used in general applications of SDS-PAGE electrophoresis such as proteomics and immunoblotting techniques. Thus, using this continuous LAG gel, it is possible to simultaneously analyze giant proteins, such as HERC1 and dynein, big proteins like clathrin heavy chain and small proteins like ARF. The LAG system has a good resolution, low cost, and high reproducibility. Moreover, to simultaneously analyze all proteins saves time. All these characteristics, together with the use of a standard apparatus found in any biochemistry laboratory, make the LAG system an easy tool to use.

Keywords: Electrophoresis / Giant proteins / Gradient / HERC1 / SDS-PAGE

DOI 10.1002/elps.200600141

More than 40 years after its initial description [1], PAGE remains one of the most powerful tools for protein analysis. Several variants of PAGE exist that provide different types of information about the analyzed proteins (mass, charge, purity, etc.). Among these variants, the most common is probably the one using SDS and hence referred to as SDS-PAGE. This anionic detergent binds over the entire length of the heat-denatured proteins, thereby conferring a total charge on them which is proportional to their size (*i.e.*, a uniform mass/charge ratio). As a result, the migration distance of a protein when an electric current is applied through an SDS-PAGE gel is solely de-

pendent upon the protein's mass. This fact, together with a few additional refinements such as the use of reducing agents and a stacking gel, has made it possible to separate proteins according to their molecular weight with considerable resolution. If low costs and high reproducibility are added to the equation, then it is no wonder that SDS-PAGE has become a staple of protein biochemistry laboratories, as highlighted by the wealth of applications that make use of it: Western blot, proteomics, interaction studies, etc.

In order to separate proteins of high or low molecular weight by SDS-PAGE, polyacrylamide gels must be prepared containing either a low or a high percentage of acrylamide, respectively. To generate the gel, acrylamide is mixed with bisacrylamide to form the cross-linked polymer in the presence of ammonium peroxodisulfate and TEMED. The acrylamide/bisacrylamide ratio generally used is 40:1 [2]. If both large and small proteins have to be analyzed in the same experiment, a gradient of acrylamide concentration (high percentage at the bottom and a lower percentage at the top) can be used. In this case, a stacking gel is unnecessary since the continually

Correspondence: Dr. Jose Luis Rosa, Departament de Ciències Fisiològiques II, IDIBELL, Campus de Bellvitge, Universitat de Barcelona, E-08907, L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain
E-mail: joseluisrosa@ub.edu
Fax: +34-934024268

Abbreviations: **CCV**, clathrin-coated vesicles; **GFP**, green fluorescent protein; **HEK**, human embryonic kidney; **HERC1**, HECT (homologous to E6-associated protein carboxy-terminus) domain and **RCC1** (regulator of chromosome condensation) like domain; **LAG**, low-percentage acrylamide gel and a gradient SDS-PAGE gel

decreasing pore size performs the same function. However, such gradient gels usually fail to resolve the largest proteins in the sample, which are too big to even enter the gel. To analyze these giant proteins, it is necessary to prepare gels with an increased acrylamide/bisacrylamide ratio (80:1) as well as a lower acrylamide percentage (4–5%), as was reported previously [3]. Nevertheless, this approach has still some setbacks, such as excessive gel softness and stickiness, which makes it difficult to manipulate for staining or transferring to membranes. Furthermore, this approach renders it difficult to simultaneously analyze giant proteins and small proteins. With these problems and techniques in mind, an SDS-polyacrylamide gel was formed by the combination of a gra-

dient gel (6–15% with an acrylamide/bisacrylamide ratio of 40:1), which successfully resolved proteins in the 5–200 kDa range, and a low-percentage acrylamide gel (4% and an acrylamide/bisacrylamide ratio of 80:1), that has a very good resolution for giant proteins (> 200 kDa). To make the upper gel more tractable, both gels were polymerized and poured at the same time (*i.e.*, the upper gel was poured at the top of the gradient gel before allowing the latter to solidify). Thus, the final gel is a more consistent unit and can easily be manipulated by grabbing it by its bottom, denser region. In order to denominate this type of gel, we have chosen LAG gel from the combination of a low-percentage acrylamide gel and a gradient SDS-PAGE gel (LAG) (Fig. 1).

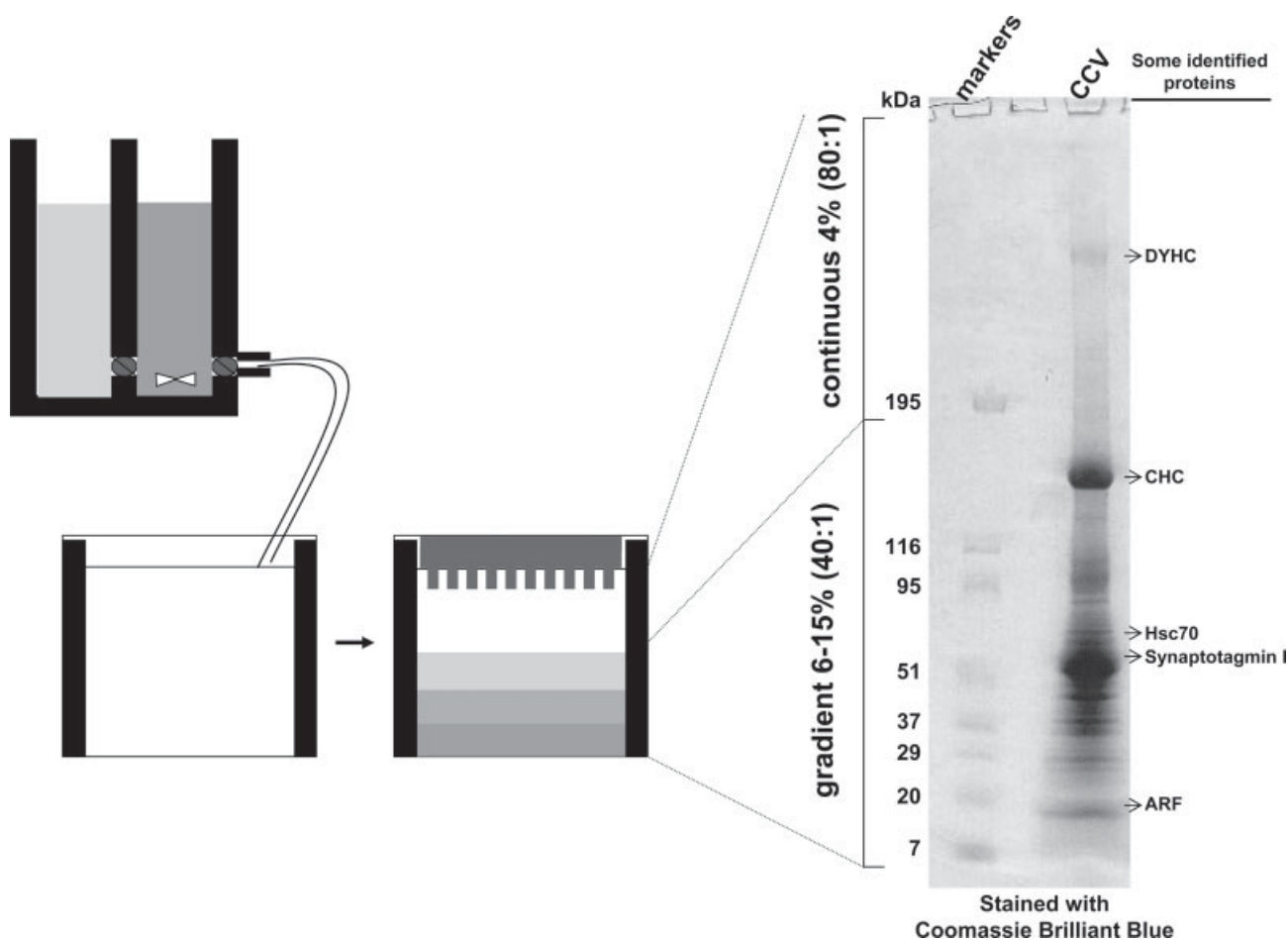


Figure 1. The LAG gel. (Left side) Schematic representation of how to make a gradient gel (6–15% with an acrylamide/bisacrylamide ratio of 40:1) combined with a continuous gel (4% with an acrylamide/bisacrylamide ratio of 80:1) between glass plates from a slab apparatus. The 6% (40:1) and 15% (40:1) acrylamide solutions are poured in each compartment of the gradient maker at the same time. Straight afterwards, a 4% (80:1) solution is added before letting the gradient gel solidify, as indicated previously. Note, the absence of a stacking gel, as in this preparation, and the decreasing pore size performs the same function. (Right side) Example of a LAG gel. Proteins from clathrin-coated vesicles (CCV) were separated using the LAG gel, and visualized by CBB staining and identified by MS and/or immunoblot with specific antibodies. Molecular weight standards (myosin: 195 kDa; β -galactosidase: 116 kDa; BSA: 95 kDa; ovalbumin: 51 kDa; carbonic anhydrase: 37 kDa; soybean trypsin inhibitor: 29 kDa; lysozyme: 20 kDa; aprotinin: 7 kDa) are also shown (BioRad laboratories, Hercules, CA, USA).

An example of the LAG gel is shown in Fig. 1. To test its resolution and its possible applications, purified clathrin-coated vesicles (CCV) were used [4] because they are formed by few proteins but with a very different range of molecular weights. A 100 µg of CCV resuspended in Laemmli buffer (50 mM Tris/HCl (pH 8.8), 2% w/v SDS, 100 mM DTT, 10% v/v glycerol, and 0.01% bromophenol

blue) [5] was loaded in a LAG gel, previously generated in glass plates (16 cm × 18 cm) from a standard slab apparatus [6]. Electrophoresis was run at 45 V for 16 h and at room temperature. Afterwards, the gel was stained with CBB, whereupon the protein standards showed the good resolution of this system (Fig. 1). In the CCV lane, the protein staining shows a wide molecular weight spec-

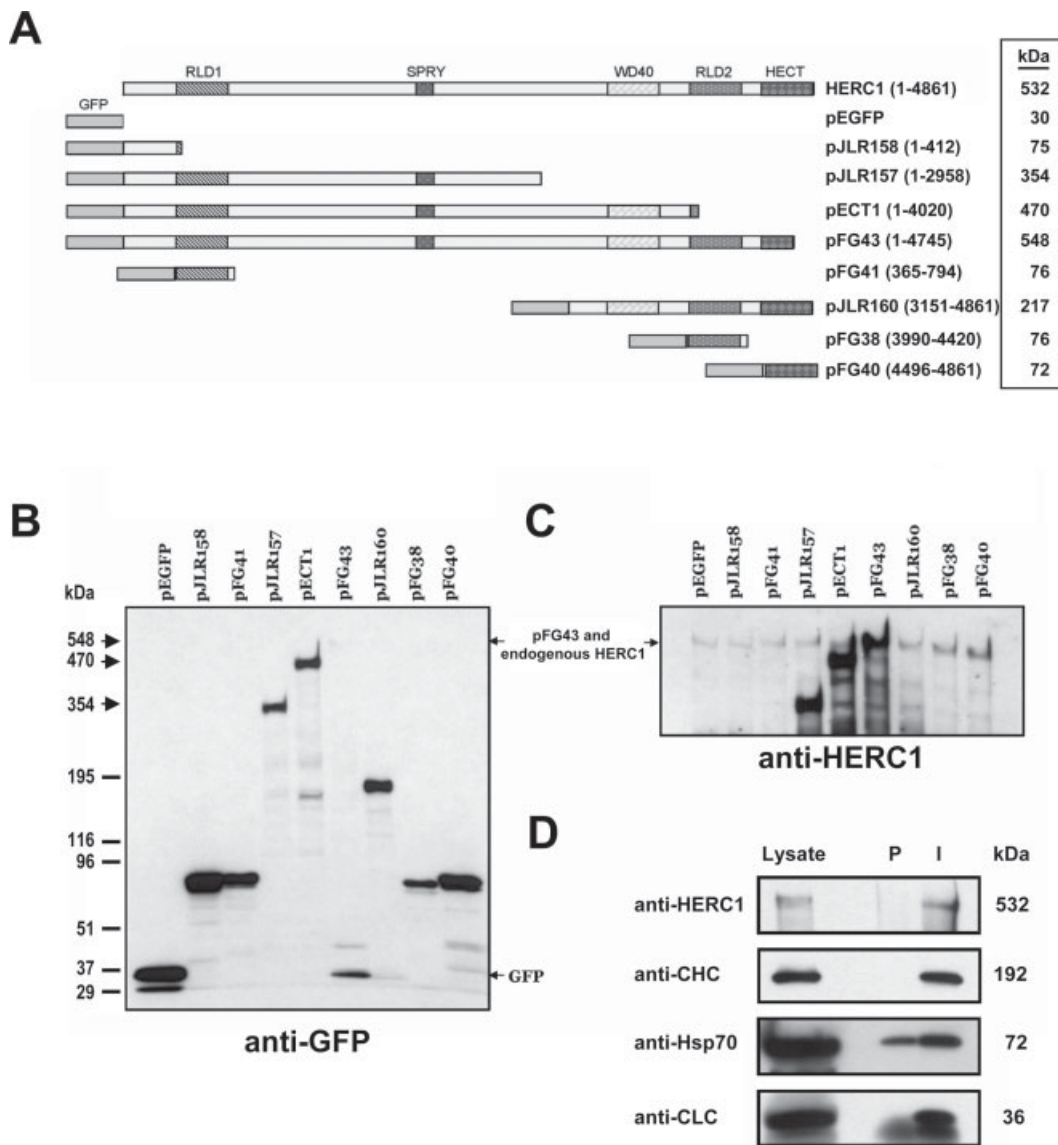


Figure 2. Some applications of the LAG system. (A) Schematic representation of several GFP-fusion proteins from the giant protein HERC1 and its domains [3]. The amino acids from the HERC1 sequence covered by each fusion protein are shown in brackets. Molecular weight of GFP-fusion proteins is indicated to the right. (B, C) Plasmids expressing the above GFP-fusion proteins were transfected in HEK-293 cells. Lysates were loaded in a LAG gel, transferred to a PVDF membrane, and analyzed by immunoblot with anti-GFP (Roche Diagnostics, Indianapolis, USA) (B) or with anti-HERC1 (C) antibodies [3]. Molecular weight of standards (29–195 kDa from BioRad) and higher GFP-fusion proteins (arrowheads) are indicated to the left. (D) Lysates from HEK-293 cells were immunoprecipitated with preimmune (P) or immune (I) antibodies against HERC1. HERC1 and HERC1-binding proteins were identified by immunoblot with specific antibodies.

trum. Further identification by proteomics confirmed the separation in the same gel of giant proteins as dynein heavy chain (DYHC, 527 kDa), big proteins as clathrin heavy chain (CHC, 192 kDa), medium proteins as the chaperone Hsc70 (72 kDa) or synaptotagmin I (65 kDa), and small proteins as ADP-ribosylation factor 1 (ARF1, 20 kDa). All of them have previously been reported to be present in CCV [7]. These results show the ability of the LAG gel to simultaneously separate in a 1-D electrophoresis, proteins of very high and low molecular weight, and an example of its application to proteomic analysis.

A frequent application of SDS-PAGE electrophoresis of proteins is the immunoblot analysis. This application was also checked with the LAG gel. It was observed that the simultaneous polymerization of both gels (low-percentage acrylamide gel and the gradient gel) led to an easier manipulation of the gel. For the transfer (Western blotting), a standard wet apparatus (BioRad) and protocol was used with an increased transfer time of 4 h with $I = 400$ mA. Under these conditions, commercial protein markers (7–200 kDa) were completely transferred. It is recommended to use PVDF membranes because NC membranes were found to stick too strongly to the upper region of the gel. Furthermore, it was observed that in order to get optimal and reproducible results in the immunoblot, the use of two PVDF membranes (one on each gel side) during the transfer is preferable. Otherwise a nonspecific strong background is seen in the high molecular weight region, probably due to contaminants in the transfer buffer, when the membrane is analyzed with antibodies. Following the above indications, proteins of all sizes can be simultaneously analyzed by immunoblot. As an example of its application and resolution, we have used several green fluorescent protein (GFP)-fusion proteins of a giant protein named HECT (homologous to E6-associated protein carboxy-terminus) domain and RCC1 (regulator of chromosome condensation) like domain (HERC1) (532 kDa) (Fig. 2A). Plasmids expressing the indicated fusion proteins were transfected in human embryonic kidney (HEK)-293 cells. Forty-eight hours later, cell lysates were analyzed in the LAG gel and transferred to a PVDF membrane as indicated above. GFP-fusion proteins were identified by incubation with anti-GFP mAb (Roche). As shown in Fig. 2B, all GFP-fusion proteins

were detected in the same membrane, exposing, as expected, a decrease in the expression level of the fusion proteins which was directly proportional to their increased size. Thus, smaller fusion proteins as pFG40 were detected more quickly than a giant protein as pFG43, which was clearly detectable with anti-HERC1 antibodies (Fig. 2C).

As another application example, immunoprecipitation of HERC1 protein using specific anti-HERC1 antibodies was performed in HEK-293 lysates. HERC1 and its associated proteins (CHC: clathrin heavy chain; Hsp 70; CLC: clathrin light chain) were separated in a LAG gel and transferred to a PVDF membrane. Proteins were detected using specific antibodies (Fig. 2D).

In summary, all these examples highlight the ability of the LAG system to simultaneously analyze proteins of very high and low molecular weight, with a high resolution and definition, extending the utility of SDS-PAGE gel electrophoresis.

We thank Francesc Canals for technical assistance in proteomic analysis. This work was funded by grants from Ministerio de Educación y Ciencia (BFU2004-06329/BMC), the European Union (Fondos Europeos de Desarrollo Regional (FEDER)), and Generalitat de Catalunya (2005SGR00022). E.C.T., F.R.G, and O.H. have been supported by doctoral fellowships from Fundació IDI-BELL, Fundación Ramón Areces, and International Graduate School of Catalunya (IGSOC), respectively.

References

- [1] Maizel, J. V. Jr., *TIBS* 2000, 25, 590–592.
- [2] Brent, R., Kingston, R. E., Seidman, J. G., Struhl, K. *et al.*, *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, New York 2005.
- [3] Rosa, J. L., Casaroli-Marano, R. P., Buckler, A. J., Vilaró, S., Barbacid, M., *EMBO J.* 1996, 15, 4262–4273.
- [4] Keen, J. H., Willingham, M. C., Pastan, I. H., *Cell* 1979, 16, 303–312.
- [5] Laemmli, U. K., *Nature* 1970, 227, 680–685.
- [6] Studier, F. W., *TIBS* 2000, 25, 588–590.
- [7] Blondeau, F., Ritter, B., Allaire, P. D., Wasiak, S. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2004, 101, 3833–3838.



ERK and p38 pathways regulate amino acid signalling

Eduard Casas-Terradellas¹, Irantzu Tato¹, Ramon Bartrons, Francesc Ventura, Jose Luis Rosa^{*}

Departament de Ciències Fisiològiques II, IDIBELL, Campus de Bellvitge, Universitat de Barcelona, E-08907, L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 1 February 2008
Received in revised form 1 August 2008
Accepted 14 August 2008
Available online 6 September 2008

Keywords:

Amino acid
ERK
MSK
p38
RSK
S6K1

ABSTRACT

The ribosomal protein S6 kinase 1 (S6K1) is emerging as a common downstream target of signalling by hormones and nutrients such as insulin and amino acids. Here, we have investigated how amino acids signal through the S6K1 pathway. First, we found that a commercial anti-phospho-Thr389-S6K1 antibody detects an 80–90 kDa protein that is rapidly phosphorylated in response to amino acids. Unexpectedly, this phosphorylation was insensitive to both mTOR and PI-3 kinase inhibitors, and knockdown experiments showed that this protein was not S6K1. Looking for candidate targets of this phosphorylation, we found that amino acids stimulated phosphorylation of RSK and MSK kinases at residues that are homologous to Thr389 in S6K1. In turn, these phosphorylations required the activity of either p38 or ERK MAP kinases, which could compensate for each other. Moreover, we show that these MAP kinases are also needed for the amino acid-induced phosphorylation of S6K1 at Thr421/Ser424, as well as for that of S6K1 substrate, the S6 ribosomal protein. Consistent with these results, concomitant inhibition of p38 and ERK pathways also antagonised the well-known effects of amino acids on the process of autophagy. Altogether, these findings demonstrate a previously unknown role for MAP kinases in amino acid signalling.

© 2008 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Cell growth is a fundamental biological process through which cells accumulate mass and increase in size. This process is modulated by the availability of nutrients. In eukaryotic cells, the Ser/Thr kinase mTOR controls cell size in response to nutrients. In metazoans, insulin/IGF (insulin-like growth factor) controls cell and organismal growth by modulating mTOR signalling. mTOR forms two distinct multiprotein complexes, mTORC1 and mTORC2, which can be distinguished by their sensitivity to the drug rapamycin. Rapamycin-sensitive mTORC1 regulates several pathways that collectively determine cell mass, whereas rapamycin-insensitive mTORC2 regulates cell shape via changes in the actin cytoskeleton [1,2].

The insulin pathway components leading to mTORC1 have been well established. Insulin binding to its receptor causes an increase in tyrosine phosphorylation of IRS1/2 (insulin receptor substrate 1/2). These phosphorylated residues in IRS1/2 serve in turn as docking sites for phosphoinositide 3-kinase (PI3K), whose binding leads to an increase in the plasma membrane levels of phosphatidylinositol-3,4,5-P₃ (PIP₃). As a result of increased PIP₃ levels, protein kinase B

(PKB/Akt) and phosphoinositide-dependent protein kinase 1 (PDK1) are also recruited to the plasma membrane. PDK1 can then activate PKB/Akt by phosphorylating it at T308. Activated PKB/Akt then phosphorylates and inactivates Tuberous Sclerosis Complex protein 2 (TSC2). Since TSC2 negatively regulates the small GTPase Rheb (Ras homolog enriched in brain), TSC2 inactivation by PKB/Akt leads to an accumulation of the active GTP-bound form of Rheb. This active form directly activates mTORC1 and induces the phosphorylation of its substrates: S6K1 and 4EBP-1 [2,3].

The importance of nutrients in mTOR signalling was evidenced by studies on autophagy. These initial studies showed that amino acids inhibited autophagy and activated S6K1 [4]. Furthermore, it was shown that S6K1 activation was dependent on mTOR activity [5]. Activation of S6K1 involves the phosphorylation of multiple Ser/Thr residues. Of these, Thr389 (T389) phosphorylation, which is mediated by mTORC1, appears to be a critical step in S6K1 activation [6–9]. Specific antibodies against this phosphorylated residue have been a valuable tool to analyse S6K1 activation. In fact, it was with these reagents that amino acid-induced S6K1 phosphorylation at T389 was initially described [10]. Although the signalling components that mediate mTOR activation in response to nutrients are still poorly defined, it seems that hVps34, a class 3 PI3K, and MAP4K3 are involved in mTOR activation by amino acids [3,10–12].

Critical cellular processes such as proliferation, migration and differentiation are regulated by extracellular signals including growth factors, stresses and cytokines. Intracellularly, cells need to integrate the extent and timing of these signals to trigger an appropriate biological response. Many of these signals act via specific

Abbreviations: mTOR, Mammalian target of rapamycin; S6K1, Ribosomal protein S6 kinase 1; RSK, 90 kDa ribosomal S6 kinase; MSK, Mitogen- and stress-activated protein kinase; ERK, Extracellular signal-regulated kinase; GSK3 β , Glycogen synthase kinase 3 β ; MAP, Mitogen-activated protein; MAPK, Mitogen-activated protein kinase; siRNAs, Small interfering RNAs

* Corresponding author. Fax: +34 934024268.

E-mail address: jose Luisrosa@ub.edu (J.L. Rosa).

¹ These authors contributed equally.

transmembrane receptors, triggering a plethora of intracellular biochemical events in which mitogen-activated protein kinases (MAPKs), such as ERK (extracellular signal-regulated kinase) or p38, often play very important roles. In addition to activating transcription factors, these kinases also phosphorylate and activate other groups of kinases, including the mitogen- and stress-activated kinases MSK1 and MSK2, and the p90 ribosomal S6 kinases RSK1, RSK2, RSK3 and RSK4. Several studies have shown that, while MSKs can be activated by both p38 and ERK, RSKs are exclusively activated by ERK. These kinases, through phosphorylation of a wide variety of substrates, regulate important cellular functions. RSKs control transcription, cell proliferation, cell survival, cytoskeletal rearrangements and glycogen metabolism. MSKs activate transcription factors, such as CREB and ATF1, and induce chromatin remodelling. In spite of the many cellular functions identified so far for both MSKs and RSKs, nothing has yet been published involving these kinases in amino acid signalling [13,14].

In the present study, we uncover new players and mechanisms involved in amino acid signalling. First of all, we found that the anti-P-T389-S6K1 antibody detects a previously unreported protein of approximately 85 kDa. In response to amino acids, this protein was rapidly phosphorylated and translocated from cytoplasm to nucleus. This phosphorylation was insensitive to both rapamycin and wortmannin. Experiments of siRNA showed that this protein was not S6K1. Instead, we found that amino acids stimulated phosphorylation of RSK and MSK at residues homologous to S6K1-T389. These phosphorylations required the activity of either p38 MAPK or, in its absence, the activity of ERK. Finally, we show that p38/ERK MAP kinases also regulated S6K1 phosphorylation at T421/S424 with a similar mechanism. Physiological implications of this signalling are shown and discussed.

2. Materials and methods

2.1. Reagents

The reagents used were insulin, wortmannin, rapamycin, betaine, γ -amino-*n*-butyric acid (AIB), glycine, Phalloidin-TRITC, horseradish peroxidase-coupled secondary antibodies, anti-Flag, anti-HA and anti-P-ERK1/2 antibodies (Sigma-Aldrich); amino acid solutions (MEM and MEM non-essential) (Gibco); L-glutamine solution (Biological Industries); TO-PRO3 (Molecular Probes); U0126 and SB 203580 (Calbiochem); PMA (Biomol); anti-P-S9-GSK3 β (Ab-1) antibody (Oncogene Research Products); anti-mTOR, anti-P-T389-S6K1 (1A5), anti-P-T421/S424-S6K1, anti-P-S380-RSK, anti-P-S376-MSK, anti-P-S235/236-S6, anti-S6 (54D2), anti-P-S133-CREB and anti-P-T180/Y182-p38 antibodies (Cell Signalling Technology); anti-TSC2 (C-20), anti-S6K1 (C-18) and anti-RSK1 (C-21) antibodies (Santa Cruz Biotechnology, Inc.); anti-HERC1 antibody [15], anti-LC3 antibody (MBL); enhanced chemiluminescence (ECL Plus) reagent, PVDF transfer membrane (GE Healthcare).

2.2. Cell culture and transfections

HeLa, HEK-293, HEK-293T and MCF-7 cells were cultured at 37 °C in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (Gibco) with 10% fetal bovine serum. Plasmids were transfected with Lipofectamine 2000 (Invitrogen) in HeLa cells and with polyethylenimine (PEI) in HEK-293 or HEK-293T cells. siRNA transfections were carried out in HeLa cells with Lipofectamine 2000. Cell treatments such as serum starvation, amino acid deprivation, insulin or amino acid stimulation were performed as previously reported [5,10,16]. Briefly, for experiments with 200 nM insulin (I), cells were deprived of serum overnight and then incubated with insulin for 30 min. For experiments with amino acids (II), after overnight serum deprivation cells were incubated for an additional 2 h with D-PBS (Dulbecco's phosphate-buffered saline

containing 1000 mg/l D-glucose and 36 mg/l sodium pyruvate, calcium and magnesium) (Gibco). Cells were then stimulated with amino acids (a mix of essential amino acids, non-essential amino acids and L-glutamine solutions from Gibco and Biological Industries to 1 \times stock final concentration) for 30 min. The concentration of each amino acid designated as 1 \times is as follows (in mg/l): L-Arg, 126; L-Cys, 24; L-His, 42; L-Ile, 52; L-Leu, 52; L-Lys, 73; L-Met, 15; L-Phe, 33; L-Thr, 48; L-Trp, 10; L-Tyr, 36; L-Val, 47; L-Ala, 9; L-Asn, 13; L-Asp, 13; L-Glu, 15; Gly, 7; L-Pro, 11; L-Ser, 10; L-Gln, 292. The specific inhibitors were added 30–60 min before the stimulation with amino acids or insulin at a final concentration of 20 nM rapamycin, 100 nM wortmannin, 5 μ M U0126 and 10 μ M SB 203580. PMA stimulation was performed as previously reported [30].

2.3. Plasmids and siRNAs

Flag-p70 and Flag-p85 S6K1; HA-GST-p85; Flag-MSK1; HA-MSK2, HA-S6K2, GST-S6; 3xFlag-RSK1, 3xFlag-RSK1-NA, 3xFlag-RSK2; and activated MKK6 were kindly provided by Dr. B. Law, Dr D.M. Sabatini, Dr. S. Arthur, Dr. J. Blenis, Dr. J.L. Maller and Dra. P. Muñoz-Canoves, respectively. siRNAs were designed for targeting the human coding sequence of S6K1 GGGGGCUAUGGAAAGUUUdTdT, mTOR CCCUGCCUUUGUCAUGCCUdTdT and RSK1 GCUAUACCGUCGUGAGAUCdTdT.

2.4. Cell lysate and immunoblotting

Previously treated cells were lysed in lysis buffer (10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 100 mM NaCl, 1% Nonidet P40, 50 mM NaF, 1 mM sodium vanadate, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 5 μ g/ml leupeptin, 5 μ g/ml aprotinin, 1 μ g/ml pepstatin A, 20 mM β -glycerophosphate, 100 μ g/ml benzamide) for 1 h at 4 °C. Equal amounts of proteins (100–200 μ g/lane) were separated by electrophoresis. To analyse simultaneously in the same SDS/PAGE gel giant proteins as HERC1 or mTOR and small proteins as LC3, we used a combination of SDS/PAGE gels named LAG gel [17]. After running overnight the gel, the proteins were transferred to PVDF membranes and visualised by immunoblotting as described previously [17]. Band intensities were analysed with a gel documentation system (LAS-3000 Fujifilm). The protein levels were normalised with respect to mTOR or TSC2 levels and expressed as percentage of controls.

2.5. Immunoprecipitations and kinase assay

Lysates from HEK-293T or HEK-293 cells were immunoprecipitated with anti-mTOR or anti-RSK1 antibodies, respectively. Washed immunoprecipitates were used for *in vitro* kinase assay using purified HA-GST-p85 or GST-S6 as substrate, respectively. For mTOR kinase assay: lysis, immunoprecipitation, kinase assay and HA-GST-p85 purification were performed as described [18]. For RSK kinase assay: lysis and immunoprecipitation were performed as described [18], and kinase assay as described [30] using GST-S6 as substrate and anti-P-S235/236-S6 antibodies to detect the incorporation of phosphate. Band intensities were quantified with a gel documentation system (LAS-3000 Fujifilm) and results are expressed as mean \pm SEM from the control.

2.6. Confocal microscopy

HeLa cells were processed for immunofluorescence analysis as previously described [19] using anti-P-T389-S6K1 antibody (1:60), Phalloidin-Texas red isothiocyanate (TRITC) (at 0.04 μ g/ml) and TO-PRO3 (at 0.3 μ M).

2.7. Statistical analysis

Results are expressed as mean \pm SEM. Data for multiple variable comparisons were analysed by one-way analysis of variance (ANOVA).

For comparison of significance, Dunn's test was used as a post hoc test according to the statistical program GraphPad Prism.

3. Results

3.1. Anti-P-T389-S6K1 antibody detects a p85 S6K1-like protein that is phosphorylated in response to amino acids in a rapamycin- and wortmannin-independent manner

Previous reports suggest that amino acids mediate S6K1 activation by inducing mTOR-mediated T389-S6K1 phosphorylation [5,8,10]. To confirm this point, we analysed by Western blot the activation of

endogenous S6K1 by amino acids using a commercial monoclonal anti-P-T389-S6K1 antibody (1A5, Cell Signaling Technology). As a model, we used HEK-293 and HeLa cells, because both cell lines have extensively been used to analyse this signalling pathway. Before being stimulated with amino acids, cells were first deprived of serum overnight, followed by an incubation in medium without amino acids [5,10,16]. As a positive control of S6K1 activation, cells deprived of serum were stimulated with insulin. As shown in Fig. 1A, phosphorylation of endogenous S6K1 isoforms, p70 and p85, was detected by Western blot with anti-P-T389 antibody after 30 min of treatment with insulin in HeLa cells. Unexpectedly, after 30 min of treatment with amino acids, we detected an increase in a band with similar

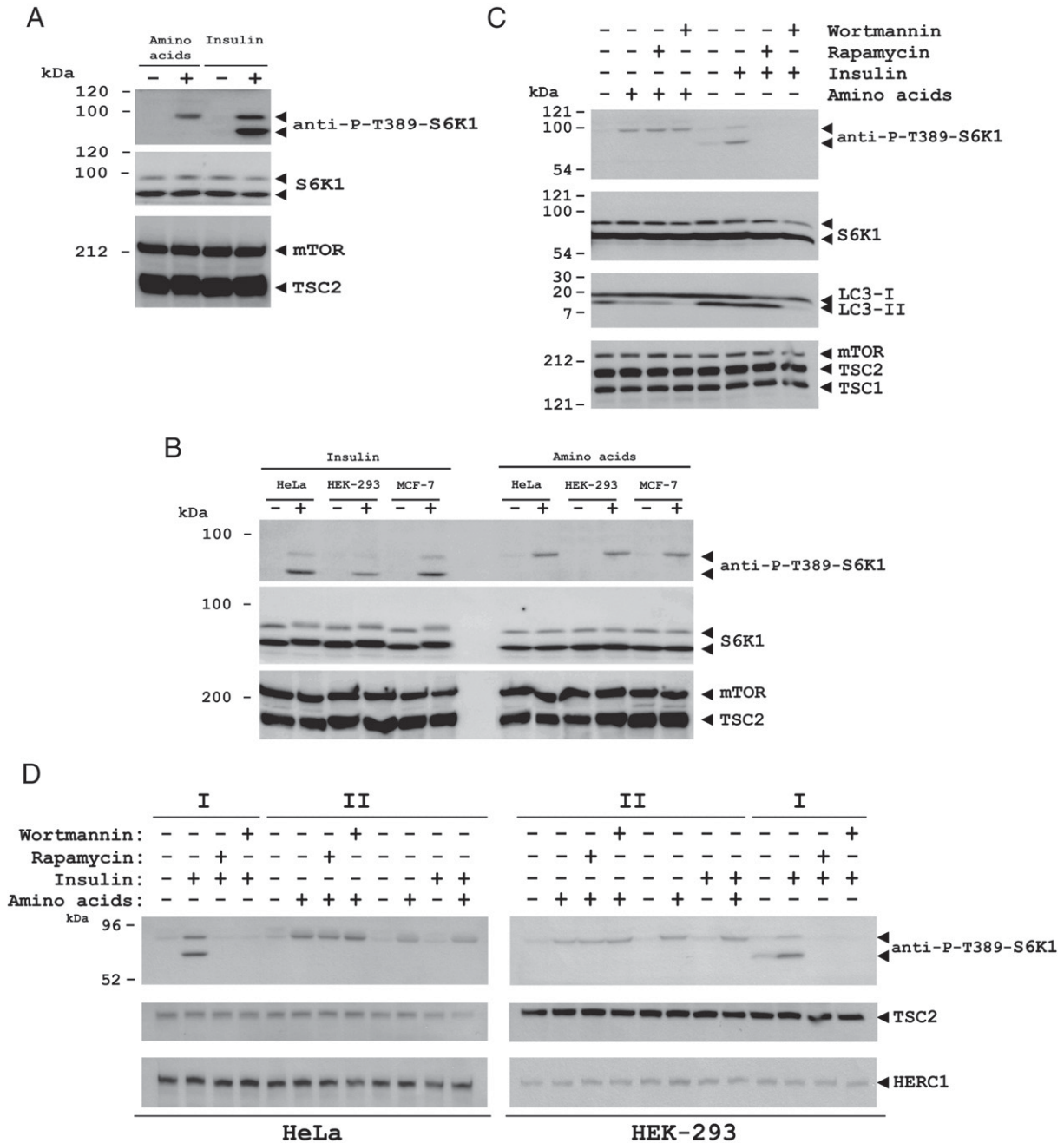


Fig. 1. Anti-P-T389-S6K1 antibody detects a p85 S6K1-like protein other than p70 S6K1 which is phosphorylated in response to amino acids. HeLa (A, B, D), MCF-7 (B) or HEK-293 (B–D) cells were deprived of serum overnight and stimulated with 200 nM insulin for 30 min (I) or, after serum deprivation, they were deprived for 2 h of amino acids, followed by stimulation with amino acids 1× for up to 30 min (II). Cell lysates were analysed by Western blot analysis with the indicated antibodies. (C, D) Cells were incubated with 100 nM wortmannin or 20 nM rapamycin for 30 min before insulin or amino acid stimulation. Molecular weight markers are indicated on the left. These data are representative of three independent experiments.

mobility to that of the S6K1 p85 isoform, but we found no increase in p70 phosphorylation. Sometimes, another band, less intense and with a slower mobility than the p85-like band, was also detected after longer exposure (not shown). Although these signals were clearly detected (see also next figures), they were not strong probably because we are detecting endogenous levels of these phosphorylated proteins. These treatments did not modify endogenous levels of other proteins involved in the mTOR signalling pathway, such as S6K1, mTOR, TSC2, TSC1 or HERC1 (Fig. 1A and data not shown) [1–3,20]. These results were also observed in other cell lines such as HEK-293 or MCF-7 (Fig. 1B). In order to confirm these results, we repeated these experiments in the presence of known inhibitors of S6K1 activation in HEK-293 cells (Fig. 1C). These experiments confirmed the specific activation of this endogenous p85-like isoform of S6K1 by amino acids and that this activation is independent of rapamycin and wortmannin, known inhibitors of mTOR and PI3K and mTOR kinases, respectively [41]. To show the functionality of these inhibitors, in parallel experiments, cell stimulation by insulin confirmed the previously reported inhibition of S6K1 phosphorylation (p70 and p85 isoforms) by wortmannin and rapamycin [1–3] (Fig. 1C). Similar results were also obtained in HeLa cells (Fig. 1D). In Fig. 1D, “II” indicates experiments with cells previously depleted of both serum and amino acids, whereas “I” indicates cells previously depleted of serum but not of amino acids. Under these conditions, the simultaneous stimulation with amino acids and insulin did not increase the phosphorylation of endogenous p85-like protein indicating that this phosphorylation is independent of the presence of insulin (Fig. 1D, experiments II).

As a control of amino acid action, we analysed the protein levels of autophagy marker LC3-II [21]. The presence of amino acids but not insulin inhibited the autophagy previously induced by cell starvation (Fig. 1C). In these conditions, autophagy inhibition was independent of rapamycin.

3.2. Time-course of amino acid-induced phosphorylation and nuclear translocation of the p85 S6K1-like protein

Next, we analysed the timing of p85-like protein phosphorylation in response to amino acids. We did this using both Western blot and immunofluorescence microscopy with the anti-P-T389-S6K1 antibody. These experiments indicated that the p85-like protein is phosphorylated very rapidly (1–5 min) after amino acid treatment (Fig. 2). Moreover, p85-like protein phosphorylation in the cytosol was followed by its translocation to the nucleus, which was clearly detected after 15 min (Fig. 2B). This effect was transient, since incubation with complete medium significantly restored the original subcellular distribution (Fig. 2B).

3.3. Amino acid signalling is not mediated by endogenous S6K1 phosphorylation at T389

S6K1 (*RPS6KB1*) gene encodes a transcript with two alternative translation starts resulting in the generation of p85 ($\alpha 1$) and p70 ($\alpha 2$) isoforms. p70 is identical to p85 in its amino acid sequence except for the fact that it lacks the N-terminal 23 amino acids, which contain a nuclear localisation signal (Fig. 3A). Thus, p85 has been described to localise in the nucleus while p70 appears predominantly in the cytoplasm [22,23]. With this in mind, the above data seem to indicate that the p85 isoform of S6K1 was phosphorylated by the presence of amino acids. To confirm this hypothesis, we transfected HEK-293 cells with S6K1 isoforms labelled with the Flag-epitope [24]. Treatment with insulin confirmed the functionality of the Flag-p70 and Flag-p85 constructs (Fig. 3B). Treatment with amino acids did not induce the phosphorylation of either Flag-p85 or Flag-p70, but it still phosphorylated the endogenous p85-like protein (Fig. 3B). A second S6 kinase gene exists, S6K2 (*RPS6KB2*), which is known to

be highly similar to the S6K1 gene [3]. We have also analysed the putative regulation by amino acids of the S6K2 protein using transfected cells with HA-S6K2 [36]. Similar to S6K1, treatment with amino acids did not induce the phosphorylation of HA-S6K2 (Fig. 3C). The functionality of the HA-S6K2 construct was confirmed by its phosphorylation after treatment with insulin (Fig. 3C). These results suggested that the phosphorylated band detected with anti-P-T389-S6K1 antibody after treatment with amino acids is not S6K1 or S6K2 proteins. To confirm this point, HeLa cells were transfected with small interfering RNAs (siRNAs) targeting S6K1 or mTOR, as well as with control siRNA. The siRNA treatment resulted in a >95% knockdown of S6K1 or mTOR expression (Fig. 3D). In these cells, treatment with amino acids still induced the phosphorylation of the p85-like protein detected by the anti-P-T389-S6K1 antibody, in a manner independent of S6K1 or mTOR expression (Fig. 3D). As control, knockdown of the autophagy inhibitor mTOR produced an increment in LC3 levels (Fig. 3D), as expected [2]. Altogether, these results show that, under these conditions, amino acids did not stimulate detectable phosphorylation of endogenous S6K1 at T389 and that the anti-P-T389-S6K1 antibody is probably detecting another related protein.

These findings differ from previous reports describing the T389 phosphorylation of S6K1 by amino acids [8,10,12]. Although we must keep in mind the different experimental conditions used in some experiments, the cross-reaction of the anti-P-T389-S6K1 antibody could explain some of these differences. Some of these reports also used an *in vitro* kinase assay and purified HA-GST-S6K1 protein as substrate to show the mTOR activation [8,12]. To clarify this point, we used a similar *in vitro* kinase assay to examine if mTOR was activated by amino acids under these conditions. As shown in Fig. 3D, mTOR immunoprecipitated from amino acid-starved cells phosphorylated the purified substrate HA-GST-S6K1 at T389. This phosphorylation was increased when the substrate was incubated with mTOR immunoprecipitated from cells stimulated with amino acids. As negative control, the kinase assay with mTOR immunoprecipitated from cells stimulated was performed in the absence of ATP. These findings confirmed previous reports [8,12]. In order to reconcile all these results, a possible explanation is that incubation with amino acids activates the kinase activity of mTOR, as demonstrated by the *in vitro* assays with high levels of substrate (Fig. 3E, slight but significantly activation of mTOR: 1.67 ± 0.26 fold), but *in vivo* this is not enough to phosphorylate endogenous S6K1 at T389 (Figs. 1–3). In agreement with this, we did not observe amino acid-induced phosphorylation at Thr37/46 of endogenous 4EBP1 protein, another mTOR substrate (data not shown), confirming previous results [16]. With this rationale, one would think that, if S6K1 could be overexpressed to higher levels, then maybe a fraction of this protein would become an *in vivo* substrate of mTOR. To check this, we used HEK-293T cells in place of HEK-293 or HeLa cells because HEK-293T cells contain the SV40 T antigen that allows for amplification of transfected plasmids containing the SV40 origin of replication. Using these cells, a small fraction of overexpressed Flag-p85 S6K1 was phosphorylated at T389 after treatment with amino acids (Fig. 3F). Moreover, SV40 transformation activates PI3K and Akt kinases [37,38]. Thus, S6K1 overexpression and/or PI3K/Akt activation could also explain some previous reports of mTOR activation by amino acids and their discrepancy with these results.

3.4. Phosphorylation of RSK and MSK is involved in amino acid signalling

The fact that amino acid signalling was not mediated by S6K1/S6K2 phosphorylation at T389 led us to focus upon other candidates. To do this, we took the sequence surrounding S6K1 T389 residue and looked for other proteins with similar sequences which could be candidates to be detected by the anti-P-T389-S6K1 antibody. Members of the AGC family of serine/threonine protein kinases

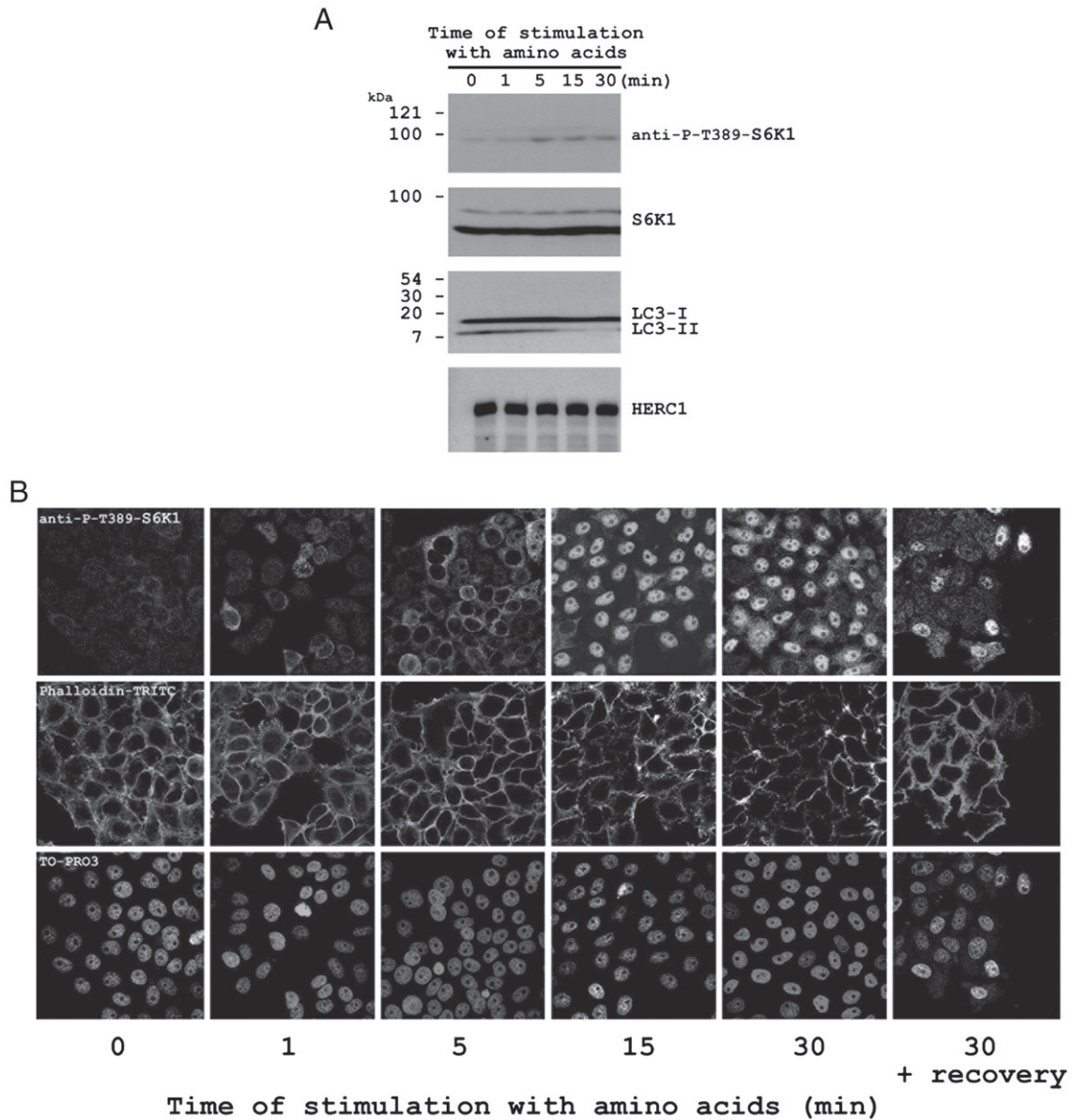


Fig. 2. Time-course of stimulation with amino acids. HEK-293 (A) or HeLa (B) cells were deprived of serum and amino acids, and then stimulated with amino acids as described in Fig. 1 at different times. (A) Cell lysates were analysed by Western blot analysis with the indicated antibodies. Molecular weight markers are indicated on the left. (B) Staining with anti-P-T389-S6K1 antibody, Phalloidin-TRITC (F-actin staining) and TO-PRO3 (nuclear staining) was carried out as indicated in Materials and methods. For recovery, after 30 min, cells were washed and incubated with complete medium for 1 h.

such as the RSK and MSK families present a high degree of homology with this region (Fig. 4A). Moreover, these proteins have an electrophoretic mobility similar to p85 and their regulation occurs independently of mTOR. In particular, a serine residue within the hydrophobic motif of the RSK and MSK family members could be the target of the anti-P-T389-S6K1 antibody [13]. To check this hypothesis, we transfected HEK-293 cells with a member of each of these families tagged with Flag-epitopes. As shown in Fig. 4B, C, phosphorylation of Flag-RSK1 or Flag-MSK1 was detected with anti-P-T389-S6K1 antibody after stimulation with amino acids. To show that this phosphorylation occurs at the serine of its hydrophobic motif, we also transfected a non active (NA) mutant form of RSK1 obtained by replacing S380 by lysine [25]. As shown in Fig. 4B, this mutant was not detected by anti-P-T389-S6K1 antibody, indicating that phosphorylation of RSK1 at S380 is necessary for its detection using this antibody. These results are not exclusive for RSK1 or MSK1 because other members of these families, such as RSK2 or MSK2,

were also detected phosphorylated after stimulation with amino acids (Fig. 4C and data not shown). To confirm that these proteins are involved in amino acid signalling, we performed siRNA experiments. Knockdown of RSK1 clearly inhibited the amino acid-induced phosphorylation detected with the anti-P-T389-S6K1 antibody (Fig. 4D). As a positive control, RSK1 knockdown also led to a decrease in the phosphorylation of glycogen synthase kinase 3 β (GSK3 β), a known RSK substrate [13] (Fig. 4D). In parallel experiments, knockdown of S6K1 did not affect any of these phosphorylations (Fig. 4D). Although a complete elimination of the phosphorylation detected with the anti-P-T389-S6K1 antibody would probably require the simultaneous knockdown of all RSK (RSK1–4) and/or MSK (MSK1–2) expressed in these cells, the observed reductions in amino acid-induced phosphorylations as a result of RSK1 knockdown strongly suggest that RSK1 is a major target of amino acid signalling (Fig. 4D). Interestingly, it has been demonstrated that whereas MSK is restricted to the nucleus, RSK is abundant in the cytoplasm and,

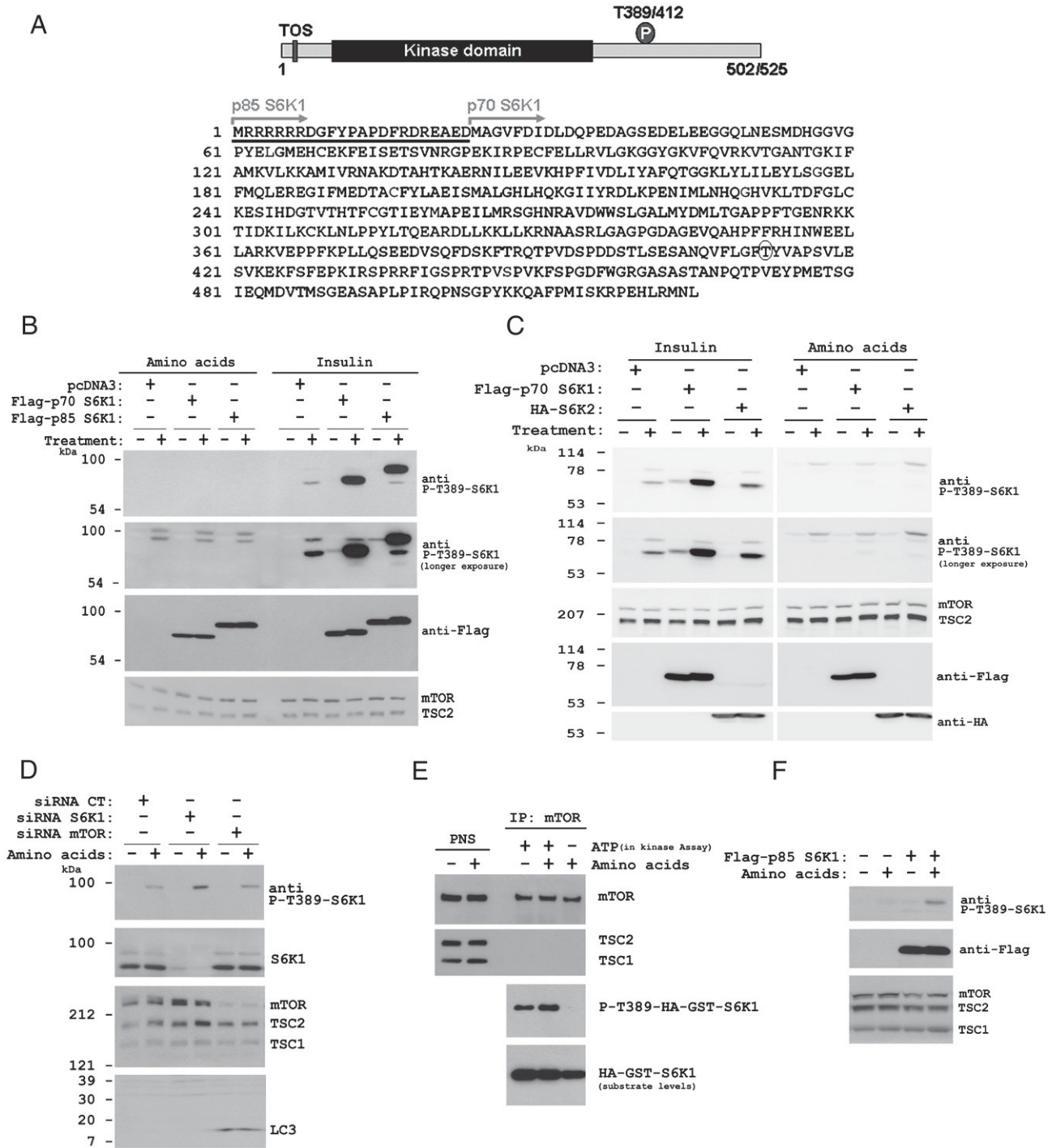
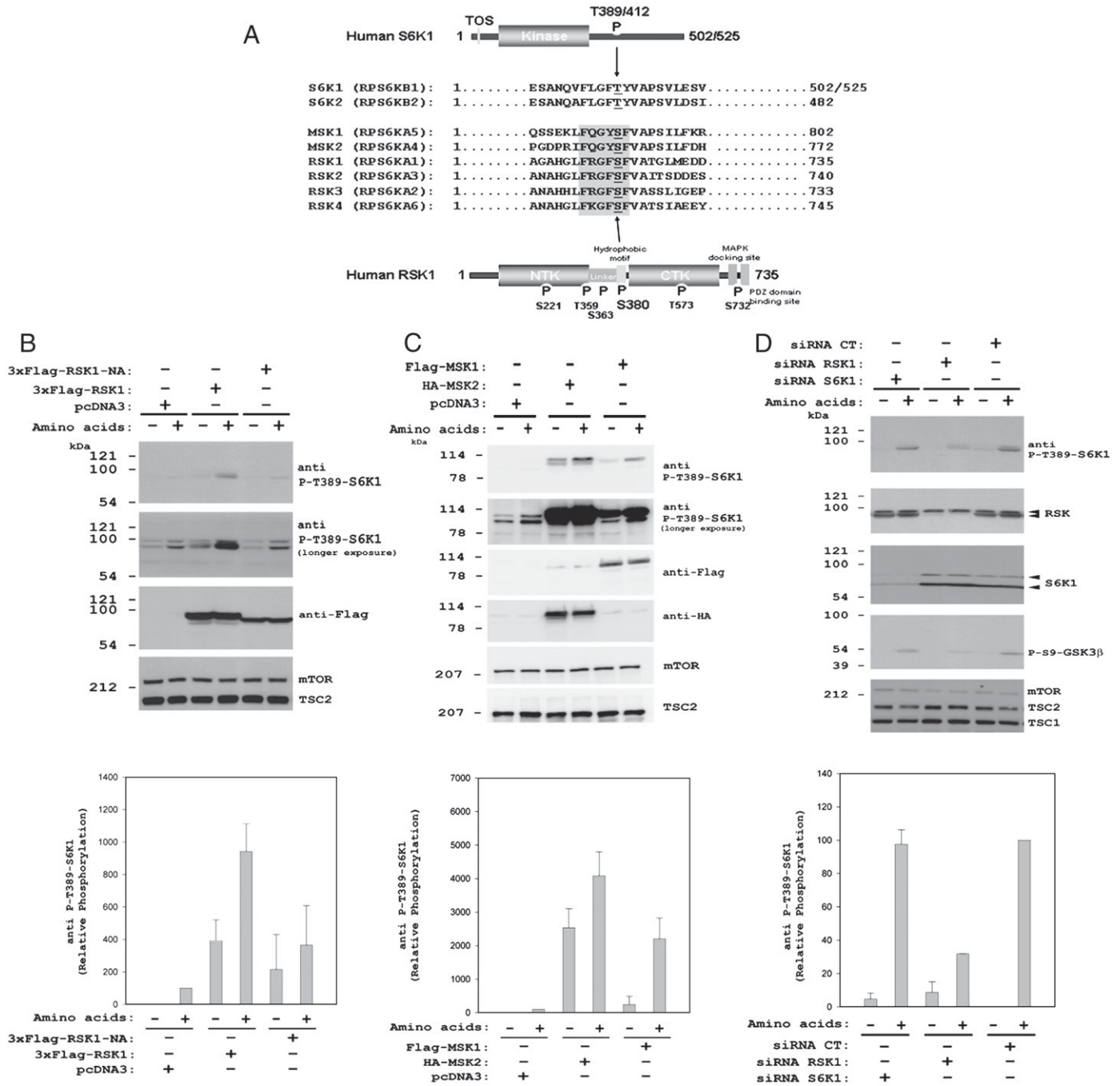


Fig. 3. Amino acid signalling is not mediated by S6K1 phosphorylation at T389. (A) Structure and sequence of human S6K1 protein. Two alternative translation starts result in the generation of p85 and p70 isoforms. p70 lacks the N-terminal 23 amino acids (underlined), which contain a nuclear localisation signal. The threonine recognised by the antibody (T389 in p70 or T412 in p85) is indicated and circled. (B) HEK-293 cells were transfected 24 h before serum deprivation with Flag-p70 S6K1 or Flag-p85 S6K1. (C) HeLa cells were transfected 24 h before serum deprivation with HA-S6K2 or Flag-p70. (D) HeLa cells were transfected with the indicated siRNAs 48 h before serum deprivation. Amino acid deprivation, stimulation and Western blot analysis in B–D were similar to what has been described in Fig. 1. (E) *In vitro* kinase assay using mTOR immunoprecipitates (IP) as source of mTOR-containing complexes and HA-GST-S6K1 as substrate. Lysates from HEK-293T cells deprived of serum and amino acids and then stimulated or not with amino acids for 30 min (PNS) were immunoprecipitated with anti-mTOR antibodies. Immunocomplexes were resuspended in kinase buffer and incubated with purified HA-GST-S6K1 in the presence or absence of ATP during 30 min at 37 °C. Reactions were stopped in ice with SDS/PAGE buffer and analysed by immunoblotting for phosphorylation on T389 using the anti-P-T389-S6K1 antibody and for substrate levels using an anti-HA antibody. Levels of TSC1 and TSC2 proteins were used as control of lysates. HA-GST-S6K1 substrate was previously expressed in and purified from HEK-293T cells. We have quantified this kinase activity from three independent experiments observing a significant activation of mTOR in the presence of amino acids (1.67 ± 0.26 fold of activation). (F) Overexpression of S6K1 in HEK-293T. Cells were transfected 24 h before serum deprivation with Flag-p85 S6K1. Amino acid deprivation, stimulation and Western blot analysis were as described in Fig. 1. These data are representative of at least three independent experiments.

upon stimulation, a fraction translocate to the nucleus [13]. These data and our findings suggest that the translocating protein observed in the confocal immunostaining analysis (Fig. 2B) is RSK.

Collectively, the above results point to the fact that phosphorylation of RSK and MSK proteins mediates signalling by amino acids. However, one could still argue that all these results have been found



using only the anti-P-T389-S6K1 antibody. In order to resolve this point, we have used commercial phospho-specific antibodies against the equivalent residues to S6K1-T389: S380 (for RSK) and S376 (for MSK). In Fig. 5A, it is shown how these antibodies detected the phosphorylation of endogenous RSK and MSK proteins after stimulation with amino acids (lane 6). As expected, insulin did not stimulate these phosphorylations (lane 4), in agreement with previous publications [2,3]. In this context, *in vitro* kinase assays using GST-S6 fusion protein as substrate confirmed the activation of endogenous RSK by amino acids (Fig. 6).

3.5. ERK and p38 pathways regulate amino acid signalling

RSK proteins have been described to be activated by MAP kinases of the extracellular signal-regulated kinase (ERK) family in response to different stimuli such as growth factors, hormones or neurotransmitters [13]. MSK proteins have also been described to be activated by ERK in response to such stimuli, as well as by the p38 MAP kinase family in response to several cellular stress stimuli and proinflammatory factors [13]. To analyse these regulatory MAP kinases, specific antibodies against their phosphorylated forms are

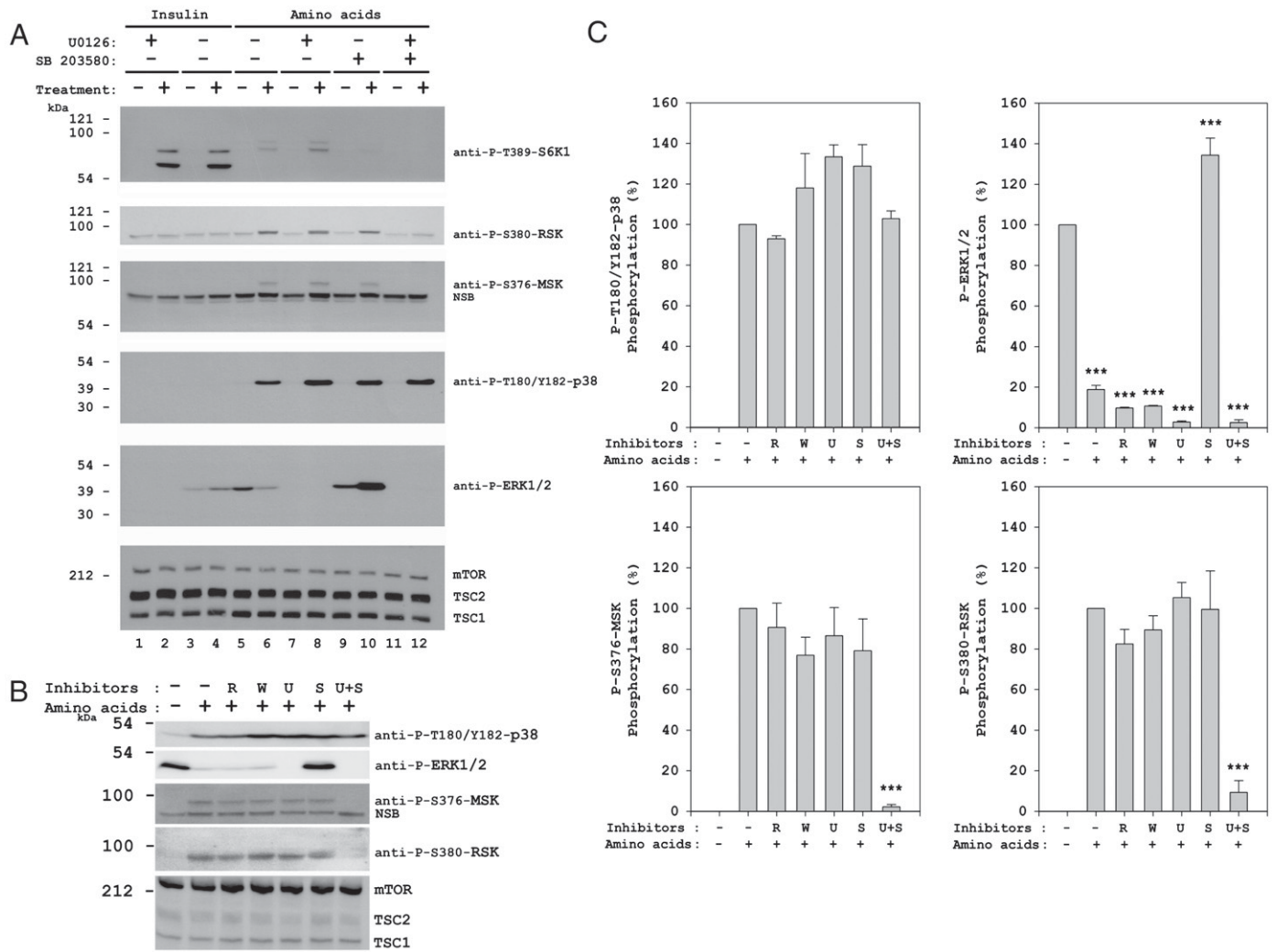


Fig. 5. ERK and p38 pathways mediate the amino acid-induced phosphorylation of RSK and MSK. HEK-293 (A) or HeLa (B) cells were deprived of serum and amino acids. Stimulation and Western blot analysis were carried out as described in Fig. 1. Where indicated, cells were incubated with 5 μ M U0126 (U), 10 μ M SB 203580 (S), 100 nM wortmannin (W) or 20 nM rapamycin (R) for 60 min before insulin or amino acid stimulation. NSB: nonspecific band recognised by the antibody. (C) Histograms from experiments in B ($n=3$). All bands were normalised with respect to mTOR levels. Data represent the ratio of P-T180/Y182-p38, P-ERK1/2, P-S376-MSK and P-S380-RSK, and are expressed as the mean \pm SEM of percentage of respective control. Statistical analysis was carried out as indicated in Materials and methods. *** $p < 0.001$.

frequently used as indicators of their activation. We have used these antibodies to analyse their putative activation during amino acid signalling. As it is shown in Fig. 5A (lanes 5–6), p38 was phosphorylated upon stimulation with amino acids. Interestingly, ERK proteins were phosphorylated in the starved state (Fig. 5A, lane 5) previous to amino acid stimulation, while amino acid treatment decreased this phosphorylation (Fig. 5A, lane 6). Because there is no phosphorylation of RSK or MSK in the starved state, these results seem to rule out the possibility that ERK are responsible for the amino acid-induced phosphorylation of RSK and MSK. On the other hand, the observed activation of p38 by amino acids points to this protein as a good candidate to mediate RSK and MSK phosphorylation. The specificity of these phosphorylations was checked by stimulation with insulin. As expected, only ERK proteins were phosphorylated (Fig. 5A, lane 4). To elucidate the roles of these kinases, we have used specific inhibitors of their respective pathways: U0126, an inhibitor of ERK phosphorylation, and SB 203580, which blocks p38 activity. Interestingly, only when both inhibitors were simultaneously used were RSK and MSK phosphorylation completely inhibited (Fig. 5A, lane 12). This suggests a compensatory mechanism whereby ERK would mediate RSK and MSK phosphorylation when p38 is inactive, while p38 would assume this role in

the absence of a functional ERK. It has been previously reported that p38 signalling exerts an inhibitory effect on ERK signalling [40]. This could also explain why ERK phosphorylation is stimulated by amino acids in the presence of SB 203580 (Fig. 5A, lane 10). Under these conditions, the presence of rapamycin or wortmannin did not significantly affect to the phosphorylations of ERK, p38, RSK or MSK proteins (Fig. 5B, C).

To determine the significance of these MAP kinases and their downstream targets in the amino acid signalling, we have compared the phosphorylation of these kinases in cells treated with a strong inducer of the ERK signalling. Stimulation of cells with the phorbol ester PMA, which stimulates Ras/ERK but not PI3K/Akt signalling, resulted in an induction of ERK, p38, RSK and MSK activation, and the phosphorylation of S6 (at S235/S236), CREB (at S133) and GSK3 β (at Ser 9) known substrates of S6K/RSK, MSK and RSK, respectively (Fig. 7). Interestingly, ERK phosphorylation was observed only with PMA addition (with amino acids there is an inhibition of its previous phosphorylation by amino acid deprivation. See also Fig. 5). Thus, these data indicate a substantial signalling by amino acids and, although the upstream mechanism seems to be different, there is a convergence of the signalling in RSK and MSK proteins upon stimulation of cells by PMA or amino acids.

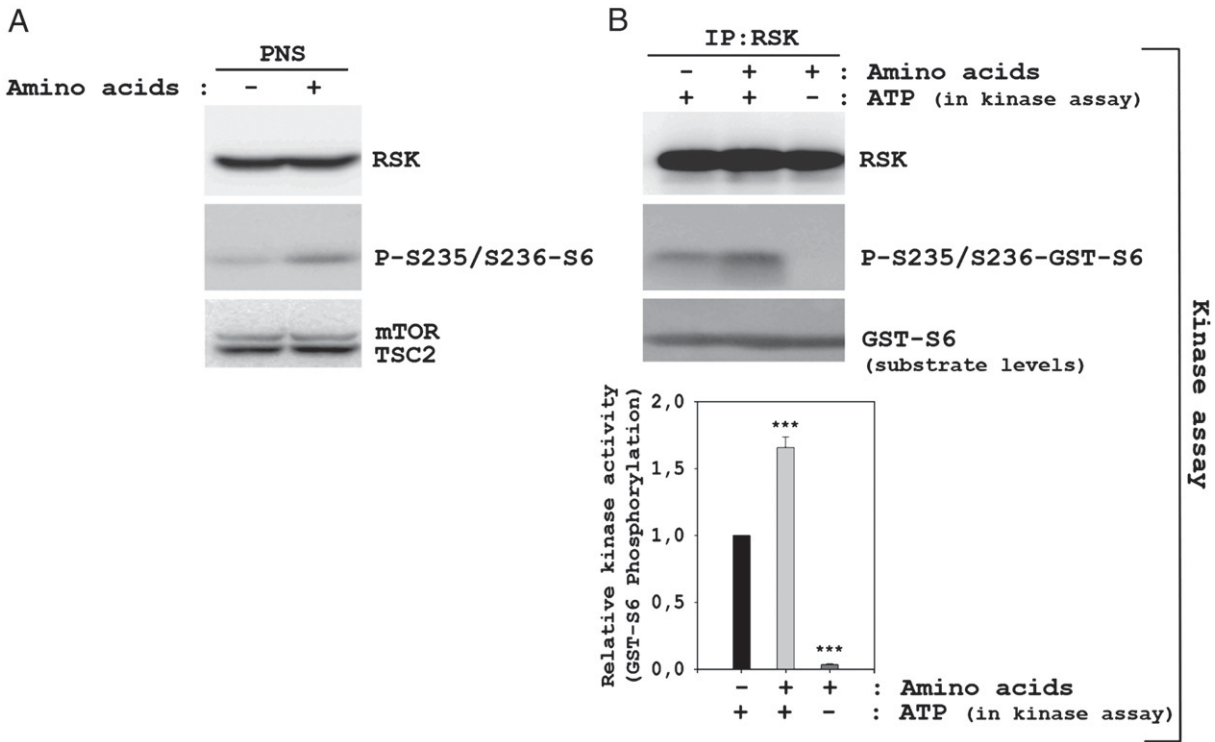


Fig. 6. Amino acids stimulate *in vitro* RSK activity. Amino acid deprivation, stimulation and Western blot analysis in A and B were similar to what has been described in Fig. 1. Postnuclear supernatants (PNS) from HEK-293 cells deprived of serum and amino acids and then stimulated or not with amino acids for 30 min were immunoprecipitated with anti-RSK antibodies. (B) *In vitro* kinase assay using RSK immunoprecipitates (IP) as source of RSK-containing complexes and purified GST-S6 as substrate. Immunocomplexes were resuspended in kinase buffer and incubated with purified GST-S6 in the presence or absence of ATP during 15 min at 30 °C. Reactions were stopped in ice with SDS/PAGE buffer and analysed by immunoblotting for phosphorylation on S235/S236 using the anti-P-S235/S236-S6 antibody (A, B) and for substrate levels using an anti-GST antibody (B). Histograms from experiment in B ($n=4$). All bands were normalised with respect to GST-S6 substrate levels. Data represent the ratio of P-S235/S236-GST-S6 phosphorylation and are expressed as the mean \pm SEM of percentage of respective control. Statistical analysis was carried out as indicated in Materials and methods. *** $p<0.001$. Levels of mTOR and TSC2 proteins were used as control of lysates. GST-S6 substrate was previously expressed in and purified from *E. coli*.

Several authors have reported the activation of the S6K1 activity by amino acids using a kinase assay [5,26]. Although our results show that endogenous S6K1 is not phosphorylated at T389 after stimulation by amino acids, they do not rule out the possibility that

amino acid signalling can induce S6K1 activation through phosphorylation at residues other than T389 [1–3,27]. The results above and previously reported studies describing the S6K1 phosphorylation at T421/S424 after the stimulation with EGF or amino acids [28,29], led

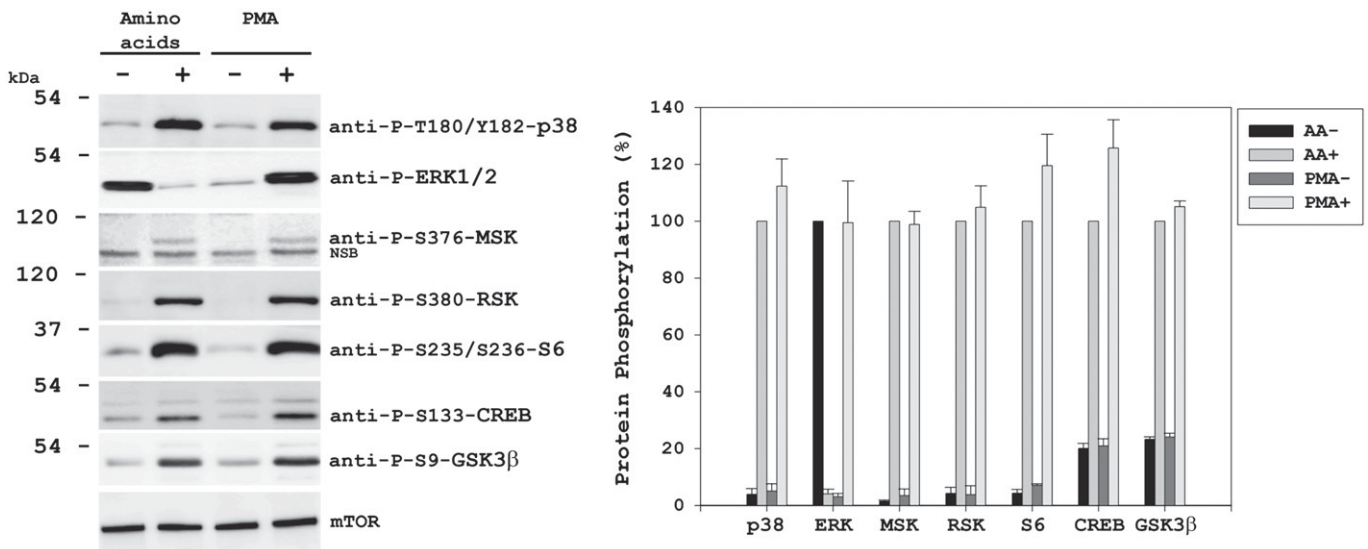


Fig. 7. Comparison of signalling by amino acids and PMA on ERK and p38 pathways. HeLa cells were deprived of serum overnight and stimulated with PMA for 30 min or, after serum deprivation, they were deprived for 2 h of amino acids, followed by stimulation with amino acids 1 \times for 30 min. Cell lysates were analysed by Western blot analysis with the indicated antibodies. Molecular weight markers are indicated on the left. NSB: nonspecific band recognised by the antibody. All bands were normalised with respect to mTOR levels. Data ($n=3$) represent the ratio of P-T180/Y182-p38, P-ERK1/2, P-S376-MSK, P-S380-RSK, P-S235/S236-S6, P-S133-CREB and P-S9-GSK3 β and are expressed as the mean \pm SEM of percentage of respective control (amino acid stimulation except for ERK which was amino acid depletion condition).

us to analyse this phosphorylation using an anti-phospho specific antibody. As shown in Fig. 8A (lanes 4–5), amino acids stimulated the S6K1 phosphorylation at T421/S424, in agreement with Fumarola et al. [29]. Interestingly, the main phosphorylation was at the p70 isoform of S6K1, which was easily observable when these samples were analysed in parallel with other samples stimulated with insulin (Fig. 8A, lane 4 versus lane 6). This comparison also revealed that p70 S6K1 phosphorylation at T421/S424 is stimulated more strongly by insulin than it is by amino acids. In order to examine whether MAP kinases play a regulatory role in this phosphorylation, we used the above specific inhibitors U0126 and SB 203580 of ERK and p38 pathways, respectively. As shown in Fig. 8A (lanes 5–12), only when both inhibitors were used simultaneously was S6K1 phosphorylation at T421/S424 completely inhibited (lane 12). To analyse if this phosphorylation is regulated by rapamycin and/or wortmannin, we

performed similar experiments in the presence of these inhibitors. As shown in Fig. 8B, C, stimulation of S6K1 phosphorylation at T421/S424 by amino acids is only dependent on ERK/p38 activities. To assess the functional consequences of this phosphorylation, we also measured the phosphorylation of the ribosomal S6 protein, substrate of S6K1 activity. S6 phosphorylation was clearly stimulated by amino acids in a manner dependent on ERK/p38 activities (Figs. 8B, C and 6A). In this case, we also detected a partial inhibition of S6 phosphorylation by the ERK inhibitor U0126. Although this inhibition was lower than that obtained in the presence of both ERK and p38 inhibitors, these results might indicate the involvement of another ERK-regulated kinase in S6 phosphorylation, as has been reported with growth factors or serum [30].

Osmotic stress has been reported to activate p38 and inhibits ERK [39]. These effects are similar to described here for amino acids. In

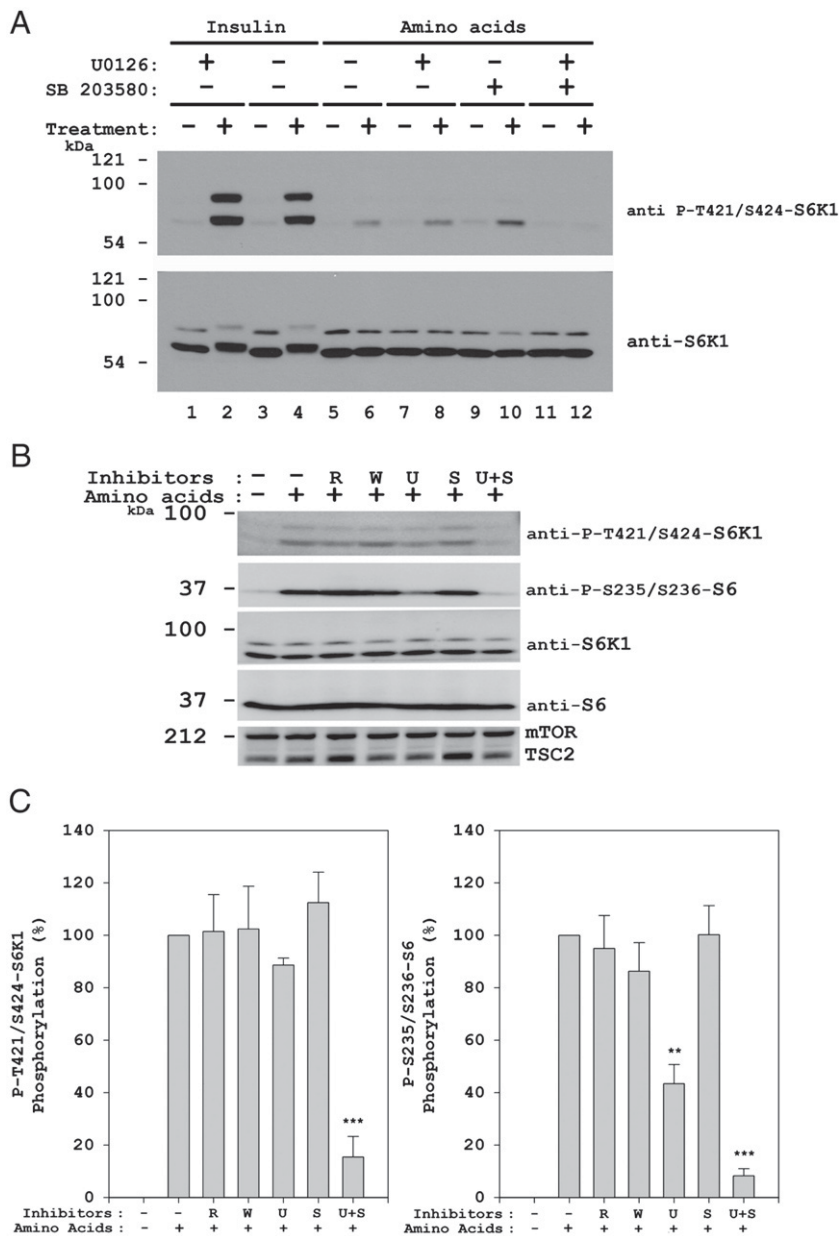


Fig. 8. ERK and p38 pathways mediate the amino acid-induced phosphorylation of S6K1 at T421/S424. HEK-293 (A) or HeLa (B) cells were deprived of serum and amino acids. Stimulation and Western blot analysis were performed as described in Fig. 1. Where indicated, cells were incubated with 5 μ M U0126 (U), 10 μ M SB 203580 (S), 100 nM wortmannin (W) or 20 nM rapamycin (R) for 60 min before insulin or amino acid stimulation. (C) Histograms from experiments in B ($n=3$). All bands were normalised with respect to mTOR levels. Data represent the ratio of P-T421/S424-S6K1 and P-S235/S236-S6, and are expressed as the mean \pm SEM of percentage of respective control. Statistical analysis was carried out as indicated in Materials and methods. *** $p<0.001$; ** $p<0.01$.

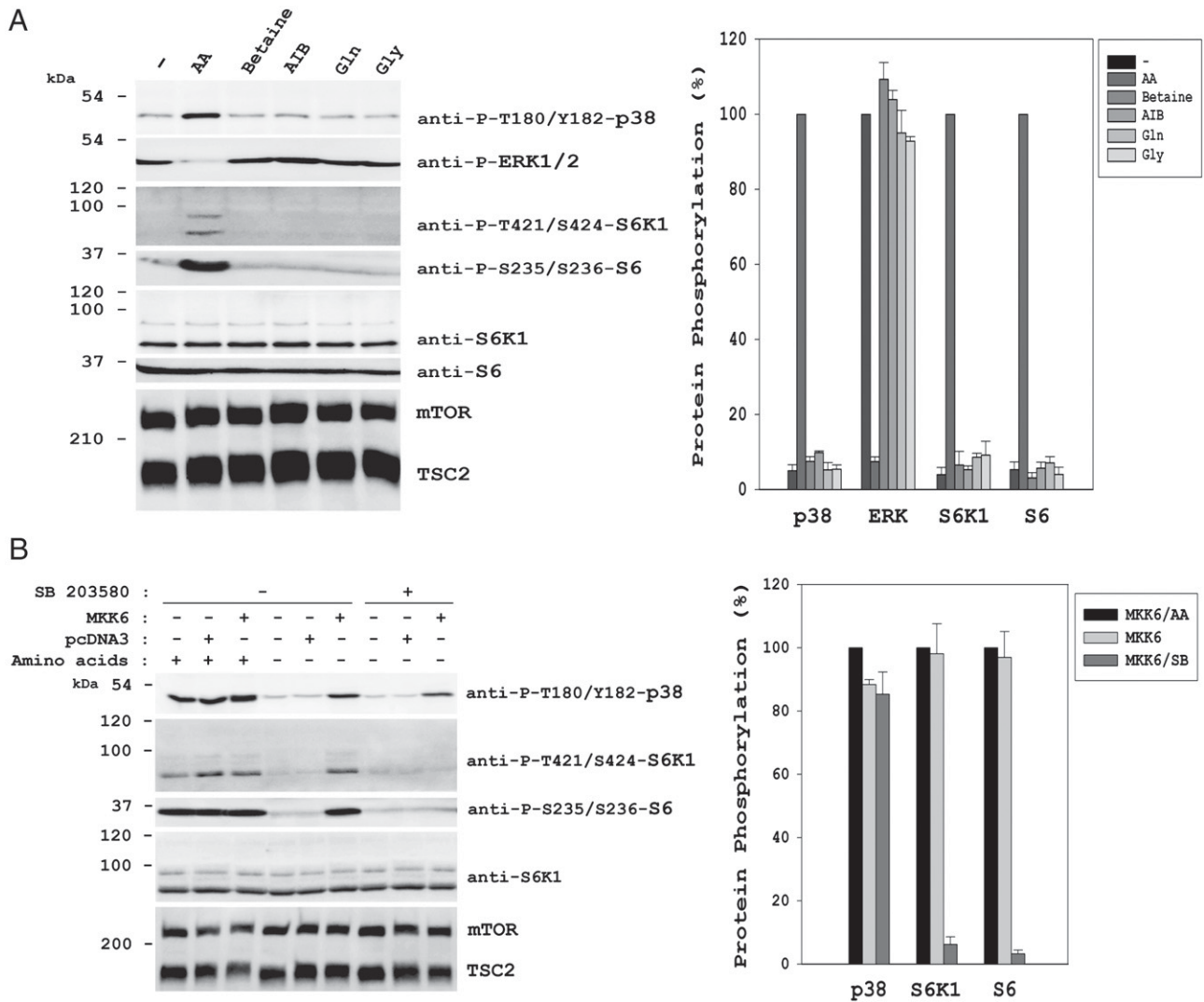


Fig. 9. Amino acid signalling is not due to osmotic stress but to a specific effect of amino acids through p38 pathway. HeLa cells were deprived of serum and amino acids. Stimulation and Western blot analysis were performed as described in Fig. 1. (A) Where indicated, cells were stimulated for 30 min with different osmolytes (Betaine and AIB- γ -amino-n-butyric acid-) or amino acids (Gln, Gly or amino acids) to a final concentration of 10 mM. Levels of mTOR, TSC2, S6K1 and S6 proteins were used as control of lysates. Only amino acid effect was significant. (B) Cells were transfected with the p38 activator MKK6 and the control pcDNA3 24 h before serum deprivation. Where indicated, cells were incubated with 10 μ M SB 203580 for 60 min before stimulation with amino acids. Levels of mTOR, TSC2 and S6K1 proteins were used as control of lysates. All bands were normalised with respect to mTOR levels. Histograms from experiments in A and B ($n=3$) represent the ratio of P-T180/Y182-p38, P-ERK1/2, P-T421/S424-S6K1 and P-S235/S236-S6 and are expressed as the mean \pm SEM of percentage of respective control.

order to show that we are analysing nutrient signalling and not osmotic stress signalling, we have performed experiments in the presence of non-nutrient osmolytes such as betaine or γ -amino-n-butyric acid (AIB), and of amino acids such as Gly or Gln to a molar concentration similar to the total concentration of the amino acids in previous experiments. As shown in Fig. 9A neither of these molecules could reproduce the regulation induced by all amino acids in p38, ERK, S6K1 or S6.

The involvement of p38 pathway in the signalling by amino acids led us to ask us if constitutive activation of this pathway would be enough to activate S6 phosphorylation. To this end, we used a constitutive active form of MKK6, which phosphorylates and activates p38, and analysed cell extracts from HeLa after amino acid depletion. Under these conditions, activation of p38 by MKK6 expression was enough to activate S6K1 (T421/S424) and S6 (S235/S236) (Fig. 9B). This effect was completely blocked by the p38 inhibitor SB 203580 (Fig. 9B).

The stimulation of autophagy by amino acid depletion and its inhibition when these nutrients were re-added was one of the earliest

physiological observations in the field of amino acid signalling [31]. Figs. 1C and 2A confirmed these observations using an LC3-based assay for monitoring autophagy [21]. To analyse whether ERK and p38 pathways are involved in the autophagy regulated by amino acids, we used the specific inhibitors U0126 and SB 203580 of ERK and p38, respectively. As shown in Fig. 10, the presence of amino acids inhibited the autophagy produced by starvation and only when both inhibitors were used simultaneously was autophagy significantly less inhibited (LC3-II levels). In parallel experiments, rapamycin or wortmannin did not affect the amino acid-induced autophagy inhibition. Inhibitors did not affect autophagy induced by amino acid depletion (Fig. 10B).

4. Discussion

The mTOR pathway has an essential role in the control of mammalian growth and development. Hormones such as insulin and nutrients such as amino acids seem to mediate their cellular effects through this pathway [1,2]. The kinase p70 S6K1 is a substrate of the mTOR kinase and it is commonly used as a reporter of mTOR activity.

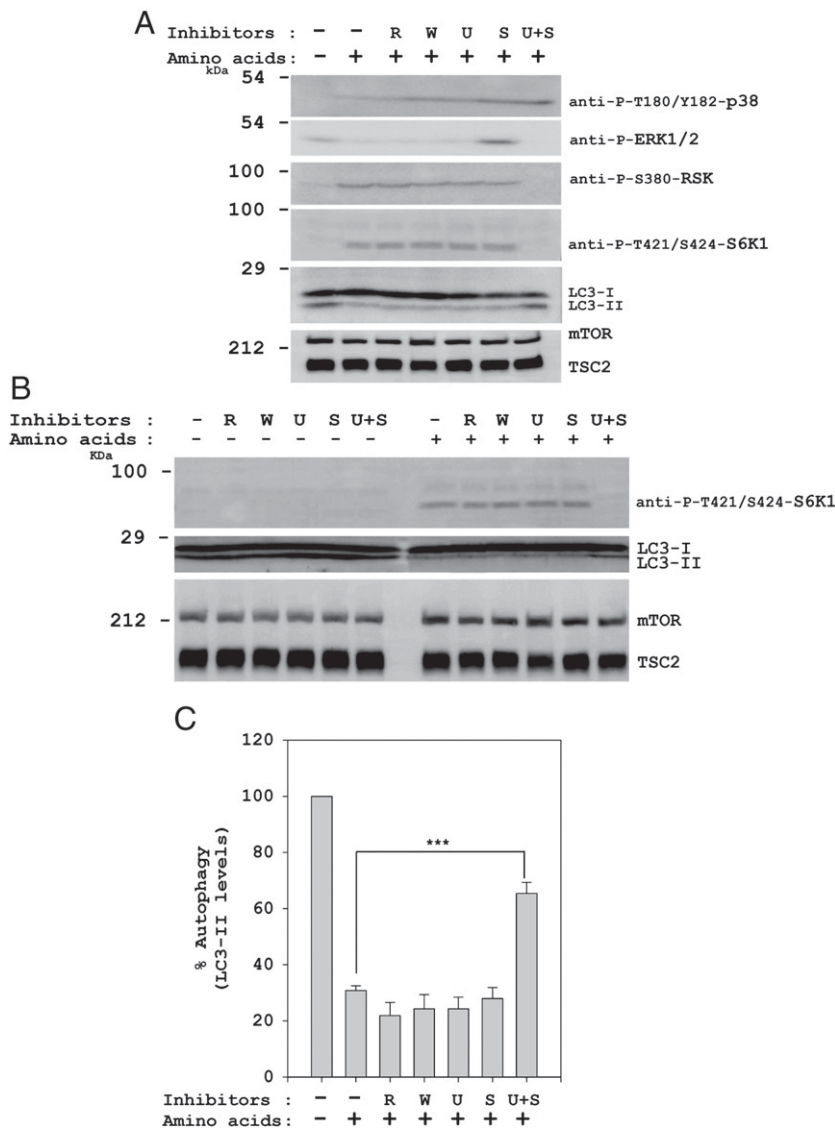


Fig. 10. ERK and p38 pathways are involved in the regulation of autophagy by amino acids. (A) HEK-293 cells were deprived of serum and amino acids. Stimulation and Western blot analysis were carried out as described in Fig. 1. Where indicated, cells were incubated with 5 μ M U0126 (U), 10 μ M SB 203580 (S), 100 nM wortmannin (W) or 20 nM rapamycin (R) for 60 min before insulin or amino acid stimulation. (B) Depleted cells were incubated with inhibitors as in A. Stimulation and Western blot analysis were carried out as described in Fig. 1. (C) Histograms from experiments in A ($n=5$). All bands were normalised with respect to mTOR levels. Data represent the ratio of LC3-II levels and are expressed as the mean \pm SEM of percentage of respective control. Statistical analysis was carried out as indicated in Materials and methods. *** $p < 0.001$.

Since it was demonstrated that mTOR phosphorylates p70 S6K1 at T389 and that this phosphorylation plays an important physiological role in insulin signalling, analysis of the T389 phosphorylation of p70 S6K1 with a commercial anti-phospho specific antibody has been extensively used [1,2]. In this study, we set about using this experimental approach to examine endogenous p70 S6K1 activation by amino acids. Unexpectedly, however, by using the same commercial anti-P-T389-S6K1 antibody, we detected the fast phosphorylation of an endogenous 80–90 kDa protein. Remarkably, this phosphorylation was insensitive to both the mTOR inhibitor rapamycin and the PI3K inhibitor wortmannin, indicating that the mTOR pathway is not responsible for it (Fig. 1). A possible explanation for these observations was that the protein being phosphorylated was the less abundant p85 S6K1 isoform [22,23]. In order to test this hypothesis, we analysed whether this isoform was phosphorylated at T412, equivalent to T389 of p70 S6K1, in response to amino acids. Transfection studies with plasmids specifically expressing each of the S6K1 isoforms or even the related S6K2 protein showed that none of them was the target of the observed phosphorylation (Fig. 3B, C). This was conclusively demon-

strated with the knockdown of both S6K1 isoforms (Fig. 3D), clearly indicating that the anti-P-T389-S6K1 antibody recognises, upon amino acid treatment, a protein that is neither p70 S6K1 nor p85 S6K1. These results are in contrast with those of others, who have reported S6K1 T389 phosphorylation as a result of amino acid signalling [3]. In some cases, the differences between our results and those of previous studies can be explained by the different experimental approaches used. For instance, *in vitro* kinase assays that we performed showed that mTOR is slight activated by amino acid treatment (Fig. 3E), in agreement with other studies [8,12]. Likewise, we could also detect amino acid-induced phosphorylation of S6K1 at T389, but only in experiments using overexpressed proteins (Fig. 3F, [10]). In support of our results using endogenous proteins in HeLa, HEK-293 and MCF-7 cells, studies in other cell types such as L6 muscle cells, 3T3-L1 adipocytes and Fao hepatoma cells also showed the non-T389 phosphorylation of S6K1 when cells were incubated with amino acids in the absence of insulin [32].

Database searches for amino acid sequences that resembled the one recognised by the anti-P-T389-S6K1 antibody in p70 S6K1 led us

to focus on RSK and MSK proteins as candidates for amino acid signalling targets. These proteins, like S6K1, are serine/threonine protein kinases of the AGC family, they have an electrophoretic mobility similar to that of p85 S6K1 and they are regulated independently of mTOR [13]. Our results show that members of these protein families are indeed recognised by anti-P-T389-S6K1 antibody when cells are stimulated with amino acids (Fig. 4). This observation was very important because it led us to study the regulation of amino acid signalling by MAP kinases. Activation of ERK and p38 proteins has been shown to play a key role in the regulation of cell growth, differentiation and cell stress [33]. The results presented in this paper are compatible with a model in which amino acids exert their effects at least partly by activating p38 MAPK, or ERK when p38 is inactive, and this in turn leads to activation of RSK and MSK kinases. This observation is also very relevant because it involves p38 in the activation of RSK proteins. Thus, we show that RSK proteins are regulated by p38 or ERK proteins in a similar manner to what has been described for MSK [13]. The fact that both p38 and ERK can phosphorylate RSK and MSK reflects a robust cellular mechanism to maintain RSK/MSK regulation by nutrients even when one of the above MAPK cascades has been inactivated. Likewise, this functional redundancy also explains why previous reports failed to identify the role of MAPKs in amino acid signalling, since those reports used specific inhibitors to only one of these kinases [5]. Interestingly, while this manuscript was being written a paper was published describing the regulation of RSK proteins by ERK and p38 in response to Toll-like receptor activation in dendritic cells [34]. Thus, although a majority of studies have shown that RSK is predominantly activated by ERK, these studies evidence that p38 is also an activator of RSK.

The comparison between the stimulation of cells with the phorbol ester PMA, an established ERK/RSK-MSK activator [13], and with amino acids shows the efficacy of the amino acid signalling under these experimental conditions (Fig. 7). An interesting observation of these findings was that, following amino acid deprivation, ERK was activated (as revealed by increased ERK phosphorylation) whereas their substrates, RSK and MSK, were not activated. This unusual observation probably indicates an unknown mechanism that impaired the activation of RSK and MSK by ERK after amino acid deprivation. During the correction of this paper, it has been also reported the activation of ERK followed to amino acid deprivation in hepatoma cells requiring GCN2 kinase activity and eIF2 α phosphorylation [45].

The involvement of MAP kinases in amino acid signalling led us to analyse the phosphorylation of S6K1 at other residues previously shown to be regulated by MAP kinases [28]. Indeed, we could detect S6K1 phosphorylation at T421/S424, in agreement with previous work using the same anti-phospho antibody [29]. S6K1 phosphorylation at T421/S424 correlated with an increase in the phosphorylation of S6K1's substrate, the ribosomal S6 protein (Figs. 8 and 9). These phosphorylations are regulated by p38 and ERK kinases. The amino acid-stimulated S6 phosphorylation may be catalyzed by S6K1 phosphorylated at T421/S424 and T389 at undetectable levels and RSK [42] (Fig. 6). The S6K1 activation by amino acids is compatible with the convergent role assigned to S6K1 as a sensor of insulin- and nutrient-mediated signalling [3,30].

Autophagy is stimulated in mammalian cells by nutrient deprivation, which may act through mTOR repression or other as yet undefined mechanisms that activate class 3 PI3K in an mTOR-independent manner [31]. The regulatory role of amino acids in autophagy was initially reported in perfused rat liver, when Mortimore and Schworer [35] showed the induction of autophagy by amino acid deprivation. Since then, autophagy has been used as a physiological indicator of amino acid signalling [31]. More recently, MAP kinases ERK and p38 have been involved in the regulation of autophagy in response to other stimuli [43,44]. Now, we show that ERK and p38 kinases also mediate the regulation of autophagy by

amino acids (Fig. 10). By contrast, our data using inhibitors of mTOR and PI3K suggest that these two kinases are not involved in the autophagy inhibition stimulated by amino acids after nutrient deprivation. Although further studies will certainly be required in order to fully understand the detailed mechanisms underlying amino acid signalling and autophagy, we believe that the data shown here represent a significant step forward in this direction.

Acknowledgments

We thank F.R. Garcia-Gonzalo, O. Hadjebi and J. Hadjebi for their support and comments. We also thank E. Adanero, E. Castaño and B. Torrejon for their technical assistance. Likewise, we are grateful to Dr. B. Law, Dr. D.M. Sabatini, Dr. S. Arthur, Dr. J. Blenis, Dr. J.L. Maller, and Dra. P. Muñoz-Canoves for the plasmids they have provided us and to Dr. F. Vinals, Dr. S. Ambrosio, Dr. I. Ferrer and Dr. J. Gil for kindly supplying the antibodies and inhibitors. This study was supported by grants from Ministerio de Educacion y Ciencia (BFU-2004-06329/BMC and BFU-2007-65452/BMC, Spain), European Union (FEDER), ISCIII (RETIC RD06/0020) and Generalitat de Catalunya (2005SGR00022). E.C.T. and I.T. have been supported by doctoral fellowships from Fundació IDIBELL/Universitat de Barcelona and by Juan de la Cierva's program, respectively.

References

- [1] J. Avruch, K. Hara, Y. Lin, M. Liu, S. Long, K. Yonezawa, Insulin and amino-acid regulation of mTOR signaling and kinase activity through the Rheb GTPase, *Oncogene* 25 (2006) 6361–6372.
- [2] S. Wullschlegel, R. Loewith, M.N. Hall, TOR signaling in growth and metabolism, *Cell* 124 (2006) 471–484.
- [3] S.H. Um, D. D'Alessio, G. Thomas, Nutrient overload, insulin resistance, and ribosomal protein S6 kinase 1, S6K1, *Cell. Metab.* 3 (2006) 393–402.
- [4] E.F. Blommaart, J.J. Luiken, P.J. Blommaart, G.M. van Woerkom, A.J. Meijer, Phosphorylation of ribosomal protein S6 is inhibitory for autophagy in isolated rat hepatocytes, *J. Biol. Chem.* 270 (1995) 2320–2326.
- [5] K. Hara, K. Yonezawa, Q.P. Weng, M.T. Kozlowski, C. Belham, J. Avruch, Amino acid sufficiency and mTOR regulate p70 S6 kinase and eIF-4E BP1 through a common effector mechanism, *J. Biol. Chem.* 273 (1998) 14484–14494.
- [6] P.B. Dennis, N. Pullen, S.C. Kozma, G. Thomas, The principal rapamycin-sensitive p70(s6k) phosphorylation sites, T-229 and T-389, are differentially regulated by rapamycin-insensitive kinase kinases, *Mol. Cell. Biol.* 16 (1996) 6242–6251.
- [7] Q.P. Weng, M. Kozlowski, C. Belham, A. Zhang, M.J. Comb, J. Avruch, Regulation of the p70 S6 kinase by phosphorylation in vivo. Analysis using site-specific anti-phosphopeptide antibodies, *J. Biol. Chem.* 273 (1998) 16621–16629.
- [8] D.H. Kim, D.D. Sarbassov, S.M. Ali, J.E. King, R.R. Latek, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst, D.M. Sabatini, mTOR interacts with raptor to form a nutrient-sensitive complex that signals to the cell growth machinery, *Cell* 110 (2002) 163–175.
- [9] H. Nojima, C. Tokunaga, S. Eguchi, N. Oshiro, S. Hidayat, K. Yoshino, K. Hara, N. Tanaka, J. Avruch, K. Yonezawa, The mammalian target of rapamycin (mTOR) partner, raptor, binds the mTOR substrates p70 S6 kinase and 4E-BP1 through their TOR signaling (TOS) motif, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 15461–15464.
- [10] T. Nobukuni, M. Joaquin, M. Rocco, S.G. Dann, S.Y. Kim, P. Gulati, J.M. Backer, F. Natt, J.L. Bos, F.J.T. Zwartkruis, G. Thomas, Amino acids mediate mTOR/raptor signaling through activation of class 3 phosphatidylinositol 3OH-kinase, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102 (2005) 14238–14243.
- [11] M.P. Byfield, J.T. Murray, J.M. Backer, hVps34 is a nutrient-regulated lipid kinase required for activation of p70 S6 kinase, *J. Biol. Chem.* 280 (2005) 33076–33082.
- [12] G.M. Findlay, L. Yan, J. Procter, V. Mieuillet, R.F. Lamb, A MAP4 kinase related to Ste20 is a nutrient-sensitive regulator of mTOR signaling, *Biochem. J.* 403 (2007) 13–20.
- [13] C. Hauge, M. Frödin, RSK and MSK in MAP kinase signaling, *J. Cell Sci.* 119 (2006) 3021–3023.
- [14] M. Katz, I. Amit, Y. Yarden, Regulation of MAPKs by growth factors and receptor tyrosine kinases, *Biochim. Biophys. Acta* 1773 (2007) 1161–1176.
- [15] J.L. Rosa, R.P. Casaroli-Marano, A.J. Buckler, S. Vilaro, M. Barbacid, p619, a giant protein related to the chromosome condensation regulator RCC1, stimulates guanine nucleotide exchange on ARF1 and Rab proteins, *EMBO J.* 15 (1996) 4262–4273.
- [16] X. Wang, A. Beugnet, M. Murakami, S. Yamanaka, C.G. Proud, Distinct signaling events downstream of mTOR cooperate to mediate the effects of amino acids and insulin on initiation factor 4E-binding proteins, *Mol. Cell. Biol.* 25 (2005) 2558–2572.
- [17] E. Casas-Terradellas, F.R. Garcia-Gonzalo, O. Hadjebi, R. Bartrons, F. Ventura, J.L. Rosa, Simultaneous electrophoretic analysis of proteins of very high and low molecular weights using low-percentage acrylamide gel and a gradient SDS-PAGE gel, *Electrophoresis* 27 (2006) 3935–3938.

- [18] S.M. Ali, D.M. Sabatini, Structure of S6 kinase 1 determines whether raptor-mTOR or rictor-mTOR phosphorylates its hydrophobic motif site, *J. Biol. Chem.* 280 (2005) 19445–19448.
- [19] F.R. Garcia-Gonzalo, P. Muñoz, E. Gonzalez, R.P. Casaroli-Marano, S. Vilaro, R. Bartrons, F. Ventura, J.L. Rosa, The giant protein HERC1 is recruited to aluminum fluoride-induced actin-rich surface protrusions in HeLa cells, *FEBS. Lett.* 559 (2004) 77–83.
- [20] H. Chong-Kopera, K. Inoki, Y. Li, T. Zhu, F.R. Garcia-Gonzalo, J.L. Rosa, K.L. Guan, TSC1 stabilizes TSC2 by inhibiting the interaction between TSC2 and the HERC1 ubiquitin ligase, *J. Biol. Chem.* 281 (2006) 8313–8316.
- [21] Y. Kabeya, N. Mizushima, T. Ueno, A. Yamamoto, T. Kirisako, T. Noda, E. Kominami, Y. Ohsumi, T. Yoshimori, LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing, *EMBO J.* 19 (2000) 5720–5728.
- [22] P.J. Coffey, J.R. Woodgett, Differential subcellular localisation of two isoforms of p70 S6 protein kinase, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 198 (1994) 780–786.
- [23] C. Reinhard, A. Fernandez, N.J. Lamb, G. Thomas, Nuclear localization of p85S6k: functional requirement for entry into S phase, *EMBO J.* 13 (1994) 1557–1565.
- [24] B.K. Law, P. Norgaard, H.L. Moses, Farnesyltransferase inhibitor induces rapid growth arrest and blocks p70S6k activation by multiple stimuli, *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 10796–10801.
- [25] E. Silverman, M. Frödin, S. Gammeltoft, J.L. Maller, Activation of p90 Rsk1 is sufficient for differentiation of PC12 cells, *Mol. Cell. Biol.* 24 (2004) 10573–10583.
- [26] Y. Iiboshi, P.J. Papst, H. Kawasome, H. Hosoi, R.T. Abraham, P.J. Houghton, N. Terada, Amino acid-dependent control of p70(S6k). Involvement of tRNA aminoacylation in the regulation, *J. Biol. Chem.* 274 (1999) 1092–1099.
- [27] M. Pende, S.H. Um, V. Mieulet, M. Sticker, V.L. Goss, J. Mestan, M. Mueller, S. Fumagalli, S.C. Kozma, G. Thomas, S6K1(-)/S6K2(-) mice exhibit perinatal lethality and rapamycin-sensitive 5'-terminal oligopyrimidine mRNA translation and reveal a mitogen-activated protein kinase-dependent S6 kinase pathway, *Mol. Cell. Biol.* 24 (2004) 3112–3124.
- [28] C.K. Billington, K.C. Kong, R. Bhattacharyya, P.B. Wedegaertner, R.A. Panettieri, T.O. Chan, R.B. Penn, Cooperative regulation of p70S6 kinase by receptor tyrosine kinases and G protein-coupled receptors augments airway smooth muscle growth, *Biochemistry* 44 (2005) 14595–14605.
- [29] C. Fumarola, S. La Monica, G.G. Guidotti, Amino acid signaling through the mammalian target of rapamycin (mTOR) pathway: role of glutamine and of cell shrinkage, *J. Cell. Physiol.* 204 (2005) 155–165.
- [30] P.P. Roux, D. Shahbazian, H. Vu, M.K. Holz, M.S. Cohen, J. Taunton, N. Sonenberg, J. Blenis, RAS/ERK signaling promotes site-specific ribosomal protein S6 phosphorylation via RSK and stimulates cap-dependent translation, *J. Biol. Chem.* 282 (2007) 14056–14064.
- [31] D.J. Klionsky, Autophagy: from phenomenology to molecular understanding in less than a decade, *Nat. Rev., Mol. Cell. Biol.* 8 (2007) 931–937.
- [32] F. Tremblay, S. Brulé, S.H. Um, Y. Li, K. Masuda, M. Roden, X.J. Sun, M. Krebs, R.D. Polakiewicz, G. Thomas, A. Marette, Identification of IRS-1 Ser-1101 as a target of S6K1 in nutrient- and obesity-induced insulin resistance, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104 (2007) 14056–14061.
- [33] J. Avruch, MAP kinase pathways: the first twenty years, *Biochim. Biophys. Acta* 1773 (2007) 1150–1160.
- [34] R. Zaru, N. Ronkina, M. Gaestel, J.S.C. Arthur, C. Watts, The MAPK-activated kinase Rsk controls an acute Toll-like receptor signaling response in dendritic cells and is activated through two distinct pathways, *Nat. Immunol.* 8 (2007) 1227–1235.
- [35] G.E. Mortimore, C.M. Schworer, Induction of autophagy by amino-acid deprivation in perfused rat liver, *Nature* 270 (1977) 174–176.
- [36] K.A. Martin, S.S. Schalm, A. Romanelli, K.L. Keon, J. Blenis, Ribosomal S6 kinase 2 inhibition by a potent C-terminal repressor domain is relieved by mitogen-activated protein-extracellular signal-regulated kinase kinase-regulated phosphorylation, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 7892–7898.
- [37] J.J. Zhao, O.V. Gjoerup, R.R. Subramanian, Y. Cheng, W. Chen, T.M. Roberts, W.C. Hahn, Human mammary epithelial cell transformation through the activation of phosphatidylinositol 3-kinase, *Cancer Cell.* 3 (2003) 483–495.
- [38] T. DeAngelis, J. Chen, A. Wu, M. Prisco, R. Baserga, Transformation by the simian virus 40 T antigen is regulated by IGF-I receptor and IRS-1 signaling, *Oncogene.* 25 (2006) 32–42.
- [39] Y. Nagata, K. Todokoro, Requirement of activation of JNK and p38 for environmental stress-induced erythroid differentiation and apoptosis and of inhibition of ERK for apoptosis, *Blood.* 94 (1999) 853–863.
- [40] H. Zhang, X. Shi, M. Hampong, L. Blanis, S. Pelech, Stress-induced inhibition of ERK1 and ERK2 by direct interaction with p38 MAP kinase, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 6905–6908.
- [41] G.J. Brunn, J. Williams, C. Sabers, G. Wiederrecht, J.C. Lawrence, R.T. Abraham, Direct inhibition of the signaling functions of the mammalian target of rapamycin by the phosphoinositide 3-kinase inhibitors, wortmannin and LY294002, *EMBO J.* 15 (1996) 5256–5267.
- [42] M.S. Cohen, H. Hadjivassiliou, J. Taunton, A clickable inhibitor reveals context – with the sustained mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated dependent autoactivation of p90 RSK, *Nat. Chem. Biol.* 3 (2007) 156–160.
- [43] E. Corcelle, M. Nebout, S. Bekri, N. Gauthier, P. Hofman, P. Poujeol, P. Fénichel, B. Mograbi, Disruption of autophagy at the maturation step by the carcinogen lindane is associated kinase activity, *Cancer Res.* 66 (2006) 6861–6870.
- [44] E. Corcelle, N. Djerbi, M. Mari, M. Nebout, C. Fiorini, P. Fénichel, P. Hofman, P. Poujeol, B. Mograbi, Control of the autophagy maturation step by the MAPK ERK and p38: lessons from environmental carcinogens, *Autophagy* 3 (2007) 57–59.
- [45] M.M. Thiaville, Y.X. Pan, A. Gjymishka, C. Zhong, R.J. Kaufman, M.S. Kilberg, MEK signaling is required for phosphorylation of eIF2alpha following amino acid limitation of HepG2 human hepatoma cells, *J. Biol. Chem.* 283 (2008) 10848–10857.



Review

The RCC1 superfamily: From genes, to function, to disease

Ouadah Hadjebi, Eduard Casas-Terradellas, Francesc R. Garcia-Gonzalo¹, Jose Luis Rosa^{*}

Departament de Ciències Fisiològiques II, IDIBELL, Campus de Bellvitge, Universitat de Barcelona, E-08907, L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 3 December 2007
 Received in revised form 19 March 2008
 Accepted 20 March 2008
 Available online 10 April 2008

Keywords:

RCC1
 RLD
 GRF
 GEF
 HERC
 RCBTB

ABSTRACT

The Regulator of Chromosome Condensation 1 (RCC1) was identified over 20 years ago as a critical cell cycle regulator. By analyzing its amino acid sequence, RCC1 was found to consist of seven homologous repeats of 51–68 amino acid residues, which were later shown to adopt a seven-bladed β -propeller fold. Since the initial identification of RCC1, a number of proteins have been discovered that contain one or more RCC1-like domains (RLDs). As we show here, these RCC1 superfamily proteins can be subdivided in five subgroups based on structural criteria. In recent years, a number of studies have been published regarding the functions of RCC1 superfamily proteins. From these studies, the emerging picture is that the RLD is a versatile domain which may perform many different functions, including guanine nucleotide exchange on small GTP-binding proteins, enzyme inhibition or interaction with proteins and lipids. Here, we review the available structural and functional data on RCC1 superfamily members, paying special attention to the human proteins and their involvement in disease.

© 2008 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

The RCC1 superfamily of proteins is characterized by a 350–500 residue domain, known as the RCC1-like domain or RLD, that was first reported in 1987 in the Regulator of Chromosome Condensation 1, RCC1 [1,2]. A mutated RCC1 allele was found to be responsible for the temperature-sensitive phenotypes seen in the ts-BN2 hamster cell lines, including premature chromosome condensation and arrest in the G1 phase of the cell cycle. These phenotypes could be rescued by the introduction of wild-type RCC1 [1–3]. It was not until the mid-nineties that another human protein, HERC1, was found that contained not one, but two RLDs [4]. Since then, sixteen additional human proteins have been described that have at least one RLD in their amino acid sequences.

In this review, we show that these proteins can be divided into five subgroups based on their structural characteristics (Fig. 1): (1) the RCC1 subgroup, (2) the HERC subgroup, (3) the RCBTB subgroup, (4) the kinase subgroup and (5) the miscellaneous subgroup, encompassing the proteins that cannot be classified into any of the other subgroups.

In addition, the following sections will present the available knowledge regarding the structure and function of RCC1 superfamily genes and proteins, with an emphasis on the human members. Finally, the involvement of RCC1 superfamily genes and proteins in pathological conditions will also be discussed.

2. RCC1 superfamily genes and proteins

The genes encoding human RLD-containing proteins (see Table 1) are located in different chromosomes, though closer homologs tend to be located in the vicinity of each other. Thus, the genes for RCC1 and TD-60 are close to each other in chromosome 1. Similarly, HERC1 and HERC2 are both on the long arm of chromosome 15, whereas HERC3, HERC5 and HERC6 are in the same region in chromosome 4 [5]. Likewise, both RCBTB1 and RCBTB2 are located on the long arm of chromosome 13. The other genes are dispersed throughout the genome, either on autosomes or, in the case of RPGR, in the X chromosome.

All these genes have different exon numbers and the proteins encoded by them range from little more than 400 amino acid residues to close to 5000 (see Table 1). Splicing isoforms have been studied in some cases, such as those of RCC1, DelGEF, RPGR, PAM and some HERC proteins [6–10]. While alternative splicing of RCC1, HERC6 and PAM does not affect the sequence of their RLDs [6,7,10], the same cannot be said of DelGEF, RPGR and HERC4, where some of the isoforms have truncated RLDs [7,8,11,12]. Apart from that, the Ensembl database also predicts alternatively spliced transcripts for some of the other proteins described here, but whether or not these isoforms actually exist has not yet been examined [13].

Regarding the architectures of RCC1 superfamily proteins (Fig. 1), there are instances where the RLD domain makes up almost the whole protein, as is the case for RCC1 subgroup members (RCC1, TD-60, DelGEF and WBSR16), or it can be the only highly conserved region of a protein, as in RPGR. In other cases, the RLD is part of more complex, multidomain proteins. For example, RLDs can be found in proteins involved in ubiquitination, where they are associated with HECT or

^{*} Corresponding author. Fax: +34 934024268.

E-mail address: joseluisrosa@ub.edu (J.L. Rosa).

¹ Present address: Gene Expression Laboratory, The Salk Institute for Biological Studies, 10010 North Torrey Pines Road, La Jolla, CA 92037, United States.

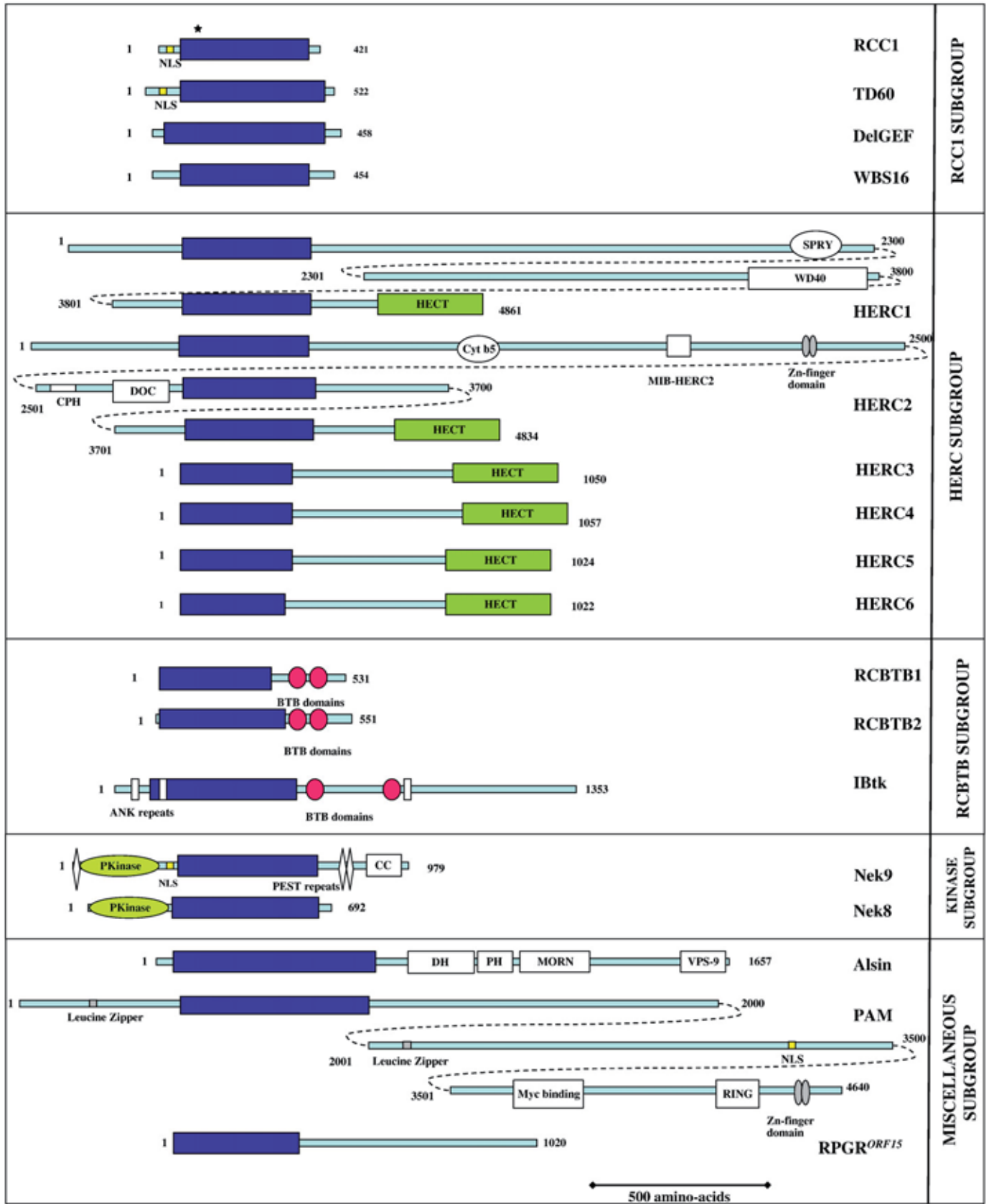


Fig. 1. Schematic representation of human RCC1 superfamily proteins. The eighteen proteins have been classified into five subgroups: (1) the RCC1 subgroup (including those proteins whose RLD spans almost the whole length of the protein), (2) the HERC subgroup (proteins containing RLD and HECT domains), (3) the RCBTB subgroup (proteins containing RLD and BTB domains), (4) the kinase subgroup (proteins containing RLD and kinase domains) and (5) the miscellaneous subgroup, encompassing those proteins that do not fit into any of the previous categories. Dark blue rectangles represent the RLDs. All proteins and domains are shown to scale (scale shown at bottom right side). Big proteins such as PAM, HERC1 and HERC2 are drawn in more than one line, with amino acid numbers shown at each end. A star on top of RCC1's RLD shows the location of the β -wedge, essential for RCC1's activity as a Ran-GEF.

Table 1
The human RCC1 superfamily proteins

The human RCC1 superfamily								
	Protein names	Number of residues	Protein/gene accession number	Chromosomal location	Known function/interaction	RLD function	Other known domains	References
RCC1 subgroup	RCC1 (Regulator of Chromosome Condensation 1), Ran-GEF (RLD: 18–421)	421	P18754/ NM_001269	1p36.1	Binds to chromatin and acts as a guanine exchange factor (GEF) on Ras homologue Ran	G,P	Nuclear localization signal (NLS)	[1–3,15,22,29,31,66]
	TD-60 (telophase disk 60), RCC2 (RLD: 121–507)	522	Q9P258/ NM_018715	1p36.13	Chromosomal passenger protein involved in mitotic progression	?	NLS	[28,30,77]
	DelGEF (deafness locus-associated putative guanine nucleotide exchange factor), also called SERGEF. (RLD: 4–407)	458	Q9UGK8/ NM_012139	1p14.3	Modulates secretion of proteoglycans and interacts with Sec5 and DelGIP1	?		[8,32,33]
	WBSR16 (William-Beuren syndrome critical region 16), WBS16 (RLD: 56–454)	454	Q8N572/ NM_030798	7q11.23	Possible role in Williams-Beuren syndrome	?		[152]
HERC subgroup	HERC1 (for HECT domain and RCC1) (RLD1: 361–749; RLD2: 3990–4366)	4861	Q15751/ NM_003922	15q22	Binds clathrin heavy chain, phosphoinositides, ARF/Rab proteins and TSC2. Ubiquitin ligase, no known targets	G,P,L	HECT, SPRY, WD40, leucine zipper	[4,5,42–44,79,80]
	HERC2 (RLD1: 415–784; RLD2: 2949–3332; RLD3: 3941–4324)	4834	Q95714/ NM_004667	15q13	Involved in murine rjs syndrome. ubiquitin ligase, no known targets	?	HECT, Mib-HERC2, DOC domain, ZZ type zinc finger, cyt b5-like region	[5,34,141–148]
	HERC3 (RLD: 1–371)	1050	Q15034/ NM_014606	4q21	Ubiquitin ligase, no known targets	?	HECT	[5,35,41]
	HERC4 (RLD: 1–371)	1057	Q5GLZ8/ NM_015601 or NM_022079	10q21.3	Ubiquitin ligase, no known targets	?	HECT	[7,45]
	HERC5 (previously known as Ceb1) (RLD: 1–367)	1024	Q9UII4/ NM_016323	4q22.1	Mediates ISGylation of natural ISG15 target proteins	?	HECT	[7,36–40]
	HERC6 (RLD: 1–355)	1022	Q8IVU3/ NM_017912	4q22.1	Ubiquitin ligase, no known targets	?	HECT	[7,37–40]
RCBTB subgroup	RCBTB1 (RCC1 and BTB containing protein 1) or CLLD7 (RLD: 1–357)	531	Q8NDN9/ NM_018191	13q14	Possible tumor suppressor in chronic lymphocytic leukemia	?	BTB domain	[154–156]
	RCBTB2, also called CHC1L (RLD: 1–372)	551	Q95199/ NM_001268	13q14.3	Possible tumor suppressor in prostate cancer	?	BTB domain, BRCA domain	[157]
	IBtk (inhibitor of Bruton's tyrosine kinase) (RLD: 74–485)	1353	Q9P2D0/ NM_015525	6q14.1	Inhibits Btk	?	BTB, ANK	[52]
Kinase subgroup	Nek9, also known as Nercc1 (RLD: 332–725)	979	Q8TD19/ NM_033116	14q24.3	Role in mitotic progression. Binds to Ran.	P	Protein kinase, CC, PEST sequences	[46–49,81–83]
	Nek8 (RLD: 272–683)	692	Q86SG6/ NM_178170	17q11.1	Role in ciliary size and function	?	Protein kinase	[46,50,51,84–86,135–140]
Miscellaneous subgroup	Alsin also called ALS2 (RLD: 110–633)	1657	Q96Q42/ NM_020919	2q33.1	Rab5-GEF and Rac1 effector, though not through RLD domain, binds to GRIP1	G, P	DH, PH, MORN, VPSP	[57–59,87–89,125,126,134]
	PAM (protein associated with Myc) also called Myc binding protein 2 (MYCB2) (RLD: 552–1030)	4640	Q75592/ NM_015057	13q22	Binds to Myc and inhibits adenyl cyclase	P	RZF, 2 Zinc-fingers, Myc binding protein, NLS	[10,60–63,95–117]
	RPGR (retinitis pigmentosa GTPase regulator), ORF15 (RLD: 1–372)	1020	Q92834/ NM_000328	Xp11.4	Role in ciliary function. Linked to retinitis pigmentosa, binds to PDEδ and RPGRIP1	P		[9,11,12,53–56,90–94]

In the RLD function column, G, P and L stand for: guanine nucleotide exchange/release factor (G), protein–protein interactions (P), and protein–lipid interactions (L). A question mark indicates that no functions have been identified for that RLD.

RING finger domains (the HERC proteins and Pam), or in proteins with other catalytic activities, such as kinases. RLDs can also be associated with protein–protein interaction domains such as the BTB domain (Broad complex, Tramtrack and Bric à brac) of the RCBTB subgroup.

Concerning the RLDs themselves, these are domains of usually around 400 amino acid residues (from 355 to 411), with the exceptions

of PAM and Alsin, whose RLDs are bigger than the rest at 478 and 523 residues, respectively (Table 1). Fig. 2 shows an alignment of all reported human RLDs, i.e. those present in the proteins shown in Fig. 1. The RLDs shown in these two figures are recognized as such by the InterPro database (entry IPR009091) [14] and also by the Superfamily database (entry 50985) (<http://supfam.cs.bris.ac.uk/SUPERFAMILY>). In

the former webpage, information is available on the hidden Markov model-based algorithm used for establishing the presence and location of RLDs in protein sequences.

As previously described, the RLD of RCC1 is made of seven repetitive sequences of 51–68 amino acid residues each, which together constitute the full domain [15]. These repeats, known as RCC1 repeats, are defined by another algorithm that can be found in the Prosite database (entry PS50012) [16], or in InterPro (entry IPR000408) [14]. Although all RLD sequences align well with the RLD of RCC1 (Fig. 2), not all of them contain seven RCC1 repeats according to the definition just mentioned. Thus, while the RLDs of RCC1, DelGEF, HERC1 (both RLDs), HERC2 (the last two RLDs), HERC3 and HERC4 all contain seven canonical RCC1 repeats, all other RLDs contain between three and six RCC1 repeats (PAM and IBtk have three; RCBTB2, HERC5 and the first RLD in HERC2 have four; TD-60, HERC6, RCBTB1, Nek8 and Alsin have five; WBSCR16, Nek9 and RPGR have six). However, the absence of seven canonical RCC1 repeats in these RLDs should not be interpreted as meaning that these RLDs do not have seven repeats. As a matter of fact, all these RLDs have sequences that correspond, both in length and in similarity (Fig. 2), to each of the seven repeats in RCC1. Therefore, these RLDs do indeed contain seven repeats, some of which qualify as bona fide RCC1 repeats, while the rest are non-canonical RCC1-like repeats [17]. The next section will address the relationship between these sequence repeats and the three-dimensional structure of these proteins.

In Fig. 3A, a phylogenetic tree of all known human RLDs is shown. As explained in the figure legend, this tree was generated from the alignment in Fig. 2. Interestingly, the tree shows that the five subgroup-based classification mentioned earlier for RLD-containing proteins (Fig. 1) does not accurately reflect the phylogenetic relationships between RLDs. Thus, for the RCC1 subgroup, the RLDs of RCC1, TD-60 and WBSCR16 are closely related, but they are very different from that of DelGEF. Regarding the HERC subgroup, their RLDs cluster in two separate regions, corresponding to the large (HERC1–2) and small (HERC3–6) HERC proteins, respectively. In the RCBTB subgroup, all three RLDs are closely related to each other, as happens with the Kinase subgroup. Finally, the miscellaneous subgroup has no phylogenetic basis at all, since its three members are not closely related to each other: Alsin RLD is most similar to the RLDs of small HERCs, PAM's RLD is closest to those in the RCBTB subgroup and the RLD of RPGR clusters with those of RCC1 subgroup members RCC1, TD-60 and WBSCR16.

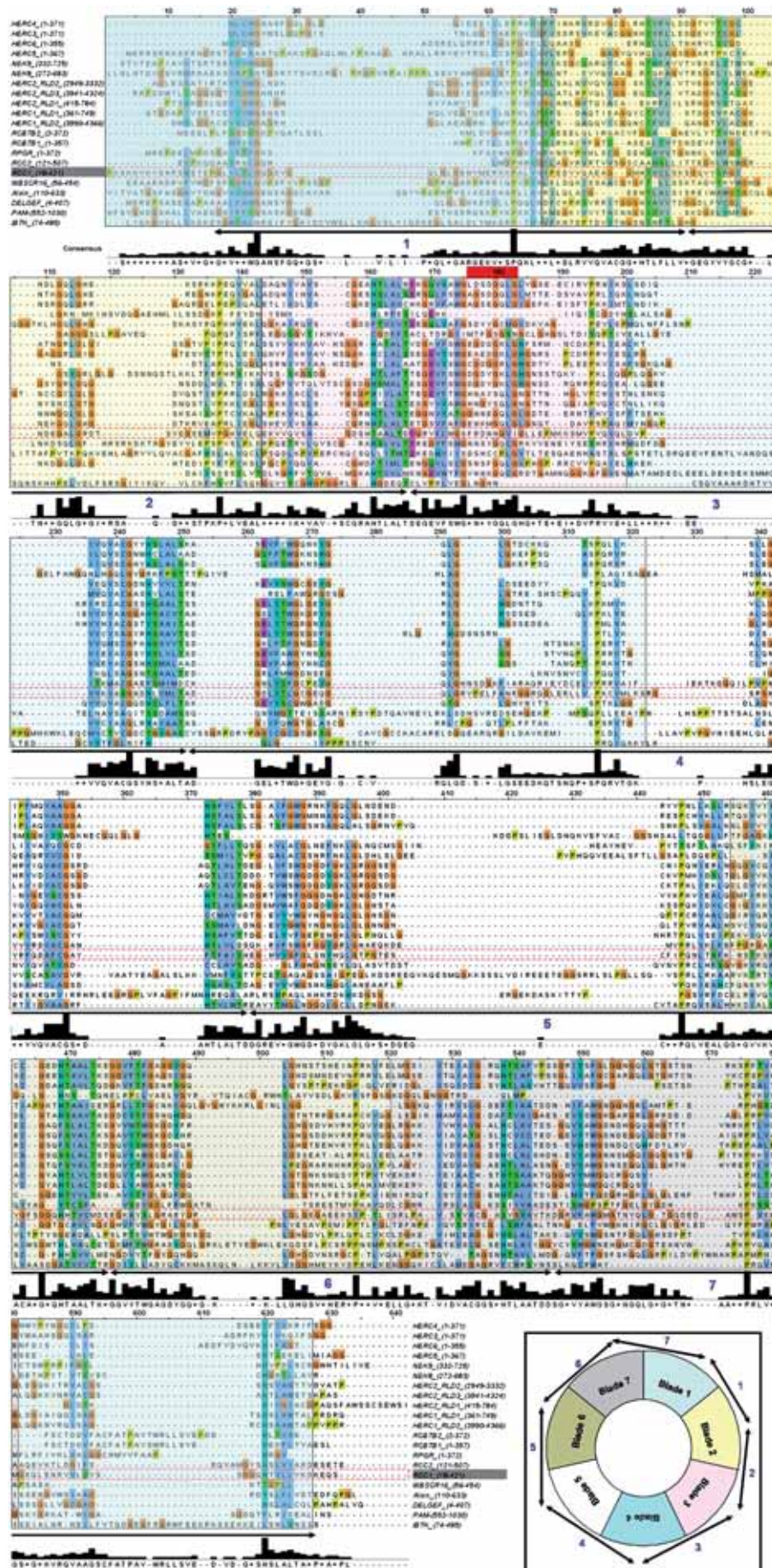
Very little is known regarding the evolution of RLDs. The fact that RCC1 repeats and RLDs are found in all sorts of organisms, including prokaryotes, unicellular eukaryotes, plants, fungi and animals (as shown by the Pfam database, entry PF00415 [18,19]), suggests a very ancient origin for this domain, possibly previous to the appearance of eukaryotic organisms. Nevertheless, other possibilities have been suggested, such that prokaryotes got their RLDs later on by horizontal gene transfer from eukaryotes [17,20]. Even less can be said about the mechanisms that gave rise to the first RLDs. In this respect, the fact that exons in RCC1 roughly match its sequence repeats seems to indicate that the RLD arose by sequential duplication of an ancestral repeat module, but this has yet to be proven [17]. In any case, regardless of how RLDs first came into being, they have proven to be very useful and versatile protein domains, as evidenced by their widespread distribution and their conservation between species.

3. Three-dimensional structure

To this day, only two three-dimensional structures of RLDs have been published [15,21,22]. One of them corresponds to the bacterial β -lactamase inhibitor protein-II (BLIP-II) from *Streptomyces exfoliatus* [21], while the other is that of human RCC1 [15]. Since both structures are remarkably similar, we will focus our discussion mainly on the latter. Ten years ago, Renault et al. reported that the crystal structure of RCC1 resembles that of the WD40 domain, which is present, among others, in the beta subunits of trimeric G proteins [15]. Despite their distinct amino acid sequences, RLD and WD40 domains share a tertiary structure which is reminiscent of a seven-bladed propeller [15]. In RCC1, each of these blades consists of a four-stranded antiparallel β -sheet, with the inner strand of each blade aligned with the central shaft of the propeller, which is filled with water molecules [15]. Interestingly, the seven repeats identified in RCC1 by primary sequence analysis (see above) do not correspond with the blades of the propeller, but rather each sequence repeat contains the third and fourth β -strands of one blade, followed by the first and second β -strands of the next blade [15] (inset Fig. 2). As a result of this, one of the blades in the propeller consists of the last half of the seventh sequence repeat, followed by the first half of the first sequence repeat, an arrangement that behaves as a molecular clasp, closing the circular structure [15]. A superimposition of all seven blades in RCC1 shows a very remarkable structural similarity in the first three β -strands of each blade, suggesting that these strands are the most essential to maintain the overall propeller structure [15]. By contrast, the fourth strand, the outermost one in each blade, is structurally more variable, and it is likely that these strands play a more important role in the interactions of RCC1 with other molecules. Consistent with this, BLIP-II, which also folds as a seven-bladed β -propeller, only has three β -strands per blade, confirming that the outer β -strand is not required to maintain the core propeller structure [21]. Each of the blades in RCC1 contains several highly conserved residues, including three glycine residues that are required for the sharp turns between the different strands, as well as hydrophobic residues that stabilize the antiparallel β -sheets [15]. In the outer strands, there are also several conserved residues, including an invariable *cis*-proline [15]. Both the N- and the C-terminal tails of RCC1 are located on the same side outside the propeller plane, with the N-terminal tail containing a nuclear localization signal (NLS) as well as phosphorylation and methylation sites [23–26]. While N-terminal methylation is required for binding of RCC1's N-terminal tail to nucleosomal DNA, core nucleosomal histones bind to the propeller itself at the same side where N- and C-termini protrude [23,27]. On the opposite side of the propeller, multiple Ran-binding residues can be found, in addition to those involved in catalyzing nucleotide exchange on this small GTP-binding protein [15]. A critical role in this latter function is carried out by the β -wedge, a rigid β -sheet protruding prominently from blade-3 (residues 146–153), which is directly involved in destabilizing the association between Ran and GDP, thus eliciting GDP release and subsequent GTP uptake by Ran [15]. As expected, no β -wedge is present in BLIP-II [21].

Given this wealth of structural data for RCC1, the question arises as to whether RCC1's structural features are conserved in other RCC1 superfamily proteins, and to what extent. In principle, given the sequence homology between RCC1 and the other RLDs, it would seem

Fig. 2. Multiple alignment of the RLDs of all known human RCC1 superfamily proteins. The sequences used correspond to the entries shown in Table 1. This figure has been generated using ClustalW and Jalview [158–160], then edited manually. Alignments are colored using the Clustal-IX scheme in Jalview (glycines are shown in orange, prolines in lime green, small and hydrophobic amino acids (A, V, L, I, M, F, W) in blue, hydroxyl and amine amino acids (S, T, N, Q) in dark green, negatively charged amino acids (D, E) in magenta, positively charged amino acids (R, K) in red and histidines and tyrosines in dark blue. The consensus sequence and degree of conservation (graph in black) are shown under the alignment [158–160]. A phylogenetic tree was generated from this alignment and is shown in Fig. 3A. The RCC1 sequence has been highlighted with a red rectangle (dashed line), and the sequences corresponding to its seven internal repeats are marked by bidirectional arrows [15]. A red filled rectangle around sequence number 180 represents the location of the RCC1 β -wedge. HERC1 and HERC2, which have more than one RLD, have each of their domains numbered. In the bottom right, a schematic representation depicts the relationship between the seven propeller blades (each in different colors also represented in the alignment) of RCC1 and its seven sequence repeats [15].



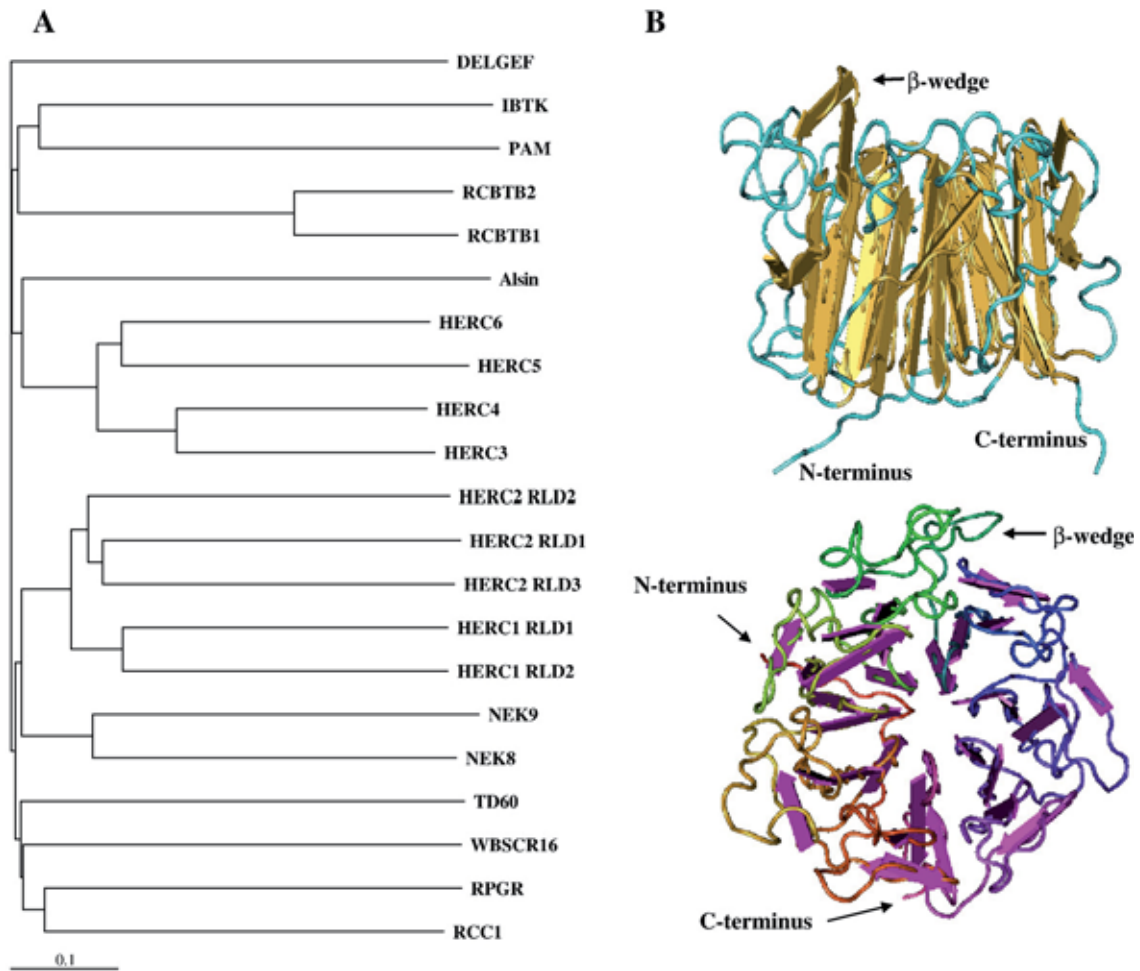


Fig. 3. (A) Phylogenetic tree of the RLDs of all human RCC1 superfamily proteins. The tree was generated using ClustalW and Jalview [158–160]. (B) Human RCC1 1.7 Å structure [15,22]. (top) lateral view of the β -propeller showing the β -wedge, necessary for the GEF activity of RCC1 on Ran, and the N- and C-termini of RCC1. (bottom) frontal view of the β -propeller. The figure was generated and edited using the Cn3D program (www.ncbi.nlm.nih.gov/structure/Cn3D/cn3d.shtml) (Protein Data Bank entry for the human RCC1 structure is 1A12).

likely that many of these RLDs also adopt β -propeller structures. In the following paragraphs, we will present evidence pointing in this direction, but it must be kept in mind that definitive evidence will only be provided by high-resolution structural analyses like those published for RCC1 and BLIP-II [15,21].

A first piece of evidence favouring the hypothesis that most or all RLDs fold as seven-bladed β -propellers lies in the fact that BLIP-II, despite being a bacterial protein and having only four canonical RCC1 repeats (and three non-canonical ones), also adopts this same folding [21], thus indicating that RCC1-like repeats need not be canonical in order to give rise to the antiparallel β -sheets that constitute the blades. In order to further test our hypothesis, we analyzed whether critical residues needed for propeller formation in RCC1 are conserved in the other human RLDs. There are only four residues that are conserved in all seven repeats in RCC1: three glycines needed for the turns between β -strands and a *cis*-proline in the last strand of each blade [15]. We counted how many of these 28 residues in RCC1 were conserved in each of the other RLDs. To do that, we scored as positive hits those cases in which an RLD had the same residue as RCC1 in either the same position (as defined by the alignment in Fig. 2), or up to two residues away from the expected position. Using these criteria, we found that most RLDs (14 out of 20) contain at least 80% of the 28 studied residues in the appropriate positions. For the other six RLDs, the values are over 70% for PAM, Nek8 and Nek9, 60% for IBtk, 50% for Alsin, and only 35% for HERC5. Therefore, on the basis of these data alone, HERC5, Alsin and IBtk would be the least likely candidates to share a common three-dimensional fold with RCC1.

Another hint as to whether other RLDs also fold as seven-bladed β -propellers can be found by looking at the predicted secondary structures for these domains. We used the Hierarchical Neural Network (HNN) secondary structure prediction method (<http://npsa-pbil.ibcp.fr>) to do this for all the RLDs in Fig. 2. In all cases, these RLDs are predicted to contain multiple β -strands at roughly the expected positions, and these strands are almost invariably followed very closely by glycine residues. This is true even for HERC5, Alsin and IBtk, suggesting that our previous failure to identify these glycines is probably due to these residues not being well aligned in Fig. 2 with their counterparts in the other RLDs. Altogether, the observations presented here suggest that most or all RLDs fold as seven-bladed β -propellers, although, as has been said, definitive proof is not yet available.

Even if the overall propeller structure is broadly conserved among these proteins, there is still room for significant variability among individual RLDs. As mentioned above, the RLD of RCC1 contains an extra β -sheet, also known as the β -wedge, which sticks out of the propeller between the third and fourth β -strands of blade-3. This β -wedge, which is critical for RCC1 function, does not appear to be conserved in other RLDs (Fig. 2, red filled box). The existence of the β -wedge in RCC1 proves an important point, namely that specific structural motifs can be intercalated between the β -strands of the propeller (at least between the third and fourth strands of a blade) without disrupting β -propeller structure, and that these specific motifs may bestow important functions upon the RLDs containing them. Hence, other RLDs may also contain analogous motifs (not necessarily similar to RCC1's β -wedge), which may confer important

and specific activities to these domains without affecting their overall folding pattern. But again, more three-dimensional structures of RLDs will be needed in order to determine whether this is the case or not.

4. Tissue and subcellular localization

While some human RLD-containing proteins, such as RCC1, have essential cellular functions and seem to be expressed in virtually all cell types, others, like IBtk, have more restricted expression patterns and their functions are likely to be more tissue-specific. On the other hand, the subcellular localizations of all these proteins are dependent on which other molecules they interact with inside cells. In the RCC1 subgroup, RCC1 and TD-60, both of which have essential cell cycle functions and are widely expressed, have nuclear localization signals (NLS) [26,28,29] and are therefore located in the nucleus during interphase (it must be noted, however, that TD-60 is only expressed in the G2 and M phases of the cell cycle [30], while RCC1 levels are cell cycle-independent). By contrast, during cell division RCC1 is associated with mitotic chromosomes [24,29], whereas TD-60 is associated with the inner centromeres, from which it migrates to the spindle midzone at later stages of mitosis [28]. While the RLD plays an important role in RCC1's association to chromatin [23,27,31], nothing is known about how TD-60 interacts with centromeres and the mitotic spindle. Likewise, not much is known about the two other RCC1 subgroup members, DelGEF and WBSR16, other than the fact that DelGEF has two isoforms, one of which (DelGEF1) is located primarily in the nucleus, but also in the cytoplasm, whereas the other (DelGEF2, having a truncated RLD) seems to localize in mitochondria [8,32,33]. Concerning the HERC subgroup, all members are expressed in most if not all tissues, but at varying levels. Thus, HERC1, HERC2, HERC4 and HERC6 mRNAs are especially abundant in brain and testis [4,7,34], HERC3 is more prevalent in brain [7,35] and HERC5 is expressed at much higher levels in testis than in any other tissue [7,36,37]. In addition, HERC5 and HERC6 levels in certain cell types have been shown to be regulated by inflammatory mediators, but this will be dealt with in the following section [37–40]. In terms of their intracellular localizations, these proteins seem to be cytosolic, although they can also be found associated to intracellular membranes by virtue of their interactions with other proteins or lipids [4,5,7,41–45]. Regarding the kinase subgroup, Nek9 appears to be a ubiquitous mitotic regulator, whereas Nek8 mRNA is more abundant in liver, kidney and testes, although it is also present in other tissues [46]. There is some controversy as to whether Nek9 is located mainly in the nucleus or the cytosol [47–49]. In any case, however, it is clear that Nek9 has an NLS and the nuclear-to-cytoplasm ratio of the protein can be affected by the adenoviral E1A protein [49]. On the other hand, Nek8 has been shown to reside in the cytoplasm and in the proximal region of primary cilia in kidney epithelial cells [50,51]. Not much is known about the localization of RCBTB subgroup members, apart from the fact that IBtk seems to be specifically expressed in lymphocytes, where it is found underlying the plasma membrane [52]. As to the miscellaneous subgroup, an interesting case is that of RPGR, for which several isoforms have been reported [9,11,12]. Apart from a recently described isoform which predominates in the inner segments of retinal cones and whose RLD is slightly truncated [11], the two main RPGR isoforms seem to be RPGR^{ex1-19} and RPGR^{ORF15}. Both share the same RLD but differ in their C-termini, where RPGR^{ORF15} has a glutamic acid-rich domain and a nucleophosmin-binding domain that are absent in RPGR^{ex1-19} [9,53]. Both isoforms associate with microtubule-containing structures such as the connecting cilia of retinal photoreceptors, where RPGR^{ORF15} predominates [54], or the transitional zone of motile cilia in airway epithelia, where only RPGR^{ex1-19} can be found [54]. In addition, RPGR^{ORF15} localizes to centrosomes/spindle poles in cultured cell lines that lack cilia as well as in the basal body in ciliated cell lines [53]. RPGR^{ORF15} can also be

found in the tip and axoneme of sperm flagella [55]. Although RPGR interacts with a number of different proteins, the RLD-mediated interaction of RPGR with RPGRIP is of critical importance to target RPGR to the photoreceptor connecting cilium [56]. Regarding the Alsin protein, its levels have been found to be highest in brain, but other tissues also contain smaller amounts of the protein [57]. Alsin has been localized to multiple sites within the cell: the cytosol, endocytic compartments, including early endosomes and macropinosomes, and actin-rich structures such as membrane ruffles and lamellipodia [57–59]. Interestingly, the RLD of Alsin seems to prevent binding to these membrane-bound compartments, maybe because of an intramolecular interaction between the N-terminal RLD and the C-terminus of the protein [59]. Finally, PAM is expressed ubiquitously but with higher mRNA levels in brain and thymus [60]. In mouse and rat brains, mRNA levels of the respective PAM orthologs are most abundant in the pyramidal cells of the hippocampus and in the granule cells of the dentate gyrus and cerebellum [61]. PAM expression is also developmentally regulated, with mRNA levels increasing in mouse in the two weeks immediately after birth, until they reach adult levels [61]. At the subcellular level, PAM has been found to reside in the nucleus, but it is also present in the cytosol and in the neurites of nerve cells [60,62,63].

5. Functions

At the functional level, RCC1 is undoubtedly the best characterized member of the family. RCC1 is a guanine nucleotide exchange factor (GEF) for Ran (*Ras*-related nuclear) [for review on GEFs, see [64]]. The fact that Ran-GEF, i.e. RCC1, is in the nucleus whereas Ran-GAP (Ran GTPase activating protein) is in the cytoplasm gives rise to a gradient of the active form of Ran that acts as the driving force behind vectorial nucleocytoplasmic transport [65]. By contrast, during cell division the same gradient is established around mitotic chromosomes, to which RCC1 binds by means of its interaction with DNA and histones [23,27,31,66], an interaction that allosterically regulates RCC1's GEF activity [31]. This mitotic gradient, in turn, has a critical role first in mitotic spindle formation and then in nuclear envelope reassembly [67,68]. Unlike other RLD-containing proteins, RCC1 seems to be present in all eukaryotic organisms, including the baker's yeast *Saccharomyces cerevisiae*, where it is known as Prp20p or Srm1 [69–73], and the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*, where its name is Pim1 [74,75]. These RCC1 orthologs seem to be the only RLD-containing proteins in these organisms, and their functions appear to be very similar to their mammalian counterparts, as shown by the fact that these proteins also act as GEFs for the yeast orthologs of Ran [69–75]. Also consistent with a broad evolutionary conservation of RCC1's functions, both Prp20p and Bj1 (fruit fly's RCC1) can rescue the phenotype of RCC1 mutation in hamster cells [70]. This high degree of conservation suggests that functions so far only ascribed to some of the RCC1 orthologs, such as the role of Prp20p in nuclear pore complex (NPC)-mediated transcriptional control [76], may also be conserved in other organisms, although this remains to be proven.

Not so much is known about the other RLD-containing proteins. TD-60 is a member of the chromosome passenger complex (CPC) in inner centromeres and plays an essential role in prometaphase to metaphase progression [28], where it is required for proper localization of other CPC proteins (INCENP and Aurora B), for Aurora B kinase activation together with microtubules and for proper alignment of chromosomes on the metaphase plate [28,77]. TD-60 also seems to play a role in cytokinesis, but the mechanisms are not yet clear [30]. In addition, TD-60 has been shown to interact preferentially with the nucleotide-free form of Rac1, suggesting that TD-60 might be a Rac1-GEF, although this has not been demonstrated [28]. DelGEF regulates proteoglycan secretion by binding to DelGIP1 (DelGEF Interacting Protein 1) and to the exocyst component Sec5 [32,33], whereas WBSR16 (also known as WBS16) is yet to be studied.

The HERC proteins have a HECT (Homologous to E6-AP COOH-terminus) domain and at least one RLD (for review see [5]). The HECT domain of these proteins is believed to be involved in the transfer of ubiquitin or ubiquitin-like proteins to target substrates [78]. In this respect, HERC5, which was initially described as Ceb1 [36], has been found to catalyze the transfer of ISG15 (interferon-stimulated gene-15), a protein related to ubiquitin, to a number of cellular proteins in response to interferon- α/β [38–40]. Moreover, HERC5 activity as an ISG15 ligase has been shown to be abolished both by mutation of the active site cysteine (Cys-994) in the HECT domain and by deletion of the RLD [38,39]. Apart from that, HERC5 mRNA has been shown to be induced by a number of inflammatory mediators, including LPS, TNF- α , IL-1 β and IFN- α/β [37–39], whereas HERC5 protein levels are downregulated in response to LPS [37]. The HERC5 protein also interacts with both cyclin E and p21 and its levels rise in response to compromised p53 or retinoblastoma (Rb) activity, which suggests a role in the cell cycle [36]. Whether or not the roles of HERC5 in inflammation and the cell cycle are connected with each other has not been established yet. Interestingly, the HERC5 gene has only been found in primates, so it is unclear whether its functions are primate-specific or, alternatively, they are performed in other species by its close homolog HERC6 [7]. Consistent with the latter hypothesis, HERC6 is present in rodents and is also regulated by interferon- β [7,38].

HERC1, formerly known as p532, has been shown to bind to the tumor suppressor TSC2 and it has been suggested that HERC1 could be involved in TSC2 ubiquitination, but this has not been proven [79]. On the other hand, *in vitro* studies have shown that the HECT domains of both HERC1 and HERC3 form covalent thioester bonds with ubiquitin, suggesting that they have E3 ubiquitin ligase activity, but no target has been found in either case [41,80]. Furthermore, the RLD1 of HERC1 has been shown to associate with phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PI(4,5)P₂), an interaction that is required for the ability of this domain to act as a guanine nucleotide release factor (GRF) for small GTP-binding proteins of the ARF and Rab families [4,42]. In addition, binding of the RLD1 to PI(4,5)P₂ has been suggested to be responsible for the recruitment of HERC1 onto actin-rich membrane protrusions [43]. HERC1 RLD2, on the other hand, interacts directly with clathrin heavy chain (CHC), which suggests a role for HERC1 in vesicular transport [44]. Although no biochemical studies exist concerning the function of HERC2, the phenotype of HERC2 mutant mice suggests a possible role for this protein in either vesicular trafficking or the cell cycle of specific cell types, but this awaits demonstration [34]. Regarding HERC3, in addition to having an active HECT domain [41,80], this protein has been shown to undergo ubiquitin-mediated proteasomal degradation and to non-covalently interact with ubiquitin [41]. However, even though its intracellular localization suggests a role in vesicular trafficking, nothing is yet known about the precise function of this protein [41]. Since HERC3 is most closely related to HERC4, it is possible that both proteins share similar functions. HERC4 has recently been identified as an important player in spermatogenesis [45]. More precisely, the absence of HERC4, which is normally expressed in all sperm cell precursors but not in mature spermatozoa, causes a significant reduction in sperm cell motility, which is due to incomplete clearance of proteins and organelles from sperm cell precursors, resulting in abnormal flagella in the mature sperm [45]. Although it seems very likely that the role of HERC4 in spermatogenesis is based on its ubiquitin ligase activity, this has not been demonstrated [45].

In the kinase subgroup, Nek9 is a p34/Cdc2 substrate with critical roles in cell cycle progression, both during interphase [47] and during mitosis [48,81]. In addition, Nek9 binds to Ran through both its RLD and kinase domains, but Ran-GEF activity like that of RCC1 has not been demonstrated [48] and it is thought to be unlikely given the relatively low similarity between the RLDs of both proteins [48]. Instead, the RLD of Nek9 is thought to play an autoinhibitory role by

direct binding to the kinase domain [48,82,83]. Finally, the C-terminus of Nek9 has been shown to interact with Nek6 and Nek7, two members of the Nek family of kinases that, unlike Nek8 and Nek9, do not have RLDs [81]. In contrast to the cell cycle function of Nek9, Nek8 appears to regulate primary cilia length in kidney epithelial cells [84], which in turn may be a consequence of Nek8's ability to affect the phosphorylation status of other proteins, such as polycystin-2, a ciliary protein [85], or Bicc2, a protein involved in microtubule-dependent transport [50,86]. In the RCBTB subgroup, IBtk acts as an inhibitor of Bruton's tyrosine kinase (Btk) in lymphocytes [52], but nothing else is known about these proteins.

Concerning the last subgroup, Alsin was initially reported to act as a GEF for Rab5, via its Vps9 domain, and for Rac1, via its DH-PH domain [58]. Nevertheless, while the role of Alsin as Rab5-GEF seems to have stood the test of time, the same cannot be said for its purported Rac1-GEF activity, which is a source of controversy [59]. Indeed, a recent report suggests that Alsin acts as a downstream effector of active Rac1, rather than as a Rac1 upstream activator [59]. According to this study, Rac1 activation recruits Alsin to membrane ruffles and macropinosomes, which in turn leads to Alsin-mediated Rab5 activation and subsequent Rab5-dependent fusion of macropinosomes with other endosomes. Further evidence favouring a role for Alsin in the control of endocytic events comes from a number of additional studies [87–89]. In particular, Alsin's RLD has been shown to bind to GRIP1 (Glutamate receptor-interacting protein-1) and thereby control surface expression of AMPA-type glutamate receptors in neurons [89]. Moreover, neurons from Alsin^{-/-} mice show defects in ligand-induced TrkB and IGF-1R endocytosis, which may be due to faulty Rab5-dependent endosome fusion [88]. Finally, Alsin's RLD has been shown to interact with the C-terminal half of Alsin (encompassing its MORN and Vps9 domains) and this has been proposed to play a role in the regulation of Alsin's translocation to the plasma membrane, but this remains unproven [59].

Concerning RPGR, mounting evidence suggests that it has an important role in regulating microtubule-dependent transport along cilia (see [9] for review). First of all, RPGR is located in cilia in different tissues (see Tissue and subcellular localization) and interacts, directly or indirectly, with a number of axonemal and basal body proteins, as well as with microtubule motor proteins [9,53,55,90–93]. Moreover, mutations in RPGR lead to malfunction of cells/tissues that depend on ciliary function for their proper operation, such as retinal photoreceptors (which require transport along their connecting cilia in order to properly assemble the light-capturing discs on their outer segments), airway epithelia or sensory cells in the cochlea (see Involvement in diseases). Apart from this, RPGR has been shown to associate, via its RLD, with the delta subunit of rod cGMP-phosphodiesterase, but the functional significance of this interaction is not entirely clear [94].

As its name reveals, PAM (protein associated with Myc) was identified by virtue of its binding to the transcriptional activation domain of Myc [60]. More recently, alternative splicing of PAM has been shown to regulate its binding affinity for this transcription factor [10]. The PAM-Myc interaction takes place in the nucleus, where PAM is enriched [60], and, although nothing is known about the functional significance of this interaction, a possible role is suggested by the fact that PAM is downregulated in quiescent and senescent fibroblasts relative to replicative ones [95]. Apart from the nucleus, PAM is also found in the cytoplasm, where it has been shown to act as a potent inhibitor of certain adenylyl cyclase (AC) isoforms [96]. In particular, when HeLa cells are treated with sphingosine-1-phosphate, PAM translocates from the endoplasmic reticulum to the plasma membrane and this results in a long-lasting inhibition of AC and of agonist-stimulated cAMP accumulation [97]. Remarkably, the RLD of PAM is sufficient for AC inhibition [96], and different residues within the RLD have been implicated in AC binding and inhibition, respectively [98]. In addition to its roles in the nucleus and in controlling cAMP-

mediated signaling, PAM has other tissue-specific functions. First, a role for the murine ortholog of PAM in the male germline is suggested by the fact that PAM mRNA contains a 26-nucleotide sequence that binds to DAZL, a germ cell-specific protein with an essential role in sperm production [99]. Although this suggests that PAM protein translation might be regulated during spermatogenesis [100], this has not been demonstrated. By contrast, plenty of evidence shows that PAM and its orthologs have a conserved role in neuronal development and function (for a review, see [101]). In mammals, apart from its higher expression in specific parts of the brain [61] and its role in spinal nociceptive processing, which may be dependent on AC inhibition [102], PAM (known as Phr1 in mouse) has recently been found to play an important role in motor axon navigation in the developing embryo [62]. This function has been connected with Phr1's ability to downregulate DLK, a MAPKKK, and thus block p38 MAPK signaling within axon shafts, which in turn controls the microtubule cytoskeleton [62]. These findings are consistent with previous results suggesting that Phr1 deletion underlies defects in respiratory muscle innervation leading to death of newborn mice [103] (see Involvement in diseases). Furthermore, PAM has been found to colocalize and interact with the TSC1/TSC2 tumor suppressor complex in the neurites and growth cones of brain cortical neurons [63]. This interaction is likely to be evolutionarily conserved, since the *Drosophila* and zebrafish orthologs of PAM have also been shown to functionally interact with this complex [63,104]. In zebrafish, PAM ortholog Esrom is required for the bundling and targeting of retinal axons [104] as well as for tetrahydrobiopterin and yellow pigment production [105]. In *Drosophila*, mutations in the PAM ortholog Highwire lead to increased synaptic growth but also to impaired synaptic function [106,107]. This phenotype is similar to the one observed in *C. elegans* when RPM-1, the worm ortholog of PAM, is mutated [108,109]. Indeed, recent studies have shown that both Highwire and RPM-1 control synaptogenesis in part by inducing the ubiquitination and subsequent degradation of target proteins in the synapse [110–116]. In the nematode, RPM-1 has been shown to be a constituent of a synaptic SCF-like ubiquitin ligase complex including Skp1, Cullin and the F-box protein FSN-1, with which RPM-1 interacts [114]. This complex regulates synaptic cytoarchitecture by mediating the degradation of DLK-1, a MAPKKK, and thereby suppressing signaling through a MAPK cascade involving DLK-1, MKK-4 (MAPKK) and PMK-3 (a p38 MAPK) [115]. Much of this pathway seems to be conserved in the fly (and probably in mouse also, see above), where Highwire also collaborates with Dfsn (FSN-1 ortholog) [113] to induce degradation of Wallenda/DLK (DLK-1 ortholog) [112]. However, instead of suppressing a p38 MAPK cascade like RPM-1 does, Highwire suppresses activation of JNK and of the Fos transcription factor [112]. Nevertheless, suppression of MAPK signaling only explains part of the synaptic defects of RPM-1/Highwire loss-of-function mutants [107,112,116,117]. Thus, Highwire also acts by suppressing BMP signaling, which it probably achieves by inducing the ubiquitin-mediated degradation of the co-Smad protein Medea [117]. On the other hand, other downstream targets of RPM-1 include the GLO-4/GLO-1 pathway [116] and possibly the receptor tyrosine kinase ALK [114]. Interestingly, the N-terminal half of RPM-1, which includes its RLD but not its RING finger necessary for ubiquitin-dependent functions, has been shown to interact with GLO-4, itself an RLD-containing protein which in turn regulates the function of a Rab GTP-binding protein named GLO-1 [116]. This RPM-1/GLO-4/GLO-1 pathway, which acts in parallel with the RPM-1/DLK-1/MKK-4/PMK-3 one, regulates synaptic physiology by affecting late endosome function [116]. Although GLO-4, a protein most closely related to RPGR, DelGEF and *Drosophila* Claret, is a candidate GLO-1-GEF, this has not been demonstrated [116].

To finish this section, the available information on RCC1 superfamily proteins lacking clear mammalian orthologs will be briefly reviewed. As has been said, GLO-4 is most closely related to *Drosophila* Claret. Both GLO-4 and Claret have been shown to act upstream of Rab

proteins (GLO-1 and Lightoid, respectively) and both are needed for the formation of lysosome-related organelles (gut granules in the case of GLO-4, eye pigment granules in the case of Claret) [118,119]. In addition, the RLD of Claret has been shown to bind preferentially to the nucleotide-free form of Lightoid, suggesting that Claret may act as a Lightoid-GEF. Whether Claret/Lightoid share the function of GLO-4/GLO-1 at the synapse remains to be determined. PARF-1 is an *Arabidopsis thaliana* protein containing PH, RLD and FYVE domains that has been shown to bind monophosphorylated phosphoinositides [120]. UVR8 (UV-resistance locus-8) is another *Arabidopsis* protein that, like RCC1, consists of a canonical RLD flanked by short N- and C-terminal tails (curiously, though, the closest mammalian homolog of UVR8 RLD is the RLD of HERC4, which is 38% identical). UVR8 accumulates in the nucleus in response to UV-B light and orchestrates the plant UV response by binding to chromatin via histones and inducing the expression of downstream genes such as HY5 and those involved in flavonoid biosynthesis [121–123]. Nd6p (non-discharge protein-6) is found in the protozoan *Paramecium tetraurelia* and presents two RLDs on its N-terminus [124]. Nd6p is required for dense core granule exocytosis and the RLDs seem to be essential for this function [124]. In bacteria, the Pfam database finds 65 proteins with canonical RCC1 repeats. Although none have been described yet, it will be interesting to see what proteins like Q74DR4 (Swissprot accession number), with more than 2000 amino acid residues and six RCC1 repeats in its N-terminus, are doing in bacteria such as *Geobacter sulfurreducens* [18,19]. Even a few viruses seem to contain RLD proteins, as is the case for neseORF72 and neseORF73, found in *Neodiprion sertifer* nucleopolyhedrovirus [18,19].

6. Involvement in diseases

Mutations in RCC1 superfamily proteins have been linked to several diseases. Among these, one of the best studied cases is that of RPGR, mutations of which are responsible for 70–80% of cases of X-linked retinitis pigmentosa (XLRP), one of the most severe forms of human retinal degeneration [9]. More than 200 disease-causing mutations have been identified in RPGR, many of them affecting its RLD. The vast majority of RPGR mutations (~95%) lead to XLRP, whereas the remaining 5% include other kinds of retinal degeneration and also, in four cases, ciliary dyskinesia, a disease whose symptoms include upper respiratory tract and middle ear infections as well as hearing loss [9]. All these phenotypes, together with the functional data reviewed above, are consistent with a role for RPGR in microtubule-dependent transport along cilia [9].

Alsin was discovered as the gene encoded by the ALS2 locus, which had been linked to an autosomal recessive form of juvenile-onset amyotrophic lateral sclerosis (jALS) [125,126]. To this day, ten disease-causing mutations have been identified in the Alsin gene, all of which lead to the production of truncated proteins (see [127,128] for reviews). Interestingly, in those cases where truncations are very early in the protein, affecting its RLD domain, these mutations lead to jALS, a condition where both upper and lower spinal cord motoneurons degenerate. By contrast, less severe truncations in Alsin lead to either juvenile primary lateral sclerosis (jPLS) or to infantile-onset ascending hereditary spastic paraplegia (IAHSP), in which only upper motoneurons are affected [127]. Surprisingly, Alsin^{-/-} mice do not show obvious motor deficits [129,130], but their neurons appear to be more susceptible to oxidative stress [129]. In this regard, a critical connection between Alsin, oxidative stress and ALS may lie in the fact that Alsin binds to Cu/Zn superoxide dismutase (SOD1), the protein encoded by the ALS1 locus involved in autosomal dominant ALS [131,132]. Furthermore, Alsin has been shown to antagonize the neurotoxic effects of dominant SOD1 mutants, an activity for which the DH-PH domain of Alsin is essential [131,132]. Finally, Alsin^{-/-} mice have recently been shown to have lymphopenia and other hematopoietic abnormalities resembling those also observed in ALS

patients [133,134]. Although this may point to a role for immunodeficiency in the ethiopathogenesis of ALS, this is not yet clear.

Another RLD-containing protein involved in disease is Nek8. In addition to being overexpressed in human breast tumors [135], a mutation in the RLD of Nek8 (G448V) was found to underlie a form of murine autosomal recessive polycystic kidney disease (PKD) known as juvenile cystic kidney, or jck [46,136]. Nek8 localization to cilia is lost in the renal epithelia of these animals, which results in structurally abnormal cilia and leads to cyst formation [84,137]. Although little is known about the detailed mechanisms controlling cystogenesis, this process appears to be regulated by a pathway involving both Nek8 and Pkd1, another protein involved in PKD [138]. On the other hand, mutations in human Nek8 have very recently been identified as the cause of nephronophthisis type 9, a juvenile renal cystic disease [139], and it has been suggested that Nek8 might also be linked to human PKD [140].

Also involved in mouse pathology is HERC2, mutations of which lead to the rjs syndrome (runty, jerky, sterile), also known as jdf2 (juvenile development and fertility-2) [34,141,142]. Although the pathogenic mechanisms of this syndrome are not known, it has been suggested that at least some of its symptoms could be due to pituitary defects [34]. In humans, the HERC2 genomic locus, including multiple partially duplicated paralogs of HERC2 [143], corresponds to the chromosomal breakpoint region in deletions causing Prader–Willi and Angelman syndromes [144,145]. However, lack of HERC2 protein does not seem to play a role in any of these syndromes [142]. Likewise, in a very recent set of papers, a single nucleotide polymorphism (SNP) in intron 86 of the HERC2 gene has been shown to determine human blue/brown eye color, but this intronic sequence has its effects by controlling the expression of the neighboring OCA2 gene [146–148].

Concerning other HERC proteins, HERC1 was found during the course of a screen aimed at identifying mammary oncogenes and was shown to be overexpressed in tumor cell lines relative to normal ones [4]. More recently, HERC1 has been shown to bind to the tumor suppressor TSC2 [79]. However, in spite of these data, it remains unclear whether HERC1 plays any role in tumorigenesis.

On the other hand, HERC5 seems to be an important player in the innate immune response [37–39]. Initially, HERC5 expression in endothelial cells was found to be tightly modulated by proinflammatory cytokines such as TNF- α and IL-1 β and by the bacterial lipopolysaccharide (LPS), suggesting a role for HERC5 in inflammation and bacterial infections [37]. More recently, HERC5 levels have also been shown to be upregulated by type I interferons, which are themselves expressed in response to bacterial or viral infections [38,39]. Furthermore, it has been shown that, in response to interferons α or β , HERC5 catalyzes conjugation of ISG15, a ubiquitin-like protein, to a broad spectrum of target proteins [38–40]. Although the exact function of ISG15 conjugation, also known as ISGylation, to target proteins is not yet known, it seems clear that this is an important innate defensive mechanism, as supported by the fact that a viral protein, NS1 from influenza B virus, has developed the ability to specifically block ISGylation [149,150].

Apart from the possible presence of anti-PAM autoantibodies in some schizophrenic patients [151], no evidence exists that PAM is involved in any human disease. Nevertheless, Phr1, the murine ortholog of PAM, is the best candidate for a respiratory distress syndrome that kills mice at birth [100]. In these mice, the phrenic nerve fails to completely innervate the diaphragm, whereas the intercostal muscles, though innervated, show dysmorphic nerve terminals [100]. This phenotype is consistent with both the evolutionarily conserved role of Phr1 orthologs in synaptic development [110,112–115] and its effects on motor axon navigation in the embryo [62]. Interestingly, Hirschsprung's disease in humans is often accompanied by congenital central hypoventilation syndrome and it has been proposed that this might be due to genomic deletions encompassing not only the Ednrb

gene (responsible for Hirschsprung's disease) but also the neighboring PAM gene [100].

WBSCR16, whose name comes from the fact that the gene is located in the Williams–Beuren syndrome (WBS) critical region, is one of many genes at 7q11.23 one copy of which is deleted in this neurodevelopmental disorder. WBS is thought to arise as a result of haploinsufficiency of multiple genes in this region and the precise contribution, if any, of WBSCR16 to the WBS phenotype is not known [152].

DelGEF was thus named because of its genomic location in a deafness locus (DFNB18) and its assumed role as a GEF. While there is no evidence of DelGEF having GEF activity, it has been proven that the gene responsible for non-syndromic recessive deafness (DFNB18) is not DelGEF, but USH1C [153]. Therefore, there is no evidence connecting DelGEF with any human disease.

Finally, the RCBTB1 and 2 genes, formerly CLLD7 and CHC1L respectively, are located very close to each other in chromosomal band 13q14. RCBTB1 is a candidate tumor suppressor gene for B-cell chronic lymphocytic leukemia (B-CLL) [154–156], whereas RCBTB2 might be a tumor suppressor in sporadic prostate cancer [157].

7. Conclusions

The initial identification of RCC1 as the guanine nucleotide exchange factor (GEF) for Ran led many to assume that RCC1-like domains (RLDs) in other proteins would also act as GEFs for small GTP-binding proteins. Although this is clearly the case for other domains with GEF activity [64], it does not seem to hold true for RLDs. Indeed, it is becoming clear that different RLDs, rather than sharing a conserved function, share a very versatile conserved structure that has been co-opted by a number of proteins to perform many different functions.

Most often, RLDs participate in protein–protein interactions. These interactions do sometimes involve small GTP-binding proteins, but only in the case of RCC1 has GEF activity been shown conclusively. Although some other RCC1 superfamily proteins are certainly good GEF candidates (e.g. Claret and GLO-4), it remains a mystery how many of them will eventually turn out to be bona fide GEFs. In other cases, binding of an RLD to a target protein may affect protein localization (e.g. RPGR targeting to the connecting cilium depends on its RLD binding to RPGRIP) or may affect the activity of the target protein (e.g. PAM's RLD inhibiting adenylyl cyclase activity). Apart from binding to other proteins, RLDs have also been shown to bind to lipids (the case of HERC1), which underscores the functional versatility of this domain.

It has been more than twenty years since RCC1 was originally identified. Over these two decades, all human RCC1 superfamily proteins, and many non-human ones, have been discovered and most of them are characterized to some extent. In practically all cases, however, the functions of these proteins are only beginning to be understood, which guarantees many fascinating discoveries for the near future.

Acknowledgements

This work was funded by grants from Ministerio de Educación y Ciencia (BFU2004-06329/BMC, BFU2007-65452/BMC), the European Union (Fondos Europeos de Desarrollo Regional (FEDER)), ISCIII (RETIC RD06/0020) and Generalitat de Catalunya (2005SGR00022). O.H. and E.C. T. have been supported by doctoral fellowships from International Graduate School Of Catalunya (IGSOC) and Fundació IDIBELL, respectively.

References

- [1] T. Nishimoto, E. Eilen, C. Basilico, Premature of chromosome condensation in a ts DNA-mutant of BHK cells, *Cell* 15 (1978) 475–483.
- [2] M. Ohtsubo, R. Kai, N. Furuno, T. Sekiguchi, M. Sekiguchi, H. Hayashida, K. Kuma, T. Miyata, S. Fukushige, T. Murotsu, et al., Isolation and characterization of the active cDNA of the human cell cycle gene (RCC1) involved in the regulation of onset of chromosome condensation, *Genes Dev.* 1 (1987) 585–593.

- [3] H. Nishitani, M. Ohtsubo, K. Yamashita, H. Iida, J. Pines, H. Yasudo, Y. Shibata, T. Hunter, T. Nishimoto, Loss of RCC1, a nuclear DNA-binding protein, uncouples the completion of DNA replication from the activation of cdc2 protein kinase and mitosis, *EMBO J.* 10 (1991) 1555–1564.
- [4] J.L. Rosa, R.P. Casaroli-Marano, A.J. Buckler, S. Vilaro, M. Barbacid, p619, a giant protein related to the chromosome condensation regulator RCC1, stimulates guanine nucleotide exchange on ARF1 and Rab proteins, *EMBO J.* 15 (1996) 4262–4273.
- [5] F.R. Garcia-Gonzalo, J.L. Rosa, The HERC proteins: functional and evolutionary insights, *Cell. Mol. Life Sci.* 62 (2005) 1826–1838.
- [6] F.E. Hood, P.R. Clarke, RCC1 isoforms differ in their affinity for chromatin, molecular interactions and regulation by phosphorylation, *J. Cell Sci.* 120 (2007) 3436–3445.
- [7] K. Hochrainer, H. Mayer, U. Baranyi, B. Binder, J. Lipp, R. Kroismayr, The human HERC family of ubiquitin ligases: novel members, genomic organization, expression profiling, and evolutionary aspects, *Genomics* 85 (2005) 153–164.
- [8] J. Uhlmann, S. Wiemann, H. Ponstingl, DelGEF, an RCC1-related protein encoded by a gene on chromosome 11p14 critical for two forms of hereditary deafness, *FEBS Lett.* 460 (1999) 153–160.
- [9] X. Shu, G.C. Black, J.M. Rice, N. Hart-Holden, A. Jones, A. O'Grady, S. Ramsden, A.F. Wright, RPGR mutation analysis and disease: an update, *Human Mutat.* 28 (2007) 322–328.
- [10] T.M. Santos, S. Han, M. Bowser, K. Sazani, R.L. Beauchamp, V. Murthy, P.G. Bhide, V. Ramesh, Alternative splicing in protein associated with Myc (Pam) influences its binding to c-Myc, *J. Neurosci. Res.* 83 (2006) 222–232.
- [11] J. Neidhardt, E. Glaus, D. Barthelmes, C. Zeitz, J. Fleischhauer, W. Berger, Identification and characterization of a novel RPGR isoform in human retina, *Human Mutat.* 28 (2007) 797–807.
- [12] R. Kirschner, T. Rosenberg, R. Schultz-Heienbrok, S. Lenzner, S. Feil, R. Roepman, F.P. Cremers, H.H. Ropers, W. Berger, RPGR transcription studies in mouse and human tissues reveal a retina-specific isoform that is disrupted in a patient with X-linked retinitis pigmentosa, *Hum. Mol. Genet.* 8 (1999) 1571–1578.
- [13] T.J. Hubbard, B.L. Aken, K. Beal, B. Ballester, M. Caccamo, Y. Chen, L. Clarke, G. Coates, F. Cunningham, T. Cutts, T. Down, S.C. Dyer, S. Fitzgerald, J. Fernandez-Banet, S. Graf, S. Haider, M. Hammond, J. Herrero, R. Holland, K. Howe, K. Howe, N. Johnson, A. Kahari, D. Keefe, F. Kokocinski, E. Kulesha, D. Lawson, I. Longden, C. Melsopp, K. Megy, P. Meidl, B. Ouverdin, A. Parker, A. Plic, S. Rice, D. Rios, M. Schuster, I. Sealy, J. Severin, G. Slater, D. Smedley, G. Spudich, S. Trevanion, A. Vilella, J. Vogel, S. White, M. Wood, T. Cox, V. Curwen, R. Durbin, X.M. Fernandez-Suarez, P. Flicek, A. Kasprzyk, G. Proctor, S. Searle, J. Smith, A. Ureta-Vidal, E. Birney, *Ensembl 2007*, *Nucleic Acids Res.* 35 (2007) D610–D617.
- [14] N.J. Mulder, R. Apweiler, T.K. Attwood, A. Bairoch, A. Bateman, D. Binns, P. Bork, V. Buillard, L. Cerutti, R. Copley, E. Courcelle, U. Das, L. Daugherty, M. Dibley, R. Finn, W. Fleischmann, J. Gough, D. Haft, N. Hulo, S. Hunter, D. Kahn, A. Kanapin, A. Kejarivala, A. Labarga, P.S. Langendijk-Genevaux, D. Lonsdale, R. Lopez, I. Letunic, M. Madera, J. Maslen, C. McAnulla, J. McDowall, J. Mistry, A. Mitchell, A.N. Nikolskaya, S. Orchard, C. Orengo, R. Petryszak, J.D. Selengut, C.J. Sigrist, P.D. Thomas, F. Valentin, D. Wilson, C.H. Wu, C. Yeats, New developments in the InterPro database, *Nucleic Acids Res.* 35 (2007) D224–D228.
- [15] L. Renault, N. Nassar, I. Vetter, J. Becker, C. Klebe, M. Roth, A. Wittinghofer, The 1.7 Å crystal structure of the regulator of chromosome condensation (RCC1) reveals a seven-bladed propeller, *Nature* 392 (1998) 97–101.
- [16] N. Hulo, A. Bairoch, V. Bulliard, L. Cerutti, B.A. Cuche, E. de Castro, C. Lachaize, P.S. Langendijk-Genevaux, C.J. Sigrist, The 20 years of PROSITE, *Nucleic Acids Res.* 36 (2008) D245–D249.
- [17] T.J. Stevens, M. Paoli, RCC1-like repeat proteins: a pangemonic, structurally diverse new superfamily of beta-propeller domains, *Proteins* 70 (2008) 378–387.
- [18] A. Bateman, E. Birney, L. Cerruti, R. Durbin, L. Etwiller, S.R. Eddy, S. Griffiths-Jones, K.L. Howe, M. Marshall, E.L. Sonnhammer, The Pfam protein families database, *Nucleic Acids Res.* 30 (2002) 276–280.
- [19] A. Bateman, E. Birney, R. Durbin, S.R. Eddy, K.L. Howe, E.L. Sonnhammer, The Pfam protein families database, *Nucleic Acids Res.* 28 (2000) 263–266.
- [20] H. Ochman, J.G. Lawrence, E.A. Groisman, Lateral gene transfer and the nature of bacterial innovation, *Nature* 405 (2000) 299–304.
- [21] D. Lim, H.U. Park, L. De Castro, S.G. Kang, H.S. Lee, S. Jensen, K.J. Lee, N.C. Strynadka, Crystal structure and kinetic analysis of beta-lactamase inhibitor protein-II in complex with TEM-1 beta-lactamase, *Nat. Struct. Biol.* 8 (2001) 848–852.
- [22] L. Renault, N. Nassar, A. Wittinghofer, M. Roth, I.R. Vetter, Crystallization and preliminary X-ray analysis of human RCC1, the regulator of chromosome condensation, *Acta Crystallogr., D Biol. Crystallogr.* 55 (1999) 272–275.
- [23] T. Chen, T.L. Muratore, C.E. Schaner-Tooley, J. Shabanowitz, D.F. Hunt, I.G. Macara, N-terminal alpha-methylation of RCC1 is necessary for stable chromatin association and normal mitosis, *Nat. Cell Biol.* 9 (2007) 596–603.
- [24] J.R. Hutchins, W.J. Moore, F.E. Hood, J.S. Wilson, P.D. Andrews, J.R. Swedlow, P.R. Clarke, Phosphorylation regulates the dynamic interaction of RCC1 with chromosomes during mitosis, *Curr. Biol.* 14 (2004) 1099–1104.
- [25] H.Y. Li, Y. Zheng, Phosphorylation of RCC1 in mitosis is essential for producing a high RanGTP concentration on chromosomes and for spindle assembly in mammalian cells, *Genes Dev.* 18 (2004) 512–527.
- [26] B. Friedrich, C. Quensel, T. Sommer, E. Hartmann, M. Kohler, Nuclear localization signal and protein context both mediate importin alpha specificity of nuclear import substrates, *Mol. Cell. Biol.* 26 (2006) 8697–8709.
- [27] H. Seino, N. Hisamoto, S. Uzawa, T. Sekiguchi, T. Nishimoto, DNA-binding domain of RCC1 protein is not essential for coupling mitosis with DNA replication, *J. Cell Sci.* 102 (Pt 3) (1992) 393–400.
- [28] C. Mollinari, C. Reynaud, S. Martineau-Thuillier, S. Monier, S. Kieffer, J. Garin, P.R. Andreassen, A. Boulet, B. Goud, J.P. Kleman, R.L. Margolis, The mammalian passenger protein TD-60 is an RCC1 family member with an essential role in prometaphase to metaphase progression, *Dev. Cell* 5 (2003) 295–307.
- [29] W. Moore, C. Zhang, P.R. Clarke, Targeting of RCC1 to chromosomes is required for proper mitotic spindle assembly in human cells, *Curr. Biol.* 12 (2002) 1442–1447.
- [30] S. Martineau-Thuillier, P.R. Andreassen, R.L. Margolis, Colocalization of TD-60 and INCENP throughout G2 and mitosis: evidence for their possible interaction in signalling cytokinesis, *Chromosoma* 107 (1998) 461–470.
- [31] M.E. Nemergut, C.A. Mizzen, T. Stukenberg, C.D. Allis, I.G. Macara, Chromatin docking and exchange activity enhancement of RCC1 by histones H2A and H2B, *Science* 292 (2001) 1540–1543.
- [32] M. Sjolinder, J. Uhlmann, H. Ponstingl, Characterisation of an evolutionary conserved protein interacting with the putative guanine nucleotide exchange factor DelGEF and modulating secretion, *Exp. Cell Res.* 294 (2004) 68–76.
- [33] M. Sjolinder, J. Uhlmann, H. Ponstingl, DelGEF, a homologue of the Ran guanine nucleotide exchange factor RanGEF, binds to the exocyst component Sec5 and modulates secretion, *FEBS Lett.* 532 (2002) 211–215.
- [34] A.L. Lehman, Y. Nakatsu, A. Ching, R.T. Bronson, R.J. Oakey, N. Keiper-Hrynko, J.N. Finger, D. Durham-Pierre, D.B. Horton, J.M. Newton, M.F. Lyon, M.H. Brilliant, A very large protein with diverse functional motifs is deficient in rjs (runty, jerky, sterile) mice, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95 (1998) 9436–9441.
- [35] W. Davies, R.J. Smith, G. Kelsey, L.S. Wilkinson, Expression patterns of the novel imprinted genes Nap115 and Peg13 and their non-imprinted host genes in the adult mouse brain, *Gene Expr. Patterns* 4 (2004) 741–747.
- [36] K. Mitsui, M. Nakanishi, S. Ohtsuka, T.H. Norwood, K. Okabayashi, C. Miyamoto, K. Tanaka, A. Yoshimura, M. Ohtsubo, A novel human gene encoding HECT domain and RCC1-like repeats interacts with cyclins and is potentially regulated by the tumor suppressor proteins, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 266 (1999) 115–122.
- [37] R. Kroismayr, U. Baranyi, C. Stehlik, A. Dorfleutner, B.R. Binder, J. Lipp, HERC5, a HECT E3 ubiquitin ligase tightly regulated in LPS activated endothelial cells, *J. Cell Sci.* 117 (2004) 4749–4756.
- [38] A. Dastur, S. Beaudenon, M. Kelley, R.M. Krug, J.M. Huibregtse, Herc5, an interferon-induced HECT E3 enzyme, is required for conjugation of ISG15 in human cells, *J. Biol. Chem.* 281 (2006) 4334–4338.
- [39] J.J. Wong, Y.F. Pung, N.S. Sze, K.C. Chin, HERC5 is an IFN-induced HECT-type E3 protein ligase that mediates type I IFN-induced ISGylation of protein targets, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103 (2006) 10735–10740.
- [40] T. Takeuchi, S. Inoue, H. Yokosawa, Identification and Herc5-mediated ISGylation of novel target proteins, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 348 (2006) 473–477.
- [41] C. Cruz, F. Ventura, R. Bartrons, J.L. Rosa, HERC3 binding to and regulation by ubiquitin, *FEBS Lett.* 488 (2001) 74–80.
- [42] F.R. Garcia-Gonzalo, R. Bartrons, F. Ventura, J.L. Rosa, Requirement of phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate for HERC1-mediated guanine nucleotide release from ARF proteins, *FEBS Lett.* 579 (2005) 343–348.
- [43] F.R. Garcia-Gonzalo, P. Munoz, E. Gonzalez, R.P. Casaroli-Marano, S. Vilaro, R. Bartrons, F. Ventura, J.L. Rosa, The giant protein HERC1 is recruited to aluminum fluoride-induced actin-rich surface protrusions in HeLa cells, *FEBS Lett.* 559 (2004) 77–83.
- [44] J.L. Rosa, M. Barbacid, A giant protein that stimulates guanine nucleotide exchange on ARF1 and Rab proteins forms a cytosolic ternary complex with clathrin and Hsp70, *Oncogene* 15 (1997) 1–6.
- [45] C.I. Rodriguez, C.L. Stewart, Disruption of the ubiquitin ligase HERC4 causes defects in spermatogenesis and impaired fertility, *Dev. Biol.* 312 (2007) 501–508.
- [46] S. Liu, W. Lu, T. Obara, S. Kuida, J. Lehoczyk, K. Dewar, I.A. Drummond, D.R. Beier, A defect in a novel Nek-family kinase causes cystic kidney disease in the mouse and in zebrafish, *Development* 129 (2002) 5839–5846.
- [47] B.C. Tan, S.C. Lee, Nek9, a novel FACT-associated protein, modulates interphase progression, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 9321–9330.
- [48] J. Roig, A. Mikhailov, C. Belham, J. Avruch, Nerc1, a mammalian NIMA-family kinase, binds the Ran GTPase and regulates mitotic progression, *Genes Dev.* 16 (2002) 1640–1658.
- [49] P. Pelka, A. Scime, C. Mandalfino, M. Joch, P. Abdulla, P. Whyte, Adenovirus E1A proteins direct subcellular redistribution of Nek9, a Nima-related kinase, *J. Cell. Physiol.* 212 (2007) 13–25.
- [50] P.M. Holland, A. Milne, K. Garka, R.S. Johnson, C. Willis, J.E. Sims, C.T. Rauch, T.A. Bird, G.D. Virca, Purification, cloning, and characterization of Nek8, a novel NIMA-related kinase, and its candidate substrate Bicc2, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 16229–16240.
- [51] M.R. Mahjoub, M.L. Trapp, L.M. Quarmby, NIMA-related kinases defective in murine models of polycystic kidney diseases localize to primary cilia and centrosomes, *J. Am. Soc. Nephrol.* 16 (2005) 3485–3489.
- [52] W. Liu, I. Quinto, X. Chen, C. Palmieri, R.L. Rabin, O.M. Schwartz, D.L. Nelson, G. Scala, Direct inhibition of Bruton's tyrosine kinase by IBtk, a Btk-binding protein, *Nat. Immunol.* 2 (2001) 939–946.
- [53] X. Shu, A.M. Fry, B. Tulloch, F.D. Manson, J.W. Crabb, H. Khanna, A.J. Faragher, A. Lennon, S. He, P. Trojan, A. Giessl, U. Wolfrum, R. Vervoort, A. Swaroop, A.F. Wright, RPGR ORF15 isoform co-localizes with RPGRIP1 at centrioles and basal bodies and interacts with nucleophosmin, *Hum. Mol. Genet.* 14 (2005) 1183–1197.
- [54] D.H. Hong, B. Pawlyk, M. Sokolov, K.J. Strissel, J. Yang, B. Tulloch, A.F. Wright, V.Y. Arshavsky, T. Li, RPGR isoforms in photoreceptor connecting cilia and the transitional zone of motile cilia, *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 44 (2003) 2413–2421.

- [55] H. Khanna, T.W. Hurd, C. Lillo, X. Shu, S.K. Parapuram, S. He, M. Akimoto, A.F. Wright, B. Margolis, D.S. Williams, A. Swaroop, RPGR-ORF15, which is mutated in retinitis pigmentosa, associates with SMC1, SMC3, and microtubule transport proteins, *J. Biol. Chem.* 280 (2005) 33580–33587.
- [56] Y. Zhao, D.H. Hong, B. Pawlyk, G. Yue, M. Adamian, M. Grynberg, A. Godzik, T. Li, The retinitis pigmentosa GTPase regulator (RPGR)-interacting protein: subserving RPGR function and participating in disk morphogenesis, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100 (2003) 3965–3970.
- [57] K. Yamanaka, C. Vande Velde, E. Eymard-Pierre, E. Bertini, O. Boespflug-Tanguy, D.W. Cleveland, Unstable mutants in the peripheral endosomal membrane component ALS2 cause early-onset motor neuron disease, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100 (2003) 16041–16046.
- [58] J.D. Topp, N.W. Gray, R.D. Gerard, B.F. Horazdovsky, Alsin is a Rab5 and Rac1 guanine nucleotide exchange factor, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 24612–24623.
- [59] R. Kunita, A. Otomo, H. Mizumura, K. Suzuki-Utsunomiya, S. Hadano, J.E. Ikeda, The Rab5 activator ALS2/alsin acts as a novel Rac1 effector through Rac1-activated endocytosis, *J. Biol. Chem.* 282 (2007) 16599–16611.
- [60] Q. Guo, J. Xie, C.V. Dang, E.T. Liu, J.M. Bishop, Identification of a large Myc-binding protein that contains RCC1-like repeats, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95 (1998) 9172–9177.
- [61] H. Yang, K. Scholich, S. Poser, D.R. Storm, T.B. Patel, D. Goldowitz, Developmental expression of PAM (protein associated with MYC) in the rodent brain, *Brain Res.* 136 (2002) 35–42.
- [62] J.W. Lewcock, N. Genoud, K. Lettieri, S.L. Pfaff, The ubiquitin ligase Phr1 regulates axon outgrowth through modulation of microtubule dynamics, *Neuron* 56 (2007) 604–620.
- [63] V. Murthy, S. Han, R.L. Beauchamp, N. Smith, L.A. Haddad, N. Ito, V. Ramesh, PAM and its ortholog highwire interact with and may negatively regulate the TSC1-TSC2 complex, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 1351–1358.
- [64] J.L. Bos, H. Rehmann, A. Wittinghofer, GEFs and GAPs: critical elements in the control of small G proteins, *Cell* 129 (2007) 865–877.
- [65] G. Riddick, I.G. Macara, A systems analysis of importin- α - β mediated nuclear protein import, *J. Cell Biol.* 168 (2005) 1027–1038.
- [66] M. Ohtsubo, H. Okazaki, T. Nishimoto, The RCC1 protein, a regulator for the onset of chromosome condensation locates in the nucleus and binds to DNA, *J. Cell Biol.* 109 (1989) 1389–1397.
- [67] C. Bamba, Y. Bobinnec, M. Fukuda, E. Nishida, The GTPase Ran regulates chromosome positioning and nuclear envelope assembly in vivo, *Curr. Biol.* 12 (2002) 503–507.
- [68] P. Askjaer, V. Galy, E. Hannak, I.W. Mattaj, Ran GTPase cycle and importins alpha and beta are essential for spindle formation and nuclear envelope assembly in living *Caenorhabditis elegans* embryos, *Mol. Biol. Cell* 13 (2002) 4355–4370.
- [69] M. Aebi, M.W. Clark, U. Vijayaraghavan, J. Abelson, A yeast mutant, PRP20, altered in mRNA metabolism and maintenance of the nuclear structure, is defective in a gene homologous to the human gene RCC1 which is involved in the control of chromosome condensation, *Mol. Gen. Genet.* 224 (1990) 72–80.
- [70] M. Ohtsubo, T. Yoshida, H. Seino, H. Nishitani, K.L. Clark, G.F. Sprague Jr., M. Frasch, T. Nishimoto, Mutation of the hamster cell cycle gene RCC1 is complemented by the homologous genes of *Drosophila* and *S. cerevisiae*, *EMBO J.* 10 (1991) 1265–1273.
- [71] G. Schlenstedt, C. Saavedra, J.D. Loeb, C.N. Cole, P.A. Silver, The GTP-bound form of the yeast Ran/TC4 homologue blocks nuclear protein import and appearance of poly(A)⁺ RNA in the cytoplasm, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92 (1995) 225–229.
- [72] K.J. Ryan, J.M. McCaffery, S.R. Wente, The Ran GTPase cycle is required for yeast nuclear pore complex assembly, *J. Cell Biol.* 160 (2003) 1041–1053.
- [73] M. Clement, F. Deshaies, L. de Repentigny, P. Belhumeur, The nuclear GTPase Gsp1p can affect proper telomeric function through the Sir4 protein in *Saccharomyces cerevisiae*, *Mol. Microbiol.* 62 (2006) 453–468.
- [74] E. Hirose, M. Mukai, A. Shimada, H. Nishitani, Y. Shibata, T. Nishimoto, Loss of RanGEF/Pim1 activity abolishes the orchestration of Ran-mediated mitotic cellular events in *S. pombe*, *Genes Cells* 11 (2006) 29–46.
- [75] T. Matsumoto, D. Beach, Premature initiation of mitosis in yeast lacking RCC1 or an interacting GTPase, *Cell* 66 (1991) 347–360.
- [76] D.J. Dilworth, A.J. Tackett, R.S. Rogers, E.C. Yi, R.H. Christmas, J.J. Smith, A.F. Siegel, B.T. Chait, R.W. Wozniak, J.D. Aitchison, The mobile nucleoporin Nus2p and chromatin-bound Prp20p function in endogenous NPC-mediated transcriptional control, *J. Cell Biol.* 171 (2005) 955–965.
- [77] S.E. Rosasco-Nitcher, W. Lan, S. Khorasanizadeh, P.T. Stukenberg, Centromeric Aurora-B activation requires TD-60, microtubules, and substrate priming phosphorylation, *Science* 319 (2008) 469–472.
- [78] M. Scheffner, O. Staub, HECT E3s and human disease, *BMC Biochem.* 8 (Suppl 1) (2007) S6.
- [79] H. Chong-Kopera, K. Inoki, Y. Li, T. Zhu, F.R. Garcia-Gonzalo, J.L. Rosa, K.L. Guan, TSC1 stabilizes TSC2 by inhibiting the interaction between TSC2 and the HERC1 ubiquitin ligase, *J. Biol. Chem.* 281 (2006) 8313–8316.
- [80] S.E. Schwarz, J.L. Rosa, M. Scheffner, Characterization of human hect domain family members and their interaction with UbcH5 and UbcH7, *J. Biol. Chem.* 273 (1998) 12148–12154.
- [81] C. Belham, J. Roig, J.A. Caldwell, Y. Aoyama, B.E. Kemp, M. Comb, J. Avruch, A mitotic cascade of NIMA family kinases. Nerc1/Nek9 activates the Nek6 and Nek7 kinases, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 34897–34909.
- [82] M.J. O'Connell, M.J. Krien, T. Hunter, Never say never. The NIMA-related protein kinases in mitotic control, *Trends Cell Biol.* 13 (2003) 221–228.
- [83] E.A. Nigg, Mitotic kinases as regulators of cell division and its checkpoints, *Nat. Rev., Mol. Cell Biol.* 2 (2001) 21–32.
- [84] L.A. Smith, N.O. Bukanov, H. Husson, R.J. Russo, T.C. Barry, A.L. Taylor, D.R. Beier, O. Ibragimov-Beskrovnaya, Development of polycystic kidney disease in juvenile cystic kidney mice: insights into pathogenesis, ciliary abnormalities, and common features with human disease, *J. Am. Soc. Nephrol.* 17 (2006) 2821–2831.
- [85] E. Sahara, Y. Luo, J. Zhang, D.K. Manning, D.R. Beier, J. Zhou, Nek8 regulates the expression and localization of polycystin-1 and polycystin-2, *J. Am. Soc. Nephrol.* 19 (2008) 469–476.
- [86] C.C. Hoogenraad, P. Wulf, N. Schiefermeier, T. Stepanova, N. Galjart, J.V. Small, F. Grosveld, C.I. de Zeeuw, A. Akhmanova, Bicaudal D induces selective dynein-mediated microtubule minus end-directed transport, *EMBO J.* 22 (2003) 6004–6015.
- [87] S. Hadano, S.C. Benn, S. Kakuta, A. Otomo, K. Sudo, R. Kunita, K. Suzuki-Utsunomiya, H. Mizumura, J.M. Shefner, G.A. Cox, Y. Iwakura, R.H. Brown Jr., J.E. Ikeda, Mice deficient in the Rab5 guanine nucleotide exchange factor ALS2/alsin exhibit age-dependent neurological deficits and altered endosome trafficking, *Hum. Mol. Genet.* 15 (2006) 233–250.
- [88] R.S. Devon, P.C. Orban, K. Gerrow, M.A. Barbieri, C. Schwab, L.P. Cao, J.R. Helm, N. Bissada, R. Cruz-Aguado, T.L. Davidson, J. Witmer, M. Metzler, C.K. Lam, W. Tetzlaff, E.M. Simpson, J.M. McCaffery, A.E. El-Husseini, B.R. Leavitt, M.R. Hayden, ALS2-deficient mice exhibit disturbances in endosome trafficking associated with motor behavioral abnormalities, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103 (2006) 9595–9600.
- [89] C. Lai, C. Xie, S.G. McCormack, H.C. Chiang, M.K. Michalak, X. Lin, J. Chandran, H. Shim, M. Shimoji, M.R. Cookson, R.L. Huganir, D.L. Rothstein, D.L. Price, P.C. Wong, L.J. Martin, J.J. Zhu, H. Cai, Amyotrophic lateral sclerosis 2-deficiency leads to neuronal degeneration in amyotrophic lateral sclerosis through altered AMPA receptor trafficking, *J. Neurosci.* 26 (2006) 11798–11806.
- [90] J.P. Boylan, A.F. Wright, Identification of a novel protein interacting with RPGR, *Hum. Mol. Genet.* 9 (2000) 2085–2093.
- [91] R. Roepman, N. Bernoud-Hubac, D.E. Schick, A. Maugeri, W. Berger, H.H. Ropers, F.P. Cremers, P.A. Ferreira, The retinitis pigmentosa GTPase regulator (RPGR) interacts with novel transport-like proteins in the outer segments of rod photoreceptors, *Hum. Mol. Genet.* 9 (2000) 2095–2105.
- [92] D.H. Hong, G. Yue, M. Adamian, T. Li, Retinitis pigmentosa GTPase regulator (RPGR)-interacting protein is stably associated with the photoreceptor ciliary axoneme and anchors RPGR to the connecting cilium, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 12091–12099.
- [93] D.H. Hong, B.S. Pawlyk, J. Shang, M.A. Sandberg, E.L. Berson, T. Li, A retinitis pigmentosa GTPase regulator (RPGR)-deficient mouse model for X-linked retinitis pigmentosa (RP3), *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97 (2000) 3649–3654.
- [94] M. Linari, M. Ueffing, F. Manson, A. Wright, T. Meitinger, J. Becker, The retinitis pigmentosa GTPase regulator, RPGR, interacts with the delta subunit of rod cyclic GMP phosphodiesterase, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96 (1999) 1315–1320.
- [95] A. Semov, R. Marcotte, N. Semova, X. Ye, E. Wang, Microarray analysis of E-box binding-related gene expression in young and replicatively senescent human fibroblasts, *Anal. Biochem.* 302 (2002) 38–51.
- [96] K. Scholich, S. Pierre, T.B. Patel, Protein associated with Myc (PAM) is a potent inhibitor of adenylyl cyclases, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 47583–47589.
- [97] S.C. Pierre, J. Hausler, K. Birod, G. Geisslinger, K. Scholich, PAM mediates sustained inhibition of cAMP signaling by sphingosine-1-phosphate, *EMBO J.* 23 (2004) 3031–3040.
- [98] X. Gao, T.B. Patel, Histidine residues 912 and 913 in protein associated with Myc are necessary for the inhibition of adenylyl cyclase activity, *Mol. Pharmacol.* 67 (2005) 42–49.
- [99] X. Jiao, P. Trifillis, M. Kiledjian, Identification of target messenger RNA substrates for the murine deleted in azoospermia-like RNA-binding protein, *Biol. Reprod.* 66 (2002) 475–485.
- [100] B. Collier, B. Gorgoni, C. Loveridge, H.J. Cooke, N.K. Gray, The DAZL family proteins are PABP-binding proteins that regulate translation in germ cells, *EMBO J.* 24 (2005) 2656–2666.
- [101] T.A. Fulga, D. Van Vactor, Synapses and growth cones on two sides of a highwire, *Neuron* 57 (2008) 339–344.
- [102] C. Ehnert, I. Tegeder, S. Pierre, K. Birod, H.V. Nguyen, A. Schmidtke, G. Geisslinger, K. Scholich, Protein associated with Myc (PAM) is involved in spinal nociceptive processing, *J. Neurochem.* 88 (2004) 948–957.
- [103] R.W. Burgess, K.A. Peterson, M.J. Johnson, J.J. Roix, I.C. Welsh, T.P. O'Brien, Evidence for a conserved function in synapse formation reveals Phr1 as a candidate gene for respiratory failure in newborn mice, *Mol. Cell. Biol.* 24 (2004) 1096–1105.
- [104] J. D'Souza, M. Hendricks, S. Le Guyader, S. Subburaju, B. Grunewald, K. Scholich, S. Jesuthasan, Formation of the retinotectal projection requires Esrom, an ortholog of PAM (protein associated with Myc), *Development* 132 (2005) 247–256.
- [105] S. Le Guyader, J. Maier, S. Jesuthasan, Esrom, an ortholog of PAM (protein associated with c-myc), regulates pteridine synthesis in the zebrafish, *Dev. Biol.* 277 (2005) 378–386.
- [106] H.I. Wan, A. DiAntonio, R.D. Fetter, K. Bergstrom, R. Strauss, C.S. Goodman, Highwire regulates synaptic growth in *Drosophila*, *Neuron* 26 (2000) 313–329.
- [107] C. Wu, Y.P. Waikar, C.A. Collins, A. DiAntonio, Highwire function at the *Drosophila* neuromuscular junction: spatial, structural, and temporal requirements, *J. Neurosci.* 25 (2005) 9557–9566.
- [108] M. Zhen, X. Huang, B. Bamber, Y. Jin, Regulation of presynaptic terminal organization by *C. elegans* RPM-1, a putative guanine nucleotide exchanger with a RING-H2 finger domain, *Neuron* 26 (2000) 331–343.
- [109] A.M. Schaefer, G.D. Hadwiger, M.L. Nonet, rpm-1, a conserved neuronal gene that regulates targeting and synaptogenesis in *C. elegans*, *Neuron* 26 (2000) 345–356.

- [110] A. DiAntonio, A.P. Haghghi, S.L. Portman, J.D. Lee, A.M. Amaranto, C.S. Goodman, Ubiquitination-dependent mechanisms regulate synaptic growth and function, *Nature* 412 (2001) 449–452.
- [111] B. Abrams, B. Grill, X. Huang, Y. Jin, Cellular and molecular determinants targeting the *Caenorhabditis elegans* PHR protein RPM-1 to perisynaptic regions, *Dev. Dyn.* 237 (2008) 630–639.
- [112] C.A. Collins, Y.P. Wairkar, S.L. Johnson, A. DiAntonio, Highwire restrains synaptic growth by attenuating a MAP kinase signal, *Neuron* 51 (2006) 57–69.
- [113] C. Wu, R.W. Daniels, A. DiAntonio, Dfns collaborates with Highwire to down-regulate the Wallenda/DLK kinase and restrain synaptic terminal growth, *Neural Develop.* 2 (2007) 16.
- [114] E.H. Liao, W. Hung, B. Abrams, M. Zhen, An SCF-like ubiquitin ligase complex that controls presynaptic differentiation, *Nature* 430 (2004) 345–350.
- [115] K. Nakata, B. Abrams, B. Grill, A. Goncharov, X. Huang, A.D. Chisholm, Y. Jin, Regulation of a DLK-1 and p38 MAP kinase pathway by the ubiquitin ligase RPM-1 is required for presynaptic development, *Cell* 120 (2005) 407–420.
- [116] B. Grill, W.V. Bienvenut, H.M. Brown, B.D. Ackley, M. Quadroni, Y. Jin, *C. elegans* RPM-1 regulates axon termination and synaptogenesis through the Rab GEF GLO-4 and the Rab GTPase GLO-1, *Neuron* 55 (2007) 587–601.
- [117] B.D. McCabe, S. Hom, H. Aberle, R.D. Fetter, G. Marques, T.E. Haerry, H. Wan, M.B. O'Connor, C.S. Goodman, A.P. Haghghi, Highwire regulates presynaptic BMP signaling essential for synaptic growth, *Neuron* 41 (2004) 891–905.
- [118] G.J. Hermann, L.K. Schroeder, C.A. Hieb, A.M. Kershner, B.M. Rabbitts, P. Fonarev, B.D. Grant, J.R. Priess, Genetic analysis of lysosomal trafficking in *Caenorhabditis elegans*, *Mol. Biol. Cell* 16 (2005) 3273–3288.
- [119] J. Ma, H. Plesken, J.E. Treisman, I. Edelman-Novemsky, M. Ren, Lightoid and Claret: a rab GTPase and its putative guanine nucleotide exchange factor in biogenesis of *Drosophila* eye pigment granules, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101 (2004) 11652–11657.
- [120] B. Heras, B.K. Drobak, PARF-1: an *Arabidopsis thaliana* FYVE-domain protein displaying a novel eukaryotic domain structure and phosphoinositide affinity, *J. Exp. Bot.* 53 (2002) 565–567.
- [121] D.J. Kliebenstein, J.E. Lim, L.G. Landry, R.L. Last, *Arabidopsis* UVR8 regulates ultraviolet-B signal transduction and tolerance and contains sequence similarity to human regulator of chromatin condensation 1, *Plant Physiol.* 130 (2002) 234–243.
- [122] B.A. Brown, C. Cloix, G.H. Jiang, E. Kaiserli, P. Herzyk, D.J. Kliebenstein, G.I. Jenkins, A UV-B-specific signaling component orchestrates plant UV protection, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102 (2005) 18225–18230.
- [123] E. Kaiserli, G.I. Jenkins, UV-B promotes rapid nuclear translocation of the *Arabidopsis* UV-B specific signaling component UVR8 and activates its function in the nucleus, *Plant Cell* (2007).
- [124] D. Gogendeau, A.M. Keller, A. Yanagi, J. Cohen, F. Koll, Nd6p, a novel protein with RCC1-like domains involved in exocytosis in *Paramecium tetraurelia*, *Eukaryot. Cell* 4 (2005) 2129–2139.
- [125] S. Hadano, C.K. Hand, H. Osuga, Y. Yanagisawa, A. Otomo, R.S. Devon, N. Miyamoto, J. Showguchi-Miyata, Y. Okada, R. Singaraja, D.A. Figlewicz, T. Kwiatkowski, B.A. Hosler, T. Sagie, J. Skaug, J. Nasir, R.H. Brown Jr., S.W. Scherer, G.A. Rouleau, M.R. Hayden, J.E. Ikedo, A gene encoding a putative GTPase regulator is mutated in familial amyotrophic lateral sclerosis 2, *Nat. Genet.* 29 (2001) 166–173.
- [126] Y. Yang, A. Hentati, H.X. Deng, O. Dabbagh, T. Sasaki, M. Hirano, W.Y. Hung, K. Ouahchi, J. Yan, A.C. Azim, N. Cole, G. Gascon, A. Yagmour, M. Ben-Hamida, M. Pericak-Vance, F. Hentati, T. Siddique, The gene encoding alsin, a protein with three guanine-nucleotide exchange factor domains, is mutated in a form of recessive amyotrophic lateral sclerosis, *Nat. Genet.* 29 (2001) 160–165.
- [127] F. Gros-Louis, C. Gaspar, G.A. Rouleau, Genetics of familial and sporadic amyotrophic lateral sclerosis, *Biochim. Biophys. Acta* 1762 (2006) 956–972.
- [128] J. Chandran, J. Ding, H. Cai, Alsln and the molecular pathways of amyotrophic lateral sclerosis, *Mol. Neurobiol.* 36 (2007) 224–231.
- [129] H. Cai, X. Lin, C. Xie, F.M. Laird, C. Lai, H. Wen, H.C. Chiang, H. Shim, M.H. Farah, A. Hoke, D.L. Price, P.C. Wong, Loss of ALS2 function is insufficient to trigger motor neuron degeneration in knock-out mice but predisposes neurons to oxidative stress, *J. Neurosci.* 25 (2005) 7567–7574.
- [130] H.X. Deng, H. Zhai, R. Fu, Y. Shi, G.H. Gorrie, Y. Yang, E. Liu, M.C. Dal Canto, E. Mugnaini, T. Siddique, Distal axonopathy in an alsin-deficient mouse model, *Hum. Mol. Genet.* 16 (2007) 2911–2920.
- [131] K. Kanekura, Y. Hashimoto, T. Niikura, S. Aiso, M. Matsuoka, I. Nishimoto, Alsln, the product of ALS2 gene, suppresses SOD1 mutant neurotoxicity through RhoGEF domain by interacting with SOD1 mutants, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 19247–19256.
- [132] K. Kanekura, Y. Hashimoto, Y. Kita, J. Sasabe, S. Aiso, I. Nishimoto, M. Matsuoka, A Rac1/ phosphatidylinositol 3-kinase/Akt3 anti-apoptotic pathway, triggered by Alsln, the product of the ALS2 gene, antagonizes Cu/Zn-superoxide dismutase (SOD1) mutant-induced motoneuronal cell death, *J. Biol. Chem.* 280 (2005) 4532–4543.
- [133] E.A. Erie, H. Shim, A.L. Smith, X. Lin, K. Keyvanfar, C. Xie, J. Chen, H. Cai, Mice deficient in the ALS2 gene exhibit lymphopenia and abnormal hematopoietic function, *J. Neuroimmunol.* 182 (2007) 226–231.
- [134] L. Provinciani, M.A. Laurenzi, L. Vesprini, A.R. Giovagnoli, C. Bartocci, M. Montroni, P. Bagnarelli, M. Clementi, P.E. Varaldo, Immunity assessment in the early stages of amyotrophic lateral sclerosis: a study of virus antibodies and lymphocyte subsets, *Acta Neurol. Scand.* 78 (1988) 449–454.
- [135] A.J. Bowers, J.F. Boylan, Nek8, a NIMA family kinase member, is overexpressed in primary human breast tumors, *Gene* 328 (2004) 135–142.
- [136] V.E. Torres, P.C. Harris, Mechanisms of disease: autosomal dominant and recessive polycystic kidney diseases, *Nat. Clin. Prac.* 2 (2006) 40–55 (quiz 55).
- [137] M.L. Trapp, A. Galtseva, D.K. Manning, D.R. Beier, N.D. Rosenblum, L.M. Quarmby, Defects in ciliary localization of Nek8 is associated with cystogenesis, *Pediatr. Nephrol.* (Berlin, Germany) 23 (2008) 377–387.
- [138] T.A. Natoli, T.C. Gareski, W.R. Dackowski, L. Smith, N.O. Bukanov, R.J. Russo, H. Husson, D. Matthews, P. Piepenhagen, O. Ibraghimov-Beskrovnaia, Pkd1 and Nek8 mutations affect cell–cell adhesion and cilia in cysts formed in kidney organ cultures, *Am. J. Physiol.* 294 (2008) F73–F83.
- [139] E.A. Otto, M.L. Trapp, U.T. Schultheiss, J. Helou, L.M. Quarmby, F. Hildebrandt, NEK8 mutations affect ciliary and centrosomal localization and may cause nephronophthisis, *J. Am. Soc. Nephrol.* 19 (2008) 587–592.
- [140] Y. Cai, S. Somlo, Too much of a good thing: does Nek8 link polycystic kidney disease and nephronophthisis? *J. Am. Soc. Nephrol.* 19 (2008) 418–420.
- [141] M. Walkowicz, Y. Ji, X. Ren, B. Horsthemke, L.B. Russell, D. Johnson, E.M. Rinchik, R.D. Nicholls, L. Stubbs, Molecular characterization of radiation- and chemically induced mutations associated with neuromuscular tremors, runting, juvenile lethality, and sperm defects in *jdF2* mice, *Mamm. Genome* 10 (1999) 870–878.
- [142] Y. Ji, M.J. Walkowicz, K. Buiting, D.K. Johnson, R.E. Tarvin, E.M. Rinchik, B. Horsthemke, L. Stubbs, R.D. Nicholls, The ancestral gene for transcribed, low-copy repeats in the Prader–Willi/Angelman region encodes a large protein implicated in protein trafficking, which is deficient in mice with neuromuscular and spermiogenic abnormalities, *Hum. Mol. Genet.* 8 (1999) 533–542.
- [143] Y. Ji, N.A. Rebert, J.M. Joslin, M.J. Higgins, R.A. Schultz, R.D. Nicholls, Structure of the highly conserved HERC2 gene and of multiple partially duplicated paralogs in human, *Genome Res.* 10 (2000) 319–329.
- [144] J.M. Amos-Landgraf, Y. Ji, W. Gottlieb, T. Depinet, A.E. Wandstrat, S.B. Cassidy, D.J. Driscoll, P.K. Rogan, S. Schwartz, R.D. Nicholls, Chromosome breakage in the Prader–Willi and Angelman syndromes involves recombination between large, transcribed repeats at proximal and distal breakpoints, *Am. J. Hum. Genet.* 65 (1999) 370–386.
- [145] R.D. Nicholls, J.L. Knepper, Genome organization, function, and imprinting in Prader–Willi and Angelman syndromes, *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 2 (2001) 153–175.
- [146] R.A. Sturm, D.L. Duffy, Z.Z. Zhao, F.P. Leite, M.S. Stark, N.K. Hayward, N.G. Martin, G.W. Montgomery, A single SNP in an evolutionary conserved region within intron 86 of the HERC2 gene determines human blue–brown eye color, *Am. J. Hum. Genet.* 82 (2008) 424–431.
- [147] M. Kayser, F. Liu, A.C. Janssens, F. Rivadeneira, O. Lao, K. van Duijn, M. Vermeulen, P. Arp, M.M. Jhamai, W.F. van Ijcken, J.T. den Dunnen, S. Heath, D. Zelenika, D.D. Despriet, C.C. Klaver, J.R. Vingerling, P.T. de Jong, A. Hofman, Y.S. Aulchenko, A.G. Uitterlinden, B.A. Oostra, C.M. van Duijn, Three genome-wide association studies and a linkage analysis identify HERC2 as a human iris color gene, *Am. J. Hum. Genet.* 82 (2008) 411–423.
- [148] H. Eiberg, J. Troelsen, M. Nielsen, A. Mikkelsen, J. Mengel-From, K.W. Kjaer, L. Hansen, Blue eye color in humans may be caused by a perfectly associated founder mutation in a regulatory element located within the HERC2 gene inhibiting OCA2 expression, *Hum. Genet.* 123 (2008) 177–187.
- [149] W. Yuan, R.M. Krug, Influenza B virus NS1 protein inhibits conjugation of the interferon (IFN)-induced ubiquitin-like ISG15 protein, *EMBO J.* 20 (2001) 362–371.
- [150] R.M. Krug, W. Yuan, D.L. Noah, A.G. Latham, Intracellular warfare between human influenza viruses and human cells: the roles of the viral NS1 protein, *Virology* 309 (2003) 181–189.
- [151] X.F. Wang, D. Wang, W. Zhu, K.K. Delrahim, D. Dolnak, M.H. Rapaport, Studies characterizing 60 kDa autoantibodies in subjects with schizophrenia, *Biol. Psychiatry* 53 (2003) 361–375.
- [152] G. Merla, C. Ucla, M. Guipponi, A. Reymond, Identification of additional transcripts in the Williams–Beuren syndrome critical region, *Hum. Genet.* 110 (2002) 429–438.
- [153] X.M. Ouyang, X.J. Xia, E. Verpy, L.L. Du, A. Pandya, C. Petit, T. Balkany, W.E. Nance, X.Z. Liu, Mutations in the alternatively spliced exons of USH1C cause non-syndromic recessive deafness, *Hum. Genet.* 111 (2002) 26–30.
- [154] H. Mabuchi, H. Fujii, G. Calin, H. Alder, M. Negrini, L. Rassenti, T.J. Kippis, F. Bullrich, C.M. Croce, Cloning and characterization of CLLD6, CLLD7, and CLLD8, novel candidate genes for leukemogenesis at chromosome 13q14, a region commonly deleted in B-cell chronic lymphocytic leukemia, *Cancer Res.* 61 (2001) 2870–2877.
- [155] D. Mertens, S. Wolf, P. Schroeter, C. Schaffner, H. Dohner, S. Stilgenbauer, P. Lichter, Down-regulation of candidate tumor suppressor genes within chromosome band 13q14.3 is independent of the DNA methylation pattern in B-cell chronic lymphocytic leukemia, *Blood* 99 (2002) 4116–4121.
- [156] E.E. Solomou, P.P. Sfikakis, P. Kotsi, M. Papaioannou, V. Karali, E. Vervessou, A.V. Hoffbrand, P. Panayiotidis, 13q deletion in chronic lymphocytic leukemia: characterization of E4.5, a novel chromosome condensation regulator-like guanine nucleotide exchange factor, *Leuk. Lymphoma* 44 (2003) 1579–1585.
- [157] A. Latil, L. Chene, P. Mangin, G. Fournier, P. Berthon, O. Cussenot, Extensive analysis of the 13q14 region in human prostate tumors: DNA analysis and quantitative expression of genes lying in the interval of deletion, *Prostate* 57 (2003) 39–50.
- [158] M. Clamp, J. Cuff, S.M. Searle, G.J. Barton, The Jalview Java alignment editor, *Bioinformatics* 20 (2004) 426–427.
- [159] J.D. Thompson, D.G. Higgins, T.J. Gibson, CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice, *Nucleic Acids Res.* 22 (1994) 4673–4680.
- [160] J.D. Thompson, T.J. Gibson, F. Plewniak, F. Jeanmougin, D.G. Higgins, The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools, *Nucleic Acids Res.* 25 (1997) 4876–4882.

