

**ELS PREMIS NOBEL
DE L'ANY 2004
SOBRE EL
PREMI NOBEL DE QUÍMICA
CONCEDIT A
AARON CIECHANOVER,
AVRAM HERSHKO I IRWIN ROSE,
A CÀRREC D'ERWIN KNECHT,
DE L'INSTITUT D'INVESTIGACIONS
CITOLÒGIQUES, DE LA FUNDACIÓ
VALENCIANA D'INVESTIGACIONS
BIOMÈDIQUES**

**LA DEGRADACIÓ DE PROTEÏNES MITJANÇADA
PER UBIQUITINA: COM ES RECONeixEN LES PROTEÏNES
CELLULARS QUE CAL DESTRUIR?**

EL PREMI NOBEL DE QUÍMICA DE L'ANY 2004

El 6 d'octubre la Reial Acadèmia Sueca de Ciències va emetre un comunicat en el qual anunciava la concessió del Premi Nobel de Química per a l'any 2004 conjuntament a Aaron Ciechanover (nascut l'any 1947), del Technion-Israel Institute of Technology a Haifa (Israel), Avram Hershko (nascut el 1937), del mateix centre, i a Irwin Rose (nascut el 1926), de la Universitat de Califòrnia a Irvine (EUA). Tots tres eren guardonats per la mateixa descoberta: la degradació de proteïnes mitjançada per ubiquitina. Els treballs pels quals premien ara aquests investigadors van començar a finals de la dècada dels setanta i començament dels vuitanta del segle passat i van conduir a la identificació i caracterització d'una de les principals vies per les quals les proteïnes cel·lulars són degradades fins als seus aminoàcids constituents. Però, què és la degradació intracel·lular de proteïnes?

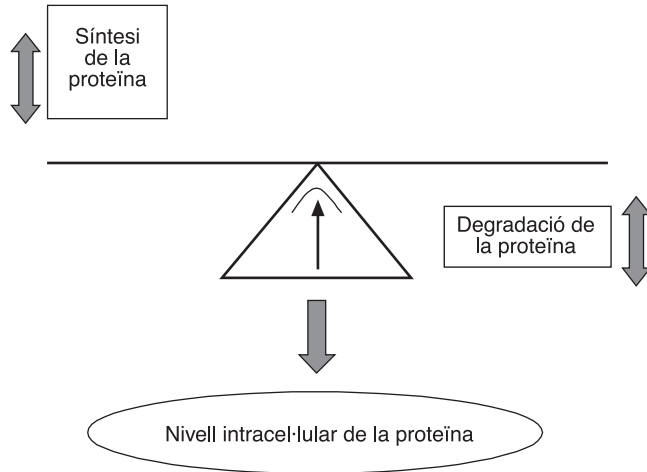
La degradació intracel·lular de proteïnes és un procés que es pot considerar, si més no pel que fa al resultat, com l'oposat al de la síntesi de proteïnes. Per a copsar la importància d'aquesta descoberta descriurem en primer lloc en què consisteix aquesta degradació intracel·lular de proteïnes i per què s'ha desenvolupat en les cèl·lules; després n'esmentarem les principals característiques; continuarem amb la descripció dels mecanismes moleculars que intervenen en la via de degradació intracel·lular de proteïnes mitjançada per ubiquitina i que inclouen, en un lloc destacat, les proteases que degraden les proteïnes i, finalment, parlarem de la importància fisiològica del procés i enumerarem les principals patologies on s'està comprovant,

en els darrers anys, l'important paper de la via ubiquitina-proteasoma.

LA DEGRADACIÓ INTRACEL·LULAR DE PROTEÏNES COM A PROCÉS OPOSAT A LA SÍNTESI DE PROTEÏNES

Tothom sap que la major part de les funcions cel·lulars, fins i tot les més crucials, les duen a terme les macromolècules més versàtils dels éssers vius: les proteïnes. Estructuralment, les proteïnes constitueixen polímers lineals construïts a partir d'una col·lecció de vint aminoàcids units per enllaços peptídics. Aquestes cadenes polipeptídiques se sintetitzen a partir de motlles de RNA als ribosomes de la cèl·lula mitjançant el procés de la síntesi de proteïnes. Però les proteïnes cel·lulars també es degraden fins a aminoàcids, com ja se sap, des que l'any 1942 Rudolf Schoenheimer va publicar el conegut llibre *The Dynamic State of Body Constituents*. Es coneix amb el nom de *degradació intracel·lular de proteïnes* el conjunt de processos pels quals totes les proteïnes de totes les cèl·lules estan essent contínuament degradades, mitjançant el trencament dels seus enllaços peptídics, fins als seus aminoàcids constituents. Convé de fer notar que aquesta degradació no té res a veure amb la digestió de les proteïnes de la dieta, la qual, en els organismes superiors amb organització multicel·lular, es produeix al seu interior, en el tracte digestiu, però fora de les cèl·lules, que es limiten a prendre els productes d'aquesta digestió extracel·lular, els aminoàcids, a fi d'utilitzar-los en les seves reaccions biosintètiques i catabòliques. La degradació intracel·lular de proteïnes difereix de la digestió dels aliments en dos aspectes principals: a) les proteïnes que es degraden són les mateixes proteïnes que han fabricat les cèl·lules de l'organisme, i b) aquesta degradació es produeix a l'interior de les cèl·lules

mitjançant uns processos que consumeixen energia o, el que és el mateix, ATP. Per tant, la cèl·lula sintetitza a partir d'aminoàcids les seves pròpies proteïnes en els ribosomes, però també fa el contrari.



14

FIGURA 1. El nivell intracel·lular de qualsevol proteïna depèn d'un delicat balanç entre les cinètiques de síntesi i les de degradació d'aquesta proteïna.

PER QUÈ ÉS NECESSÀRIA UNA DEGRADACIÓ INTRACEL·LULAR DE PROTEÏNES?

La necessitat que tenen els organismes que no poden sintetitzar les seves molècules precursors (com alguns aminoàcids) de dur a terme la digestió de l'aliment, és a dir, els organismes heteròtrofs, és òbvia: l'aliment extern, que en darrera instància, com tantes vegades s'ha dit, depèn dels organismes autòtrofs, proporciona aquests precursors. Però resulta una

mica més difícil d'entendre la necessitat d'una degradació intracel·lular de proteïnes per a l'economia d'un organisme i de les seves cèl·lules. Sobretot és difícil d'entendre per què aquesta degradació no és un procés estrany d'escassa rellevància: tots, absolutament tots, els organismes, unicel·lulars i pluricel·lulars, autòtrofs i heteròtrofs, estan degradant constantment totes les proteïnes pròpies que tant els ha costat de sintetitzar. A més, aquesta degradació s'esdevé a una escala considerable, fins al punt que algunes cèl·lules eliminen diàriament la quarta part o més de les pròpies proteïnes i les substitueixen per unes altres de noves. Des dels treballs de Charles Darwin, els científics pensen sempre en termes evolutius per a entendre per què s'ha desenvolupat amb èxit un procés. Per tant, ens hem de preguntar: la degradació intracel·lular de proteïnes, quin avantatge representa per a les cèl·lules i els organismes?

En primer lloc, aquest procés permet d'eliminar proteïnes defectuoses, l'acumulació de les quals acabaria desencadenant l'envelliment i/o la mort cel·lular. De fet, durant la síntesi de proteïnes es produeixen proteïnes amb errors i aquestes proteïnes errònies són eliminades ràpidament a fi d'evitar que s'acumulin, fins al punt que s'ha calculat que un 30% o més de les proteïnes acabades de sintetitzar són immediatament degradades, malgrat que probablement no totes siguin proteïnes amb errors. Sols per aquest fet, sembla obvi que la degradació intracel·lular de proteïnes sigui essencial per a la supervivència de les cèl·lules i els organismes. Ara bé, la degradació intracel·lular de proteïnes no es limita únicament a degradar proteïnes defectuoses, sinó que també degrada proteïnes funcionals. Malgrat que podria semblar inconvenient per a la cèl·lula el fet d'haver de destruir, mitjançant uns mecanismes que consumeixen energia, proteïnes que funcionen perfectament i que han requerit, a més, un considerable esforç i aportació energètica per a ésser sintetit-

zades, aquesta degradació intracel·lular de proteïnes compleix moltes altres funcions. Aquestes funcions inclouen: *a*) el control de processos cel·lulars tan essencials com el cicle, la divisió, la proliferació i la diferenciació cel·lulars, el trànsit intracel·lular de proteïnes, els mecanismes de morfogènesi, l'envelliment i la mort cel·lular (tant per necrosi com per apoptosi); *b*) la modificació de la maquinària enzimàtica en resposta a canvis ambientals per a permetre una adaptació més bona del metabolisme cel·lular a aquests; *c*) la provisió a les cèl·lules, en situacions d'estrès com el dejuni, d'aminoàcids utilitzables bé com a font d'energia (per exemple, al fetge per glucogènesi) o bé per a la síntesi de proteïnes essencials per a la supervivència cel·lular; *d*) el control de la comunicació intercel·lular, com s'esdevé en la fabricació de pèptids antigènics per a la seva presentació pels complexos principals d'histocompatibilitat al sistema immunològic; *e*) el control de la transducció de nombrosos senyals, i un llarg etcètera. Tot plegat comporta per a les cèl·lules un nombre tal d'avantatges, que ha determinat que el procés de degradació intracel·lular de proteïnes sigui universal per a totes les cèl·lules conegudes actualment.

PRINCIPALS CARACTERÍSTIQUES DE LA DEGRADACIÓ INTRACEL·LULAR DE PROTEÏNES

Quines característiques té aquesta degradació intracel·lular de proteïnes? Ja n'hem esmentat tres, que es resumeixen així: totes les cèl·lules degraden, contínuament i de manera extensiva, totes les seves proteïnes. Però hi ha altres característiques del procés que s'han anat esbrinant al llarg dels anys i que són importants. N'esmentarem dues que són rellevants per a entendre el sistema ubiquitina-proteasoma.

En primer lloc, totes les proteïnes d'una cèl·lula són

degradades, però, al començament dels anys setanta del segle passat ja se sabia que cada proteïna d'aquesta cèl·lula es degrada a una velocitat diferent i seguint una cinètica exponencial de primer ordre. Per això, aquesta velocitat acostuma a expressar-se en termes de vida mitjana o temps necessari perquè la meitat de les molècules existents en un moment determinat siguin degradades (i, normalment, sintetitzades novament). Les vides mitjanes de cada proteïna en una mateixa cèl·lula varien enormement des d'uns pocs minuts fins a diversos dies, la qual cosa indica que la degradació intracel·lular de proteïnes és un procés específic que reconeix, en cada moment, quines proteïnes s'han de degradar i quines no. Però, a més, la velocitat de degradació de cada proteïna varia segons les condicions metabòliques en què es troben les cèl·lules i les hormones: diverses drogues, la dieta i altres factors fan variar les vides mitjanes de les proteïnes. Això darrer significa que la degradació intracel·lular de proteïnes és també un procés regulat.

La segona característica rellevant en el context de la degradació intracel·lular de proteïnes per la via ubiquitina-proteasoma fa referència a l'energia. Des de fa algun temps se sap, particularment després del treball de Simpson de l'any 1953, que la degradació intracel·lular de proteïnes, o almenys una part, requereix energia. I, atès que la degradació intracel·lular de proteïnes és un procés catabòlic, això ha resultat sempre una mica sorprenent, ja que la bioquímica ensenya que les reaccions anabòliques consumeixen energia, mentre que les catabòliques en produeixen. Els treballs de Hershko, Ciechanover, Rose i altres van contribuir a proporcionar una explicació per a aquesta aparent paradoxal, tal com veurem.

EL PROCÉS DE LA UBIQUITINACIÓ DE PROTEÏNES
COM A EXEMPLE DE SENYALITZACIÓ DE PROTEÏNES
PER A LA SEVA DEGRADACIÓ

18

Un avenç considerable, previ al descobriment de la ubiquitina, fou el desenvolupament el 1977 per Etlinger i Goldberg d'un lisat de reticulòcits de conill que reconstruïa la degradació intracel·lular de proteïnes dependent d'energia. Precisament, treballant amb aquest sistema lliure de cèl·lules, Avram Hershko i Aaron Ciechanover, durant diverses estades en règim sabàtic al laboratori d'Erwin Rose al Fox Chase Cancer Center de Filadèlfia, van descobrir, a la darrera dels anys setanta i començament dels vuitanta del segle passat, la via de degradació intracel·lular de proteïnes mitjançada per ubiquitina. Aquests experiments els van publicar en una sèrie de deu excel·lents treballs entre 1979 i 1983 (Ciechanover *et al.*, 1978; Hershko *et al.*, 1979; Ciechanover *et al.*, 1980; Hershko *et al.*, 1980; Hershko *et al.*, 1981; Ciechanover *et al.*, 1981; Ciechanover *et al.*, 1982; Haas and Rose, 1982; Hershko *et al.*, 1982; Hershko *et al.*, 1983). Fraccionant el lisat de reticulòcits, mitjançant una cromatografia de bescanvi aniònic, que havien utilitzat per a mirar d'eliminar-ne l'hemoglobina, van trobar que se separaven dues fraccions, totes dues necessàries per a la degradació de proteïnes. En la primera d'aquestes fraccions es trobava un polipèptid no identificat d'uns nou mil daltons i molt estable. Gairebé de seguida, Wilkinson *et al.*, l'any 1980, van identificar aquest polipèptid com la ubiquitina, una proteïna molt ubiqüa, tal com indica el seu nom, aïllada per primer cop el 1975 a partir de tim boví i de la qual es desconeixia la funció. Pel que fa a la segona fracció, un subfraccionament addicional va permetre de separar, per un costat, la proteasa o proteases responsables d'aquesta degradació (posteriorment identificades per altres científics com els proteasomes) i, per un altre,

uns enzims (els anomenats *E1*, *E2* i *E3*) que intervenien unint la ubiquitina per un enllaç covalent a les proteïnes perquè fossin reconegudes per la proteasa que les degradava. A partir d'aquí van reconstruir el procés ATP-dependent de degradació selectiva de proteïnes. Les proteïnes que havien d'ésser destruïdes quedaven senyalades per a la degradació mitjançant una maquinària de tres grups d'enzims (*E1*, *E2* i *E3*) que unien ubiquitines a les proteïnes. Aquesta unió d'ubiquitines a la proteïna constituïa un veritable «petó de la mort», atès que la proteïna així marcada quedava senyalada per a ésser reconeguda i destruïda pel sistema proteolític de les cèl·lules. Quant a les proteases responsables d'aquesta degradació, aleshores sols se sabia que tenien un pH d'actuació neutre, allunyat per tant del pH àcid de les proteases lisosomals (catepsines) i que, per tant, havien d'ésser diferents d'aquestes. Més tard es va saber que aquesta destrucció anava a càrrec dels proteasomes.

19

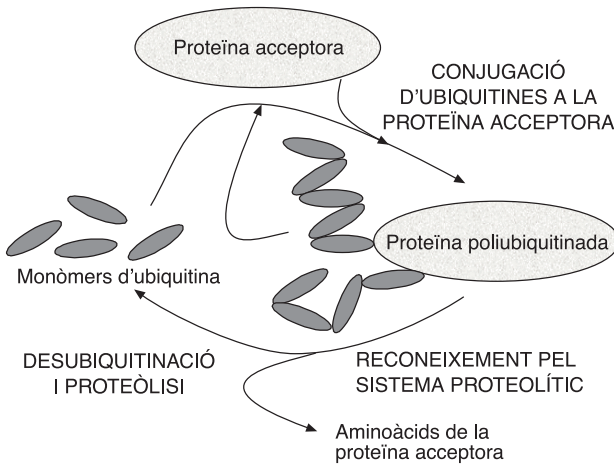


FIGURA 2. El descobriment de la via de degradació de proteïnes mitjançada per ubiquitina. Vegeu-ne l'explicació al text.

DESCRIPCIÓ DEL PROCÉS D'UBIQUITINACIÓ DE PROTEÏNES PER A LA SEVA DEGRADACIÓ

Actualment, què en sabem, d'aquesta via? Doncs que les cèl·lules eucariòtiques han desenvolupat un sistema, l'anomenada *poliubiquitinació de proteïnes*, que opera al costat d'un sistema proteolític, els proteasomes, a fi de facilitar la regulació temporal i específica de la proteòlisi intracel·lular (Hershko i Ciechanover, 1998; Hershko *et al.*, 2000). Aquest sistema consisteix en el marcatge per a degradació de moltes proteïnes a través d'una sèrie d'enzims, E1, E2 i E3, que actuen consecutivament per reconèixer i transferir al substrat una proteïna de setanta-sis residus d'aminoàcids, la *ubiquitina*, en un procés que consumeix ATP. Aquesta unió es produeix majoritàriament a través d'un enllaç isopeptídic entre el grup ϵ -amí d'una lisina interna del substrat i el grup carboxil terminal de la ubiquitina que procedeix d'una glicina. En primer lloc, l'enzim E1 (enzim activador de la ubiquitina) catalitza una reacció que consumeix ATP i que permet la unió covalent d'una molècula d'ubiquitina a una cisteïna interna del mateix E1, de manera que genera un intermediari tiol-èster d'alta energia (E1-S~ubiquitina). Després, intervien un o diversos enzims E2 (enzims transportadors o conjugadors d'ubiquitina). Aquí, la ubiquitina activada es transfeix primerament a aquell o aquells E2 amb els quals forma un altre enllaç tiòlic d'alta energia (E2-S~ubiquitina) i, després, la ubiquitina passa a la proteïna substrat que s'ha de degradar, mitjançant un enllaç isopeptídic entre el grup carboxil de la glicina terminal de la ubiquitina i l' ϵ -amí d'un residu de lisina intern de la proteïna (tot i que alguna vegada la ubiquitina també s'uneix al grup amí terminal de la proteïna). Aquesta proteïna està unida de manera específica a un tercer enzim, E3 (enzim ubiquitina-proteïna ligasa). Tal com s'esdevé amb els E2, els enzims E3 són nombrosos (en el

genoma humà se n'han identificat al voltant d'un miler). Els més coneguts pertanyen a les famílies d'enzims E3 amb un domini HECT i a les d'enzims E3 amb un domini RING. Els E3 que contenen el dit RING catalitzen probablement la transferència de la ubiquitina des dels enzims E2 fins al substrat, com ho fan probablement també altres E3, com els que tenen una capsula U o un domini PHD, mentre que en els E3 amb domini HECT hi ha una transferència prèvia de la ubiquitina a un residu cisteïna dels enzims E3 per a formar un nou intermediari tiòlic d'alta energia, E3-S-ubiquitina, abans de transferir aquesta ubiquitina a la proteïna substrat. Després d'aquest procés, es pot produir la incorporació d'altres ubiquitines activades a grups ϵ -amí de residus interns de lisina de la ubiquitina anterior (habitualment es tracta del Lys⁴⁸) ja unida al substrat. Això dóna lloc a una cadena de poliubiquitines que serà reconeguda pel proteasoma. Malgrat que probablement l'enzim E1 és únic, l'elevat nombre d'enzims E2, enzims conjugadors d'ubiquitina, i, sobretot, d'enzims E3, ubiquitina ligases, permeten una gran flexibilitat i especificitat en el reconeixement dels diversos substrats. La fosforilació d'algunes proteïnes sembla ésser un requisit malgrat no ésser l'únic, per a la ubiquitinació i subsegüent degradació de moltes d'aquestes proteïnes (però en alguns casos és a l'invés i aquesta fosforilació protegeix el substrat). En la unió de les cadenes de poliubiquitina intervenen, de vegades també, cooperant amb els enzims E1, E2 i E3, uns enzims, anomenats *E4*, que en realitat són un tipus especial d'enzim E3. Recentment s'ha posat de manifest allò que ja se sospitava: que el paper de la cadena de poliubiquitina és dirigir la proteïna fins al proteasoma sense intervenir pròpiament en l'inici del procés de degradació.

Malgrat que, com ja s'ha dit, habitualment es fa servir el Lys⁴⁸ de la ubiquitina per a formar les cadenes de poliubiquitina, també es poden usar altres residus de lisina alterna-

tius en la molècula d'ubiquitina, com són ara el Lys⁶, el Lys¹¹, el Lys²⁷, el Lys³³ i el Lys⁶³. La ubiquitina compleix altres funcions, a més de la poliubiquitinació de proteïnes per a senyalitzar-les com a substrats del proteasoma, i de vegades intervé com a senyal de direccionament que determina la localització i destinació de diferents proteïnes. En contrast amb la degradació de proteïnes mitjançada per proteasomes, que requereix cadenes relativament llargues de poliubiquitina, l'endocitosi requereix gairebé sempre monoubiquitinació i prou. Així, per exemple, la ubiquitinació intervé en la internalització de diversos receptors de membrana, incloent-hi diversos receptors amb activitat de tirosina cinasa que són monoubiquitinats a la superfície cel·lular per la ubiquitina ligasa Cbl, la qual cosa en determina la internalització i direccionament al sistema endosomal. La monoubiquitinació és també necessària per a dirigir proteïnes a l'interior dels cossos multivesiculars (unes estructures d'origen endosomal). Tanmateix, en algun cas, també en l'endocitosi poden intervenir processos de poliubiquitinació. La topologia de la ubiquitinació és també important per a decidir la destinació final de la proteïna. Així, les proteïnes poliubiquitinades en el Lys⁶³ s'han implicat en els llevats (*S. cerevisiae*) en processos diferents dels de la degradació de proteïnes, com ara la reparació del DNA, el control de la traducció de proteïnes, l'endocitosi o l'activació de proteïncinases. Existeixen altres exemples de poliubiquitinacions no dirigides a la degradació intracel·lular de proteïnes, tot i que el seu paper és menys clar. Una complicació addicional es deu a la possibilitat que la ubiquitinació en el residu N-terminal, independentment d'ubiquitinacions en les lisines d'una proteïna, actui, com ja hem indicat, com un senyal per a la seva degradació. En qualsevol cas, aquesta diversitat en la topologia de les ubiquitinacions indica que la ubiquitina té un paper molt més ampli que la simple proteòlisi dependent de proteasomes. Convé

esmentar, també, i encara que sigui breument, que, de la mateixa manera que les proteïnofosfatases actuen en direcció oposada a les proteïncinases, existeix també una àmplia varietat d'enzims desubiquitinadors, que no sols permeten de recuperar les ubiquitines de les proteïnes que es degraden en els proteasomes, sinó també revertir l'efecte de les ubiquitinacions. Així mateix, afegirem que la ubiquitina és un membre d'una família de proteïnes senyalitzadores, que comparteixen el mecanisme de marcatge de proteïnes per enllaç isopeptídic, i que inclouen SUMO, Nedd8/Rub1, Atg12/Atg5, etc.

LA MAQUINÀRIA DE DEGRADACIÓ INTRACEL·LULAR DE PROTEÏNES UBIQUITINADES: PROTEASES I PROTEASOMES

Tothom sap que, en cèl·lules eucariotes, la major part de les proteïnes (llevat d'unes poques que són sintetitzades pels mitoribosomes o pels ribosomes de cloroplasts) se sintetitzen en ribosomes lliures o associats a membranes. Quant a la degradació intracel·lular de proteïnes, aquí intervenen uns enzims, anomenats genèricament *proteases*, que hidrolitzen els enllaços peptídics de les proteïnes. En el genoma humà s'han identificat al voltant de cinc-centes proteases (Puente *et al.*, 2003), i n'hi ha moltes que es troben localitzades dins de la cèl·lula en gairebé tots els subcompartiments, on controlen posttraduccionament un elevat nombre de funcions. Aquesta varietat de proteases determina que siguin nombrosos els llocs en la cèl·lula on transcorre la degradació intracel·lular de proteïnes. Ara bé, les cèl·lules eucariòtiques tenen dos sistemes principals de degradació intracel·lular de proteïnes. Un d'ells és el sistema ubiquitina-proteasoma, responsable, sobretot, de la degradació selectiva de moltes proteïnes de vida mitjana curta. L'altre és el sistema lisosomal, que degrada tant proteïnes de l'exterior com de l'interior de les

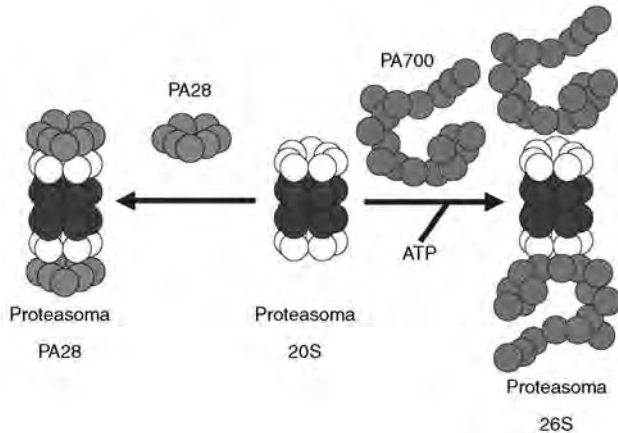
cèl·lules i del qual, malgrat la importància que té, no parlarem aquí.

Els *proteasomes* (Glickman i Ciechanover, 2002; Pickart i Cohen, 2004) intervenen, almenys però no pas exclusivament, en la degradació de proteïnes defectuoses, incloent-hi nombroses proteïnes mal plegades en el reticle endoplasmàtic, i que en surten per a ésser degradades per proteasomes citosòlics, i proteïnes reguladores de vida mitjana molt curta i de molta importància. Els diferents *proteasomes* (el 20S, sol o unit a diferents complexos reguladors, com el 19S o el PA28 i potser d'altres) són proteïnes d'una elevada massa molecular, àmpliament distribuïdes i són responsables de la proteòlisi que es produeix seguint diferents vies de degradació de proteïnes, dependents o independents del polipèptid ubiquitina. El *proteasoma 20S* està format per dues còpies de set subunitats α diferents i per dues còpies més de set subunitats β diferents, totes de massa molecular entre 21 i 35 kDa, que formen un cilindre buit de quatre anells heptàmers apilonats (en una estructura $\alpha_{1-7}\beta_{1-7}\beta_{1-7}\alpha_{1-7}$). Les dues còpies de cada subunitat ocupen posicions equivalents en les dues meitats simètriques del cilindre, la qual cosa resulta en una estructura amb doble simetria amb les subunitats α i β localitzades en els anells exteriors i interiors, respectivament, del cilindre. Tres de les subunitats β tenen activitats catalítiques, denominades, respectivament, *activitat similar a la quimotripsina*, *activitat similar a la tripsina* i *activitat hidrolitzadora de pèptids peptidil-glutamil* (o també, *activitat anàloga a les caspases*). No obstant això, el nombre de subunitats en cèl·lules de mamífer és superior a catorze, ja que aquí existeixen tres subunitats β addicionals, LMP2, LMP7 i MECL1, no essencials, que s'indueixen pel γ -interferó i que s'incorporen al proteasoma 20S a expenses de les tres subunitats catalítiques delta o Y, MB1 o X i Z per a constituir els anomenats *immunoproteaso-*

mes. A més, algunes subunitats del proteasoma apareixen amb diverses isoformes. Tot plegat possibilita l'existència de subpoblacions del proteasoma en diferents localitzacions (nucli i citosol, incloent-hi la cara citosòlica de la membrana del reticle endoplasmàtic) i amb funcions diverses.

El proteasoma 20S pot formar part de complexos més grans. Així, el *proteasoma 26S* està constituït per un cor proteolític, el proteasoma 20S, i per la partícula reguladora 19S, que regula l'activitat del proteasoma 20S. Fins a dues d'aquestes partícules reguladores poden disposar-se en cada un dels dos extrems del cilindre que forma el proteasoma 20S. La partícula reguladora 19S consisteix en, almenys, setze subunitats diferents i està formada per una tapa, que conté vuit subunitats no ATPasa distintes (Rpn3, Rpn5-Rpn9, Rpn11 i Rpn12), i una base amb sis subunitats ATPasa (Rpt1-Rpt6) i dues subunitats no ATPasa (Rpn1, Rpn2). A més, es continuen proposant subunitats addicionals, per la qual cosa no es pot considerar que la caracterització de la partícula reguladora 19S estigui encara conclosa. Es pot formar un altre complex entre el proteasoma 20S i el regulador 11S (o PA28 o REG) anomenat *proteasoma-PA28*. El regulador 11S està compost per dues subunitats homòlogues (cap de les quals és una ATPasa) i forma un anell heptàmer (homòmer o heteròmer). Aquest complex, absent en els llevats, es creu que intervé en la producció, en el citosol cel·lular, de pèptids antigènics que passarien al reticle endoplasmàtic a través de les proteïnes del transportador associat amb el processament d'antígens (TAP) per a la seva presentació pel complex principal d'histocompatibilitat classe I. El regulador 11S i el 19S també es poden unir alhora, cadascun per un extrem, al proteasoma 20S, i generar un proteasoma mixt o híbrid, que s'ha calculat que representa la quarta part de tots els proteasomes, però encara se'n desconeix la funció. Els proteasomes, per tant, intervenen en les vies no lisosòmiques de degradació

intracel·lular de proteïnes, tant dependents (el 26S però no el 20S) com independents del polipèptid ubiquitina (el 20S i el PA28-proteasoma).



26

FIGURA 3. Alguns dels diferents proteasomes que operen en cèl·lules eucariotes superiors. Vegeu-ne l'explicació en el text.

IMPORTÀNCIA FISIOLÒGICA DE LA DEGRADACIÓ INTRACEL·LULAR DE PROTEÏNES PER LA VIA UBIQUITINA-PROTEASOMA

El nombre de substrats fisiològics de la via ubiquitina-proteasoma ha augmentat considerablement en els darrers anys. Així, per exemple, es degraden per aquestes vies les ciclines, que controlen, en diversos punts, la progressió del cicle de divisió cel·lular; diferents factors de transcripció, molts dels quals són també protooncògens, atès que formes mutades d'aquests factors donen lloc a transformació cel·lular; nombrosos supressors tumorals; diverses proteïnes reguladores

que catalitzen passos limitants de rutes metabòliques, etc. Com a conseqüència de la identificació de tots aquests substrats, s'ha posat de manifest la participació d'aquest procés en la regulació de diferents processos cel·lulars que ja esmentàvem abans. Aquí en recordarem un parell.

1. Cicle cel·lular

La progressió del cicle cel·lular depèn, entre altres coses, de la síntesi i la degradació d'unes proteïnes anomenades *ciclines*. Aquestes són degradades per la via ubiquitina-proteasoma segons el que es va demostrar entorn del 1990 i, si això no s'esdevé, el cicle cel·lular s'atura. A més, l'enzim E3 que intervé en aquesta degradació té diverses subunitats i constitueix l'anomenat *complex promotor de l'anafase*. Aquest té una funció molt important també en la separació dels cromosomes en l'anafase, tant durant la mitosi com durant la meiosi.

27

2. Reaccions inflammatòries i presentació d'antígens

En les respostes inflammatòries i immunes intervenen molts gens que desenvolupen funcions molt importants. L'expressió de molts d'aquests gens està regulada per un factor de transcripció anomenat *NF- κ B* que normalment es troba en la cèl·lula formant un complex inactiu amb una proteïna inhibidora anomenada *I κ B*. Davant d'una inflamació, produïda per exemple per un bacteri, la proteïna I κ B és fosforilada i això desencadena la poliubiquitinació d'aquesta proteïna i la seva degradació pel proteasoma. En quedar lliure, ara el factor de transcripció NF- κ B es transporta al nucli, on s'uneix a determinats llocs en el DNA i activa la transcripció de gens relacionats amb la resposta inflammatòria.

D'altra banda, la invasió d'una cèl·lula per un virus determina que una part de les proteïnes codificades pel material genètic siguin degradades fins a pèptids pels proteasomes citosòlics. Després, aquests pèptids es transporten a l'interior del reticle endoplasmàtic, on s'uneixen a les molècules del complex principal d'histocompatibilitat classe I que es dirigeixen a la membrana plasmàtica i presenten aquests antigens al sistema immunitari. Quan aquest reconeix, a través dels receptors d'un limfòcit T assassí o d'un limfòcit T CD8+, els pèptids estranys units al complex principal d'histocompatibilitat classe I i que han estat produïts pel sistema ubiquitina-proteasoma, destrueix la cèl·lula infectada de manera que impedeix, o si més no retarda, la propagació del virus. Per tant, els proteasomes constitueixen una part important del sistema de defensa davant les infeccions víriques.

Les anteriors no són les úniques funcions cel·lulars en què estan implicats els proteasomes. Tanmateix, per raons d'espai sols podem esmentar alguna de les altres funcions: el control de qualitat de les proteïnes acabades de sintetitzar, la reparació del DNA, el control de l'expressió gènica, la progressió dels ritmes circadianis, el control de la floració en plantes, etc.

ALGUNES IMPLICACIONS PATOLÒGIQUES D'ALTERACIONS EN ELS MECANISMES DE DEGRADACIÓ INTRACEL·LULAR DE PROTEÏNES

Els mecanismes de degradació intracel·lular de proteïnes operen en totes les cèl·lules superiors i el seu mal funcionament pot originar diverses patologies. De fet, es coneixen més de cinquanta malalties genètiques hereditàries que afecten els processos de proteòlisi, i sols les proteases representen ja prop d'un 10 % de les dianes de drogues terapèutiques.

1. Càncer

Nombroses evidències indiquen que alteracions en la proteòlisi mitjançada per ubiquitina de reguladors del cicle cel·lular contribueixen a la tumorigènesi, tant per una degradació defectuosa de reguladors positius del cicle cel·lular com per la degradació augmentada de reguladors negatius del cicle cel·lular, incloent-hi proteïnes proapoptòtiques. Com a resultat d'aquest fet, la via ubiquitina-proteasoma és actualment una diana per al desenvolupament de nous tractaments per al càncer. Així, s'usa un inhibidor dels proteasomes, el Velcade (Bortezomib o PS341), per al tractament del mieloma múltiple i que potser es pot fer extensiu a altres tipus de càncer. També s'ha d'esperar que els enzims E3, per la seva major especificitat, siguin dianes terapèutiques més apropiades pel fet que sols afecten la degradació de determinats substrats i no pas tota l'activitat del proteasoma. Alteracions en altres vies de degradació intracel·lular de proteïnes distintes al proteasoma també són importants en el desenvolupament del càncer. Així, també s'ha observat tot sovint una relació inversa entre l'activitat lisosomal i el potencial maligne, la qual cosa suggereix que defectes en les vies lisomals de degradació intracel·lular de proteïnes contribueixen al desenvolupament del càncer. De fet, Beclin1, l'homòleg en mamífers de Apg6/Vps30p de llevats, intervé en el control negatiu del creixement cel·lular i en supressió tumoral.

2. Malalties neurodegeneratives: la degradació de proteïnes com a alternativa al plegament

A més del càncer, les alteracions en les vies de degradació s'han associat a un creixent nombre de situacions patològiques, com són ara miopaties del múscul cardíac i del múscul

esquelètic, deficiència de α -antitripsina, malalties infeccioses i malalties neurodegeneratives. Així, en una àmplia varietat de malalties cròniques degeneratives s'ha descrit l'aparició de conjugats d'ubiquitina, proteasomes i determinades proteïnes característiques de la malaltia. De fet, se sap que una característica comuna de nombroses malalties neurodegeneratives, malgrat que també de l'envelliment, és l'aparició d'agregats proteics. Aquests agregats, que es formen intracel·lularment o extracel·lularment, es coneixen amb diversos noms, entre els quals hi ha els de *agregats de proteïnes*, *plaques* (que generalment es fa servir per a agregats proteics extracel·lulars), *cossos d'inclusió*, *cossos ceroides*, *cossos de lipofuscina*, *agressomes*, etc. Aquests agregats de proteïnes són insolubles i, sobre una fase inicial de petits agregats a partir de proteïnes plegades defectuosament, i mitjançant entrecreuaments de les proteïnes, donen lloc a una malla de proteïnes que n'atrapen unes altres i originen agregats insolubles d'elevat pes molecular que es dipositen a la cèl·lula, tant al citosol i nucleoplasma com a l'interior de determinats orgànuls. Això s'esdevé, per exemple, en la malaltia d'Alzheimer, en què s'acumulen madeixes neurofibril·lars, i on les principals proteïnes agregades són la tau i la proteïna amiloide; en la malaltia de Parkinson, en què s'acumulen cossos de Lewy i on la principal proteïna agregada és la nucleïna, però també la tau; en la malaltia de Huntington, en què s'acumulen, especialment al nucli, proteïnes amb poliglutamines com la huntingtina i l'esclerosi amiotròfica lateral, i on s'acumulen els cossos de bunina, en els quals novament tau i la proteïna amiloide són les proteïnes més freqüents; en la malaltia de Creutzfeldt-Jacob, en què la principal proteïna agregada és la proteïna prió tant dins (endosomes) com fora de la cèl·lula, l'ataxia 1 i 3 espinocerebel·losa, i on les principals proteïnes agregades són l'ataxina 1 i 3 respectivament; en la malaltia de Pick, en què la principal proteïna agregada és novament

tau en el citosol; en la malaltia de Friedrich, on la principal proteïna agregada és la frataxina al nucleoplasma, etc. En molts d'aquells casos en què s'acumulen proteïnes al citosol es produeix un transport de proteïnes amb plegament defectuós al centrosoma, o centre d'organització de microtúbuls, on constitueixen tot sovint una estructura que envolten filaments intermedis. Les proteïnes allí acumulades apareixen modificades per oxidacions, poliubiquitinacions, etc. En el cas de poliubiquitinacions, aquesta modificació respon a l'intent, per part de la cèl·lula, d'eliminar aquests agregats, ja que la seva acumulació, especialment en el cas de cèl·lules no proliferants, és perjudicial per al seu funcionament normal. Malgrat que en algun cas s'ha pogut establir una relació directa entre l'alteració en el sistema ubiquitina, en el cas de moltes d'aquestes malalties s'ha demostrat que l'acumulació de material agregat al citosol (en forma d'agressomes pericentriolars o fibril·les de tipus amiloide) altera indirectament el funcionament normal de la maquinària proteolítica del sistema ubiquitina-proteasoma, essencial per a la supervivència cel·lular. Tanmateix, altres sistemes procuren compensar aquest defecte activant-se tant per eliminar els agregats com per mirar de substituir almenys algunes de les funcions dels proteasomes.

Les esmentades no són les úniques patologies en què hi ha implicats els proteasomes. No obstant això, novament per raons d'espai sols podem esmentar alguna de les altres: fibrosi cística, mongolisme, etc.

En definitiva, doncs, els treballs de Hershko, Ciechanover i Rose, premis Nobel de Química de 2004, però també els de molts altres investigadors, han permès d'elucidar una de les vies per les quals les proteïnes segueixen el camí invers al de la seva síntesi. La degradació intracel·lular de proteïnes ha estat, fins fa una trentena d'anys, un procés al qual, en comparació amb la síntesi de proteïnes, no s'havia pres-

tat gaire atenció pel fet de considerar-lo poc important. Ara bé, actualment sembla prou clar que la destrucció de les proteïnes és absolutament necessària per a la vida, que el funcionament defectuós d'aquest procés està implicat en nombroses patologies i que el seu coneixement bàsic contribuirà a desenvolupar teràpies eficaces per a aquestes patologies.

BIBLIOGRAFIA

- CIECHANOVER, A.; ELIAS, S.; HELLER, H.; HERSHKO, A. (1982). «Covalent affinity purification of ubiquitin-activating enzyme». *J. Biol. Chem.*, núm. 257, p. 2537-2542.
- CIECHANOVER, A.; HELLER, H.; ELIAS, S.; HAAS, A. L.; HERSHKO, A. (1980). «ATP-dependent conjugation of reticulocyte proteins with the polypeptide required for protein degradation». *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, núm. 77, p. 1365-1368.
- CIECHANOVER, A.; HELLER, H.; KATZ-ETZION, R.; HERSHKO, A. (1981). «Activation of the heat-stable polypeptide of the ATP-dependent proteolytic system». *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, núm. 78, p. 761-765.
- CIECHANOVER, A.; HOD, Y.; HERSHKO, A. (1978). «A heat-stable polypeptide component of an ATP-dependent proteolytic system from reticulocytes». *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, núm. 81, p. 1100-1105.
- ETLINGER, J. D.; GOLDBERG, A. L. (1977). «A soluble ATP-dependent proteolytic system responsible for the degradation of abnormal proteins in reticulocytes». *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, núm. 78, p. 761-765.
- GLICKMAN, M. H.; CIECHANOVER, A. (2002). «The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction». *Physiol. Rev.*, núm. 82, p. 373-428.

- HAAS, A.L.; ROSE, I.A. (1982). «The mechanism of ubiquitin activating enzyme». *J. Biol. Chem.*, núm. 257, p. 10329-10337.
- HERSHKO, A.; CIECHANOVER, A. (1998). «The ubiquitin system». *Annu. Rev. Biochem.*, núm. 67, p. 425-479.
- HERSHKO, A.; CIECHANOVER, A.; HELLER, H.; HAAS, A. L.; ROSE, I. A. (1980). «Proposed role of ATP in protein breakdown: conjugation of proteins with multiple chains of the polypeptide of ATP-dependent proteolysis». *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, núm. 77, p. 1783-1786.
- HERSHKO, A.; CIECHANOVER, A.; ROSE, I. A. (1979). «Resolution of the ATP-dependent proteolytic system from reticulocytes: a component that interacts with ATP». *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, núm. 76, p. 3107-3110.
- (1981). «Identification of the active amino acid residue of the polypeptide of ATP-dependent protein breakdown». *J. Biol. Chem.*, núm. 256, p. 1525-1528.
- HERSHKO, A.; CIECHANOVER, A.; VARSHAVSKY, A. (2000). «Basic Medical Research Award. The ubiquitin system». *Nat. Med.*, núm. 6, p. 1073-1081.
- HERSHKO, A.; EYTAN, E.; CIECHANOVER, A.; HAAS, A. L. (1982). «Immunochemical analysis of the turnover of ubiquitin-protein conjugates in intact cells». *J. Biol. Chem.*, núm. 257, p. 13964-13970.
- HERSHKO, A.; HELLER, H.; ELIAS, S.; CIECHANOVER, A. (1983). «Components of ubiquitin-protein ligase system». *J. Biol. Chem.*, núm. 258, p. 8206-8214.
- PICKART, C. M.; COHEN, R. E. (2004). «Proteasomes and their kin: proteases in the machine age». *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, núm. 5, p. 177-187.
- PUENTE, X. S.; SÁNCHEZ, L. M.; OVERALL, C. M.; LÓPEZ-OTÍN, C. (2003). «Human and mouse proteases: a comparative genomic approach». *Nat. Rev. Genet.*, núm. 4, p. 544-558.

- SCHOENHEIMER (1942). *The Dynamic State of Body Constituents*. Harvard University Press, Cambridge, MS.
- SIMPSON, M. V. (1953). «The release of labeled amino acids from the proteins of rat liver slices». *J. Biol. Chem.*, núm. 201, p. 143-154.
- WILKINSON, K. D.; URBAN, M. K.; HAAS, A. L. (1980). «Ubiquitin is the ATP dependent proteolysis factor I of rabbit reticulocytes». *J. Biol. Chem.*, núm. 255, p. 7529-7532.