



Universitat Autònoma de Barcelona

**ADVERTIMENT.** L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  [http://cat.creativecommons.org/?page\\_id=184](http://cat.creativecommons.org/?page_id=184)

**ADVERTENCIA.** El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

**WARNING.** The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>



**Universitat Autònoma de Barcelona**  
**Departament de Bioquímica i Biologia Molecular**  
**Unitat de Medicina**

**ESTUDI DEL PAPER DE LA PROTEÏNA QUINASA  
CK2 EN L'INICI DE LA TRADUCCIÓ DE  
PROTEÏNES I DE LA SEVA ASSOCIACIÓ A  
MICRODOMINIS DE LA MEMBRANA CEL·LULAR**

Memòria presentada per

**Antoni Falqués Costa**

Per optar al grau de Doctor en  
Bioquímica, Biologia Molecular i Biomedicina

Treball realitzat al Departament de Bioquímica i Biologia Molecular  
de la Universitat Autònoma de Barcelona,  
sota la direcció del  
Dr. Carles Gil Giró i la tutoria del Dr. Emili Itarte Fresquet

**Dr. Carles Gil Giró**  
(Director)

**Antoni Falqués Costa**  
(Doctorand)

Bellaterra, Desembre 2016





## **AGRAÏMENTS ESPECIALS**

Vull agrair al Dr. Carles Gil Giró els seus anys de col·laboració i sobretot haver acceptat la direcció d'aquesta tesi en el seu tram final. Un agraïment també per al Dr. Emili Itarte Fresquet per els seus anys de dedicació i direcció en l'inici d'aquest treball.

## **FONTS DE FINANÇAMENT**

BFU2005-07573. *Proteína quinasa CK2 en los complejos de inicio de la traducción en mamíferos. Interacciones y fosforilaciones funcionales en el complejo multifactorial*. IP: Emilio Itarte Fresquet.

BFU2009-10189. *Proteína quinasa CK2 y respuesta a HB-EGF: Implicación en carcinoma renal de células claras*. IP: Emilio Itarte Fresquet.

Anton Falqués Costa ha estat becari PIF per la Universitat Autònoma de Barcelona.





**ÍNDEX TEMÀTIC**

<b>ÍNDEX TEMÀTIC</b> .....	i
<b>RESUM</b> .....	v
<b>ABREVIATURES</b> .....	vii
<b>INTRODUCCIÓ</b> .....	1
<b>1 Proteïna Quinasa CK2</b> .....	3
1.1 Característiques generals .....	3
1.1.1 Estructura general i característiques enzimàtiques de CK2.....	3
1.1.2 Especificitat dual de CK2.....	5
1.2 Estructura de CK2 .....	6
1.2.1 Subunitats catalítiques de CK2, compensació funcional i especialització .....	6
1.2.2 Estructura de CK2 $\alpha$ .....	7
1.2.3 Subunitat reguladora CK2 $\beta$ .....	11
1.2.4 Funcions del dímer de CK2 $\beta$ aïllat.....	14
1.3 Regulació cel·lular de CK2 .....	15
1.3.1 Regulació de l'expressió i de l'assemblatge.....	16
1.3.2 Regulació per fosforilació de CK2.....	17
1.3.3 Regulació de les interaccions amb proteïnes i/o molècules no proteiques.....	18
1.4 Localització tissular i subcel·lular de CK2 .....	18
1.4.1 Localització subcel·lular de la proteïna quinasa CK2 .....	19
1.4.2 CK2 a membrana plasmàtica .....	19
1.4.3 CK2 al citosol.....	20
1.4.4 CK2 a mitocondris.....	20
1.4.5 CK2 en reticle endoplasmàtic.....	21
1.4.6 CK2 en citoesquelet .....	21
1.4.7 Altres localitzacions de CK2 .....	21
1.5 Paper fisiològic de CK2 .....	22
1.5.1 CK2 al cicle cel·lular i la proliferació .....	23
1.5.2 CK2 en supervivència cel·lular i apoptosi .....	24
1.5.3 CK2 en resposta a l'estrès.....	25
<b>2 Factors d'iniciació de la traducció</b> .....	26
2.1 <i>Multifactor Complex</i> , l'inici de la traducció proteica i la formació dels complexos de preiniciació de la traducció .....	26
2.2 La família dels factors d'iniciació de la traducció .....	28
2.2.1 eIF1, el més petit de la família.....	28
2.2.2 eIF5, la seva activitat GTPasa és clau.....	28
2.2.3 eIF4, responsable de guiar l'mRNA cap al ribosoma.....	29



2.2.4	eIF3, l'esquelet del complex ternari .....	30
2.2.5	eIF2, un trímer clau .....	33
2.2.6	eIF2 $\beta$ , substrat de CK2 i estabilitzadora del complex .....	33
2.3	Mecanismes de control de la traducció .....	36
2.4	El paper de la proteïna CK2 en síntesi proteica.....	37
<b>3</b>	<b>Microdominis de membrana</b> .....	<b>39</b>
3.1	El model del mosaic fluid .....	39
3.2	Primeres caracteritzacions de les membranes resistents al detergent .....	42
3.3	Dos tipus de microdominis: Caveoles i <i>Lipid raft</i> .....	44
3.3.1	Les caveoles .....	44
3.3.2	Lipid raft.....	45
3.4	Els microdominis de membrana i les proteïnes associades .....	46
3.5	Els receptors dels factors de creixement i els <i>lipid raft</i> .....	48
3.5.1	El receptor d'EGF.....	48
3.5.2	Paper dels <i>lipid raft</i> i caveoles en senyalització per EGFR.....	49
3.6	Els dominis lipídics al sistema nerviós: una funció essencial per als esfingolípidis .....	51
3.7	El <i>lipid raft</i> i el seu paper en l'exocitosi neuronal .....	53
3.7.1	Procés d'exocitosi .....	53
3.7.2	Complex SNARE.....	54
3.7.3	La família de Syntaxina .....	56
	<b>OBJECTIUS</b> .....	<b>59</b>
<b>4</b>	<b>OBJECTIUS</b> .....	<b>61</b>
	<b>MATERIALS I MÈTODES</b> .....	<b>63</b>
5.1	Cultius cel·lulars .....	65
5.1.1	Línies cel·lulars .....	65
5.1.2	Manteniment de les línies cel·lulars .....	66
5.1.3	Sincronització de cultius .....	67
5.1.4	Recompte cel·lular .....	68
5.1.5	Congelació i descongelació de línies cel·lulars .....	69
5.1.6	Tractaments amb inhibidors de CK2.....	70
5.2	Obtenció de línies silenciades.....	71
5.2.1	Silenciament transitori amb siRNA .....	71
5.2.2	Línies cel·lulars silenciades de manera estables amb shRNA.....	73
5.3	Gradients de Sucrosa .....	75
5.3.1	Gradients discontinus.....	76
5.3.2	Gradients lineals .....	77
5.4	Tècniques de proteïnes .....	79
5.4.1	Obtenció d'extractes cel·lulars totals i fraccionament subcel·lular .....	79

5.4.2	Determinació de la concentració de proteïna .....	80
5.4.3	Coimmunoprecipitació.....	81
5.4.4	Extracció de proteïnes amb Àcid Tricloroacètic.....	83
5.4.5	Transfecció transitòria amb PEI.....	84
5.5	Electroforesis de proteïnes i anàlisi per immunodetecció .....	85
5.5.1	Electroforesi.....	85
5.5.2	Tinció dels gels SDS-PAGE en blau de coomassie.....	87
5.5.3	Electrotransferència .....	87
5.5.4	Immunodetecció.....	89
5.6	Activitats enzimàtiques i marcatges radioactius.....	90
5.6.1	Assaig d'activitat de CK2 en mostres biològiques .....	90
5.6.2	Fosforilació in vitro d'eIF2 $\beta$ per CK2.....	92
5.6.3	Marcatge metabòlic amb <sup>35</sup> S-Met/Cys .....	93
5.7	Tècniques amb membranes cel·lulars.....	95
5.7.1	Obtenció de membranes sinaptosomals – Fracció P2.....	95
5.7.2	Aïllament de membranes resistents a detergent .....	96
5.7.3	Extracció i mesura de colesterol .....	97
5.7.4	Alliberament de Glutamat.....	99
<b>RESULTATS .....</b>		<b>101</b>
<b>Capítol I .....</b>		<b>103</b>
<b><i>Paper de la proteïna quinasa CK2 en l'assemblatge de complexos d'iniciació de la traducció en cèl·lules HEK293T.....</i></b>		<b>103</b>
6.1	Caracterització dels complexos d'iniciació de la traducció proteica en HEK293T .....	105
6.2	Quantificació de la fosforilació d'eIF2 $\beta$ en les dianes per CK2.....	106
6.3	La mutació S2A d'eIF2 $\beta$ alterava el patró de sedimentació d'eIF3.....	109
6.4	La inhibició farmacològica de la proteïna quinasa CK2 alterava els complexos de preiniciació i la síntesi proteica .....	111
6.5	El silenciament transitori de CK2 $\alpha$ i CK2 $\beta$ provocava un desassemblatge dels complexos d'inici de la traducció .....	118
6.6	El tractament farmacològic amb TBB afectava a la incorporació d'eIF2 $\beta$ als complexos que contenen eIF3b i eIF3c .....	127
Conclusions Capítol I .....		128
<b>Capítol II .....</b>		<b>129</b>
<b><i>Estudi de la presència i funció fisiològica de la proteïna quinasa CK2 en microdominis de membrana (Lipid rafts) .....</i></b>		<b>129</b>
7.1	La proteïna quinasa CK2 s'associa als <i>lipid raft</i> dels sinaptosomes de rata.....	131
7.1.1	Presència de la proteïna quinasa CK2 als DRM de sinaptosomes de rata .....	131
7.1.2	La depleció del colesterol provocava un desancoratge de CK2 de la membrana .....	136

7.1.3	La inhibició farmacològica de CK2 provocava un augment de l'alliberament de glutamat 140	
7.2	Caracterització inicial de la presència i funció fisiològica de CK2 en membranes riques en <i>lipid raft</i> en cèl·lules renals humanes .....	142
7.2.1	Condicions de creixement i purificació dels lipid raft en HK-2.....	142
7.2.2	Presència de CK2 en DRM de cèl·lules HK-2.....	146
7.2.3	La depleció de colesterol provoca que CK2 es desancori .....	147
7.2.4	Resposta cel·lular al tractament amb MCD.....	149
7.2.5	L'efecte dels factors de creixement .....	151
	Conclusions Capítol II.....	154
	<b>CONCLUSIONS</b> .....	155
8.1	Conclusions Generals.....	157
8.1.1	Capítol I .....	157
8.1.2	Capítol II .....	157
	<b>DISCUSSIÓ</b> .....	159
9.1	Discussió general .....	161
9.2	Discussió del capítol 1: Paper de la proteïna quinasa CK2 en l'assemblatge de complexos d'iniciació de la traducció en cèl·lules HEK293T .....	162
9.3	Discussió del capítol 2: Estudi de la presència i funció fisiològica de la proteïna quinasa CK2 en microdominis de membrana ( <i>Lipid rafts</i> ).....	169
	<b>BIBLIOGRAFIA</b> .....	177
	<b>ÍNDEX SUPLEMENTARIS</b> .....	195
11.1	Índex d'il·lustracions .....	197
11.2	Índex de taules .....	198
11.3	Índex de figures.....	199
	<b>ANNEX</b> .....	201

## **RESUM**

La proteïna quinasa CK2 és una serina treonina quinasa que s'expressa ubiquament a la cèl·lula i de manera pleiotròpica en humans, és constitutivament activa i se n'han descrit més d'un centenar de substrats.

En aquest treball hem estudiat el paper que juga aquesta proteïna en dos entorns diferents: en la regulació de l'inici del procés de traducció en el marc de la síntesi proteica i en el paper que juga quan apareix associada a microdominis de membrana i, més concretament a, *lipid raft*. CK2 presenta diversos substrats en tot l'entramat de proteïnes que conformen el *Multifactor Complex*, un compendi de proteïnes responsables dels primers passos de la de la síntesi proteica, i en aquest treball ens hem centrat en eIF2 i eIF3, on algunes de les seves subunitats són substrats de la quinasa.

Després de plantejar-nos dues aproximacions, la farmacològica amb un dels inhibidor canònics de CK2 com és TBB (4,5,6,7-tetrabromo-1H-benzotriazole), i la genètica, alterant els patrons d'expressió de les subunitats de CK2 es va arribar a la conclusió que la fosforilació d'eIF2 $\beta$  en la seva Ser<sup>2</sup> era clau per mantenir l'estabilitat del complex de preiniciació de la síntesi proteica. L'absència de la fosforilació provocava el desassamblatge dels complexos de preiniciació, que es traduïa amb una menor formació del ribosoma actiu, amb la conseqüent disminució de la síntesi proteica.

En la segona part d'aquest treball es va aportar llum sobre un nou paper de CK2, en aquest cas, quan apareixia associada a microdominis de membrana, tant en sinaptosomes de rata com en cèl·lules humanes de ronyó HK-2.

Aquests microdominis, i en concret els *lipid raft*, són estructures lipídiques riques en colesterol i esfingolípids, i s'han descrit com a grans plataformes de senyalització cel·lular. L'eliminació del colesterol amb metil- $\beta$ -ciclodextrina (MCD) de les nostres membranes provocava el desancoratge i la pèrdua d'activitat de CK2 en aquests microdominis i això ens va portar a intentar entendre'n la raó fisiològica i estructural de la seva associació.

Com que està descrit en la bibliografia que la Ser<sup>14</sup> de Sintaxina-1 és substrat de CK2, vam centrar els nostres estudis en veure quin paper podia tenir en el cas dels sinaptosomes de rata. La Sintaxina-1 forma part del complex SNARE responsable de regular la fusió de les vesícules exocitòtiques amb la membrana presinàptica i vàrem poder comprovar que la inhibició de CK2 amb DMAT (2-dimethylamino-4,5,6,7-tetrabromo-1H-benzimidazole) provocava una desregulació a l'alça de la secreció de glutamat. Per tant, semblava evident que la presència de CK2 en *lipid raft* de sinaptosomes de rata té, com a mínim, la funció de regular l'exocitosi cel·lular.

L'estudi de la presència de CK2 en *lipid raft* de les cèl·lules renals HK-2 va demostrar que també vam ser capaços de detectar CK2 activa a la fracció corresponent als *lipid raft*, i es va començar a caracteritzar la resposta cel·lular als tractaments amb MCD com a treball previ per estudiar la possible relació de CK2 i la via de MAPK, on la quinasa hi té diversos substrats.

Tot i quedar lluny dels objectius marcats, va posar les bases tècniques i els primers indicis experimentals per poder-ne descriure la seva funció fisiològica en un futur.



**ABREVIATURES**

<sup>32</sup> P	Isòtop fòsfor 32
<sup>35</sup> S	Isòtop sofre 35
<sup>35</sup> S-Met	Metionina marcada amb l'isòtop sofre 35
<sup>35</sup> S-Met/Cys	Metionina i marcada amb l'isòtop sofre 35
40S	Subunitat petita del ribosoma eucariota
43S	Complex de preiniciació de la síntesi proteica 43S
48S	Complex de preiniciació de la síntesi proteica 48S
60S	Subunitat gran del ribosoma eucariota
786-O	Línia cel·lular derivada de ronyó humà
80S	Ribosoma eucariota complet. Conté les subunitats 40S i 60S
ADH	Aldehid deshidrogenasa
ADN	Àcid desoxiribonucleic
ARC	De l'anglès " <i>activity-regulated cytoskeleton-associated protein</i> "
Arg	Aminoàcid Arginina
ARN	Àcid Ribonucleic
ARNm	ARN missatger
Asn	Aminoàcid Asparagina
ATP	Adenosil Trifosfat
AUG	Codó d'iniciació de la traducció. Conté Adenina, Uracil i Guanidina
BCA	De l'anglès <i>Bicinchoninic Acid Assay</i> . Mètode de quantificació de proteïnes
BSA	De l'anglès <i>Bovine Serum Albumin</i> .
BSL-2	De l'anglès <i>Biosafety Level 2</i>
Ca <sup>2+</sup>	Catió Calci
CAV-2	De l'anglès <i>Canine Adenovirus Type 2</i>
CD36	De l'anglès <i>Cluster of Differentiation 36</i> també coneguda com a FAT.
CD5	De l'anglès <i>Cluster of Differentiation 5</i> , també coneguda com a LEU1
CD59	Glicoproteïna coneguda també com a MAC-IP o MIRL
Cdc25B	De l'anglès <i>Cell Division Cycle protein 25</i> .
cdc34	De l'anglès <i>Cell Division Cycle protein 37</i>
Cdc37	De l'anglès <i>Cell Division Cycle protein 37</i>
CDK	De l'anglès <i>Cyclin-dependent kinases</i>
Chk1	De l'anglès <i>Checkpoint kinase 1</i>
CIP1	Inhibidor de les ciclins dependent de quinases (CDK)
CK1	De l'anglès <i>Casein Kinase 1</i>
CK2	De l'anglès <i>Casein Kinase 2</i>
CK2α	Subunitat catalítica alfa de CK2
CK2α'	Subunitat catalítica alfa prima de CK2
CK2α''	Subunitat catalítica alfa prima prima de CK2
CK2α2β2	Holoenzim de CK2 format per dues subunitats CK2α i dues de CK2β
CK2β	Subunitat regulador de CK2
CKIP-1	De l'anglès <i>pleckstrin homology domain-containing protein</i>
CMGC	Grup de proteïnes que conté (de l'anglès) <i>cyclin-dependent kinases (CDKs), mitogen-activated protein kinases (MAP kinases), glycogen synthase kinases (GSK) and CDK-like kinases</i>
c-Mos	De l'anglès <i>Proto-oncogene serine/threonine-protein kinase</i>
COP9	De l'anglès <i>Constitutive photomorphogenesis 9</i>
CRL	De l'anglès <i>Certificate Revocation List</i>
CTx-FITC	De l'anglès <i>Cholera toxin</i> conjugada amb <i>Fluorescein isothiocyanate</i>
CV	De l'anglès <i>Control Vector</i> . Utilitzat amb la tècnica del shRNA
CX4549	Inhibidor de CK2, també conegut com <i>Silmitasertib</i>
CX5011	Inhibidor de CK2
Cys	Aminoàcid cisteïna
DHX29	De l'anglès <i>DEAH-Box Helicase 29</i> . DEAH és la seqüència Asp-Glu-Ala-His
DIM	De l'anglès <i>Detergent Insoluble Membranes</i>
DMAT	Inhibidor de CK2
DMEM	De l'anglès <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	De l'anglès Dimethyl sulfoxide
DNA	De l'anglès Deoxyribonucleic Acid

DRM	De l'anglès <i>Detergent Resistant Membranes</i>
dsRNA	De l'anglès double-stranded Ribonucleic Àcid
DTT	De l'anglès <i>Dithiothreitol</i>
ECL	De l'anglès <i>Enhanced Chemoluminescence</i>
EDTA	De l'anglès <i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i>
EGF	De l'anglès <i>Epidermal Grow Factor</i>
EGFR	De l'anglès <i>Epidermal Grow Factor Receptor</i>
EGTA	De l'anglès <i>ethylene glycol-bis(β-aminoethyl ether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid</i>
eIF	De l'anglès Factor d'Iniciació de la Traducció (eIF1, eIF2β, eIF3b...)
eIFs	De l'anglès conjunt de Factors d'Iniciació de la Traducció en eucariotes
EPK	De l'anglès Eucaryotic Protein Kinase
ErbB2	Receptor d'EGF, subunitat 2. També conegut com Her2
ErbB3	Receptor d'EGF, subunitat 3. També conegut com Her3
ErbB4	Receptor d'EGF, subunitat 4. També conegut com Her4
ERK	De l'anglès <i>Extracellular signal-regulated kinases</i>
Erk2	De l'anglès <i>Extracellular signal-regulated kinases</i>
FAF-1	De l'anglès FAS-associated factor 1. FAS és l'antigen TNFRSF6
FBS	De l'anglès Serum Fetal Boví
FGF	De l'anglès <i>Fibroblast growth factor</i>
Flot-1	Flotilina 1
FPR3	Gen codificant de FK506-binding nuclear protein
G418	Antibiòtic també anomenat Geneticina
GAP43	De l'anglès <i>Growth Associated Protein 43</i>
GDH	De l'anglès Glutamat Deshidrogenasa
GDP	De l'anglès <i>Guanosine diphosphate</i> ,
Glu	Aminoàcid Glutamina
GPL	Glicerofosfolípids
Grb2	De l'anglès <i>Growth factor receptor-bound protein 2</i>
GSK	De l'anglès <i>Glycogen synthase kinase</i>
GTP	De l'anglès <i>Guanosine triphosphate</i> ,
HA	De l'anglès <i>Human influenza hemagglutinin</i>
HEK293T	De l'anglès Línia cel·lular derivada de ronyó embrionari humà
HeLa	Línia cel·lular derivada de càncer de cèrvix, que pren el nom de la pacient Henrietta Lacks,
HER	Grup de receptors d'EGF. Conté HER1, HER2, HER3 i HER4.
His	Aminoàcid Histidina
HK-2	De l'anglès Línia cel·lular derivada de ronyó humà sa.
HPV-16	De l'anglès Virus del Papil·loma Humà
H-Ras	GTPasa responsable de l'activació de Ras
HRI	De l'anglès <i>Heme-regulated eIF2α kinase</i>
HRP	De l'anglès <i>Horseradish Peroxidase</i>
Hsp90	De l'anglès <i>Heat Shock Protein</i> de 90 kDa
IC	Estadística: Índex de confiança
IGF-1	De l'anglès <i>Insulin-Like Growth Factor</i>
IgG	Immunoglobulina G
K562	Línia cel·lular humana. De l'anglès <i>Homo sapiens bone marrow chronic myel</i>
KCl	Clorur Potàssic
kDa	Quilo Dalton
KSR1	De l'anglès <i>Kinase Suppressor of Ras</i>
LDH	Lactat deshidrogenasa
LTP	De l'anglès Long term potentiation
Lys	Aminoàcid Lisina
mA	Unitat: MiliAmper
MAPK	De l'anglès <i>Mitogen-activated protein kinase</i> - Wikipedia
MCD	De l'anglès <i>Methyl-β-cyclodextrin</i>
mCi	Unitat: millicurie
MEK-1	De l'anglès <i>Mitogen-activated protein kinase kinase</i>
Met	Aminoàcid Metionina
MFC	De l'anglès <i>Multifactor Complex</i>
Mg	Magnesi

MOI	De l'anglès <i>Multiplicity of Infection</i>
mM	Unitats: milimolars
MPN	Domini proteic compost per <i>Mpr1</i> , <i>Pad1</i> , amino-terminal
Munc18	De l'anglès <i>mammalian uncoordinated-18</i>
NaCl	Clorur de sodi
NADP <sup>+</sup>	De l'anglès <i>Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate</i> , forma oxidada
NADP(H)	De l'anglès <i>Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate</i> , forma reduïda
NCK-1	De l'anglès <i>NCK Adaptor Protein 1</i>
NEU3	Gen que codifica per la Sialidasa-3
NGF	De l'anglès Nerve Growth Factor
Nip1	Nomenclatura equivalent en llevat per eIF3c d'humà
NLS	De l'anglès <i>Nuclear localization signal</i>
nm	Unitats: nanòmetres
nM	Unitats: nanomolar
NMDA	De l'anglès <i>N-methyl-D-aspartate</i>
Nopp 140	De l'anglès Nucleolar and coiled-body phosphoprotein 1
ns	Estadística: no significant
NSF	De l'anglès <i>N-ethylmaleimide-sensitive factor</i>
P/S	De l'anglès <i>Penicillin/Streptomycin Solution</i>
p/v	Unitats: Pes/volum
P1	Fracció membranosa obtinguda després de la primera centrifugació a 1000 g
P2	Fracció membranosa obtinguda després de la segona centrifugació a 12000 g
P <sup>21</sup> WAF1	De l'anglès <i>Cyclin-dependent kinase inhibitor p21</i>
P <sup>27</sup> KIP1	De l'anglès <i>Cyclin-dependent kinase inhibitor 1B</i>
p90Rsk	De l'anglès <i>90 kDa ribosomal protein S6 kinase 1</i>
PAGE	De l'anglès Polyacrylamide gel electrophoresis
PBS	De l'anglès <i>Phosphate-buffered saline</i>
PCI	Domini proteic derivat de proteasoma, COP9 signalosoma, eIF3
pCMV-HA	Vector de clonació derivat del citomegalovirus amb el tag d'hemagglutinin
PDGF	De l'anglès <i>Platelet-derived growth factor</i>
PERK	De l'anglès <i>protein kinase R (PKR)-like endoplasmic reticulum kinase</i>
PI3K	De l'anglès <i>Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase</i>
PIC	De l'anglès <i>Pre-initiation complexes</i>
PIP3	De l'anglès <i>Phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate (PtdIns(3,4,5)P3)</i>
PKA	De l'anglès <i>Protein Kinase A</i>
PKC	De l'anglès <i>Protein Kinase C</i>
PKR	De l'anglès <i>Protein kinase RNA-activated</i> o <i>Protein kinase R</i>
PLC	De l'anglès <i>Phospholipase C</i>
PMSF	De l'anglès <i>Phenylmethane Sulfonyl Fluoride</i>
PP1	De l'anglès <i>Protein phosphatase 1</i>
Prt1	Nomenclatura equivalent en llevat per eIF3b d'humà
PTB	De l'anglès <i>Phosphotyrosine-binding domain</i>
PTC	De l'anglès <i>Proximal Tube Cells</i>
PTEN	De l'anglès <i>Phosphatase and tensin homolog</i>
PTH	De l'anglès <i>Parathyroid hormone</i>
PVDF	De l'anglès <i>Polyvinylidene fluoride</i> o <i>polyvinylidene difluoride</i>
Rac1	De l'anglès <i>Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1</i>
RADA	Seqüència peptídica per l'estudi de l'activitat de CK2 RRRADDSDDDDD
RNA	De l'anglès <i>Ribonucleic acid</i>
RNPs	De l'anglès <i>Ribonucleoprotein</i>
rpm	Unitats: revolucions per minut
rpS6	De l'anglès <i>Ribosomal Protein S6</i>
rRNA	De l'anglès ribosomal <i>Ribonucleic acid</i>
SDS	Dodecilsulfat sòdic
SEC	De l'anglès Size-exclusion chromatography
Ser	Aminoàcid Serina
SH2	De l'anglès <i>Src Homology 2</i>
shRNA	De l'anglès <i>short hairpin RNA</i>
siRNA	De l'anglès small interferent RNA
SNAP	De l'anglès <i>Soluble NSF Attachment Protein</i>



SNARE	De l'anglès <i>Soluble NSF Attachment Protein REceptor</i>
SOS-1	De l'anglès <i>Son of sevenless homolog 1</i>
Src	De l'anglès <i>Proto-oncogene tyrosine-protein kinase Src</i>
STED	De l'anglès <i>Stimulated emission depletion (STED) microscopy</i>
Stx1	De l'anglès <i>Syntaxin-1</i>
Syk	De l'anglès <i>Spleen tyrosine kinase</i>
TBB	Inhibidor de CK2 <i>4,5,6,7-tetrabromobenzotriazole</i>
TBBz	Inhibidor de CK2 <i>4,5,6,7-Tetrabromobenzimidazole</i>
TCA	De l'anglès <i>Trichloroacetic acid</i>
TEMED	De l'anglès <i>Tetrametiletildiamina</i>
TfR	De l'anglès <i>Transferrin Receptor</i>
TGF	De l'anglès <i>Transforming Growth factor</i>
TGN	De l'anglès <i>Trans-Golgi Network</i>
Thr	Aminoàcid Treonina
Thy-1	Coneguda també com CD90, de l'anglès <i>Cluster of Differentiation 90</i>
TIF32	Nomenclatura equivalent en llevat per eIF3a d'humà
Tif34	Nomenclatura equivalent en llevat per eIF3i d'humà
Tif35	Nomenclatura equivalent en llevat per eIF3g d'humà
TMR	Tampó de mostra reductor
TrkA	De l'anglès <i>Tropomyosin receptor kinase A</i>
TrkB	De l'anglès <i>Tropomyosin receptor kinase A</i>
tRNA	De l'anglès <i>transfer RNA</i>
T-SNARE	De l'anglès <i>Target - Soluble NSF Attachment Protein REceptor</i>
TTBS	De l'anglès <i>Tween 20 Tris-Buffered Saline</i>
Tyr	Aminoàcid Tirosina
U/mL	Unitats: Unitats per mililitre
U937	Linia cel·lular humana derivada de la pleura
UAB	Universitat Autònoma de Barcelona
uPAR	De l'anglès <i>Urokinase receptor</i> ,
UTR	De l'anglès <i>untranslated region</i>
V	Unitat: Volts
Val	Aminoàcid Valina
VAMP	De l'anglès <i>Vesicle associated membrane proteins</i>
V-SNARE	De l'anglès <i>Target - Soluble NSF Attachment Protein REceptor</i>
wce	De l'anglès <i>Whole Cell Extract</i>
WHD	De l'anglès <i>Winged Helix Domain</i>
XRCC1	De l'anglès <i>X-ray repair cross-complementing protein 1</i>

# ***INTRODUCCIÓ***

---



# 1 Proteïna Quinasa CK2

## 1.1 Característiques generals

La proteïna quinasa CK2 pertany a la família de les caseïna quinases, que es van descriure per primera vegada l'any 1954 [1]. Aquesta família engloba dues proteïnes quinasa més, com són CK1 i GEF-CK, però, tot i això, només GEF-CK és capaç de fosforilar la caseïna en condicions “*in vivo*”. La comprovació d'aquest fenomen va fer que l'any 1994 se'ls canviés el nom pel de proteïna quinasa CK1 i proteïna quinasa CK2.

*“La proteïna CK2 s’ha descrit tradicionalment com una serina/treonina quinasa independent de missatger, constitutivament activa, essencial per a la viabilitat cel·lular, trobant-se ubiquament expressada en eucariotes, donant lloc a complexos tetramèrics, formats per les seves subunitats catalítiques i reguladores. Existeixen, però, diferents mecanismes en els quals l’activitat de l’enzim pot ser modulada o dirigida cap a determinats substrats, a la vegada que en pot excloure d’altres com la localització subcel·lular, la fosforilació i la interacció amb altres proteïnes [2]”.*

Aquest dos últims paràgrafs, amb algunes variacions, han estat presents a la majoria de tesis doctorals del nostre grup i en articles relacionats. Amb el temps, però, la visió de l'estructura, l'activitat i la seva distribució ha evolucionat i s'ha convertit en més flexible. Abans d'entrar en detall de l'activitat de la proteïna quinasa CK2 cal fer un repàs a les seves característiques estructurals.

### 1.1.1 Estructura general i característiques enzimàtiques de CK2

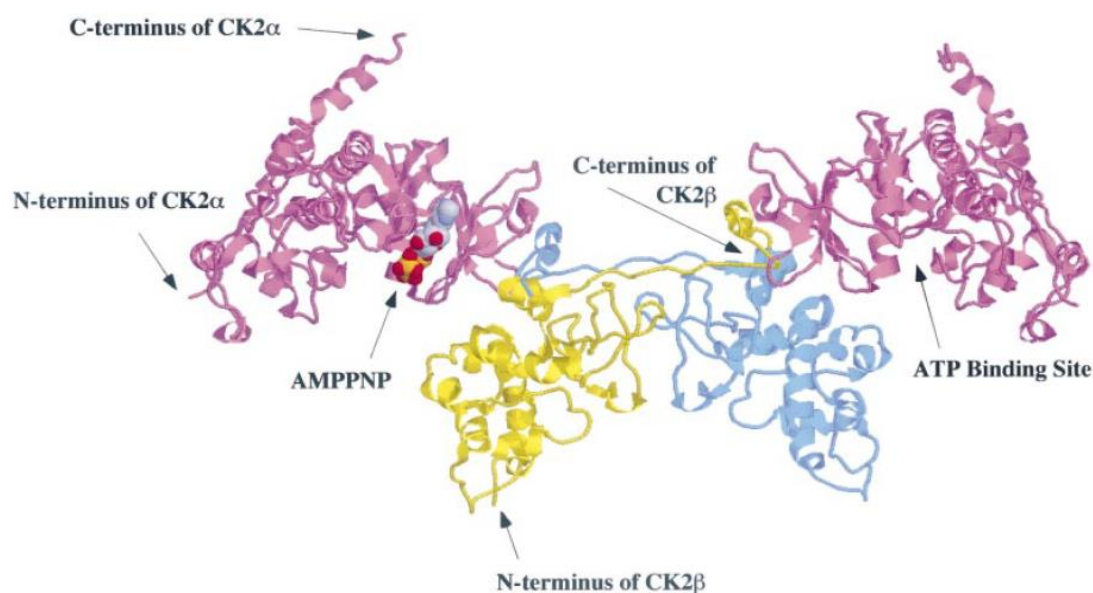
Com ja s'ha comentat, la proteïna quinasa CK2 es troba distribuïda de manera ubica als organismes eucariotes, on de manera més habitual apareix formant un tetràmer compost per dues subunitats catalítiques i dues de reguladores [2], tot i que en força organismes s'han detectat diversos isoenzims, 2 subunitats CK2 $\alpha$  o 2 subunitats CK2 $\beta$ . En humans només s'ha descrit una subunitat reguladora CK2 $\beta$ , però en canvi s'han detectat tres subunitats catalítiques: CK2 $\alpha$ , CK2 $\alpha'$  i CK2 $\alpha''$  [4, 5 i 6].

En canvi, en altres organismes també s'han descrit variants de la subunitat reguladora CK2 $\beta$ , com en *Saccharomyces Cerevisiae* [6] o en plantes on arribem a trobar 4 gens que codifiquen per diverses variants de CK2 $\alpha$  i 4 més que codifiquen per variants de CK2 $\beta$  [7].

Centrant-nos en mamífers, els tetràmers de CK2 poden ser formats per dues subunitats idèntiques de CK2 $\alpha$  o CK2 $\alpha'$  o per una subunitat de cada [24].

En les etapes inicials de l'estudi de CK2 s'havia descrit que eren capaces de fosforilar un residu de serina o treonina que es trobés proper a aminoàcid acidí. Però amb la feina de Pinna i Meggio al llarg dels anys s'ha pogut conèixer millor la seqüència de reconeixement de CK2 a l'hora de fosforilar.

L'any 1994 el grup del Dr. Meggio va proposar que la seqüència de consens per a CK2 era XXS/T-XXE/D. Gran part de les Ser/Thr quinases reconeixen seqüències semblants a aquesta, on hi estan involucrats residus bàsics o prolines [8].



---

**Il·lustració 1 – Estructura de CK2 en alta resolució.** Estructura en alta resolució de l'holoenzim de CK2 on es van representar en lila les subunitats catalítiques CK2 $\alpha$ , i en groc i en blau les dues subunitats reguladores CK2 $\beta$ , amb la presència d'un ATP que no és hidrolitzable [2].

---

En contrast, però, les prolines i els residus bàsics són molt poc freqüents en la fosforilació de CK2, fins i tot alguns estudis els ha demostrat com dominants negatius per a la fosforilació per aquesta quinasa.

Entre l'any 2002 i 2003 Pinna i Meggio van proposar que la fosforilació de les serines o treonines es produeix normalment en posició +3 de l'aminoàcid àcid [9], però també es donen casos on la fosforilació es produeix en posició +1 [10], fet que més endavant en aquesta tesi veurem que és força important.

Una seqüència de fosforilació tan curta ha facilitat molt la identificació teòrica de possibles nous substrats de CK2, però també ha posat en relleu que no sempre es compleix.

En un article de l'any 2003 de Lichfield [2] hi ha algun exemple, com el cas de p53, que presenta una fosforilació per CK2 a la Ser<sup>253</sup> tot i no presentar la seqüència de consens [11].

Per altra banda, la presència de la seqüència de consens no garanteix una fosforilació eficient, ja que pot dependre de molts altres factors que la poden modular, com ja van demostrar Pinna i Meggio molt abans [8].

### **1.1.2 Especificitat dual de CK2**

La caracterització inicial de CK2 la situava tradicionalment com a una serina/treonina quinasa, però amb el pas del temps s'ha pogut aprofundir en la definició dels substrats i s'ha vist que, sota certes condicions, CK2 pot tenir un comportament dual.

En diversos articles es posen exemples d'aquest comportament, sobretot en llevats, on en absència de la quinasa *bona fide*, CK2 fosforila la immunofilina FPR3 en la seva Tyr<sup>184</sup> *in vitro* [12].

En el cas de la fosforilació de la histona H2A en la Tyr<sup>57</sup>. S'ha pogut comprovar la implicació de CK2 mitjançant la inhibició amb TBBz i també per la mutació puntual de la tirosina en qüestió. Aquesta tirosina, fosforilada en llevats i en humans és important per la ubiquitinizació de la histona, i el treball amb l'inhibidor comparat amb la mutació puntual en confirmen l'efecte que hi té CK2.

Tot i això, un cop més el grup del Dr. Pinna, estudiant la resposta de CK2 davant de pèptids sintètics amb serines, treonines i tirosines fosforilables, van demostrar que l'afinitat per aquesta última era molt més baixa que pels dos residus primers [13].

La condició dual de CK2 també es manté en el tipus de donadors de fosfats que pot utilitzar, ja que ho pot fer a través d'ATP i GTP. A més a més, aquesta quinasa no es veu afectada per cap dels clàssics missatgers secundaris com Ca<sup>2+</sup>, nucleòtids cíclics o fosfatidilinositols, ni es troba integrada en cap via específica de transducció de senyal.

Pèptids polibàsics com les polilisines poden afectar la seva activitat en funció del substrat a fosforilar [14], en canvi, compostos polianiónics com l'heparina n'inhibeixen l'activitat i s'ha vist també que la presència de DNA també produeix el mateix efecte [15].

## 1.2 Estructura de CK2

A l'inici d'aquest apartat ja hem comentat els detalls més generals de l'estructura de CK2. En aquest punt entrarem en més concreció en els aspectes estructurals que en gran part en determinen la seva activitat enzimàtica i també la interacció entre les diferents subunitats.

### 1.2.1 Subunitats catalítiques de CK2, compensació funcional i especialització

Tot i ser molt semblants, CK2 $\alpha$  i CK2 $\alpha'$  són sintetitzades a partir de diferents gens. La seva semblança estructural, el mimetisme funcional i la impossibilitat de distingir-ne la seva activitat *in vitro*, fa que molts articles no facin diferències entre les dues isoformes.

L'alt grau d'identitat en els dominis catalítics N-terminal de CK2 $\alpha$  i CK2 $\alpha'$ , que arriba al 90 %, possiblement justifica el fet que ambdues subunitats presentin una activitat enzimàtica tan semblant. Però com era d'esperar, venint de dues seqüències gèniques diferents, la diferència entre CK2 $\alpha$  i CK2 $\alpha'$  es troba a l'extrem C-terminal, tot i que l'evolució de les espècies ha conservat molt aquest extrem, proposant així l'existència d'alguna funció important en aquests dominis [2].

Pel que fa a CK2 $\alpha''$ , fins ara és la subunitat més desconeguda. La seva seqüència d'aminoàcids s'acosta més a CK2 $\alpha$  que no pas a CK2 $\alpha'$ . En aquest cas l'homologia supera el 90 % en l'extrem N-terminal també i les diferències es tornen a produir a l'extrem C-terminal, on difereixen clarament [2].

La similitud entre aquestes isoformes explica els fenòmens de compensació funcional observats en alguns organismes. Fins avui no s'han pogut aconseguir ratolins *knockouts* viables per CK2 $\alpha$  ni per CK2 $\alpha''$ . En el cas de CK2 $\alpha'$  els ratolins homozigots deficients de CK2 $\alpha'$  són viables, fet que proposa que alguna de les altres dues formes possibles de la quinasa compensa aquesta disminució. Tot i això apareixen conseqüències fisiològiques com l'esterilitat que fan pensar que la compensació no és completa o almenys no és 100 % funcional [2].

En llevats, el *knockout* d'una de les dues isoformes de CK2 $\alpha$  (CKA1 i CKA2) fan que siguin viables, però el doble mutant no ho és, suggerint també l'existència d'una funció compensatòria com en els ratolins.

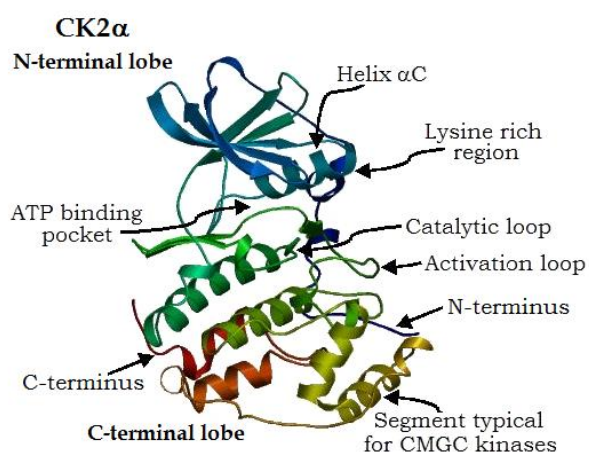
Tal i com hem vist anteriorment amb els ratolins, també es produeixen afectacions fenotípiques, obtenint soques més sensibles a la temperatura provocant canvis tant en la mida de les colònies com en la morfologia cel·lular. De nou, doncs, la compensació funcional no acaba de ser completa per mantenir-ho [6].

Per aprofundir en l'estructura de CK2, ens hem basant principalment en dos articles, el primer de Litchfield [2], el segon de Niefind, Raaf i Issinger [16].

### 1.2.2 Estructura de CK2 $\alpha$

Estructuralment parlant, CK2 $\alpha$  s'engloba a la família dels EPK (de l'anglès proteïnes quineses eucariotes). Està formada per dos dominis de plegament ben definits:

- El domini N-terminal és el més petit i presenta 5 fulles beta antiparal·leles ( $\beta$ 1- $\beta$ 5), seguides d'una llarga hèlix alfa ( $\alpha$ C), prèvia a la regió interdomini.
- La regió C-terminal és més gran que la N-terminal i està formada bàsicament per una successió



**Il·lustració 2 – Detall de l'estructura CK2 $\alpha$ .** Figura adaptada de l'article "Site-Directed Mutagenesis in the Research of Protein Kinases - The Case of Protein Kinase CK2" [17], on s'hi poden veure les característiques estructurals descrites en aquest apartat.

d'hèlix alfa a excepció de dues fulles beta ( $\beta$ 7/ $\beta$ 8 i  $\beta$ 6/ $\beta$ 9) que es troben a la regió interdomini i que són essencials per la seva funció. L'alt grau de conservació de les hèlix alfa d'aquest domini, i que també es produeix en la família de les CMGC, fa que es pugui considerar CK2 $\alpha$  com a parent d'aquest grup.

En aquest grup hi trobem també les quineses dependents de ciclines (CDK), les quineses activades per mitògens (MAPK), les glicogen sintases quineses (GSK) i les quineses semblants a CDK.

Com és habitual, la mateixa estructura de la proteïna ens defineix les seves característiques funcionals. A continuació es detallen les més importants, agafant CK2 $\alpha$  humana com a exemple.

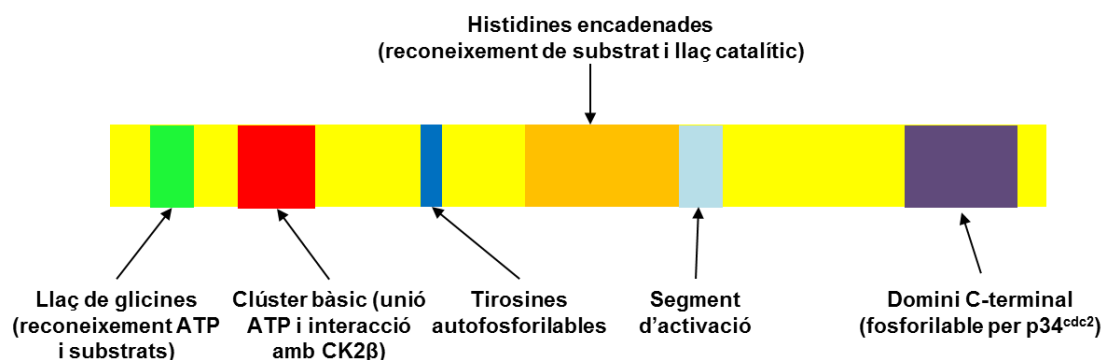


### Llaç de glicines

Localitzat al segment N-terminal, és el responsable de la unió a ATP, es troba involucrat en el reconeixement de substrats i en l'estabilització del segment d'activació per interacció amb aquest. Destaquen 3 aminoàcids en aquesta regió, com són la Lys<sup>49</sup>, implicada en el reconeixement de substrat en posició n+2; la Tyr<sup>50</sup> que regula l'activitat de proteïnes homologues a CK2 per fosforilació (però en aquest cas se'n desconeix la seva funció) i la Ser<sup>51</sup>, que sembla que li confereix activitat ATPasa.

### Clúster bàsic

Agrupació de residus bàsics entre els aminoàcids 70-83 amb múltiples implicacions funcionals i no gens habitual entre les quinases en aquesta regió. Localitzat just davant d'aquest clúster trobem la Lys<sup>68</sup>, que s'ha descrit com a residu essencial en la unió a ATP. La mutació d'aquesta lisina inhibeix totalment l'activitat de CK2 $\alpha$ .



**Il·lustració 3 – Característiques estructurals de CK2 $\alpha$ .** Esquema adaptat de l'article de Blanquet [18], seguint el format de Litchfield [2] per resumir les principals característiques de l'estructura de CK2 $\alpha$ . Llaç de glicines (en verd) implicat en el reconeixement de substrat, de l'ATP i amb la presència de la Tyr<sup>50</sup> fosforilable. El clúster bàsic (en vermell) presenta el clúster de lisines clau per la unió de l'ATP i la interacció amb la subunitat reguladora CK2 $\beta$ . En posició més central trobem les tirosines autofosforilables (blau) seguides de l'encadenament d'histidines, on hi trobem el llaç catalític i és una regió important pel reconeixement de substrat, que ve seguit del segment d'activació (blau cel). A l'extrem C-terminal hi trobem la regió menys conservada de CK2 $\alpha$  que conté les treonines fosforilables per p34<sup>cdc2</sup>.

Estudis estructurals semblen implicar també la Lys<sup>68</sup>, conjuntament amb el glutàmic 81, en la formació d'un pont salí que estabilitzaria el clúster de lisines i ajudaria a mantenir la conformació activa de CK2 $\alpha$  de blat de moro [19].

Aquest clúster de residus bàsics interacciona amb la subunitat reguladora CK2 $\beta$  per una seqüència acídica i sembla mediar el procés de regulació per CK2 $\beta$  enfront diversos substrats com calmodulina [20].

Aquesta seqüència bàsica es pot dividir en 2 segments, el primer (74-77) està implicat en la inhibició de CK2 per heparina [21] entre d'altres, i el segon (79-83) està implicat en el reconeixement de substrat per interacció amb el determinant acídica de la posició n+3 [22].

Aquest clúster també sembla clau a l'hora de la importació de la quinasa cap al nucli, ja que presenta una potencial seqüència de localització nuclear (NLS). S'ha descrit que la mutació dels residus 74-77 per alanines afecta dràsticament la capacitat de CK2 $\alpha$  de translocar-se cap a nucli [25].

### **Regió d'autofosforilació**

Entre les Thr<sup>127</sup> i Thr<sup>129</sup> es conforma una regió que conté determinants d'autofosforilació.

### **Histidines encadenades**

Aquesta quarta regió destacada comprèn una sèrie de sis residus bàsics espaiats per 5 aminoàcids (142-KALDYCHSMGIMHRDVKPHNNVMIDHEHRKLR-172).

Aquesta distribució espaiada d'histidines amb una lisina i una arginina a cada extrem forma una hèlix  $\alpha$  que aporta la base molecular del reconeixement de cadenes acídiques dels centres de fosforilació de CK2 (Pinna, 1990).

En aquest cas, destaquen també la His<sup>160</sup> implicada en el reconeixement de substrat, i el Trp<sup>176</sup> que, conjuntament amb la Val<sup>66</sup>, donen a CK2 la propietat de poder escollir ATP i GTP com a donadors de fosfat.

Diversos estudis de mutagènesis substituint el triptòfan per la fenilalanina han mostrat una disminució de l'activitat de CK2, tant per la subunitat catalítica aïllada com per la forma holoenzimàtica.

### **Segment d'activació**

El localitzem entre els aminoàcids 184-191. Abans de l'inici de citat segment d'activació es troba la Tyr<sup>182</sup>, que s'autofosforila en una reacció intramolecular (trans), la qual és inhibida per la presència de la subunitat reguladora CK2 $\beta$  i de la qual se'n desconeix el significat biològic [24].

A diferència amb la resta de quinases del mateix grup (CdKs, MAPK, GSK-3), el segment d'activació de CK2 no presenta residus de serina o treonina ni s'ha descrit cap tipus de fosforilació en aquesta regió. La fosforilació en aquests centres desplega el segment d'activació de forma que estabilitza la quinasa i la porta a una conformació activa.

Aquestes dades suporten la idea que CK2 $\alpha$  sempre es troba en conformació oberta, fet que explicaria la seva activitat constitutiva. Tot i això, la mutació d'aquests residus provoca una disminució en l'activitat de la quinasa, ja que la seva interacció amb el domini N-terminal sembla clau per una activació total de CK2 [25].

### **Domini C-terminal**

Presenta 4 llocs de fosforilació per p34<sup>cdc2</sup>, on dos d'aquests centres, la Thr<sup>344</sup> i Thr<sup>360</sup>, van ser identificats com a residus fosforilats *in vivo* en cèl·lules mitòtiques, tot i que aquesta regió es troba poc conservada.

### **Loop catalític**

El procés químic de transferència d'un grup fosfat d'alta energia d'un nucleòtid a una proteïna que actua com a substrat és un procés força complicat. El reconeixement, la unió, l'alineament especial de dos substrats i l'estabilització de l'estat de transició requereixen diverses cadenes laterals i regions de cadena principal dels dos principals dominis del nucli catalític d'un EPK.

Per tant, una localització espacial precisa de tots aquests elements és un pre-requisit indispensable perquè aquesta reacció es dugui a terme, i si només un d'aquest elements falla el procés pot quedar inactivat.

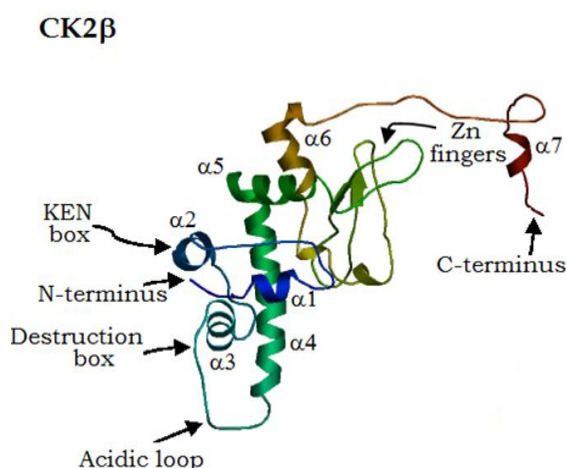
S'ha observat que en CK2 $\alpha$ , per permetre l'alineació correcta dels substrats, cal contrarestar la càrrega negativa de l'ATP, present com a donador de fosfats, mitjançant grups carregats positivament (2 ions Mg<sup>2+</sup> i les Lys<sup>68</sup> i Lys<sup>158</sup>).

Aquesta Lys<sup>158</sup> forma part de l'anomenat *loop* catalític, que va dels residus Arg<sup>155</sup> i Asn<sup>161</sup>, en el cas de CK2 $\alpha$ , però que es troba conservada en les EPK. Per a la unió de l'ió de magnesi cal la intervenció de dos residus més: Asn<sup>161</sup> i Asp<sup>175</sup> i que constitueixen part de l'anomenat *loop* d'unió al magnesi. D'aquesta manera, la unió del *loop* catalític, el *loop* d'unió al magnesi, la fulla  $\beta$ 9 i el *loop* P+1 creen el que es coneix com a segment d'activació, crucial per al coneixement i unió a substrat.

### 1.2.3 Subunitat reguladora CK2 $\beta$

A diferència de les subunitats catalítiques, en humans només es coneix una forma de subunitat reguladora, CK2 $\beta$  [26].

Si en l'apartat anterior destacàvem l'alt grau de conservació de CK2 $\alpha$ , en el cas de la subunitat CK2 $\beta$ , el grau de conservació encara és més alt. De fet, la totalitat de la seva seqüència de 215 aminoàcids és idèntica entre les aus i els mamífers, i difereix només en un aminoàcid dels *Xenopus*. La representació esquemàtica de la

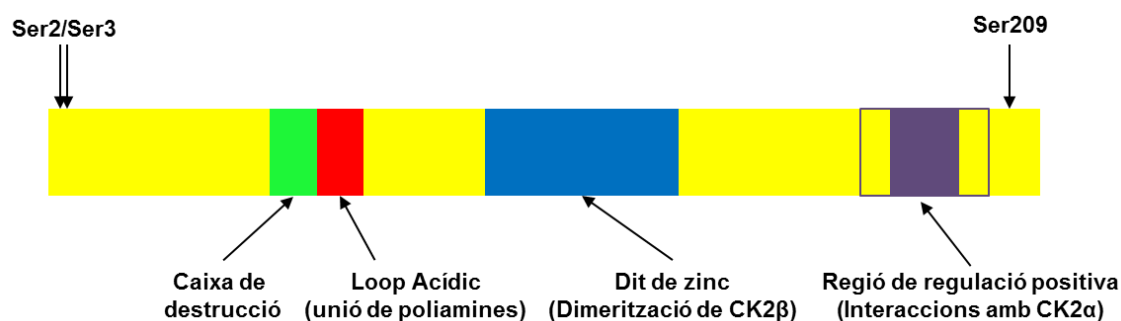


**Il·lustració 4 – Detall de l'estructura de CK2 $\beta$ .** Figura adaptada de l'article "Site-Directed Mutagenesis in the Research of Protein Kinases - The Case of Protein Kinase CK2" [17], on s'hi poden veure les característiques estructurals descrites en aquest apartat.

Il·lustració 5 mostra els trets característics més importants de la subunitat reguladora CK2 $\beta$ . Si hi entrem en més detall trobem:

#### Llocs de fosforilació

La proteïna CK2 $\beta$  conté un lloc d'autofosforilació que comprèn les serines 2 i 3 i possiblement també la Ser<sup>4</sup> del seu extrem N-terminal. S'ha descrit que aquesta autofosforilació és un procés intramolecular, basant-se en les dades cinètiques obtingudes.



**Il·lustració 5 – Característiques estructurals de CK2 $\beta$ .** Esquema adaptat de l'article de Litchfield [2] on de manera lineal podem veure els trets més característics de l'estructura de CK2 $\beta$ . Hi veiem la caixa de destrucció (en verd), el *loop* àcidic d'unió a poliamines i possiblement relacionat amb la regulació de l'activitat de CK2 (en vermell), el dit de zinc (en blau) on es produeix la dimerització de CK2 $\beta$ , i a la dreta de la figura la zona d'interacció amb CK2 $\alpha$  (en lila) i la regió pròxima que s'ha descrit [27] que pot tenir implicacions amb la regulació positiva de CK2.

No obstant això, l'estructura d'alta resolució recent de CK2 tetramèrica, que es va determinar per cristal·lografia de raigs X, planteja alguns dubtes respecte al mecanisme precís de l'autofosforilació, ja que el domini N-terminal de CK2 $\beta$  es troba a una distància de més de 40 Å des del lloc actiu de qualsevol de les subunitats catalítiques dins del complex de CK2 tetramèrica [27] (veure la Il·lustració 1).

Veient aquesta distància s'ha proposat que el mecanisme autofosforilació podria raure en la formació d'estructures CK2 d'ordre superior formades per diversos tetràmers CK2, que s'han caracteritzat *in vitro* [28]. CK2 $\beta$  també és fosforilada a Ser<sup>209</sup>. Aquesta serina s'ha descrit que està fosforilada d'una manera dependent del cicle cel·lular en les cèl·lules *in vitro* per p34<sup>cdc2</sup> [29].

### **Caixa de destrucció**

Indicada en verd a la figura, va ser inicialment proposada per Allende i Allende [30], que proposen que CK2 $\beta$  conté una seqüència molt semblant a la caixa de destrucció que confereix la degradació mitosi-específica a la ciclina B. Tot i que no sembla que la caixa de destrucció de CK2 $\beta$  actuï sola per regular-ne l'estabilitat, queda per veure si la caixa de destrucció actua en concert amb altres senyals, com ara la fosforilació, per regular l'estabilitat de CK2 tetramèrica o la pròpia CK2 $\beta$ .

### **Regió de residus àcids**

Del residu 55 al 64 hi trobem una zona d'aminoàcids àcids. La seva similitud amb les seqüències típiques dels substrats de CK2 (DLEPDEELED) ha fet que diversos autors s'hagin permès especular que aquesta regió és una mostra ancestral de seqüències d'autoinhibició que ja s'han descrit en altres proteïnes quinases [31].

Diverses línies d'evidència experimental són consistents amb la conclusió que aquesta regió de CK2 $\beta$ , en efecte, regula l'activitat de CK2. Les mutacions que neutralitzen les càrregues negatives dins d'aquest segment de CK2 $\beta$  inhibeixen l'estimulació per poliamines i augmenten l'activitat basal de l'enzim.

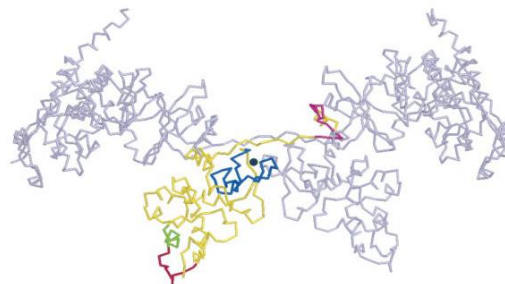
Sobre la base d'aquestes i altres observacions, es va proposar un model per a la regulació intramolecular de CK2, segons el qual els residus d'aquesta regió 55 - 64 d'CK2 $\beta$  es van postular per interactuar amb un grup bàsic dels aminoàcids en una subunitat catalítica de CK2 $\alpha$  dins el mateix complex de CK2 tetramèrica.

Aquest model, però, no és consistent amb l'estructura cristal·lina de CK2 tetramèrica [27] que demostra que aquest clúster d'aminoàcids està situat a una distància considerable del lloc actiu de qualsevol subunitat catalítica (Il·lustració 6). De fet, aquest tram àcid es troba a més de 30 Å des del tram bàsic d'aminoàcids que comprèn

els residus 74 - 80 de CK2 $\alpha$ . No obstant això, com pot ser el cas per a l'autofosforilació, és concebible que les interaccions entre els residus 55 - 64 d'CK2 $\beta$  i residus 74 - 80 d'CK2 $\alpha$  es produeixen a través d'interaccions d'ordre superior entre tetràmers CK2 [27].

### Dit de zinc

Més endavant també hi trobem un dit de zinc que conté quatre cisteïnes en les posicions 109, 114, 137 i 140, que és important per la dimerització de CK2 $\beta$  i també una regió a C-terminal implicada amb la regulació de l'activitat catalítica de CK2 holoenzim.



**Il·lustració 6 – Estructura en 3D de l'holoenzim.** Aquesta representació mostra la distribució a llarg de l'estructura de CK2 de les regions destacades en la Il·lustració 5. El punt negre indica la unió dels dos dits de zinc.

L'àtom de zinc present genera una àrea hidrofòbica al voltant del seu eix de rotació, originant un nucli hidrofòbic entre

les dues subunitats reguladores. Aquest nucli presenta una interfase petita (540 Å) donant lloc a un dímer de CK2 $\beta$  allargat, amb una gran superfície respecte al seu pes molecular.

Aquesta gran superfície permet que pugui ser un potencial punt d'ancoratge per altres substrats, fet pel qual cada cop més es parla de CK2 $\beta$  com a un *multivalent docking partner* per part d'altres substrats [62]. Com era d'esperar, la mutació de Cys<sup>109</sup> i Cys<sup>114</sup> desestructuren el dit de zinc i provoquen la pèrdua de les interaccions entre les subunitats reguladores CK2 $\beta$  [27] tant *in vitro* com quan s'expressen en cèl·lules de mamífer. Estudis previs havien demostrat que CK2 $\beta$  es sintetitza en excés respecte a CK2 $\alpha$  i que la formació de dímers de CK2 $\beta$  es poden donar en absència de subunitats CK2 $\alpha$  [32] i també s'ha observat que la formació de dímers CK2 $\beta$  és un requisit previ per a la formació de complexos amb les subunitats catalítiques de CK2. Més endavant en parlarem.

### El segment C-terminal

Aquest segment, inicialment, va ser catalogat com a un domini de regulació positiva per la seva capacitat de millorar i estabilitzar l'activitat catalítica de CK2 [33], del residu 181 al 204, però també s'ha vist posteriorment, treballant amb pèptids sintètics, que és clau per a la interacció entre CK2 $\alpha$  i CK2 $\beta$ . Vistes aquestes característiques estructurals que semblen indicar una tendència a que CK2 $\beta$  es trobi en forma de dímer, cal parlar d'algunes de les funcions que se li han descrit.

### 1.2.4 Funcions del dímer de CK2β aïllat

Fins ara hem descrit la implicació de CK2β en l'acoblament de complexos CK2 tetramèrics, en la millora de l'activitat catalítica i l'estabilitat de CK2, i en la modulació de la selectivitat de substrat de CK2. A més, en molts casos, és evident que CK2β és responsable de l'ancoratge o reclutament de substrats CK2 o reguladors potencials. A més a més, dianes potencials de CK2 com p53, FAF-1 o CD5 s'ha descrit que interaccionen amb CK2 via CK2β (alguns exemples com [36 i 37]).

		* *   *   *   * *   *	
CK2α	MSGPVP-SRARVYTDVNTHRPREYWDYESHVVEWGNQDDYQIVRKLGRGKYSEVFEAINI		59
CK2α'	MPGPAAGSRARVYAENVSLRSREYWDYEAHVPSWGNQDDYQIVRKLGRGKYSEVFEAINI		60
Chk1	-----MAVPFVEDWDLVQTLGEGAYGEVQLAVNR		29
c-Mos	[...]RLAWCSIDWEQVLLLEPLGSGGFGSVYRAT--		81
A-Raf	[...]PPSEVQLLKRIGTGSFGTVFRG---		344
		*   * *   * * *   *	
CK2α	TNNEKVVVKILKPVKKKKIKREIK---ILENLRGGPNITLADIVKDPVSRTPALVFEHV		116
CK2α'	TNNERVVVKILKPVKKKKIKREVK---ILENLRGGTNI IKLIDTVKDPVSKTPALVFEYI		117
Chk1	VTEEAVAVKIVDMKRAVDCPENIKKEICINKMLNHENVVKFYGHRRE--GNIQYLFLEYC		87
c-Mos	YRGETVALKKVVRSTKN-----ASCPGDP-GCPGTII [...]		115
A-Raf	RWHGDVAVKVLKVSQPT-----MGFMTRPGF---AII [...]		373

**Il·lustració 7 – Seqüència de l'alineació de les serina/treonina quinases amb un putatiu domini d'unió CK2β.** Comparació de la regió d'unió CK2β de les subunitats CK2α i CK2α' amb les regions d'unió CK2β putatives identificades en altres serina/treonina quinases com Chk1 (aa1-87), c-Mos (aa52-115) i A-Raf (aa323-373) o hi veiem els residus bàsics en negre, els àcids en blau, els petits o hidròfobs en vermell, i la resta en verd. Els residus subratllats en groc són invariables i les marcats amb \* es troben altament conservats. Imatge extreta de l'article de Bibby i Litchfield [26].

Al voltant de CK2β s'ha desenvolupat tota una recerca per la seva forma dimèrica i se n'han descrit uns quants casos. A nivell de bioquímica més bàsica s'ha descobert per assajos d'immunofluorescència i també per immunoprecipitació que es detecten dímers de CK2β en absència de CK2α [38 i 39].

Altres descobriments de la funcionalitat del dímer s'han fet amb el sistema de doble híbrid en llevats, on s'ha vist que la interacció de CK2β i c-Mos i Raf-A es feia per l'extrem C-terminal, igual que es fa amb CK2α [40 i 41].

Més experiments s'han realitzat al voltant de c-Mos en oòcits de *Xenopus* i s'ha vist que CK2β també interacciona amb els inhibidors de c-Mos inhibint-ne la maduració, correlacionant-se així amb el que s'ha observat en llevats, on la sobreexpressió de CK2β n'atura el creixement [40].

Encara que aquests resultats impliquen que CK2β generalment exerceix un efecte negatiu sobre la proliferació, és important tenir en compte que la sobreexpressió de CK2β no afecta dràsticament la proliferació quan es sobreexpressa en cèl·lules d'osteosarcoma humà o en fibroblasts de ratolí [41].

Proteïnes d'interacció	Funció fisiològica	Detectada
<b>Proteïnes d'interacció amb CK2<math>\beta</math> dependents de CK2</b>		
<b>p90Rsk</b>	S/T proteïna quinasa	<i>in vitro</i>
<b>PKC<math>\zeta</math></b>	S/T proteïna quinasa, intervé en l'activació de NF- $\kappa$ B	<i>in vitro</i>
<b>Topoisomerasa II</b>	Remodelació del DNA, essencial durat la mitosi i la meiosi	<i>in vitro</i>
<b>p53</b>	Supressor tumoral	<i>in vitro/in vivo</i>
<b>P27KIP1</b>	Inhibidor CDK, progressió cicle cel·lular	<i>in vitro</i>
<b>P21WAF1/CIP1</b>	Inhibidor CDK, progressió cicle cel·lular	<i>in vitro/in vivo</i>
<b>Cdc25B</b>	Fosfatasa, activador CDK, progressió cicle cel·lular	<i>in vitro/in vivo</i>
<b>CD5</b>	Receptor superfície cel·lular, timòcits, limfòcits T	<i>in vitro</i>
<b>FGF-2</b>	<i>Fibroblast Growth Factor-2</i> , proliferació cel·lular	<i>in vitro</i>
<b>Nopp 140</b>	Proteïna nucleolar, possible xaperona de transport nuclear	<i>in vitro</i>
<b>L5</b>	Proteïna ribosomal	<i>in vitro/in vivo</i>
<b>L41</b>	Proteïna ribosomal	<i>in vitro</i>
<b>HHV-6 IE2</b>	<i>Human herpesvirus 6 immediate-early protein</i> , activador transcripcional	<i>in vitro/in vivo</i>
<b>Proteïnes d'interacció amb CK2<math>\beta</math> independents de CK2</b>		
<b>c-Mos</b>	S/T proteïna quinasa, activador MAPK, progressió cicle cel·lular	<i>in vitro/in vivo</i>
<b>Chk1</b>	S/T proteïna quinasa, Dany DNA	<i>in vitro/in vivo</i>
<b>A-Raf</b>	S/T proteïna quinasa, proliferació cel·lular	<i>in vitro/in vivo</i>

**Taula 1 – Proteïnes que interactuen amb CK2 $\beta$ .** Recull de proteïnes que interactuen amb CK2 $\beta$  extret de l'article de Bibby i Litchfield [26].

Es desconeix el motiu de la diferència de resposta entre diverses línies, ressaltant així la complexitat de CK2. D'altra banda, aquests resultats demostren que, tot i que CK2 $\beta$  té un paper molt important en la formació del tetràmer de CK2, la seva activitat individual no és gens menyspreable.

### 1.3 Regulació cel·lular de CK2

A l'article [2] de David W. Lichtfield, el capítol de la regulació s'obre amb una frase que ja posa de manifest les dificultats de regulació: “*A major area of confusion, controversy and excitement within the CK2 field over the years has been the debate over its regulation in cells*”.

La creença original en el món científic era que l'activitat de CK2 es troba activada constitutivament i que no estava regulada. Però a partir de l'última part de la dècada de 1980 es van publicar estudis que parlen de l'activació de CK2 en resposta a una gran varietat d'estímuls [42].



Aquests estudis no han donat cap indici consistent, o general, en els mecanismes responsables de la regulació de CK2 en les cèl·lules. Tot i que encara no és possible conciliar amb precisió tots els punts de vista oposats que han aparegut, sembla que una sèrie de mecanismes diferents contribueixen a la regulació fisiològica de CK2.

Alguns dels mecanismes que contribueixen a la regulació de CK2 en les cèl·lules inclouen:

- Regulació de l'expressió i de l'assemblatge.
- Regulació per modificacions covalents.
- Regulació de les interaccions amb proteïnes i/o molècules no proteiques.

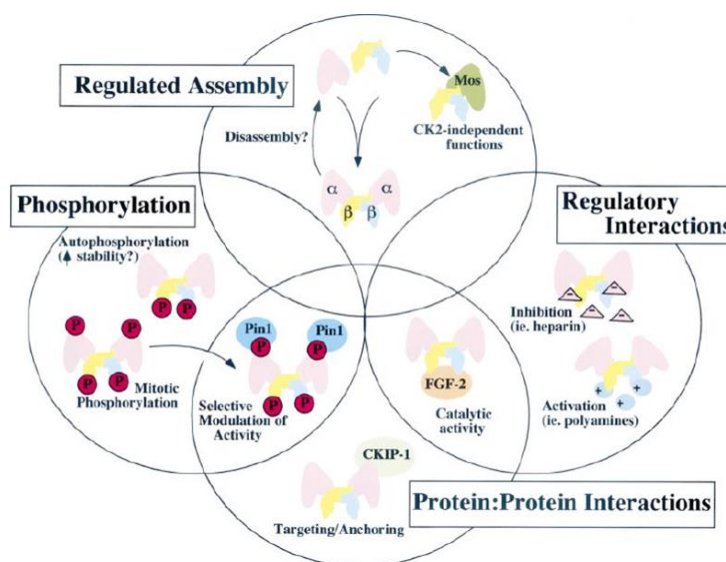
A continuació s'exposen amb més detall.

### 1.3.1 Regulació de l'expressió i de l'assemblatge

La semblança estructural entre CK2 $\beta$  i les ciclines ens mostra alguns trets compartits en la regulació. CK2 $\beta$  modula l'activitat catalítica de CK2 i en regula l'especificitat de substrat i també la formació del tetràmer actiu. L'existència d'una putativa caixa de destrucció dins de la seqüència de CK2 $\beta$  i la demostració que CK2 $\beta$  es ubiquïtinada i degradada a través de la via de proteasomal subratlla, a més, les seves possibles similituds amb les ciclines [43].

D'acord amb la perspectiva que CK2 és anàloga a les ciclines dependents de quinases, s'ha vist que l'activitat de CK2 oscil·la durant el cicle cel·lular, tot i que aquest fenomen no es va observar universalment [43].

En general, sembla que els nivells de CK2 corresponen a la taxa de proliferació, com cèl·lules amb majors taxes de proliferació mostren generalment majors nivells de CK2.



**Il·lustració 7 – Resum de la regulació cel·lular de CK2.** El nombre de mecanismes de regulació de CK2 poden ser molts, i en alguns casos pot estar regulada per més d'un. Aquests mecanismes es troben descrits amb més detall al text que acompanya aquesta figura. Imatge adaptada de l'article de Litchfield [2].

En la mateixa línia, CK2 $\alpha'$  ha estat identificada com un gen d'expressió retardada quan s'indueixen fibroblasts quiescents [43]. No obstant això, a diferència de les quinases dependents de ciclina, les alteracions en l'activitat o expressió de CK2 en les diferents etapes del cicle cel·lular no semblen ser absolutes, i totes les subunitats CK2 s'expressen a través del cicle cel·lular [43].

Si ens centrem a parlar de la regulació per assemblatge, com ja s'ha comentat anteriorment, CK2 s'ha considerat tradicionalment un enzim tetramèric, amb CK2 $\beta$  exercint el control sobre l'activitat catalítica de CK2 $\alpha$ , però, tal i com hem vist amb CK2 $\beta$ , a la subunitat catalítica també se li han trobat substrats únics del dímer com la calmodulina [43].

No deixa de ser sorprenent, però, que *in vitro* el tetràmer de CK2 només es pot dissociar si es tracta amb agents desnaturalitzants. Per tant, cal assumir que l'aparició de les subunitats soles respon al mal assemblatge, tot i que no es descarta que hi pugui haver algun mecanisme de regulació, sobretot a nivell de localització cel·lular.

### **1.3.2 Regulació per fosforilació de CK2**

En moltes de les quinases, la regulació de la seva activitat depèn de la fosforilació per part d'altres quinases en dianes específiques presents als anomenats dominis d'activació, i quan són expressades en bacteris, moltes no solen trobar-se actives. Les subunitats catalítiques de CK2, en canvi, són catalíticament actives quan s'expressen en bacteris, tant amb la presència com en l'absència de CK2 $\beta$ .

L'existència de diferents dianes de fosforilació tant en CK2 $\alpha$  com en CK2 $\beta$  fa pensar que, malgrat que la fosforilació no sigui totalment indispensable per l'activitat, podria contribuir en certa manera a la seva regulació [2].

Entre aquestes regions de fosforilació cal destacar, tal i com s'indica a la Il·lustració 5, l'autofosforilació de la Ser<sup>209</sup> de CK2 $\beta$ , així com les dianes de fosforilació presents a l'extrem C-terminal de CK2 $\alpha$  (veure Il·lustració 3).

Malgrat que aquestes fosforilacions no afecten la seva activitat, s'ha vist que la fosforilació de la subunitat reguladora estabilitza l'holoenzim, o que en absència de CK2 $\beta$ , la subunitat CK2 $\alpha$  pot ser autofosforilada a la Tyr<sup>182</sup>, situada dins del domini d'activació [2].

### **1.3.3 Regulació de les interaccions amb proteïnes i/o molècules no proteïques**

#### **Interaccions proteïna-molècules no proteïques**

La classificació establerta que CK2 és una quinasa independent de missatger, per no trobar-se regulada per aquestes petites molècules com les ciclines, lípids o calci, no exclou la possibilitat que aquestes participin en algun aspecte de la regulació CK2.

Per exemple, compostos amb càrrega negativa com l'heparina inhibeixen CK2 o que compostos com les poliamines, carregades positivament, l'activen. També s'ha vist que els estudis fets *in vitro* es poden reproduir en condicions fisiològiques i que, per tant, podríem arribar a modular-ne l'activitat.

#### **Interaccions proteïna-proteïna**

Les interaccions entre proteïnes representen el major mecanisme de regulació de quinases, i ho poden fer de maneres diferents. En certes interaccions entre proteïnes poden regular directament la seva activitat, en altres actuaran com a proteïnes dirigides o d'ancoratge, i CK2 no n'és una excepció.

Alguns exemples d'interacció de CK2 amb altres proteïnes es poden agrupar de la següent manera: la interacció de CK2 amb FGF-1, FGF-2, Hsp90, Cdc37 actua directament estabilitzant o alterant l'activitat catalítica de CK2, però si ho fa amb tubulina, FAF-1 o CKIP-1 redistribueixen CK2 cap a localitzacions subcel·lulars més específiques. Moltes d'aquestes proteïnes actuen sobre la subunitat reguladora de la forma holoenzimàtica de CK2, tal i com es pot veure a la Taula 1.

## **1.4 Localització tissular i subcel·lular de CK2**

En un article publicat l'any 2000 de Michael Faust i Mathias Montenarh sota el títol "*Subcellular localization of protein kinase CK2 - A key to its function?*" [44] es proposava una extensa revisió del que fins llavors es considerava la distribució tissular i subcel·lular de CK2.

Pel que fa a la distribució tissular destaca que s'ha trobat en gairebé tots els òrgans de l'embrió de ratolí, suggerint així un important paper en el desenvolupament embrionari, però en destaquen el seu paper en el desenvolupament del cervell i del sistema nerviós.

Quan s'estudia l'activitat de CK2 mitjançant marcatge radioactiu en ratolins adults, les activitats més altes es detecten en els testicles, el cervell i el fetge, mentre que

l'activitat de CK2 en el ronyó i la melsa és baixa. L'activitat presenta uns nivells molt baixos en el múscul esquelètic i teixit adipós. Aquestes activitats s'han corroborat també amb l'estudi per *western blot* dels diversos teixits, mostrant també que en cor la presència de CK2 és baixa.

Recentment, l'observació que l'activitat de CK2 més alta es troba en els testicles i el cervell s'ha confirmat per al ratolí. A més, aquest informe ha demostrat que l'activitat de la proteïna quinasa CK2 es correlaciona directament amb el nivell d'expressió de CK2 $\alpha$  i CK2 $\beta$ , tal i com ja proposava Guerra et al. l'any 1999 [45].

#### **1.4.1 Localització subcel·lular de la proteïna quinasa CK2**

Inicialment no es van detectar diferències entre l'activitat de CK2 entre el citosol i el nucli, però estudis posteriors van demostrar que la proteïna no només es trobava en citosol i nucli, sinó que ho feia en gairebé tots els orgànuls de la cèl·lula. La millora de l'anàlisi de CK2 en els orgànuls va millorar ostensiblement quan es van tenir anticossos específics per les diverses subunitats.

#### **1.4.2 CK2 a membrana plasmàtica**

Des del 1986 [46] es coneix que CK2 és present en membranes citoplasmàtiques en forma oligomèrica en fetge de ratolí i diverses línies cel·lulars. S'ha descrit que l'encarregada de fixar l'holoenzim a la membrana és la subunitat beta, per la mateixa regió que s'uneix a les poliamines.

També s'ha vist que l'expressió de CK2 en les membranes no és constant en totes les fases del desenvolupament, i així trobem que és molt baix durant les etapes prenatales en rata, però que augmenta una setmana després del naixement. Així mateix s'ha descrit en diversos articles que CK2 pot actuar també com a ectoquinasa [48 i 49], i aquestes afirmacions s'han pogut confirmar els últims anys amb estudis fins de microscòpia electrònica.

Recentment s'ha caracteritzat la presència de CK2 a les vesícules lipídiques o *lipid raft* de cervell de rata [49], com veurem més endavant en aquesta tesi doctoral, i on es postula que hi tenen un paper important per a la senyalització cel·lular i amb la regulació de la secreció de neurotransmissors. Amb tot això podem concloure que la proteïna quinasa CK2 és un enzim associat a membrana a través de socis o substrats d'unió extracel·lular, així com intracel·lulars. La fosforilació d'aquests substrats o la unió a les proteïnes associades a la membrana de plasma està implicada principalment en la regulació de la proliferació cel·lular o la vigilància immune.

### **1.4.3 CK2 al citosol**

L'any 1985 [50] es van tenir les primeres proves de la presència de CK2 al citosol de les cèl·lules i han estat força autors també els que ho han anat acotant millor [52 i 53].

S'ha estudiat la localització de CK2 per immunofluorescència i microscòpia immunoelectrònica en cèl·lules HeLa, on s'ha observat que les subunitats CK2 $\alpha$  i CK2 $\beta$  es localitzen al citoplasma durant la interfase i es distribueixen per tota la cèl·lula durant la mitosi. En contrast, la subunitat CK2 $\alpha'$  es localitza en nucli durant la fase G1 i al citoplasma durant la fase S. Aquests resultats suggereixen que CK2 pot jugar un paper important durant la divisió cel·lular en canviar la seva localització entre el citoplasma i el nucli. D'altra banda, aquests resultats també indiquen una distribució asimètrica de les diferents subunitats de CK2.

Així mateix, també s'ha observat que en algun tipus de càncer, la distribució de les subunitats de CK2 varia. Per exemple, en el cas de la leucèmia estudiat per Watabe, on en les cèl·lules de leucèmia humana U937 eren privades de sèrum, CK2 es trobava al citoplasma. Si aquestes cèl·lules es tractaven amb Bufalin, un fàrmac derivat d'un verí de gripau que inhibeix selectivament la proliferació de diverses línies tumorals, CK2 es translocava a nucli [53]. Es creu que aquesta translocació indueix l'apoptosi a través de la fosforilació i l'activació de la topoisomerasa II per CK2.

Tots aquests resultats semblen encarats a concloure que la localització en ambdós compartiments, nucli i citoplasma, pot dependre de condicions cel·lulars definides i que aquesta localització pot variar d'un tipus de cèl·lula a un altre. D'altra banda, la localització de CK2 al citoplasma o al nucli sembla reflectir un procés dinàmic. Si estudiem amb més deteniment els orgànuls citosòlics, veurem que apareix en diversos d'ells.

### **1.4.4 CK2 a mitocondris**

Als mitocondris, CK2 s'hi ha caracteritzat des del 1988 [54], partint d'estudis fets en ronyó boví i en fetge de rata. L'activitat de CK2 es troba sobretot a l'espai intermembrana del mitocondri en repòs, però la quinasa es transloca a la membrana interna si es tracten les cèl·lules amb espermina. Aquesta translocació sembla lògica si tenim en compte que la matriu mitocondrial conté alguns substrats potencials de CK2 [55]. Després de diversos estudis publicats sobre la relació de la proteïna quinasa CK2 i el mitocondri, un dels més recents, que data del 2014, postula que la inhibició de la quinasa per les molècules més utilitzades com TBB, afecta primer de tot a CK2 mitocondrial i en provoca la mort [56].

#### **1.4.5 CK2 en reticle endoplasmàtic**

Al reticle endoplasmàtic també s'hi ha identificat la presència de la quinasa, sobretot com a responsable de la fosforilació de calnexina, una xaperona responsable del plegament de glicoproteïnes sintetitzades al reticle. Presenta un domini N-terminal fosforilable per CK2 i PKC i el domini extracel·lular també té una diana per ERK-1. La fosforilació d'aquests llocs ancora la proteïna al reticle i facilita la seva funció.

Recentment, i en farem esment més endavant en aquesta tesi, Mogri et al. han descrit més substrats de la proteïna quinasa CK2 al reticle endoplasmàtic, en aquest cas, regulant l'activitat de la ceramida sintasa, en llevats. L'article conclou que la quinasa té un paper rellevant en la regulació del metabolisme dels esfingolípid, un dels components principals dels *lipid raft* [57].

#### **1.4.6 CK2 en citoesquelet**

La presència de CK2 al citoesquelet també s'ha pogut comprovar àmpliament. En un primer moment es va descriure la seva presència en microtúbuls de cervell de rata [58]. Al llarg dels anys se n'han descrit més substrats, entre ells les cadenes pesada i lleugera de la miosina [59] o la  $\beta$ -tubulina [60] que, tot i no ser-ne substrat, s'hi troba unida per la subunitat catalítica, i s'ha observat que en el cas de cèl·lules en divisió també es troba en el fus mitòtic, confirmant-hi la presència de les subunitats CK2 $\alpha$ , CK2 $\alpha'$  i CK2 $\beta$  [36].

La unió entre la proteïna quinasa CK2 i els microtúbuls estables permet localitzar la quinasa molt a prop dels seus substrats al citoesquelet, de manera que puguin ser fosforilats més eficientment. L'important paper del citoesquelet a l'hora de mantenir la forma cel·lular i la seva polaritat permet suggerir que CK2 també hi juga un paper important [61].

#### **1.4.7 Altres localitzacions de CK2**

S'han detectat també evidències de la presència de CK2 en centrosomes, que podrien situar CK2 com a proteïna en l'organització del fus mitòtic [62]. La seva presència en nucli ha generat molta controvèrsia al llarg de la història, tot i haver-se detectat molts substrats nuclears, des d'enzims que participen en la síntesi dels àcids nucleics, factors de transcripció, oncoproteïnes nuclears, proteïnes supressores de tumors, i les proteïnes nucleolars. Sembla que la presència al nucli de CK2, a banda de ser variable entre les diferents línies cel·lulars també depèn en gran part del punt del cicle cel·lular.

Les estructures de CK2 $\alpha$  i CK2 $\alpha'$  tenen una senyal de localització nuclear, per tant, sembla lògic que CK2 holoenzim s'hi pugui detectar, sobretot després de tractaments com, per exemple, el que es fa amb andrògens o altres factors de creixement, on CK2 es transloca des del citosol al nucli i s'associa preferentment amb el de la cromatina i la matriu nuclear [63]. Encara que es té poca informació sobre els substrats de CK2 en la matriu nuclear, CK2 sembla ser un modulador important del manteniment de l'arquitectura nuclear a través de la fosforilació i potser la interacció proteïna-proteïna.

## 1.5 Paper fisiològic de CK2

La llarga llista de compartiments on s'ha ubicat CK2 i també la gran quantitat de substrats que se li han atorgat fa que la seva importància a nivell fisiològic sigui gran, però al mateix temps difícil d'acotar.

Functional category	No. of proteins
Signaling proteins (with the exclusion of transcription factors) (e.g.: $\beta$ -catenin, androgen receptor BID, calmodulin, caveolin, CD44, CD45, DARPP-32, disheveled, IRS1, MPR300, NLS receptor (Srp1p), PKA RII, I-2 of PP-1, PKC II $\beta$ , SAPK1/JNK1, neuromodulin, NIPP-1, PTEN)	87
Transcription factors (e.g.: c-Myb, ABF-1, c-Myc, CREB, CREM, Hoxb-6 and 7, Ikb $\beta$ , p53, MAX, mUBF, PU-1, SRF, Tal-1, TFIIIA.)	60
Proteins affecting DNA/RNA functions and protein synthesis (e.g.: B23, DNA ligase, DNA topoisomerase I, and II $\alpha$ , eIF2, nucleolin, RNA polymerase I, Nopp140, RNA polymerase III, hnRNP A2, TBP, ribosomal proteins P0, P1 and P2)	50
Viral proteins (e.g.: EBNA-2, HPV E7, HSV IE63, SV40 large T Ag, influenza virus PA, NSP5, EBV ZEBRA, HIV-2 Nef, HIV-1 Rev, HIV Vpu, HIV RT, HSV VP1, VZV-gpI)	38
Cytoskeleton and structural proteins (e.g.: spectrin, glycophorin, tubulin, connexin, vitronectin)	14
Metabolic enzymes (e.g.: acetylCoA carboxylase, glycogen synthase, ornithine decarboxylase, phospholipase D1a, PGD synthase)	9
Miscellaneous (e.g.: bPrP, CDC34, chromogranin, furin, myosin light chain, osteopontin, phosphophorin, $\alpha$ -synuclein, complement C3, immunophilin Fpr3)	49

**Taula 2 – Substrats de CK2 i funcions.** Taula extreta de l'article "*One-thousand-and-one substrates of protein kinase CK2*" [10] on Meggio et al. van fer un extens recull de substrats de CK2 i en van estudiar les seqüències consens i altres característiques.

La seva ubiqüitat, pleitropia i la senzillesa de la seqüència consens de fosforilació, fa que una de cada quatre proteïnes del genoma puguin ser fosforilades per CK2, segons prediccions *in silico* [10]. Un dels treballs més extensos fins a l'actualitat i que recull gran part de les proteïnes que s'han detectat com a substrat, més de 300, és "*One-thousand-and-one substrates of protein kinase CK2?*".

En aquest treball s'apunta que més d'un terç d'aquests substrats de CK2 descrits estan implicats en l'expressió gènica i la síntesi de proteïnes com a factors de transcripció (60) o efectors de l'estructura de l'ADN/ARN (50) o com a factors de traducció.

La implicació de CK2 en processos de neoplàsia, de supervivència cel·lular o d'infecció vírica, la situa com a focus d'interès en la investigació de la relació de la funció fisiològica i el substrat fosforilat per tal d'entendre aquests processos.

El que sembla evident és que la distribució de CK2 al llarg dels diversos compartiments de la cèl·lula i les funcions que se'n deriven no responen a un patró aleatori, i hi ha fins i tot qui s'atreveix a atribuir-li un paper d'element integrador de senyals i de control global de les vies de senyalització, fugint del rol de proteïna quinasa canònica de senyalització cel·lular [16].

A continuació es detallen 3 exemples d'implicació fisiològica de CK2:

- Al llarg del cicle cel·lular
- En supervivència i apoptosi
- En resposta a estrès

### **1.5.1 CK2 al cicle cel·lular i la proliferació**

A la bibliografia hi ha força evidències que senyalen CK2 com un possible regulador del cicle cel·lular. Estudis genètics en llevat indiquen que CK2 és necessària per a la progressió a través de G1/S i G2/M [6].

En cèl·lules eucariotes, la progressió a través del cicle pot ser inhibida per l'addició de nucleòtids antisentit contra les subunitats CK2 $\alpha$  i CK2 $\beta$  o per la microinjecció d'anticossos.

Aquest requeriment de CK2 en nucli de cèl·lules en un estat de proliferació alt també s'ha demostrat per activitat de CK2, nivells de proteïna i immunofluorescència en cèl·lules reestimulades amb sèrum [64].

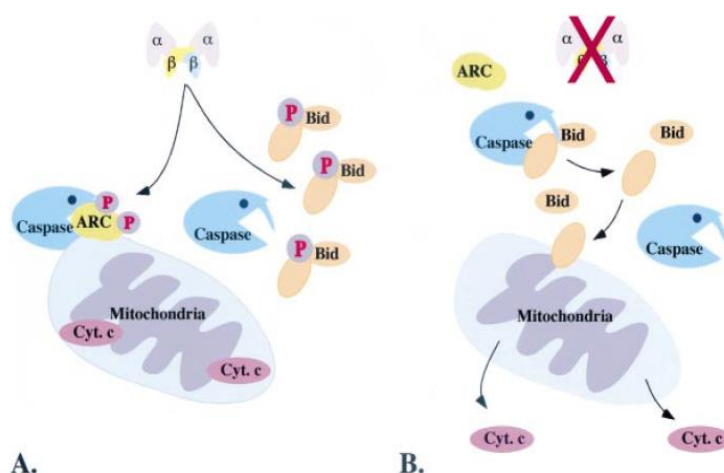
Tot i els múltiples estudis que demostren la necessitat de CK2 en el cicle cel·lular i proliferació, es desconeixen els mecanismes moleculars d'aquest requeriment, es postula però, que és degut a la fosforilació i regulació de proteïnes associades a la progressió del cicle cel·lular, de les que podem destacar les fosforilacions de p34<sup>cdc2</sup>, cdc34 i la topoisomerasa II en llevat.



### 1.5.2 CK2 en supervivència cel·lular i apoptosi

L'ús de cèl·lules de mamífer com a model d'estudi va poder confirmar les evidències aportades al llarg dels anys de la implicació de CK2 en supervivència cel·lular [65].

En llevats ja es proposava que la presència i l'activitat de CK2 eren necessàries per a la viabilitat cel·lular, ja que cèl·lules amb la quinasa inactiva eren incapaces de sobreviure. En cèl·lules de mamífer també s'ha observat que la sobreexpressió de mutants inactius de la subunitat catalítica posava en seriosos compromís la viabilitat cel·lular [66].



**Il·lustració 8 – Paper de CK2 en la regulació de l'apoptosi.** **A)** En condicions on CK2 no es troba compromesa fosforila proteïnes com Bid i ARC. Quan ARC es troba fosforilada per CK2 es localitza al mitocondri on inhibeix la caspasa 8. Quan Bid es troba fosforilada per CK2 es resistent al tall per la caspasa 8. **B)** En condicions d'apoptosi o quan l'activitat de CK2 es troba compromesa, ni ARC ni Bid poden ser fosforilades per CK2. En aquestes condicions ARC no es localitza en mitocondri i no inhibeix la caspasa 8 i Bid és més sensible al tall per caspasa 8. La translocació de Bid a mitocondri provoca l'alliberament del citocrom C i l'amplificació de l'activació de les caspases [2].

També s'ha demostrat la implicació de CK2 en apoptosi utilitzant l'inhibidor específic de CK2 TBB [67]. En aquest estudi s'observa com la inhibició de CK2 promou la defosforilació de la proteïna apoptòtica HS1, específica en cèl·lules hematopoètiques i la seva degradació per caspases. Però HS1 no és l'única proteïna protegida del tall per caspasa amb la fosforilació de CK2.

S'ha descrit un altre mecanisme complementari per la regulació del tall per caspases, en el qual es demostra la necessitat de la fosforilació d'ARC (repressor d'apoptosis amb el domini de reclutament de caspasa) per CK2 perquè aquesta proteïna dugui a terme la seva activitat inhibidora en front de la caspasa 8 [68], tal i com indica la Il·lustració 8.

### **1.5.3 CK2 en resposta a l'estrès**

La idea que CK2 podria ser un component clau de vies induïdes per l'estrès ha estat reforçada per diversos estudis. En resposta a estímuls d'estrès específics (xoc tèrmic, llum ultraviolada o radiació ionitzant), un *pool* de CK2 es relocalitza al compartiment nuclear. Quan el dany es produeix, cada subunitat CK2 es troba associada amb dominis subnuclears com la matriu nuclear.

Com a exemple del paper de CK2 en resposta a la llum ultraviolada, s'ha descrit que la quinasa juga un paper important a l'hora de reparar el dany a l'ADN. Per mantenir la seva integritat genètica, les cèl·lules eucariotes estan equipades amb mecanismes sofisticats per detectar i reparar el dany de les cadenes simples i dobles de l'ADN.

Aquesta reparació es fa amb la proteïna XRCC1, que s'encarrega de refer l'ADN trencat. Aquesta proteïna fa d'scaffold de la maquinària necessària per a la reparació i la fosforilació per CK2.

Aquestes dades suggereixen un nou paper per CK2 en el reclutament/acoblament de complexos de proteïnes de reparació de l'ADN als llocs de trencament de la cadena d'ADN a través d'una capacitat d'interactuar amb els llocs de poli-ADP-ribosa (PAR) en la síntesi de trencaments de la cadena d'ADN [69].

Els dos principals camps d'estudi d'aquesta tesi doctoral han estat intentar dilucidar la implicació de CK2 i de la seva activitat a l'inici de la traducció de les proteïnes, i també caracteritzar la seva presència en *lipid raft* i trobar-hi una explicació fisiològica.

A continuació, fem una ullada als factors d'iniciació de la traducció i als seus processos associats.

## **2 Factors d'iniciació de la traducció**

A principis de segle, el primer autor en començar a parlar de la formació del *Multifactor Complex* com a clau intermediari a l'hora d'iniciar la traducció proteica va ser el Dr. Alan G. Hinnebusch, amb el seu article “*A Multifactor Complex of eukaryotic initiation factors, eIF1, eIF2, eIF3, eIF5, and initiator tRNAMet is an important translation initiation intermediate in vivo*” [70]. En ell posava les bases de les interaccions entre els diversos factors amb el tRNA i suggeria el mecanisme pel qual aquests complexos s'unien i també algunes vies de regulació. A partir d'aquest article realitzat en llevat, diversos grups han dedicat esforços a entendre les interaccions entre les diverses subunitats i el seu significat i funció biològica.

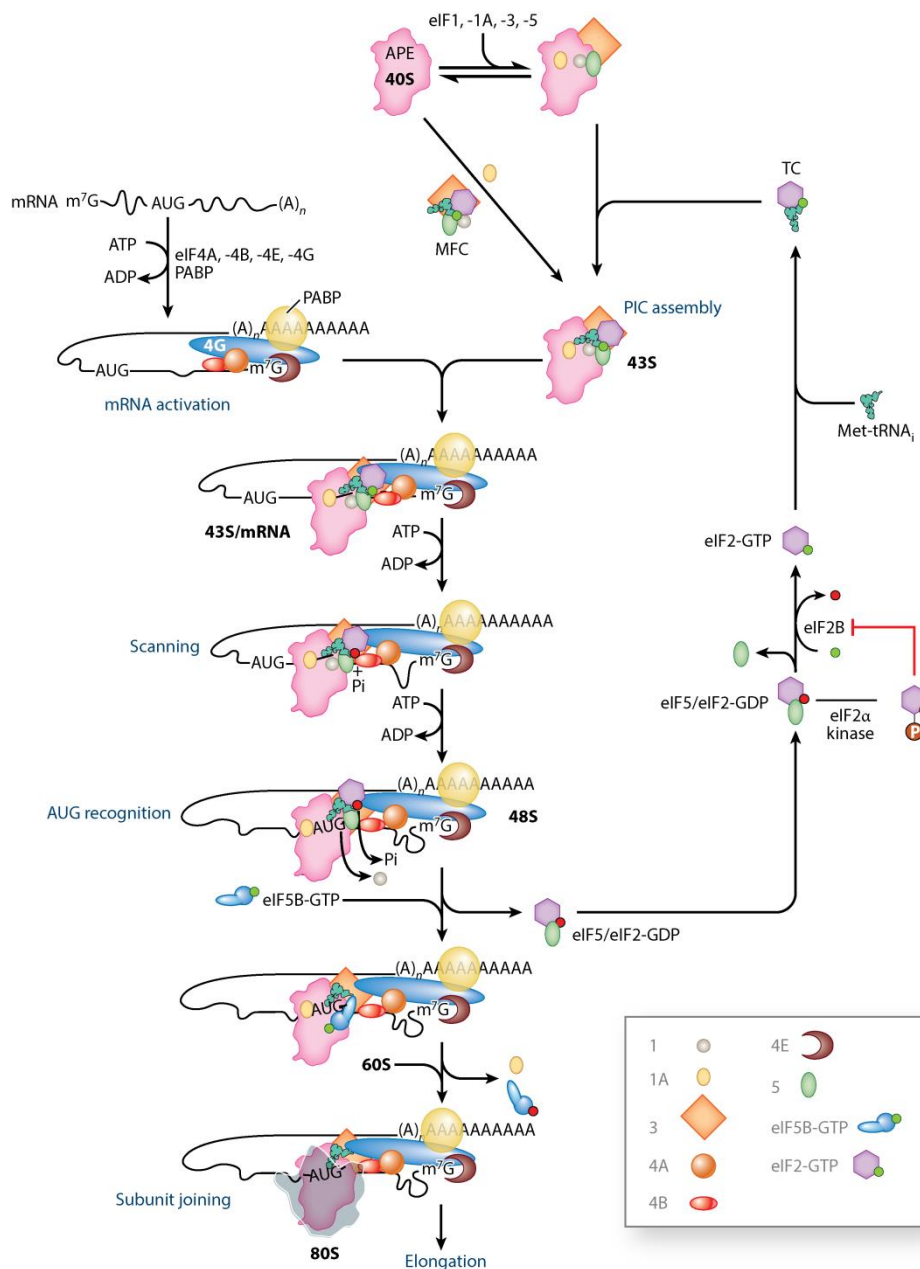
En aquesta part de la introducció ens centrarem en donar una visió general del *Multifactor Complex*, parlarem dels trets característics més importants d'eIF2 i eIF3 com a proteïnes centrals d'un dels nostres estudis i també veurem la possible implicació de CK2 en tot aquest procés.

### **2.1 *Multifactor Complex*, l'inici de la traducció proteica i la formació dels complexos de preiniciació de la traducció**

La síntesi proteica és un procés dinàmic que consta de tres etapes. L'etapa d'iniciació inclou tots els mecanismes necessaris per a l'assemblatge dels ribosomes amb el tRNA, que conté la metionina iniciadora (Met-tRNA<sub>i</sub>) i amb el codó d'iniciació de l'mRNA en el lloc P del ribosoma. Durant l'elongació es porta a terme la síntesi polipeptídica, on la formació de l'enllaç peptídic es dona en els centres catalítics formats per RNA ribosomal (rRNA) de la subunitat gran del ribosoma [70 i 71]. Quan el ribosoma arriba al codó d'STOP s'allibera la nova cadena polipeptídica i l'mRNA, procés anomenat terminació.

El procés d'iniciació de la traducció proteica pressuposa, com a tal, la formació del complex d'iniciació ribosomal, on l'anticodó Met-tRNA<sub>i</sub> Met s'aparella amb el codó d'iniciació de la traducció de l'mRNA. En eucariotes, el codó que determina l'inici de la traducció és l'AUG i sempre és present a l'extrem de l'mRNA sense tenir-ne en compte l'estructura.

L'estructura del complex d'iniciació de la traducció està conformada per múltiples factors d'iniciació de la traducció, anomenats a partir d'ara eIFs, que interaccionen amb la subunitat 40S del ribosoma per tal d'estimular la formació del complex.



**II-Il·lustració 9 – Esquema canònic de la cascada d'inici de la traducció proteica.** Imatge adaptada de l'article “*The Scanning Mechanism of Eukaryotic Translation Initiation*” del Dr. Hinnebusch [73]. Tot el procés comença amb l'assemblatge del PIC 43S, que es forma després de la unió per un costat de l'MFC format per eIF1, eIF1A, eIF3, amb el TC format per eIF2-GTP i el Met-tRNA<sub>i</sub> i amb eIF5. A la subunitat 40S també hi podem observar els llocs de codificació A, P i E que un cop format el ribosoma actiu efectuaran la traducció de l'mRNA. El PIC 43S s'afegeix a un mRNA activat, amb el complex mRNA-eIF4 en el seu extrem 5'. Un cop s'ha fet el reconeixement del codó d'inici AUG, eIF5 hidrolitza GTP d'eIF2, que produeix la dissociació d'eIF1 i el tancament cap a la posició d'escaneig del PIC. La presència d'eIF5B-GTP, recluta cap al PIC la subunitat 60S i s'acaben alliberant eIF5B-GDP, eIF1a i eIF2 que serà reciclat per reiniciar el procés.

El model més acceptat diu que eIF3, conformat per múltiples subunitats com detallarem més endavant, eIF1 i eIF5 s'uneixen a la subunitat 40S del ribosoma, impedit la unió de la subunitat 60S i així evitant la formació del ribosoma actiu. Un cop format el complex eIF1-eIF5-eIF3-40S, s'hi uneix el Met-tRNA<sub>i</sub> Met a través d'un complex ternari format per eIF2 amb una molècula de GTP unida, formant el complex

43S. Aquest complex serà l'encarregat ja d'interaccionar amb l'RNA missatger. Aquest mRNA incorporarà eIF4, que s'hi troba unit en el seu extrem 5' a través de l'estructura m<sup>7</sup>GpppN. Aquest nou complex de preiniciació, que rep el nom de 48S, serà l'encarregat del reconeixement del codó AUG.

La unió correcta entre codó i anticodó provoca l'activació de l'activitat GTPasa d'eIF5, que en eliminar GTP unit a eIF2, provoca l'eliminació del complex eIF1-eIF3-eIF2-eIF5 que fins ara bloquejava la unió amb la subunitat 60S, i es permet la formació del complex 80S i l'inici del procés d'elongació.

Vist l'esquema general de l'inici de la traducció a la Il·lustració 9, cal comentar alguns aspectes amb més detall dels protagonistes del procés.

## 2.2 La família dels factors d'iniciació de la traducció

Aquesta àmplia família de proteïnes agrupa totes les proteïnes que d'una manera o altra estan implicades en l'inici de la traducció proteica. Dins d'aquesta família hi trobem els conjunts de proteïnes eIF1, eIF2, eIF3, eIF4 i eIF5 molt diferents entre elles i en alguns casos amb fins a 13 subunitats.

### 2.2.1 eIF1, el més petit de la família

En el cas d'eIF1 (12 kDa en llevat), al qual sempre se li atribueix associat eIF1A (17 kDa en llevat), que antigament era conegut com a eIF4C [74], s'uneix a la subunitat 40S del ribosoma, i n'estabilitzen la seva conformació oberta. De fet, eIF1 es defineix com a essencial a l'hora de transferir el complex ternari format per Met-tRNA<sup>Met</sup> i eIF2-GTP a la subunitat petita del ribosoma per formar el PIC 43S.

El paper d'eIF1A es redueix a catalitzar aquesta reacció, ja que s'ha vist que no juga cap rol estructural a l'hora de fer la transferència o en la generació del ribosoma actiu [75].

### 2.2.2 eIF5, la seva activitat GTPasa és clau

Tal i com comentàvem en el cas d'eIF1, eIF5 també presenta dues proteïnes diferents. Conegut habitualment com a eIF5A o senzillament eIF5, és una proteïna monomèrica d'uns 50 kDa, té un paper principal en la formació del *Multifactor Complex* acompanyant eIF1, eIF1A, eIF3 i la subunitat 40S del ribosoma, i hi desenvolupa una funció clau.

El seu extrem N-terminal presenta activitat GTPasa i s'encarrega d'hidrolitzar el GTP unit a eIF2, i afavoreix la unió amb la subunitat 60S del ribosoma, formant així el ribosoma actiu o complex 80S. Pel que fa al seu domini C-terminal, és l'encarregat d'interaccionar amb altres eIFs, com ara eIF1, que mentre es troba unit, n'inhibeix la funció GTPasa [76].

L'altra proteïna de la família d'eIF5, és eIF5B, que intervé més endavant en el procés d'inici de la traducció, però abans de la hidròlisi de GTP d'eIF2. Un cop el codó d'inici de la traducció s'ha reconegut, eIF5B-GTP entra al complex i en surt eIF5-eIF2-GDP i el sistema recupera el fosfat perdut [77].

### **2.2.3 eIF4, responsable de guiar l'mRNA cap al ribosoma**

El paper d'eIF4, també anomenat eIF4F, és lleugerament diferent al que havíem vist fins ara. Es tracta d'un complex de proteïnes que facilita el reclutament dels ribosomes cap al RNA missatger. Aquest esdeveniment és el pas limitant de la velocitat de la traducció en la majoria de circumstàncies, i és un objectiu principal per a la traducció de control.

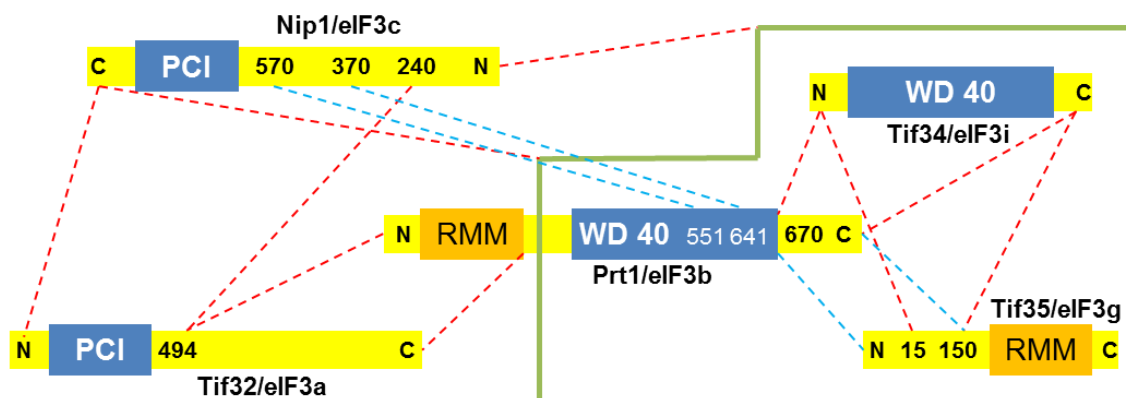
Les funcions de les proteïnes que formen part del *core* d'eIF4F inclouen el reconeixement de l'estructura cap 5' de l'mRNA (eIF4E), el lliurament d'una RNA helicassa (eIF4A), la unió de l'mRNA i el ribosoma (eIF4G), i la circularització de l'mRNA a través de la interacció amb la cua poliadenines (eIF4G).

S'ha descrit que la seva activitat pot venir regulada per factors de transcripció, per fosforilació de les seves subunitats, per inhibició o per trencament proteolític. De fet, alguns estímuls extracel·lulars, utilitzant vies com la PI3K i Ras, en poden alterar el seu estat de fosforilació. Hi ha determinades infeccions víriques que afecten directament a la funció d'eIF4F.

Hem deixat eIF2 i eIF3 pel final d'aquest apartat per tal d'entrar-hi amb més detall. Aquests dos factors d'inici de la traducció proteica són protagonistes del primer capítol d'aquesta tesi. La interacció entre aquests dos factors es va descriure l'any 2002 en llevats en un article de Valášek [78], on després de diversos experiments es veia clara la necessitat d'aquesta interacció per la formació correcta del complex ternari.

## 2.2.4 eIF3, l'esquelet del complex ternari

El complex multiproteic eIF3 el formen un conjunt de 13 proteïnes (eIF3a-m) de les quals 8 formen part del que es coneix com a “core d'eIF3” [79].



**Il·lustració 10 – Mapa de les interaccions entre les subunitats eIF3.** Els subcomplexos estables que podrien ser separats per SEC es representen per línies de traços vermelles. La interacció de Nip1/eIF3c amb el subcomplex Prt1/eIF3b-Tif34/eIF3i-Tif35/eIF3g subcomplex està representat per una línia sòlida al voltant de Prt1/eIF3b-Tif34/eIF3i-Tif35/eIF3g. La unió de Nip1/eIF3c amb el domini C-terminal de Prt1/eIF3b es va observar per Valášek et al. [78], mentre que la unió del domini C-terminal de Tif35/eIF3g amb el C-terminal de Prt1/eIF3b es va concloure a partir d'observacions indirectes. Per tant aquests dues interaccions estan representades per línies de punts blaves. Figura adaptada de l'article “*Novel insights into the architecture and protein interaction network of yeast eIF3*” [80] publicat l'any 2012 per Khoshnevis et al.

Temps enrere, i quan només se n'havia resolt l'estructura en llevats, es proposava un model amb només 5 proteïnes formant part del (a, b, c, g & i) que es troben altament conservades [78].

La resta de proteïnes hi són presents o absents en funció del punt del procés en què ens trobem. Degut a la seva variabilitat de subunitats, la massa del complex oscil·la entre els 550 kDa i el 800 kDa i, només recentment, se n'ha pogut resoldre una imatge estructural en l'entorn del PIC 43S [78].

En tractar-se d'un complex implicat en moltes de les etapes del procés, la seva estructura és força complexa. L'any 2012 es va aportar més llum a l'estructura d'eIF3, però la dificultat de purificar-la sola (fins al moment les purificacions publicades comptaven amb una elevada presència d'eIF15 [82 i 83]), va portar a Khoshnevis et al. a treballar amb un model d'eIF3 de llevat reconstituït [80], obviant la presència de les modificacions post-transduccionals.

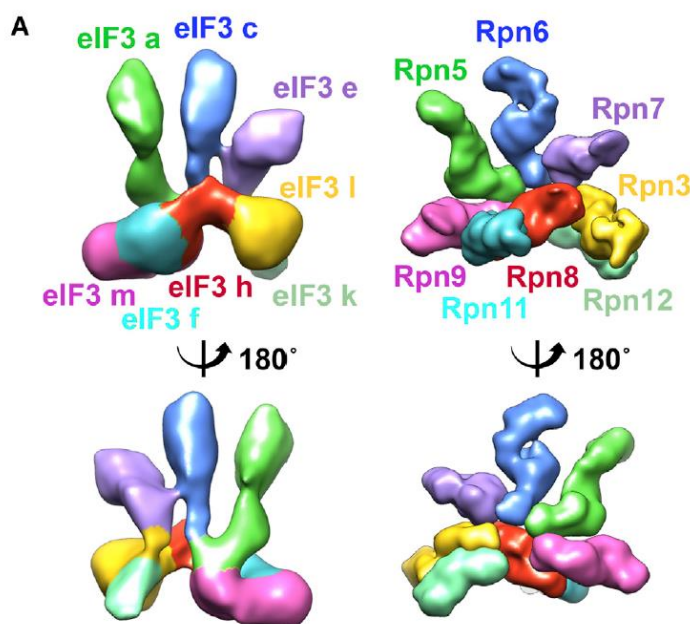
Nomenclatura eIF3	
Llevat	Humà
Tif32	eIF3a
Prt1	eIF3b
Nip1	eIF3c
Moe1	eIF3d
Int-6	eIF3e
	eIF3f
Tif35	eIF3g
	eIF3h
Tif34	eIF3i
Hrc1	eIF3j
	eIF3k
	eIF3l
	eIF3m

**Taula 3 – Nomenclatura equivalent de les subunitats d'eIF3.** Taula extreta de diversos articles.

Aquests estudis van revelar la necessitat, per exemple, d'un subcomplex format per Prt1-Tif34-Tif35 per tal que Nip1 s'hi pugui unir de manera estable, també que Tif34 s'uneix a PRT1 per establir l'associació de Tif35 amb el complex [83].

Així mateix s'ha vist que Tif32 serveix com la plataforma de la interacció de la unió de la part C-terminal de Nip1.

Els estudis per criomicroscopia d'alta resolució (6Å), però, han permès afinar la

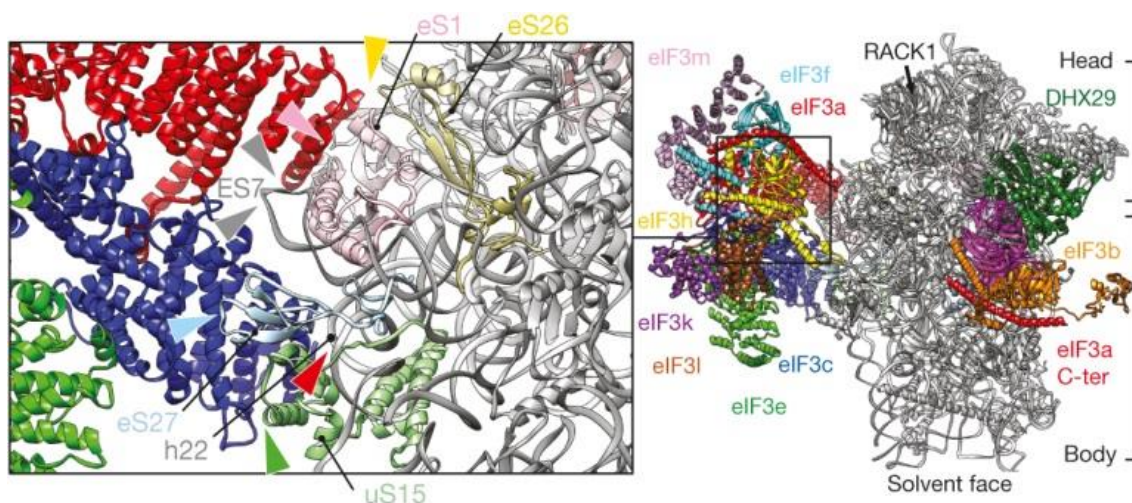


**Il·lustració 11 – Conservació del core proteic PCI/MPN.** Imatge contraposada entre l'octàmer d'eIF3 i la tapa del proteasoma per tal de veure les similituds estructurals. La coloració de les subunitats del core d'eIF3 s'ha utilitzat també en la coloració del proteasoma. Figura adaptada de l'article "Architecture of human translation initiation factor 3" de Jordi Querol-Audi [84] (PCI: Proteasome, COP9, eIF3; MPN (Mpr1–Pad1 N-terminal)).

caracterització de l'estructura [79]. De les 8 subunitats que formen part del core, podem dividir-les en dos grups per les seves característiques estructurals. Les subunitats (a, c, e, k, l and m) contenen els dominis anomenats PCI (proteasoma, COP9 signalosoma, eIF3), que presenten al seu extrem N-terminal un domini WHD (winged helix domain) i dues de les subunitats (f i h) presenten el domini MPN (Mpr1, Pad1, amino-terminal). Segons ja proposaven Enchev et al. l'any 2010 [85], les subunitats que presenten les estructures PCI/MPN tenen una semblança important amb la tapa del proteosoma i amb el signalosoma COP9. Aquesta semblança queda clara amb la Il·lustració 11, on es comparen les dues estructures.



A la Il·lustració 10 podem veure com s'estructuren aquestes subunitats del core. Les subunitats eIF3b, eIF3d, eIF3g i eIF3i, per la seva part, es troben unides al core de manera estable i flexible i semblen ser les encarregades del reconeixement de l'RNA.



**Il·lustració 12 – Interaccions de l'MFC amb el ribosoma.** La figura ens mostra els contactes entre el factor eIF3 amb la subunitat petita del ribosoma, un cop formen el complex 43S. Per millorar la qualitat de la purificació, s'ha dut terme amb la helicassa DHX29 unida. El recuadre negre de la figura de la dreta ens mostra els contactes amb més detall, veient també a la figura complet la presència d'eIF3b i eIF3a abraçant la subunitat petita del ribosoma. A la mateixa figura hi ha el codi de colors. Aquesta figura s'ha adaptat de l'article "Structure of mammalian eIF3 in the context of the 43S preinitiation complex" de Des Georges [79].

L'última de les 13 subunitats, eIF3j, és subestequiomètrica i es descriu com a no essencial, tot i que al 2004 ja hi havia autors que proposaven el contrari [71]. Tot i no ser essencial, publicacions recents que també l'han descrit com a substrat de CK2, han proposat que la fosforilació per aquesta quinasa altera la síntesi proteica [86].

### Els contactes entre eIF3 i la subunitat petita del ribosoma

Recentment s'han descrit amb força resolució les interaccions entre eIF3 amb altres eIFs i també amb la subunitat petita 40S del ribosoma, el que es coneix com a complex de preiniciació 43S.

En l'article "Structure of mammalian eIF3 in the context of the 43S preinitiation complex" [79] s'hi ha fet un exhaustiu repàs.

Després d'integrar diversos models i fonts d'informació, a l'article [79] es conclou que s'han observat interaccions entre eIF3a i eIF3c amb les proteïnes ribosomals de la subunitat 40S, tal i com s'observa a la Il·lustració 12.

### **2.2.5 eIF2, un trímer clau**

Per acabar el repàs dels factors d'inici de la traducció convé repassar en profunditat l'estructura i les característiques d'eIF2. Aquest factor és un heterotrímer de 126 kDa format per una subunitat  $\alpha$  de 36 kDa, una subunitat  $\beta$  de 38 kDa i una subunitat  $\gamma$  de 56 kDa, i es considera essencial per a l'inici de la síntesi proteica, ja que forma part del complex ternari en forma d'eIF2-GTP amb el Met-tRNA Met unit.

Aquest complex, un cop format, s'uneix a la subunitat petita del ribosoma 40S, que amb la resta d'eIFs forma el PIC43S. El procés segueix, com ja hem descrit abans, fins al moment del l'aparellament entre el codó AUG i el Met-tRNA d'iniciació. En aquest moment, eIF5 i la seva activitat GTPasa hidrolitzen GTP que es troba unit a eIF2 i l'activen, provocant que sigui alliberat del complex 48S, eIF5 recluta la subunitat 60S, el ribosoma es tanca i comença la traducció.

El procés de reciclatge d'eIF2-GDP el duu a terme eIF2B, el qual intercanvia amb ell un fosfat i eIF2-GTP està preparat per una nova ronda d'iniciació de la traducció [87].

#### **eIF2 $\alpha$ , la subunitat reguladora del complex**

La fosforilació de la Ser51 d'eIF2 $\alpha$  i la seva implicació en la inhibició de la síntesi de proteïnes es coneix bé, i des de fa temps [88]. Aquesta serina és diana per diverses quinases, i la seva fosforilació provoca una unió de la subunitat  $\alpha$  a la forma no catalítica d'eIF2B, provocant un complex inactiu [89]. Aquesta fosforilació es produeix, per exemple, per privació d'aminoàcids via GCN2, per estrès de reticle via PERK, presència de dsRNA via PKR o presència de metalls pesats via HRI [92 i 93].

#### **eIF2 $\gamma$ , l'esquelet estructural**

La subunitat eIF2 $\gamma$  és, estructuralment parlant, el component central per l'assemblatge de la subunitat eIF2, fent de pont entre la subunitat eIF2 $\alpha$  i eIF2 $\beta$ , també conjuntament amb eIF2 $\beta$  ajuden a la unió del Met-tRNA<sub>i</sub>-Met.

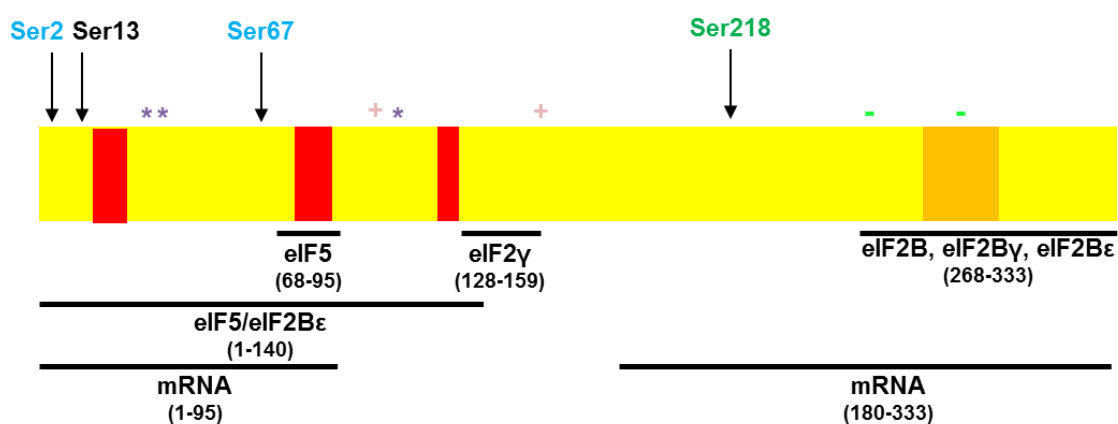
### **2.2.6 eIF2 $\beta$ , substrat de CK2 i estabilitzadora del complex**

#### **Estructura i funció**

La subunitat beta del factor d'iniciació de la traducció eIF2 presenta una seqüència de 333 aminoàcids, àmpliament conservats, obtenint una proteïna d'uns 38 kDa. Hi ha poques homologies descrites per la seva seqüència excepte amb l'extrem C-terminal d'eIF5 [92]. Les anàlisis funcionals i estructurals d'eIF2 $\beta$  han evidenciat que conté tres regions diferents: el N-terminal desestructurat i el centre i les regions C-terminal amb una estructura més definida.

La regió central conté el lloc d'unió a eIF2 $\gamma$ , mentre que la regió C-terminal conté un dit de zinc que contribueix a la unió d'RNA i és important pel procés de selecció de codó del tRNA d'iniciació [93]. Aquesta funció és molt important en el procés d'inici de la traducció, i s'ha vist que mutacions en eIF2 $\beta$  suposen inicis del procés de traducció sense tenir en compte el codó AUG d'iniciació en *C. Elegans* [94].

La regió central i la C-terminal també s'ha vist que contenen els llocs d'unió per CK2, mentre que els llocs de fosforilació d'aquesta proteïna quinasa es troben a la regió N-terminal. La presència de tres blocs de lisina [95] i els llocs de fosforilació *in vitro* de la proteïna quinasa CK2 i PKC (proteïna quinasa C) són característics de la regió N-terminal de mamífers eIF2 $\beta$  [96].



**Il·lustració 13 – Esquema de l'estructura d'eIF2 $\beta$ .** A la part superior de la figura hi trobem els llocs de fosforilació descrits per eIF2 $\beta$ . En blau els llocs per CK2, en negre per PKC i en verd per PKA. Amb els signes “\*”, “+” s'indiquen els putatius llocs de fosforilació descrits en estudis de proteòmica per altres quinases i amb el signe “-” s'indiquen llocs d'acetilació. En vermell hi podem trobar els blocs de polilisina a la part N-terminal i en taronja el dit de Zinc. A la part inferior de la figura hi trobem els principals punts d'interacció d'eIF2 $\beta$  amb altres proteïnes i amb l'mRNA. Esquema adaptat de la tesi doctoral del Dr. Franc Llorens i ampliat amb la informació present a la base de dades d'Uniprot.

En el cas dels llevats, els blocs de lisina es conserven i participen en la unió a eIF5, eIF2B $\epsilon$  i ARNm, però si es suprimeixen comprometen el creixement cel·lular, la qual cosa apunta a un paper important per a aquesta funció estructural [7]. Si aquests efectes del creixement cel·lular també s'exerceixen sobre les cèl·lules de mamífers encara no s'ha explorat.

### Les interacció d'eIF2 $\beta$

Una de les característiques principals de la subunitat eIF2 $\beta$  és la seva capacitat d'interactuar amb altres proteïnes, encarregant-se de la majoria de contactes del complex eIF2. S'ha descrit que s'uneix a l'mRNA [97] a través d'un dels clústers de lisines que presenta, i així mateix, la bibliografia en descriu que s'uneix a la subunitat catalítica eIF2B [98] i també amb eIF5, regulant-ne l'activitat GTPasa [99].

Com ja hem vist quan parlàvem d'eIF3, la interacció entre aquesta subunitat i la d'eIF2 $\beta$  és estreta. Interactua directament amb eIF3a, i la seva unió amb eIF5 potencia la posterior unió amb eIF3c, que acabarà introduint el complex ternari al *Multifactor Complex* [100].

D'altra banda, eIF2 $\beta$  s'uneix directament a TIF32/eIF3a [101] i la unió a eIF2 $\beta$  amb eIF5 potencia l'associació d'aquests últims amb Nip1/eIF3c, que també ajuda a integrar el complex ternari al *Multifactor Complex* [102].

A més a més, eIF2 $\beta$  s'uneix a la proteïna adaptadora NCK-1 i aquesta unió evita la fosforilació d'eIF2 $\alpha$  i la posterior aturada de la traducció en resposta a l'estrès reticle endoplasmàtic [103].

El nostre grup va demostrar que eIF2 $\beta$  també s'uneix a CK2, que fosforila altres eIFs i proteïnes ribosomals i que la unió d'eIF2 $\beta$  a la subunitat catalítica lliure de CK2 (CK2 $\alpha$ ) inhibeix la seva activitat en substrats de proteïna [104].

### Fosforilació d'eIF2 $\beta$

La fosforilació d'eIF2 $\beta$  *in vitro* i *in vivo* ha estat coneguda des de finals dels anys 70 [110]. Els llocs de fosforilació principals d'eIF2 $\beta$  en humà que s'han descrit són:

- a) Per CK2 a Ser<sup>2</sup> i la Ser<sup>67</sup>
- b) Per PKC la Ser<sup>13</sup>
- c) Per PKA la Ser<sup>218</sup>

Aminoàcid	Modificació	Prot.	Ref.
Ser <sup>2</sup>	Acetilació		[105]
Ser <sup>2</sup>	Fosforilació	CK2	[106]
Ser <sup>13</sup>	Fosforilació	PKC	[106]
Thr <sup>31</sup>	Fosforilació		[106]
Thr <sup>36</sup>	Fosforilació		[106]
Ser <sup>67</sup>	Fosforilació	CK2	[107]
Ser <sup>105</sup>	Fosforilació		[108]
Thr <sup>111</sup>	Fosforilació		[107]
Ser <sup>158</sup>	Fosforilació		[107]
Ser <sup>218</sup>	Fosforilació	PKA	
Lys <sup>265</sup>	Acetilació		[109]
Lys <sup>293</sup>	Acetilació		[109]

A banda d'això, a través d'Uniprot s'han recollit altres possibles modificacions post-transduccionals recollides a la bibliografia, i presents en la Taula 4. S'ha proposat també que eIF2 $\beta$  podria ser substrat de la proteïna quinasa d'ADN tot i que no se n'ha descrit el lloc de fosforilació.

**Taula 4 – Modificacions post-transduccionals d'eIF2 $\beta$ .** Taula adaptada de la informació present en l'entrada P20042 d'Uniprot.

Totes aquestes unions i elevat número de proteïnes cal que estiguin ben regulades. A continuació veurem els mecanismes més importants.

## **2.3 Mecanismes de control de la traducció**

L'expressió gènica està regulada en diversos nivells, incloent la traducció d'ARNm en proteïnes. En comparació amb la regulació transcripcional, el control de la traducció dels mRNA permet canvis més ràpids en les concentracions cel·lulars de les proteïnes codificades i, per tant, es pot utilitzar per mantenir l'homeòstasi, a més de la modulació de més canvis permanents en la fisiologia cel·lular o la destinació.

Com ja hem comentat, el procés de traducció es pot dividir en la iniciació, elongació, terminació, i el reciclatge de ribosoma, essent la primera etapa on es fan la majoria de processos de regulació.

La mateixa existència d'un codó d'iniciació ja és un punt important de la regulació. Aquest codó s'identifica generalment per un mecanisme d'escaneig, on la subunitat petita del ribosoma (40S) carregat amb Met-tRNA<sub>i</sub>, formant el complex PIC, s'uneix a l'ARNm prop de l'extrem 5' i n'escaneja la regió no traduïda (5'UTR) fins a trobar el codó AUG. Per tant, la mateixa estructura de l'RNA ribosomal ja impedeix un inici de la traducció incorrecte a sobre la regió de 5'UTR.

La presència en aquest punt dels factors d'inici de la traducció implicats en el reconeixement de l'estructura de poliadenines de l'mRNA missatger també és un altre procés de regulació que, per exemple, es troba disminuït en casos d'estrès o deprivació.

En altres condicions també poden intervenir en la regulació les proteïnes que s'uneixen a l'mRNA, els microRNA o RNPs que s'uneixen al 3'UTR i recluten cap al complex alguns factors d'inhibició dels eIFs.

Però com sempre, també hi ha maneres de saltar-se aquesta regulació en l'escanejat. Hi ha un subconjunt d'mRNA en els quals els PIC s'uneixen a una regió coneguda com IRES (de l'anglès, llocs interns d'entrada del ribosoma) i comencen a traduir sense seguir els passos habituals. Aquest mecanisme és habitual en els mRNA vírics per eludir les regulacions de les cèl·lules infectades.

Un altre dels mecanismes destacats per bloquejar la traducció és inhibir l'activitat dels eIFs i impedir el reclutament del Met-tRNA<sub>i</sub> cap a la subunitat 40S. Tot i que pugui semblar un mecanisme massa generalista d'inhibició, hi ha processos que han evolucionat per permetre la transcripció d'mRNA específics en condicions d'estrès, quan la majoria de processos es troben reprimits.

## 2.4 El paper de la proteïna CK2 en síntesi proteica

Tal i com s'ha descrit anteriorment, CK2 presenta molts substrats implicats en el procés d'expressió gènica, i com en alguns punts també hem anat veient, alguns d'ells es troben relacionats amb la síntesi proteica.

Es coneix que CK2 fosforila i interacciona amb una àmplia gamma de proteïnes, tant factors de la traducció, com proteïnes ribosomals i proteïnes d'interacció amb mRNA [10] que poden estar en íntim contacte durant la traducció.

Com a exemple, en l'MFC, tres de les quatre proteïnes que el formen (eIF2, eIF5 i eIF3), són substrats de CK2.

eIF3 va ser el primer substrat endogen caracteritzat de CK2 l'any 1976. Dues de les seves subunitats, eIF3d (p67) i eIF3c (p120) són fosforilades eficientment per CK2 purificada de diversos orígens [111]. A l'any 2008 [112] es va proposar també eIF3b com a substrat de CK2 i recentment s'hi ha afegit eIF3j [86].

TABLE I  
Identification of eIF3 protein subunits and their corresponding PTMs using nano-LC-LTQ-FTMS

Protein name	UniProt accession number	Molecular mass <sup>a</sup>	Sequence coverage	Post-translational modifications <sup>b</sup>
		Da	%	
eIF3a	Q14152	166,758.3	86	Loss of Met-1, phosphorylation (Ser-881, Ser-1198, Ser-1336*, Ser-1364*)
eIF3b	P55884	93,093.7	77	Acetylation (Met-1), phosphorylation (Ser-83, Ser-85, Ser-119, Ser-125*, Ser-152, Ser-154, Ser-164)
eIF3c	Q99613	106,143.8	65	Phosphorylation (Ser-9, Ser-11, Ser-13, Ser-15, Ser-16, Ser-18, Ser-39, Ser-166**, Thr-524*, Ser-909**)
eIF3d	O15371	63,972.9	74	Not found
eIF3e	P60228	52,131.8	84	Loss of Met-1, acetylation (Ala-2)
eIF3f	O00303	37,554.8	79	Loss of Met-1, acetylation (Ala-2), phosphorylation (Ser-258*)
eIF3g	O75821	35,639.8	83	Loss of Met-1, phosphorylation (Thr-41, Ser-42)
eIF3h	O15372	40,010.4	89	Phosphorylation (Ser-183*)
eIF3i	Q13347	36,501.9	93	Not found
eIF3j	O75822	29,293.2	81	Loss of Met-1, acetylation (Ala-2), phosphorylation (Ser-11, Ser-13, Ser-20, Thr-109**)
eIF3k	Q9UBQ5	24,970.6	75	Loss of Met-1, acetylation (Ala-2)
eIF3l	Q9Y262	66,637.9	70	Loss of Met-1, acetylation (Ser-2)
eIF3m	Q7L2H7	42,413.8	74	Loss of Met-1, acetylation (Ser-2)

<sup>a</sup> Calculated from the theoretical average mass of the corresponding eIF3 protein subunit plus any post-translational modifications identified.  
<sup>b</sup> \*, found only after TiO<sub>2</sub> phosphopeptide enrichment \*\*, found only after Ga(III) IMAC or TiO<sub>2</sub> phosphopeptide enrichment.

**Taula 5 – Resum de les modificacions post-transduccionals d'eIF3.** Taula extreta i adaptada de l'article [112] on s'ha estudiat per espectrometria de masses el complex eIF3.

De fet, el cas de l'extrem N-terminal d'eIF3c, tal i com s'observa a la Taula 5, presenta molts llocs de fosforilació, i com a mínim en tres d'ells, s'hi ha descrit fosforilació per CK2. La fosforilació d'aquesta regió és important perquè és la responsable dels contactes amb eIF1 i per facilitar contactes també amb eIF5.

Pel que fa a eIF2 també va ser un dels primers substrats coneguts de CK2 [113]. La seva fosforilació per CK2 fou caracteritzada *in vitro* en les Ser<sup>2</sup> i Ser<sup>67</sup> d'eIF2β [95] i membres del nostre grup en van descriure les seves implicacions i la seva necessitat pel bon funcionament del complex eIF2 [114].

Alguns estudis van intentar buscar alguna relació funcional en la fosforilació d'eIF2 $\beta$  per CK2. Per exemple es va veure que la fosforilació d'eIF2 $\beta$  de blat per CK2 no modificava el bescanvi de GDP-GTP en eIF2. Cal destacar, però, que en aquests estudis s'utilitzava proteïna purificada, i per tant, aquesta, probablement ja es trobava fosforilada. A més, no eren presents tots els components de la maquinària de síntesi, només estudiant-se en aquest cas el bescanvi espontani pel propi eIF2 [115].

Per contra, altres autors a l'any 1994 observaren que la fosforilació del complex d'eIF2-eIF2B per CK2 disminuïa l'afinitat d'unió d'eIF2 al GDP, augmentant la capacitat de bescanvi GTP-GDP en presència d'eIF2 $\beta$  [116]. Aquest treball es basa en defosforilacions i refosforilacions *in vitro* mitjançant fosfatasa alcalina i CK2, respectivament, d'eIF2 i eIF2B purificades, sense la resta d'elements d'iniciació de la síntesi proteica i sense demostrar-se els centres implicats en aquestes fosforilacions.

Posteriorment estudis han descrit com eIF2B també és substrat de CK2, tant *in vitro* com *in vivo*, a les Ser<sup>712</sup> i la Ser<sup>713</sup> del domini C-terminal. En aquest cas la mutació dels centres de CK2 redueix la interacció entre eIF2B i eIF2, provocant una disminució de l'activitat eIF2B [117], tal i com postulaven els autors de l'anterior treball.

En llevat també s'ha descrit la fosforilació d'eIF2 $\alpha$  per CK2, probablement en tres serines situades en el domini C-terminal (Ser<sup>292</sup>, Ser<sup>294</sup> i Ser<sup>301</sup>), la mutació de les quals per alanines sembla comprometre l'òptima funcionalitat d'eIF2 [93].

El factor eIF5 humà també és fosforilat per CK2 *in vitro* i *in vivo* en la Ser<sup>389</sup> i Ser<sup>390</sup> del domini C-terminal, i se'n va descriure una possible relació amb la progressió del cicle cel·lular [118]. A banda d'aquesta funció, en cèl·lules eucariotes sembla afectar molt lleugerament la formació del complex 80S, la interacció amb eIF2 no és modificada i en llevat la viabilitat cel·lular no és compromesa i no s'observen defectes en creixement [118 i 119].

Com hem vist, les implicacions de CK2 en tot el procés de la traducció proteica és força extens i nosaltres hi hem intentat aportar una mica més de llum.

Abans d'entrar en detall en els resultats d'aquest capítol, en l'últim punt de la introducció plantejarem un camp alternatiu d'estudi de CK2, les membranes i els microdominis de membrana.



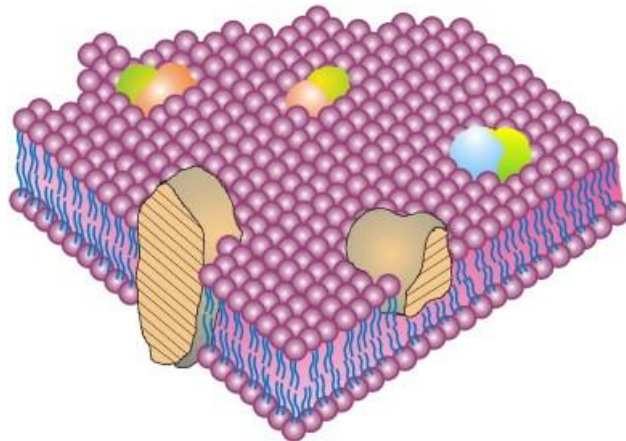
### 3 Microdominis de membrana

El model original de “mosaic fluid” ens transporta a la idea que les proteïnes floten de manera lliure en un mar lipídic, però d'uns anys cap aquí l'idea d'una membrana uniforme ha canviat. La troballa de dos tipus de microdominis anomenats *lipid raft* i caveoles n'ha canviat el punt de vista. Abans d'entrar en detall amb els microdominis cal fer una ullada al model de mosaic fluid.

#### 3.1 El model del mosaic fluid

Aquest model va ser proposat l'any 1972 per Singer i Nicolson per tal d'explicar l'estructura i el funcionament de les membranes cel·lulars. El model de mosaic fluid es va proposar gràcies a observacions de microscòpia electrònica, ajudat amb l'estudi d'interaccions hidròfiles, dels enllaços no covalents com ponts d'hidrogen i el desenvolupament de les tècniques com la criofractura i de contrast negatiu. Gran part de la informació d'aquest punt deriva de l'article “*The Fluid Mosaic Model of the Structure of Cell Membranes*” [121].

El model presenta la membrana plasmàtica com una estructura dinàmica en la qual els seus components poden fluir en major o menor mesura pel pla de membrana. La hipòtesi es basa en una membrana plasmàtica, on els fosfolípids es disposen formant una bicapa lipídica. Les proteïnes s'intercalen en aquesta bicapa de lípids depenent de les interaccions amb les regions de la zona lipídica. Defineix també dos tipus de proteïnes segons la disposició a la bicapa:



**Il·lustració 14 – Model tridimensional del mosaic fluid original.** Figura adaptada de l'article “*The Fluid Mosaic Model of the Structure of Cell Membranes*” [121] d'una representació tridimensional de la membrana, on hi podem veure les proteïnes globulars transmembrana distribuïdes en la matriu lipídica.

- a) Proteïnes integrals o intrínseques: embegudes en la bicapa lipídica, travessen la membrana una o diverses vegades, sortint per una o per les dues cares (són proteïnes transmembrana) i s'hi poden trobar unides mitjançant enllaços covalents a un lípid o un glúcid de la membrana.



L'aïllament d'aquestes proteïnes requereix el trencament de la bicapa. Les glicoproteïnes es troben travessant tota la capa de la membrana cel·lular i el seu nom respon al fet que contenen glúcids.

- b) Proteïnes perifèriques o extrínseques: es troben principalment al costat citosòlic de la bicapa lipídica, tot i que també n'hi ha al domini extracitosòlic. No són proteïnes transmembrana. Estan dèbilment unides a la membrana per enllaços no covalents de manera que són fàcilment separables de la bicapa (sense provocar-ne la seva ruptura) mitjançant solucions salines.

De manera similar a la distribució, la presència i la funció de les proteïnes de membrana depenen del tipus i de l'origen de la membrana en qüestió. Les membranes intracel·lulars, com les membranes mitocondrials o les membranes del reticle endoplasmàtic, tenen un contingut en proteïnes extremadament elevat, que representa fins a un 75 % en pes del total de la membrana. Aquest valor reflecteix l'alta activitat funcional d'aquestes membranes.

D'altra banda, les membranes de mielina dels axons tenen un baix contingut en proteïnes (<25 %) i treballen en primer lloc com a aïllants elèctrics, i per fer-ho, hi ajuda un elevat contingut en lípids.

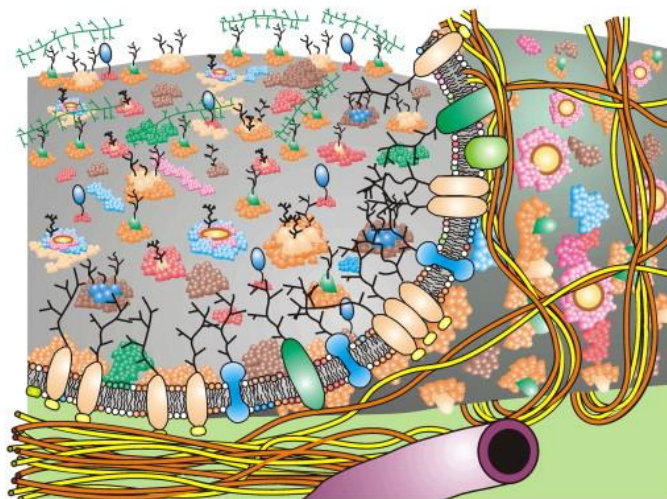
En canvi, les membranes plasmàtiques tenen una distribució compensada de lípids i proteïnes. Les membranes bacterianes s'assemblen més, en la seva distribució proteïna-lípid, a la membrana mitocondrial interna. La diferent distribució proteica és sobretot un reflex dels diferents requisits funcionals de les membranes especialitzades.

Mentre que els lípids són els elements biològics que constitueixen l'estructura de les membranes, les proteïnes els hi confereixen funcions específiques. D'acord amb el model del mosaic fluid, les membranes biològiques poden ser considerades com un "fluid de dues dimensions" que "dissol" les proteïnes de membrana hidròfobes i on tots els lípids i proteïnes poden moure's per difusió amb més o menys llibertat.

Donat que les principals proteïnes són més grans que el gruix d'una membrana biològica, sobresurten per fora d'un o dels dos costats de la membrana. De la mateixa manera que els lípids, les proteïnes també poden difondre lateralment, tot i que de forma molt més lenta, de manera que les membranes biològiques ofereixen una superfície constantment canviant: es parla d'un mosaic fluid.

Aquesta dinàmica de les membranes biològiques, que permet reaccions ràpides davant d'impulsos externs, és una immediata conseqüència de la seva fluïdesa. La barrera energètica per la translocació de proteïnes a través de la doble capa és elevada igual que per als glicolípidis.

En la revisió de l'any 2014 [122] un dels autors del treball original, Nicolson, posa al dia el que s'ha descobert fins ara. La Il·lustració 15 mira de ser un exemple de com ha evolucionat la teoria fins ara, tot i que manté les bases de l'any 1972.



La revisió de l'article original parla de moltes de les noves estructures que s'han descrit i fa evident que la teoria original no es pot aplicar a totes les membranes.

Aquest article proposa una sèrie nous microdominis que són menys fluids que la resta de la membrana i es troben enriquits amb algunes

**Il·lustració 15 – Actualització del model de mosaic fluid.** La figura, adaptada de l'article "The Fluid - Mosaic Model of Membrane Structure: Still relevant to understanding the structure, function and dynamics of biological membranes after more than 40 years" [122] mostra les estructures presents a la membrana, les interaccions amb el citoesquelet i algunes estructures extracel·lulars. S'hi representen proteïnes integrals, glicoproteïnes, lípids i oligosacàrids en diferents color. La membrana s'ha "pelat" per la part superior per veure la superfície de la membrana interna. S'hi pot veure també que altres mecanismes de restricció de la difusió lateral també hi són representats, com dominis de lípids de membrana integral, la formació del complex de glicoproteïnes (vist a la membrana de tall transversal), associacions de polisacàrids-glicoproteïna (a l'extrem superior esquerre) i interacció directa o indirecta dels dominis de la membrana amb elements de la part interior del citoesquelet (a baix a l'esquerra).

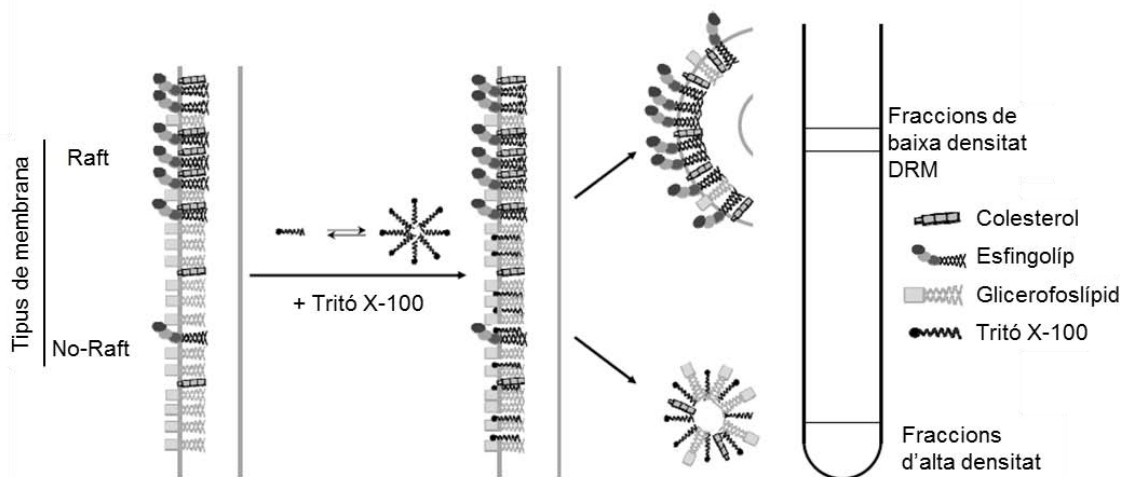
proteïnes, moltes d'elles implicades en processos de transducció de senyal, fet que ha portat a pensar que aquestes estructures són grans plataformes de senyalització [123]. Però anem per passos.

### 3.2 Primeres caracteritzacions de les membranes resistents al detergent

En un article publicat l'any 1992, Brown i Rose [124] van demostrar que les proteïnes ancorades a fosfoglicèrids poden ser recuperades a partir de lisats de cèl·lules epitelials en una baixa densitat, la forma insoluble en detergent.

Aquesta va ser la primera evidència que va donar suport a la publicada l'any 1988 per Simons i van Meer, que van proposar la localització de certes proteïnes al domini apical de les membranes de certs tipus cel·lulars, com a conseqüència de la seva associació amb glicoesfingolípids, com ara els *lipid raft* [125].

En aquell moment hi va haver diversos estudis bioquímics sobre la composició, organització i funcions biològiques dels *lipid raft* basats en el mètode de Brown i de Rose, i molts investigadors equiparaven els *lipid raft* a “una fracció de membrana que es caracteritza per una composició lipídica particular que condueix a una membrana líquida ordenada o també es defineix en termes d'insolubilitat en detergents aquosos no iònics” [124].



**Il·lustració 16 – Esquema de la purificació dels *lipid raft*.** A la il·lustració hi veiem les diferències de solubilitat entre els dos tipus de membrana en presència de Tritó X-100. La població de membranes insoluble, que trobem a la part menys densa del gradient, correspon a les DRM. A una concentració de Tritó X-100 a l'1 % el detergent es troba en forma monomèrica i és capaç d'introduir-se a la membrana (*no-raft*) i formen petites micelles. En el cas de les membranes tipus *lipid raft*, les membranes es troben enriquides amb esfingolípids i colesterol, i això fa que els trossos de membrana no puguin formar micelles. El gràfic s'ha adaptat de l'article *Membrane Domains and the “Lipid raft” Concept* de Sonnino i Prinetti [126].

La major part dels components de les membranes cel·lulars (incloent GPLs, components de lípids lliures, i glicoproteïnes de membrana intrínsecs) es solubilitzen pels detergents i agents caotròpics.

Però en els primers estudis, es va demostrar que "el material insoluble en detergent" (DIM) es trobava enriquit amb proteïnes de la matriu pericel·lular, components del citoesquelet i amb glicoesfingolípid, però el temps va demostrar que eren molt més complexos, contenen esfingolípid, esfingomièlina, colesterol, proteïnes ancorades a fosfoglicèrids o altres proteïnes hidrofòbiques de membrana, i tots ells es mostraven insolubles al tractament amb detergent no-iònic, com el Tritón X-100. En canvi, la resta d'elements de les membranes fora de la regió dels *lipid raft* es solubilitzaven formant micromiscel·les amb el detergent, tal i com mostra la Il·lustració 16.

La fracció DIM/DRM pot ser separada després del tractament amb detergent a partir de la seva baixa densitat, a causa de l'alt nombre de lípids presents, utilitzant gradients lineals o discontinus [124]. La capacitat de poder purificar els *lipid raft* va fer que la seva investigació creixés de manera molt important. Es va concloure, doncs que els DRM tenen principalment esfingolípid, colesterol i àcids grassos palmitoleats.

No obstant això, es van plantejar diverses crítiques pel que fa a la importància de les dades bioquímiques obtingudes mitjançant l'anàlisi de les fraccions DRM, com ara les presents en aquest tres articles [126, 127 i 128] alguns d'ells amb títols prou lacònics com "*Lipid rafts: Elusive or Illusive?*"

Un argument era que l'aparent insolubilitat en un detergent d'un component cel·lular concret pot provocar un reordenament de diversos elements de la membrana i acabar insolubilitzant tot el conjunt, o també s'esgrimia que el mètode de purificació és molt sensible als paràmetres experimentals de temperatura, concentració de detergent i la seva capacitat de penetració en la membrana cel·lular, sense obviar procediments mecànics utilitzats per la lisi o la homogeneïtzació o, fins i tot, el pH dels tampons utilitzats.

Com a resposta d'aquestes preocupacions de la comunitat científica, es van realitzar estudis comparatius utilitzant una àmplia varietat de detergents i de condicions, algunes d'elles utilitzades en els materials i mètodes d'aquesta tesi [129 i 130].

Aquests estudis van mostrar que les DRM enriquides en colesterol i esfingolípid, acompanyades de les proteïnes unides a fosfatidilinositols o proteïnes acilades es poden obtenir.

L'esforç per estandarditzar el protocol va propiciar un estudi més detallat d'aquestes microdominis membranosos i se'n van poder estudiar en profunditat diversos tipus.

### 3.3 Dos tipus de microdominis: Caveoles i *Lipid raft*

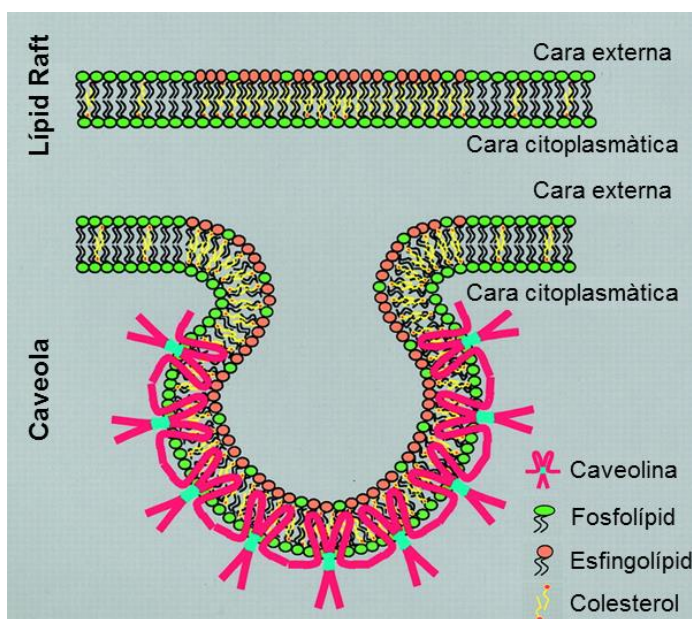
#### 3.3.1 Les caveoles

Una de les primeres estructures de DRM que es va descriure van se les caveoles, originalment descrites com a invaginacions arrodonides de la membrana plasmàtica d'uns 50-100 nm [133], que es mostren resistents als detergents no iònics com el Tritón X-100 i comparteixen la característica dels DRM de flotar quan es disgrega la membrana plasmàtica [134].

La insolubilitat amb els detergents no iònics s'atribueix a l'enriquiment de la membrana amb esfingolípid i colesterol, a diferència de la majoria de la membrana que està formada per fosfolípids.

La diferent conformació de les cadenes lipídiques, insaturades amb els fosfolípids, i saturades en els esfingolípid, fa que el seu empaquetament sigui molt més fort, en el segon cas [135]. Les membranes de les caveoles, a banda de contenir esfingolípid que li concedeixen aquesta duresa, també incorporen molècules de colesterol. Aquestes li provoquen una lleugera desestabilització, creant una bicapa anomenada "fase líquida ordenada" [136].

En aquestes estructures, la presència de colesterol els dona un cert grau de mobilitat lateral a les proteïnes presents, però també les converteix en insolubles en detergents iònics.



**Il·lustració 17 – Organització detallada dels *lipid raft* i les caveoles a les membranes.** A la part de dalt hi trobem els *lipid raft*. El mosaic líquid ordenat s'enriqueix de manera espectacular amb colesterol (en groc), els esfingolípid s'orienten al costat exoplasmàtic (esfingomielina i glicoesfingolípid) (en taronja). Per contra, la fase desordenada es compon essencialment de fosfolípids, com ara fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, i fosfatidilserina (es mostra en verd). A baix hi ha l'estructura de les caveoles: L'estructura de la membrana desordenada és la mateixa que a la figura superior. Després de la integració de la proteïna caveolina-1, la membrana forma petites invaginacions. Els monòmers de Caveolina-1 s'acoblen per formar homooligòmers discrets (que es mostren com dímers per simplificar) que contenen entre 14 a 16 molècules caveolina. Aquestes estructures confereixen l'estructura de les caveoles. A la il·lustració els oligòmers de caveolina-1 són vermells i el domini d'oligomerització de la caveolina-1 és blau [132].

A la part citoplasmàtica de les caveoles hi trobem una alta presència de proteïnes, on destaquen les caveolines, de les quals se'n coneixen tres membres, caveolina-1 amb dues isoformes, caveolina-2 amb tres isoformes i caveolina-3.

Aquestes proteïnes, tot i ser presents a la membrana, els seus extrems C-terminal i N-terminal es troben a la cara citoplasmàtica [137], on la palmitolització d'alguns dels seus residus sembla ser clau per a la unió d'alguns receptors, com en el cas de la família d'SRC que s'uneix a l'extrem N-terminal.

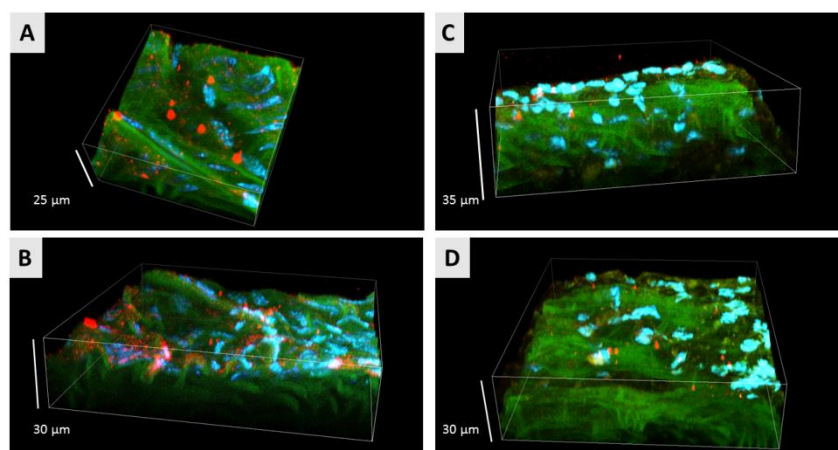
Estructuralment s'han descrit dos tipus de caveoles, en funció de la seva profunditat, i es creu que les caveolines juguen un paper important a l'hora d'estructurar-les, i molt probablement es deu a la capacitat d'aquestes proteïnes d'unir colesterol i esfingolípids. De fet, hi ha estudis que descriuen l'estret equilibri entre l'expressió de les diverses caveolines i les seves isoformes amb la major o menor abundància de colesterol a l'entorn [135 i 136].

Des del punt de vista estructural, també destaca la presència d'un altra proteïna, la Flotilina, en forma de Flotilina-1 i Flotilina-2, que té la capacitat de formar complexos amb la caveolina i que es descriu com a clau en l'estructuració de les caveoles [139].

### 3.3.2 Lipid raft

Tot i que ja s'han introduït més enrere, cal fer una ullada en més profunditat a l'estructura i les característiques d'aquestes microestructures de membrana.

Les estructures membranoses resistents a detergent es troben força distribuïdes en diferents tipus cel·lulars. L'estudi en profunditat va demostrar que no totes presentaven unides alguna de les caveolines descrites anteriorment.



**Il·lustració 18 – Lipid raft en 3D.** L'evolució tecnològica ha portat a poder observar els microdominis de membrana amb microscòpia làser confocal. En aquest article [140] del 2014, hi observem en vermell la caveolina, en blau el nucli i en verd les fibres d'elastina.



Aquestes estructures van ser descrites per primer cop l'any 1997 [141] com a *lipid raft*, o vesícules lipídiques, partint de l'aproximació experimental de la seva copurificació amb les caveoles, però amb una mida lleugerament més petita, entre 13 i 26 nm, i sempre inferiors a 70 nm.

Tot i mantenir l'estructura a "fase líquida ordenada" descrita anteriorment, la diferència principal rau en que en aquest cas, la membrana es manté plana i desapareix la invaginació mostrada per les caveoles i provocada per la presència de caveolines.

Tal i com hem comentat abans, els primers anys d'investigació d'aquesta estructura lipídica no van ser fàcils i hi havia força controvèrsia. Però a banda dels estudis comentats anteriorment per concretar els detalls del protocol, l'aplicació de tècniques biofísiques o de microscòpia van aportar molta llum en aquest tema [133 i 140] i van acabar d'aportar solidesa a la idea que aquestes estructures existien a les cèl·lules.

Derivat d'aquests estudis, a banda de conèixer mica en mica la dinàmica molecular d'aquestes estructures, s'hi ha pogut identificar les flotilines com a proteïna estructural principal.

A partir d'aquest punt, tota l'estructuració de la membrana pren més sentit encara, i s'estudien amb més detall les proteïnes presents a la mateixa membrana o que de manera tangencial es copurifiquen amb els *lipid raft*.

### **3.4 Els microdominis de membrana i les proteïnes associades**

A banda de la presència ja esmentada de les diverses formes de caveolina i Flotilina en els microdominis, també destaca la presència de proteïnes ancorades de glicofosfatidilinositols, però aquestes no són ni molt menys iguals a tots els microdominis i porten a pensar en una possible especialització de cada *raft* [143].

Un gran nombre de proteïnes ancorades als *raft*, són receptors o proteïnes relacionades amb la transducció de senyal, corresponent en gran part a la família de les proteïnes G, com Ras o Src i receptors associats del tipus tirosina quinasa [144].

La Taula 6 mostra un resum de les proteïnes presents tant en les caveoles com en els *lipid raft*. Tot i el bon nombre de proteïnes que s'hi detallen, la presència proteica global als *raft* és molt baixa, i d'aquí un dels motius principals de la seva baixa densitat, com ja s'ha descrit abans.

Però si s'analitza la llista de la taula, veiem com moltes d'elles són desencadenants de cascades de resposta cel·lular, ja siguin proteïnes senyalitzadores o receptors de senyal extracel·lulars.

Les funcions de totes aquestes proteïnes es poden veure afectades pel seu tipus d'ancoratge a la membrana. En un article de l'any 2013 [126] *Sonnino* i *Prinetti* ho agrupaven així:

L'associació d'una proteïna a la fase líquida ordenada, que mostra una reducció de la fluïdesa respecte el seu entorn, pot reduir la seva mobilitat lateral, afavorint així interaccions més estables amb altres proteïnes del mateix domini. Per exemple: l'associació amb els *lipid raft* permet un mecanisme de "co-clustering" de diferents proteïnes de membrana.

Fins i tot en alguns casos, tots els membres que pertanyen a una mateixa via de senyalització es troben ancorats als *lipid raft*, quan no estan activades. O en altres casos, l'activació dels receptors de membrana provoca el reclutament a *lipid raft* dels mateixos receptors o de les proteïnes de resposta.

També es pot donar el cas que diverses poblacions de *lipid raft* s'agreguin en resposta a un estímul determinat, optimitzant la interacció de diversos conjunts de proteïna que es trobaven físicament separades originalment.

Anteriorment esgríem un argument, però, que contrasta amb aquesta darrera afirmació de l'article de *Sonnino* i *Prinetti*, ja que la densitat de proteïnes als *lipid raft* és baixa. Però per altra banda la "captura" d'aquestes proteïnes en els *lipid raft* també pot prevenir d'interactuar amb proteïnes de la resta de la membrana, que en alguns casos suposa la inhibició d'alguns processos biològics.

<b>Lipid raft</b>	<b>Caveoles</b>
<b>Components Lipídics</b>	
Colesterol	Colesterol
Esfingomielina	Esfingomielina
Glicoesfingolípids	Glicoesfingolípids
Fosfatidilinositol	Fosfatidilinositol
Gangliòsid GM1	Gangliòsid GM1
Gangliòsid GM3	
<b>Proteïnes estructurals</b>	
Flotilina-1 i 2	Flotilina-1 i 2 Caveolina 1, 2 i 3
<b>Proteïnes de senyalització</b>	
H-Ras	H-Ras
G <sub>i</sub> , G <sub>o</sub> , G <sub>β</sub>	G <sub>q</sub>
Quinasa Src	Quinasa Src
Quinasa Syk	eNOS
Grb2, Erk2 Shc	PIP3 quinasa Fosfolipasa C
<b>Receptors</b>	
PDGF	PDGF
EGF	EGF
IGF-1	IGF-1
TrkA, TrkB	TrkA, CD36
<b>Proteïnes GPI ancorades</b>	
CD59 (per ex.)	uPAR

**Taula 6 – Recull components presents als microdominis lipídics tant en caveoles com en lipid raft.** Taula adaptada de l'article "*Lipid rafts and Caveolae in Signaling by Growth Factor Receptors*", de Laurentiis et al. [123].



Tornant a l'article, [126] afegixen dos punts més a la classificació:

L'associació d'una proteïna a una zona rígida de la membrana pot induir canvis conformacionals a la cadena peptídica que poden afectar a la seva activitat funcional a part de dificultar les interaccions laterals amb els altres components dels *raft*.

Les proteïnes que es troben concentrades als *lipid raft* tenen una interacció més favorable amb els components dels *lipid raft*. Els glicoesfingolípidis de l'estructura dels *raft* són grans candidats a la unió lípid-proteïna gràcies als seus complexos d'oligosacàrids.

A banda de la unió dels glicoesfingolípidis als *lipid raft*, s'ha descrit també la seva capacitat de modular l'activitat dels receptors tirosina quinasa, tot i que en molts casos no se'n té el mecanisme clar.

El mateix article ens proposa també tres possibles interaccions entre els glicoesfingolípidis de la membrana i les proteïnes:

- a) A través dels aminoàcids presents en els *loops* extracel·lulars de la proteïna si la conformació de la cadena polipeptídica permet que aquests residus siguin prou a prop de la superfície de la membrana.
- b) A través dels residus de sucre en els glicans d'una proteïna glicosilada, si la dinàmica de la cadena d'oligosacàrid de proteïnes permet l'orientació adequada cap a la superfície de la cèl·lula.
- c) A través de la part hidròfila de l'ancoratge en el cas de les proteïnes GPI; aquesta part és, per definició situada a prop de la superfície extracel·lular de la membrana.

### **3.5 Els receptors dels factors de creixement i els *lipid raft***

L'estudi del paper dels *lipid raft* i de les caveoles s'ha dut a terme de manera força àmplia, però sobretot s'ha aprofundit en el paper del receptor del factor de creixement epidèrmic, a partir d'aquí EGFR.

#### **3.5.1 El receptor d'EGF**

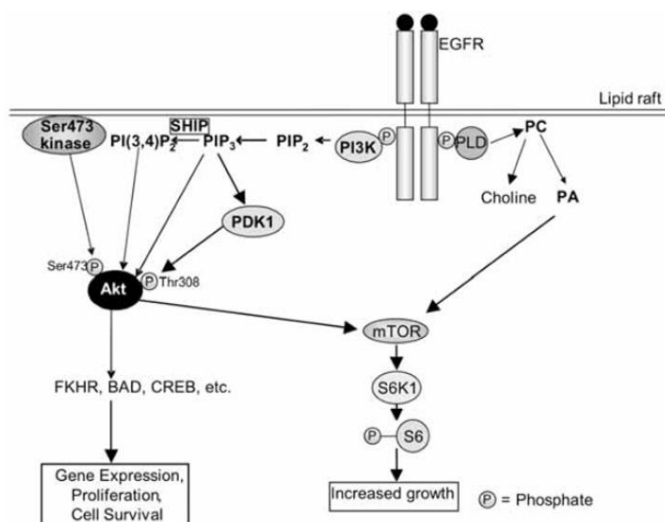
El receptor de factor de creixement epidèrmic (en anglès EGFR) s'ha descrit com un mediador important de l'oncogènesi de les cèl·lules del càncer, de la proliferació, del creixement i de la supervivència cel·lular.

Aquest receptor s'expressa en totes les cèl·lules de l'epidermis i de l'estroma, així com algunes cèl·lules glials i de múscul llis, i té diversos lligands, inclòs el propi EGF, el

factor de creixement transformant TGF- $\alpha$ , i l'EGF que uneix heparina (HB-EGF). Aquest receptor també es pot transactivar per la unió de lligands a certs receptors acoblats a proteïna G, com ara el receptor de l'angiotensina II [143 i 144].

EGFR té tres homòlegs coneguts: ErbB2 (Neu o HER2), ErbB3 (HER3) i ErbB4 (HER4), amb la qual pot formar heterodímers [147]. La unió del lligand provoca la homodimerització o la heterodimerització del receptor i n'activa la seva activitat tirosina quinasa, que li permet autofosforilar-se o fosforilar altres proteïnes *downstream*.

EGFR es compon d'un nombre de dominis extracel·lulars que formen el lloc d'unió al lligand, presenta també un domini transmembrana i juxtamembrana, seguit per un domini quinasa intracel·lular i el domini C-terminal. Presenta cinc motius d'autofosforilació al domini C-terminal, proporcionant llocs d'ancoratge per a proteïnes que contenen SH2 (homologia a la regió 2 de Src) o per la unió amb altres proteïnes adaptadores com Grb2.



**Il·lustració 19 – Via de senyalització per EGFR en lipid raft.** Exemple d'una de les vies de senyalització presents als *Lipid raft*. "Lipid rafts and Caveolae in Signaling by Growth Factor Receptors" [123].

El domini C-terminal també pot actuar de forma autoinhibidora quan es troba substrats no fosforilats, i també s'hi han descrit nou llocs de fosforilació que determinaran quina via s'activarà *downstream*, com per exemple la via de les MAPK o la de la fosfolipasa C i D i PI3K, entre d'altres [146 i 147].

### 3.5.2 Paper dels lipid raft i caveoles en senyalització per EGFR

A l'article "Lipid rafts and Caveolae in Signaling by Growth Factor Receptors" d'Arcaro et al. [123], del qual s'ha extret bona part de la informació d'aquest punt de la introducció, els autors posen de manifest la gran discrepància que es troba en la literatura a l'hora d'explicar d'una manera clara la implicació dels *lipid raft* i les caveoles en la senyalització pel receptor d'EGF, basant-se sobretot en els mètodes que s'utilitzen per tal de purificar-los.

Les purificacions sense detergent, basades en la flotació de les membranes de baixa densitat, van mostrar una presència d'H-Ras, Grb2 i SOS-1 tant en les mostres tractades amb EGF com les control, i Raf-1 s'hi trobava present també després de l'estimulació.

Al revés, EGFR era present en la fracció de caveolina en les cèl·lules no estimulades, però els seus nivells començaven a disminuir després de 30 segons de l'estimulació per EGF, i després de 60 minuts d'estimulació que ja no era detectable en aquesta fracció. Amb aquests resultats, es va proposar que, un cop produïda la dimerització del receptor i amb la via activada, EGFR es desplaçava fora de les caveoles per aturar-ne l'activació.

Mineo et al. [81] van obtenir resultats similars per a EGFR, cosa que demostra que abans de l'activació, 60 % d'EGFR estaven presents en la fracció de caveolina de fibroblasts humans, però hi va haver una disminució dramàtica en el nombre després de l'aplicació EGF.

Diversos autors han reproduït i ampliat els resultats, mostrant, per exemple, que EGFR sembla seguir actiu lluny de les caveoles. La depleció de colesterol a les cèl·lules va provocar la sortida d'EGFR i caveolina-1 de les caveoles, allunyant-ne la PLC $\gamma$  que fins llavors havia colocalitzat amb EGFR, però tot així semblava que seguia essent capaç d'activar PLC $\gamma$ .

Per contra, diverses línies d'investigació qüestionen la idea que les caveoles són bones zones per a la senyalització via EGFR, no en va en suggereixen fins i tot que les caveoles podrien tenir un paper regulador negatiu. Concretament, sembla ser que l'scaffold de caveolina-1 estabilitza EGFR quinasa en una conformació inactiva [83], i la mateixa regulació negativa també existeix en el cas de l'activitat de la tirosina quinasa d'ErbB2 [84, 85].

En el primer cas, Couet et al. [150] van demostrar el cofraccionament d'EGFR, ErbB2 i la seva estreta relació, amb caveolina, justificant l'existència de dominis d'unió a caveolina-1 en l'estructura d'EGFR.

Entre altres evidències es va veure que una sobreexpressió de la caveolina-1 també va provocar la inhibició de l'activitat quinasa d'EGFR, també va inhibir l'activitat de Raf-1, MEK-1 i ERK2. Així mateix, la sobreexpressió de GM3 provoca una major interacció entre la proteïna i l'EGFR disminuint-ne encara més l'activitat.

### 3.6 Els dominis lipídics al sistema nerviós: una funció essencial per als esfingolípidis

En general, "*A Treatise on the Chemical Constitution of the Brain*" [151], publicat per J. L.W. Thudichum el 1884, document amb el qual es va elucidar l'estructura de l'esfingosina i dels lípids cerebrals basats en esfingosina, és considerat com una fita que marca el naixement de la neuroquímica moderna.

El cervell és l'òrgan amb el contingut de lípids més alt en el cos humà (excloent el teixit adipós). Això provoca que les cèl·lules del cervell absorbeixin àvidament els àcids grassos essencials a través de la barrera hematoencefàlica per satisfer les seves necessitats per a la síntesi de complexos glicolípidics [152].

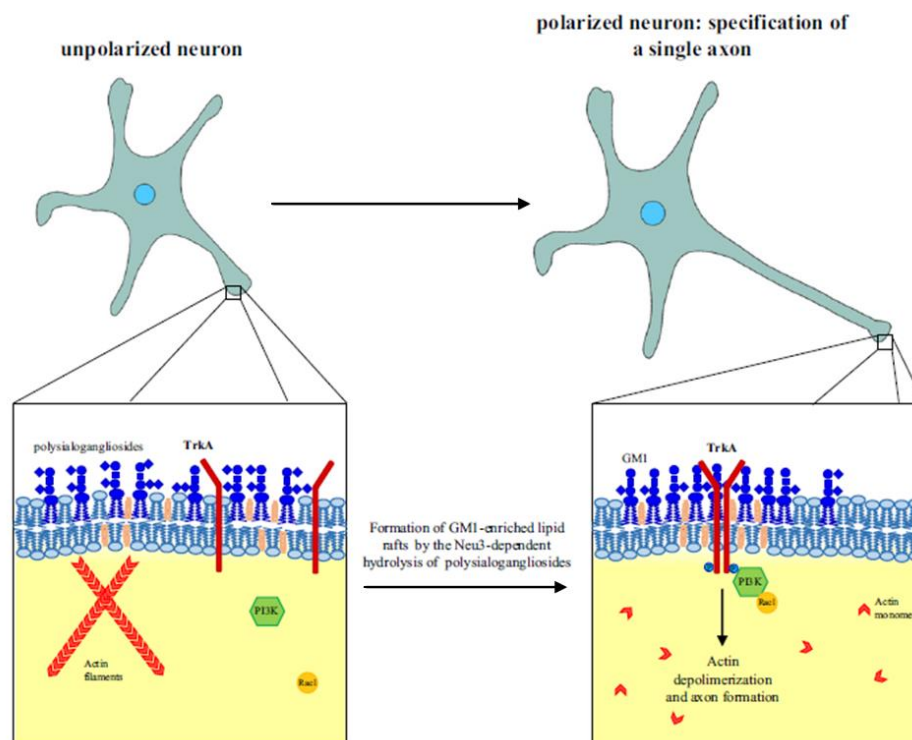
Les membranes plasmàtiques de les cèl·lules neuronals estan altament enriquides en colesterol, en els esfingolípidis i en alguns glicoesfingolípidis. Aquests últims es caracteritzen per l'alt nivell de complexitat estructural, a causa de l'alta complexitat dels seus grups de cap hidròfils i de la gran heterogeneïtat en la cua hidrofòbica donant origen a un nombre increïble d'espècies moleculars diferents.

Les diverses composicions d'aquests lípids semblen establir patrons fins i tot en funció de l'envelliment fisiològic. En particular, el contingut de glicoesfingolípidis total i la complexitat de l'espècie molecular en el cervell humà incrementen marcadament des de les etapes embrionàries a la vida postnatal [153].

Com a exemple d'aquests canvis amb la composició lipídica podem destacar el que s'observa en ratolí on la síntesi de galactolípidis, normalment enriquits en la mielina central i perifèrica, que està absent durant les etapes embrionàries del cervell de ratolí, s'activa quan els oligodendròcits entren en la diferenciació terminal, i s'ha vist que està molt activa durant l'extensió de les beines de mielina [154].

Com a regla general, la matèria grisa del cervell i les neurones són altament enriquides en els gangliòsids (glicoesfingolípidis que contenen àcid siàlic [81]) i es caracteritzen per la molt alta complexitat i l'heterogeneïtat de les espècies moleculars de gangliòsids [82].

La mielina i oligodendròcits estan enriquits en galactolípidis, més concretament en sulfat de galactosilceramida, i amb esfingomielina [83,84], mentre que els astròcits es caracteritzen per un contingut d'esfingolípidis inferior i per la presència d'espècies de glicolípidis simples.

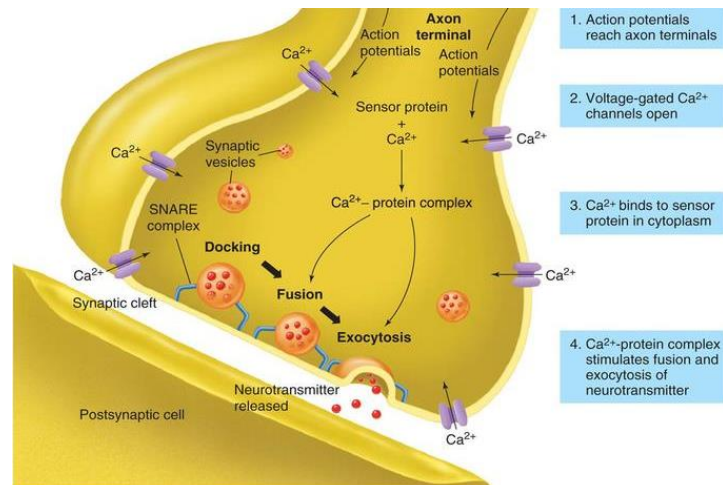


**II·lustració 20 – Polarització de les neurones.** Model esquemàtic de l'especialització de les neurones per a axons GM1 / TrkA-dependents. L'augment de l'activitat de l'enzim NEU3, una gangliosidasi, i el consegüent augment de la concentració de GM1 en un domini concret de la membrana que provoca el reclutament i l'activació del receptor tirosina quinasa per NGF. L'activació provoca també el reclutament dels seus efectors *downstream* PI3K i Rac1. Això provoca una despolimerització de l'actina i un augment de NEU3 provocant així l'inici de la polarització i el creixement de l'axó [155].

Un altre exemple de l'especificitat dels lípids a la membrana del cervell el tenim amb la polarització de les neurones de la II·lustració 20, amb la hidrolització dels polisialoganglòsids obtenint GM1, que provoca el canvi conformacional de la membrana, apareixent zones d'alta concertació de colesterol, permetent l'agrupament dels receptors TrkA i activant les vies *downstream* que permeten la polarització de les cèl·lules neuronals.

### 3.7 El lipid raft i el seu paper en l'exocitosi neuronal

El trànsit vesicular és essencial per a una varietat de processos en les cèl·lules eucariotes, incloent el manteniment dels diferents compartiments subcel·lulars, proteïnes i hormones, la secreció, la fertilització de l'òvul, i l'alliberament de neurotransmissors.



**Il·lustració 21 – Esquema de l'exocitosi a nivell neuronal.** Als passos 1-4 es resumeix com els potencials d'acció estimulen l'exocitosi de vesícules sinàptiques. Els potencials d'acció obren els canals oberts pel  $\text{Ca}^{2+}$ , les vesícules es van acostant a la membrana plasmàtica i s'uneixen al complex de proteïnes SNARE; els sensors de  $\text{Ca}^{2+}$  alteren el complex SNARE per permetre la fusió completa de les vesícules sinàptiques amb la membrana plasmàtica. El lligant (químicament) es troba entre els canals tancats de les dendrites i el cos de la cèl·lula. Això permet que aquestes regions responguin als neurotransmissors químics. La despolarització produïda per aquests canals s'ha d'estendre a l'axó. L'axó és on es produeixen els primers potencials d'acció. Després d'estímul de despolarització es provoca l'obertura dels canals dependents de voltatge i els potencials d'acció es poden transferir sense disminució al llarg de l'axó. Adaptada des d'*humanphysiology2011* amb el © The McGraw-Hill.

#### 3.7.1 Procés d'exocitosi

El procés d'exocitosi a nivell cel·lular es pot dur a terme de dues maneres diferents:

- 1) **Ruta constitutiva** o per defecte. Es troba a totes les cèl·lules, ja siguin especialitzades en secreció o no, i és necessària per a la comunicació i manteniment de la cèl·lula. Aquest transport és continu i no regulat, no necessita senyals externs per dur a terme. En aquesta via s'engloben tant els processos que van cap a la matriu extracel·lular com aquells que van a parar d'uns orgànuls a uns altres. La importància d'aquesta ruta és que aporta a la membrana plasmàtica proteïnes i lípids nous, que s'acaben de sintetitzar, i així manté l'equilibri de la membrana i evita que perdi volum a causa de la constant endocitosi. Alguns exemples d'aquesta secreció constitutiva són l'alliberament de col·lagen que fabriquen els fibroblasts o d'anticossos per part dels limfòcits B activats.

2) **Ruta de secreció regulada.** A diferència de la constitutiva, no la trobem a totes les cèl·lules, ja que és més freqüent en aquelles cèl·lules especialitzades en secreció de productes com hormones, neurotransmissors en el cas de les neurones, enzims, etc. Aquesta via rep el nom de regulada, ja que les vesícules formades en el l'aparell de Golgi viatgen fins a la membrana plasmàtica però sense fusionar-se, és a dir, es queden molt a prop, fins que reben una senyal o estímul que definitivament les fa fusionar amb la membrana plasmàtica i abocar a l'exterior el seu contingut.

Alguns exemples d'aquesta secreció regulada són l'alliberament d'insulina a la sang en cèl·lules- $\beta$  del pàncrees, quan els nivells de glucosa en sang són elevats; o l'alliberament de neurotransmissors.

L'exocitosi a nivell neuronal implica les vesícules sinàptiques, que contenen els neurotransmissors, i que són alliberats en un procés regulat també per calci. Aquest procés requereix la presència dels canals de calci i de les vesícules al que es coneix com a zona presinàptica. Perquè aquest procés funcioni correctament es requereix la presència d'un complex multiproteic conegut com a SNARE [156].

### **3.7.2 Complex SNARE**

Les proteïnes SNARE (de l'anglès "SNAP - Soluble NSF Attachment Protein REceptor") són una gran família de proteïnes que es subdivideix en més de 60 tipus i són presents en llevats i mamífers.

La funció principal de les proteïnes SNARE és intervenir en la fusió de vesícules, és a dir, en el cas de l'exocitosi en la fusió de les vesícules de transport amb la membrana plasmàtica o, en un altre cas, en la fusió de la vesícula de transport amb un compartiment de destinació, per exemple un lisosoma.

Les proteïnes SNARE es poden dividir en dos subgrups, en funció de si són proteïnes de vesícula (v-SNARE) [157] que s'incorporen a les membranes de les vesícules de transport durant el procés de gemmació, o com a proteïnes objectiu (t-SNARE) [158], que es troben en les membranes dels compartiments de destinació de les vesícules de transport.

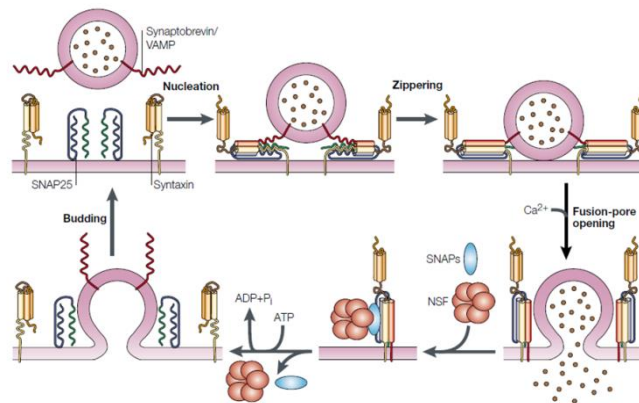
Les proteïnes SNARE més estudiades són aquelles que controlen l'acoblament de les vesícules sinàptiques amb la membrana presinàptica. Aquestes SNARE són l'objectiu de les neurotoxines que secreten els bacteris responsables del botulisme i del tètanus [159].

Les SNARE són molècules petites i abundants. Principalment les trobem unides a la membrana plasmàtica mitjançant proteïnes d'unió. Tot i que la seva estructura i mida és força variable, totes comparteixen un segment en el seu domini citosòlic anomenat "SNARE motif" que consta d'uns 60-70 aminoàcids capaços de formar un muntatge reversible estret, creant paquets de quatre hèlix anomenats complexos trans SNARE.

Els complexos metaestables trans-SNARE es formen de manera ràpida i es componen per la unió de tres proteïnes SNARE:

- Sintaxina-1 i SNAP-25, residents a la membrana cel·lular,
- Sinaptobrevina (també coneguda com a proteïna de membrana associada a vesícules o VAMP) ancorada a la membrana vesicular.

En l'exocitosi neuronal, Sintaxina-1 i Sinaptobrevina estan ancorades a les respectives membranes pel seu domini C-terminal, mentre que la SNAP-25 està unida a la membrana plasmàtica mitjançant diverses cadenes de cisteïna palmitolades.



**Il·lustració 22 – Cicle d'assemblatge i desassemblatge del complex SNARE en l'exocitosi de vesícules sinàptiques.** Sintaxina-1 existeix en una conformació tancada que necessita obrir-se per iniciar la nucleació. El *Zippering* del feix de les quatre hèlixs alfa cap a l'extrem carboxil acosta les membranes de la vesícula sinàptica i la plasmàtica una cap a l'altra, el que podria conduir a la fusió de membranes. Després de la fusió, la proteïna N-etilmaleimida sensible a la fusió (NSF) i les proteïnes d'unió NSF-solubles (SNAP) es desmunten els complexos cis-nucli que romanen en la mateixa membrana per reciclar-los per a una altra ronda de fusió. SNAP-25, proteïna synaptosomal associada de 25 kDa; SNARE, receptor de SNAP. Figura adaptada de l'article "Snares and Munc18 in synaptic vesicle fusion" de Rizo i Südhof [160].

El nucli del complex SNARE és un conjunt de quatre hèlix  $\alpha$  aportades per les diferents proteïnes que el formen: tant Sintaxina-1 com Sinaptobrevina aporten una hèlix cadascuna i la SNAP-25 n'aporta dues.

S'ha demostrat que les SNARE residents a la membrana plasmàtica es troben en diferents microdominis o agrupacions, la integritat dels quals és essencial per a la competència exocítica de la cèl·lula [157].

Molts altres factors que interactuen amb SNAREs s'han caracteritzat, i en conjunt mostra dues característiques principals: poden ser molècules reclutades per altres *pool* proteics presents i lliures a les membranes, o formen part d'altres clústers necessaris per a la fusió de membranes [161].



### 3.7.3 La família de Sintaxina

Les sintaxines, tal i com s'ha descrit abans, són una família de proteïnes exclusives del sistema nerviós implicades en l'exocitosi de vesícules sinàptiques, on hi juguen un paper important, mediant en l'ancoratge de les vesícules sinàptiques a la cara interna de la membrana presinàptica.

Estructuralment presenten un domini C-terminal transmembrana, el domini H3 formant part del complex SNARE i una cua N-terminal reguladora. Una de les característiques principals que tenen és que una de les seves hèlix  $\alpha$  forma part del complex SNARE [160].

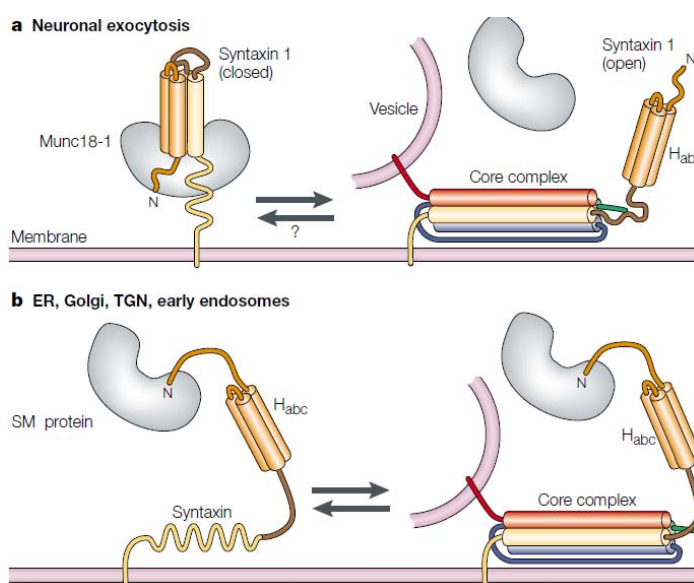
Sintaxina-1 interacciona amb sinaptotagmina de manera calci-dependent i també ho fa amb els canals de calci i potassi a través del seu domini C-terminal. Aquesta interacció directa amb els canals és un mecanisme molecular adequat per

aproximar el mecanisme de fusió de membranes amb els canals de calci durant la despolarització dels botons axonals presinàptics, on hi juga un paper clau.

En el cas de Sintaxina-1 que té un paper rellevant en aquesta tesi, se li han descrit més d'una dotzena de

proteïnes que s'hi uneixen específicament, suggerint així un paper important en la interacció proteïna-proteïna [162].

Pel que fa a l'estricta regulació del procés, s'ha descrit que la família de les proteïnes Munc18 s'uneixen a les sintaxines i en regulen negativament la seva activitat [163]. En el cas de Sintaxina-1 s'hi uneix per dos llocs diferents donant lloc a la conformació tancada: al domini N-terminal i al central amb la part reguladora inclosa. Quan Munc s'allibera de la regió central, Sintaxina-1 passa a ser activa.



**Il·lustració 23 – Diferents maneres d'acoblament entre Sintaxina-1 i proteïnes SM (Sec1/Munc18).** a) En l'exocitosi neuronal, la interacció entre Munc18-1 (gris) i la conformació tancada de Sintaxina-1 (groc i taronja) és incompatible amb la formació del complex entre els motius SNARE (receptor SNAP), la sinaptobrevina i SNAP-25 b) La interacció dels motius peptídics Sintaxina-1 amino-terminal amb homòlegs Sec1/Munc18 (proteïnes SM) que es produeixen en el reticle endoplasmàtic (ER), l'aparell de Golgi, la xarxa trans-Golgi (TGN) i els endosomes primerencs és totalment compatible amb la formació dels complexos. Figura adaptada de l'article "Snares and Munc18 in synaptic vesicle fusion" de Rizo i Südhof [160].

Aquest procés de regulació que impedeix la formació del complex SNARE, tal i com s'observa a la Il·lustració 23, és un element de control exclusiu de l'exocitosi neuronal, ja que en els processos que es produeixen a l'aparell de Golgi o al reticle endoplasmàtic el procediment és al revés, i Munc18 és necessària per a la formació del complex.

De fet, hi ha autors que proposen que la desregulació d'aquesta unió Munc18/Sintaxina-1 es relaciona amb patologies neuronals com ara l'esquizofrènia [164], on s'ha vist una alteració de la relació estequiomètrica en algunes regions del teixit del cervell. Aquesta aproximació, però, no és compartida per tots els autors del camp.

Altres autors han posat de relleu el paper de la fosforilació de la Thr<sup>14</sup> d'un altre membre de la família de les sintaxines, Sintaxina-3, com a clau a l'hora de regular l'exocitosi en mastòcits [165].

El paper clau que desenvolupa Sintaxina-1 en el procés de l'exocitosi neuronal fa que l'estudi sobre les seves característiques bioquímiques i implicacions fisiològiques siguin un camp d'estudi important. En aquesta tesi també hi hem dedicat esforços per aportar coneixement nou en aquest camp.

Després d'introduir els elements necessaris per entendre el context del nostre treball experimental, plantegem els objectius i passem a veure fins on hem aconseguit arribar.



# ***OBJECTIUS***

---



La proteïna quinasa CK2 s'expressa de manera ubiqua i és present en molts dels processos que tenen lloc a la cèl·lula i l'alteració de la seva activitat hi produeix efectes evidents, ja observats en el nostre grup d'investigació.

La primera part d'aquesta treball neix de l'herència deixada pel Dr. Franc Llorens i la seva tesi doctoral "Caracterització funcional de la interacció i fosforilació de la subunitat  $\beta$  del factor d'inici de la síntesi proteica eIF2 per la proteïna quinasa CK2" (Ref. Teseo 381735). Derivat d'aquesta tesi i de noves aportacions a la bibliografia, els nostres objectius van ser:

- 1) Caracteritzar *in vivo* la fosforilació d'eIF2 $\beta$  per CK2.
- 2) Estudiar els efectes de la inhibició farmacològica de CK2 i l'alteració del seu patró d'expressió sobre la formació del *Multifactor Complex* i la síntesi de proteïnes.
- 3) Estudiar les interaccions entre eIF2 i eIF3 i la seva relació amb l'activitat de la proteïna quinasa CK2.

La segona part d'aquest treball mostra, de nou, l'àmplia varietat de substrats i funcions de CK2, que en aquest cas es situava en l'estudi de la seva presència en membranes. Els objectius d'aquesta segona part van ser:

- 1) Caracteritzar l'activitat de CK2 en membranes resistents a detergent i confirmar que es tracta d'estructures tipus *lipid raft*, en membranes sinaptosomals de rata i en cèl·lules de ronyó humà.
- 2) Estudiar el motiu fisiològic que justifiqui la presència de CK2 en aquests microdominis de membrana.



# ***MATERIALS I MÈTODES***

---





## 5.1 Cultius cel·lulars

### 5.1.1 Línies cel·lulars

Per dur a terme els experiments d'aquesta tesi s'han utilitzat dues línies cel·lulars diferents:

#### **HEK293T (CRL-11268™): BSL-2**

Variante d'una línia cel·lular humana HEK293 derivada de ronyó embrionari (*Human Embryonic Kidney 293 cells*), transformada amb el gen que codifica per l'antigen T gran del virus SV40. Aquesta línia és originària de cèl·lules embrionàries de ronyó humà. Es caracteritzen per presentar una morfologia epitelial i créixer de forma adherent.

Són d'ampli ús experimental, en ser unes línies de proliferació ràpida, amb una elevada facilitat de transfecció i expressió dels transgens. Aquesta elevada expressió del transgen ve donada per l'amplificació episomal d'aquells plàsmids transfectats que contenen l'origen de replicació del SV40.

#### **HK-2 (CRL-2190™): BSL-2**

Línia humana derivada de cèl·lules del túbul proximal (PTC) d'un ronyó sa d'un home adult. Aquesta línia ha estat immortalitzada mitjançant partícules virals portadores del vector sintètic pLXSN, que conté els gens E6/E7 del virus del papil·loma humà 16 (HPV-16). El vector té el gen de resistència a la Neomicina, fent que les cèl·lules tinguin resistència per l'antibiòtic G418.

La línia prové d'una sola cèl·lula originària, i es caracteritza per ser una línia de morfologia epitelial i que manté un creixement dependent d'ancoratge, la qual cosa impossibilita la seva expansió en metilcel·lulosa, agar tou o suspensió.

La línia manté característiques funcionals de l'epiteli tubular, com transportadors de glúcids sodi-dependents, resposta de l'adenilat ciclase dependent de l'hormona paratiroidea (PTH) però no l'antidiürètica (ADH). Poden generar també gluconeogènesis i emmagatzemar glicogen.

En tractar-se de cèl·lules amb un nivell de bioseguretat 2, tots els tractaments s'han dut a terme a la campana de flux laminar mantenint totes les mesures de seguretat pertinents durant la manipulació i també en l'eliminació de residus.

### 5.1.2 Manteniment de les línies cel·lulars

Les línies cel·lulars que s'han fet servir en aquesta tesi es mantenen en creixement en un flasc T75 fins que assoleixen 80-90 % de confluència, moment en el qual s'ha decidit que s'ha de fer el passatge a un nou flasc. El temps transcorregut entre passatges varia en funció de la velocitat de creixement de la línia i de la densitat de cèl·lules sembrades en el nou passatge.

És important remarcar el fet que cal conèixer en tot moment quants passatges presenten les línies del nostre cultiu, ja que a mesura que aquests augmenten, les línies cel·lulars van canviant les seves característiques.

Això és molt més rellevant en el cas de les línies silenciades de manera estable mitjançant shRNA, ja que s'ha demostrat que un alt nombre de passatges pot provocar la pèrdua del silenciament. Internament s'ha decidit que el número de passatges màxim per fer experiments significatius amb aquestes línies és de 15.

Medi	Composició	Línia cel·lular	Condicció
<b>DMEM complet</b>	DMEM (10 % FBS, 1 mM piruvat sòdic, 1 % (v/v) Glutamina, 1 % (v/v) Penicil·lina Estreptomicina)	HEK293T HK-2	Creixement i manteniment de línies salvatges
<b>DMEM + antibiòtics de selecció</b>	DMEM (10 % FBS, 1 mM piruvat sòdic, 1 % Glutamina, 1 % Penicil·lina Estreptomicina) + 1 µg/mL puromicina	HEK293T-CK2β HEK293T-CV	Creixement, manteniment i selecció de línies silenciades per CK2 i control

**Taula 7 – Medis i condicions de cultiu.** Recull de condicions, composicions de medis pel cultiu cel·lular de les línies cel·lulars estudiades a la tesi.

De manera rutinària, totes les línies cel·lulars que s'han fet servir creixen en medi DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) complet. Tot i això, en el cas de la línia silenciada per les subunitats beta de CK2, el medi presentarà un antibiòtic de selecció per assegurar que continua creixent en condicions de silenciament. A la Taula 7 hi ha els medis principals utilitzats en funció de la línia o tractament.

#### Materials i reactius

- DMEM complet
- Tripsina
- PBS 1x estèril Pipetes Pasteur
- Pipetes serològiques
- Flascos T75

#### Composició PBS 1X

- 137 mM NaCl,
- 2.7 mM KCl,
- 10 mM Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O,
- 1.8 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.4)

**Taula 8 – Formulació del tampó PBS.** Tampó d'ampli ús en tècniques de cultiu cel·lular

### Metodologia

Nota: El protocol descrit a continuació es basa en el manteniment del cultiu en flascs de 75cm<sup>2</sup>, tot i que el procés és molt similar a l'hora de plaquejar les cèl·lules per fer els tractaments, però amb volums de reactius al volum dels pous i plaques de cultiu.

1. S'aspira el medi i es renta el flasc amb 10 mL de PBS 1x estèril.
2. S'afegeixen 2 mL de tripsina i s'incuba el flasc a l'incubador de 37°C durant 2 minuts per ajudar a les cèl·lules a desenganxar-se.

Plaques i flascs	Rentats PBS	Tripsina	Medi resuspen.	Volum final medi
Plaques de 6 pous	2 mL	0,4 mL	1 mL	2 mL
Plaques de 35 mm Ø	2 mL	0,4 mL	1 mL	2 mL
Plaques de 60 mm Ø	6 mL	1 mL	2 mL	6 mL
Plaques de 90 mm Ø	10mL	1,5mL	3mL	
Flascs T25	5 mL	1 mL	2 mL	5 mL
Flascs T75	12 mL	3 mL	5 mL	15 mL

**Taula 9 – Volums de reactius de cultius.** Adaptació dels volums descrits en el protocol pels rentats, tripsinització, resuspensió i volum final de medi per les diferents plaques utilitzades.

3. Es poden fer cops suaus al lateral del flasc per acabar de desenganxar les cèl·lules. Per inactivar la tripsina s'afegeixen 8 mL de medi complet per tal d'inactivar la tripsina.
4. Es resuspenen les cèl·lules del flasc i s'afegeixen 2 mL de resuspensió cel·lular a un nou flasc. D'aquesta forma es sembla aproximadament 1/5 de les cèl·lules del cultiu original. Aquesta proporció és variable en funció de la densitat cel·lular necessària.
5. Al nou flasc s'afegeix medi complet fins a un volum final de 15 mL.
6. El flasc es manté en un incubador a 37°C, al 5 % CO<sub>2</sub> i en una atmosfera humida.

#### **5.1.3 Sincronització de cultius**

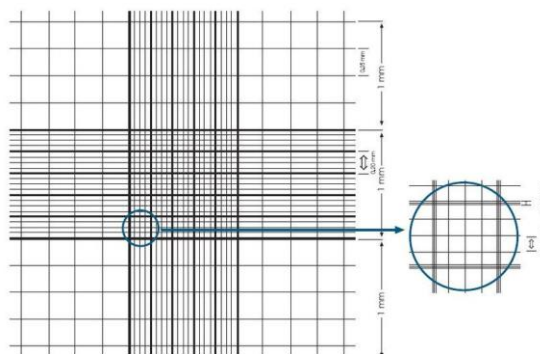
Alguns dels protocols utilitzats requerien sincronitzar el cicle de les cèl·lules, i habitualment es fa a G<sub>0</sub>. Això s'ha fet deprivant-les entre 18 i 24 hores, canviant el medi habitual per un que contenia DMEM completat amb 1 % L-Glutamina, 1 % Penicil·lina-estreptomicina, 1 % Piruvat Sòdic però amb només 0,5 % de FBS.

### 5.1.4 Recompte cel·lular

En gran part dels experiments d'aquesta tesi calia conèixer la concentració de cèl·lules inicial a l'hora de plaquejar les cèl·lules per l'experiment, per aconseguir un resultat el màxim de produïble possible. Per poder fer aquest recompte cel·lular s'han utilitzat dues tècniques, el recompte amb cambra de Neubauer i el comptador automàtic de cèl·lules *Cell Counter* [Bio-Rad].

#### Recompte amb cambra de Neubauer

Per aquesta tècnica s'ha utilitzat el que es coneix com a cambra de Neubauer, un portaobjectes que presenta dues zones deprimides al fons de les quals hi ha marcada una quadrícula de dimensions conegudes. Aquesta cambra es tapa amb un cobreobjectes que queda adherit per tensió superficial i s'afegeix la suspensió de cèl·lules, que per capilaritat s'incorporarà dins de la cambra. Les cèl·lules comptades a la cambra amb l'ajut d'un microscopi invertit ens permetran conèixer la concentració de cèl·lules de la solució original.



**Il·lustració 24 – Retícula de la cambra de Neubauer.** S'hi observen les diverses zones que es fan servir com a referència a l'hora de comptar el nombre de cèl·lules presents, amb la capacitat de ser extrapolable proporcionalment al cultiu de partida [166].

#### Materials i reactius

- *Tripan blue*
- Cambra de Neubauer
- Cobreobjectes
- PBS 1x estèril

#### Metodologia

1. S'agafa una petita al·lquota de la resuspensió cel·lular d'interès.
2. Es dilueixen 50 µL de la resuspensió en 150 µL PBS 1X i 50 µL de *Tripan blue* (colorant per cèl·lules mortes) en un tub eppendorff estèril i després d'un pols de centrifugar, es pipeteja la dissolució a la cambra de Neubauer
3. Es compten les cèl·lules que no han quedat tenyides amb blau de tripa en quatre camps diferents. A partir del nombre de cèl·lules comptades en els 4 camps i seguint la fórmula següent, es podrà conèixer la quantitat de cèl·lules que hi ha en resuspensió. Si es compten també les mortes es pot arribar a conèixer la relació de viables/mortes del cultiu.

$$N^{\circ} \text{ cèl/mL} = n^{\circ} \text{ cèl comptades} : 4 \text{ camps} \times 5 \text{ (dilució resuspensió)} \times 10^4 \text{ (factor dilució)}$$

### **Recompte amb comptador automàtic de cèl·lules cell counter**

Aquest mètode és més senzill, ja que fa ús d'un comptador automàtic cel·lular i no cal utilitzar ni la cambra de Neubauer ni el microscopi invertit.

Té l'avantatge que és ràpid i àgil, resultant útil en els casos en què es treballa amb múltiples línies de forma simultània i no poden estar massa temps en resuspensió.

Però té l'inconvenient que no pot detectar densitats inferiors a les 25.000 cèl·lules/mL ni superiors a 2.000.000 cèl·lules/mL, així com línies cel·lulars que tinguin una mida petita (< 25 µm diàmetre) i/o que es trobin agrupades.

#### Materials i reactius

- *Tripan blue*
- Cambra de recompte cel·lular automatitzada.
- Cell counter [Bio-Rad]

#### Metodologia

1. S'afegeixen 50 µL de resuspensió cel·lular en un tub eppendorf estèril i s'addicionen 50 µL de *Tripan blue*.
2. S'hi fa un pols de vòrtex a la mostra. Es carreguen 20 µL a una de les cavitats de recompte de la cambra de recompte cel·lular automatitzada.
3. Es col·loca la cambra de recompte dins del comptador cel·lular. L'aparell donarà el nombre de cèl·lules viables de la mostra.

### **5.1.5 Congelació i descongelació de línies cel·lulars**

#### **Congelació de línies cel·lulars**

Les línies cel·lulars eucariotes poden criopreservar-se en nitrogen líquid per a mantenir-ne un estoc per a posteriors usos. El protocol és el següent:

#### Materials i reactius

- DMSO pur
- Criotubs de 1,5 mL
- FBS (*Foetal Bovine Serum*)
- Contenidor especial de congelació

#### Metodologia

1. Es deixa créixer el cultiu cel·lular fins assolir la confluència i es resuspenen les cèl·lules en 1 mL de medi.
2. Es recompten les cèl·lules i se sembra a cada criotub  $0,5-1 \times 10^6$  cèl·lules totals.

3. Prèviament es dilueix el DMSO fred en FBS (dil 1:10). Enlloc de diluir-lo amb FBS es pot diluir també en DMEM complet, però la dilució en FBS permet una millor recuperació de les línies en el moment de descongelar-les.
4. S'afegeix a cada tub 1000 µL de medi de congelació.
5. Es protegeixen els criotubs dins d'un contenidor especial de congelació i es deixen a -80°C durant 48 hores.
6. Al cap de 2 dies, els criotubs es traspassen al contenidor de nitrogen líquid.

### **Descongelació de línies cel·lulars**

A diferència de la congelació de les línies, que ha de ser un procés lent per evitar la formació de cristalls de gel, la descongelació ha de ser ràpida, ja que el DMSO és tòxic per la cèl·lula.

#### Materials i reactius

- DMEM complet
- Flascos de cultius T25 o T75
- Falcons de 15 mL
- Bany a 37°C
- Centrifuga

#### Metodologia

1. Es treu el vial del rack de nitrogen líquid i es deixa temperar 2 minuts a temperatura ambient. S'acaba de descongelar el vial a un bany de 37 °C.
2. Quan ja estigui gairebé descongelat s'aboca el contingut del vial en un tub de centrifuga tipus "falcon" on hi ha 8 mL de DMEM complet prèviament temperat.
3. Se centrifuguen 5 min a 1000 rpm per rentar el pellet cel·lular i es retira el sobrenedant i es resuspèn de nou el pellet amb DMEM complet.
4. La nova resuspensió s'afegeix a un flasc T25 o T75 depenent de la densitat cel·lular del criovial i de la taxa de divisió de les cèl·lules.
5. Al dia següent es canvia el medi, eliminant així les cèl·lules mortes.
6. En el cas que la línia requereixi un antibiòtic de selecció (com les silenciades per les subunitats de CK2), aquest es podrà afegir en aquest punt, no abans.

### **5.1.6 Tractaments amb inhibidors de CK2**

En el capítol de resultats d'aquesta tesi també es mostren resultats obtinguts en treballar amb inhibidors de CK2 com TBB (4,5,6,7-tetrabromobenzotriazole), i DMAT (2-dimethylamino-4,5,6,7-tetrabromo-1H-benzimidazole).

Quan aquests tractaments s'han fet sobre cèl·lules en cultiu, l'administració de l'inhibidor es fa directament sobre el medi de cultiu ja que aquest és permeable a la membrana. La dilució *stock* de cada un dels inhibidors conté DMSO que no superarà mai la concertació de 0,5 % (v/v).

## 5.2 Obtenció de línies silenciades

L'obtenció de línies cel·lulars silenciades, tant de manera transitòria com estable, permet veure com afecta l'absència de la proteïna d'estudi en el nostre model.

En aquesta tesi s'ha aplicat tant la tècnica del silenciament transitori amb siRNA per les subunitats CK2 $\alpha$  i CK2 $\beta$ , com el silenciament estable només per CK2 $\beta$ . En aquest apartat es detallen els protocols.

### 5.2.1 Silenciament transitori amb siRNA

La tècnica del siRNA es basa en la interacció d'una molècula curta d'RNA de doble cadena d'entre 20 i 25 nucleòtids d'extrems asimètrics. Un cop dins la cèl·lula, les dues cadenes de l'RNA són enzimàticament separades i hibriden amb l'RNA missatger de la proteïna que es vol silenciar. L'estructura resultant és inestable i, en conseqüència, els mecanismes cel·lulars l'eliminaran.

Aquestes estructures es poden introduir a la cèl·lula de dues maneres: transfectant els fragments d'RNA com a petites estructures, o transfectant-los introduïts dins un vector d'expressió. En els nostres experiments s'ha optat per utilitzar el kit comercial siGENOME SMART*pool* de Dharmacon® que presenta un conjunt de 3 o 4 seqüències que per estudis *in silico* s'ha pronosticat que hibriden amb la proteïna d'estudi.

#### Materials i reactius

- siGENOME SMART*pool* de Dharmacon M-003475 per CK2 $\alpha$  i M-007679 CK2 $\beta$ .
- Reactiu de transfecció DharmaFECT 1 T-2001.
- Aigua RNase free.
- Medi complet amb i sense antibiòtics.



Materials i reactius

1. Es tripsinitzen les cèl·lules HEK293T plaquejades.
2. Es dissolen les cèl·lules en un medi complet per tal de plaquejar  $2.5 \times 10^5$  cèl·lules/mL per tal de transfectar-les amb DharmaFECT 1.
3. Es plaquegen 2 mL de la dissolució a cada pou de la placa de 6 pous, i s'incuben les cèl·lules *over night* a 37°C.
4. Es prepara una dissolució a 5  $\mu$ M siRNA en aigua RNAsa-free (per transfeccions de 25 nM i 50 nM de siRNA).

		Control	Scramble	CK2 $\alpha$ 1 25 nM	CK2 $\alpha$ 2 50 nM	CK2 $\beta$ 1 25 nM	CK2 $\beta$ 2 50 nM
TUB A	siRNA	0 $\mu$ L	10 $\mu$ L	10 $\mu$ L	10 $\mu$ L	10 $\mu$ L	10 $\mu$ L
	Medi complet lliure d'antibiòtics	200 $\mu$ L	190 $\mu$ L	190 $\mu$ L	190 $\mu$ L	190 $\mu$ L	190 $\mu$ L
TUB B	Dharmafect1	5 $\mu$ L	5 $\mu$ L	5 $\mu$ L	7,5 $\mu$ L	5 $\mu$ L	7,5 $\mu$ L
	Medi complet lliure d'antibiòtics	195 $\mu$ L	195 $\mu$ L	195 $\mu$ L	192,5 $\mu$ L	195 $\mu$ L	192,5 $\mu$ L
	Medi complet lliure d'antibiòtics	1600 $\mu$ L	1600 $\mu$ L	1600 $\mu$ L	1600 $\mu$ L	1600 $\mu$ L	1600 $\mu$ L

**Taula 10 – Relació de volums necessaris per a la transfecció dels siRNA per CK2 $\beta$ .** Volums de referència utilitzats per transfectar una placa de 6 pous. Per consultar la composició del medi complet es pot consultar la Taula 7.

5. En tubs separats, i tal i com indica la Taula 10, cal diluir la quantitat necessària de dissolució de 5  $\mu$ M de siRNA (en el Tub A) i el DharmaFECT 1 (en el tub B) amb medi lliure d'antibiòtics.
6. Es barreja el contingut de cada tub pipetejant amunt i avall i es deixa a temperatura ambient durant 5 minuts.
7. S'afegeix el contingut del tub A al tub B i es barreja de nou pipetejant amunt i avall. Es deixa incubant a temperatura ambient durant 20 minuts.
8. S'afegeix el volum necessari de medi complet sense antibiòtics per arribar al volum establert per la transfecció, segons indica Taula 10.
9. S'elimina el medi de cultiu de cada pou de la placa i s'hi afegeix el que correspon de les mesclades preparades i s'incuben les cèl·lules a 37°C i 5 % CO<sub>2</sub> durant 65 hores.

## 5.2.2 Línies cel·lulars silenciades de manera estable amb shRNA

### Vectors i shRNA (*short hairpin RNA*)

*Nota: Aquest protocol i la producció de les línies silenciades de manera estable són obra del Dr. Jordi Vilardell i forma part de la seva Tesi Doctoral DESREGULACIÓ DELS NIVELLS DE LES SUBUNITATS ALFA I BETA DE LA PROTEÏNA QUINASA CK2 EN EL CARCINOMA RENAL DE CÈL·LULES CLARES (CCRCC) (Referenciada al Teseo amb el número 1064787). Per coherència amb els resultats mostrats, creia oportú que el protocol hi fos present.*

Els siRNA (*small interfering RNA*) processats a partir dels shRNAs (*short hairpin RNA*) són un altre bon mecanisme per tal d'interferir de manera específica en determinats mRNA, provocant la supressió de la proteïna codificada pel gen d'interès.

En aquest segon cas de silenciament s'opta per uns shRNA comercials contra la subunitat CK2 $\beta$ , clonats d'un vector integratiu, empaquetat en partícules lentivirals, MISSION® *Lentiviral Transduction Particles*.

<b>Referència</b>	NM_001320.x-823s1c1
<b>Nº Clon</b>	TRCN0000003796
<b>Gen</b>	CSNK2B
<b>Plàsmid</b>	pLKO.1-puro (U6, cppt, hPGK, puroR, SIN/3' LTR, f1 ori, ampR, pUC ori, 5' LTR, Psi, RRE)
<b>Seqüència</b>	5'CGGTGGTTTCCCTCACATGC TCTTCTCGAGAAGAGCATGTG AGGGAAACCATTTTT-3'
<b>Diana</b>	CDS (unió a nucleòtids 823-844 de CSNK2B mRNA)

Inicialment la nostra idea era poder silenciar les dues subunitats de CK2, CK2 $\alpha$  i CK2 $\beta$ , però després de diversos intents, el silenciament de la subunitat

**Taula 11 – Característiques tècniques del shRNA contra CK2 $\beta$ .** Recull de les característiques del vector que s'ha utilitzat per silenciar la subunitat CK2 $\beta$  en la línia cel·lular HEK293T.

catalítica no ha estat possible a causa de l'alta mortalitat del model. Per tant, a partir d'aquí ens centrarem en el procés amb la subunitat reguladora CK2 $\beta$ . Els shRNA contra la subunitat de CK2 $\beta$  i el shRNA control estan clonats dins de dos tipus de vectors diferents: pLKO.1-puro vector i TRC2-pLKO-puro vector. Els dos vectors tenen capacitat integrativa, un promotor constituït per l'expressió del shRNA (*U6 promotor*) i un gen de resistència a la puromicina (*puroR*) per seleccionar les línies que l'expressen.

<b>Referència</b>	SHC202V
<b>Nº Clon</b>	nd
<b>Gen</b>	Non target
<b>Plàsmid</b>	TRC2-pLKO-puro (U6, cppt, hPGK, puroR, SIN/3' LTR, f1 ori, ampR, pUC ori, 5' LTR, Psi, RRE, WPRE)
<b>Seqüència</b>	Nd
<b>Diana</b>	Non target

Les característiques tècniques dels shRNA que s'han fet servir per silenciar la línia cel·lular HEK293T es troben a la Taula 11 i la Taula 12.

**Taula 12 – Característiques tècniques del vector de control per la transfecció del shRNA contra CK2 $\beta$ .** Recull de les característiques del vector que s'ha utilitzat per silenciar la subunitat CK2 $\beta$  en la línia cel·lular HEK293T.

Per tal d'obtenir la línia cel·lular estable que es trobi silenciada per CK2 $\beta$ , es va decidir fer servir les partícules lentivirals empaquetades de la casa comercial Sigma-Aldrich, MISSION® Lentiviral Transduction Particles, portadores d'un shRNA clonat dins d'un plàsmid integratiu, tal com es detalla al protocol comercial.

Aquestes partícules tenen l'avantatge que permeten una eficient transfecció en cèl·lules com HEK293T i també en línies més complicades de transfectar que també s'ha utilitzat en el nostre grup HK-2 i 786-O. Amb el protocol que hi ha a continuació es van obtenir, entre d'altres, les línies cel·lulars shRNA-CK2 $\beta$  i shRNA-CV que s'han utilitzat en aquesta tesi.

#### Materials i reactius

- Plaques multi pou de 6 pous
- Tripsina
- PBS 1X
- DMEM complet
- DMEM complet + 1  $\mu$ g/mL puromicina
- Polybrene (hexadimethrine bromide)

#### Metodologia

##### **Dia 1:**

- Es plaqueja la línia cel·lular HEK293T en medi complet les 24h prèvies a la transducció a la densitat desitjada. Cal preveure la sembra de tal forma que, en el moment de la transducció amb les partícules lentivirals, les cèl·lules no superin el 50-80 % de confluència, per ajudar a la futura selecció de les línies.
- De la mateixa forma, es sembra per a cada cas una placa control a la mateixa densitat cel·lular.

##### **Dia 2:**

- Es descongela l'estoc de partícules lentivirals lentament en gel i s'afegeixen 8  $\mu$ g/mL de Polybrene (*hexadimethrine bromide*) a cadascun dels pous de la placa per facilitar el procés de transducció.
- Per a cadascun dels pous, s'afegeix el volum necessari de suspensió de partícules lentivirals per tal de tenir la MOI (*Multiplicity of Infection*) desitjada. En el nostre cas es va usar una MOI de 2 per a cadascuna de les línies (2 partícules lentivirals/cèl·lula).
- Per calcular els volums de partícules a afegir es van usar les següents fórmules:

$$\begin{aligned} \text{Unitats transductants necessàries (TU)} &= (n^\circ \text{ cèl·lules per pou}) \times (\text{MOI desitjada}) \\ \text{Total partícules lentivirals a afegir} &= (\text{total de TU necessàries}) / (\text{TU/mL del vial}) \end{aligned}$$

- S'incuben les cèl·lules O/N a 37°C en un incubador preparat per aquesta finalitat.

**Dia 3:**

- Es renova el medi que conté les partícules lentivirals per medi complet prèviament temperat.

**Dia 4 i posteriors:**

Per tenir una transducció estable, cal seleccionar les cèl·lules que han integrat el vector al seu genoma. Per fer-ho es renova el medi amb medi complet amb 1 µg/mL de puomicina. La concentració de puomicina escollida per a la selecció depèn de la sensibilitat de la línia a l'antibiòtic, i es va determinar prèviament amb una corba de mort cel·lular per a cadascuna de les línies.

Cal canviar cada 2 o 3 dies el medi complet amb 1 µg/mL de puomicina, fins a tenir la línia seleccionada. La selecció dura entre 5 i 6 dies, i després cal fer un passatge a una placa nova per duplicat, amb i sense medi de selecció, per assegurar que sense l'antibiòtic hi ha un 100 % de mortalitat.

**5.3 Gradients de Sucrosa**

Els gradients de sucrosa ens permeten separar els diversos components de l'extracte cel·lular sense alterar-ne les seves interaccions, i només regit pel diferent coeficient de sedimentació. En el nostre cas els hem utilitzat per intentar dilucidar la diferent distribució de les subunitats d'eIFs i de CK2 en funció del tractament al que sotmetem les nostres cèl·lules.

Per formar aquests gradients, el tampó que hem utilitzat conté el que descriu la Taula 13 i es conserva a 4°C. Amb petites modificacions, és el tampó que utilitzaven en el seu article de l'any 2005 Miyamoto, Patel i Hershey JW, titulat "*Changes in ribosomal binding activity of eIF3 correlate with increased translation rates during activation of T lymphocytes*" [168].

En aquesta tesi s'han utilitzat tres tipus de gradients, discontinus, lineals i de flotació. Aquests últims quedaran descrits més endavant dins l'apartat dels treballs realitzats amb membranes. Ho trobarem al punt 5.7.2.

**Tampó de formació dels gradients**

- 50 mM HEPES pH7,9,
- 100 mM NaCl
- 10 mM Mg(OAc)<sub>2</sub>

**Taula 13 – Composició del Tampó de Gradients.** Detall de la composició del tampó dels gradients derivat del que es va utilitzar en l'article de Hershey (2005) [168].

### 5.3.1 Gradients discontinus

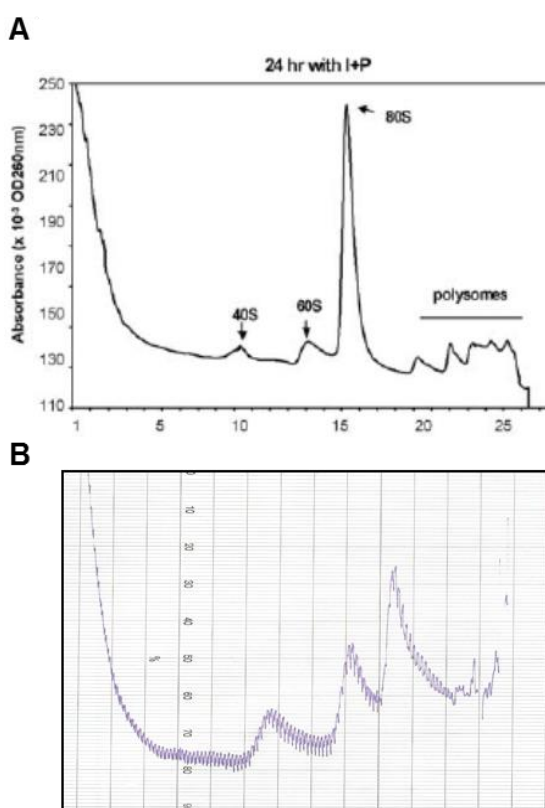
Aquest tipus de gradients els hem intentat optimitzar per separar i concentrar les fraccions que més ens interessin.

#### Materials i reactius

- Ultracentrífuga Beckman
- Bomba peristàltica Pharmacia LKB Pump P1
- Rotor basculant SW32 Ti
- Tampó de gradients (Taula 13)
- Tubs de centrífuga de poliestirè de 16,8 mL

#### Metodologia

1. Es preparen 5 solucions de concentració creixent de sucrosa 5:15:25:35:45 % dissoltes en Tampó de Gradients fred (Taula 13).
2. Es dipositen 3 mL de la solució al 45 % de sucrosa al fons del tub de centrifugar. A continuació, i amb l'ajuda de la bomba peristàltica Pharmacia LKB Pump P1 a una velocitat mai superior a 10, s'hi afegeixen 3 mL de 35 %, 25 %, 15 % i 5 %. És convenient que el gradient passi el màxim temps possible submergit en gel.
3. Un cop format el gradient, s'hi apliquen amb pipeta i molta cura els 800 µL d'extracte corresponent.
4. Es carreguen els tubs amb el gradient als *buckets* del rotor SW 32.1 Ti i es posa a centrifugar durant 15h a 100.000 g i 4°C.
5. Es fracciona el gradient recollint fraccions d'1 mL, de dalt a baix, assegurant així que les possibles interfases entre els diversos coixins queden pràcticament íntegres en una fracció. Caldrà conservar les fraccions en gel per seguir amb l'estudi.



**Il·lustració 25 – Exemple de perfil de 254 nm. A)** Figura adaptada de l'article de Hershey [168] on es mostren amb sagetes els pics més importants (40S, 60S i 80S) i la zona dels polisomes. **B)** Exemple de perfil a 254 nm cru obtingut després de fraccionar un dels gradients d'aquesta tesi. (Part de la Figura 12).

### 5.3.2 Gradients lineals

Aquesta és la tècnica original que figurava en l'article de Miyamoto, Patel i Hershey [168] (Il·lustració 25) a partir de la qual nosaltres hem posat a punt el nostre protocol. Amb aquest tipus de gradient volem estudiar d'una manera més fina i dinàmica el moviment de les diverses subunitats d'eIFs i de CK2, en funció del tractament a que sotmetem les cèl·lules.

Així mateix, acoblant un espectròmetre que ens mesuri l'absorbància a 254 nm podrem seguir l'evolució de la subunitat 40S, 60S i 80S del ribosoma, ja que aquesta longitud d'ona correspon al màxim d'absorbància de l'RNA ribosomal.

Les figures presents en l'article de Hershey [168] ens van servir de referència a l'hora d'entendre els patrons d'absorbància obtinguts, però nosaltres hi vam afegir un punt més per atribuir correctament els pics observats.

Es tracta del seguiment per *western blot* de la proteïna ribosomal RP-S6 present a la subunitat 40S del ribosoma i també a la 80S (Figura 3).

Originàriament, i en resultats publicats a la meua tesina, vam començar treballant amb gradients del 5 al 30 % de sucrosa, però per tots els resultats exposats a aquesta tesi, ho hem fet amb gradients del 5 % al 45 % de sucrosa, que resol la zona polisomal.

#### Material i reactius

- Formador de gradients Hoefer SG50
- Bomba peristàltica Pharmacia LKB Pump P1
- Fraccionador de gradients Haaekebuehler Autodensiflow II
- Ultracentrifuga Beckman
- Tubs de centrifuga de poliestirè de 16,8 mL
- Rotor basculant de Beckman Coulter® SW32 Ti
- Tampó de gradients (Taula 13)

#### Metodologia

1. Es preparen dues solucions de sucrosa, una al 5 % i l'altra al 45 % (p/v) en el tampó de gradients (Taula 13) fred.
2. Amb l'ajut d'un formador de gradients Hoefer SG50, un agitador magnètic que no superarà les 250 rpm i amb la bomba peristàltica Pharmacia LKB Pump P1, que tampoc hauria de superar la velocitat 40, es formen els gradients en tubs de 16.8 mL, preparats per anar al rotor basculant SW 32 Ti. El tub del gradient hauria d'estar el màxim temps possible en gel.

3. Es carreguen 800 µL de l'extracte corresponent a la part superior del gradient i es posa a centrifugar. El temps de centrifugació anirà en funció de la zona del gradient que ens interessi més. Si volem veure amb més detall la zona dels polisomes, la centrifugació serà més curta, entre 10 i 12 hores. En canvi, si ens interessa veure amb més detall la zona dels PICs, centrifugarem durant 16 hores per tal d'afavorir una bona separació a la part menys densa.

La velocitat de centrifugació no variarà i serà de 100.000 g i a una temperatura de 4°C.

4. Per fraccionar el gradient cal ajudar-se amb un fraccionador Haekebuchler Autodensiflow II al qual se li acobla una bomba peristàltica, que mai superarà la velocitat de 40. Per tal de seguir l'evolució del fraccionament i tenir controlada la posició de les diverses subunitats ribosomals, es segueix l'absorbància a 254 nm., el màxim d'absorbància del rRNA, ajudats per la Unitat de Control UV-1 de LKB Pharmacia.

Com que ens interessa obtenir-ne un registre gràfic, s'hi acobla el registrador REC101, també de LKB Pharmacia, que permetrà tenir una idea de com es mouen les subunitats ribosomals.

5. Se'n recullen 21 fraccions de 800 µL i es conserven en gel per seguir amb l'estudi.
6. Per assignar els pics de 254 nm obtinguts caldrà fer un *western blot* contra la proteïna ribosomal RPS6.

En alguns casos dels dos capítols d'aquesta tesi, per tal de concentrar la proteïna present en les fraccions dels gradients s'ha hagut de recórrer a la precipitació de les proteïnes, i s'ha fet amb àcid tricloroacètic i deoxicolat sòdic (punt 5.4.4 d'aquest capítol de materials i mètodes)

## 5.4 Tècniques de proteïnes

### 5.4.1 Obtenció d'extractes cel·lulars totals i fraccionament subcel·lular

Per fer gran part de les anàlisis presents en aquesta tesi s'ha utilitzat aquest protocol de lisi cel·lular, amb el tampó descrit a la Taula 14.

#### Materials i reactius

- Pipetes Pasteur
- Pipetes serològiques
- Tubs Eppendorf
- Tampó de lisi fred
- Microcentrífuga refrigerada

#### Metodologia

1. Es renten dues vegades les cèl·lules amb PBS 1x i s'hi afegeixen 750 µL de tampó de lisi fred per a cada placa de 9 cm de diàmetre. A la Taula 14 se n'indica la composició i la Taula 15 els volums adaptats en funció del tipus de placa de cultiu que s'utilitzi.
2. Es deixa actuar el tampó de lisi durant 10 minuts mantenint la placa en gel.
3. Es recullen les cèl·lules amb un *scraper*. Les cèl·lules són recuperades amb una pipeta Pasteur en un eppendorff.
4. S'homogeneïtzen les cèl·lules amb un Dounce, on hi fem 10 embolades.
5. Les mostres es centrifuguen a 14.000 g, durant 10 minuts a 4°C, per eliminar les restes cel·lulars no llisades.
6. Es recupera el sobrenedant, el qual contindrà l'extracte cel·lular total, que s'anomenarà també *wce* (de l'anglès whole cell extract).

#### Composició Tampó de Lisi

- 50 mM Tris-HCl pH 7,5
- 10 mM MgCl<sub>2</sub>,
- 125 mM KCl,
- 1 mM DTT,
- 0,1 % v/v Tritón X-100,
- PMSF 0,1 mM,
- EGTA 1,5 mM,
- EDTA 1 mM,
- NaF 25 mM,
- Na<sub>2</sub>VO<sub>3</sub> 0,2 mM
- PPI 2 mM
- 1µg/ µL aprotinina, leupeptina, pepstatina i benzamidina

**Taula 14 – Tampó de lisi.** Composició del tampó de lisi utilitzat de manera rutinària en aquest treball.

Tipus de Placa	Volum de Tampó
Plaques de 6 pous	200 µL
Plaques de 35 mm Ø	350 µL
Plaques de 60 mm Ø	400 µL
Plaques de 90 mm Ø	700 µL

**Taula 15 – Volum del tampó de lisi.** Recull dels diversos volums utilitzats per llisar les cèl·lules en funció de la superfície de la placa a tractar.



### 5.4.2 Determinació de la concentració de proteïna

#### Mètode de Bradford

El càlcul de la concentració de proteïna per les mostres obtingudes des de cultius cel·lulars es va fer seguint el mètode de Bradford [169] basat en la unió del colorant Blau de Comassie a les proteïnes.

#### Materials i reactius

- Tubs eppendorff
- Solució concentrada de BSA 1 g/mL
- Cubetes d'espectrofotometria
- Reactiu Bradford (Bio-Rad)

#### Metodologia

1. Es preparen les dilucions necessàries per fer la recta patró. Habitualment entre 1 mg/mL i 12 mg/mL. S'ajusten les dilucions a 200 µL amb aigua destil·lada.
2. Es pipetegen 2 µL i 4 µL de cada mostra i també s'enrasen a 200 µL amb aigua destil·lada.
3. Es dilueix el reactiu de Bradford 4 vegades i se n'afegeix 800 µL a cada tub i se li fa un pols de vòrtex i s'incuben les mostres a temperatura ambient durant 15 minuts i se'n llegeix l'absorbància de les mostres a 595 nm .

#### Mètode de BCA

Aquest mètode alternatiu de determinació de quantitat de proteïna es basa amb el descrit per Stoscheck [170] i ha estat utilitzat per les mostres del capítol II, procedents de l'homogeneïtzació de cervell de rata. El canvi de mètode deu a la millor tolerància d'aquest a les substàncies presents al tampons, sobretot detergents, que s'utilitzen en aquest capítol, respecte a com es comportaria el mètode de Bradford.

#### Materials i reactius

- Tubs eppendorff i PBS 1X
- Solució estàndard de BSA 1g/mL
- Placa de 96 pous
- Reactius (A i B) de BCA.

#### Metodologia

1. Es prepara el reactiu de treball de BCA barrejant 50 parts del reactiu A amb 1 part del reactiu B.
2. S'afegeix 1 µL de l'estàndard de BSA a cada pou o 1 µL de cada mostra.
3. S'afegeixen 100 µL de PBS 1x a cada pou i es completa la barreja de reacció amb 100 µL més del reactiu de treball de BCA.
4. S'agita la placa durant 30 segons i s'incuba a 37°C durant 30 minuts.
5. Es tempera la placa a temperatura ambient i es llegeix l'absorbància a 562 nm.

### 5.4.3 Coimmunoprecipitació

#### Amb proteïna A-Sepharosa

Per tal d'estudiar les interaccions entre els eIFs, i veure si els tractaments als quals hem sotmès a les nostres cèl·lules afecten aquesta interacció, hem posat apunt un protocol de coimmunoprecipitacions basat en diversos d'existents al laboratori.

#### Materials i reactius

- Resina HA-Agarosa
- Tubs eppendorf
- Agitador orbital
- Centrifuga
- Tampó lisi
- Tampó TMR 5X

#### Metodologia

1. Es lisen les cèl·lules amb el protocol anterior (veure 5.4.1), tot centrifugant 15 minuts a 15.000 rpm per tal d'eliminar les restes cel·lulars i se n'obté l'extracte total.
2. S'aliquota la resina en tubs eppendorf. Cada tub ha de contenir un mínim de 30 µL de resina.
3. Es renta i s'equilibra la resina amb tampó de lisi fent centrifugacions curtes de 30 segons a 4.000 rpm. Cal mantenir els tubs el màxim de temps possible en gel. El rentat és necessari per tal d'eliminar el tampó de conservació de la resina que conté 20 % d'etanol.
4. Es reparteix per cada tub amb resina l'extracte corresponent, guardant-ne una petita part que correspondrà al wce, que ens servirà com a control de càrrega. Es deixa 5 minuts en gel i s'hi afegeix 1 µg d'anticòs per cada 10 µL de resina.
5. Un cop totes les barreges estan llestes, es posen a incubar *overnight* a 4°C amb agitació orbital.
6. L'endemà es fa una primera centrifugació de 30 segons a 800 g per sedimentar la resina i es recupera tot el sobrenedant, que s'anomena "*cleared*" i que conté tot el que no s'ha unit al complex resina anticòs.
7. Es fa una altra sèrie de rentats, com els descrits anteriorment, de la resina i s'elueix tot el que hi ha quedat unit amb Tampó de Mostra Reductor (TMR) 5x (Taula 17) i es bull durant 10 minuts.

#### **Control d'interacció directa amb la resina**

*Només incubem l'extracte corresponent amb la resina, sense anticòs.*

#### **Control d'interacció amb regions inespecífiques de l'anticòs**

*Afegim a la barreja de resina i extracte la mateixa quantitat d'anticòs secundari de la mateixa espècie que el que utilitzarem.*

**Taula 16 – Controls d'immunoprecipitació.** Donada la naturalesa de la tècnica cal tenir uns bons controls negatius per poder descartar interaccions inespecífiques.

8. Les mostres estan a punt per ser analitzades, tot i que és recomanable fer una centrifugada a 13.000 rpm per sedimentar la resina i separar el sobrenedant. Així, la càrrega del gel serà més fàcil.

#### **Amb anti-HA conjugat amb agarosa**

Aquest protocol, en essència, és molt semblant al que hem utilitzat per la resina de proteïna A-sepharosa, però la resina Anti-HA-Agarose (Sigma) porta ja l'anticòs conjugat utilitzant una resina activada amb Bromur de Cianogen, resultant-ne una unió és molt més forta.

L'anticòs anti-HA reconeix l'epítip YPYDVPDYA, que és el que expressen totes les proteïnes que hem transfectat en aquesta tesi, ja que ho hem fet amb el vector pCMV-HA que porta integrat el HA<sub>tag</sub>.

La forta unió entre l'anti-HA i l'agarosa, ens permet fer uns rentats una mica més abundants, passant de 4 a 5 rentats i essent altament recomanable separar l'eluït amb TMR de la resina, centrifugant només acabar de bullir.

Un dels problemes que mostren les immunoprecipitacions és la possible interferència de les cadenes pesades i lleugeres dels anticossos a l'hora de fer *western blot*, ja que es poden produir reaccions creuades amb l'anticòs secundari i donar falsos positius, o molta senyal de fons. Amb la resina conjugada amb l'anti-HA, si ho separem ràpidament l'anticòs no es deixa anar, no es desnatura i no interfereix.

#### Metodologia

1. Es lisa a la sala de cultius les plaques amb les cèl·lules a analitzar i es centrifuguen els extractes durant 15 minuts a 15.000 g a 4°C. Dels sobrenedants es conserva una alíquota de 100 µL com a extracte total "wce", per carregar com a control en els *western blot* i per calcular la concentració de proteïna.
2. S'afegeixen 35 µl d'aigua en un eppendorff per utilitzar-lo de referència amb el volum de resina que s'afegeixen. Aproximadament caldrà afegir uns 65-70 µl de la solució al 50 % de resina, que es troben dissoltes en 20 % de metanol.
3. S'equilibra la resina amb 4 rentats de 30 segons a 4000 rpm amb tampó de lisi per eliminar les restes de metanol present en el buffer de la resina. Deixem reposar l'últim rentat en gel.
4. S'aspira el sobrenedant. Es deixa de la resina enrasada, s'hi afegeix el mateix volum d'extracte a cada tub i es resuspèn la resina amb cops suaus al fons del tub.
5. Els tubs s'incuben amb agitació orbital a 4°C *overnight*.

6. Es recupera el sobrenedant centrifugant 30 segons a 4000 rpm els tubs i el sobrenedant es conserva com a *cleared "CI"*.
7. La resina incubada amb els extractes totals es renten amb 4 rentats de 30 segons a 4°C amb tampó de lisi, acabat de preparar.
8. Es resuspèn la resina amb TMR 2,5x i es bull la mostra durant 5 minuts.
9. Se centrifuguen 30 segons a 4.000 rpm i s'afegeix el mateix volum de tampó de lisi que de TMR 2,5x.

#### **5.4.4 Extracció de proteïnes amb Àcid Tricloroacètic**

La precipitació de proteïnes amb àcid tricloroacètic (TCA) és una tècnica que s'utilitza quan es necessita concentrar la mostra de proteïna obtinguda o per eliminar possibles interferents presents a la matriu de la mostra i que podrien interferir en la detecció per *western blot*. En alguns protocols havíem vist que s'hi afegia deoxicolat sòdic com a coadjuvant de la precipitació i nosaltres també li vam afegir.

En aquesta tesi l'hem utilitzat en el capítol I a l'hora de concentrar algunes de les mostres obtingudes dels gradients i en el capítol II per concentrar les proteïnes alliberades al sobrenedant de les membranes purificades i posteriorment tractades.

##### Materials i reactius

- Tubs eppendorff
- Agitador vòrtex.
- Centrífuga per tubs eppendorff
- Deoxicolat Sòdic 2 %
- Àcid Tricloroacètic 50 %
- TMR 2,5x "bàsic" (pH 8,5)
- Acetona glaciària

##### Metodologia

1. S'afegeix a les mostres a precipitar el volum suficient de la solució de deoxicolat sòdic 2 % perquè la concentració final sigui de 0,02 % i es deixa incubar 20 minuts en gel.
2. A la campana d'extracció s'hi afegix el volum necessari d'una solució al 50 % de TCA, perquè la concentració final sigui del 12,5 % i es deixa una hora en gel. Cal fer un pols d'agitació amb vòrtex.
3. Es centrifuguen els tubs a 13.000 rpm durant 20 minuts a 4°C i se n'aspira el sobrenedant. Es deixa que s'evaporin les possibles restes de TCA.
4. Es renta el pellet amb 200 µL d'acetona freda (-20°C) i es torna a centrifugar durant 15 minuts també a 13.000 rpm. S'aspira el sobrenedant i es deixa assecar a l'aire durant 10 minuts.

5. Es resuspèn el pellet, amb un TMR 2,5x més bàsic del habitual (pH 8,5). El pH és important per corregir l'acidesa de les mostres provocada per la presència de traces de TCA. S'ha vist que aquestes traces poden provocar canvis de pH importants que ens poden donar problemes a l'hora de carregar el gel i en la detecció de la proteïna.

#### **5.4.5 Transfecció transitòria amb PEI**

La transfecció amb PEI està basat amb el que va proposar Kamen l'any 2002 [171]. Aquest mètode es basa amb la utilització d'un polímer de 25kDa anomenat Polyethylenimina, que presenta una alta capacitat de transfectar les cèl·lules HEK293T i altres línies similars.

##### Materials i reactius

- Solució PEI
- Medi de cultiu DMEM sense sèrum

##### Metodologia

- 1) Dissolem el DNA plasmídic amb el medi de cultiu DMEN sense sèrum.
- 2) Afegim la solució de PEI fins a una concentració final de 1 µg/µL, sempre mantenint la relació 3:1 amb µg DNA:µL PEI.
- 3) Ho deixem incubar a temperatura ambient durant 10 minuts i aboquem la barreja sobre el cultiu cel·lular.
- 4) Incubem les cèl·lules com a mínim 20 hores a 37°C, 5% CO<sub>2</sub> i humitat.

## 5.5 Electroforesis de proteïnes i anàlisi per immunodetecció

El western-blot és la tècnica més utilitzada de la tesi, i com a tal, hem adaptat el protocol original descrit per Renart [172] i Towbin [173] a les nostres necessitats.

### 5.5.1 Electroforesi

La tècnica de l'electroforesi en gels de poliacrilamida (i el seu acrònim en anglès PAGE) s'utilitza per a la separació i visualització de proteïnes separades en funció del seu pes molecular, encara que també es pot fer servir per a la separació d'RNA i DNA de baix pes molecular. Quan en aquests gels se'ls hi afegeix SDS (l'acrònim en anglès de Dodecil sulfat sòdic) l'electroforesi es converteix en desnaturalitzant i se l'anomena SDS-PAGE.

Composició TMR 5X
<ul style="list-style-type: none"> <li>• 350 mM Tris pH 6,9,</li> <li>• 10 % SDS,</li> <li>• 50 % glicerol</li> <li>• DTT 250 mM,</li> <li>• EDTA 10 mM</li> <li>• 0,0125 % de Blau de Bromofenol</li> <li>• 0,5 % <math>\beta</math>-mercaptoetanol</li> </ul>

**Taula 17 – Composició tampó de mostra reductor.** Formulació del tampó de mostra reductor utilitzat en aquesta tesi.

En aquesta tècnica, les proteïnes es bullen durant 5 minuts a 100 °C en presència d'un tampó amb SDS i  $\beta$ -mercaptoetanol (TMR) (Taula 17), fent que es trenquin els ponts disulfur de les proteïnes, adquirint una estructura primària per efecte de la desnaturalització.

	Solució B	Solució C	Tampó Electroforesi
<b>Tris/HCl</b>	1 M (pH 8,8)	0,5 M (pH 6,8)	25Mm (pH 7,5)
<b>SDS</b>	0,4 %	0,4 %	0,1 %
<b>Glicina</b>			129 mM

**Taula 18 – Composició dels tampons d'electroforesi.** Formulació dels tampons més utilitzats per polimeritzar els gels i fer l'electroforesi.

La quantitat de SDS que s'uneix a les proteïnes és constant (1,4 g SDS/g proteïna) i la relació càrrega-massa esdevé igual per a totes les proteïnes, per tant la mobilitat d'aquestes vindrà determinada principalment pel seu pes molecular.

Tots els gels presents en aquesta tesi han estat fets a mà seguint el mètode descrit per Laemmli [174] utilitzant els kits de Bio-Rad que ens permeten fer gels de 10 x 7 cm.

Material i reactius

- Acrilamida-bisacrilamida 30%
- Solució B (Taula 18)
- Solució C (Taula 18)
- Tampó d'electroforesis (Taula 18)
- H<sub>2</sub>O milli-Q
- TEMED (Sigma Aldrich)
- Persulfat amoni 10 %
- Tampó de TMR 5X (Taula 17)
- Mini-PROTEAN III / Mini-PROTEAN Tetra Cell (Bio-Rad)

Metodologia

1. Es netegen els vidres amb alcohol 70 % i es col·loquen al suport per polimeritzar els gels.
2. Es prepara la mescla per al gel apilador i el separador sense TEMED i PSA que s'afegiran al moment abocar la barreja entre els dos vidres. Cal seguir la formulació que indica la Taula 19.
3. Un cop polimeritzats els gels es munten a la cubeta d'electroforesi i es recobreixen amb tampó d'electroforesi.

4. Es bullen les mostres durant 5 minuts a 100°C i se'ls fa un pols de centrifuga per recollir les possibles gotes presents a la part interior del tap.

	Gel Separador			Gel Apilador
	10 %	12 %	15 %	3,5 %
Acrilamida (%)	10 %	12 %	15 %	3,5 %
Acrilamida (mL)	2,50	3,00	3,75	0,70
Solució B (mL)	1,87			
Solució C (mL)				1,50
H <sub>2</sub> O mQ (mL)	3,12	2,63	1,86	3,80
TEMED (µL)	10			10
PSA 10 % (µL)	100			100

5. Per millorar la reproductibilitat de l'electroforesi, es fixen unes condicions que es repetiran sempre:

- a. *Stacking*: voltatge màxim: 100 V; amperatge màxim 50 mA (25 mA per gel); 15 minuts
- b. *Running*: voltatge màxim 160 V; amperatge màxim 75 mA (35 mA per gel); 65 minuts.

**Taula 19 – Composició dels gels.** Volums necessaris per polimeritzar els gels d'acrilamida, en funció del % necessari en funció de l'experiment.

Amb aquest programa, passats 80 minuts el front de les mostres està al final del gel. Arribats a aquest punt, el procés pot seguir cap a la tinció amb Blau de Comassie (5.5.2) o cap a l'electrotransferència (5.5.3).

### 5.5.2 Tinció dels gels SDS-PAGE en blau de coomassie

La tinció del gel es fa amb una solució de blau de *coomassie* i s'utilitza quan s'analitzen proteïnes purificades o per comprovar que la concentració dels extractes proteics siguin els correctes. La tinció de gels amb *coomassie* és irreversible, per la qual cosa un cop tenyits no es podran processar cap a l'electrotransferència.

#### Materials i reactius

- Solució de tinció (50 % metanol, 10 % àcid acètic, 40 % H<sub>2</sub>O, 0,1 % *coomassie brilliant blue*)
- Solució destenyir (50 % metanol, 10 % àcid acètic, 40 % H<sub>2</sub>O)
- H<sub>2</sub>O destil·lada

#### Metodologia

1. Es desmunten els gels dels vidres i es deixen en aigua destil·lada.
2. Es submergeixen els gels amb la solució *coomassie* durant 10 minuts.
3. Es fan 3 rentats de 15 minuts amb solució per destenyir. L'últim rentat es pot allargar fins a 1 hora.
4. Si és necessari, per contrastar més les bandes es fa un rentat amb aigua destil·lada *over-night*.

### 5.5.3 Electrotransferència

Si després d'acabar l'electroforesi no es decideix tenyir el gel, el procés pot seguir amb l'electrotransferència.

#### Materials i reactius

- Membranes de difluorur de polivinilidè (PVDF) Immobilon-P de *Millipore*
- Paper de filtre 3MM
- Tampó de transferència (192 mM glicina, 25 mM Tris, 10 % metanol)
- Metanol absolut
- Ponceau-S red (0,1 % (p/v) en 5 % d'àcid acètic)
- Dispositiu de transferència Mini-Protean 3
- Tampó TTBS (150 mM NaCl, 25 mM Tris pH 8,0, 3 mM KCl, 0,1 % (v/v) Tween 20)
- Solució bloquejant (TTBS 1X + 5 % llet en pols, Central Lechera Asturiana, desnatada 1 % M.G.)
- Anticossos primaris (Taula 20)



### Metodologia

1. Es desmunten els vidres i es deixa el gel 1 minut en aigua destil·lada. Mentrestant es rehidrata i equilibra una membrana de PVDF fent els passos següents:
  - a) Se submergeix la membrana 1 minut en metanol
  - b) Es renta amb aigua destil·lada durant 1 minut
  - c) S'incuba més de 5 minuts amb tampó de transferència.
3. Es munta el kit de transferència en una cubeta amb tampó de transferència, eliminant totes les bombolles d'aire presents entre les diverses capes del *sandwich*. Suport negre – esponja – paper de filtre – gel – membrana – paper de filtre – esponja – Suport blanc (sempre que es faci amb els kits de Bio-Rad).
4. Es col·loca el *sandwich* en el suport de l'electrotransferència i se submergeix tot en tampó de transferència. Es configura la font d'electroforesi a un voltatge de 100V durant 60 minuts i cal controlar que l'amperatge es mantingui com a molt entre 200 i 400 mA.
5. Un cop acabada la transferència, i per tal de comprovar que hagi funcionat correctament es fa una tinció amb Ponceau-S, seguint el següent protocol:
  - a. Es renta la membrana amb aigua destil·lada durant 5 minuts.
  - b. S'incuba la membrana neta amb una solució que conté 0,1 % (p/v) de Ponceau-S en 5 % d'àcid acètic, també durant 5 minuts.
  - c. Es recupera la solució i es renta la membrana amb aigua destil·lada. En aquest punt és important marcar bé la membrana amb tot el que més endavant ens pugui ser necessari (alçada de pesos moleculars, delimitació dels carrils per si s'ha de tallar, possibles bombolles que s'hagin pogut produir i que puguin interferir amb la detecció posterior amb l'anticòs).
  - d. S'elimina la tinció amb Ponceau-S amb tampó de transferència o amb una solució de metanol al 20 %.
6. Amb el Ponceau-S eliminat de la membrana, cal que s'equilibri amb TTBS durant 5 minuts, i tot seguit s'incuba una hora amb una solució de bloqueig que conté TTBS amb un 5 % de llet en pols.
7. Un cop passada l'hora de bloqueig, es renta la membrana 3 cop durant 10 minuts amb TTBS i es posa l'anticòs primari desitjat. Es deixa incubant *overnight* a 4°C amb agitació suau. La solució on està diluït l'anticòs conté un 5 % BSA i un 0,02 d'azida sòdica en TTBS. La Taula 20 mostra els anticossos utilitzats en aquesta tesi.

### 5.5.4 Immunodetecció

El procés d'immunodetecció que s'aplica a partir d'aquest punt és comú per la tècnica del *western blot* i també per tècniques com el *dot-blot* o el *spot-blot*, que es van utilitzar al llarg de l'experimental de la tesi, però que no són presents als resultats finals.

#### Material i reactius

- Anticossos secundaris (Taula 21)
- Kit de revelat:
  - West Pico Chemiluminescent Substrate de Pierce
  - Lumi-Light Western Blotting Substrate de Pierce
- Films fotogràfics Hyperfilm ECL de GE-Amersham
- Sistema de revelat Chemidoc de Bio-Rad

Anticòs	Casa comercial	Pes Molecular	Dilució	Espècie productora
CK2 $\alpha$ (H-286)	SCBT	38-44 kDa	1:500	Rabbit
CK2 $\alpha$ (1AD9)	Abcam	38-44 kDa	1:1000	Mouse
CK2 $\beta$ home	homemade	28 kDa	1:4000	Rabbit
CK2 $\beta$ (6D5)	SCBT	28 kDa	1:125	Mouse
$\beta$ -Actin	SCBT	43 kDa	1:1000	Mouse
eIF2 $\beta$	SCBT	50 kDa	1:1000	Mouse
eIF2 $\beta$	homemade	50 kDa	1:2000	Rabbit
p-eIF2 $\beta$ (Ser <sup>2</sup> )	Cedit pel Dr. Oriano Univ. Pàdua	50 kDa	1:1000	Rabbit
eIF3b	SCBT	100 kDa	1:1000	Rabbit
eIF3c-Nter	Bethyl	110 kDa	1:2000	Mouse
eIF3c-Cter	SCBT	110 kDa	1:500	Rabbit
eIF5	SCBT	58 kDa	1:1000	Rabbit
RP-S6	SCBT	31 kDa	1:500	Cabra
Anti-HA	Roche		1:1000	Mouse
ERK 1/2	CST	42/44 kDa	1:1000	Mouse
p-ERK 1/2	CST	42/44 kDa	1:000	Mouse

**Taula 20 – Anticossos primaris.** Recull d'anticossos primaris que s'han utilitzat en el treball experimental d'aquesta tesi i que apareixen a les figures del capítol de resultats.

#### Metodologia

1. Es recupera l'anticòs primari i es tornen a fer 3 rentats de 10 minuts a la membrana amb TTBS.
2. S'hi afegeix solució bloquejant i s'hi dilueix l'anticòs secundari (Taula 21), normalment a 1:5000, i es deixa durant 1 hora a temperatura ambient.
3. Un cop s'acaba la incubació es repeteix el protocol de rentat de 3 vegades per espai de 10 minuts, i ja està a punt per revelar.

4. Es prepara el reactiu de revelat segons el protocol comercial i es deixa incubar 5 minuts sobre les membranes.

Anticòs	Casa comercial	Dilució	Espècie productora
IgG Goat Anti-Rabbit IgG (H+L)-HRP conjugate	Bio-Rad	1:5000	Cabra
IgG Goat-Anti-Mouse IgG (H+L)-HRP conjugate	Bio-Rad	1:5000	Cabra
IgG Rabbit Anti-Goat IgG (H+L)-HRP Conjugate	Calmbiochem	1:5000	Conill

**Taula 21 – Anticossos secundaris.** Relació d'anticossos secundaris utilitzats per fer la immunodetecció d'aquesta tesi.

5. En aquesta tesi hi ha resultats obtinguts amb dues tècniques de revelat:
- Analògic: A la cambra fosca amb la utilització de films de revelat a diferents temps i incubant-lo en revelador – aigua – fixador – aigua per obtenir les imatges.
  - Digital: Utilitzant els sistema Chemidoc de Bio-rad, on habitualment hem utilitzat un protocol que ens donava 8 imatges en 5 minuts.

## 5.6 Activitats enzimàtiques i marcatges radioactius

### 5.6.1 Assaig d'activitat de CK2 en mostres biològiques

L'activitat enzimàtica de la proteïna quinasa CK2 es pot determinar en els extractes de cèl·lules totals, i al tractar-se d'una proteïna força soluble no requereix d'unes condicions gaire dràstiques per solubilitzar-la. Cal vetllar però per treballar amb tractaments que respectin les condicions natives de la proteïna i la seva activitat.

S'ha vist que els lisats de cèl·lules es poden emmagatzemar a  $-20^{\circ}\text{C}$  i es poden utilitzar diverses vegades per als assajos de CK2. El tampó de lisi utilitzat per fer els assajos (Taula 14) s'ha de mantenir sempre entre  $0-4^{\circ}\text{C}$  de temperatura, i els inhibidors de proteases i fosfatases de proteïnes han de ser sempre acabats d'afegir per garantir-ne la seva eficiència.

CK2 està present a la cèl·lula en forma sobretot d'holoenzim, però també s'hi pot trobar com a dues subunitats separades. Les dues formes competeixen enzimàticament, però mostren diferències en la seva especificitat per a diferents substrats i aquests poden ser utilitzats per distingir entre ells.

Amb aquesta finalitat, s'utilitza un substrat peptídic de CK2, que deriva de la seqüència d'eIF2 $\beta$  i que es fosforila només per a l'holoenzim, mentre que el pèptid RADA pot ser fosforilada també per CK2 $\alpha$  subunitats lliures.

Pèptid	Seqüència	CK2 $\alpha_2\beta_2$		CK2 $\alpha$	
		K <sub>m</sub>	V <sub>max</sub>	K <sub>m</sub>	V <sub>max</sub>
RADA	RRRADDSDDDDD	14	56.5	25	18.9
eIF2 $\beta$	MSGDEMIFDPTMSKKKKKKKKP	10	71.4	660	5.0

**Taula 22 – Valors cinètics de CK2.** Valors enzimàtics per l'activitat de la proteïna quinasa CK2 davant dels dos pèptids més habituals d'estudi. Dades adaptades de l'article de Poletto et al. (2008) [96]

### Material i reactius

- 0,5M M Tris–HCl pH 7.4
- 0,1M MgCl<sub>2</sub>
- NaCl 1M
- ATP 0,1 mM
- [ $\gamma$ -<sup>33</sup>P] ATP (1-2x10<sup>6</sup> cpm/ reacció).
- Pèptid RADA 1 mM
- Pèptid eIF2 $\beta$  1 mM
- Paper de fosfoce·l·lulosa
- Àcid Ortofosfòric 0,5 %
- Líquid de centelleig
- Comptador de centelleig (Perkin Elmer)

### Metodologia

- 1 Es prepara la barreja de reacció. Per a un volum final de 20  $\mu$ L s'hi afegeix: 0,5 M Tris–HCl pH 7.4, 0,1 M MgCl<sub>2</sub>, NaCl 1 M, ATP 0,1 mM, 1 o 2  $\mu$ g d'extracte o proteïna purificada, 1 mM del pèptid escollit. En el cas que vulguem determinar l'activitat de CK2 $\alpha$ , no s'haurà d'afegir NaCl a la barreja de reacció.
- 2 Un cop estan tots els tubs de reacció preparats, s'inicia la reacció afegint [ $\gamma$ -<sup>33</sup>P] ATP (1-2x10<sup>6</sup> cpm/ reacció) i s'incuba durant 30 minuts a 30°C.
- 3 Es diposita tot el volum del tub de reacció sobre un tros de paper de filtre per aturar la reacció.
- 4 Es renten els filtres 3 vegades durant 5 minuts amb una solució 0,5 % d'àcid bòric.
- 5 S'assequen els papers i es posen als vials de centelleig i s'hi afegeixen 3 mL de líquid de centelleig.
- 6 S'incuben les mostres durant 30 minuts a temperatura ambient i es llegeix al comptador de centelleig Liquid Scintillation Analyzer (Tri-Carb 2810TR, Perkin Elmer).

### 5.6.2 Fosforilació *in vitro* d'eIF2 $\beta$ per CK2

L'assaig de fosforilació de proteïnes *in vivo* és un mètode ràpid per conèixer si una proteïna és substrat d'una quinasa determinada. En l'inici del capítol I de resultats d'aquesta tesi volíem estudiar l'activitat de CK2 sobre eIF2 $\beta$  (Figura 2).

Per fer-ho es va barrejar una part d'eIF2 $\beta$  recombinant purificat anteriorment amb CK2 $\alpha$ , també amb una mescla estequiomètrica de CK2 en forma de  $\alpha_2\beta_2$  reconstituïda. Per activar la reacció s'hi va afegir ATP radioactiu en forma de [ $\gamma$ -<sup>33</sup>P] ATP.

Les diverses mostres es van carregar en un gel SDS/PAGE i la radioactivitat incorporada es va detectar amb el Phospho Imager de Bio-Rad.

Abans de l'assaig CK2 $\alpha_2\beta_2$  es va reconstituir incubant 50 pmols de CK2 $\alpha$  i 50 pmols de CK2 $\beta$  en un tampó, que conté Tris 50 mM, pH 7,5, NaCl 150 mM i 0,1 % (1 mg/mL) de BSA, prèviament refredat entre 0 i 4°C.

La barreja es va posar a 30°C durant 5 minuts, i després es va incubar *overnight* a 4°C. L'activitat de l'holoenzim de CK2 es va determinar prèviament per assajos d'activitat quinasa, com els descrits en l'apart anterior.

#### Material i reactius

- 0,5 M Tris-HCl pH 7.4
- 0,1 M MgCl<sub>2</sub>
- 0,1 mM ATP
- 0,1 M NaCl
- [ $\gamma$ -<sup>33</sup>P] ATP (1-2x10<sup>6</sup> cpma/reacció)
- eIF2 $\beta$  wt recombinant
- CK2 $\alpha$  i CK2 $\alpha_2\beta_2$  recombinants
- Phospho Imager de Bio-Rad

#### Metodologia

1. Es prepara la barreja de reacció, que conté 50 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1 mM ATP, 1 M NaCl 0.1 mM Pèptid RADA. La barreja s'hauria de conservar en gel.
2. S'hi afegixen 0,3  $\mu$ g d'eIF2 $\beta$  i 100 ng de CK2 $\alpha$  o 25 ng de CK2 $\alpha_2\beta_2$
3. S'hi afegix el [ $\gamma$ -<sup>33</sup>P] ATP (1-2x10<sup>6</sup> cpma/reacció) a la barreja de reacció, i es deixa incubar durant 20 minuts a 30°C.
4. S'hi afegix el TMR 5x i es bull durant 10 minuts a 100°C per tal d'aturar la reacció.
5. Es carreguen les mostres a un gel de SDS/PAGE i es segueix el protocol indicat anteriorment per les electroforesis, tenint en compte que treballem amb material radioactiu i que convé mantenir les mesures de seguretat.
6. Es tenyeix el gel amb blau de comassie (protocol indicat al punt 5.5.2), s'asseca per evaporació o amb buit i s'exposa al Phospho Imager de Bio-rad. Els períodes de detecció poden anar des d'hores a dies.

### 5.6.3 Marcatge metabòlic amb $^{35}\text{S}$ -Met/Cys

Els experiments de marcatge metabòlic amb  $^{35}\text{S}$ -Met ens permeten seguir la incorporació de l'aminoàcid marcat a les noves proteïnes sintetitzades i per tant podem extrapolar i comparar les taxes de producció de noves proteïnes en funció de l'aminoàcid radioactiu incorporat i del tractament realitzat.

Una de les claus d'aquest experiment és que el medi de cultiu de les cèl·lules és deficient en metionina, per tant, al complementar el medi de cultiu amb l'aminoàcid marcat, les cèl·lules només disposen d'aquest per a produir noves proteïnes.

#### Materials i reactius

- Medis de cultiu (Taula 23)
- PBS 1x
- [ $^{35}\text{S}$ ]-L-Methionine (>800 Ci/mmol). Hartmann Analytic.
- Material i reactius necessaris per la precipitació amb TCA (punt 1.6.1)
- Líquid de centelleig
- Comptador de centelleig (Perkin Elmer)

#### Metodologia

##### Dia 1

1. Es sembren les cèl·lules HEK293T al 50 % de confluència, en dues plaques de 6 pous, una per treballar amb radioactivitat i l'altre per treballar en fred.

Medi de cultiu	Composició
<b>Medi Deprivació</b>	DMEM + 1 % Glu + 1 % P/S 1 mM Piruvat Sòdic + 0,5 % FBS
<b>Medi Lliure Complet</b>	DMEM lliure de Cys i Met + 1 % Glu + 1 % P/S 1 mM Piruvat Sòdic + 10 % FBS
<b>Medi Lliure Deprivació</b>	DMEM lliure de Cys i Met + 1 % Glu + 1 % P/S 1 mM Piruvat Sòdic + 0,5 % FBS

**Taula 23 – Medi de cultiu pel marcatge.** Formulació dels medis de cultiu necessari per fer el marcatge radioactiu amb  $^{35}\text{S}$ -Met.

##### Dia 2

2. Es preparen els medis de cultiu necessaris. A part del ja habitual medi complet (Taula 23) cal preparar 3 medis més.
3. Es fa un rentat amb PBS 1x temperat de les plaques i se substitueix el medi de cultiu en funció de si el creixement ha de ser asincrònic, sincrònic i mantenir la condició de deprivació pel tractament. Aquest medi es mantindrà un mínim de 16 hores.

## Dia 3

4. L'experiment de marcatge present en aquesta tesi conté un tractament per inhibició de CK2 amb TBB al llarg de 3 hores. Per tant, cal fer un canvi de medi a les cèl·lules i afegir-hi l'inhibidor de la quinasa, tal i com indica la Taula 24.

Condicció	Composició del medi tractament
Asincròniques (-TBB)	2 mL de M. Complet + 5 µL de DMSO
Asincròniques (+TBB)	2 mL de M. Complet + 5 µL de TBB 10 mM
Re-estimulades (- TBB)	2 mL de M. Complet + 5 µL de DMSO
Re-estimulades (+TBB)	2 mL de M. Complet + 5 µL de TBB 10 mM
Deprivades (- TBB)	2 mL de M. Deprivació + 5 µL de DMSO
Deprivades (+TBB)	2 mL de M. Deprivació + 5 µL de TBB 10 mM

**Taula 24 – Composició dels medis de tractament.** Recull de les condicions de tractament de les cèl·lules pel marcatge radioactiu i el tractament d'inhibició amb TBB.

5. Es prepara la solució de marcatge amb  $^{35}\text{S}$ -Met. Agafem 260 µL de Medi de Deprivació Lliure (Taula 23) i s'hi afegeixen 15 µL de la solució [ $^{35}\text{S}$ ]Met-label (2 mCi/200 µL).
6. Per tal de fer el pols de marcatge, es fa un nou canvi de medi cap al Medi complet lliure de metionina o cisteïna, o quan s'escaigui el seu anàleg de deprivació. I s'afegeixen 20 µL de la Solució de Marcatge a cada pou. S'agita suaument i es posa dins la caixa de metacrilat sense tapar del tot. 1 hora a 37°C, 5 % CO<sub>2</sub>. Cal que, prèviament, la caixa de metacrilat hagi estat temperada a 37°C durant 1 hora.
7. S'eliminen les restes de medi radioactiu de cada pou i es renten les cèl·lules amb 1 mL de PBS temperat a 37°C.

Condicció	Composició del medi del pols de marcatge
Asincròniques (-TBB)	1 mL de M. Lliure Complet + 2,5 µL de DMSO
Asincròniques (+TBB)	1 mL de M. Lliure Complet + 2,5 µL de TBB 10 mM
Re-estimulades (- TBB)	1 mL de M. Lliure Complet + 2,5 µL de DMSO
Re-estimulades (+TBB)	1 mL de M. Lliure Complet + 2,5 µL de TBB 10 mM
Deprivades (- TBB)	1 mL de M. Lliure Deprivació + 2,5 µL de DMSO
Deprivades (+TBB)	1 mL de M. Lliure Deprivació + 2,5 µL de TBB 10 mM

**Taula 25 – Composició dels medis de tractament pel marcatge.** Recull de les condicions de tractament de les cèl·lules pel marcatge radioactiu i el tractament d'inhibició amb TBB amb el medi lliure de metionina i cisteïna.

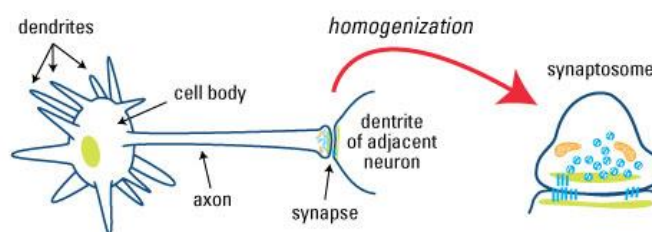
8. Es col·loquen les plaques sobre gel i s'hi afegeixen 300 µL de Tampó de Lisi i es deixa actuar durant 10 min. Es resuspenen les cèl·lules amb el mateix tampó i es centrifuga a 16.000 rpm.

9. S'apliquen 30  $\mu\text{L}$  de cada mostra sobre un tros de paper de filtre 3MM. La mida recomanable és 2x2 cm. Es deixa absorbir bé pel paper i es renta durant 15 minuts amb una solució 10 % TCA freda. Es fan dos rentats més de 10 minuts.
10. Es fa un rentat ràpid amb acetona i es deixa que els papers s'assequin. Si s'escau ens podem ajudar de la bombeta d'infraroig.
11. Un cop secs es posen els papers als vials que contenen el líquid de centelleig i es compta utilitzant el canal de  $^{35}\text{S}$ .

## 5.7 Tècniques amb membranes cel·lulars

### 5.7.1 Obtenció de membranes sinaptosomals – Fracció P2

Per tal d'obtenir les fraccions riques amb membranes sinaptosomals ens hem basat amb un protocol de l'article "The isolation of nerve endings from brain" [176], amb petites modificacions. En el nostre cas el nostre model han estat les rates



**Il·lustració 26 – Els sinaptosomes.** Són estructures formades per la membrana presinàptica del terminal sinàptic que es tanca formant una vesícula i per la membrana postsinàptica que queda unida a la presinàptica, mantenint una estructura semblant a la de la sinapsi nerviosa [175].

#### Animals utilitzats

Per a la preparació de la fracció enriquida en sinaptosomes (P2), es van utilitzar rates mascle de la soca Sprague-Dawley amb una edat aproximada de 7 setmanes.

Segons el que es va acordar amb el Servei d'Establació de la Universitat Autònoma de Barcelona, les rates van rebre aliment i aigua *ad libitum* i van ser mantingudes en cicles de llum/fosc de 12 h (llum de les 8 h fins les 20 h) amb temperatura i humitat controlades (temperatura de  $21^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ ).

#### Tampó HB

- 20 mM Tris-HCl (pH 7.5)
- 2 mM EDTA,
- 0.5 mM EGTA,
- 2 mM DTT,
- 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Aprotinina,
- 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Leupeptina,
- 2 mM PMSF,
- Inhibidors de proteases i de fosfatases de Sigma Aldrich

Tots els animals utilitzats en els experiments van ser proporcionats pel Servei d'Establació mitja hora abans de la seva utilització al laboratori, segons protocol experimental aprovat pel Comitè d'Ètica en Experimentació Animal de la UAB.

**Taula 26 – Composició Tampó HB.** Aquest tampó serà la matriu de partida on tindrem resuspeses les membranes sinaptosomals.



### Material i reactius

- Rata Sprague-Dawley (aprox. 7 setmanes.)
- Guillotina
- Homogeneïtzador Potter
- Centrifuga Bekman Coulter J2-21
- Tampó HB (Taula 26)

### Metodologia

1. Es decapita la rata sense anestèsia amb la guillotina i se n'extreu el cervell de la cavitat cranial, descartant el cerebel.
2. S'homogeneïtza amb 40 volums d'una solució 0.32M de sucrosa en PBS 1x freda i se li fan 12 cops d'èmbol, sempre en gel, amb un homogeneïtzador Potter a 900 rpm i un èmbol de tefló amb un espai de 0.1mm
3. Es centrifuga durant 5 minuts a 1000 g amb el rotor JA20 de Beckman Coulter. Un cop eliminat el *debris* cel·lular i els nuclis (P1), es recupera el sobrenedant i es centrifuga 20 minuts a 12.000 g, també amb el rotor JA20.
4. Es descarta el sobrenedant i es resuspèn el pellet obtingut (P2) que és ric amb sinaptosomes i mitocondris amb el Tampó HB (Taula 26). Aquesta fracció P2 serà el nostre punt de partida en gran part del treball en membranes aquest apartat.

## **5.7.2 Aïllament de membranes resistents a detergent**

### **Extracció amb detergent**

#### Material i reactius

- Sonicador
- Ultra centrifuga Hitachi cp 100 wx
- Rotor SW41 – Beckman Coulter
- Tubs de centrifuga
- Tampó sodi (Taula 27) + detergents.

#### Metodologia

1. Es resuspèn el pellet P2 amb 2 mL de tampó sòdic fred, (Taula 27) que caldrà completar-lo amb el detergent corresponent, que en els experiments d'aquesta tesi poden ser:
  - a. 1 % Tritón X-100
  - b. 1 % Brij-98
2. L'ús d'un o altre detergent marcarà la temperatura d'extracció que en el cas del Tritón X-100 serà de 4°C i del Brij-98 serà de 37°C. El temps d'agitació, però, és manté fix als 30 minuts.

<b>Composició Tampó de sodi (NaB)</b>
<ul style="list-style-type: none"><li>• 140 mM NaCl</li><li>• 5 mM KCl</li><li>• 5 mM NaHCO<sub>3</sub></li><li>• 1 mM MgCl<sub>2</sub></li><li>• 1,2 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub></li><li>• 20 mM HEPES/NaOH</li><li>• 10 mM glucosa, pH 7,4</li></ul>



**Taula 27 – Tampó sodi.** Formulació del tampó sodi amb el que es resuspèn la fracció M. Cal completar-lo amb el detergent necessari.

### Gradient de Flotació

Les membranes resistents a detergent presenten una propietat característica, i és que són capaces de flotar en un gradient 5:35:45 % de sucrosa, fenomen que es produeix per la seva baixa densitat.

#### Material i reactius

- Tubs de centrifuga pel rotor SW41.
- Ultracentrífuga Hitachi cp 100 wx
- Tampó sodi (Taula 26) + sucrosa sòlida

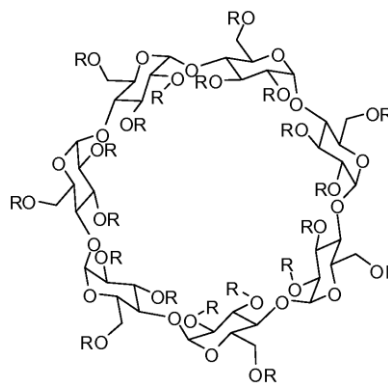
#### Metodologia

1. Afegim sucrosa sòlida a la preparació de membranes fins que es trobi al 45 % (p/v). Un cop dissolt s'hi afegeix a sobre amb molta cura un coixí de sucrosa de 35 % de 8 mL i 2,5 mL al 5 %. La sucrosa està dissolta en el mateix tampó sodi (Taula 27).
2. Es centrifuga el gradient a 100.000 g durant 18 hores a 4°C amb el rotor SW41 de Beckman Coulter.
3. Es fracciona el gradient en fraccions d'1 mL, de dalt a baix, trobant entre la fracció 2 i 3 la zona de membranes resistents a detergent.

### 5.7.3 Extracció i mesura de colesterol

Un dels elements més característics de les membranes resistents a detergent, entre les que hi trobem els *lipid raft*, és la presència de colesterol. Aquest lípid, gràcies a la seva estructura química, estructura aquestes regions lipídiques de la membrana i els hi confereix estabilitat.

Per tal de determinar si les membranes resistents a detergent que hem aconseguit purificar per flotació corresponen *lipid raft* cal que n'analitzem el contingut amb colesterol.



**Il·lustració 27 – Metil-β-ciclodextrina.** Estructura de la ciclodextrina utilitzada per extreure el colesterol de les membranes cel·lulars. La molècula presenta un anell, on la cara interna és hidrofòbica i l'externa hidròfila. Aquesta distribució provoca que el colesterol tingui gran afinitat per l'interior de l'anell i es pugui solubilitzar. En el nostre cas la "R" és un grup metil.

### Extracció de colesterol

Per fer l'extracció del colesterol de les membranes, i també pels tractaments sobre les mateixes cèl·lules, utilitzarem la metil- $\beta$ -ciclodextrina (Il·lustració 27). Aquesta ciclodextrina té una alta afinitat per les molècules de colesterol i és capaç d'arrencar-les per afinitat de la membrana cel·lular, tot i que el mecanisme no és del tot clar [177].

#### Material i reactius

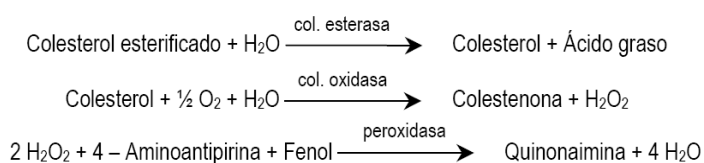
- Metil- $\beta$ -ciclodextrina
- Centrífuga J2-21 Beckman Coulter
- Tampó sodi amb 1 % Brij-98

#### Metodologia

1. A partir de la fracció rica amb membranes sinaptosomals (P2), es fan incubacions a concentracions creixents de 10 mM, 35 mM i 50 mM de metil- $\beta$ -ciclodextrina amb agitació suau durant 1 hora a 37°C.
2. A continuació es centrifuguen durant 15 minuts a 190.000 g i 4°C també amb el rotor SW41 i es separa els sobrenedants.
3. Es solubilitzen les membranes amb el mateix volum que el de partida de la fracció P2 amb tampó sòdic (Taula 27) i, en aquest cas, 1 % Brij-98 durant 20 minuts a 37°C.
4. En el cas que sigui necessari s'aïllen les DRM segons el protocol anteriorment descrit.

### Determinació de colesterol

La presència de colesterol a les nostres mostres s'ha determinat seguint un protocol que es basa en un mètode enzimàtic i consisteix en utilitzar una reactiu comercial de Biosystems que es mesura



---

**Il·lustració 28 – Reacció de la detecció del Colesterol.**  
Reacció química que es produeix en el procés de detecció del colesterol amb el kit comercial de Biosystems.

---

a l'analitzador automàtic de Cobras-Mira i referenciar-la a un patró conegut.

Aquest mètode es basa en la determinació espectrofotomètrica de la quinonaimina, formada com a conseqüència de les dues reaccions consecutives la del la colesterol oxidasa i la peroxidasa.

Material i reactius

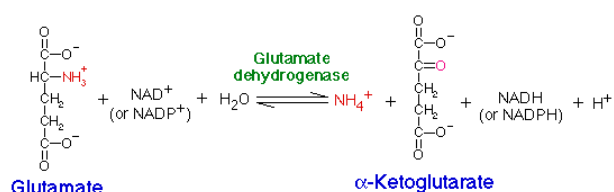
- Reactiu de determinació de colesterol conté: 35 mM Pipes a pH 7.0, 0.5 mM Colat Sòdic, 28 mM fenol, 0.2 U/mL Colesterol esterasa, 0.1 U/mL colesterol oxidasa, 0.8 U/mL peroxidasa i 0.5 mM de 4 aminoantipirina (Biosystems)
- Espectrofotòmetre

Metodologia

1. Es barregen 10 µL de mostra i de patró respectivament amb el reactiu comercial, s'agita bé i es deixa reaccionar durant 10 minuts a temperatura ambient.
2. Per calcular la concentració de colesterol, es llegeix l'absorbància de cada mostra a 500 nm .

**5.7.4 Alliberament de Glutamat**

Amb aquesta tècnica volem conèixer si els tractaments fets a les nostres sinaptosomes n'alteren la capacitat d'alliberar neurotransmissors. En aquest cas ens centrem amb el glutamat.



**II·lustració 29 – Reacció de la GDH.** Reacció química de la glutamat deshidrogenasa que és clau en la detecció de glutamat a través de la fluorescència del NADPH reduït [178].

Aquesta metodologia està

basada en l'article de "Ca<sup>2+</sup>-evoked synaptic transmission and neurotransmitter receptor levels are impaired in the forebrain of *trkB* (-/-) mice" [179].

Material i reactius

- Espectrofluorimetre (Shimadzu RF5001PC)
- Tampó sodi amb 10 mM de glucosa
- Barreja de reacció: NADP<sup>+</sup>, Glutamat Deshidrogenasa i Clorur de Calci.

Metodologia

1. Es resuspenen les alíquotes de P2 en tampó sòdic prèviament temperat a 37°C. Aquest tampó conté 140 mM NaCl, 5 mM KCl, 5 mM NaHCO<sub>3</sub>, 1 mM MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 20 mM Hepes, 1.2 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> ·12H<sub>2</sub>O a pH 7.4, al qual s'hi afegixen 10 mM glucosa al moment d'us. S'incuba la barreja durant uns minuts per temperar-ho tot.

2. Es transfereixen les alíquotes a una cubeta de quars que ja conté el mateix tampó sòdic però completat amb 1 mM NADP<sup>+</sup>, 100 U de glutamat deshidrogenasa i 1.3 mM CaCl<sub>2</sub>. Cal que la cubeta estigui en un entorn termostatitzat a 37°C.
3. Per provocar la despolarització de la membrana i l'alliberament del glutamat s'afegeix KCl a la barreja de reacció, fins a una concentració final a la cubeta de 50 mM. Com a control intern s'afegeix L-Glutamat fins a una concentració final de 5 nM.
4. L'alliberament es monitoritza determinant els nivells de NADPH seguint l'absorbància a 440 nm ( $\lambda_{exc} = 340$  nm) amb l'ajut d'un espectrofluorímetre.

# ***RESULTATS***

---



## **Capítol I**

*Paper de la proteïna quinasa CK2 en l'assemblatge de complexos  
d'iniciació de la traducció en cèl·lules HEK293T*

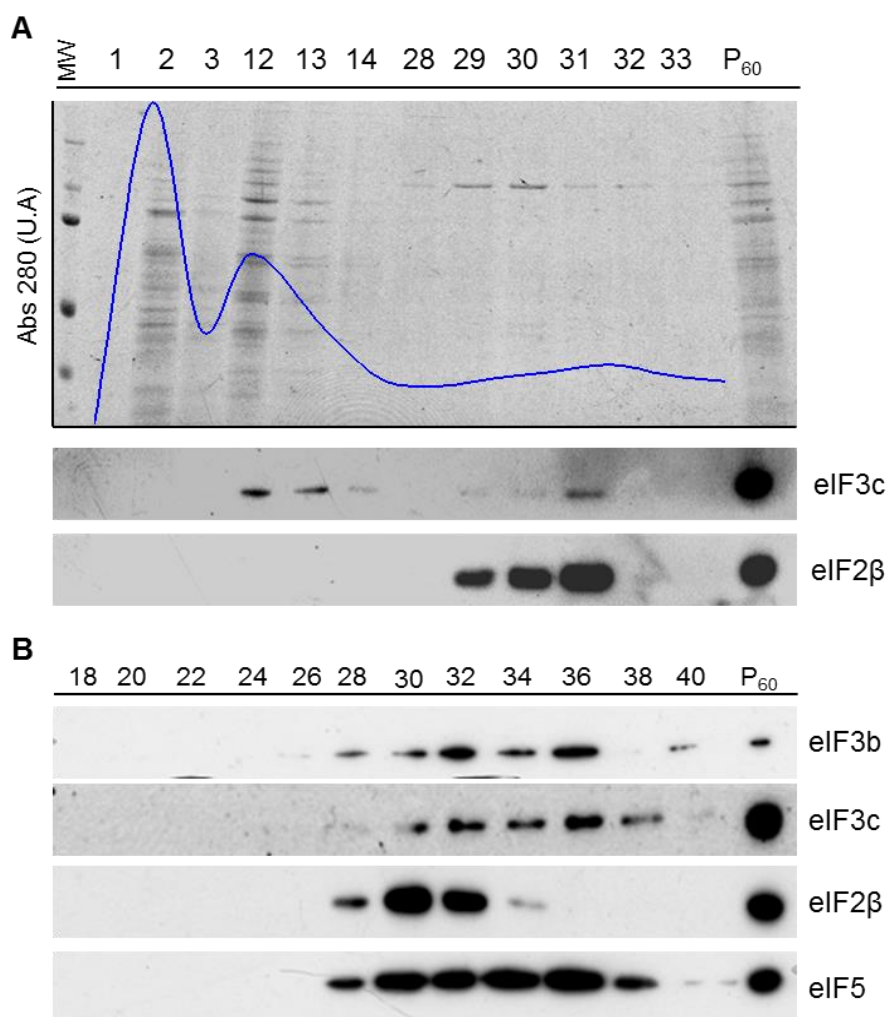




En aquest primer capítol de resultats de la tesi desgranarem els efectes de l'alteració de l'activitat de la proteïna quinasa CK2 sobre l'inici de la traducció de les proteïnes, i alguna de les proteïnes que en formen part. Aquesta alteració de l'activitat es va fer tant a través de la inhibició farmacològica com alterant-ne la seva expressió gènica.

## 6.1 Caracterització dels complexos d'iniciació de la traducció proteica en HEK293T

Per tal de caracteritzar els complexos d'iniciació de la traducció en la línia cel·lular HEK293T, el primer que es va fer als inicis de la fase experimental de la tesi va ser la purificació del complex eIF3 en aquesta línia cel·lular.



**Figura 1 – Copurificació del Multifactor complex.** **A)** Anàlisi per tinció amb blau de comassie de les fraccions seleccionades per tal de fer el primer *screening* de la cromatografia amb fosfocel·lulosa. A sota, anàlisi per *western blot* de les mateixes fraccions per detectar la presència d'eIF2β i eIF3c amb els corresponents anticossos. **B)** Detall de les fraccions on es va detectar la presència d'eIF2β i eIF3c, detectant també per *western blot* dos components més del Multifactor Complex com són eIF5 i eIF3b.

La dificultat de purificar un complex amb gairebé 13 subunitats, però, ens va portar a centrar-nos en dues d'elles, eIF3b i eIF3c, com a representants del *core* del complex, i que al mateix temps, en el cas d'eIF3c és substrat de l'holoenzim de CK2.

La purificació es va dur a terme mitjançant una cromatografia líquida d'absorció, amb matriu de fosfocel·lulosa. Al voltant de la fracció 30 van ser detectats tres dels quatre components del conegut com *Multifactor Complex*. S'hi van trobar eIF2, eIF3 i eIF5 i, més concretament, les subunitats eIF2 $\beta$ , eIF3b, eIF3c i eIF5 (Figura 1). El fet de colocalitzar aquestes subunitats del *Multifactor Complex* en la nostra línia cel·lular d'estudi va posar les bases per començar a estudiar els efectes de la modificació de l'activitat i presència de CK2.

Abans, però, calia també estudiar una de les proteïnes implicades en aquest complex i que també es coneix com a substrat de CK2, com és el factor d'iniciació de la traducció eIF2 i més concretament la seva subunitat eIF2 $\beta$ .

## 6.2 Quantificació de la fosforilació d'eIF2 $\beta$ en les dianes per CK2

En estudis previs utilitzant *pirofosfat* marcat radioactivament amb l'isòtop  $^{32}\text{P}$  per fer marcatges cel·lulars es va veure que l'aminoàcid Ser<sup>2</sup> d'eIF2 $\beta$  era el lloc de fosforilació preferit per CK2, revelant-se com a menys prevalent la fosforilació que es produïa a la Ser<sup>67</sup> de la mateixa proteïna [114].

El primer que calia fer per entrar a veure com es comportava CK2 en la seva diana de fosforilació preferida *in vivo*, era caracteritzar el comportament de l'anticòs contra la forma fosforilada en la Ser<sup>2</sup> de la subunitat eIF2 $\beta$ , que ens va cedir el Dr. Oriano de la Universitat de Pàdua.

La Figura 2A, que mostra el resultat d'un assaig de fosforilació *in vitro*, ens demostrava en la seva part inferior la capacitat de l'anticòs per reconèixer la fosforilació en la Ser<sup>2</sup> d'eIF2 $\beta$  recombinant. Aquesta banda intensa correlacionava perfectament amb la banda apareguda amb l'autoradiografia, on es veia clara la incorporació del fosfat marcat amb l'isòtop  $^{32}\text{P}$ , i demostrava, una vegada més, que eIF2 $\beta$  és substrat exclusiu de l'holoenzim de CK2.

A més a més, la sobreexpressió del vector HA-eIF2 $\beta$ -wt, que codifica per la proteïna salvatge, va provocar un augment marcat de la detecció de la forma fosforilada d'eIF2 $\beta$ , correlacionant perfectament amb l'augment de la detecció d'eIF2 $\beta$  total que es va detectar. Aquesta correlació, però, no es va donar en el cas de la sobreexpressió dels mutants puntuals d'eIF2 $\beta$ , tant en la Ser<sup>2</sup> com en la Ser<sup>67</sup>.

La quantificació d'ambdues bandes respecte a eIF2 $\beta$  total presentaven un grau de fosforilació d'eIF2 $\beta$ , computant així la forma endògena i la sobreexpressada, menor que amb la control.

	1	5	10	15	20																			
eIF2 $\beta$ -wt	M	S	G	D	E	M	I	F	D	P	T	M	S	K	K	K	K	K	K	K	K	P	F	
eIF2 $\beta$ -S2A	M	A	G	D	E	M	I	F	D	P	T	M	S	K	K	K	K	K	K	K	K	K	P	F
eIF2 $\beta$ -FD	M	S	G	D	E	M	I	A	A	P	T	M	S	K	K	K	K	K	K	K	K	P	F	
eIF2 $\beta$ -4A	M	S	G	D	E	M	I	F	D	P	T	M	S	K	K	A	A	A	A	K	K	P	F	
eIF2 $\beta$ -S67A	M	S	G	D	E	M	I	F	D	P	T	M	S	K	K	K	K	K	K	K	P	F		
(24-45)	M	L	D	E	E	G	D	T	Q	T	E	E	T	Q	P	S	E	T	K	E	V	E	P	
	E	P	T	E	D	K	D	L	E	A	E	E	D	T	R	K	K	D	A	S	D	V		
		50	55	60	65																			

Destacava per sobre de tot, però, la baixada en la detecció de la forma fosforilada en la transfecció de la forma

mutant HA-eIF2 $\beta$ -S2A, reduint-se al voltant d'un 60 % (Figura 2B).

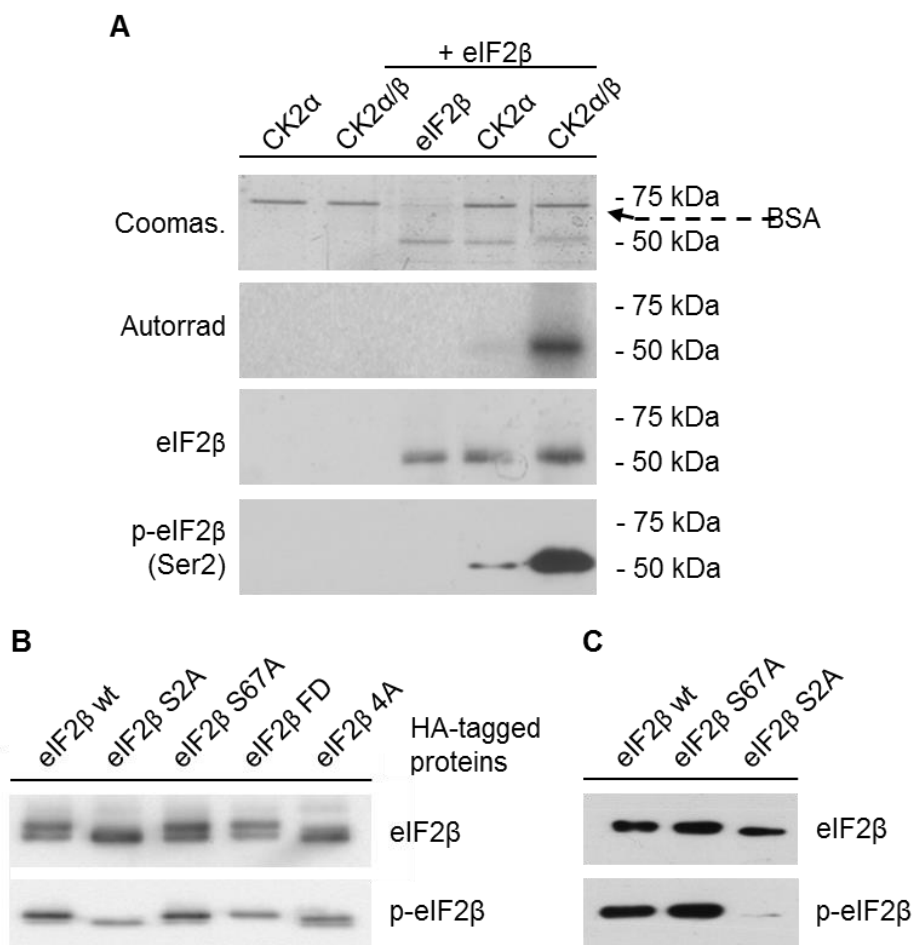
Per eliminar la possible interferència de la forma endògena, es va immunoprecipitar la proteïna transfectada amb una resina anti-HA-agarosa (Figura 2C).

En avaluar-ne el grau de fosforilació es va observar una disminució més marcada encara en el cas de la transfecció del vector HA-eIF2 $\beta$ -S2A, mantenint-se en la forma HA-eIF2 $\beta$ -S67A a uns nivells semblants que en el cas anterior, tal i com s'observava en la Figura 2B.

Resultats similars s'havien observat en estudis previs del grup en experiments fets en la línia cel·lular HeLa i marcatge radioactiu amb pirofosfat amb l'isòtop  $^{32}\text{P}$  [114], fet que validava la utilització de l'anticòs anti-p-eIF2 $\beta$  per tal de mesurar, de manera relativa, el grau de fosforilació d'eIF2 $\beta$  en extractes cel·lulars.

Aprofitant el coneixement obtingut també en la publicació *The regulatory beta subunit of protein kinase CK2 contributes to the recognition of the substrate consensus sequence. A study with an eIF2 beta-derived peptide* [96], en la qual diversos membres del grup van fer una aproximació *in vitro* del comportament i el paper CK2 en el reconeixement de les seqüències consens de fosforilació, es va afegir també a la Figura 2C l'estudi de la fosforilació *in vivo* de dos mutants més d'eIF2 $\beta$ .

Es tractava del mutant eIF2 $\beta$ -FD, on es substituïa un residu fenilalanina i un d'aspàrtic de les posicions 8 i 9 corresponents a la zona de contacte de la quinasa per dues alanines, i també eIF2 $\beta$ -4A, on es van substituir 4 residus de lisines també per alanines, de la 16 a la 19, del clúster àcid de l'extrem N-terminal d'eIF2 $\beta$ , necessari per optimitzar l'activitat de la quinasa.



**Figura 2 – Caracterització de l'anticòs anti-p-eIF2 $\beta$ .** **A)** Estudi de la fosforilació *in vitro* d'eIF2 $\beta$  en funció de la presència de les diverses subunitats de CK2. De dalt a baix: Tinció amb blau de comassie on s'observava l'absència i presència d'eIF2 $\beta$ . Autorradiografia en presència d'ATP marcat radioactivament amb <sup>33</sup>P. Les dues últimes imatges corresponien a l'anàlisi immunològica per *western blot*, primer revelat amb l'anticòs anti-eIF2 $\beta$  total i la segona imatge corresponia al revelat amb l'anticòs per eIF2 $\beta$  en la seva forma fosforilada a la Ser<sup>2</sup>. **B)** *Western blot* dels extractes cel·lulars obtinguts de la lisi de les cèl·lules HEK293T transfectades amb els vectors HA-eIF2 $\beta$ -wt, HA-eIF2 $\beta$ -S2A, HA-eIF2 $\beta$ -S67A, HA-eIF2 $\beta$ -FD i HA-eIF2 $\beta$ -4A i revelats amb els anticòs anti-eIF2 $\beta$  i anti-p-eIF2 $\beta$ . **C)** *Western blot* del resultat d'immunoprecipitar els extractes anteriors amb una resina unida a un anticòs monoclonal contra la hemaglutinina, que era el marcatge utilitzat pels vectors sobreexpressats.

Analitzant aquests dos casos en concret de sobreexpressió *in vivo* en cèl·lules HEK293T, la baixada de la fosforilació en el mutant eIF2 $\beta$ -FD era superior al 40 % de la fosforilació en la Ser<sup>2</sup>. En el cas del mutant eIF2 $\beta$ -4A, la baixada era més lleugera i fregava el 20 %.

Així mateix, i tal i com passava en el cas dels experiments *in vitro* [96] realitzats pel nostre grup, la diferent fosforilació de la Ser<sup>2</sup> depenia també del mutant en estudi, i això ens va corroborar que l'anticòs anti-p-eIF2 $\beta$  era sensible a aquest canvi.

Un cop vàrem ser capaços de mesurar la fosforilació d'eIF2 $\beta$ , calia veure com afectava el grau d'aquesta fosforilació a processos vitals per a la cèl·lula.

### 6.3 La mutació S2A d'eIF2 $\beta$ alterava el patró de sedimentació d'eIF3

S'ha vist que les alteracions en la síntesi de les proteïnes a nivell ribosomal podien venir provocades per alteracions en la formació dels complexos d'iniciació de la traducció proteica.

El mètode tradicional per poder seguir la formació d'aquests complexos d'iniciació de la traducció i de la formació de les subunitats ribosomals havia estat per mitjà de gradients de sedimentació [168], i així ho vàrem fer nosaltres.

La primera aproximació que es va fer per determinar la influència de la fosforilació de la Ser<sup>2</sup> d'eIF2 $\beta$  per a la formació dels complexos consistia en transfectar la línia cel·lular HEK293T amb dues formes recombinants d'eIF2 $\beta$ , HA-eIF2 $\beta$ -wt com a control i el mutant puntual pel lloc de fosforilació HA-eIF2 $\beta$ -S2A.

A partir d'aquest punt, una de les eines que ens van ser més útils per al nostre estudi van ser els gradients lineals de sucrosa, per la seva bona capacitat de separació i resolució de les proteïnes, sense alterar els complexos formats fins al moment de la lisi cel·lular.

Els extractes cel·lulars de les transfeccions es van analitzar per aquests gradients seguint el protocol detallat en l'apart de materials i mètodes d'aquesta tesi. En aquest cas es va treballar amb gradients de sedimentació lineals, 5 % - 45 % de sucrosa (Figura 3).

En treballar en l'estudi dels complexos d'iniciació de la traducció, calia que poguéssim ubicar de manera acurada la presència de les subunitats ribosomals 40S i 80S, i es va fer seguint la presència de la proteïna ribosomal rpS6, que forma part de la subunitat 40S del ribosoma, i que en formar-se el ribosoma actiu, es troba formant part del complex 80S.

La Figura 3 ens mostra que la línia transfectada amb el vector HA-eIF2 $\beta$ -wt, tenia una presència de la proteïna recombinant en les fraccions més lleugeres de gradient (de la fracció 1 a la 4), però que es podia seguir detectant fins arribar a la fracció 8-10, on solapava amb el pic de 40S.

La distribució d'eIF2 $\beta$  total correlacionava força bé amb l'HA-eIF2 $\beta$ -wt (detectat amb l'anticòs anti-HA<sub>tag</sub>), però la forma fosforilada d'eIF2 $\beta$ , p-eIF2 $\beta$ , no es detectava més enllà de la fracció 6 i per tant no solapava amb la regió de la subunitat 40S (Figura 3A).



La detecció de la forma fosforilada, a banda de no trobar-se a les fraccions corresponents a la subunitat 40S, mostrava una marcada disminució a les fraccions inicials, on probablement detectàvem la fosforilació endògena de la Ser<sup>2</sup> de la proteïna mutant. Destacava, però, la presència d'una petita quantitat d'eIF2 $\beta$  a la part corresponent a la regió de la subunitat ribosomal 80S, al voltant de la fracció 14.

Per tal de poder-ho estudiar, vàrem monitoritzar el comportament de dues de les subunitats del *core* d'eIF3, eIF3b i eIF3c, que al mateix temps són substrats de CK2 (Figura 3B).

El comportament de les dues subunitats en el gradient, on es van estudiar les HEK293T transfectades amb HA-eIF2 $\beta$ -wt, era força similar. Apareixien d'una manera abundant a partir de la fracció 4 fins a la 6, deixant un rastre que entrava fins a fraccions més denses del gradient arribant a solapar les fraccions on trobàvem també la proteïna ribosomal RPS6. Amb aquest solapament podíem donar per fet que les subunitats d'eIF3 arribaven a formar part del complex de preiniciació 40S.

Pel que fa a les cèl·lules transfectades amb HA-eIF2 $\beta$ -S2A, les bandes de proteòlisi de les subunitats d'eIF3 estudiades van augmentar i van aparèixer al voltant dels 100 kDa, uns 10 kDa per sota de la mida d'eIF3b i eIF3c, que ronda els 110 kDa.

Al mateix temps, es va observar una desaparició important de la zona on localitzaríem el 40S. Tot i així, petites traces d'eIF3b i eIF3c s'hi seguien detectant (Figura 3B).

Aquests resultats ens van portar a pensar que l'absència de la fosforilació en la Ser<sup>2</sup> de la subunitat eIF2 $\beta$  provocava una desestructuració dels complexos de preiniciació de la síntesi proteica.

#### **6.4 La inhibició farmacològica de la proteïna quinasa CK2 alterava els complexos de preiniciació i la síntesi proteica**

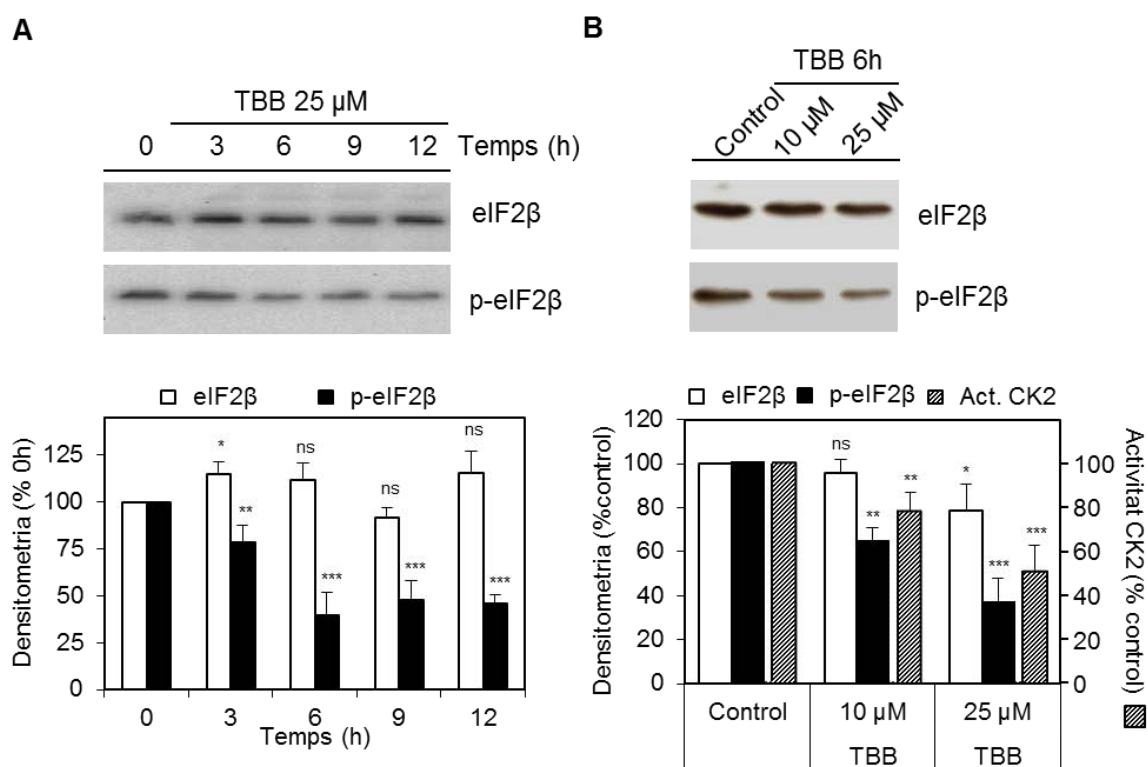
L'aproximació plantejada fins al moment de la sobreexpressió de les formes recombinants d'HA-eIF2 $\beta$  podia generar algunes suspicàcies per la integració parcial de les proteïnes recombinants al trímer d'eIF2 [114]. Això podia produir que quedi una part significant de la proteïna lliure i podia ser que interferís amb la interacció d'eIF2 amb altres factors d'iniciació de la traducció o també amb la mateixa activitat de CK2 [104] o de la proteïna fosfatasa 1 (PP1) [180].



Per tal d'intentar resoldre aquests dubtes, es van encarar els següents experiments des del punt de vista farmacocinètic, tot utilitzant 4,5,6,7-tetrabromobenzotriazole, a partir d'aquí TBB, com a com a inhibidor altament específic de CK2 [181].

Es van dur a terme també altres experiments amb el 2-dimethylamino-4,5,6,7-tetrabromobenzimidazole, DMAT, [182] un altre inhibidor específic de la proteïna quinasa CK2, però en estudis comparatius TBB es va mostrar més eficient en la línia HEK293T.

El tractament amb TBB sobre cèl·lules HEK293T asincròniques va revelar una relació dosi-dependent de la inhibició CK2 i la seva activitat, que es va detectar sobre extractes crus amb un pèptid específic com a substrat de la reacció.



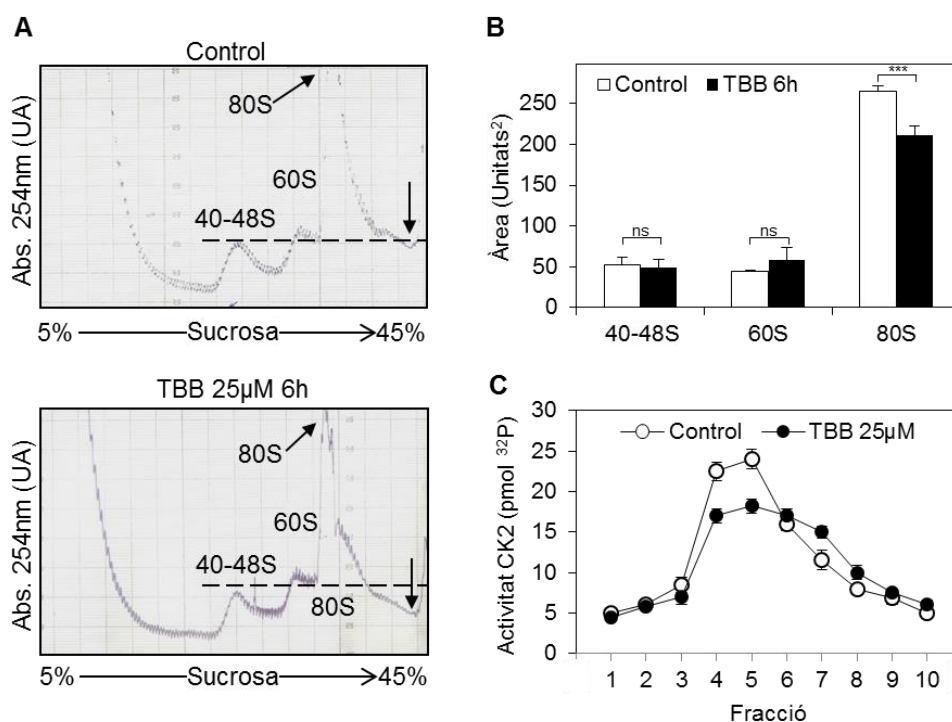
**Figura 4 – Inhibició farmacològica de CK2.** **A)** Anàlisi per *western blot* dels extractes cel·lulars d'HEK293T després d'un experiment de dosi resposta amb de 4,5,6,7-tetrabromobenzotriazole, TBB, revelat amb anti eIF2β i p-eIF2β. **B)** Extractes cel·lulars de la mateixa línia tractats amb diferents dosis de TBB, durant 6 hores i analitzats per la tècnica de *western blot* utilitzant els mateixos anticossos. Amb trama blanc i negre la representació de l'activitat de CK2 dels mateixos extractes cel·lulars, representat respecte a l'activitat total del control. A la part inferior de les dues seccions, la quantificació de les bandes on es comparava la intensitat de les bandes d'eIF2β i p-eIF2β, normalitzats per la situació control. IC: ns p>0,05, 95 % p<0,05 (\*), 99 % p<0,01 (\*\*) i 99,9 % p<0,001 (\*\*\*) n=3, calculats respecte la condició temps 0 en A) i per la condició control en B).

Però el més interessant d'aquesta inhibició per TBB se'ns va mostrar en la disminució de la fosforilació d'eIF2 $\beta$ , que correlacionava gairebé a la perfecció la disminució d'activitat de la proteïna quinasa CK2 (Figura 4B).

Això donava suport a la teoria que situa CK2 com la proteïna clau per la seva fosforilació, i ens proposava l'anticòs usat per detectar la forma fosforilada d'eIF2 $\beta$ , com a bona manera per monitoritzar l'activitat de CK2 *in vivo*.

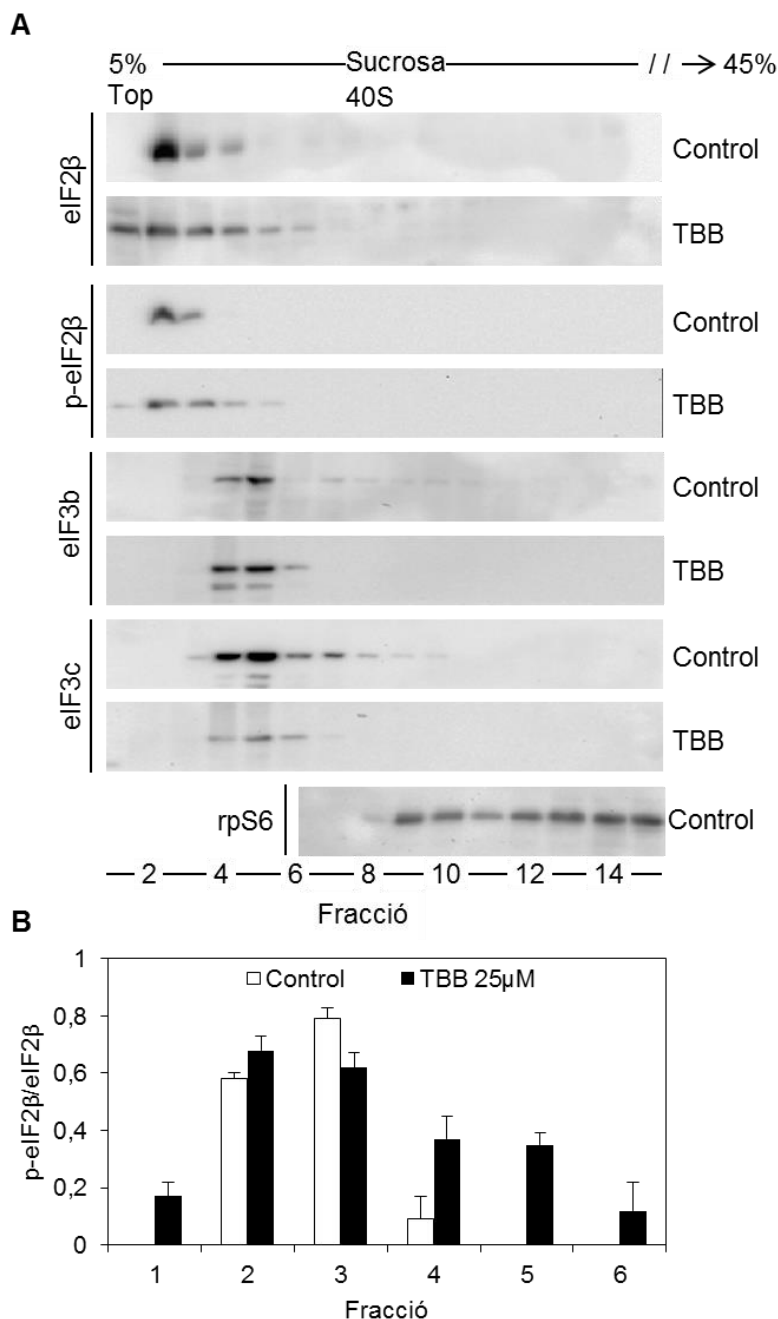
Amb els resultats obtinguts en aquesta primera part de l'apartat, es van fixar les condicions de treball amb l'inhibidor TBB quan es treballava amb cèl·lules HEK293T, que va ser de 25  $\mu$ M durant 6 hores de tractament a 37°C.

Un cop es va veure la utilitat de l'anticòs anti-p-eIF2 $\beta$ , es va estudiar com s'alterava el patró de sedimentació d'eIF2 i eIF3 en inhibir l'activitat de la proteïna quinasa CK2.



**Figura 5 – Inhibició i efecte sobre els complexos de preiniciació.** **A)** Perfils d'absorció a 254 nm, longitud d'ona corresponent al màxim d'absorbància de l'RNA ribosomal, dels gradients lineals entre el 5 i el 45 % de sucrosa, després de centrifugar-los durant 15 hores a 28.000 rpm. Les diverses sagetes indiquen els canvis dels punts principals del gradient. D'esquerra a dreta, pic del 40-48S que correspon als complexos de preiniciació, pic de la subunitat 60S, pic del ribosoma complet o 80S i la zona final on hi trobàvem els ribosomes actius, que presenten un coeficient de sedimentació tant gran per la presència de proteïnes en traducció unides als ribosomes. **B)** Gràfic resultant de la integració dels diversos pics d'absorbància a 254 nm, en les dues situacions. En blanc els gradients obtinguts de la mostra Control i en negre l'obtingut de les mostres tractades amb TBB 25  $\mu$ M durant 6 hores. **C)** Perfil d'activitat de CK2 al llarg de les 10 primeres fraccions del gradient seguint el protocol descrit en els materials i mètodes. IC: ns  $p > 0,05$ , 95 %  $p < 0,05$  (\*), 99 %  $p < 0,01$  (\*\*) i 99,9 %  $p < 0,001$  (\*\*\*) calculats entre condicions.  $n=3$

Tal i com es va fer en apartats anteriors, es va repetir el tractament de 6 hores amb 25  $\mu$ M TBB i se'n van carregar els extractes cel·lulars en un gradient lineal de sucrosa (5-45 % pes/volum) i es va centrifugar tal i com indica el protocol de materials i mètodes, durant 15 hores a 100.000 g i 4°C.



**Figura 6 – Inhibició i efecte sobre la sedimentació. A)** Anàlisi per *western blot* de les 15 primeres fraccions del gradient lineal del 5 % al 45 % de sucrosa obtingudes després de tractar la línia cel·lular HEK293T amb l'inhibidor de CK2 TBB a una concentració de 25  $\mu$ M al llarg de 6 hores. La detecció immunològica es va fer amb 4 anticossos diferents per les 15 primeres fraccions, com van ser anti-eIF2 $\beta$ , anti-p-eIF2 $\beta$ , anti-eIF3b i eIF3c. Just a sota hi trobem un fragment del *western blot* contra la proteïna ribosomal rpS6 que ens va permetre ubicar les subunitats ribosomals. **B)** Al peu, gràfica comparativa de les 6 primeres fraccions del gradient on es mostrava la diferent ràtio eIF2 $\beta$  fosforilat i total, calculades després de quantificar les bandes dels *western blot* superiors amb el software Quantity One de BioRad (n=3).

L'anàlisi del perfil d'absorbància a 254 nm (Figura 5A), màxim d'absorbància de l'RNA ribosomal, que vàrem obtenir de manera contínua en fraccionar el gradient, ens mostrava una disminució del pic de 80S i també de la presència de polisomes o ribosomes actius a la zona més densa del gradient. Així mateix, trobàvem un lleuger augment del pic del 60S, corresponent al ribosoma encara immadur.

Aquest resultat mostrava que el tractament amb TBB provocava una alteració en la formació dels complexos d'iniciació de la traducció, estrictament necessaris per a la síntesi proteica (Figura 5A i Figura 5B).

Així mateix, a la Figura 5C, es pot veure la distribució de l'activitat de CK2 al llarg del gradient i s'apreciava una davallada clara entre la fracció 4 i la 6, que superava el 25 %, mostrant-se lleugerament més present a les fraccions més denses.

Un cop es van veure els perfils a 254 nm i la distribució de l'activitat de CK2, calia també analitzar com es comportaven els diversos factors eIFs al llarg del gradient de sedimentació (Figura 6 – a la pàgina anterior).

L'experiment que es va fer amb cèl·lules HEK293T control, no tractades amb l'inhibidor TBB, eIF3b i eIF3c apareixien majoritàriament a les fraccions 4, 5 i 6, amb una cua cap a fraccions més internes, i arribaven a solapar la regió establerta com a 40S (Figura 6A).

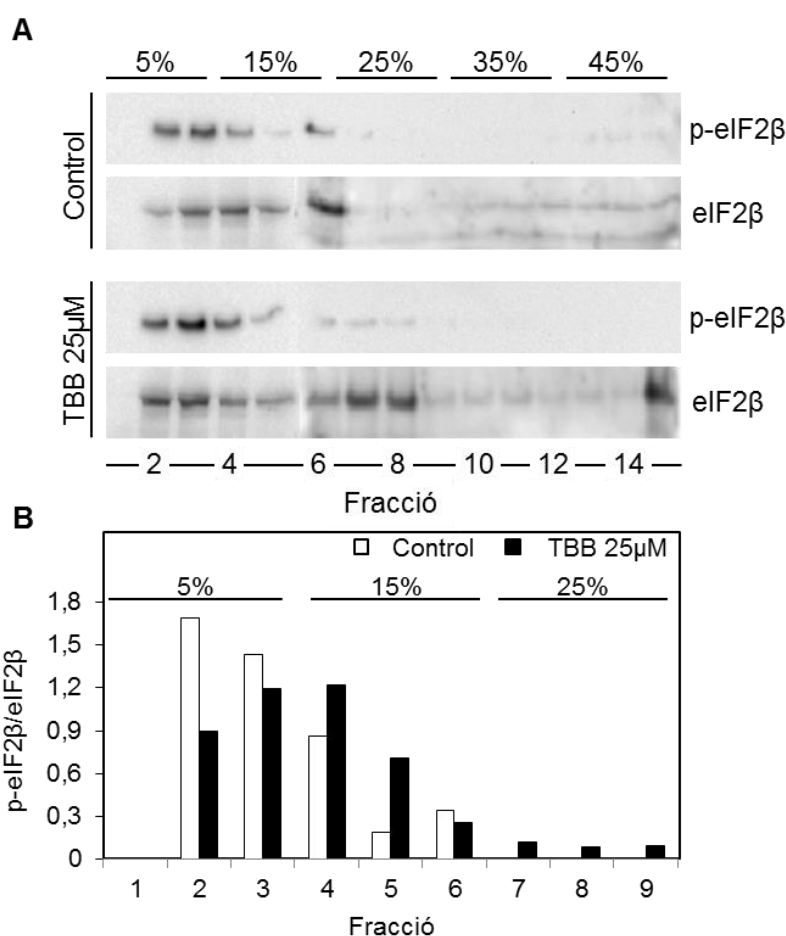
Es va veure també que el tractament amb TBB provocava una desaparició d'eIF3b i eIF3c de les fraccions més denses, fins i tot mostrant una desaparició d'eIF3c en les fraccions on, en la situació control, era més abundant.

Si s'analitzava el patró de sedimentació d'eIF2 $\beta$  que es va obtenir, s'observava un pic marcat entre la fracció 2 i 3 en el cas de les cèl·lules HEK293T sense tractar, i pràcticament desapareixia de les fraccions més internes del gradient. En canvi, el gradient de cèl·lules tractades amb TBB mostrava una distribució d'eIF2 $\beta$  molt més difusa, de la fracció 1 a la 6, solapant així la regió de les regions eIF3.

Per completar l'estudi, calia veure com es comportava la forma fosforilada, p-eIF2 $\beta$ . El màxim de la seva presència es trobava a les fraccions 2 i 3, però es van veure variacions en la ràtio p-eIF2 $\beta$ /eIF2 $\beta$  (Figura 6B) que suggeria que podrien existir dues poblacions diferenciades d'eIF2 $\beta$  en funció del seu grau de fosforilació.

Amb l'objectiu de corroborar aquestes dues poblacions d'eIF2, es van preparar uns gradients de sucrosa discontinus, amb llits que corresponen al 5:15:25:35:45 %, sempre en relació pes/volum, de sucrosa (Figura 7). Aquests percentatges responen a la voluntat de comprovar si la població d'eIF2 $\beta$  que es troba entre el 5 % i el 20 % era artefactual o realment era així.

L'anàlisi per *western blot* d'aquestes mostres ens deixa que, de mitjana, la ràtio de fosforilació en les fraccions 2, 3 i 4 de la mostra control era de 1,35i amb les cèl·lules tractades amb TBB s'obté un promig de 1,07 (Figura 7).

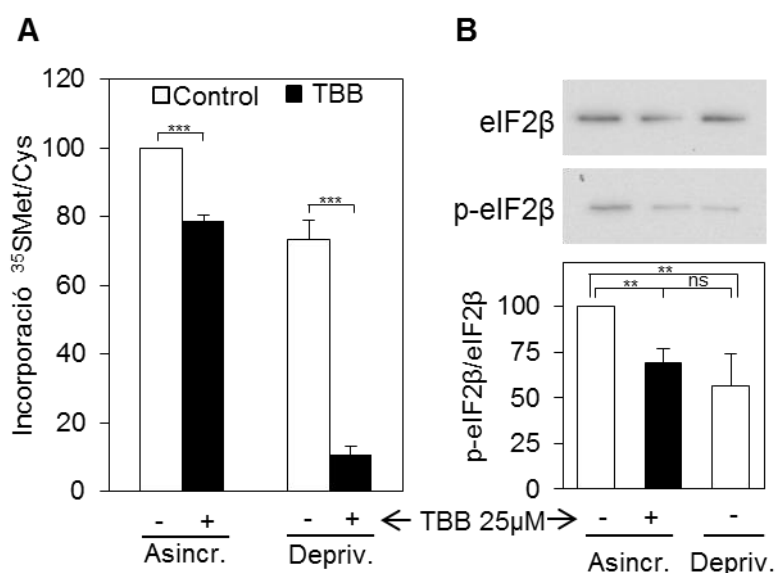


**Figura 7 – Gradient discontinu de sucrosa. A)** Anàlisi immunològica per *western blot* de les fraccions obtingudes després de fraccionar els gradients discontinus al 5:15:25:35:45 % de sucrosa, havent-los centrifugat durant 15 hores a 100.000 g, on s’hi van carregar els extractes “Control”, on només es van tractar les cèl·lules HEK293T amb DMSO i per altra banda, l’extracte tractat amb TBB 25 μM durant 6 hores. Tal i com indica la figura, s’utilitzaven els dos anticossos contra eIF2 $\beta$ , per la seva forma fosforilada i per la seva forma total. **B)** Gràfic obtingut després de calcular la ràtio entre la forma fosforilada d’eIF2 $\beta$  i la seva forma total a partir de la quantificació de les 9 primeres fraccions del gradient, corresponent a les densitats de 5 %, 15 % i 25 % de sucrosa, per tal d’intentar acotar les dues subpoblacions d’eIF2 $\beta$  (n=2).

Per altra banda, la ràtio de fosforilació de les fraccions 6 a 8 va ser de 0,29 i 0,13, respectivament. Això confirma que formes hipofosforilades d'eIF2 $\beta$  estan presents en les fraccions que sedimenten més profundament en el gradient (Figura 7).

Fins aquell moment havíem vist l'efecte que tenia l'inhibidor farmacològic TBB sobre l'activitat de la proteïna quinasa, tant en la fosforilació de la Ser<sup>2</sup> de complex d'iniciació de la traducció eIF2 $\beta$ , com en l'alteració del patró de sedimentació del mateix eIF2 $\beta$  com de les subunitats eIF3b i eIF3c i també es modificava el perfil de sedimentació de l'RNA ribosomal.

Per acabar de corroborar aquests resultats, es va fer un estudi de marcatge radioactiu amb l'isòtop <sup>35</sup>S, i se'n va mesurar la incorporació a les proteïnes noves sintetitzades en forma de metionina marcada amb <sup>35</sup>S-Met, en diverses condicions d'inhibició de CK2 amb TBB.



**Figura 8 – Marcatge amb <sup>35</sup>S-Met.** **A)** Estudi realitzat sobre cèl·lules HEK293T sembrades de manera asincrònica en un medi que contenia 10 % en FBS. En la condició de privació (depriv. a la figura) van estar 16 hores en un medi pobre, amb el 0,5 % d'FBS. En aquestes condicions es va dur a terme una inhibició amb TBB 25 $\mu$ M durant 3 hores. El marcatge cel·lular es va fer amb una solució de <sup>35</sup>S-Met/Cys a 2mCi/200  $\mu$ L durant una hora, i es va analitzar amb el comptador de centelleig. El gràfic es va normalitzar al respecte la condició de cèl·lules creixent de manera asincrònica i sense inhibidor. **B)** Les mateixes condicions es van reproduir sense el marcatge radioactiu i es van analitzar per *western blot* amb els anticossos per eIF2 $\beta$  total i per la seva forma fosforilada a la Ser<sup>2</sup>. El gràfic inferior indica la ràtio p-eIF2 $\beta$ /eIF2 $\beta$  després de quantificar les bandes del *western blot* anterior. El gràfic es va normalitzar al respecte la condició de cèl·lules creixent de manera asincrònica i sense inhibidor. IC: ns p>0,05, 99 % p<0,01 (\*\*) i 99,9 % p<0,001 (\*\*\*) (n=3), calculades entre les dues condicions en A) i per tots els valors en B).

En aquest experiment puntual, el tractament de les cèl·lules HEK293T es va reduir a la meitat, de 6 hores a 3 hores, ja que en la condició de cèl·lules deprivades a 6 hores es produïa una mort pràcticament total (Figura 8A).

Tot i així, a 3 hores de tractament amb TBB i amb deprivació les cèl·lules es veien força afectades, mostrant una mort del votant un 65 % de les cèl·lules. Per aquest motiu, a l'hora de fer l'estudi per *western blot* es va descartar aquesta condició perquè no era representativa (Figura 8B).

Amb el medi de cultiu complet i en creixement asincrònic, la mort pel tractament de TBB era pràcticament imperceptible com en la resta d'experiments.

La inhibició de CK2 amb TBB va resultar amb una disminució del 21 % en la incorporació de metionina marcada amb l'isòtop sofre 35, un nivell molt semblant al que va mostrar la condició on el cultiu estava deprivat.

Pel que fa a l'activitat de CK2 sobre el seu substrat eIF2 $\beta$ , es va veure com la ràtio de fosforilació en el cas de la inhibició es reduïa un 28 % i superava lleugerament el 35 % en el cas de les cèl·lules deprivades i no inhibides.

Això ens suggeria que amb les nostres condicions d'inhibició amb TBB per CK2 en les cèl·lules HEK293T, la traducció de noves proteïnes es reduïa gairebé a l'activitat metabòlica basal de les cèl·lules.

## **6.5 El silenciament transitori de CK2 $\alpha$ i CK2 $\beta$ provocava un desassemlatge dels complexos d'inici de la traducció**

Fins aquí havíem vist l'efecte del l'inhibidor a l'activitat de CK2 a l'hora d'alterar tots els patrons del nostre estudi, des de la fosforilació de proteïnes clau en el *Multifactor Complex*, l'alteració del patró de sedimentació de les diverses subunitats del ribosoma i també de les proteïnes que en formen part.

El pas següent era veure si l'efecte que tenia l'inhibidor farmacològic també es produïa si alteràvem el patró d'expressió gènica de la quinasa en qüestió. Per fer-ho es va estudiar com afecta el silenciament transitori de les dues subunitats de CK2 i es van transfectar a HEK293T els siRNA de CK2 $\alpha$  i CK2 $\beta$ , amb els seus controls corresponents (Més dades tècniques de la seqüència al punt 5.2.1 de materials i mètodes).

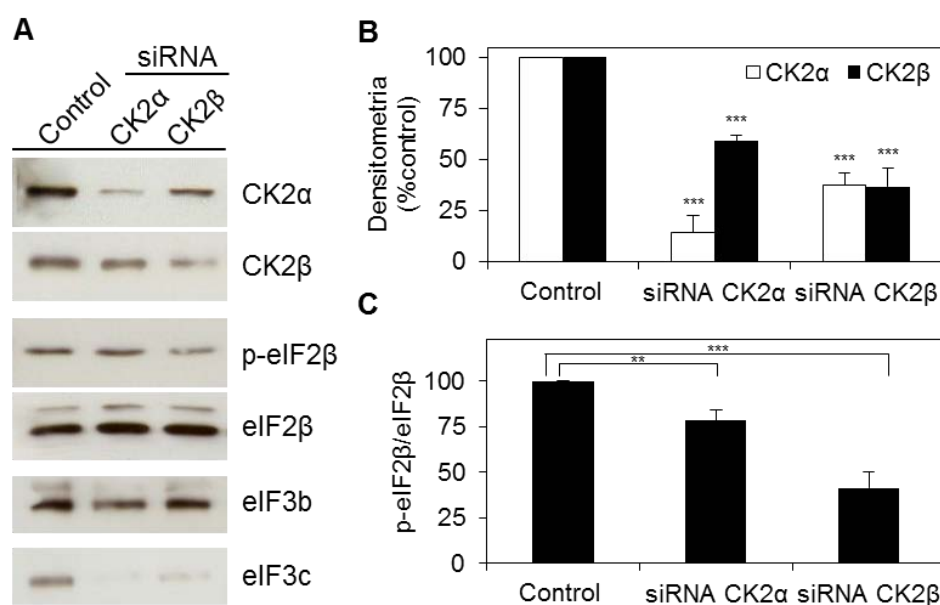
Per tal d'assegurar que el silenciament havia estat efectiu, el primer que es va fer va ser comprovar l'efecte directe sobre l'expressió proteica tal i com s'observava a la Figura 9.

En l'anàlisi per *western blot* Figura 9A, s'observava la clara baixada de les subunitats de CK2 silenciades, al voltant d'un 20 % en el cas de CK2 $\alpha$  i d'un 60 % en el de CK2 $\beta$  (Figura 9B).

En la introducció d'aquesta tesi, ja s'ha fet referència al fenomen que es produeix quan una de les dues subunitats de CK2 es troba disminuïda, la compensació de subunitats, i aquí també s'hi observava.

El silenciament de CK2 $\alpha$ , provocava una baixada compensatòria de l'expressió de la seva subunitat reguladora d'un 40 %, i en el cas del silenciament de CK2 $\beta$ , la baixada de la subunitat catalítica emulava pràcticament la de l'altre membre de tetràmer i també s'aproximava al 60 %.

Tot i el fenomen de la compensació, aquest resultat reforçava una vegada més la teoria que la subunitat CK2 $\beta$  podia presentar altres funcions a la cèl·lula a banda de la seva activitat reguladora de CK2 [96].



**Figura 9 – El silenciament de CK2 alterava la fosforilació d'eIF2 $\beta$ .** **A)** *Western blots* realitzats contra CK2 $\alpha$ , CK2 $\beta$ , eIF2 $\beta$ , p-eIF2 $\beta$ , eIF3c i eIF3b sobre els extractes cel·lulars procedents de cèl·lules HEK293T tractades amb 25 nM siRNA *Scramble*, siRNA CK2 $\alpha$  i siRNA CK2 $\beta$  (siGENOME SMARTpool, Dharmacon®). **B)** Densitometria dels *western blots* de CK2 $\alpha$  i CK2 $\beta$  per poder veure l'efecte del silenciament. **C)** Gràfic de la ràtio obtinguda de la quantificació de les bandes del *western blot* de la fosforilació d'eIF2 $\beta$  respecte la proteïna total, que es veu afectada pel silenciament. IC: 99 % p<0,01 (\*\*) i 99,9 % p<0,001 (\*\*\*) calculats respecte la condició Control en B) per cada sèrie, i per tots els valors en C).

Pel que fa als efectes que aquest silenciament tenia sobre els factors d'iniciació de la traducció, calia primer fixar-nos en el que utilitzem indirectament com a comprovant de l'activitat de CK2.



La subunitat eIF2 $\beta$  patia una baixada de la ràtio de proteïna fosforilada respecte a proteïna total del voltant d'un 22 % en el cas del silenciament de CK2 $\alpha$  i d'un 59 % en el cas del silenciament de CK2 $\beta$ , mostrant així que tot i la important baixada de la subunitat catalítica, l'holoenzim format seguia essent capaç de fosforilar els seus substrats (Figura 9C).

Les subunitats d'eIF3 que es van estudiar també patien canvis. Pel que fa a eIF3b s'observava una disminució del 24 % en cas del silenciament de CK2 $\alpha$  i era pràcticament imperceptible quan es silenciava CK2 $\beta$ .

Però sens dubte, el canvi més important era la pràctica desaparició de la subunitat eIF3c en ambdós casos. En el cas del silenciament de CK2 $\alpha$ , eIF3c es convertia en indetectable, i només se n'apreciava un 20 % respecte a l'inicial en el cas del silenciament de la subunitat beta (Figura 9A a baix).

Val la pena recordar que la subunitat eIF3c és substrat de CK2 i, per la posició de les seves dianes de fosforilació, se li atribueixen funcions d'estabilització del complex eIF3. Una de les hipòtesis que es va proposar per aquesta disminució era que la no fosforilació de la proteïna provocava que es desancorés del complex i era degradada. Aquest extrem, però, no es va poder confirmar experimentalment.

Un cop es va veure l'afectació del silenciament de les subunitats de CK2 sobre els extractes es va estudiar el comportament de l'activitat (Figura 10A) i la distribució de les dues subunitats en les fraccions del gradient on eren més abundants (Figura 10B).

Si analitzem la Figura 10 en conjunt, en la situació control detectàvem el pic màxim d'activitat de CK2 entre la fracció 4 i 6, essent detectable cap a la regió on començàvem a detectar el complex 40S, al voltant de la fracció 8 i 9. I, com era d'esperar, la distribució de les dues subunitats de CK2 $\alpha$  i CK2 $\beta$  a nivell de detecció per *western blot* correlacionaven perfectament amb el pic d'activitat (Figura 10B).

Analitzant els resultats obtinguts amb les cèl·lules HEK293T silenciades per CK2 $\alpha$ , es va veure una baixada de l'activitat de CK2 a les primeres fraccions, sobretot a les que es corresponen amb el pic d'activitat en la situació control. Tot i això, la baixada més marcada es produïa a les fraccions internes del gradient, a partir de 6, i per tant no es detectava a la regió del 40S.

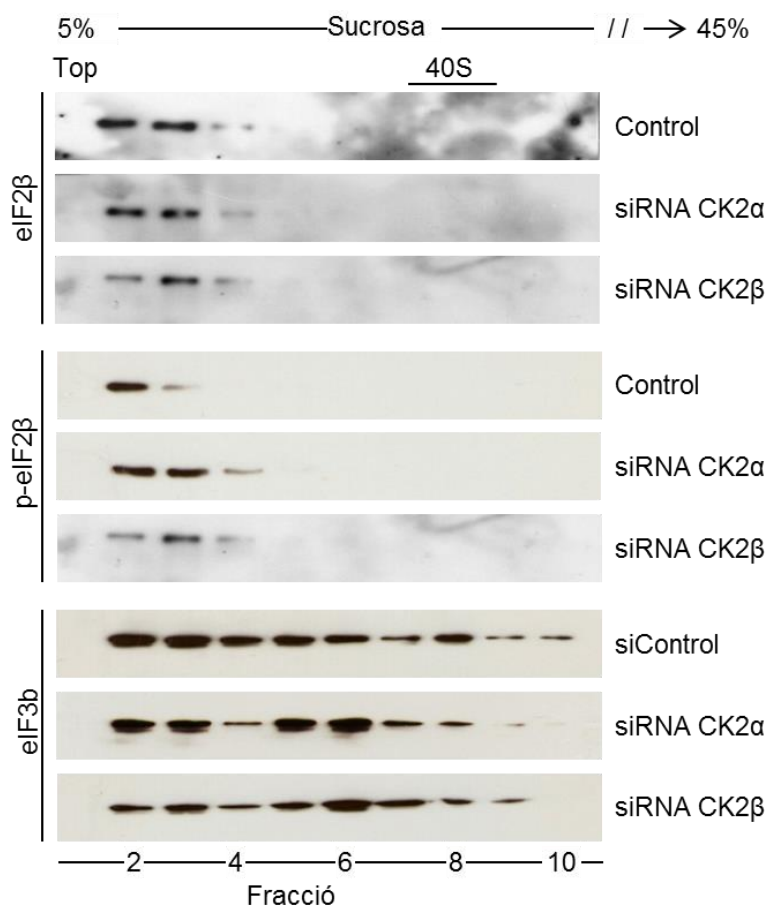
El comportament de CK2 $\beta$  en aquest cas es tradueix en un desplaçament cap a les fraccions menys denses, i arribava a solapar les fraccions que contenen la poca CK2 $\alpha$  que s'expressava (Figura 10B).



seguia detectant en regions de pes molecular més elevat, indicant així que la subunitat reguladora podia unir-se a altres complexos d'elevat pes molecular que no siguin la seva subunitat catalítica canònica. Aquest resultat recolza la teoria que diu que CK2 $\beta$  és necessària per al bon assemblatge dels complexos d'inici de la traducció proteica.

Un cop analitzada l'afectació del perfil de sedimentació i de l'activitat de CK2 associada, calia veure com es comporten les proteïnes substrat de la quinasa.

Es va observar molt poca afectació als nivells d'eIF2 $\beta$  total, però l'afectació màxima es detectava en la forma fosforilada d'eIF2 $\beta$ , que disminuïa marcadament en el cas del silenciament de la subunitat reguladora, CK2 $\beta$ . En aquest cas, la disminució de la ràtio entre la forma fosforilada i la forma total, pràcticament es reduïa un 50 %, confirmant-se una vegada més la necessitat de CK2 $\beta$  per tal d'obtenir una fosforilació completa (Figura 11).



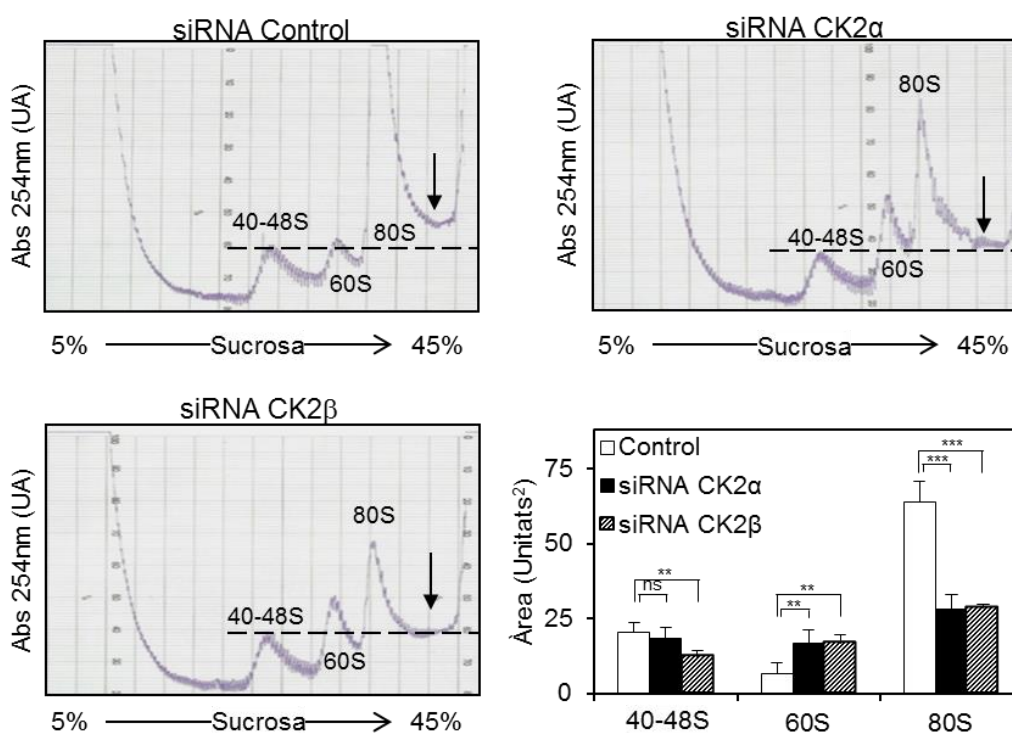
**Figura 11 – L'efecte del silenciament de CK2 sobre els eIFs.** Anàlisi de les 10 primeres fraccions dels gradients de sucrosa 5-45 % (p/v) obtingudes després de carregar-hi els extractes cel·lulars de cèl·lules HEK293T transfectades amb els siRNA *scramble*, siRNA de CK2 $\alpha$  i siRNA de CK2 $\beta$ . Anàlisi per *western blot* de la distribució i de la fosforilació de la subunitat eIF2 $\beta$  i de la seva forma fosforilada. També s'ha fet l'anàlisi per *western blot* d'eIF3b en les mateixes mostres.

L'afectació en eIF3, però, era més marcada, essent molt important sobretot en el cas d'eIF3c, que pràcticament desapareixia en produir-se la depleció de CK2. Pel que fa a eIF3b, s'apreciava un lleuger decreixement amb el siRNA CK2 $\alpha$ , i es mostrava pràcticament inalterat amb el siRNA CK2 $\beta$ .

Per acabar, calia també fer una ullada als perfils de 254 nm obtinguts de manera contínua en fraccionar el gradient, que ens ensenyaven la distribució de l'RNA ribosomal al llarg del gradient (Figura 12).

Després d'establir la condició control, el vam comparar amb la depleció de cada una de les subunitats. El siRNA de CK2 $\alpha$  provocava una disminució molt marcada del pic de 80S reduint-lo a la meitat de la seva àrea, i al mateix temps es va observar un augment de gairebé tres vegades de l'àrea del pic del 60S acompanyat d'un lleuger decreixement en el pic de 40S.

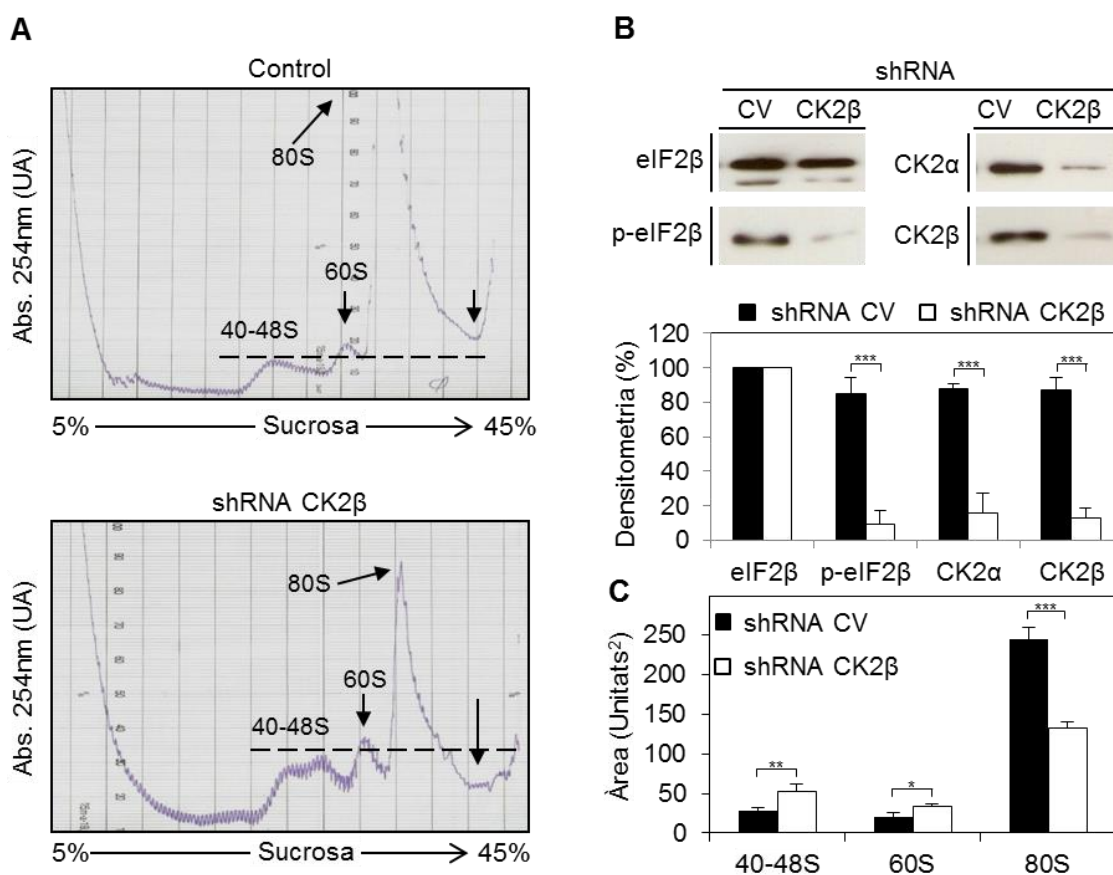
De forma pràcticament homòloga, el siRNA de CK2 $\beta$  produïa un efecte similar, tot i que destacava un decreixement més marcat del pic de 40S.



**Figura 12 – L'efecte del silenciament de CK2 als perfils de sedimentació.** Perfils d'elució obtinguts a 254 nm després de fraccionar els gradients lineals del 5 al 45 % (p/v) de sucrosa carregats amb els extractes de cèl·lules HEK293T tractades amb siRNA *scramble*, siRNA de CK2 $\alpha$  i siRNA CK2 $\beta$ , esmentats en la Figura 9. La sageta indica la posició teòrica dels ribosomes actius, segons la bibliografia. El gràfic representa la integració de cada pic analitzat, la subunitat petita del ribosoma i els complexos de preiniciació de la traducció 40-48S, la subunitat gran del ribosoma 60S i el ribosoma actiu 80S. IC: ns  $p > 0,05$ , 99 %  $p < 0,01$  (\*\*) i 99,9 %  $p < 0,001$  (\*\*\*) calculats per cada condició respecte el seu propi control en cada pic.

Aquestes alteracions als pics de sedimentació i als perfils de sedimentació van correlacionar amb el que s'havia observat anteriorment, on ja es va intuir que era necessària la presència de la forma sencera de l'holoenzim de CK2 per tal que els complexos d'iniciació evolucionessin fins a un ribosoma completament actiu. Arribats a aquest punt es va considerar que convenia intentar obtenir línies silenciades de manera estable contra les subunitats de CK2 i es va optar per la tècnica de la inclusió d'un shRNA al genoma cel·lular.

El Dr. Jordi Vilardell, responsable de la creació d'aquestes línies cel·lulars al laboratori, va intentar diverses estratègies per obtenir el silenciament estable per les dues subunitats de CK2 com havia aconseguit amb altres línies cel·lulars (HK-2 i 786-O), però amb HEK293T només es va poder fer amb la subunitat CK2 $\beta$ , ja que la línia amb la subunitat CK2 $\alpha$  tenia una viabilitat molt baixa.



**Figura 13 – L'efecte del silenciament estable de CK2 $\beta$**  **A)** Perfils d'elució registrats a 254 nm per tal de detectar la presència d'RNA ribosomal al llarg del gradient de sucrosa 5-45 % (p/v) després de carregar-hi els extractes cel·lulars de dues línies d'HEK293T, una d'elles expressava el shRNA de CK2 $\beta$  i l'altra feia el mateix amb el vector de control. **B)** Anàlisi per *western blot* dels lisats de cèl·lules HEK293T transfectades de manera estable amb el shRNA de CK2 $\beta$  i amb el seu vector control (CV). Les mostres es van analitzar amb els anticossos contra les dues subunitats de CK2, CK2 $\alpha$  i CK2 $\beta$  i també contra eIF2 $\beta$  i la seva forma fosforilada. A sota, densitometria de les bandes obtingudes, representada en % respecte el control, per analitzar quantitativament l'efecte del silenciament estable. **C)** Gràfic obtingut de la integració dels diversos pics obtinguts ens els perfils d'absorbància a 254 nm. IC: ns  $p > 0,05$ , 95 %  $p < 0,05$  (\*), 99 %  $p < 0,01$  (\*\*) i 99,9 %  $p < 0,001$  (\*\*\*) calculats entre els dos vectors transfectats.

El primer que es va observar a la Figura 13B era la necessitat de les dues subunitats per tenir un holoenzim estable. Es veu una disminució marcada de CK2 $\alpha$  a la línia tractada amb shRNA per CK2 $\beta$ , tal i com havíem pogut observar unes pàgines més enrere amb el silenciament transitori fet amb siRNA de CK2 $\beta$  (Figura 9A).

Les condicions de l'estudi es van ajustar per tal que la reducció de la subunitat CK2 $\beta$  fos al voltant del 80 %. Això provocava una reducció superior al 70 % de la subunitat CK2 $\alpha$ , però tot i així hi havia una quantitat suficient de proteïna per formar l'holoenzim. Per tal de corroborar que l'holoenzim format en les cèl·lules tractades amb shRNA de CK2 $\beta$  seguia sent activa, es va estudiar també el grau de fosforilació d'eIF2 $\beta$  (Figura 13B).

La línia silenciada amb shRNA per CK2 $\beta$  va mostrar una reducció superior al 85 % de la relació p-eIF2 $\beta$  contra la proteïna total. Això ens va mostrar que la proteïna CK2 que es formava a les cèl·lules, tot i ser menor en quantitat, seguia sent activa (Figura 13B).

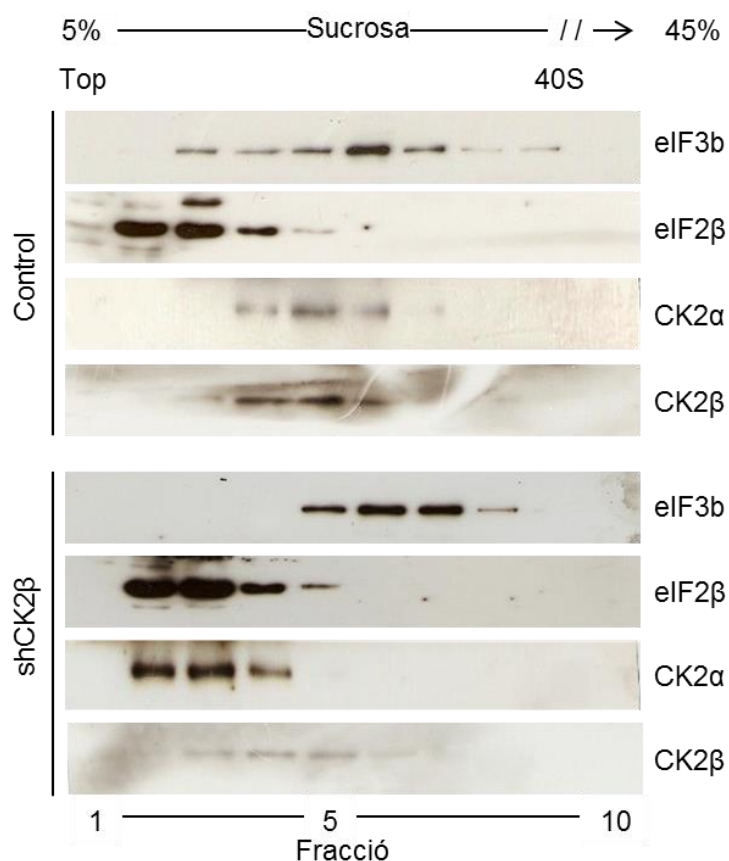
Si ens centrem en l'evolució dels perfils d'absorbància a 254 nm, es van observar canvis molt marcats en els 4 punts d'estudi habituals. El pic que atribuïem habitualment al 40S creixia i s'eixamplava, probablement indicant una acumulació a nivell cel·lular dels diversos complexos de preiniciació de la traducció, que semblaven incapaços d'evolucionar cap al ribosoma sencer (Figura 13A).

Possiblement fruit d'aquest bloqueig que s'observava en el pic 40S, el 60S responia de manera simètrica i presentava una lleugera pujada. La nostra hipòtesi era que, en no poder-se acoblar amb la subunitat 40S, s'acumulava la subunitat 60S (Figura 13C).

Les dificultats per evolucionar cap al ribosoma actiu es mostraven amb els dos últims detalls del gràfic: una reducció fregant el 45 % del pic del 80S (Figura 13C) i una clara baixada de la zona del polisomes, marcat amb una sageta a la Figura 13A, que era la regió on trobaríem els ribosomes formats i sintetitzant noves proteïnes.

L'anàlisi dels gradients de sedimentació va mostrar trets singulars que alguns d'ells es corresponen amb el que passava també amb el silenciament transitori. El silenciament de CK2 $\beta$  provocava un alliberament de la subunitat CK2 $\alpha$  que apareixia pràcticament dues fraccions més enfora que quan la línia es tracta amb el vector control. Probablement aquest desplaçament es devia a que la subunitat CK2 $\alpha$  no acabava de formar l'holoenzim CK2 $\beta$ .

De totes maneres, la poca CK2 $\beta$  que s'expressava, un 20 % segons el que s'observava en la Figura 13B, semblava que seguia unida a la poca CK2 $\alpha$  disponible i es trobava en una part lleugerament més interna del gradient.



**Figura 14 – El silenciament estable de CK2β altera el patró de sedimentació dels eIF.** Anàlisi per immunodetecció de les 10 primeres fraccions dels gradients continus de sucrosa 5-45 % (p/v) després de centrifugar-los durant 15 hores a 100.000 g i 4°C on s’hi ha carregat els extractes cel·lulars de dues línies d’HEK293T, una d’elles expressant del shRNA de CK2β i l’altra fent el mateix amb el vector de control. Una vegada més, per tal de seguir la distribució del complex eIF3 es va utilitzar la seva subunitat eIF3b ja que eIF3c havia disminuït molt la seva expressió en aquesta línia i es feia pràcticament indetectable al gradient. Aquest mateix fenomen es va produir amb la forma fosforilada d’eIF2β, tal i com es pot observar en la Figura 11B i es va optar per només mostrar la imatge de la forma total. Per altra banda es van utilitzar els anticossos contra CK2 en les seves dues formes més habituals com són CK2α i CK2β.

Pel que feia al comportament de les subunitats d’eIF3, tal i com passava amb l’efecte del siRNA CK2α i el siRNA CK2β, la subunitat eIF3c es veia molt afectada pel tractament i es convertia pràcticament en indetectable.

La subunitat eIF3b destacava una vegada més pel constrenyiment cap a les fraccions menys denses del gradient, allunyant-se de les zones pròximes a la subunitat 40S del ribosoma, i insinuava així una desestabilització dels complexos de preiniciació de la síntesi proteica (Figura 14).

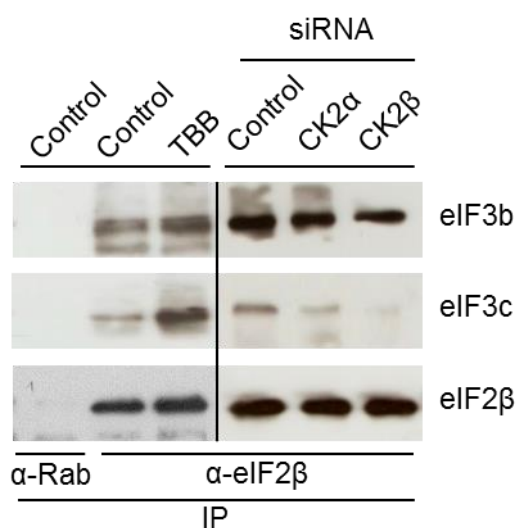
Per tant, es tornava a demostrar que l’alteració de l’activitat o de la presència de CK2 perturbava el procés de síntesi proteica i en reduïa el seu rendiment.

## 6.6 El tractament farmacològic amb TBB afectava a la incorporació d'eIF2 $\beta$ als complexos que contenen eIF3b i eIF3c

Els desplaçaments anti-paral·lels que es van observar entre eIF2 $\beta$  i eIF3b després dels diversos tractaments presentats ens van permetre concloure que la seva associació amb els complexos d'iniciació de la síntesi proteica es veia afectada pels tractaments.

L'anàlisi de les mostres d'extracte cel·lular immunoprecipitats amb anti-eIF2 $\beta$  mostrava que el tractament amb TBB produïa un augment d'eIF3b i eIF3c coimmunoprecipitant amb eIF2 $\beta$  (Figura 15).

Però la mateixa tècnica aplicada a les cèl·lules tractades amb siRNA de CK2 $\alpha$  i CK2 $\beta$  mostrava una baixada marcada d'eIF3c però eIF3b es mantenia inalterada.



**Figura 15 – Coimmunoprecipitació d'eIF2 $\beta$ .** En aquesta figura s'hi han agrupat les coimmunoprecipitacions fetes amb els extractes cel·lulars dels experiments dels apartats anteriors. D'esquerra a dreta els extractes cel·lulars d'HEK293T amb les següents condicions: control d'immunoprecipitació on s'hi ha carregat l'anticòs secundari anti-Rabbit, per mirar les unions inespecífiques. La mostra del segon carril, tal i com ja s'ha comentat abans, era el control de la inhibició per TBB on només es va aplicar a les cèl·lules un tractament amb DMSO com a diluent de TBB en els experiments, i en el tercer carril la mostra correspon al lisat de cèl·lules tractades amb TBB 25 $\mu$ M durant 6h. A la part esquerra, hi trobem els extractes de les cèl·lules transfectades amb els vectors del kit de siGenome, "scramble-control", siRNA CK2 $\alpha$  i siRNA CK2 $\beta$ . La càrrega del gel està normalitzada a partir de la concentració inicial del que coneixem com a "wce – whole cell extract" o extracte inicial.

Val la pena recalcar que els tractaments siRNA van causar una forta disminució als nivells d'eIF3c en extractes crus (Figura 9), cosa que podria ajudar a explicar les diferències en els estudis d'immunoprecipitació i la presència de quantitats significatives d'eIF3c a les fraccions inicials de la densitat de sacarosa detectada als estudis de siRNA (Figura 11B).



## Conclusions Capítol I

1. La sobreexpressió del mutant en el lloc de fosforilació, eIF2 $\beta$ -S2A, altera la unió d'eIF2 $\beta$  amb les subunitats d'eIF3 necessàries per formar els complexos de preiniciació de la traducció, claus per a l'inici de la traducció proteica.
2. La inhibició farmacològica de CK2 amb TBB provoca una baixada significativa de la fosforilació d'eIF2 $\beta$  en la Ser<sup>2</sup> i n'altera el patró de sedimentació. La subunitat eIF3b desapareix de la zona propera a la subunitat 40S del ribosoma, i la subunitat eIF2 $\beta$  només s'hi aproxima si es troba hipofosforilada.
3. La formació dels ribosomes actius, 80S, i polisomes, es veu afectada per la inhibició de CK2 i la síntesi proteica disminueix a nivells semblants a l'activitat basal de la cèl·lula.
4. El silenciament transitori de les subunitats de CK2, a banda de produir una compensació funcional a l'altra subunitat, provoca un desassamblatge dels complexos d'inici de la traducció.
5. La fosforilació d'eIF2 $\beta$  es veu afectada pel silenciament de les subunitats, superior al 20 % en CK2 $\alpha$  i d'aproximadament el 60 % en CK2 $\beta$ .
6. El silenciament de les subunitats provoca una baixada en la fosforilació d'eIF2 $\beta$  i provoca una disminució en l'assemblatge del ribosoma, augmentant la presència de la subunitat 60S sola i mostrant una baixada important del ribosoma funcional.
7. L'alteració gènica de l'expressió de CK2 provoca una desaparició d'eIF3c, que n'és substrat, i altera el patró de sedimentació d'eIF3b. Aquest fet ens suggereix que els complexos de preiniciació 43S-48S possiblement no poden evolucionar cap a la forma completa per l'absència d'eIF3c.
8. En el cas de les línies cel·lulars amb la subunitat CK2 $\beta$  silenciada de manera estable es produeix una disminució molt important de fosforilació de la Ser<sup>2</sup> d'eIF2 $\beta$ , així com una marcada compensació funcional de la subunitat CK2 $\alpha$ . La subunitat eIF3c torna a fer-se indetectable al llarg del gradient de sedimentació, i eIF3b s'ubica cap a fraccions més properes a la regió 40S.
9. La formació del ribosoma actiu i la regió polisomal torna a créixer respecte a la situació control de manera anàloga amb el silenciament puntual, però destaca l'augment que pateix la regió corresponent als complexos de preiniciació 40-48S.
10. Els tractaments farmacològics amb TBB o els silenciaments puntuals afecten a la incorporació d'eIF2 $\beta$  als complexos amb eIF3.

## **Capítol II**

*Estudi de la presència i funció fisiològica de la proteïna quinasa CK2  
en microdominis de membrana (Lipid rafts)*



## 7.1 La proteïna quinasa CK2 s'associa als *lipid raft* dels sinaptosomes de rata

En paral·lel al treball dels eIFs es van iniciar els treballs per mirar de caracteritzar l'activitat de la proteïna quinasa CK2 als *lipid raft* de les membranes sinaptosomals de rata i intentar-ne desxifrar alguna de les seves funcions biològiques.

D'aquests treballs se n'ha obtingut una publicació, sota el títol *Protein kinase CK2 associates to lipid rafts and its pharmacological inhibition enhances neurotransmitter release* que va ser publicada a la revista FEBS Letters el gener del 2011.

### 7.1.1 Presència de la proteïna quinasa CK2 als DRM de sinaptosomes de rata

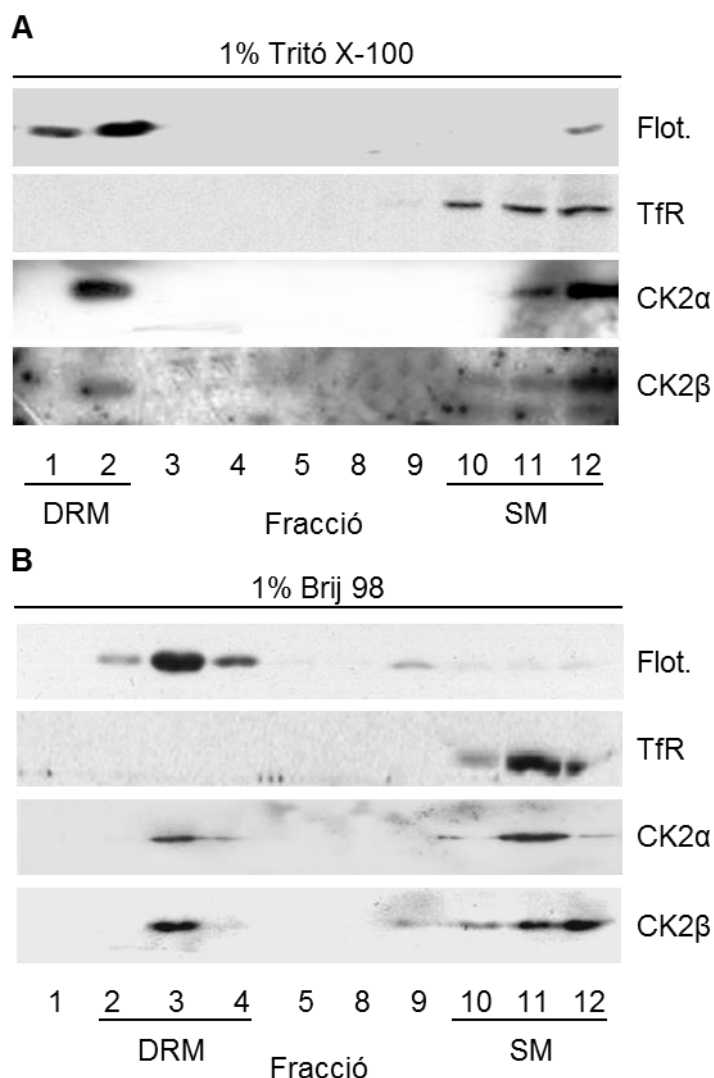
Una de les eines més estudiades per poder aïllar les membranes resistents a detergent (DRM) són els gradients de flotació, on en funció de la densitat de les membranes, algunes tendeixen a flotar. Tal i com s'ha descrit en l'apartat de materials i mètodes, els nostres treballs en aquest camp sempre parteixen d'una preparació de membranes que anomenem P2, que després de ser aplicada al gradient de flotació és pot analitzar per *western blot*.

Per tal d'ubicar al llarg del gradient les fraccions que contenen les membranes resistents a detergent (DRM), que normalment associem a la regió de *lipid raft*, es va fer traves de la detecció per *western blot* del Receptor de Transferrina (TfR) i Flotilina-1 (Flot-1). La primera proteïna ens servia com a marcador de les membranes solubilitzades i la segona com a marcador de membranes resistents al detergent.

Calia, doncs, posar a punt les condicions d'extracció amb detergent que ens permetessin aconseguir una bona separació entre les dues regions membranoses i es va optar per dos detergents, Tritón X-100 i Brij-98. Es va decidir treballar amb aquests detergents ja que el primer era el típicament utilitzat en l'aïllament de *lipid raft*, mentre que el segon s'havia descrit que pot extreure de manera efectiva els microdominis de membrana a temperatura fisiològica.

Un cop realitzada la centrifugació, la Flot-1 es trobava amb la seva màxima abundància a la regió del gradient on la densitat era inferior, regió DRM, fraccions 1 i 2. Aquest resultat ens permetia assegurar que l'extracció havia estat correcta (Figura 16A).

La separació de CK2 al llarg del gradient mostrava dos *pools* per cada una de les subunitats. Tant CK2 $\alpha$  com CK2 $\beta$  es podien detectar clarament tant en la regió de les DRM com de les membranes solubles i, quantitativament parlant, s'atribuïa que un 50 % de cada una de les dues subunitats era present a la regió del DRM.

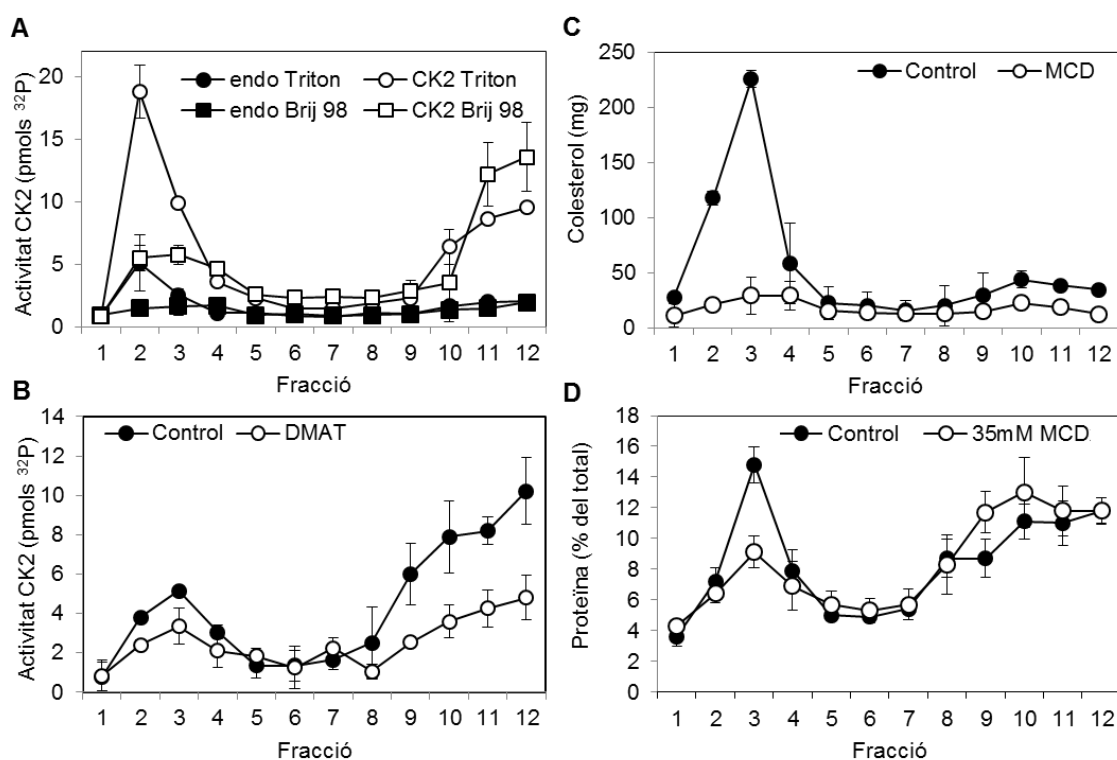


**Figura 16 – CK2 era present a les fraccions DRM de les membranes sinaptosomals.** La fracció enriquida amb sinaptosomes es va solubilitzar amb 1 % de Tritón X-100 (A) durant 30 minuts a 4°C, en el panell superior, i en 1 % de Brij-98 (B) durant 30 minuts a 37°C en el panell inferior. Cada mostra va ser fraccionada en un gradient discontinu de sucrosa 5:35:45 % (p/v). El mateix volum de cada fracció es va analitzar per *western blot* i es va revelar amb els anticossos anti-Flotilina-1 com a marcador de les *lipid raft*, anti Receptor de Transferrina, TfR a la imatge, com a marcador de proteïnes solubles i CK2 $\alpha$  i CK2 $\beta$  com a subunitats de la proteïna quinasa CK2. Ubiquem les DRM a les fraccions 1,2 amb l'extracció amb Tritón X-100 (A) i a les 2-4 amb l'extracció amb Brij-98 (B), corresponent a la part superior del tub, mentre que les fraccions 10 a 12 en els dos casos corresponen a les fraccions solubles del gradient (SM).

Tot i que a l'actualitat el Tritón X-100 és un dels detergents més usats per la comunitat científica per aïllar els *lipid raft*, han anat apareixent altres productes que aporten millores sensibles als ja establerts. Tal i com s'indica més amunt, es va provar el Brij-98, que aporta unes característiques diferents al Tritón X-100 (Figura 16) [183].

L'extracció de membranes es va poder fer en aquest cas a 37°C, evitant així les interaccions lipídiques inespecífiques provocades per les baixes temperatures. Aquestes interaccions inespecífiques ens haurien pogut portar a assignar de manera errònia a algunes proteïnes com a presents amb DRM.

Tal i com va passar amb el Tritón X-100, la separació entre les proteïnes marcadores era total, essent encara més clara la separació de la Flot-1, indicant una bona extracció de les DRM (Figura 16A). Si analitzem també la distribució de les subunitats de CK2 es va veure també dos *pools* diferenciats, tant en DRM com a les membranes solubles. El *pool* present en les DRM mostrava una lleugera baixada, respecte el 50 % que s'observava amb el Tritón X-100, situant-se en aquest cas al voltant del 35 %. A la figura observem també un petit canvi en la distribució de les fraccions on assumim que hi ha el DRM. Aquest podia ser provocat senzillament pel procés de fraccionament que es duia a terme a mà.



**Figura 17 – Activitat de CK2 en els perfils de flotació.** **A)** El gràfic de l'activitat de la proteïna quinasa CK2 (en pmols de <sup>32</sup>P incorporat) en les fraccions del gradient després de les extraccions amb 1 % Tritón X-100 i amb 1 % Brij98. S'hi pot observar la diferència entre la fosforilació endògena i l'obtinguda amb el pèptid RADA. **B)** Gràfic de l'activitat de CK2, ara sí, mesurada només amb el pèptid RADA, de les fraccions del gradient amb la mostra extreta amb Brij-98. En aquest cas la comparació es fa amb la mostra control amb i amb la tractada amb 25µM de DMAT. **C)** Perfil de la distribució del colesterol al llarg del gradient després de tractar les mostres amb MCD amb 35 mM metil-β-ciclodextrina (MCD, al gràfic) durant 60 minuts, abans de dur a terme la solubilització amb 1 % de Brij-98 i fraccionar el gradient discontinu de sucrosa. **D)** Les mateixes mostres de l'apartat C) van ser quantificades per la presència de proteïna de les fraccions al llarg del gradient.

Un cop es va poder detectar la presència de CK2 a la regió corresponent al *lipid raft*, calia comprovar si l'holoenzim hi era de manera activa, i ho vàrem fer per mitjà de la fosforilació d'un pèptid substrat determinat, el pèptid RADA, i també de la fosforilació endògena dels dos gradients, tant en els gradients Tritón X-100 com en els de Brij-98 (Figura 17A).

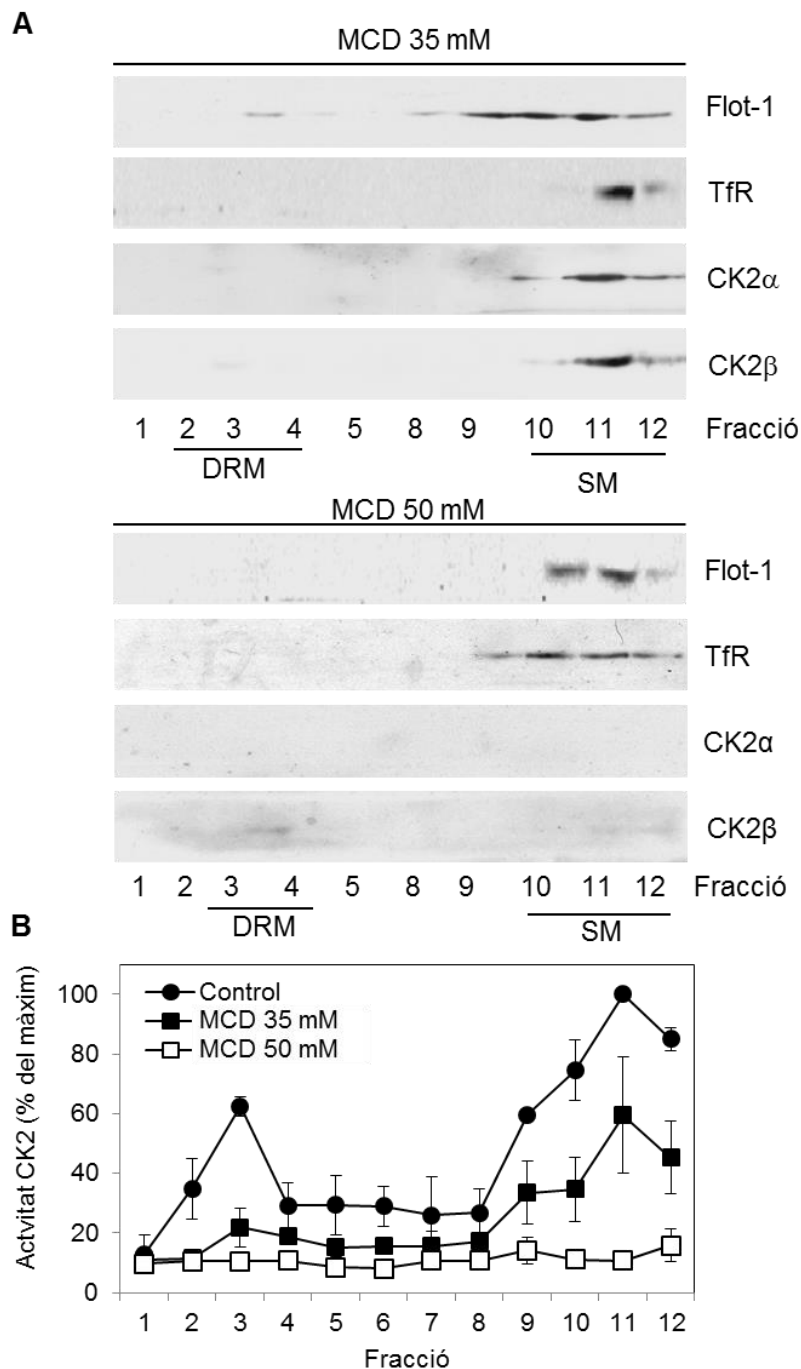
La presència de CK2 i la seva activitat correlacionaven de manera exacta en les fraccions dels *lipid raft* (Figura 16A) i ho feia de manera notable també amb les fraccions de membranes solubilitzades. En analitzar la comparativa entre els dos detergents, destacava per sobre de tot el gran pic que s'observava en la regió dels DRM en l'extracció amb Tritón X-100. De fet, l'activitat que mostrava era quatre vegades més gran que l'extracció feta amb Brij-98, essent també l'activitat inespecífica també més gran. Aquest fet, combinat amb les condicions més fisiològiques d'extracció amb Brij-98, van fer que a partir d'aquest punt, les extraccions amb membranes sinaptosomals de rata mostrades es fessin amb aquest detergent.

A la mateixa Figura 17, en l'apartat C) i D) es mostra el perfil de presència de colesterol i de proteïna que es va obtenir en tractar les membranes sinaptosomals amb 35 mM metil- $\beta$ -ciclodextrina (MCD). Tal i com s'ha comentat a l'apartat de materials i mètodes (5.7.3) aquesta ciclodextrina, gràcies a la seva estructura, és capaç d'arrencar les molècules de colesterol de les membranes [184]. El resultat que s'hi observa, amb la marcada disminució de colesterol i també de la concentració de proteïna, corroborava que les fraccions 2 i 3 corresponien d'una manera clara a la regió de les membranes riques amb colesterol, resistents a detergent que habitualment s'atribuïen als *lipid raft*.

Un cop s'havia ubicat la presència de la proteïna quinasa CK2 a la regió dels DRM i s'havia comprovat que era activa, es va voler comprovar si l'activitat era o no específica, i es va decidir fer per la inhibició farmacològica de la quinasa.

En el capítol I d'aquesta tesi ja s'ha parlat de dos dels inhibidors de CK2 que més s'utilitzaven en el moment de la realització de la part experimental d'aquest treball. En el primer capítol es va utilitzar l'inhibidor TBB perquè es mostrava més eficient en les cèl·lules HEK293T. Tot i això, en les comparacions prèvies entre TBB i DMAT (1,2-dimethylamino-4,5,6,7-tetrabromo-1H-benzimidazole) que es van dur a terme amb les membranes sinaptosomals de rata, es va veure que DMAT era més eficient en aquest cas. Per això, la majoria dels tractaments d'inhibició farmacològica de CK2 en aquest capítol es va decidir fer-los amb DMAT.

Amb l'experiment de la Figura 17B es va voler demostrar que l'activitat de CK2 que mostraven les regions membranoses de la Figura 17A, realment corresponia a la quinasa activa i es van tractar les membranes amb 25  $\mu$ M de DMAT.



**Figura 18 – La depleció de colesterol provoca desaparició de CK2 de les membranes. A)** Anàlisi per *western blot* de dos grups de fraccions, de la 1-5 representant la zona menys densa del gradient i de les 8 a la 12 representant la part més densa, obtingudes després del tractament amb 35 mM i 50 mM metil- $\beta$ -ciclodextrina (MCD, al gràfic) durant 60 minuts de les membranes sinaptosomals i extracció de les DRM amb 1 % Brij-98, com a la figura 16B. Es van utilitzar els anticossos anti-Flotilina-1 (Flot-1) com a marcador de la regió dels *lipid raft*, anti-Receptor de Transferrina (TfR) com a marcador de la zona de proteïnes solubles i els dos anticossos per les dues subunitats de CK2, CK2 $\alpha$  i CK2 $\beta$ . **B)** Representació gràfica de l'activitat de CK2, en % respecte el màxim d'activitat detectada, de totes les fraccions del gradient.



La regió dels DRM es va mostrar sensible a aquesta inhibició i es va produir una reducció de l'activitat del voltant dl 50 %, essent lleugerament més marcada a la regió de les membranes solubles. Per tant teníem una proteïna quinasa CK2 plenament activa a les dues fraccions del gradient. Per tal d'establir que la relació entre CK2 i colesterol era estreta, es van tractar les membranes amb concentracions creixents d'MCD a les membranes i se'n va estudiar l'evolució de les subunitats de CK2 i de la seva activitat enzimàtica (Figura 18).

Comparant la distribució de les proteïnes de la Figura 16B amb el que mostrava la Figura 18A, es va observar l'efecte que va tenir l'augment de concentració d'MCD, de 35 mM i 50 mM. L'anàlisi dels *western blot* que es van obtenir en tractar les mostres amb 35 mM MCD ens mostrava una desaparició tant de CK2 $\alpha$  com de CK2 $\beta$  i Flot-1 de les fraccions dels DRM i corroborava així que la unió de les dues subunitats de la proteïna quinasa a les membranes era dependent de colesterol.

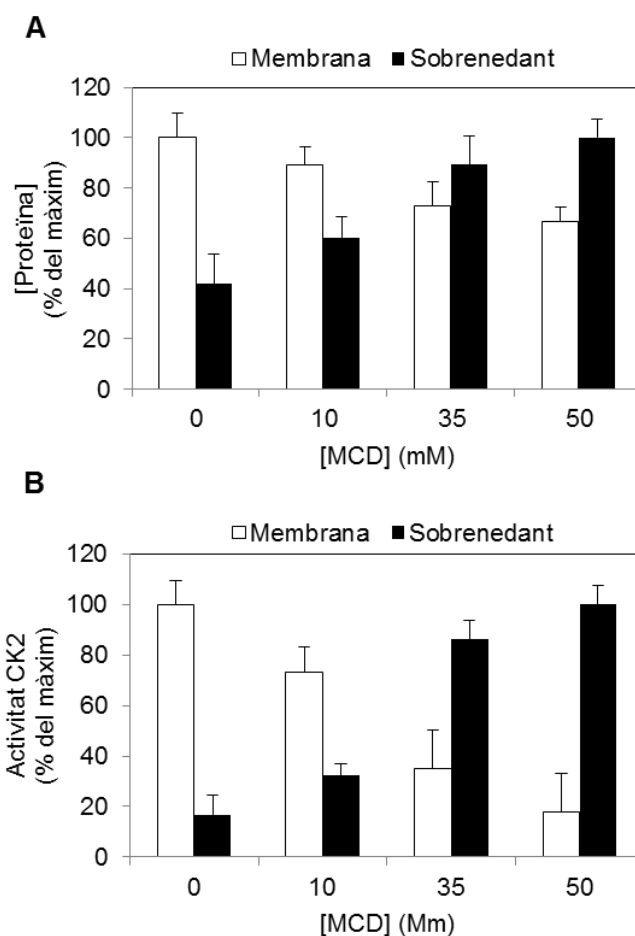
Quan es van extreure les condicions de tractament fins a 50 mM d'MCD, es va veure com CK2 acabava desapareixent totalment també de les fraccions on ubicàvem les membranes solubles, on fins llavors s'havia mostrat intacte. Les proteïnes que es van utilitzar de control per localitzar les diverses regions, Flotilina-1 i el Receptor de Transferrina, es mantenien presents encara a les fraccions solubles.

L'estudi de l'activitat enzimàtica de CK2 va acabar de confirmar el que els *western blots* havien suggerit, ja que la disminució de l'activitat a les fraccions del DRM en el cas del tractament amb 35 mM MCD, i al llarg del gradient en el tractament de 50 mM, era clara (Figura 18B).

### **7.1.2 La depleció del colesterol provocava un desancoratge de CK2 de la membrana**

El colesterol, juntament amb els glicoesfingolípid, són els components més importants dels *lipid raft*, i s'ha descrit que si s'elimina el primer de les membranes citoplasmàtiques amb MCD, aquestes regions es tornen sensibles a detergent. Per tal de confirmar que la relació CK2-DRM era dependent de colesterol, es van tractar les membranes sinaptosomals amb una concentració creixent d'MCD, 10, 35 i 50 mM, durant 60 minuts a 37°C. A continuació, les membranes eren precipitades per centrifugació obtenint un sobrenedant lliure de membranes.

Els tractaments amb concentracions creixents d'MCD provocaven un alliberament progressiu de les proteïnes presents a la fracció membranosa arribant fins a un 30 % (en concentració de proteïna total) en la condició de 50 mM MCD (B).



**Figura 19 – La depleció de colesterol provoca l'alliberació de CK2 de la membrana.** Diverses alíquotes de les preparacions de membranes es van tractar amb concentracions creixents d'MCD, 10 mM, 35 mM i 50 mM durant una hora a 37°C. Un cop tractades, les membranes es van precipitar per ultracentrifugació a 190.000 g durant 30 minuts. Els sobrenedants es van conservar i les membranes van ser solubilitzades amb una tampó 1 % Brij98 a 37°C durant 15 minuts. **A)** Evolució de la concentració de proteïna després del tractament. **B)** El gràfic superior mostra l'activitat de CK2 en pmols de  $^{32}\text{P}$  incorporats al pèptid RADA (més detalls als materials i mètodes) en les diferents mostres.

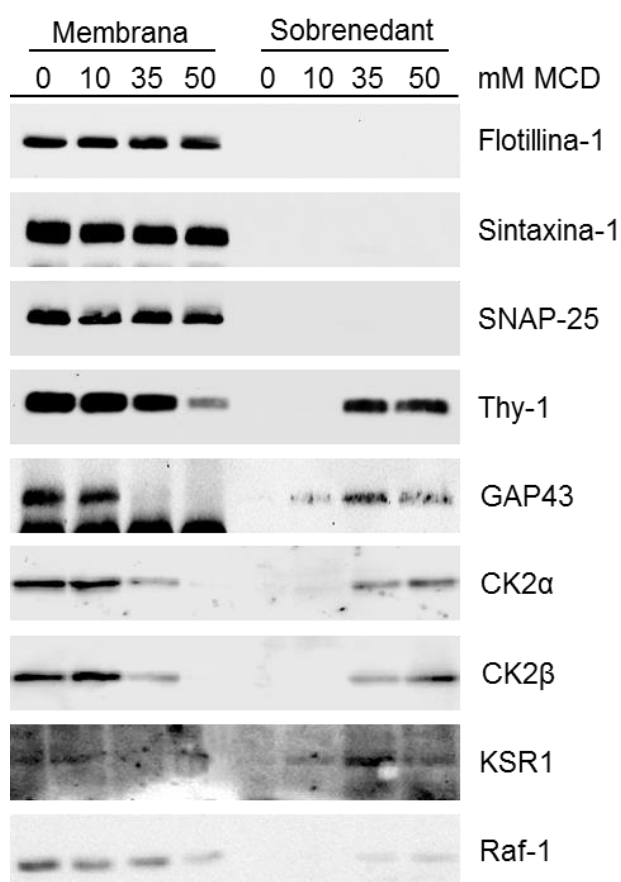
En avaluar l'activitat quinasa de CK2 a les mateixes mostres membranoses, es va veure que el tractament amb la dextrina provocava una disminució de l'activitat al voltant del 80 % a la condició on la concentració era més alta, i l'aparició al sobrenedant era pràcticament simètrica (A).

L'alliberament al medi, des de la fracció membranosa de CK2 en funció de la concentració d'MCD ens suggeria que la presència de CK2 a les membranes era dependent del colesterol present.

Per tal de mirar de corroborar la relació de dependència de CK2 de la presència de colesterol a la membrana es va voler posar en context la quinasa amb altres proteïnes de membrana que tenen un comportament ja descrit.

En aquest cas es van utilitzar diverses proteïnes, algunes d'elles integrals de membrana com Flotilina-1 o dos membres del complex SNARE com són Sintaxina-1 i SNAP-25, la primera integral de membrana i la segona unida a través de palmitoïlació.

També s'han comparat amb Thy-1 com a proteïna de la superfície cel·lular i amb GAP43 unida a la cara interna de la membrana també per palmitolació. I per acabar, també s'han afegit a aquesta contextualització dues proteïnes quinasa relacionades amb la cascada de senyalització de les MAPK quinases, com eren KSR1, que s'havia descrit que s'ancorava a la membrana i servia d'scaffold per altres proteïnes de la via, i Raf-1, membre també de la mateixa via de senyalització (Figura 20).



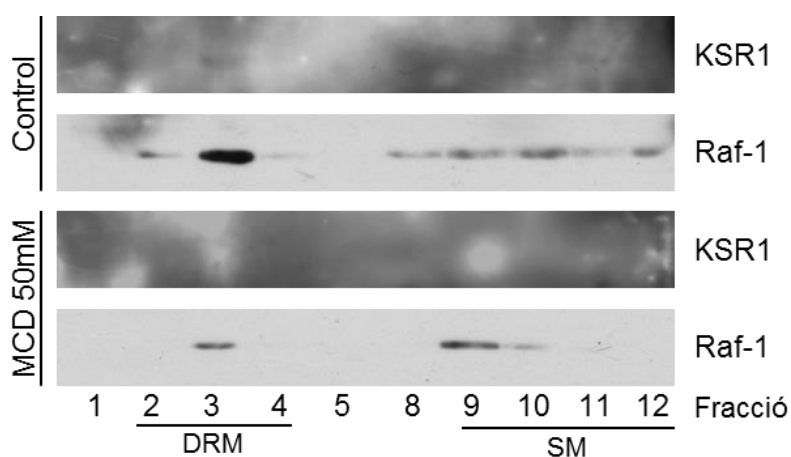
**Figura 20 – La depleció de colesterol provoca l'alliberació de la membrana de diverses proteïnes, entre elles CK2.** Les mateixes mostres que a la figura 19 es van analitzar mitjançant *western blot* contra proteïnes marcadores de membrana (Flotillina-1, Sintaxina-1, SNAP-25, Thy-1 i GAP43) i contra proteïnes objecte d'estudi (CK2alfa, CK2 beta, KSR1 i Raf-1).

El comportament de les dues subunitats de CK2 a la membrana en augmentar la concentració d'MCD era força similar a proteïnes com Thy-1 i GAP43, descrites com proteïnes perifèriques i presents a *lipid raft*, aBrij-98ixí com KSR1 i Raf-1, que també se'ls hi havia relacionat (Figura 20).

La desaparició de la membrana d'aquestes proteïnes començava a ser molt marcada a partir de la concentració de 35 mM i era pràcticament total a partir dels 50 mM, suggerint-nos de nou la relació entre la presència de colesterol a les membranes i el fet de trobar-hi CK2.

A l'any 2007, Ritt et al. van publicar un article [185] on proposaven que KSR1 (quinasa supressora de Ras, en anglès) servia d'*scaffold* a CK2 i que contribuïa a l'activació de Raf. En veure que tenien un comportament força semblant en l'estudi de la depleció del colesterol, es va voler precisar si KSR1 es trobava certament a les fraccions de DRM i com ja s'havia fet abans, se'n va estudiar el seu comportament al llarg d'un gradient de flotació.

Amb la condició control, sense afegir MCD, érem capaços de localitzar KSR1 a la fracció 3 del gradient, que fins ara sempre s'havia assignat als DRM, juntament amb Raf-1. El tractament amb 50 mM de MCD en va provocar la desaparició total de KSR1 i una marcada disminució de la presència de Raf-1 (Figura 21).

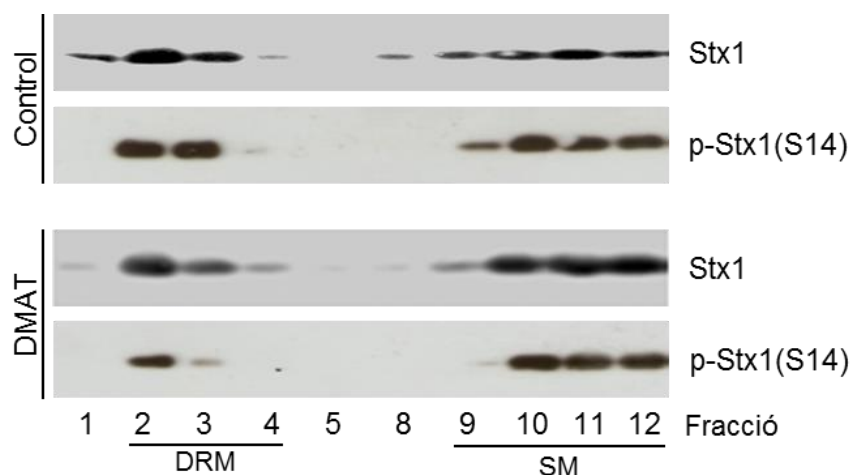


**Figura 21 – El comportament de KSR1 i el seu paper com a scaffold de CK2.** Les mostres utilitzades per aquest anàlisi per *western blot* provenen del tractament de la preparació de membranes sinaptosomals amb MCD 50 mM durant 60 minuts a 37°C, seguides de la posterior solubilització amb 1 % de Brij-98 i per acabar la centrifugació en un gradient discontinu de sucrosa 5:35:45 %. Com en figures anteriors es van estudiar les fraccions menys denses, de la 1-5, i les més denses 8-12. Les fraccions es van analitzar amb dos anticossos, anti-KSR1 i anti-Raf-1.

Amb aquest resultat podíem concloure que KSR1 es trobava a la fracció dels DRM i que era sensible a la depleció de colesterol. Un cop havíem vist que CK2 era present i activa a la membrana i avaluat el seu comportament similar a altres proteïnes presents a *lipid raft*, ens vam proposar trobar una funció fisiològica d'aquesta localització.

### 7.1.3 La inhibició farmacològica de CK2 provocava un augment de l'alliberament de glutamat

Per tal de descriure una de les possibles implicacions fisiològiques de CK2 en les membranes sinaptosomals, ens vam fixar amb Sintaxina-1 (Stx1), ja que n'és substrat i estava descrit que es troba a la regió dels DRM [2 i 3]. Per estudiar l'estat de fosforilació de la Stx1, s'utilitza l'anticòs per la forma fosforilada en la seva Ser<sup>14</sup>, diana de CK2.



**Figura 22 – La inhibició de CK2 amb DMAT reduïa la fosforilació de Sintaxina-1.** Per tal d'estudiar la fosforilació de la Ser<sup>14</sup> de Sintaxina-1, es van tractar les preparacions de membrana sinaptosomals amb 25  $\mu$ M DMAT durant 30 minuts, seguit del protocol d'extracció de DRM descrit en les figures anteriors. En l'anàlisi per *western blot* es van utilitzar dos anticossos per Sintaxina-1, per la seva forma total i per la forma fosforilada en la Ser<sup>14</sup>.

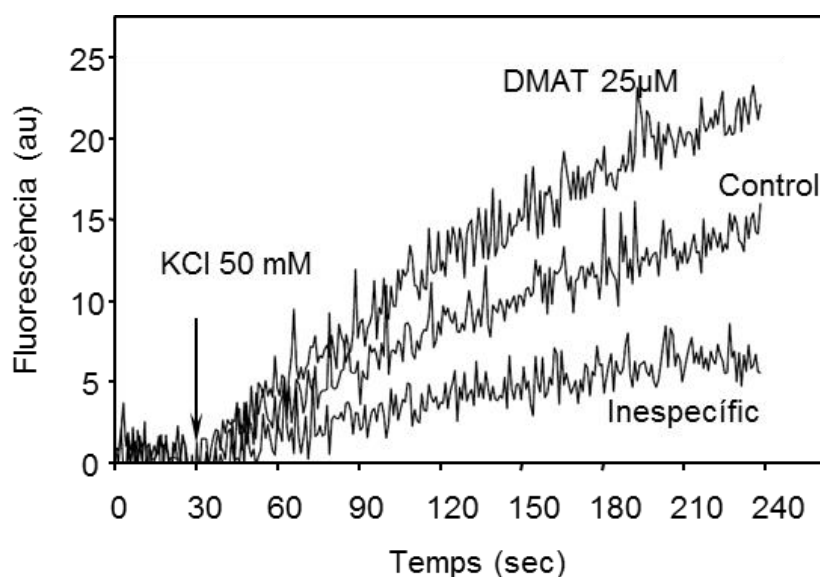
En els nostres estudis es va veure que la presència de Stx1 i de la seva forma fosforilada era bastant semblant a la regió dels DRM, tornant a confirmar així que CK2 es trobava en la seva forma fisiològicament activa en aquestes regions. Així mateix, ens mostrava que la fosforilació de Stx1 no afectava a la seva localització als *lipid raft*.

Si repetíem el tractament d'inhibició de CK2 a les membranes amb 25  $\mu$ M DMAT, la baixada de la fosforilació de Stx1 era força marcada a la regió de les DRM però es mantenia força intacta a la part del gradient corresponent a les membranes solubles (Figura 22).

Un cop es va veure que érem capaços d'inhibir l'activitat de CK2, i que aquesta afecta a la fosforilació de Sintaxina-1, ens calia veure si aquesta disminució de la forma fosforilada en Ser<sup>14</sup> tenia alguna derivada fisiològica.

Tal i com comentàvem a la Figura 20, Sintaxina-1 forma part del complex SNARE [4], essencial per a la secreció de neurotransmissors, i se'n va estudiar l'efecte de la inhibició de la fosforilació per CK2 amb DMAT.

Per fer-ho es va fer un seguiment de l'evolució de la fluorescència derivada de la secreció del glutamat, en poder-ne seguir el NADPH a 340 nm, un dels seus productes de la reacció amb la glutamat deshidrogenasa.



**Figura 23 – La inhibició de CK2 amb DMAT augmenta la secreció de glutamat.** Les preparacions de membranes sinaptosomals es van tractar amb 25 mM DMAT durant 30 minuts, just abans de provocar l'alliberament de glutamat amb 50 mM KCl i seguir-lo al llarg de 4 minuts per fluorescència a 340 nm. La dependència del calci del procés es va demostrar en la condició "inespecífic" on es va provocar la secreció sense calci al medi.

La Figura 23 ens mostra l'efecte que tenia el tractament amb 25 µM DMAT sobre la preparació de membranes sinaptosomals. Després de provocar la despolarització de la membrana amb una dosi de 50 mM de KCl, podíem seguir la secreció del glutamat de manera indirecta seguint la reducció del  $\text{NAD(P)}^+$  a través de la glutamat deshidrogenasa. La inhibició de CK2 pràcticament duplicava la secreció del glutamat i proposava així una regulació negativa de la fosforilació de la Ser<sup>14</sup> de Sintaxina-1 per CK2.

Amb aquest resultat es va poder atribuir una funció fisiològica clara a la presència de la proteïna quinasa CK2 als *lipid raft* dels sinaptosomes de rata, com era la regulació negativa de l'alliberament del glutamat per la seva fosforilació a la Ser<sup>14</sup> de Sintaxina-1.

## **7.2 Caracterització inicial de la presència i funció fisiològica de CK2 en membranes riques en *lipid raft* en cèl·lules renals humanes**

Un cop vam ser capaços d'ubicar CK2 en *lipid raft* de membranes sinaptosomals de rata i descriure'n una possible funció fisiològica, ens vam proposar fer-ho també en cultius cel·lulars, el nostre model més habitual de treball.

Aprofitant l'experiència que havíem obtingut amb les tècniques de purificació de membranes, vam començar a treballar amb les dues línies cel·lulars habituals en aquells moments en el nostre grup com eren HEK293T, protagonistes del primer capítol d'aquest treball i HK-2, una línia immortalitzada que correspon a l'epiteli del túbul proximal de ronyó humà i que en altres estudis del grup ja s'havia utilitzat per investigar-ne la resposta davant de diversos compostos.

Tot i que per mantenir el fil argumental d'aquesta tesi hauria estat ideal poder treballar amb HEK293T, després de diversos intents de purificar les membranes resistents a detergent, el procés es va mostrar més eficient per HK-2 i es va decidir tirar endavant amb aquesta línia cel·lular. Al mateix temps, i tal com veurem a la discussió, altres autors ja havien començat a treballar amb els *lipid raft* d'aquesta línia.

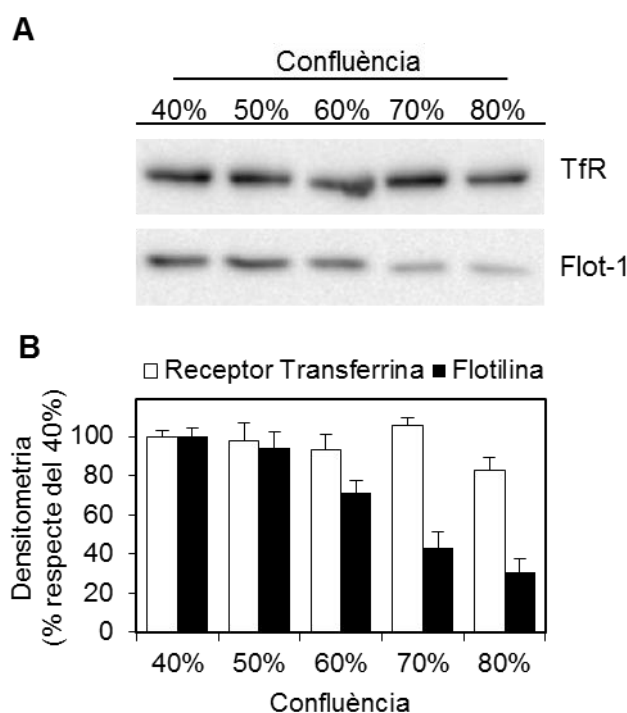
### **7.2.1 Condicions de creixement i purificació dels *lipid raft* en HK-2**

En tractar-se de cultius cel·lulars, calia establir correctament les condicions de creixement de la línia d'estudi, ja que en alguns articles han proposat que el grau de confluència del cultiu té influència en la resposta relacionada amb els *lipid raft* i en la seva abundància, en tractar-se de microdominis de la membrana [181 i 182].

Tal i com s'ha fet fins ara, per seguir la presència dels *lipid raft* a les diverses fraccions dels gradients s'ha utilitzat Flotilina-1 (Flot-1) com a proteïna marcador, i amb el Receptor de Transferrina (TfR) hem seguit el que atribuïm a les membranes solubles.

En lisar les cèl·lules a confluències creixents des del 50 % fins al 90 % es va observar que la presència de Flotilina-1 mantenia una estreta relació amb el grau de confluència del cultiu. El nou model requeria més quantitat de cèl·lules per poder resoldre bé els experiments.

A l'hora de fixar les condicions de lisi es va tenir en compte tant la presència de Flotilina-1 com la del rendiment del cultiu cel·lular, optant així per treballar a partir d'aquell moment amb uns cultius entre el 60 i el 70 % de confluència a l'hora de fer els tractaments (Figura 24).

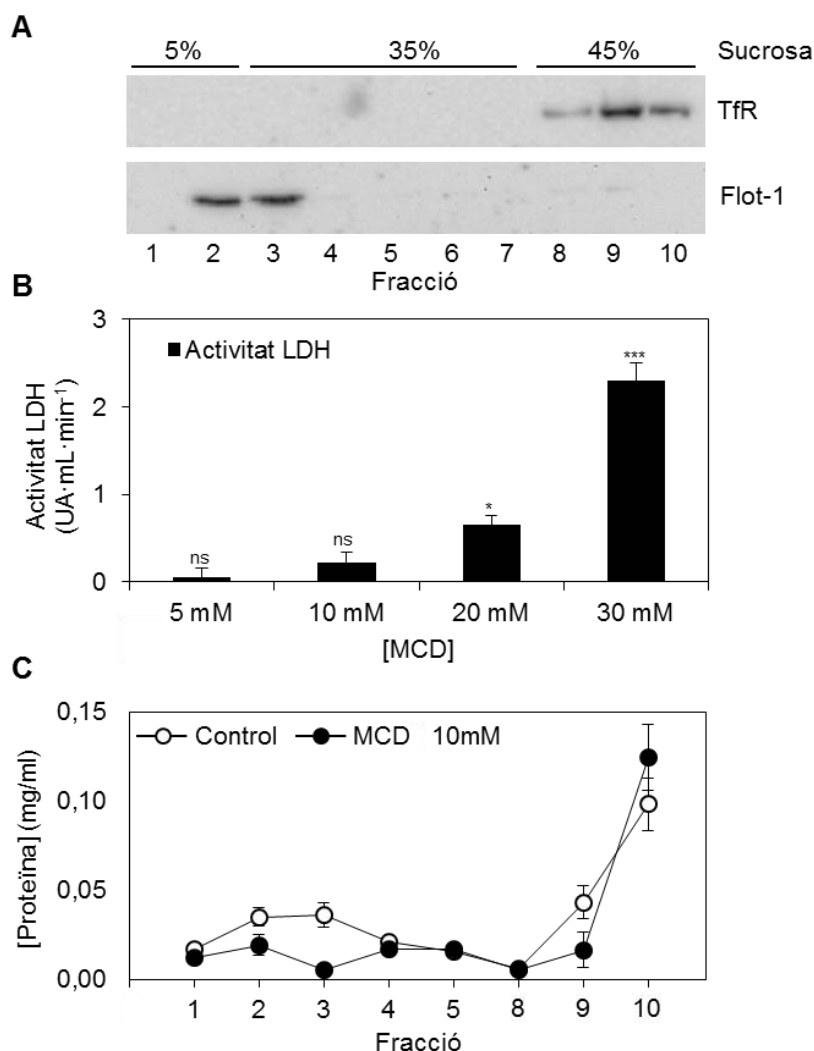


**Figura 24 – Les condicions del cultiu afecten a la presència de marcadors de lipid raft. A)** Anàlisi immunològica per *western blot* d'extractes de cultius cel·lulars de la línia HK-2 creixent de manera asincrònica en un medi ric. Els lisats es van obtenir pel procés habitual (descriu en l'apartat de materials i mètodes), a diversos temps de creixement en funció del seu grau de confluència. Es va analitzar pel Receptor de Transferrina (TfR) com a marcador habitual de les membranes solubles i Flotilina-1 (Flot-1) com a proteïna de referència a l'hora d'indicar la presència de vesícules lipídiques. **B)** Densitometria de la figura A) normalitzada amb la condició de 40 % de confluència de cada sèrie.

Aplicant un protocol semblant al que s'ha utilitzat amb les membranes sinaptosomals, es van fixar les condicions per a la purificació de les membranes resistents a detergent. Finalment van quedar fixades en una lisi amb 0,5 % Tritón X-100, una centrifugació per enriquir la fracció membranosa a 100.000 g durant 15 minuts i un gradient de flotació 5:35:45 % sucrosa i una ultracentrifugació de 4 hores a 200.000 g (Detalls del protocol a l'apartat de materials i mètodes). En aquest cas, enlloc de treballar amb el volum habitual en el primer apartat s'ha reduït gairebé a la meitat per poder tenir les mostres més concentrades.



Un cop fraccionat el gradient es va poder seguir per *western blot* la distribució de les proteïnes marcadores al llarg del gradient (Figura 25A) i es va poder comprovar que les condicions de lisi establertes ens separaven clarament les dues fraccions membranoses.



**Figura 25 – Caracterització de les DRM en cèl·lules HK-2.** **A)** Anàlisi per *western-blot* de les fraccions del gradient de flotació obtingut després de fer una purificació de membranes totals de cèl·lules HK-2 a 100.000 g, tractar-les amb 0,5 % Tritón X-100 i fer-ne un gradient de flotació 5:35:45 % de sucrosa, centrifugats durant 4 hores a 200.000 g i 4°C. El *western blot* es va revelar amb els anticossos pel Receptor de Transferrina (TfR) i per Flotilina-1 (Flot-1). **B)** Estudi de la mortalitat cel·lular amb tractaments creixent d'MCD (indicades a la figura) durant 1 hora a 37°C, avaluant la presència de l'enzim LDH al sobrenedant de les cèl·lules tractades. El protocol de mesura d'LDH està descrit en l'apartat de materials i mètodes. **C)** Gràfic de Concentració de proteïna al llarg del gradient de flotació discontinu de sucrosa. Els extractes dipositats al fons del gradient corresponen al tractament amb MCD 10 mM durant 35 minuts a 37°C sobre la preparació de les membranes extretes amb 0,5 % Tritón X-100 i al seu control en absència de la dextrina. IC: ns p>0,05, 95 % p<0,05 (\*), 99 % p<0,01 (\*\*) i 99,9 % p<0,001 (\*\*\*) calculats respecte la condició sense tractament amb MCD. Canviar fraccions

A les fraccions més denses del gradient, la 8, 9 i 10, es va localitzar TfR tal i com esperàvem, i a la interfase entre les densitats de 5 % i 35 % s'hi va ubicar la Flot-1, sense detectar-hi traces de TfR. Això demostra la correcta extracció de DRM a partir de cèl·lules HK-2.

Un cop analitzada la concentració de proteïna al llarg del gradient es va obtenir un perfil on destaquen dos pics molt definits (Figura 25C en color blanc). En tractar-se d'un gradient de flotació, la zona més densa del gradient s'hi van trobar les proteïnes presents a les membranes solubles i corresponia al pic més important del gradient, però just a la interfase dels coixins de sucrosa del 5 % i el 35 %, a les fraccions 2 i 3, se n'hi observava una altra, que corresponia a les membranes resistents al detergent.

Per tal de confirmar que aquest pic de la fracció menys densa es tractava de membranes resistents a detergent, es va decidir tractar les cèl·lules amb metil- $\beta$ -ciclodextrina i se n'havien de fixar les condicions per la toxicitat del mateix compost.

La Figura 25B mostra l'activitat LDH del sobrenedant del cultiu cel·lular que es va obtenir després de tractar les cèl·lules HK-2 amb les concentracions creixents que mostra la mateixa figura. Analitzant les dades obtingudes es va decidir treballar amb una concentració de 10 mM de MCD, descartant la de 30 mM per la seva mortalitat.

Després de tractar les membranes amb 10 mM de metil- $\beta$ -ciclodextrina al llarg d'una hora a 37°C amb agitació suau, el perfil que es va obtenir després de carregar-ho al gradient de flotació es mostra en negre a la Figura 25C.

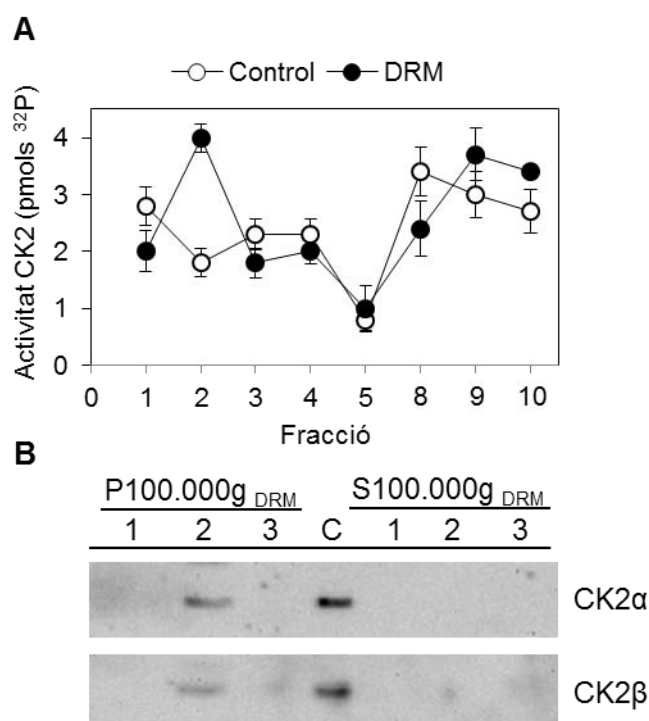
La comparació dels dos perfils de proteïna que es van obtenir mostren una clara disminució de les fraccions 2 i 3, que corresponien també a la interfase del coixí de sucrosa de 5 % i el 35 % i que en l'apartat A) de la mateixa figura on hi havíem ubicat la regió del DRM.

Això s'explicava per la disgregació de les membranes riques en colesterol per efecte d'MCD, i la desaparició de les proteïnes associades, corroborant que les fraccions 2 i 3 contenen els microdominis dependents de colesterol.

### 7.2.2 Presència de CK2 en DRM de cèl·lules HK-2

Un cop posat a punt el protocol per tal de purificar DRM en HK-2 ens vam proposar identificar la presència o no de CK2 en aquestes membranes.

Es va analitzar l'activitat de CK2 a les fraccions dels gradients obtinguts en dues condicions diferents. En blanc a la Figura 26A, la condició control on es van tractar les membranes amb 0,1 % Tritón, i on les estructures membranoses no es trenquen i per tant no es permet la flotació de les zones residents al detergent, i en la condició DRM on les vàrem tractar amb 0,5 % Tritón, i que es correspon amb les condicions descrites com a òptimes per obtenir una bona separació de membranes resistents al detergent, que es mostra en negre a la figura.



**Figura 26 – La proteïna quinasa CK2 és present als lipid raft d'HK-2. A)** Estudi d'activitat de CK2 amb pèptid RADA de les fraccions del gradient de flotació de 5:35:45 % de sucrosa, on s'hi havia carregat dues fraccions membranoses diferents obtingudes després de lisar amb 0,1 % Tritón X-100 (Control) i 0,5 % Tritón X-100 (DRM) i centrifugar-les durant 15 minuts a 100.000 g i 4°C. **B)** Anàlisi per western blot de les tres primeres fraccions del gradient de flotació 5:35:45 % sucrosa, mostrades en A) que s'atribuïen a la regió de flotació dels lipid raft, on s'hi va carregar el mateix volum pellet resuspès i el sobrenedant obtinguts després de fer una extracció amb 0,5 % Tritón X-100 i centrifugar-ho a 100.000 g. Les mostres es van analitzar amb l'anticòssos per CK2, en les seves subunitats CK2α i CK2β. El carril representat amb "C" correspon a la fracció citosòlica obtinguda en la lisi de les mateixes mostres.

El perfil que es va obtenir ens mostrava per la condició DRM un pic marcat d'activitat de CK2 en la interfase entre 5 % i 35 % de sucrosa, que no apareixia en la condició de control on l'activitat era pràcticament basal, i només mostrava un augment a les fraccions més denses del gradient (Figura 26A).

Després de detectar l'activitat de CK2 a les fraccions DRM, vam voler demostrar per *western blot* la presència de la quinasa.

A diferència dels experiments de la primera part d'aquest capítol on es va partir de preparacions de membranes sinaptosomals de rata, amb el que això suposa de quantitat de proteïna, en aquest cas per poder purificar una quantitat significativa de membranes, calia partir d'un nombre elevat de plaques de cultiu, que un cop les mostres es processaven en el gradient de flotació, en dificultaven la seva detecció per *western blot*.

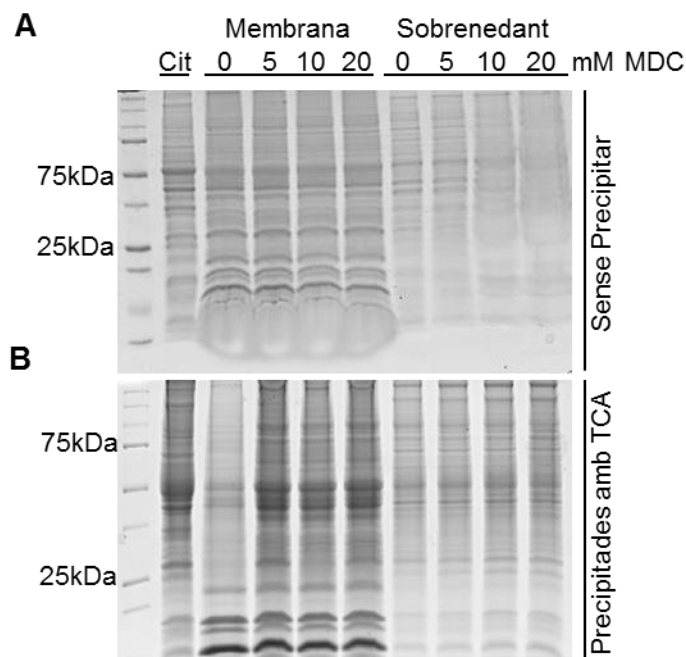
Per tal de millorar la sensibilitat, es van analitzar les tres primeres fraccions de cada gradient, tornant-les a centrifugar a 100.000 g per concentrar qualsevol estructura membranosa. Els dos gradients van ser resuspesos fins a un volum final de 75 µL i per *western blot* podem observar la clara presència de CK2 en la fracció 2 del gradient de la fracció membranosa (Figura 26B).

La correspondència del resultat per immunodetecció amb la detecció per activitat de CK2, en la fracció definida anteriorment com a la corresponent a les membranes DRM, ens suggeria d'una manera clara la presència de la quinasa en aquestes estructures membranoses.

### **7.2.3 La depleció de colesterol provoca que CK2 es desancori**

A continuació, i seguint el model també del primer apartat d'aquest capítol, es va voler comprovar el comportament de CK2 en fer un tractament per dosi-resposta amb MCD de la fracció de membranes totals.

Com comentàvem anteriorment, però, el fet de treballar amb cultiu cel·lular provoca que tinguem una mostra de partida menys abundant, i després de diverses aproximacions es va optar per no augmentar el nombre de plaques de cultiu inicials, reduint així la variabilitat entre els experiments, i acabar els experiments precipitant les mostres amb àcid tricloroacètic (TCA), que a part de concentrar les mostra, elimina possibles interferents en la detecció per *western blot* (Figura 27).

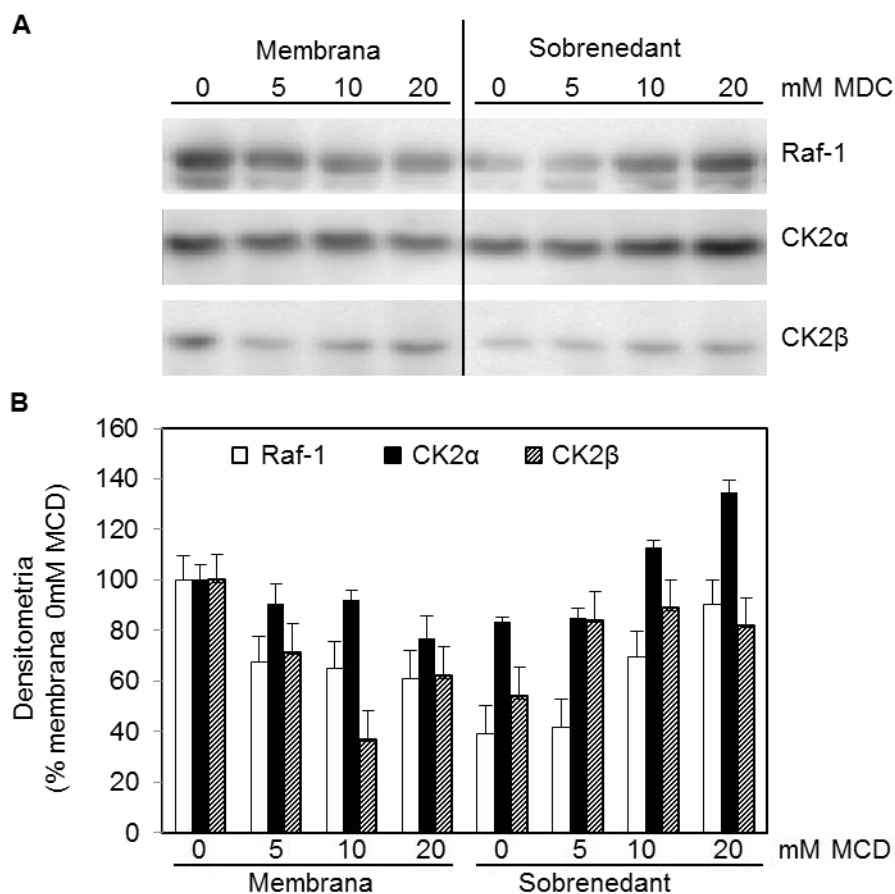


**Figura 27 – Precipitació amb TCA de les fraccions membranoses.** Gels de poliacrilamida tenyits amb blau de comassie on s’hi va carregar la fracció citosòlica (Cit) com a control de la precipitació amb TCA de les fraccions membranoses obtingudes en lissar les cèl·lules HK-2 amb un tampó 0,5 % Tritón i centrifugar-les durant 1 hora a 100.000 g i 4°C, i conservar-ne el pellet, que un cop resuspès es van tractar amb concentracions creixents d’MCD, tal i com indica el gràfic, durant 1 hora a 37°C amb agitació. **A)** En aquest gel s’hi van carregar volums equivalents de les fraccions “membrana” i “sobrenedant” de les mostres sense precipitar. **B)** Imatge obtinguda després de precipitar les mostres amb àcid tricloroacètic. Les mostres van ser resuspeses amb un volum equivalent de TMR 1x pH 8,5.

Es va prendre com a referència la proteïna de membrana Raf-1, ja que s’havia descrit la seva desaparició de la fracció de membranosa i el seu alliberament al sobrenedant, a mesura que s’augmenta la concentració de MCD, i, per tant, la depleció de colesterol dels *lipid raft*.

Per fer-ho, partim d’una preparació de membranes totals, que tractem amb MCD a concentracions creixents. Un cop tractades, les membranes es tornen a centrifugar a 190.000 g durant 45 minuts per separar-ne les dues fraccions. El sobrenedant obtingut es conserva, i les membranes es solubilitzen en 0,5 % Tritón X-100.

L’anàlisi per *western blot* (Figura 28) ens mostrava un comportament anàleg entre Raf-1 i les dues subunitats de CK2, CK2 $\alpha$  i CK2 $\beta$ , que desapareixien de les fraccions de les membranes a mesura que s’augmentava la concentració d’MCD i apareixien solubilitzades al sobrenedant.

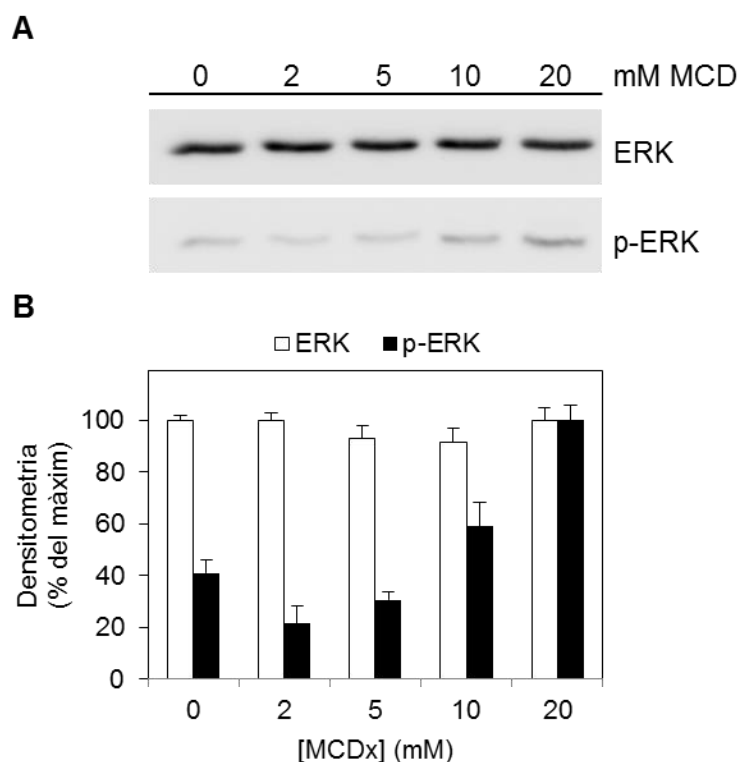


**Figura 28 – CK2 s’allibera de la cèl·lula en eliminar el colesterol. A)** Anàlisi per *western blot* i densitometria de les bandes obtingudes després de tractar les cèl·lules HK-2 amb concentracions creixents d’MCD. La preparació es va fer centrifugant els extractes obtinguts després de lisar les cèl·lules HK-2 amb un tampó 0,5 % Tritón i centrifugar-les durant 1 hora a 100.000 g i 4°C. Els tractaments amb MCD es van dur a terme durant 1 hora a 37°C amb agitació i a continuació es van centrifugar a 190.000 g durant 45 minuts. Les mostres es precipiten amb TCA 12,5 %, amb el posterior rentat amb acetona glaciada i la resuspensió en volums equivalents amb TMR pH 8,5. Les mostres resuspeses es van analitzar amb l’anticòs contra la subunitat CK2α de CK2 i contra Raf-1. **B)** Densitometria de les bandes obtingudes on s’observa la desaparició i l’aparició de cada una de les proteïnes representades.

#### 7.2.4 Resposta cel·lular al tractament amb MCD

Un cop es va veure l’efecte d’MCD en membranes purificades, i comprovada la presència de CK2 en membranes resistents a detergent, el següent pas que ens vàrem marcar va ser saber com responien les cèl·lules HK-2 al tractament a la metil-β-ciclodextrina, i l’afectació d’aquesta en la resposta a estímuls externs.

La literatura ha descrit una estreta relació entre els *lipid raft* i la família de receptors d'EGF, on a través d'ells, la via de les MAPK ens porta fins a ERK, la proteïna amb la qual entrarem en l'estudi de la translació intracel·lular de les afectacions produïdes als *lipid raft* [188], i fins hi tot es va descriure que una desestructuració important dels *lipid raft* pot portar a l'activació de la via [189]. La via de les MAPK, a més a més, ens ofería diversos substrats de CK2, per tant semblava una bona via per començar.



**Figura 29 – Tractament d'MCD a les cèl·lules HK-2. A)** Tractament de dosi-resposta d'MCD en les concentracions indicades a la figura, amb incubació durant 1 hora a 37<sup>a</sup> amb agitació. Les mostres van ser analitzades per *western blot* contra ERK tant en la seva forma total com la fosforilada **B)** Densitometria de l'apartat A) normalitzada pel % màxim de cada sèrie (n=3).

Per tant, el primer que calia veure era com es comportaven ERK i la seva forma fosforilada, al tractament d'MCD per definir-ne els nivells basals de fosforilació produïts pel mateix tractament (Figura 29B).

En aquest cas, la dosi de 20 mM ens va mostrar una forta pujada de la fosforilació d'ERK, per tant es va decidir descartar aquesta condició tant per l'elevat soroll de fons que ens podia produir com per l'activació descontrolada de la via.

Un cop vàrem veure la mortalitat i la fosforilació d'ERK obtinguda amb el tractament d'MCD es van fixar les condicions de treball amb la dextrina a 1 hora de tractament i 15 mM de concentració.

Un cop establert que CK2 era present i activa en els *lipid raft*, conegudes les dosis tòxiques que alteren aquestes vesícules lipídiques i establert també el grau de fosforilació basal del tractament, ens vam proposar començar a posar les bases per estudiar la interrelació entre els *lipid raft*, el receptor d'EGF juntament amb la via de les MAPK, com una de les vies cel·lulars que puguin justificar la presència de CK2 als *lipid raft*, ja que la bibliografia ha mostrat exemples de la interrelació entre les dues vies [190].

El primer que es va fer va ser estudiar com responen les cèl·lules HK-2 si s'estimulaven els receptors d'EGF, si al mateix temps alteràvem l'estabilitat dels *lipid raft* extraient-ne part del colesterol amb MCD.

### **7.2.5 L'efecte dels factors de creixement**

El tractament de la línia cel·lular HK-2 amb dues dosis del factor de creixement EGF, mostrava l'efecte habitual sobre l'activació de la via de les MAPK, que en aquest cas seguim via la fosforilació d'ERK si no s'hi aplica el tractament amb MCD i la fosforilació d'ERK augmentava de manera marcada (Figura 30 esquerra). Per contra, si es tractaven les cèl·lules amb MCD, en absència d'EGF es va veure l'increment en la fosforilació, descrita en l'apartat anterior, que queda a mig camí de la condició basal i la condició de tractament amb 50 mM d'EGF durant 5 minuts. Quan el tractament amb EGF es va fer sobre cèl·lules prèviament tractades amb MCD per tal de desestructurar els *lipid raft*, es va veure que la resposta al factor de creixement disminuïa sensiblement.

Aquest resultat ens porta a pensar que el receptor d'EGF, HER1(ErbB1) en la línia cel·lular HK-2 està estretament relacionat amb la regió dels *lipid raft*, com ja s'havia descrit en altres línies [191].

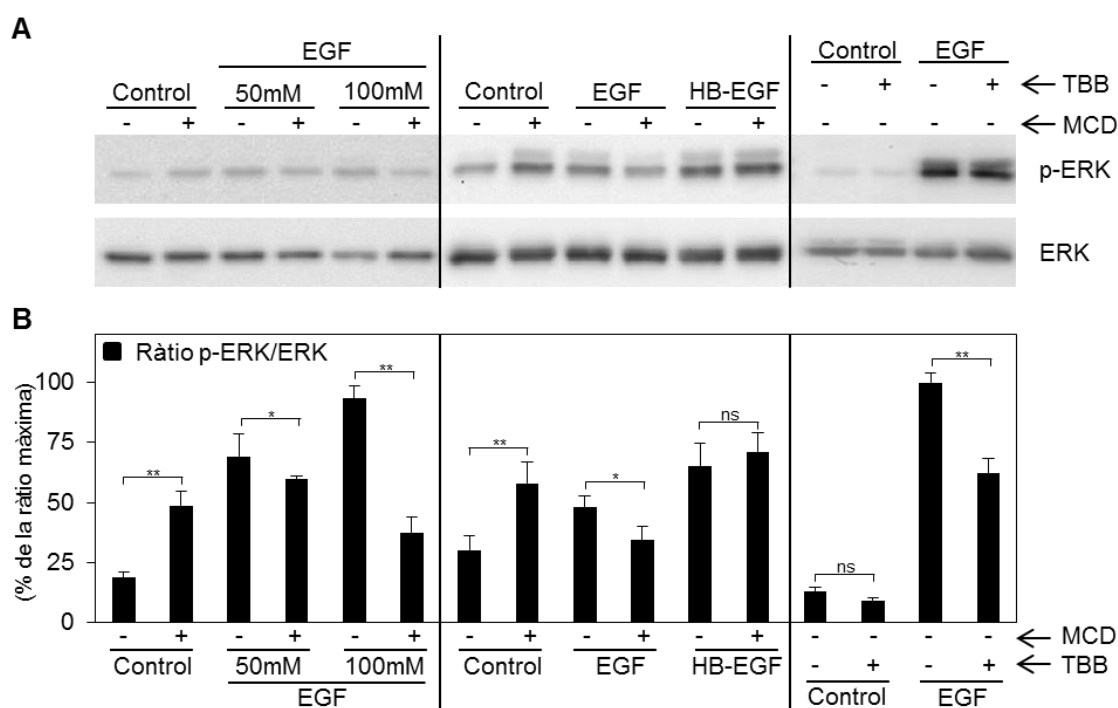
Aquest resultat contrasta amb el que s'obté si en lloc d'estimular les cèl·lules amb el factor de creixement EGF, ho fem amb HB-EGF. El *Heparin-binding EGF-like growth factor*, es va descriure que interactua amb dos membres de la família dels receptors HER, HER1 i HER4. L'estimulació de les cèl·lules HK-2 amb 10 ng/mL d'HB-EGF durant 5 minuts, va mostrar un augment en la fosforilació ERK com ja era d'esperar en tornar-se a activar la via de les MAPK (Figura 30 centre).

Però si la mateixa línia cel·lular es sotmetia a un tractament previ amb MCD, es va veure que la línia cel·lular no alterava la seva resposta i el grau de fosforilació d'ERK observat era molt similar a l'obtingut sense el tractament amb la ciclodextrina.



Per tant, es va intuir que l'afectació sobre els receptors d'EGF d'MCD no era la mateixa per tots, i la senyalització per HER4, selectiu per HB-EGF, no es va veure tan afectada.

Com a últim experiment d'aquesta caracterització inicial del comportament de CK2 a la regió dels *lipid raft* en cèl·lules, es va estudiar la resposta del receptor d'EGF després de la inhibició de l'activitat de la quinasa. En les dues condicions es va veure que l'efecte sobre la fosforilació de la inhibició de proteïna quinasa CK2 amb TBB era prou clar (Figura 30 dreta).



**Figura 30 – Resposta cel·lular al tractament amb MCD. A)** Anàlisi per *western blot* dels extractes cel·lulars obtinguts després de la lisi de les cèl·lules HK-2 tractades segons indica la figura. Les condicions de tractament van ser de 5 minuts pels tractament d'EGF a les concentracions indicades i d'HB-EGF a 10 ng/mL. Les condicions de tractament amb l'inhibidor de CK2, TBB, van ser de 25  $\mu$ M i 3 hores. El tractament amb MCD es va fer a 15 mM durant 1 hora a 37°C. Es van utilitzar anticossos contra ERK, en la seva forma fosforilada i la seva forma total. **B)** Ràtio entre les densitometries de les formes fosforilades i total d'ERK representades en funció de la ràtio màxima. IC: ns  $p > 0,05$ , 95 %  $p < 0,05$  (\*), 99 %  $p < 0,01$  (\*\*) calculats per cada condició de manera independent (n=4).

On era més rellevant aquest efecte era amb l'estimulació per EGF, on l'efecte de l'inhibidor provocava una baixada de la ràtio de fosforilació del 40 %, lleugerament superior a la baixada que s'obtenia a la via del receptor de la Insulina, que era del 23%.

Per qüestions de temps, aquests estudis no es van poder seguir endavant, i tot i ser uns estudis preliminars, posen la base per si es volgués reprendre l'estudi de la funció de la proteïna CK2 ubicada als *lipid raft*.

A partir d'aquí, estudis més centrats en la senyalització en fraccions membranoses més purificades, o la combinació de la metil- $\beta$ -ciclodextrina amb els inhibidors de CK2 podrien ser maneres per continuar aquesta línia, però això ja són experiments que potser apareixeran en altres tesis doctorals o en articles científics.

### **Conclusions Capítol II**

1. L'extracció amb detergent de les membranes sinaptosomals de rata ens mostra dos *pools* de CK2, en la regió de les membranes solubles i també en les membranes resistents a detergent.
2. La proteïna quinasa ubicada a la regió de les membranes resistents a detergent és activa i sensible a la inhibició per DMAT.
3. La unió de CK2 a la regió de les membranes resistents a detergent depèn de presència de colesterol.
4. El comportament homòleg proteïna KSR1-1 la postula com a una de les proteïnes d'ancoratge de CK2 a la membrana.
5. Sintaxina-1, proteïna substrat de CK2 present al *lipid raft*, disminueix la seva fosforilació al tractar les membranes amb DMAT, inhibidor de CK2
6. Al formar part del complex SNARE, el canvi en l'estat de fosforilació de Sintaxina-1 provocat per la inhibició de CK2 resulta amb un augment de la secreció de glutamat.
7. La presència dels marcadors de *lipid raft* en la línia cèl·lula renal HK-2 és funció de la confluència del cultiu
8. L'extracció amb 0,5 % Tritón X-100 permet separar la regió de les membranes resistents a detergent.
9. La proteïna quinasa CK2 detectada a la regió de les membranes resistents a detergent d'HK-2 és activa.
10. La depleció del colesterol desancora CK2 de les membranes de les cèl·lules HK-2.

# ***CONCLUSIONS***

---



## 8.1 Conclusions Generals

### 8.1.1 Capítol I

- La fosforilació de la Ser<sup>2</sup> d'eIF2 $\beta$  s'ha revelat com a clau per l'estabilitat dels complexos de preiniciació de la síntesi proteica en cèl·lules HEK293T
- La inhibició farmacològica de CK2 i el seu silenciament gènic altera els patrons de sedimentació de les subunitats d'eIF2 i eIF3, provocant així la desestabilització dels complexos de preiniciació.
- La formació del ribosoma actiu és veu alterada al modificar l'activitat de la proteïna quinasa CK2, reduint el metabolisme a nivell basal en el cas de la inhibició farmacològica.

### 8.1.2 Capítol II

- La proteïna quinasa CK2 és present i activa en els *lipid raft* de les membranes sinaptosomals de rata i en les de cèl·lules renals humanes HK-2.
- La presència de la quinasa en aquestes regions depèn de la disponibilitat de colesterol.
- En membranes sinaptosomals de rata, l'absència de fosforilació de la Sintaxina-1 en el complex SNARE per la proteïna quinasa CK2 desregula la secreció de glutamat.



# *DISCUSSION*

---

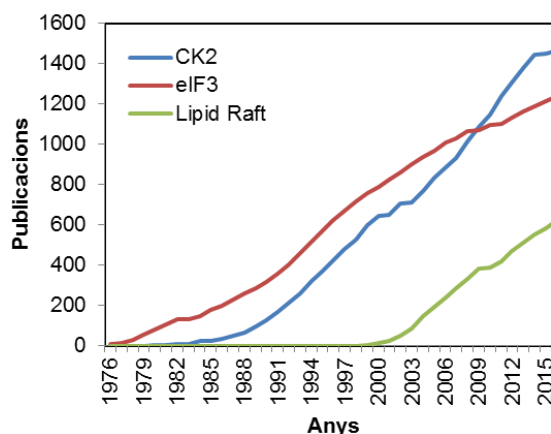




## 9.1 Discussió general

Per tal de començar aquest apartat, m'agradaria introduir primer algunes dades que poden ajudar a donar una perspectiva de la investigació que hem dut a terme aquests anys a tots aquells que tinguin aquest document a les mans i no siguin científics o propers al nostre camp.

Quan s'introdueix "CK2 or Casein Kinase II" al buscador científic per excel·lència, que és Pubmed, ens retorna fins a dia d'avui 56 publicacions l'any 2016 que parlen de la quinasa al seu títol. Si agafem de referència els últims 10 anys, passen a ser 732 publicacions, i 1.686 en el total dels anys indexats.



**Il·lustració 31 – Evolució de publicacions al llarg dels anys.** Dades extretes del buscador PubMed limitant la recerca al fet que CK2, eIF3 o *Lipid raft* apareguessin als títols de les publicacions.

Això és molt? És poc? Si fem la comparativa amb la recerca d"Alzheimer", 10.584 referències, i

745.576 amb "càncer", sembla que les publicacions de CK2 són poques. En canvi, si analitzem la diversitat de processos en què CK2 està implicada, agafant com a referència els 10 últims articles publicats, hi trobem implicació en càncer [187, 188, 189 i 190], malalties autoimmunes [196], i isquèmies [192 i 193], entre d'altres, i fins i tot se la proposa com a un bon target per a malalties hematològiques [199], a banda de la seva implicació en processos més bioquímics, com la regulació de la reparació del DNA [200], o fisiològics, com la polarització de les neurones [201].

Els altres dos grans conceptes d'aquesta tesi són els factors d'inici de la traducció de proteïnes, o eIFs, i els *lipid raft*. Pel que fa als eIFs, i tal i com comentàvem a la introducció, el fet que tingui tantes subunitats fa que el seu número de publicacions sigui força més elevat, 696 en el que portem de 2016, més de 7.100 els últims 10 anys i superior a les 12.200 indexades en total.

L'últim dels noms claus que volem comparar és el concepte *lipid raft*, que ens ha mostrat uns resultats de 44 publicacions els últims mesos, 480 els últims 10 anys i supera els 670 des de l'inici. Si ens mirem, però, la Il·lustració 31, veiem que la seva aparició és molt més tardana que els altres dos termes comparats. Feta aquesta introducció, cal posar en perspectiva les conclusions obtingudes en aquesta tesi.

## 9.2 Discussió del capítol 1: Paper de la proteïna quinasa CK2 en l'assemblatge de complexos d'iniciació de la traducció en cèl·lules HEK293T

L'acoblament dels components del *Multifactor Complex*, eIF1, eIF2, eIF3 i eIF5, s'ha descrit com a clau a l'hora d'iniciar la síntesi proteica [70]. Inicialment, aquests estudis s'havien fet en llevats [102] i més recentment s'han fet bones aproximacions en el cas humà [203].

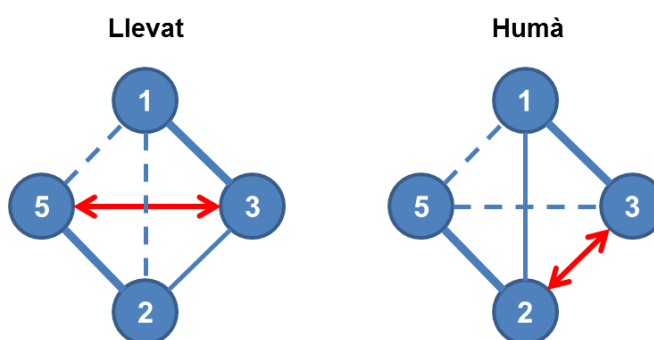
Aquests estudis han mostrat que la interacció que s'assumia clau per a la formació del complex en llevats, entre eIF3 i eIF5, en el cas del humans s'ha descrit que la interacció clau és la que representen eIF2 i eIF3 [13 i 14] [204].

Aquest darrer punt ens ha portat a voler estudiar aquesta

interacció, sobretot després de saber que la subunitat eIF2 $\beta$  d'eIF2 interaccionava amb CK2 i més endavant definir-se com a substrat de la proteïna quinasa *in vitro*, tal i com va demostrar el nostre grup en col·laboració amb el grup del Dr. Pinna de la universitat de Pàdua [15 i 16].

En aquesta tesi, s'ha vist que la inhibició farmacològica de CK2 amb TBB provoca una baixada de la fosforilació *in vivo* de la subunitat eIF2 $\beta$  en la seva Ser<sup>2</sup>, a l'extrem N-terminal (Figura 4) i, per tant, hem pogut corroborar que eIF2 $\beta$  també és substrat de CK2 *in vivo*.

Tal i com s'ha comentat a la introducció, una de les característiques principals de la subunitat eIF2 $\beta$  és la seva capacitat d'interactuar amb altres proteïnes, encarregant-se de la majoria de contactes del complex eIF2 [100]. En particular, l'extrem N-terminal s'ha descrit com a responsable dels contactes amb eIF5 i com a estabilitzador de tot el *Multifactor Complex*.



**Il·lustració 32 – Interaccions entre els factors d'iniciació de la traducció en llevats i humans.** Figura adaptada de l'article *The human translation initiation multi-factor complex promotes methionyl-tRNAi binding to the 40S ribosomal subunit* [202] on s'han estudiat les interaccions entre els diferents factors en llevat i en humà. Les línies blaves discontinues representen les interaccions febles, les blaves gruixudes les més fortes, i les vermelles les que s'han descrit com a claus per l'estabilitat del complex.

De fet, per conèixer la implicació d'aquesta serina en l'estabilitat del complex, s'ha pogut veure que la sobreexpressió del mutant de fosforilació eIF2 $\beta$ -S2A alterava el patró de sedimentació dels elements del *Multifactor Complex* (Figura 3). El mutant provoca un desplaçament cap a fraccions menys denses de les subunitats eIF3b i eIF3c, suggerint una desestabilització del complex.

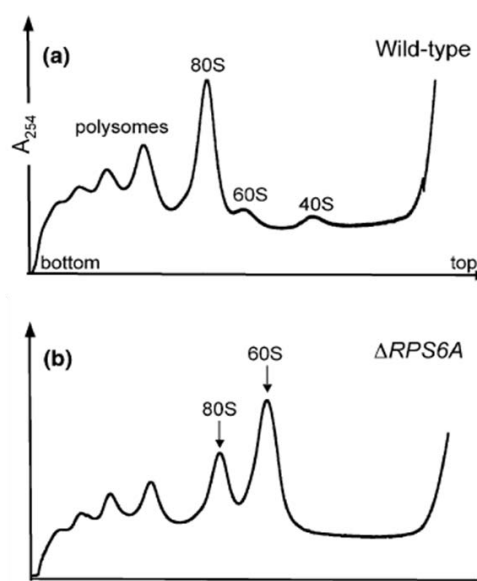
Tal i com també s'ha esmentat a la introducció, eIF3 també és substrat de la proteïna quinasa CK2 en diverses de les seves subunitats, eIF3c [206] i eIF3j [86], havent-se descrit també la seva associació amb eIF2 [78].

Els resultats obtinguts en el nostre estudi mostren que la inhibició de CK2 amb TBB o regulació a la baixa amb siRNA anti-CK2 $\alpha$  o anti-CK2 $\beta$  alteren el procés d'assemblatge adequat dels complexos d'iniciació de la traducció.

Aquest procés l'hem pogut seguir a través de dos resultats. El primer d'ells és el seguiment dels perfils d'absorbància a 254 nm, màxim d'absorbància de l'RNA ribosomal, quan s'estudien els gradients de sucrosa. D'aquests estudis n'han derivat diverses conclusions.

La primera d'elles és que ens mostra una disminució significativa del pic de 80S (Figura 5). Aquesta alteració clara de la formació del ribosoma actiu es veu recolzada per l'alteració del patró de sedimentació d'eIF3 i eIF2 que tendeixen a superposar en una regió del gradient desproveït de subunitats ribosomals (Figura 6).

L'estudi de la formació dels complexos de preiniciació de la síntesi proteica o PICS utilitzant els patrons de sedimentació l'ha utilitzat el grup del Dr. Hinnebusch des de fa més de de 15 anys [208] i a nosaltres ens ha servit per treure algunes conclusions més.



**Il·lustració 33 – Perfils d'absorció a 254 nm del mutant per RPS6A.** Figura adaptada de l'article de Pachler [207] on el perfil b) mostra l'efecte de deletar la proteïna ribosomal RPS6A en llevats, que és estructural de la subunitat 40S.

Tant el silenciament transitori de CK2 utilitzant siRNA de CK2 $\alpha$  i CK2 $\beta$  (Figura 12) com l'ús de línies estables amb el shRNA CK2 $\beta$  (Figura 13) ens han mostrat informació interessant quan s'han estudiat els perfils de sedimentació.

Sens dubte, el canvi més important del perfil és la marcada reducció del pic corresponent al 80S, que és molt més important que en el cas de TBB. Tot i això, també destaca la pujada que s'observa en els pics de 60S, que possiblement representen l'acumulació dels que no poden evolucionar cap al ribosoma complet. De fet, a la bibliografia hi ha alguns exemples on directament s'afecta la formació o l'estabilitat de la subunitat 40S com en el cas de la Il·lustració 33, on s'ha deletat la proteïna ribosomal RPS6A i es produeix un efecte semblant al que s'observa en els nostres resultats [207].

El que sí que és un tret característic en les tres condicions que alteren CK2 d'aquesta tesi, inhibició farmacològica, silenciament transitori i silenciament estable, és que la zona polisomal pateix una baixada important insinuant una disminució global de la formació de ribosomes actius en alterar l'activitat de CK2. Aquest fenomen també s'ha descrit a la bibliografia en casos de mutants d'eIF2 $\beta$  i eIF3 en llevats, on la baixada de la zona polisomal és important [209]. Tot i que en el nostre model d'estudi, per qüestions tècniques, la zona polisomal no queda tan ben definida com a l'article, acumulem prou dades com per poder establir un criteri per afirmar-ho.

Tal i com hem comentat anteriorment, el desplaçament dels diversos factors d'iniciació en funció del tractament que apliquem a la nostra línia cel·lular ens pot mostrar el grau d'alteració que pateix l'MFC a l'hora de formar-se.

Els panells d'imatges d'estudis per *western blot* de les diverses subunitats són molt habituals en aquest camp i s'utilitzen per poder comparar els diversos comportaments. En un estudi recent publicat per Borgo et al. [86] sota el títol "*Protein kinase CK2 potentiates translation efficiency by phosphorylating eIF3j at Ser127*" treballen en un camp força paral·lel al nostre, on veuen el paper important de la fosforilació d'eIF3j per CK2 a l'hora d'alterar la traducció proteica. Tant en el seu cas com en el nostre, el patró de distribució d'eIF3 es veu alterat, produint-se també un desplaçament cap a fraccions del gradient menys denses en tractar les cèl·lules amb un inhibidor de CK2.

Si analitzem amb més detall l'estat de fosforilació d'eIF2 $\beta$  en la seva Ser<sup>2</sup>, tal i com era d'esperar, pateix un decreixement en els tractaments aplicats al llarg de la tesi. Val a dir que la baixada de fosforilació en eIF2 $\beta$  més gran s'observa quan avaluem els extractes de les línies silenciades de manera estable.

Aquest resultat respon a l'esforç per trobar l'equilibri entre la concentració de l'inhibidor o dels vectors de silenciament sense afectar en escriure la viabilitat cel·lular. En aquest sentit, i com ja s'ha comentat al capítol de resultats, la línia transfectada estable amb el shRNA de CK2 $\alpha$  no era viable.

Analizant els panells de *western blots* derivats del gradient, on veiem uns canvis més destacats és en el cas de la inhibició per TBB, on eIF2 $\beta$  pateix un efecte contrari a eIF3, que tenia tendència a sortir cap a regions menys denses, i sembla que s'endinsa més cap l'interior del gradient (Figura 6). Sigui com sigui, eIF2 $\beta$  present en aquesta regió es troba hipofosforilat en comparació amb el que trobem a les primeres fraccions del gradient.

*L'evolució dels inhibidors de CK2 ha estat molt dinàmica al llarg dels anys. Els experiments d'aquesta tesi, es van dur a terme en la seva gran majoria entre l'any 2008 i el 2011. En aquell moment, els inhibidors de CK2 més utilitzats eren TBB, utilitzat en el capítol 1, i DMAT, utilitzat en el capítol 2. De llavors ençà s'han sintetitzat diversos inhibidors de la quinasa, en gran part sota el paraigües del grup del Dr. Pinna a la Universitat de Pàdua. El TBBz o el TBCA, entre d'altres van donar pas al CX-4549 que va ser utilitzat per Borgo et al. en el seu article [86] o el CX-5011 utilitzat per Salizzato en [197]. Aquests inhibidors són altament selectius per CK2 i fins i tot s'estan utilitzant en assajos clínics [210].*

Un dels resultats que mostra l'efecte més clar de la inhibició de CK2 és el representat a la Figura 8 on es veu la

---

**Taula 28 – Els inhibidors de CK2.** La modulació farmacològica de l'activitat de la quinasa està en constant evolució.

---

taxa d'incorporació de metionina marcada amb  $^{35}\text{S}$  després del tractament amb TBB. La disminució de la incorporació que s'observa als resultats d'aquesta tesi es correspon també amb els observats, per exemple, a l'article de Salizzato et al. [211], on després de tractar les cèl·lules KCL22 i K562 amb un dels nous inhibidors de CK2 com el CX5011 veuen una baixada de la incorporació que oscil·la entre el 43 % i el 25 % en funció de la línia cel·lular utilitzada. En el nostre cas, el percentatge ronda el 35 % de disminució, per tant queda palès que la inhibició per CK2 provoca una baixada de la síntesi proteica. Aquest resultat és robust amb la baixada que s'observa a la zona polisoma.

Curiosament, però, els estudis de coimmunoprecipitació van mostrar que la inhibició CK2 afavoreix la presència d'eIF2 $\beta$  i eIF3b/eIF3c en complexos. Això suggeriria que la hipofosforilació d'eIF2 $\beta$ , i presumiblement també la d'eIF3c, en els llocs de fosforilació de CK2 estarien a favor de la seva dissociació. Aquest fenomen també s'ha observat en el cas d'eIF3j a l'article de Borgo [86], on també per immunoprecipitació s'ha vist que la inhibició de CK2 provoca un augment de la unió d'eIF3j als complexos.

En contrast amb això, en blat s'ha vist que la presència de CK2 afavoreix la unió d'eIF2 $\beta$  i His-eIF3c recombinants *in vitro*, tant en la presència de CK2 $\alpha$  sola o en forma d'holoenzim [212]. La raó d'aquesta discrepància és desconeguda, però podria reflectir les diferències en les estructures oligomèriques eIF3 i en la fosforilació d'eIF2 *in vivo* entre humà i vegetal.

Diversos autors han corroborat que la fosforilació d'eIF3c per CK2 sembla ser bastant similar des de llevat a humà, [201, 207 i 208]. Per contra, s'han observat diferències importants entre espècies pel que fa a la fosforilació d'eIF2. En el llevat, CK2 fosforila eIF2 específicament en la subunitat eIF2 $\alpha$  [93], mentre que en els mamífers la fosforilació es produeix exclusivament en la seva subunitat eIF2 $\beta$  [95 i 114]. En plantes, CK2 fosforila tant la subunitat eIF2 $\alpha$  com eIF2 $\beta$ , però els llocs de fosforilació detectats en planta eIF2 $\beta$  són diferents dels principals llocs detectats en mamífers eIF2 $\beta$  [214].

És probable que les diferències en la fosforilació d'eIF2 $\beta$  per CK2 afectin la interacció entre eIF2 i eIF3 i, per tant, influeixin en l'acoblament dels complexos d'iniciació de la traducció. Encara que hi ha diferències entre els mamífers i plantes a la fosforilació d'eIF2 $\beta$  per CK2, la seva fosforilació té un requisit en comú: ha de ser en presència de la quinasa en forma holoenzimàtica, ja que CK2 $\alpha$  lliure és incapaç de fosforilar-los [103, 113 i 206].

L'any 1991 també es va poder observar que en reticulòcits de conill estudiats *in vitro*, eIF3 apareix fosforilada, amb un pes molecular aparent de 120 kDa, que és atribuïble a eIF3b o eIF3c per CK2, amb la mateixa eficiència per l'holoenzim que per CK2 $\alpha$  [111]. L'eficiència de CK2 $\alpha$  lliure en fosforilar eIF3c nativa ha estat confirmada en blat [214] i, en aquest cas, la presència de subunitats CK2 $\beta$  no activen, sinó que més aviat inhibeixen, la fosforilació *in vitro* per CK2 $\alpha$  de qualsevol dels eIF3 endògens o, més concretament, pels eIF3c recombinants.

Però tornant als resultats, i en concret a les situacions en què hem intentat alterar l'activitat de CK2, n'han sorgit dos escenaris diferents. Després dels tractaments TBB i siRNA-CK2 $\alpha$  (Figura 9), l'activitat tant de CK2 $\alpha$  potencialment lliure com de l'holoenzim de CK2 es va reduir, mentre que amb el tractament amb siRNA-CK2 $\beta$  va augmentar el CK2 $\alpha$  lliure en detriment de l'holoenzim CK2; tot i això, l'afectació sobre la fosforilació d'eIF2 $\beta$  va disminuir més amb el silenciament de la subunitat CK2 $\beta$  (Figura 9C).

No obstant això, tots aquests tractaments tenen conseqüències similars en el perfil de sedimentació dels complexos d'iniciació de la traducció, cosa que suggereix que CK2 $\alpha$  lliure no és suficient per afavorir el seu muntatge, sinó que també és necessària la presència de la subunitat CK2 $\beta$  (Figura 5 i Figura 12). D'altra banda, els resultats mostren per primera vegada que la fosforilació d'eIF2 $\beta$  endogen en cèl·lules vives, on el trobem integrat a eIF2 natiu, requereix la presència de CK2 $\beta$  (Figura 9A), cosa que confirma les dades prèvies obtingudes *in vitro*.

Un altre dels resultats que ens ha portat més maldecaps a l'hora d'interpretar-lo és la baixada de la presència d'eIF3c en alterar l'activitat de CK2, ja sigui per la inhibició per TBB o pel silenciament de CK2 $\alpha$ . Hipotetitzem que la fosforilació d'eIF3c l'estabilitza, i que, per tant, es necessita l'enzim sencer i actiu per tal de poder fosforilar-lo. El que ens ha resultat més inesperat és la baixada després de fer els tractaments amb el siRNA-CK2 $\beta$ , ja que era de suposar que la presència de la subunitat CK2 $\alpha$  podria estabilitzar eIF3c a nivell del que faria l'holoenzim (Figura 9A) [214].

Aquest últim resultat ens obliga a estirar el raonament cap al paper que desenvolupa CK2 $\beta$  en l'estabilització d'altres elements del complex. Tal i com hem indicat a la introducció d'aquesta tesi, a la Taula 1 adaptada de l'article de Liechfield [26], cada vegada més s'estan descrivint funcions de la subunitat catalítica sola, per tant, no és gens menyspreable el seu paper estabilitzant d'altres elements del complex.

Per tal de contrastar l'efecte de la subunitat CK2 $\beta$  en tot el procés, es va generar una línia silenciada amb shRNA CK2 $\beta$  (Figura 13). La correspondència dels resultats era important amb l'obtingut amb el silenciament puntual, sobretot pel que fa a la desaparició d'eIF3c i la baixada de fosforilació d'eIF2 $\beta$ . L'únic tret característic d'aquest tractament el trobem quan veiem el perfil de 254 nm. La baixada del pic 80S, (Figura 13A) superior al 40 %, i el lleuger augment de 60S es mantenen, però el més destacable és l'eixamplament i el doble pic que pateix la zona on hi ubiquem la subunitat 40S i els complexos de preiniciació de la traducció fins al 48S. Aquest tret característic no s'havia observat ni insinuat en cap altre dels tractaments.

Comparativament amb els altres tractaments, on havíem ajustat les condicions de silenciament perquè no fossin tan agressives, com comentàvem anteriorment, la condició de silenciament estable se'ns escapava a tal regulació fina.

Possiblement, la poca CK2 $\beta$  present (Figura 13B) provoca que la concentració d'holoenzim present sigui baixa i que sobretot l'activitat de CK2 $\beta$  lliure disminueix i produeix que els diversos complexos de preiniciació no puguin progressar cap al ribosoma actiu.

Com era d'esperar també, el perfil de sedimentació dels casos siRNA CK2 $\beta$  (Figura 11) i shRNA CK2 $\beta$  (Figura 14) presenta unes característiques similars, on se'ns fa indetectable eIF3c i on eIF3b tendeix a trobar-se en zones més denses del gradient. De totes maneres, la disminució en eIF3c no seria l'únic factor responsable per al muntatge alterat de MFC ja que la presència d'eIF2 $\beta$  i eIF3b en els complexos detectats en els estudis immunoprecipitació no va disminuir en els tractaments amb el siRNA i, fins i tot, va augmentar després del tractament amb TBB. Valášek l'any 2000





Estudis previs han demostrat en llevat l'existència d'un *Multifactor Complex* (format per eIF3, eIF1, eIF2, GTP i per Met-tRNA<sup>i</sup>Met) lliure de subunitats ribosomals que sedimenten en fraccions menys denses en els gradients i sempre es localitzen per davant del pic 40S [70]. Aquesta descoberta també s'ha trobat en cèl·lules humanes [202] i és una constant en els nostres experiments. La incorporació d'eIF2-GDP al MFC redueix la seva afinitat pel Met-tRNA<sup>i</sup>, bàsicament perquè s'ha descrit que eIF2 interacciona amb eIF3. En canvi, l'afinitat d'eIF2-GTP pel Met-tRNA<sup>i</sup> no es veu afectada per la incorporació al *Multifactor Complex*. En aquest context sembla que eIF2 hauria d'interactuar de manera transitòria amb eIF2B per tal de fer el recanvi GDP-GTP. Curiosament, la subunitat catalítica d'eIF2B (eIF2B $\epsilon$ ) també és substrat de CK2 [117].

La possibilitat que l'augment dels complexos entre eIF2 $\beta$ - eIF3b detectats al nostre estudi, en resposta a la inhibició CK2, podrien correspondre, doncs, a múltiples complexos defectuosos en intercanvi de GTP o en la unió Met-tRNA<sup>i</sup> o per un altre dels 12 tipus de complexos que avorten la iniciació de la traducció sembla que pren força. Aquesta hipòtesi és atractiva, però que per ser confirmada hauria demanat més estudis.

### **9.3 Discussió del capítol 2: Estudi de la presència i funció fisiològica de la proteïna quinasa CK2 en microdominis de membrana (*Lipid rafts*)**

Com ja hem comentat anteriorment, la proteïna quinasa CK2 fosforila una àmplia gamma de substrats, s'expressa de manera ubiqua en la majoria de teixits i es troba en gran part dels compartiments cel·lulars i fins i tot extracel·lulars, actuant com a ectoquinasa [215].

L'activitat de CK2 en membranes ja va ser objecte d'estudi per part del nostre grup a l'any 1997 [216], però en aquell cas els estudis es van centrar en membranes de fetge de rata. En els estudis que es presenten en aquest segon capítol de la tesi, la presència de CK2 s'ha volgut acotar als microdominis de membrana resistents a detergent, tant en cultiu cel·lular com en preparacions de sinaptosomes de rata.

Diversos estudis han relacionat CK2 i cervell i un dels primers d'aparèixer va ser *Regulation of protein kinase CK2 isoform expression during rat brain development* [217] a l'any 1994, on caracteritzaven el paper de les diverses subunitats de CK2 en el desenvolupament del cervell.

De fet, es coneix que l'activitat de CK2 en la majoria de regions del cervell és més gran que en altres teixits, i evidències convincents demostren que CK2 fosforila una sèrie de substrats que tenen clares implicacions en neurogènesi [218], la transmissió sinàptica [219] i la plasticitat sinàptica i desenvolupament neuronal [220].

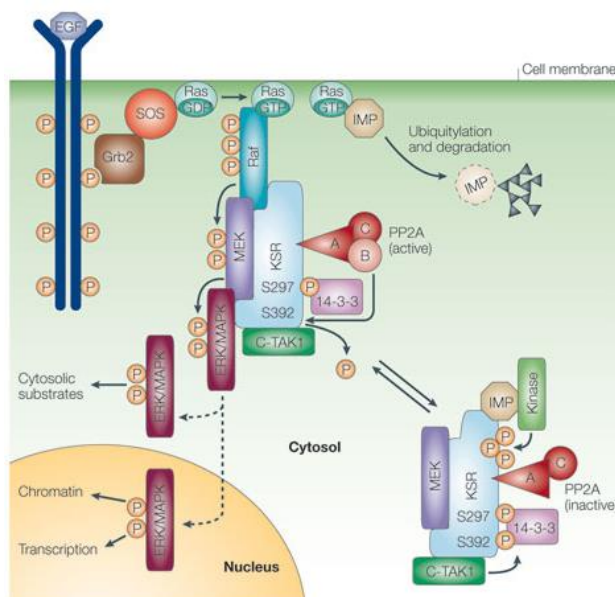
Els primers estudis van demostrar un ràpid augment de l'activitat de CK2 en la potenciació a llarg termini (LTP) en l'hipocamp, un model neurobiològic que preval per a l'aprenentatge i la memòria [219]. D'acord amb aquesta observació, s'ha demostrat recentment, també a les neurones de l'hipocamp, que el factor de creixement nerviós (NGF) activa CK2, i seguidament fosforila i inhibeix la PTEN, que condueix a la inhibició de la glicogen sintasa quinasa 3b (GSK3b) i a l'estimulació del creixement axonal [221].

La relació de PTEN i CK2 és interessant, ja que ens transporta al camp del *lipid raft*. Aquesta fosfatasa conté un motiu d'unió a caveolina-1 que permet el reclutament cap als microdominis lipídics. Aquest fenomen el va observar Goswami l'any 2005 [222]. A més a més, se sap que la caveolina-2 (CAV-2) és fosforilada *in vivo* per CK2 en dos residus (Ser<sup>23</sup> i Ser<sup>36</sup>) i que aquestes fosforilacions són necessàries per a les seves accions com un regulador positiu de la caveolina-1 durant la biogènesi de les caveoles [223]. D'altra banda, estudis d'insolubilitat en detergent i experiments amb gradients de flotació amb sucrosa, com els que s'han fet servir per aquesta tesi, van revelar l'any 2008 que la fosforilació de Ser<sup>23</sup> de CAV-2 es produeix preferentment en DRM [224]. Aquest fet proposa una possible interacció de CK2 amb *lipid raft*, encara que sigui mitjançant un substrat.

Els primers indicis d'aquest fenomen els trobem a la Figura 16, on CK2 apareix ancorada a la regió corresponent a les membranes resistents a detergent (DRM), després del tractament alternatiu amb dos detergents diferents, Tritón X-100 o Brij-98. L'ús d'inhibidor farmacològic de CK2 ens va permetre corroborar en aquest punt que la quinasa es trobava conformacionalment estable i activa en la regió dels DRM (Figura 17). Amb l'ús de MCD a concentracions creixents hem pogut corroborar que la unió de CK2 a la regió dels DRM depèn de colesterol i que molt probablement estarem parlant d'una regió *lipid raft* (Figura 18). La inhibició farmacològica s'ha utilitzat també en altres investigacions, proposant per exemple que CK2 també té un paper important en la plasticitat sinàptica, ja que la seva inhibició farmacològica afecta la LTP per la modificació selectiva de la localització sinàptica dels receptors de NMDA (N-metil-D-aspartat) [220]. En el nostre cas, l'ús de l'inhibidor de CK2 ens ha permès aproximar una de les funcions de la quinasa en *lipid raft*.

Tot i que ja hi ha una trajectòria bibliogràfica de localització de CK2 en membranes cel·lulars, l'estructura de la quinasa no presenta, aparentment, cap domini d'unió a membrana, i per això calia trobar-li un possible model d'ancoratge.

En el nostre cas es proposa la proteïna quinasa supressora de Ras (KSR1) com a possible model, ja que està descrit que CK2 s'hi relaciona de forma estreta, servint-li d'scaffold acostant-la a la membrana [185]. KSR1 es transloca a la membrana cel·lular després de ser activada, colocalitzant MEK i ERK amb les quinases de la família Raf i CK2, que contribueix a l'activació de Raf [185].



**Il·lustració 35 – El paper de KSR1 en la senyalització de les MAPK.** Figura adaptada de l'article *Coordinating ERK/MAPK signalling through scaffolds and inhibitors* [225] on es mostra esquema general de la senyalització ERK/MAPK amb el paper destacat per KSR1 on actua com a *scaffold*.

L'associació de CK2 als *lipid raft*, que s'ha proposat en aquesta tesi, juntament amb l'afinitat de KSR1 per membranes riques en dominis rics en ceràmida [226] podria promoure la interacció entre CK2 i KSR1. Per altra banda, es coneix que els *lipid raft* tenen un paper clau en la regulació de la via de fosfatidilinositol-3 quinasa/Akt, i per tant els *raft* podrien actuar com a plataforma de senyalització permetent la convergència de CK2 i la via d'Akt. A més, altres substrats de CK2, alguns d'ells analitzats a la Figura 20, s'han descrit com a presents als *lipid raft*, com la Sinaptotagmina I [227], VAMP2 [228] o Sintaxina-1 [229], entre d'altres. Per tant, tenim encara més motius que justifiquen la presència de CK2 en *lipid raft* de sinaptosomes de rata.

Sintaxina-1 (Stx1) ha pres un paper destacat en el nostre estudi en ser fosforilada de manera exclusiva per CK2 a la Ser<sup>14</sup> [230]. El paper cel·lular d'aquesta proteïna es situa en la regulació de l'exocitosi i forma part del complex SNARE, acompanyada de la sinaptobrevina i del complex SNAP-25. Dades publicades suggereixen un paper de CK2 i la forma fosforilada de Sintaxina-1 en la definició dels subdominis específics en la membrana plasmàtica axonal que estan separats de les zones actives sinàptiques [231], pel que sembla tenir força lògica la presència de la quinasa ben a prop de

Sintaxina-1. El procés de fosforilació de les proteïnes del complex SNARE, però, segueix sense ser massa clar, malgrat la seva importància funcional. Tot i això, diverses línies d'evidència indiquen que aquesta fosforilació podria tenir un paper important en el control de l'exocitosi regulada de calci [232]. D'altra banda, la fosforilació de la Ser<sup>14</sup> de la Stx1 és un modulador important de la interacció amb Munc18-1, que controla la immobilització de vesícules a la membrana plasmàtica amb el consegüent control de l'exocitosi [155 i 225], tal i com ja vèiem a la Il·lustració 23.

A la bibliografia hi trobem exemples de la implicació fisiològica de la fosforilació del complex SNARE per CK2. Entre ells l'article "*Deficits in syntaxin 1 phosphorylation in schizophrenia*" [234], on es conclou que l'alteració de la fosforilació per CK2 de la Ser<sup>14</sup> de Sintaxina-1, pot jugar un rol a la fisiopatologia de l'esquizofrènia. El cas de la proteïna citosòlica *synaphin/complexin*, és lleugerament diferent. La seva funció és regular la velocitat de secreció de neurotransmissors mitjançant el complex SNARE i s'ha vist que si es troba fosforilada en la seva Ser<sup>115</sup> augmenta molt l'afinitat per al complex [235]. Aquest article de l'any 2007 va ser la primera aproximació al paper de CK2 a l'hora de regular la secreció de neurotransmissors.

Amb els nostres resultats hem aportat llum sobre el paper de CK2 en la fosforilació de Sintaxina-1 que és localitzada en els *lipid raft*, però en general, la relació dels complexos SNARE i els *lipid raft* sempre ha estat complicada. Concretament a la Figura 22, veiem que CK2 és la responsable de la fosforilació de la Ser<sup>14</sup> de Sintaxina-1 en el nostre model, ja que grau de fosforilació disminueix en tractar les membranes amb l'inhibidor farmacològic. Aquesta troballa indirecta amb l'inhibidor ens va permetre seguir buscant una possible implicació fisiològica d'aquesta presència, i ens restringia el camp de recerca, encarant-nos cap al complex SNARE i la seva regulació. L'estudi detallat de la distribució de Sintaxina-1 i de la proteïna SNAP-25 a la membrana ha mostrat que tendeixen a trobar-se agrupades en clústers, i en alguns casos les diverses agrupacions es troben solapades [236].

L'estudi per microscòpia d'alta resolució (STED), però, ha revelat que el que es creia que eren grans acumulacions de les proteïnes, eren més concretament petites agrupacions de monòmers de Sintaxina-1 fixant la mida d'aquests clústers al voltant dels 100 nm [237]. La integritat d'aquests clústers s'ha revelat com a dependent de colesterol, sobretot per les Sintaxines-1 i 3 [238] i s'ha vist que la depleció del colesterol provoca una redistribució de les proteïnes a la membrana, que fins i tot la eliminació del colesterol pot provocar la inhibició de la secreció en alguns tipus cel·lulars [239] o el descontrol de la neurotransmissió espontània [240].

Tot i aquestes evidències, la participació dels altres elements descrits anteriorment en el procés d'exocitosi fa que no es pugui concloure directament que la depleció del colesterol alteri per si sola els processos d'exocitosi. El que sí que sembla evident és que la formació d'aquests clústers compartimenta físicament els processos cel·lulars. La presència dels complexos SNARE en les DRM s'ha estudiat en molts tipus cel·lulars utilitzant tot tipus de variacions en el protocol, fet que comporta certa dificultat a l'hora de comparar-los entre ells.

SNARE	Association with DRMs (%)
Syntaxin 1	0% in P2 from homogenized rat brain (Hering <i>et al.</i> 2003); 0% in pancreatic $\beta$ cells (Ohara-Imaizumi <i>et al.</i> 2004); 0% and 22% in neuroendocrine cells (Lang <i>et al.</i> 2001; Chamberlain <i>et al.</i> 2001), < 10% in synaptosomes from rat brain (Gil <i>et al.</i> 2005)
Syntaxin 2	0% in mast cells (Pombo <i>et al.</i> 2003); 15% in alveolar epithelial cells (Chintagari <i>et al.</i> 2006)
Syntaxin 3	> 50% in mast cells (Pombo <i>et al.</i> 2003; for epithelial cells see also Lafont <i>et al.</i> 1999)
Syntaxin 4	< 10% in endothelial cell membranes and macrophages (Predescu <i>et al.</i> 2005; Kay <i>et al.</i> 2006); approx. 35% in adipocytes (Chamberlain & Gould, 2002); less than 20% and 50% in mast cells (Puri & Roche, 2006; Pombo <i>et al.</i> 2003)
SNAP-25	0%, 20% and 24% in neuroendocrine cells (Lang <i>et al.</i> 2001; Chamberlain <i>et al.</i> 2001; Salaun <i>et al.</i> 2005b); 20% in synaptosomes from rat brain (Gil <i>et al.</i> 2005)
SNAP-23	< 10% in endothelial cell membranes (Predescu <i>et al.</i> 2005); 31% in alveolar epithelial cells (Chintagari <i>et al.</i> 2006); approx. 50% in macrophages (Kay <i>et al.</i> 2006); 54% in neuroendocrine cells (Salaun <i>et al.</i> 2005b); 50 and 70% in mast cells (Pombo <i>et al.</i> 2003; Puri & Roche, 2006); > 70% in adipocytes (Chamberlain & Gould, 2002)
Synaptobrevin/VAMP2	5–24% in neuroendocrine cells (Chamberlain <i>et al.</i> 2001); < 10% in synaptosomes from rat brain (Gil <i>et al.</i> 2005); approx. 20% in mast cells (Puri & Roche, 2006); 22% in alveolar epithelial cells (Chintagari <i>et al.</i> 2006); 36% in adipocytes (Chamberlain & Gould, 2002); 70–80% in macrophages (Kay <i>et al.</i> 2006)
Cellubrevin/VAMP3	20–30% in macrophages (Kay <i>et al.</i> 2006)

**Taula 29 – Associació de proteïnes SNARE amb les membranes resistents a detergent.** La solubilització de les membranes cel·lulars es va realitzar utilitzant Tritón X-100 en concentracions que van de 0,1 a 1 %. En els estudis de Lang *et al.* (2001) [237] i Hering *et al.* (2003) [241] el detergent es va incloure en els passos de gradient de densitat. Taula adaptada de l'article "SNARE proteins and 'membrane rafts'" de Thorsten Lang [238].

Com ja s'ha vist anteriorment, la controvèrsia en el camp dels *lipid raft* és gran, i amb la copurificació dels complexos SNARE no ho és menys. Els percentatge de detecció arriba al 80 % en el cas de la sinaptobrevina en macròfags, passant pel 50 % de Sintaxina-3 en cèl·lules màstiques o el 10 % en membranes sinaptosomals de rata. A la Taula 29. hi ha un extens recull d'experiments que han mirat de situar el complex SNARE a les DRM. Afegeix més controvèrsia a tot aquest argumentari el fet que en alguns experiments, les proves clàssiques de verificació dels *lipid raft* no s'han completat i marcadors habituals com Thy-1 o Flotilina-1 no s'han solapat a l'hora d'estudiar els gradients de flotació [240].

Tornant a CK2, ja s'ha descrit la seva implicació en alguns processos fisiològics a l'entorn del cervell. A l'hipocamp, la possible relació existent entre l'activitat de CK2 i la inhibició de la neurotransmissió es pot preveure a partir dels resultats obtinguts sobre les neurones de l'hipocamp, que en situació de depressió mostren l'activació del receptor de neurotrofina p75 per CK2 [242].

Per tant, és factible plantejar la hipòtesi d'un mecanisme en les neurones de l'hipocamp en la qual l'alliberament de neurotransmissors pot veure's afectat per CK2, després de ser activat de manera dependent per un receptor presinàptic, per exemple, per un lligand de p75 [237 i 238].

En el nostre cas s'ha vist que la inhibició farmacològica de CK2 provoca una desregulació de la secreció del glutamat, augmentant l'alliberament del neurotransmissor al medi, després de despolaritzar la membrana amb KCl (Figura 23). Aquesta troballa, doncs, aporta un rol més de la proteïna quinasa CK2. La seva associació amb *lipid raft* de la membrana sinaptosomal es podria atribuir a una modulació de processos excitotòtics, un procés que obre un nou camp d'estudi per aquesta quinasa a l'hora de descobrir noves funcions fisiològiques a la membrana.

A la part final del segon capítol, el canvi de model d'estudi ens ha portat a intentar entendre el paper de CK2 en els *lipid raft*, després d'haver estat capaços de detectar-la en les DRM de les cèl·lules del túbul proximal de ronyó HK-2. En aquell moment el pas d'HEK293T, que era el model d'estudi utilitzat al primer capítol, cap a HK-2 va coincidir amb el tram final de la tesi del Dr. Jordi Vilardell, bàsicament centrada en l'estudi del paper de CK2 en cèl·lules renals humanes. De fet, amb el mateix model d'estudi que el que es va utilitzar en aquesta tesi, les cèl·lules HK-2, es va veure que, en casos de fallades renals agudes, la localització del colesterol i la caveolina canviava durant el procés. Aquesta troballa va proposar per primera vegada la implicació dels *lipid raft* en la inducció i el manteniment de la fase aguda quan hi ha una fallada renal aguda [245].

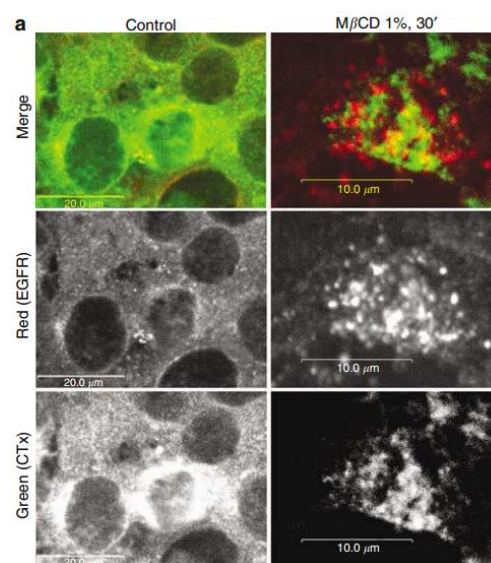
Per un altre costat s'ha comprovat, també en HK-2, l'existència d'un canvi de les proteïnes associades a *lipid raft* en el cas de la síndrome de Fabry, una malaltia genètica rara, relacionada amb problemes amb el metabolisme dels esfingolípid, que provoca una alteració en l'emmagatzemat lisosomal a causa de la deficiència de la  $\alpha$ -galactosidasa. L'acumulació d'esfingolípid es produeix preferentment en *lipid raft* i sembla que pot alterar-ne els mecanismes de resposta [246].

Per altra banda, les alteracions als *lipid raft* també s'han relacionat amb la progressió del carcinoma renal, on s'hi ha observat una regulació a l'alça de Flotilina-2 (Flot-2), tot i que el seu paper no és clar del tot [247]. El que sí que s'ha vist és que la Flot-2 hi està implicada d'alguna manera i sobretot serveix com a marcador del pronòstic del tumor [248]. De fet, en trobar CK2 endogenament activa unida a la regió dels DRM, emulant el que s'havia fet en la primera part del capítol, hem mirat de trobar una explicació fisiològica a aquesta situació.



Abans però, i un cop més treballant amb MCD, hem pogut acotar que la unió es fa dependent de colesterol (Figura 28), per tant ens trobem en un escenari semblant al que ens trobàvem a la primera part del capítol.

Una de les estructures que s'ha descrit que es troba present en *lipid raft* són els receptors del EGF [249] i per estudiar l'efecte que es produeix *downstream* vam triar la via de les MAPK per la facilitat d'estudi de la seva activació amb els anticossos contra ERK-1/2 i p-ERK-1/2. Aquesta via, al mateix temps, presenta diversos substrats de CK2, i s'ha vist que la quinasa hi juga un paper modulador important. A la bibliografia hi ha indicis clars que el tractament de les membranes cel·lulars amb MCD provoca el que es coneix com a *clustering* dels receptors d'EGF presents, i es pot produir una transactivació de la via i mostrar *downstream* senyals d'activació [189].



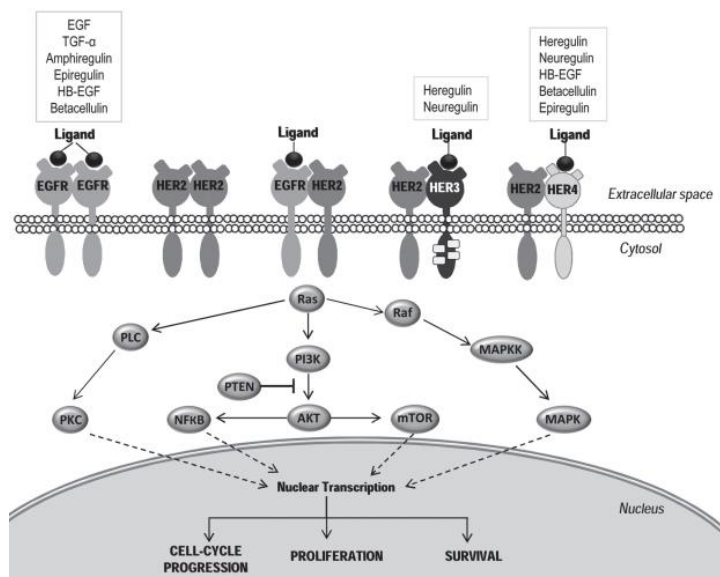
**Il·lustració 36 – El tractament amb MCD agrupa el receptors d'EGF.** La figura mostra l'efecte del tractament amb 1 % MCD sobre les cèl·lules HaCaT durant 30 minuts. Un cop fixades es van incubar amb anti-EGFR (vermell) i anti CTx-FITC (verd) per veure les membranes [189].

A més, s'ha descrit que una depleció severa de colesterol pot arribar a provocar fins i tot un augment de la proliferació cel·lular. Per tal de poder donar un valor a l'última figura de la tesi (Figura 30), on es mostra el resultat de l'estimulació amb diversos lligands dels receptors d'EGF i també l'efecte de la inhibició de la proteïna quinasa CK2, calia establir primer els nivells basals de fosforilació després del tractament amb MCD en veure el fenomen de la transactivació.

La família dels receptors d'EGF està formada per 4 receptors tirosina-quinasa coneguts com a EGFR (ErbB-1), HER2/c-neu (ErbB-2), HER3 (ErbB-3) and HER4 (ErbB-4), els quals poden homodimeritzar o heterodimeritzar. La Il·lustració 37 mostra les principals combinacions amb els lligands més establerts [250].



Alguns d'ells comparteixen lligand i altres tenen el seu d'específic i això ens va portar a comparar la resposta dels receptors quan els estimulàvem amb EGF (EGFR) o HB-EGF (EGFR i HER4) després de tractar les cèl·lules amb MCD, i les diferències han estat prou significatives (Figura 30).



**Il·lustració 37 – Receptors d'EGF.** Recull de les dimeritzacions més habituals dels receptors d'EGF i els seus lligands més comuns. La part inferior mostra una resum de les principals vies d'activació [251].

Tot i ser uns estudis inicials, el fet que la resposta no sigui la mateixa en EGF i HB-EGF és prou interessant. El tractament amb MCD sembla que afecta més la resposta per EGFR evitant la fosforilació *downstream* de p-ERK; en canvi, la resposta a HB-EGF es manté inalterable. De fet, treballs recents s'estan centrant molt en el paper de l'entorn dels receptors a l'hora d'avaluar la formació dels receptors i en els processos d'oligomerització, basant-se en que la presència de més monòmers del receptor agrupats poden corbar la membrana i alterar-ne la resposta [252].

Sens dubte, però, els nostres estudis en aquest camp han quedat molt lluny de la concreció d'alguns dels treballs referenciats. No deixa de ser intrigant, però, aquesta presència detectada de CK2 en *lipid raft* de les cèl·lules HK-2, i queda el camp obert per a futurs estudis.

## ***BIBLIOGRAFIA***

---



- [1] G. Burnett and E. Kennedy, "The enzymatic phosphorylation of proteins," *J Biol Chem*, vol. 211, pp. 969–980, 1954.
- [2] D. W. Litchfield, "Protein kinase CK2: structure, regulation and role in cellular decisions of life and death.," *Biochem. J.*, vol. 369, no. Pt 1, pp. 1–15, Jan. 2003.
- [3] F. J. Lozeman, D. W. Litchfield, C. Piening, K. Takio, K. A. Walsh, and E. G. Krebs, "Isolation and characterization of human cDNA clones encoding the alpha and the alpha' subunits of casein kinase II.," *Biochemistry*, vol. 29, no. 36, pp. 8436–8447, Sep. 1990.
- [4] D. W. Litchfield, F. J. Lozeman, C. Piening, J. Sommercorn, K. Takio, K. A. Walsh, and E. G. Krebs, "Subunit structure of casein kinase II from bovine testis: Demonstration that the  $\alpha$  and  $\alpha'$  subunits are distinct polypeptides," *J. Biol. Chem.*, vol. 265, no. 13, pp. 7638–7644, 1990.
- [5] Z. C. Litchfield DW1, Bosc DG, Canton DA, Saulnier RB, Vilks G, "Functional specialization of CK2 isoforms and characterization of isoform-specific binding partners," *Mol Cell Biochem*, vol. 227, no. 1–2, pp. 21–29, 2001.
- [6] C. V Glover CV 3rd, "On the physiological role of casein kinase II in *Saccharomyces cerevisiae*," *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*, vol. 59, pp. 95–133, 1998.
- [7] I. C. Vélez-Bermúdez, L. Carretero-Paulet, T. Legnaioli, D. Ludevid, M. Pagès, and M. Riera, "Novel CK2 $\alpha$  and CK2 $\beta$  subunits in maize reveal functional diversification in subcellular localization and interaction capacity," *Plant Sci.*, vol. 235, pp. 58–69, 2015.
- [8] F. Meggio, O. Marin, and L. A. Pinna, "Substrate specificity of protein kinase CK2," *Cell Mol Biol Res*, vol. 40, no. 5–6, pp. 401–409, 1994.
- [9] L. A. Pinna, "Protein kinase CK2: a challenge to canons," *J Cell Sci*, vol. 115, no. Pt 20, pp. 3873–3878, 2002.
- [10] F. Meggio and L. A. Pinna, "One-thousand-and-one substrates of protein kinase CK2?," *FASEB J*, vol. 17, no. 3, pp. 349–368, 2003.
- [11] D. W. Meek, S. Simon, U. Kikkawa, and W. Eckhart, "The p53 tumour suppressor protein is phosphorylated at serine 389 by casein kinase II," *EMBO J.*, vol. 9, no. 10, pp. 3253–3260, 1990.
- [12] L. K. Wilson, N. Dhillon, J. Thorner, and G. S. Martin, "Casein kinase II catalyzes tyrosine phosphorylation of the yeast nucleolar immunophilin Fpr3," *J. Biol. Chem.*, vol. 272, no. 20, pp. 12961–12967, 1997.
- [13] O. Marin, F. Meggio, S. Sarno, L. Cesaro, M. A. Pagano, and L. A. Pinna, "Tyrosine versus serine/threonine phosphorylation by protein kinase casein kinase-2. A study with peptide substrates derived from immunophilin Fpr3," *J. Biol. Chem.*, vol. 274, no. 41, pp. 29260–29265, 1999.
- [14] F. Romero-Oliva, G. Jacob, and J. E. Allende, "Dual effect of lysine-rich polypeptides on the activity of protein kinase CK2," *J. Cell. Biochem.*, vol. 89, no. 2, pp. 348–355, 2003.
- [15] M. Gatica, G. Jacob, C. C. Allende, and J. E. Allende, "DNA inhibits the catalytic activity of the alpha subunit of protein kinase CK2.," *Biochemistry*, vol. 34, no. 1, pp. 122–127, 1995.
- [16] K. Niefind, J. Raaf, and O. G. Issinger, "Protein kinase CK2: From structures to insights," *Cellular and Molecular Life Sciences*, vol. 66, no. 11–12, pp. 1800–1816, 2009.
- [17] E. Sajnaga, R. Szyszka, and K. Kubinski, "Site-Directed Mutagenesis in the Research of Protein Kinases - The Case of Protein Kinase CK2," in *Genetic Manipulation of DNA and Protein - Examples from Current Research*, InTech, 2013.
- [18] P. R. Blanquet, "Casein kinase 2 as a potentially important enzyme in the nervous system," *Progress in Neurobiology*, vol. 60, no. 3, pp. 211–246, 2000.
- [19] K. Niefind, B. Guerra, L. A. Pinna, O. G. Issinger, and D. Schomburg, "Crystal structure of the catalytic subunit of protein kinase CK2 from *Zea mays* at 2.1 Å resolution.," *EMBO J.*, vol. 17, no. 9, pp. 2451–62, 1998.
- [20] S. Sarno, P. Vaglio, O. Marin, O. G. Issinger, K. Ruffato, and L. A. Pinna, "Mutational analysis of residues implicated in the interaction between protein kinase CK2 and peptide substrates.," *Biochemistry*, vol. 36, no. 39, pp. 11717–24, 1997.

- [21] P. Vaglio, S. Sarno, O. Marina, F. Meggio, O. G. Issinger, and L. A. Pinna, "Mapping the residues of protein kinase CK2  $\alpha$  subunit responsible for responsiveness to polyanionic inhibitors," *FEBS Lett.*, vol. 380, no. 1–2, pp. 25–28, 1996.
- [22] S. Sarno, P. Vaglio, F. Meggio, O. G. Issinger, and L. a Pinna, "Protein kinase CK2 mutants defective in substrate recognition. Purification and kinetic analysis.," *J. Biol. Chem.*, vol. 271, no. 18, pp. 10595–10601, 1996.
- [23] O. Filhol, A. Nueda, V. Martel, D. Gerber-Scokaert, M. J. Benitez, C. Souchier, Y. Saoudi, and C. Cochet, "Live-cell fluorescence imaging reveals the dynamics of protein kinase CK2 individual subunits.," *Mol. Cell. Biol.*, vol. 23, no. 3, pp. 975–87, 2003.
- [24] a Donella-Deana, L. Cesaro, S. Sarno, AM. Brunati, M. Ruzzene, and L. a Pinna, "Autocatalytic tyrosine-phosphorylation of protein kinase CK2 alpha and alpha' subunits: implication of Tyr182.," *Biochem. J.*, vol. 357, no. Pt 2, pp. 563–567, 2001.
- [25] S. Sarno, P. Ghisellini, and L. A. Pinna, "Unique activation mechanism of protein kinase CK2. The N-terminal segment is essential for constitutive activity of the catalytic subunit but not of the holoenzyme," *J. Biol. Chem.*, vol. 277, no. 25, pp. 22509–22514, 2002.
- [26] A. C. Bibby and D. W. Litchfield, "The multiple personalities of the regulatory subunit of protein kinase CK2: CK2 dependent and CK2 independent roles reveal a secret identity for CK2beta.," *Int. J. Biol. Sci.*, vol. 1, no. 2, pp. 67–79, 2005.
- [27] K. Niefind, B. Guerra, I. Ermakowa, and O. G. Issinger, "Crystal structure of human protein kinase CK2: insights into basic properties of the CK2 holoenzyme.," *EMBO J.*, vol. 20, no. 19, pp. 5320–5331, 2001.
- [28] E. Valero, S. De Bonis, O. Filhol, R. H. Wade, J. Langowski, E. M. Chambaz, and C. Cochet, "Quaternary structure of casein kinase 2: Characterization of multiple oligomeric states and relation with its catalytic activity," *J. Biol. Chem.*, vol. 270, no. 14, pp. 8345–8352, 1995.
- [29] D. W. Litchfield, D. G. Bosc, and E. Slominski, "The protein kinase from mitotic human cells that phosphorylates Ser-209 on the casein kinase II beta-subunit is p34cdc2.," *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1269, no. 1, pp. 69–78, 1995.
- [30] J. E. Allende and C. C. Allende, "Protein kinases. 4. Protein kinase CK2: an enzyme with multiple substrates and a puzzling regulation.," *FASEB J.*, vol. 9, no. 5, pp. 313–323, 1995.
- [31] T. R. Soderling, "Protein kinases and phosphatases: regulation by autoinhibitory domains," *Biotechnol. Appl. Biochem.*, vol. 18 ( Pt 2), no. 0885–4513, pp. 185–200, 1993.
- [32] M. Kusk, C. Bendixen, M. Duno, O. Westergaard, and B. Thomsen, "Genetic dissection of intersubunit contacts within human protein kinase CK2.," *J. Mol. Biol.*, vol. 253, no. 5, pp. 703–711, 1995.
- [33] O. Marin, F. Meggio, S. Sarno, and L. A. Pinna, "Physical dissection of the structural elements responsible for regulatory properties and intersubunit interactions of protein kinase CK2 $\beta$ - subunit," *Biochemistry*, vol. 36, no. 23, pp. 7192–7198, 1997.
- [34] K. Appel, P. Wagner, B. Boldyreff, O. G. Issinger, and M. Montenarh, "Mapping of the interaction sites of the growth suppressor protein p53 with the regulatory beta-subunit of protein kinase CK2.," *Oncogene*, vol. 11, no. 10, pp. 1971–8, 1995.
- [35] B. B. Olsen, V. Jessen, P. Højrup, O. G. Issinger, and B. Boldyreff, "Protein kinase CK2 phosphorylates the Fas-associated factor FAF1 in vivo and influences its transport into the nucleus," *FEBS Lett.*, vol. 546, no. 2–3, pp. 218–222, 2003.
- [36] W. Krek, G. Maridor, and E. A. Nigg, "Casein kinase II is a predominantly nuclear enzyme," *J. Cell Biol.*, vol. 116, no. 1, pp. 43–55, 1992.
- [37] B. Guerra, S. Siemer, B. Boldyreff, and O. G. Issinger, "Protein kinase CK2: evidence for a protein kinase CK2 $\beta$  subunit fraction, devoid of the catalytic CK2 $\alpha$  subunit, in mouse brain and testicles," *FEBS Lett.*, vol. 462, no. 3, pp. 353–357, 1999.
- [38] M. Chen, D. Li, E. G. Krebs, and J. A. Cooper, "The casein kinase II beta subunit binds to Mos and inhibits Mos activity.," *Mol. Cell. Biol.*, vol. 17, no. 4, pp. 1904–12, 1997.

- [39] M. Chen and J. A. Cooper, "The beta subunit of CKII negatively regulates *Xenopus* oocyte maturation," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 94, no. 17, pp. 9136–9140, 1997.
- [40] I. Roussou and G. Draetta, "The Schizosaccharomyces-Pombe Casein Kinase-II Alpha-Subunit and Beta-Subunit - Evolutionary Conservation and Positive Role of the Beta-Subunit," *Mol. Cell. Biol.*, vol. 14, pp. 576–586, 1994.
- [41] G. Vilks, D. R. Derksen, and D. W. Litchfield, "Inducible expression of the regulatory protein kinase CK2beta subunit: incorporation into complexes with catalytic CK2 subunits and re-examination of the effects of CK2beta on cell proliferation.," *J. Cell. Biochem.*, vol. 84, no. 1, pp. 84–99, 2001.
- [42] D. W. Litchfield, G. Dobrowolska, and E. G. Krebs, "Regulation of casein kinase II by growth factors: a reevaluation.," *Cellular & molecular biology research*, vol. 40, no. 5–6, pp. 373–381, 1994.
- [43] O. Marin, F. Meggio, and L. A. Pinna, "Structural features underlying the unusual mode of calmodulin phosphorylation by protein kinase CK2: A study with synthetic calmodulin fragments.," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 256, no. 2, pp. 442–446, 1999.
- [44] M. Faust and M. Montenarh, "Subcellular localization of protein kinase CK2. A key to its function?," *Cell Tissue Res.*, vol. 301, no. 3, pp. 329–340, 2000.
- [45] B. Guerra and O. G. Issinger, "Protein kinase CK2 and its role in cellular proliferation, development and pathology.," *Electrophoresis*, vol. 20, no. 2, pp. 391–408, 1999.
- [46] W. Pyerin, E. Burow, K. Michaely, D. Kübler, and V. Kinzel, "Catalytic and molecular properties of highly purified phosphatase/casein kinase type II from human epithelial cells in culture (HeLa) and relation to ecto protein kinase.," *Biol. Chem. Hoppe. Seyler.*, vol. 368, no. 3, pp. 215–27, Mar. 1987.
- [47] A. M. B. Zylbersztejn, C. G. V. de Moraes, A. K. C. Lima, J. E. de O. Souza, A. H. Lopes, S. A. G. Da-Silva, M. A. C. Silva-Neto, and P. M. L. Dutra, "CK2 Secreted by *Leishmania braziliensis* Mediates Macrophage Association Invasion: A Comparative Study between Virulent and Avirulent Promastigotes.," *Biomed Res. Int.*, vol. 2015, p. 167323, 2015.
- [48] G. Cozza, S. Zanin, S. Sarno, E. Costa, C. Girardi, G. Ribaud, M. Salvi, G. Zagotto, M. Ruzzene, and L. A. Pinna, "Design, validation and efficacy of bisubstrate inhibitors specifically affecting ecto-CK2 kinase activity," *Biochem. J.*, vol. 471, no. 3, pp. 415–430, Nov. 2015.
- [49] C. Gil, A. Falques, E. Sarro, R. Cubi, J. Blasi, J. Aguilera, and E. Itarte, "Protein kinase CK2 associates to lipid rafts and its pharmacological inhibition enhances neurotransmitter release," *FEBS Lett.*, vol. 585, no. 2, pp. 414–420, 2011.
- [50] T. J. Singh and K. P. Huang, "Glycogen synthase (casein) kinase-1: tissue distribution and subcellular localization," *FEBS Lett.*, vol. 190, no. 1, pp. 84–88, Oct. 1985.
- [51] K. V. Kandror, A. O. Benumov, and A. S. Stepanov, "Casein kinase II from *Rana temporaria* oocytes. Intracellular localization and activity during progesterone-induced maturation," *Eur J Biochem*, vol. 180, no. 2, pp. 441–448, 1989.
- [52] J. A. Girault, H. C. Hemmings Jr., S. H. Zorn, E. L. Gustafson, and P. Greengard, "Characterization in mammalian brain of a DARPP-32 serine kinase identical to casein kinase II," *J Neurochem*, vol. 55, no. 5, pp. 1772–1783, 1990.
- [53] M. Watabe, S. Nakajo, T. Yoshida, Y. Kuroiwa, and K. Nakaya, "Treatment of U937 cells with bufalin induces the translocation of casein kinase 2 and modulates the activity of topoisomerase II prior to the induction of apoptosis.," *Cell Growth Differ.*, vol. 8, no. 8, pp. 871–9, 1997.
- [54] Z. Damuni and J. Reed, "Purification and properties of a protamine kinase and a type II casein kinase from bovine kidney mitochondria.," *Arch Biochem Biophys.*, vol. 262, no. (2), pp. 574–84, 1988.
- [55] D. Sarrouilhe and M. Baudry, "Evidence of true protein kinase CKII activity in mitochondria and its spermine-mediated translocation to inner membrane.," *Cell. Mol. Biol. (Noisy-le-grand)*, vol. 42, no. 2, pp. 189–197, 1996.

- [56] F. Qaiser, J. H. Trembley, B. T. Kren, J. J. Wu, A. K. Naveed, and K. Ahmed, "Protein kinase CK2 inhibition induces cell death via early impact on mitochondrial function," *J. Cell. Biochem.*, vol. 115, no. 12, pp. 2103–2115, 2014.
- [57] T. Fresques, B. Niles, S. Aronova, H. Mogri, T. Rakhshandehroo, and T. Powers, "Regulation of Ceramide Synthase by Casein Kinase 2-dependent Phosphorylation in *Saccharomyces cerevisiae*," 2014.
- [58] L. Serrano, M. A. Hernández, J. Díaz-Nido, J. Avila, M. A. Hernández, J. Díaz-Nido, and J. Avila, "Association of casein kinase II with microtubules," *Exp. Cell Res.*, vol. 181, no. 1, pp. 263–272, Mar. 1989.
- [59] L. a Pinna and F. Meggio, "Protein kinase CK2 ('casein kinase-2') and its implication in cell division and proliferation.," *Prog. Cell Cycle Res.*, vol. 3, pp. 77–97, 1997.
- [60] J. A. Greenwood, C. W. Scott, R. C. Spreen, C. B. Caputo, and G. V. W. Johnson, "Casein kinase II preferentially phosphorylates human tau isoforms containing an amino-terminal insert: Identification of threonine 39 as the primary phosphate acceptor," *J. Biol. Chem.*, vol. 269, no. 6, pp. 4373–4380, 1994.
- [61] L. Ulloa, J. Díaz-Nido, and J. Avila, "Depletion of casein kinase II by antisense oligonucleotide prevents neuritogenesis in neuroblastoma cells.," *EMBO J.*, vol. 12, no. 4, pp. 1633–40, 1993.
- [62] L. McKendrick, D. Milne, and D. Meek, "Protein kinase CK2-dependent regulation of p53 function: evidence that the phosphorylation status of the serine 386 (CK2) site of p53 is constitutive and stable.," *Mol. Cell. Biochem.*, vol. 191, no. 1–2, pp. 187–99, 1999.
- [63] C. Guo, S. Yu, A. T. Davis, and K. Ahmed, "Nuclear matrix targeting of the protein kinase CK2 signal as a common downstream response to androgen or growth factor stimulation of prostate cancer cells," *Cancer Res.*, vol. 59, no. 5, pp. 1146–1151, 1999.
- [64] F. A. Miro, F. Llorens, N. Roher, M. Plana, N. Gómez, and E. Itarte, "Persistent nuclear accumulation of protein kinase CK2 during the G1-phase of the cell cycle does not depend on the ERK1/2 pathway but requires active protein synthesis," *Arch. Biochem. Biophys.*, vol. 406, no. 2, pp. 165–172, 2002.
- [65] K. Niefind, J. Raaf, and O. G. Issinger, "Protein kinase CK2 in health and disease: Protein kinase CK2: from structures to insights," *Cell Mol Life Sci*, vol. 66, no. 11–12, pp. 1800–1816, 2009.
- [66] F. Lebrin, E. M. Chambaz, and L. Bianchini, "A role for protein kinase CK2 in cell proliferation: evidence using a kinase-inactive mutant of CK2 catalytic subunit alpha.," *Oncogene*, vol. 20, no. 2001, pp. 2010–2022, 2001.
- [67] M. Ruzzene, D. Penzo, and L. A. Pinna, "Protein kinase CK2 inhibitor 4,5,6,7-tetrabromobenzotriazole (TBB) induces apoptosis and caspase-dependent degradation of haematopoietic lineage cell-specific protein 1 (HS1) in Jurkat cells.," *Biochem. J.*, vol. 364, no. Pt 1, pp. 41–7, 2002.
- [68] P. F. Li, J. Li, E. C. Müller, A. Otto, R. Dietz, and R. Von Harsdorf, "Phosphorylation by protein kinase CK2: A signaling switch for the caspase-inhibiting protein ARC," *Mol. Cell*, vol. 10, no. 2, pp. 247–258, 2002.
- [69] B. B. Olsen, S.-Y. Wang, T. H. Svenstrup, B. P. C. Chen, and B. Guerra, "Protein kinase CK2 localizes to sites of DNA double-strand break regulating the cellular response to DNA damage.," *BMC Mol. Biol.*, vol. 13, p. 7, 2012.
- [70] K. Asano, J. Clayton, A. Shalev, and A. G. Hinnebusch, "A multifactor complex of eukaryotic initiation factors, eIF1, eIF2, eIF3, eIF5, and initiator tRNA(Met) is an important translation initiation intermediate in vivo," *Genes Dev.*, vol. 14, no. 19, pp. 2534–2546, 2000.
- [71] C. S. Fraser, J. Y. Lee, G. L. Mayeur, M. Bushell, J. A. Doudna, and J. W. B. Hershey, "The j-Subunit of Human Translation Initiation Factor eIF3 Is Required for the Stable Binding of eIF3 and Its Subcomplexes to 40 S Ribosomal Subunits in Vitro," *J. Biol. Chem.*, vol. 279, no. 10, pp. 8946–8956, Mar. 2004.

- [72] J. M. Ogle, F. V. Murphy, M. J. Tarry, and V. Ramakrishnan, "Selection of tRNA by the ribosome requires a transition from an open to a closed form," *Cell*, vol. 111, no. 5, pp. 721–732, 2002.
- [73] A. G. Hinnebusch, "The scanning mechanism of eukaryotic translation initiation.," *Annu. Rev. Biochem.*, vol. 83, pp. 779–812, 2014.
- [74] M. S. Sheikh, E. Fernandez-Salas, M. Yu, A. Hussain, J. D. Dinman, S. W. Peltz, Y. Huang, and A. J. Fornace, "Cloning and characterization of a human genotoxic and endoplasmic reticulum stress-inducible cDNA that encodes translation initiation factor 1(eIF1(A121/SUI1)),," *J. Biol. Chem.*, vol. 274, no. 23, pp. 16487–16493, Jun. 1999.
- [75] J. Chaudhuri, K. Si, and U. Maitra, "Function of eukaryotic translation initiation factor 1A (eIF1A) (formerly called eIF-4C) in initiation of protein synthesis," *J. Biol. Chem.*, vol. 272, no. 12, pp. 7883–7891, 1997.
- [76] M. R. Conte, G. Kelly, J. Babon, D. Sanfelice, J. Youell, S. J. Smerdon, and C. G. Proud, "Structure of the eukaryotic initiation factor (eIF) 5 reveals a fold common to several translation factors," *Biochemistry*, vol. 45, no. 14, pp. 4550–4558, 2006.
- [77] A. Unbehaun, A. Marintchev, I. B. Lomakin, T. Didenko, G. Wagner, C. U. T. Hellen, and T. V Pestova, "Position of eukaryotic initiation factor eIF5B on the 80S ribosome mapped by directed hydroxyl radical probing.," *EMBO J.*, vol. 26, no. 13, pp. 3109–23, Jul. 2007.
- [78] L. Valášek, K. H. Nielsen, and A. G. Hinnebusch, "Direct eIF2-eIF3 contact in the multifactor complex is important for translation initiation in vivo," *EMBO J.*, vol. 21, no. 21, pp. 5886–5898, 2002.
- [79] A. des Georges, V. Dhote, L. Kuhn, C. U. T. Hellen, T. V Pestova, J. Frank, and Y. Hashem, "Structure of mammalian eIF3 in the context of the 43S preinitiation complex.," *Nature*, vol. 525, no. 7570, pp. 491–5, 2015.
- [80] S. Khoshnevis, F. Hauer, P. Milon, H. Stark, and R. Ficner, "Novel insights into the architecture and protein interaction network of yeast eIF3," *Rna*, pp. 2306–2319, 2012.
- [81] M. G. Acker, S. E. Koltz, S. F. Mitchell, J. S. Nanda, and J. R. Lorsch, "Reconstitution of Yeast Translation Initiation," *Methods in Enzymology*, vol. 430, pp. 111–145, 2007.
- [82] A. R. Farley, D. W. Powell, C. M. Weaver, J. L. Jennings, and A. J. Link, "Assessing the components of the eIF3 complex and their phosphorylation status," *J Proteome Res*, vol. 10, no. 4, pp. 1481–1494, 2011.
- [83] A. Herrmannová, D. Daujotyte, J. C. Yang, L. Cuchalová, F. Gorrec, S. Wagner, I. Dányi, P. J. Lukavsky, and L. S. Valášek, "Structural analysis of an eIF3 subcomplex reveals conserved interactions required for a stable and proper translation pre-initiation complex assembly," *Nucleic Acids Res.*, vol. 40, no. 5, pp. 2294–2311, 2012.
- [84] J. Querol-Audi, C. Sun, J. M. Vogan, M. D. Smith, Y. Gu, J. H. D. Cate, and E. Nogales, "Architecture of human translation initiation factor 3," *Structure*, vol. 21, no. 6, pp. 920–928, 2013.
- [85] R. I. Enchev, A. Schreiber, F. Beuron, and E. P. Morris, "Structural insights into the COP9 signalosome and its common architecture with the 26S proteasome lid and eIF3," *Structure*, vol. 18, no. 4, pp. 518–527, 2010.
- [86] C. Borgo, C. Franchin, V. Salizzato, L. Cesaro, G. Arrigoni, L. Matricardi, L. A. Pinna, and A. Donella-Deana, "Protein kinase CK2 potentiates translation efficiency by phosphorylating eIF3j at Ser127," *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.*, vol. 1853, no. 7, pp. 1693–1701, 2015.
- [87] S. R. Kimball, "Eukaryotic initiation factor eIF2," *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, vol. 31, no. 1, pp. 25–29, 1999.
- [88] A. . Fallis, "Purification and characterization of a protein factor that reverses the inhibition of protein synthesis by the heme-regulated translational inhibitor in rabbit reticulocyte lysates.," *J. Chem. Inf. Model.*, vol. 53, no. 9, pp. 1689–1699, 2013.
- [89] L. D. Kapp and J. R. Lorsch, "The molecular mechanics of eukaryotic translation.," *Annu. Rev. Biochem.*, vol. 73, pp. 657–704, 2004.



- [90] T. Krishnamoorthy and G. Pavitt, "Tight binding of the phosphorylated  $\alpha$  subunit of initiation factor 2 (eIF2 $\alpha$ ) to the regulatory subunits of guanine nucleotide exchange factor eIF2B is required for inhibition of translation," *Mol. Cell. Biol.*, vol. 21, no. 15, 2001.
- [91] A. G. Hinnebusch, "Translational regulation of GCN4 and the general amino acid control of yeast.," *Annu. Rev. Microbiol.*, vol. 59, pp. 407–450, 2005.
- [92] S. Cho and D. W. Hoffman, "Structure of the beta subunit of translation initiation factor 2 from the archaeon *Methanococcus jannaschii*: a representative of the eIF2beta/eIF5 family of proteins," *Biochemistry*, vol. 41, no. 18, pp. 5730–5742, 2002.
- [93] L. Feng, H. Yoon, and T. F. Donahue, "Casein kinase II mediates multiple phosphorylation of *Saccharomyces cerevisiae* eIF-2 alpha (encoded by SUI2), which is required for optimal eIF-2 function in *S. cerevisiae*," *Mol Cell Biol*, vol. 14, no. 8, pp. 5139–5153, 1994.
- [94] Y. Zhang and L. L. Maduzia, "Mutations in *Caenorhabditis elegans* eIF2beta permit translation initiation from non-AUG start codons," *Genetics*, vol. 185, no. 1, pp. 141–152, 2010.
- [95] G. I. I. Welsh, N. T. T. Price, B. A. A. Bladergroen, G. Bloomberg, and C. G. G. Proud, "Identification of novel phosphorylation sites in the beta-subunit of translation initiation factor eIF-2," *Biochem Biophys Res Commun*, vol. 201, no. 3, pp. 1279–1288, Jun. 1994.
- [96] G. Poletto, J. Vilardell, O. Marin, M. A. Pagano, G. Cozza, S. Sarno, A. Falques, E. Itarte, L. A. Pinna, and F. Meggio, "The regulatory beta subunit of protein kinase CK2 contributes to the recognition of the substrate consensus sequence. A study with an eIF2 beta-derived peptide," *Biochemistry*, vol. 47, no. 32, pp. 8317–8325, 2008.
- [97] J. P. Laurino, G. M. Thompson, E. Pacheco, and B. a Castilho, "The beta subunit of eukaryotic translation initiation factor 2 binds mRNA through the lysine repeats and a region comprising the C2-C2 motif.," *Mol. Cell. Biol.*, vol. 19, no. 1, pp. 173–181, 1999.
- [98] T. G. Anthony, J. R. Fabian, S. R. Kimball, and L. S. Jefferson, "Identification of domains within the  $\epsilon$ -subunit of the translation initiation factor eIF2B that are necessary for guanine nucleotide exchange activity and eIF2B holoprotein formation," *Biochim. Biophys. Acta - Gene Struct. Expr.*, vol. 1492, no. 1, pp. 56–62, 2000.
- [99] S. Das, T. Maiti, K. Das, and U. Maitra, "Specific interaction of eukaryotic translation initiation factor 5 (eIF5) with the beta-subunit of eIF2," *J. Biol. Chem.*, vol. 272, no. 50, pp. 31712–31718, 1997.
- [100] C. R. Singh, Y. Yamamoto, and K. Asano, "Physical association of eukaryotic initiation factor (eIF) 5 carboxyl-terminal domain with the lysine-rich eIF2beta segment strongly enhances its binding to eIF3," *J Biol Chem*, vol. 279, no. 48, pp. 49644–49655, 2004.
- [101] P. V. Alone and T. E. Dever, "Direct binding of translation initiation factor eIF2 $\gamma$ -G domain to its GTPase-activating and GDP-GTP exchange factors eIF5 and eIF2B $\epsilon$ ," *J. Biol. Chem.*, vol. 281, no. 18, pp. 12636–12644, 2006.
- [102] C. R. Singh, Y. Yamamoto, and K. Asano, "Physical association of eukaryotic initiation factor (eIF) 5 carboxyl-terminal domain with the lysine-rich eIF2beta segment strongly enhances its binding to eIF3," *J Biol Chem*, vol. 279, no. 48, pp. 49644–49655, 2004.
- [103] S. Kebache, E. Cardin, D. T. Nguyễn, E. Chevet, and L. Larose, "Nck-1 Antagonizes the Endoplasmic Reticulum Stress-induced Inhibition of Translation," *J. Biol. Chem.*, vol. 279, no. 10, pp. 9662–9671, 2004.
- [104] F. Llorens, N. Roher, F. A. Miro, S. Sarno, F. X. Ruiz, F. Meggio, M. Plana, L. A. Pinna, and E. Itarte, "Eukaryotic translation-initiation factor eIF2beta binds to protein kinase CK2: effects on CK2alpha activity," *Biochem J*, vol. 375, no. Pt 3, pp. 623–631, 2003.
- [105] K. T. G. Rigbolt, T. A. Prokhorova, V. Akimov, J. Henningsen, P. T. Johansen, I. Kratchmarova, M. Kassem, M. Mann, J. V. Olsen, and B. Blagoev, "System-Wide Temporal Characterization of the Proteome and Phosphoproteome of Human Embryonic Stem Cell Differentiation," *Sci. Signal.*, vol. 4, no. 164, p. rs3-rs3, 2011.

- [106] H. Zhou, S. Di Palma, C. Preisinger, M. Peng, A. N. Polat, A. J. R. Heck, and S. Mohammed, "Toward a comprehensive characterization of a human cancer cell phosphoproteome," *J. Proteome Res.*, vol. 12, no. 1, pp. 260–271, 2013.
- [107] J. V Olsen, M. Vermeulen, A. Santamaria, C. Kumar, M. L. Miller, L. J. Jensen, F. Gnad, J. Cox, T. S. Jensen, E. A. Nigg, S. Brunak, M. Mann, L. Martin, L. J. Jensen, F. Gnad, J. Cox, T. S. Jensen, E. A. Nigg, S. Brunak, and M. Mann, "Quantitative phosphoproteomics reveals widespread full phosphorylation site occupancy during mitosis.," *Sci. Signal.*, vol. 3, no. 104, p. ra3, 2010.
- [108] V. Mayya, D. H. Lundgren, S.-I. Hwang, K. Rezaul, L. Wu, J. K. Eng, V. Rodionov, and D. K. Han, "Quantitative phosphoproteomic analysis of T cell receptor signaling reveals system-wide modulation of protein-protein interactions.," *Sci. Signal.*, vol. 2, no. 84, p. ra46, 2009.
- [109] C. Choudhary, C. Kumar, F. Gnad, M. L. Nielsen, M. Rehman, T. C. Walther, J. V Olsen, and M. Mann, "Lysine acetylation targets protein complexes and co-regulates major cellular functions.," *Science*, vol. 325, no. 5942, pp. 834–40, 2009.
- [110] R. Benne, J. Edman, R. R. Traut, and J. W. Hershey, "Phosphorylation of eukaryotic protein synthesis initiation factors," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 75, no. 1, pp. 108–112, 1978.
- [111] W. J. Lin, P. T. Tuazon, and J. A. Traugh, "Characterization of the catalytic subunit of casein kinase II expressed in *Escherichia coli* and regulation of activity," *J Biol Chem*, vol. 266, no. 9, pp. 5664–5669, 1991.
- [112] E. Damoc, C. S. Fraser, M. Zhou, H. Videler, G. L. Mayeur, J. W. B. Hershey, J. A. Doudna, C. V. Robinson, and J. A. Leary, "Structural characterization of the human eukaryotic initiation factor 3 protein complex by mass spectrometry.," *Mol. Cell. Proteomics*, vol. 6, no. 7, pp. 1135–1146, Apr. 2007.
- [113] O. G. Issinger, R. Benne, J. W. Hershey, and R. R. Traut, "Phosphorylation in vitro of eukaryotic initiation factors IF-E2 and IF-E3 by protein kinases," *J. Biol. Chem.*, vol. 251, no. 20, pp. 6471–6474, 1976.
- [114] F. Llorens, A. Duarri, E. Sarro, N. Roher, M. Plana, and E. Itarte, "The N-terminal domain of the human eIF2beta subunit and the CK2 phosphorylation sites are required for its function," *Biochem J*, vol. 394, no. Pt 1, pp. 227–236, 2006.
- [115] N. Janaki, V. M. Krishna, and K. V Ramaiah, "Phosphorylation of wheat germ initiation factor 2 (eIF-2) by N-ethylmaleimide-treated wheat germ lysates and by purified casein kinase II does not affect the guanine nucleotide exchange on eIF-2.," *Arch. Biochem. Biophys.*, vol. 324, no. 1, pp. 1–8, 1995.
- [116] L. P. Singh, R. Arorr, and J. Wahba, "Phosphorylation of the guanine nucleotide exchange factor and eukaryotic initiation factor 2 by casein kinase II regulates guanine nucleotide binding and GDP/GTP exchange.," *Biochemistry*, vol. 33, no. 31, pp. 9152–9157, 1994.
- [117] X. Wang, F. E. Paulin, L. E. Campbell, E. Gomez, K. O'Brien, N. Morrice, and C. G. Proud, "Eukaryotic initiation factor 2B: identification of multiple phosphorylation sites in the epsilon-subunit and their functions in vivo.," *EMBO J.*, vol. 20, no. 16, pp. 4349–59, 2001.
- [118] M. K. Homma, I. Wada, T. Suzuki, J. Yamaki, E. G. Krebs, and Y. Homma, "CK2 phosphorylation of eukaryotic translation initiation factor 5 potentiates cell cycle progression.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 102, no. 43, pp. 15688–15693, 2005.
- [119] R. Majumdar, A. Bandyopadhyay, H. Deng, and U. Maitra, "Phosphorylation of mammalian translation initiation factor 5 (eIF5) in vitro and in vivo," *Nucleic Acids Res*, vol. 30, no. 5, pp. 1154–1162, 2002.
- [120] T. Maiti, A. Bandyopadhyay, and U. Maitra, "Casein kinase II phosphorylates translation initiation factor 5 (eIF5) in *Saccharomyces cerevisiae*," *Yeast*, vol. 20, no. 2, pp. 97–108, 2003.

- [121] S. J. Singer and G. L. Nicolson, "The fluid mosaic model of the structure of cell membranes," *Science* (80- ), vol. 175, no. 23, pp. 720–731, 1972.
- [122] G. L. Nicolson, "The Fluid - Mosaic Model of Membrane Structure: Still relevant to understanding the structure, function and dynamics of biological membranes after more than 40 years," *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, vol. 1838, no. 6. pp. 1451–1466, 2014.
- [123] A. de Laurentiis, L. Donovan, and A. Arcaro, "Lipid rafts and caveolae in signaling by growth factor receptors.," *Open Biochem. J.*, vol. 1, pp. 12–32, 2007.
- [124] D. A. Brown and J. K. Rose, "Sorting of GPI-anchored proteins to glycolipid-enriched membrane subdomains during transport to the apical cell surface," *Cell*, vol. 68, no. 3, pp. 533–544, 1992.
- [125] W. Van't Hof and G. Van Meer, *Lipid polarity and sorting in epithelial cells*, vol. 40, no. C. 1994.
- [126] S. Sonnino and Prinetti, "Membrane domains and the 'lipid raft' concept.," *Curr. Med. Chem.*, vol. 20, no. 1, pp. 4–21, 2013.
- [127] N. M. Hooper, "Detergent-insoluble glycosphingolipid/cholesterol-rich membrane domains, lipid rafts and caveolae (review).," *Mol. Membr. Biol.*, vol. 16, no. 2, pp. 145–56, 1999.
- [128] L. H. Chamberlain, "Detergents as tools for the purification and classification of lipid rafts," *FEBS Letters*, vol. 559, no. 1–3. pp. 1–5, 2004.
- [129] S. Munro, "Lipid Rafts: Elusive or Illusive?," *Cell*, vol. 115, no. 4. pp. 377–388, 2003.
- [130] N. Madore, K. L. Smith, C. H. Graham, Jen, K. Brady, S. Hall, and R. Morris, "Functionally different GPI proteins are organized in different domains on the neuronal surface.," *EMBO J.*, vol. 18, no. 24, pp. 6917–6926, 1999.
- [131] C. M. Taylor, T. Coetzee, and S. E. Pfeiffer, "Detergent-insoluble glycosphingolipid/cholesterol microdomains of the myelin membrane," *J. Neurochem.*, vol. 81, no. 5, pp. 993–1004, 2002.
- [132] B. Razani, S. E. Woodman, and M. P. Lisanti, "Caveolae: from cell biology to animal physiology.," *Pharmacol. Rev.*, vol. 54, no. 3, pp. 431–467, 2002.
- [133] Y. E., "The fine structure of the gall bladder epithelium of the mouse.," *J. Biophys Biochem Cytol*, vol. 1(5):445-5, 1955.
- [134] E. J. Smart, Y. S. Ying, C. Mineo, and R. G. Anderson, "A detergent-free method for purifying caveolae membrane from tissue culture cells.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 92, no. 22, pp. 10104–10108, Oct. 1995.
- [135] S. N. Ahmed, D. A. Brown, and E. London, "On the origin of sphingolipid/cholesterol-rich detergent-insoluble cell membranes: Physiological concentrations of cholesterol and sphingolipid induce formation of a detergent-insoluble, liquid-ordered lipid phase in model membranes," *Biochemistry*, vol. 36, no. 36, pp. 10944–10953, Sep. 1997.
- [136] D. A. Brown and E. London, "Structure and function of sphingolipid- and cholesterol-rich membrane rafts," *J. Biol. Chem.*, vol. 275, no. 23, pp. 17221–17224, Jun. 2000.
- [137] D. J. Dietzen, W. R. Hastings, and D. M. Lublin, "Caveolin is palmitoylated on multiple cysteine residues. Palmitoylation is not necessary for localization of caveolin to caveolae," *J. Biol. Chem.*, vol. 270, no. 12, pp. 6838–6842, Mar. 1995.
- [138] D. Hailstones, L. S. Sleer, R. G. Parton, and K. K. Stanley, "Regulation of caveolin and caveolae by cholesterol in MDCK cells," *J. Lipid Res.*, vol. 39, no. 2, pp. 369–379, Feb. 1998.
- [139] D. Volonte, F. Galbiati, S. Li, K. Nishiyama, T. Okamoto, and M. P. Lisanti, "Flotillins/cavatellins are differentially expressed in cells and tissues and form a hetero-oligomeric complex with caveolins in vivo: Characterization and epitope-mapping of a novel flotillin-1 monoclonal antibody probe," *J. Biol. Chem.*, vol. 274, no. 18, pp. 12702–12709, 1999.

- [140] M. Pilarczyk, L. Mateuszuk, A. Rygula, M. Kepczynski, S. Chlopicki, M. Baranska, and A. Kaczor, "Endothelium in spots--high-content imaging of lipid rafts clusters in db/db mice," *PLoS One*, vol. 9, no. 8, p. e106065, 2014.
- [141] K. Simons and E. Ikonen, "Functional rafts in cell membranes," *Nature*, vol. 387, no. 6633, pp. 569–572, 1997.
- [142] K. Jacobson, O. G. Mouritsen, and R. G. W. Anderson, "Lipid rafts: at a crossroad between cell biology and physics.," *Nat. Cell Biol.*, vol. 9, no. 1, pp. 7–14, 2007.
- [143] B. Brügger, C. Graham, I. Leibrecht, E. Mombelli, A. Jen, F. Wieland, and R. Morris, "The Membrane Domains Occupied by Glycosylphosphatidylinositol-anchored Prion Protein and Thy-1 Differ in Lipid Composition," *J. Biol. Chem.*, vol. 279, no. 9, pp. 7530–7536, Feb. 2004.
- [144] H. H. Patel, F. Murray, and P. A. Insel, "G-Protein-coupled receptor-signaling components in membrane raft and caveolae microdomains," *Handb. Exp. Pharmacol.*, vol. 186, no. 186, pp. 167–184, 2008.
- [145] A. Wells, "EGF receptor," *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, vol. 31, no. 6, pp. 637–643, Jun. 1999.
- [146] S. Eguchi, H. Iwasaki, H. Ueno, G. D. Frank, E. D. Motley, K. Eguchi, F. Marumo, Y. Hirata, and T. Inagami, "Intracellular signaling of angiotensin II-induced p70 S6 kinase phosphorylation at Ser(411) in vascular smooth muscle cells. Possible requirement of epidermal growth factor receptor, Ras, extracellular signal-regulated kinase, and Akt.," *J. Biol. Chem.*, vol. 274, no. 52, pp. 36843–51, Dec. 1999.
- [147] R. N. Jorissen, F. Walker, N. Pouliot, T. P. Garrett, C. W. Ward, and A. W. Burgess, "Epidermal growth factor receptor: mechanisms of activation and signalling," *Exp Cell Res*, vol. 284, no. 1, pp. 31–53, 2003.
- [148] E. B. Erba, R. Matthiesen, J. Bunkenborg, W. X. Schulze, P. Di Stefano, S. Cabodi, G. Tarone, P. Defilippi, and O. N. Jensen, "Quantitation of multisite EGF receptor phosphorylation using mass spectrometry and a novel normalization approach," *J. Proteome Res.*, vol. 6, no. 7, pp. 2768–2785, 2007.
- [149] J. M. Han, Y. Kim, J. S. Lee, C. S. Lee, B. D. Lee, M. Ohba, T. Kuroki, P.-G. Suh, and S. H. Ryu, "Localization of phospholipase D1 to caveolin-enriched membrane via palmitoylation: implications for epidermal growth factor signaling.," *Mol. Biol. Cell*, vol. 13, no. 11, pp. 3976–88, Nov. 2002.
- [150] J. Couet, M. Sargiacomo, and M. P. Lisanti, "Interaction of a receptor tyrosine kinase, EGF-R, with caveolins. Caveolin binding negatively regulates tyrosine and serine/threonine kinase activities," *J. Biol. Chem.*, vol. 272, no. 48, pp. 30429–30438, 1997.
- [151] J. Thudichum, *A treatise on the chemical constitution of the brain*. London: Bailliere Tindall and Cox, 1884.
- [152] P. S. Sastry, "Lipids of nervous tissue: Composition and metabolism," *Progress in Lipid Research*, vol. 24, no. 2, pp. 69–176, 1985.
- [153] L. Svennerholm, K. Boström, P. Fredman, J. E. Månsson, B. Rosengren, and B. M. Rynmark, "Human brain gangliosides: developmental changes from early fetal stage to advanced age.," *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1005, no. 2, pp. 109–17, 1989.
- [154] S. Pfeiffer, Warrington, and R. Bansal, "The oligodendrocyte and its many cellular processes," *Trends Cell Biol.*, vol. 3, no. 6, pp. 191–197, 1993.
- [155] Y. Fukuda, T. Fukui, C. Hikichi, T. Ishikawa, K. Murate, T. Adachi, H. Imai, K. Fukuhara, A. Ueda, A. P. Kaplan, and T. Mutoh, "Neurotrophin promotes NGF signaling through interaction of GM1 ganglioside with Trk neurotrophin receptor in PC12 cells," *Brain Res.*, vol. 1596, pp. 13–21, 2015.
- [156] J. P. Bombardier and M. Munson, "Three steps forward, two steps back: Mechanistic insights into the assembly and disassembly of the SNARE complex," *Current Opinion in Chemical Biology*, vol. 29, pp. 66–71, 2015.

- [157] Z. Hua, S. Leal-Ortiz, S. M. Foss, C. L. Waites, C. C. Garner, S. M. Voglmaier, and R. H. Edwards, "V-SNARE composition distinguishes synaptic vesicle pools," *Neuron*, vol. 71, no. 3, pp. 474–487, 2011.
- [158] C. Rickman, C. N. Medine, A. R. Dun, D. J. Moulton, O. Mandula, N. D. Halemani, S. O. Rizzoli, L. H. Chamberlain, and R. R. Duncan, "t-SNARE protein conformations patterned by the lipid microenvironment," *J. Biol. Chem.*, vol. 285, no. 18, pp. 13535–13541, 2010.
- [159] J. Herreros, F. X. Miralles, C. Solsona, B. Bizzini, J. Blasi, and J. Marsal, "Tetanus toxin inhibits spontaneous quantal release and cleaves VAMP/synaptobrevin," *Brain Res.*, vol. 699, no. 2, pp. 165–170, 1995.
- [160] J. Rizo and T. C. Südhof, "Snares and Munc18 in synaptic vesicle fusion.," *Nat Rev Neurosci*, vol. 3, no. 8, pp. 641–653, 2002.
- [161] Z. Xia, Q. Zhou, J. Lin, and Y. Liu, "Stable SNARE complex prior to evoked synaptic vesicle fusion revealed by fluorescence resonance energy transfer," *J. Biol. Chem.*, vol. 276, no. 3, pp. 1766–1771, 2001.
- [162] S. Mochida, "Protein-protein interactions in neurotransmitter release.," *Neurosci. Res.*, vol. 36, no. 3, pp. 175–182, 2000.
- [163] J. Rizo and T. C. Südhof, *The Membrane Fusion Enigma: SNAREs, Sec1/Munc18 Proteins, and Their Accomplices—Guilty as Charged?*, vol. 28, no. 1. 2012.
- [164] C. N. Egbujo, D. Sinclair, and C. G. Hahn, "Dysregulations of Synaptic Vesicle Trafficking in Schizophrenia," *Current Psychiatry Reports*, vol. 18, no. 8. 2016.
- [165] S. Tadokoro, T. Shibata, Y. Inoh, T. Amano, M. Nakanishi, N. Hirashima, and N. Utsunomiya-Tate, "Phosphorylation of syntaxin-3 at Thr 14 negatively regulates exocytosis in RBL-2H3 mast cells," *Cell Biol. Int.*, vol. 40, no. 5, pp. 589–596, May 2016.
- [166] Eduardo Miranda, "Yeast Cell Counting with a Neubauer Chamber - ZYMOsphere," 2016. [Online]. Available: <http://www.zyмосphere.com/blog/article/29>. [Accessed: 12-Dec-2016].
- [167] S. Miyamoto, P. Patel, and J. W. B. Hershey, "Changes in ribosomal binding activity of eIF3 correlate with increased translation rates during activation of T lymphocytes," *J Biol Chem*, vol. 280, no. 31, pp. 28251–28264, 2005.
- [168] S. Miyamoto, P. Patel, and J. W. Hershey, "Changes in ribosomal binding activity of eIF3 correlate with increased translation rates during activation of T lymphocytes," *J Biol Chem*, vol. 280, no. 31, pp. 28251–28264, 2005.
- [169] M. M. Bradford, "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding," *Anal Biochem*, vol. 72, pp. 248–254, May 1976.
- [170] C. M. Stoscheck, "Quantitation of protein," *Methods Enzym.*, vol. 182, pp. 50–68, 1990.
- [171] Y. Durocher, S. Perret, and A. Kamen, "High-level and high-throughput recombinant protein production by transient transfection of suspension-growing human 293-EBNA1 cells," *Nucleic Acids Res*, vol. 30, no. 2, p. E9, 2002.
- [172] J. Renart, J. Reiser, and G. R. Stark, "Transfer of proteins from gels to diazobenzoyloxymethyl-paper and detection with antisera: a method for studying antibody specificity and antigen structure," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 76, no. 7, pp. 3116–3120, 1979.
- [173] H. Towbin, T. Staehelin, and J. Gordon, "Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 76, no. 9, pp. 4350–4354, 1979.
- [174] U. K. Laemmli, "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4," *Nature*, vol. 227, no. 5259, pp. 680–685, 1970.
- [175] B. K. Hay-Yan Wu, Kay Opperman, "Isolate Functional Synaptosomes," 2011.

- [176] E. G. Gray and V. P. Whittaker, "The isolation of nerve endings from brain: an electron-microscopic study of cell fragments derived by homogenization and centrifugation," *J Anat*, vol. 96, pp. 79–88, 1962.
- [177] S. Mahammad and I. Parmryd, "Cholesterol depletion using methyl- $\beta$ -cyclodextrin," in *Methods in Membrane Lipids: Second Edition*, 2014, pp. 91–102.
- [178] chem.uwec.edu, "Glutamate Dehydrogenase," 2005. [Online]. Available: <http://www.chem.uwec.edu/webpapers2005/mintermm/pages/gdh.html>. [Accessed: 12-Dec-2016].
- [179] M. A. Carmona, A. Martinez, A. Soler, J. Blasi, E. Soriano, and F. Aguado, "Ca(2+)-evoked synaptic transmission and neurotransmitter receptor levels are impaired in the forebrain of *trkb* (-/-) mice," *Mol Cell Neurosci*, vol. 22, no. 2, pp. 210–226, 2003.
- [180] P. Wakula, M. Beullens, A. van Eynde, H. Ceulemans, W. Stalmans, and M. Bollen, "The translation initiation factor eIF2beta is an interactor of protein phosphatase-1," *Biochem J*, vol. 400, no. 2, pp. 377–383, 2006.
- [181] R. Battistutta, E. De Moliner, S. Sarno, G. Zanotti, and L. A. Pinna, "Structural features underlying selective inhibition of protein kinase CK2 by ATP site-directed tetrabromo-2-benzotriazole," *Protein Sci*, vol. 10, no. 11, pp. 2200–2206, 2001.
- [182] M. A. Pagano, F. Meggio, M. Ruzzene, M. Andrzejewska, Z. Kazimierczuk, and L. A. Pinna, "2-Dimethylamino-4,5,6,7-tetrabromo-1H-benzimidazole: a novel powerful and selective inhibitor of protein kinase CK2.," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 321, no. 4, pp. 1040–4, Sep. 2004.
- [183] P. Drevot, C. Langlet, X. J. Guo, A. M. Bernard, O. Colard, J. P. Chauvin, R. Lasserre, and H. T. He, "TCR signal initiation machinery is pre-assembled and activated in a subset of membrane rafts," *EMBO J*, vol. 21, no. 8, pp. 1899–1908, 2002.
- [184] S. K. Rodal, G. Skretting, O. Garred, F. Vilhardt, B. van Deurs, and K. Sandvig, "Extraction of cholesterol with methyl-beta-cyclodextrin perturbs formation of clathrin-coated endocytic vesicles," *Mol Biol Cell*, vol. 10, no. 4, pp. 961–974, Apr. 1999.
- [185] D. A. Ritt, M. Zhou, T. P. Conrads, T. D. Veenstra, T. D. Copeland, and D. K. Morrison, "CK2 is a component of the KSR1 scaffold complex that contributes to Raf kinase activation," *Curr Biol*, vol. 17, no. 2, pp. 179–184, 2007.
- [186] P. P. López-Casas and J. Del Mazo, "Regulation of flotillin-1 in the establishment of NIH-3T3 cell-cell interactions," *FEBS Lett.*, vol. 555, no. 2, pp. 223–228, Dec. 2003.
- [187] Á. Szöör, L. Ujlaky-Nagy, G. Tóth, J. Szöllosi, and G. Vereb, "Cell confluence induces switching from proliferation to migratory signaling by site-selective phosphorylation of PDGF receptors on lipid raft platforms," *Cell. Signal.*, vol. 28, no. 2, pp. 81–93, 2016.
- [188] C. Puri, D. Tosoni, R. Comai, A. Rabellino, D. Segat, F. Caneva, P. Luzzi, P. P. Di Fiore, and C. Tacchetti, "Relationships between EGFR signaling-competent and endocytosis-competent membrane microdomains.," *Mol. Biol. Cell*, vol. 16, no. 6, pp. 2704–18, 2005.
- [189] S. Lambert, D. Vind-Kezunovic, S. Karvinen, and R. Gniadecki, "Ligand-independent activation of the EGFR by lipid raft disruption.," *J. Invest. Dermatol.*, vol. 126, pp. 954–962, 2006.
- [190] M. J. Ku, J. W. Park, B. J. Ryu, Y. J. Son, S. H. Kim, and S. Y. Lee, "CK2 inhibitor CX4945 induces sequential inactivation of proteins in the signaling pathways related with cell migration and suppresses metastasis of A549 human lung cancer cells," *Bioorganic Med. Chem. Lett.*, vol. 23, no. 20, pp. 5609–5613, 2013.
- [191] M. Guéguinou, A. Gambade, R. Félix, A. Chantôme, Y. Fourbon, P. Bougnoux, G. Weber, M. Potier-Cartereau, and C. Vandier, "Lipid rafts, KCa/CICa/Ca<sup>2+</sup> channel complexes and EGFR signaling: Novel targets to reduce tumor development by lipids?," *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, vol. 1848, no. 10, pp. 2603–2620, 2015.

- [192] S.-T. Chou, R. Patil, A. Galstyan, P. R. Gangalum, W. K. Cavenee, F. B. Furnari, V. A. Ljubimov, A. Chesnokova, A. A. Kramerov, H. Ding, V. Falahatian, L. Mashouf, I. Fox, K. L. Black, E. Holler, A. V Ljubimov, and J. Y. Ljubimova, "Simultaneous blockade of interacting CK2 and EGFR pathways by tumor-targeting nanobioconjugates increases therapeutic efficacy against glioblastoma multiforme.," *J. Control. Release*, Nov. 2016.
- [193] H. Lian, D. Li, Y. Zhou, E. Landesman-Bollag, G. Zhang, N. M. Anderson, K. C. Tang, J. E. Roderick, M. A. Kelliher, D. C. Seldin, H. Fu, and H. Feng, "CK2 inhibitor CX-4945 destabilizes NOTCH1 and synergizes with JQ1 against human T-acute lymphoblastic leukemic cells.," *Haematologica*, Oct. 2016.
- [194] C. Gowda, C. Song, M. Kapadia, J. L. Payne, T. Hu, Y. Ding, and S. Dovat, "Regulation of cellular proliferation in acute lymphoblastic leukemia by Casein Kinase II (CK2) and Ikaros.," *Adv. Biol. Regul.*, Sep. 2016.
- [195] K. Ahmed, B. T. Kren, M. Joynal Abedin, R. I. Vogel, D. P. Shaughnessy, L. Nacusi, V. L. Korman, Y. Li, S. M. Dehm, C. L. Zimmerman, G. A. Niehans, G. M. Unger, and J. H. Trembley, "CK2 targeted RNAi therapeutic delivered via malignant cell-directed tenfibgen nanocapsule: dose and molecular mechanisms of response in xenograft prostate tumors," *Oncotarget*, Sep. 2016.
- [196] S. Crunkhorn, "Autoimmune disease: CK2 blockade ameliorates EAE.," *Nat. Rev. Drug Discov.*, vol. 15, no. 11, p. 750, Nov. 2016.
- [197] S. Liu, Y. Gao, X. Yu, B. Zhao, L. Liu, Y. Zhao, Z. Luo, and J. Shi, "Annexin-1 Mediates Microglial Activation and Migration via the CK2 Pathway during Oxygen-Glucose Deprivation/Reperfusion.," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 17, no. 10, Oct. 2016.
- [198] J. Zhou, Y.-H. Zhang, H.-Z. Song, H. Ji, X.-L. Wang, L. Wang, J. Qian, J.-J. Ling, and F.-F. Ping, "5d, a novel analogue of 3-n-butylphthalide, decreases NADPH oxidase activity through the positive regulation of CK2 after ischemia/reperfusion injury.," *Oncotarget*, vol. 7, no. 26, pp. 39444–39457, Jun. 2016.
- [199] C. Gowda, M. Sachdev, S. Muthisami, M. Kapadia, L. Petrovic-Dovat, M. Hartman, Y. Ding, C. Song, J. L. Payne, B.-H. Tan, and S. Dovat, "Casein kinase II (CK2) as a therapeutic target for hematological malignancies.," *Curr. Pharm. Des.*, Oct. 2016.
- [200] F. Chen, X. Huang, M. Wu, S. Gou, and W. Hu, "A CK2-targeted Pt(IV) prodrug to disrupt DNA damage response.," *Cancer Lett.*, Oct. 2016.
- [201] M. de Bourayne, Y. Gallais, Z. El Ali, P. Rousseau, M.-H. Damiens, C. Cochet, O. Filhol, S. Chollet-Martin, M. Pallardy, and S. Kerdine-Romer, "Protein kinase CK2 controls T-cell polarization through dendritic cell activation in response to contact sensitizers.," *J. Leukoc. Biol.*, Oct. 2016.
- [202] M. Sokabe, C. S. Fraser, and J. W. B. Hershey, "The human translation initiation multi-factor complex promotes methionyl-tRNAi binding to the 40S ribosomal subunit," *Nucleic Acids Res.*, vol. 40, no. 2, pp. 905–913, Jan. 2012.
- [203] M. Sokabe, C. S. Fraser, and J. W. B. Hershey, "The human translation initiation multi-factor complex promotes methionyl-tRNA i binding to the 40S ribosomal subunit," *Nucleic Acids Res.*, vol. 40, no. 2, pp. 905–913, Jan. 2012.
- [204] M. Sokabe and C. S. Fraser, "Human eukaryotic initiation factor 2 (eIF2)-GTP-Met-tRNAi ternary complex and eIF3 stabilize the 43 S preinitiation complex.," *J. Biol. Chem.*, vol. 289, no. 46, pp. 31827–36, Nov. 2014.
- [205] G. Poletto, J. Vilardell, O. Marin, M. a Pagano, G. Cozza, S. Sarno, A. Falqués, E. Itarte, L. a Pinna, and F. Meggio, "The regulatory beta subunit of protein kinase CK2 contributes to the recognition of the substrate consensus sequence. A study with an eIF2 beta-derived peptide.," *Biochemistry*, vol. 47, no. 32, pp. 8317–8325, 2008.
- [206] A. R. Farley, D. W. Powell, C. M. Weaver, J. L. Jennings, and A. J. Link, "Assessing the components of the eIF3 complex and their phosphorylation status," *J Proteome Res*, vol. 10, no. 4, pp. 1481–1494, 2011.

- [207] K. Pachler, T. Karl, K. Kolmann, N. Mehlmer, M. Eder, M. Loeffler, K. Oender, E. O. Hochleitner, F. Lottspeich, N. Bresgen, K. Richter, M. Breitenbach, and L. Koller, "Functional interaction in establishment of ribosomal integrity between small subunit protein rpS6 and translational regulator rpL10/Grc5p," *FEMS Yeast Res.*, vol. 5, no. 3, pp. 271–280, 2004.
- [208] K. H. Nielsen, B. Szamecz, L. Valásek, A. Jivotovskaya, B.-S. Shin, and A. G. Hinnebusch, "Functions of eIF3 downstream of 48S assembly impact AUG recognition and GCN4 translational control.," *EMBO J.*, vol. 23, no. 5, pp. 1166–77, 2004.
- [209] A. V. Jivotovskaya, L. Valasek, A. G. Hinnebusch, and K. H. Nielsen, "Eukaryotic Translation Initiation Factor 3 (eIF3) and eIF2 Can Promote mRNA Binding to 40S Subunits Independently of eIF4G in Yeast," *Mol. Cell. Biol.*, vol. 26, no. 4, pp. 1355–1372, 2006.
- [210] A. Siddiqui-Jain, D. Drygin, N. Streiner, P. Chua, F. Pierre, S. E. O'Brien, J. Bliesath, M. Otori, N. Huser, C. Ho, C. Proffitt, M. K. Schwaebe, D. M. Ryckman, W. G. Rice, and K. Anderes, "CX-4945, an orally bioavailable selective inhibitor of protein kinase CK2, inhibits prosurvival and angiogenic signaling and exhibits antitumor efficacy," *Cancer Res.*, vol. 70, no. 24, pp. 10288–10298, 2010.
- [211] V. Salizzato, C. Borgo, L. Cesaro, L. A. Pinna, and A. Donella-Deana, "Inhibition of protein kinase CK2 by CX-5011 counteracts imatinib-resistance preventing rpS6 phosphorylation in chronic myeloid leukaemia cells: new combined therapeutic strategies.," *Oncotarget*, vol. 7, no. 14, pp. 18204–18, Apr. 2016.
- [212] M. D. Dennis, M. D. Person, and K. S. Browning, "Phosphorylation of plant translation initiation factors by CK2 enhances the in vitro interaction of multifactor complex components," *J Biol Chem*, vol. 284, no. 31, pp. 20615–20628, 2009.
- [213] J. I. Heazlewood, P. Durek, J. Hummel, J. Selbig, W. Weckwerth, D. Walther, and W. X. Schulze, "PhosPhAt: A database of phosphorylation sites in *Arabidopsis thaliana* and a plant-specific phosphorylation site predictor," *Nucleic Acids Res.*, vol. 36, no. SUPPL. 1, 2008.
- [214] M. D. Dennis and K. S. Browning, "Differential phosphorylation of plant translation initiation factors by *Arabidopsis thaliana* CK2 holoenzymes," *J. Biol. Chem.*, vol. 284, no. 31, pp. 20602–20614, 2009.
- [215] F. A. Rodriguez, C. Contreras, V. Bolanos-Garcia, and J. E. Allende, "Protein kinase CK2 as an ectokinase: The role of the regulatory CK2 subunit," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 105, no. 15, pp. 5693–5698, Apr. 2008.
- [216] R. Trujillo, F. Miró, M. Plana, M. José, M. Bollen, W. Stalmans, and E. Itarte, "Substrates for Protein Kinase CK2 in Insulin Receptor Preparations from Rat Liver Membranes: Identification of a 210-kDa Protein Substrate as the Dimeric Form of Endoplasmin," *Arch. Biochem. Biophys.*, vol. 344, no. 1, pp. 18–28, Aug. 1997.
- [217] J. Diaz-Nido, K. Mizuno, H. Nawa, and D. R. Marshak, "Regulation of protein kinase CK2 isoform expression during rat brain development," *Cell Mol Biol Res*, vol. 40, pp. 581–585, 1994.
- [218] J. Avila, L. Ulloa, J. González, F. Moreno, and J. Díaz-Nido, "Phosphorylation of microtubule-associated proteins by protein kinase CK2 in neuritogenesis.," *Cell. Mol. Biol. Res.*, vol. 40, no. 5–6, pp. 573–9, 1994.
- [219] C. Charriaut-Marlangue, S. Otani, C. Creuzet, Y. Ben-Ari, and J. Loeb, "Rapid activation of hippocampal casein kinase II during long-term potentiation.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 88, no. 22, pp. 10232–6, 1991.
- [220] R. Kimura and N. Matsuki, "Protein kinase CK2 modulates synaptic plasticity by modification of synaptic NMDA receptors in the hippocampus.," *J. Physiol.*, vol. 586, no. 13, pp. 3195–206, 2008.



- [221] M.-A. Arevalo and A. Rodríguez-Tébar, "Activation of casein kinase II and inhibition of phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10 phosphatase by nerve growth factor/p75NTR inhibit glycogen synthase kinase-3beta and stimulate axonal growth.," *Mol. Biol. Cell*, vol. 17, no. 8, pp. 3369–77, Aug. 2006.
- [222] R. Goswami, D. Singh, G. Phillips, J. Kilkus, and G. Dawson, "Ceramide regulation of the tumor suppressor phosphatase PTEN in rafts isolated from neurotumor cell lines," *J. Neurosci. Res.*, vol. 81, no. 4, pp. 541–550, 2005.
- [223] G. Sowa, M. Pypaert, D. Fulton, and W. C. Sessa, "The phosphorylation of caveolin-2 on serines 23 and 36 modulates caveolin-1-dependent caveolae formation.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 100, no. 11, pp. 6511–6, 2003.
- [224] G. Sowa, L. Xie, L. Xu, and W. C. Sessa, "Serine 23 and 36 phosphorylation of caveolin-2 is differentially regulated by targeting to lipid raft/caveolae and in mitotic endothelial cells.," *Biochemistry*, vol. 47, no. 1, pp. 101–11, Jan. 2008.
- [225] W. Kolch, "Coordinating ERK/MAPK signalling through scaffolds and inhibitors," *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 6, no. 11, pp. 827–837, Nov. 2005.
- [226] X. Yin, M. Zafrullah, H. Lee, A. Haimovitz-Friedman, Z. Fuks, and R. Kolesnick, "A Ceramide-binding C1 domain mediates kinase suppressor of Ras Membrane Translocation," *Cell. Physiol. Biochem.*, vol. 24, no. 3–4, pp. 219–230, 2009.
- [227] B. Davletov, J. M. Sontag, Y. Hata, A. G. Petrenko, E. M. Fykse, R. Jahn, and T. C. Südhof, "Phosphorylation of synaptotagmin I by casein kinase II," *J. Biol. Chem.*, vol. 268, no. 9, pp. 6816–6822, 1993.
- [228] H. B. Nielander, F. Onofri, F. Valtorta, G. Schiavo, C. Montecucco, P. Greengard, and F. Benfenati, "Phosphorylation of VAMP/synaptobrevin in synaptic vesicles by endogenous protein kinases.," *J. Neurochem.*, vol. 65, no. 4, pp. 1712–20, Oct. 1995.
- [229] M. K. Bennett, K. G. Miller, and R. H. Scheller, "Casein kinase II phosphorylates the synaptic vesicle protein p65.," *J. Neurosci.*, vol. 13, no. 4, pp. 1701–7, Apr. 1993.
- [230] T. Dubois, P. Kerai, M. Learmonth, A. Cronshaw, and A. Aitken, "Identification of syntaxin-1A sites of phosphorylation by casein kinase I and casein kinase II," *Eur. J. Biochem.*, vol. 269, no. 3, pp. 909–914, 2002.
- [231] D. L. Foletti, R. Lin, M. A. F. Finley, and R. H. Scheller, "Phosphorylated syntaxin 1 is localized to discrete domains along a subset of axons.," *J. Neurosci.*, vol. 20, no. 12, pp. 4535–44, 2000.
- [232] Y. Shu, X. Liu, Y. Yang, M. Takahashi, and K. D. Gillis, "Phosphorylation of SNAP-25 at Ser187 mediates enhancement of exocytosis by a phorbol ester in INS-1 cells.," *J. Neurosci.*, vol. 28, no. 1, pp. 21–30, 2008.
- [233] C. Rickman and R. R. Duncan, "Munc18/syntaxin interaction kinetics control secretory vesicle dynamics," *J. Biol. Chem.*, vol. 285, no. 6, pp. 3965–3972, 2010.
- [234] M. A. Castillo, S. Ghose, C. A. Tamminga, and P. G. Ulery-Reynolds, "Deficits in Syntaxin 1 Phosphorylation in Schizophrenia Prefrontal Cortex," *Biol. Psychiatry*, vol. 67, no. 3, pp. 208–216, Feb. 2010.
- [235] A. Shata, H. Saisu, S. Odani, and T. Abe, "Phosphorylated synaphin/complexin found in the brain exhibits enhanced SNARE complex binding," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 354, no. 3, pp. 808–813, 2007.
- [236] T. L. Toft-Bertelsen, I. Ziolkiewicz, S. Houy, P. S. Pinheiro, and J. B. Sorensen, "Regulation of Ca<sup>2+</sup> channels by SNAP-25 via recruitment of syntaxin-1 from plasma membrane clusters," *Mol. Biol. Cell*, vol. 27, no. 21, pp. 3329–3341, Nov. 2016.
- [237] T. Lang, "SNAREs are concentrated in cholesterol-dependent clusters that define docking and fusion sites for exocytosis," *EMBO J.*, vol. 20, no. 9, pp. 2202–2213, May 2001.
- [238] T. Lang, "SNARE proteins and 'membrane rafts,'" *J. Physiol.*, vol. 585, no. 3, pp. 693–698, Dec. 2007.

- [239] N. R. Chintagari, N. Jin, P. Wang, T. A. Narasaraaju, J. Chen, and L. Liu, "Effect of cholesterol depletion on exocytosis of alveolar type II cells," *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, vol. 34, no. 6, pp. 677–687, 2006.
- [240] C. R. Wasser, M. Ertunc, X. Liu, and E. T. Kavalali, "Cholesterol-dependent balance between evoked and spontaneous synaptic vesicle recycling," *J. Physiol.*, vol. 579, no. Pt 2, pp. 413–429, 2007.
- [241] H. Hering, C. Lin, and M. Sheng, "Lipid rafts in the maintenance of synapses, dendritic spines, and surface AMPA receptor stability," *J. Neurosci.*, vol. 23, no. 8, pp. 3262–3271, 2003.
- [242] M. A. Arevalo and A. Rodriguez-Tebar, "Activation of CK2 and Inhibition of PTEN Phosphatase by NGF/p75NTR Inhibits GSK-3{beta} and Stimulates Axonal Growth," *Mol. Biol. Cell*, vol. 8, pp. 3369–77, 2006.
- [243] C. Gil, A. Soler-Jover, J. Blasi, and J. Aguilera, "Synaptic proteins and SNARE complexes are localized in lipid rafts from rat brain synaptosomes," *Biochem Biophys Res Commun*, vol. 329, no. 1, pp. 117–124, 2005.
- [244] C. Gil, R. Cubi, J. Blasi, J. Aguilera, R. Cubí, J. Blasi, and J. Aguilera, "Synaptic proteins associate with a sub-set of lipid rafts when isolated from nerve endings at physiological temperature," *Biochem Biophys Res Commun*, vol. 348, no. 4, pp. 1334–1342, 2006.
- [245] R. A. Zager, A. Johnson, S. Hanson, and V. Dela Rosa, "Altered cholesterol localization and caveolin expression during the evolution of acute renal failure," *Kidney Int.*, vol. 61, no. 5, pp. 1674–1683, 2002.
- [246] A. Labilloy, R. T. Youker, J. R. Bruns, I. Kukic, K. Kiselyov, W. Halfter, D. Finegold, S. J. H. do Monte, and O. A. Weisz, "Altered dynamics of a lipid raft associated protein in a kidney model of Fabry disease," *Mol. Genet. Metab.*, vol. 111, no. 2, pp. 184–192, Feb. 2014.
- [247] Y. Yan, F. Yang, H. Zhang, J. Che, and J. Zheng, "Up-regulation of flotillin-2 is associated with renal cell carcinoma progression," *Tumor Biol.*, vol. 35, no. 10, pp. 10479–10486, Oct. 2014.
- [248] P. Hazarika, M. F. McCarty, V. G. Prieto, S. George, D. Babu, D. Koul, M. Bar-Eli, and M. Duvic, "Up-regulation of flotillin-2 is associated with melanoma progression and modulates expression of the thrombin receptor protease activated receptor 1," *Cancer Res.*, vol. 64, no. 20, pp. 7361–7369, 2004.
- [249] L. J. Pike, X. Han, and R. W. Gross, "Epidermal growth factor receptors are localized to lipid rafts that contain a balance of inner and outer leaflet lipids: a shotgun lipidomics study," *J Biol Chem*, vol. 280, no. 29, pp. 26796–26804, 2005.
- [250] M. D. Marmor, K. B. Skaria, and Y. Yarden, "Signal transduction and oncogenesis by ErbB/HER receptors," in *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics*, 2004, vol. 58, no. 3, pp. 903–913.
- [251] S. Richard, F. Selle, J. P. Lotz, A. Khalil, J. Gligorov, and D. Grazziotin-Soares, "Pertuzumab and trastuzumab: The rationale way to synergy," *An. Acad. Bras. Cienc.*, vol. 88, pp. 565–577, 2016.
- [252] S. R. Needham, S. K. Roberts, A. Arkhipov, V. P. Mysore, C. J. Tynan, L. C. Zanetti-Domingues, E. T. Kim, V. Losasso, D. Korovesis, M. Hirsch, D. J. Rolfe, D. T. Clarke, M. D. Winn, A. Lajevardipour, A. H. A. Clayton, L. J. Pike, M. Perani, P. J. Parker, Y. Shan, D. E. Shaw, and M. L. Martin-Fernandez, "EGFR oligomerization organizes kinase-active dimers into competent signalling platforms," *Nat. Commun.*, vol. 7, p. 13307, Oct. 2016.



# ***ÍNDEX SUPLEMENTARIS***

---



## 11.1 Índex d'il·lustracions

Il·lustració 1 – Estructura de CK2 en alta resolució .....	4
Il·lustració 2 – Detall de l'estructura CK2 $\alpha$ .....	7
Il·lustració 3 – Característiques estructurals de CK2 $\alpha$ .....	8
Il·lustració 4 – Detall de l'estructura de CK2 $\beta$ .....	11
Il·lustració 5 – Característiques estructurals de CK2 $\beta$ .....	11
Il·lustració 6 – Estructura en 3D de l'holoenzim .....	13
Il·lustració 7 – Seqüència de l'alineació de les serina/treonina quinases amb un putatiu domini d'unió CK2 $\beta$ .....	14
Il·lustració 8 – Resum de la regulació cel·lular de CK2 .....	16
Il·lustració 9 – Paper de CK2 en la regulació de l'apoptosi .....	24
Il·lustració 10 – Esquema canònic de la cascada d'inici de la traducció proteica .....	27
Il·lustració 11 – Mapa de les interaccions entre les subunitats eIF3 .....	30
Il·lustració 12 – Conservació del core proteic PCI/MPN .....	31
Il·lustració 13 – Interaccions de l'MFC amb el ribosoma .....	32
Il·lustració 14 – Esquema de l'estructura d'eIF2 $\beta$ .....	34
Il·lustració 15 – Model tridimensional del mosaic fluid original .....	39
Il·lustració 16 – Actualització del model de mosaic fluid .....	41
Il·lustració 17 – Esquema de la purificació dels <i>lipid raft</i> .....	42
Il·lustració 18 – Organització detallada dels <i>lipid raft</i> i les caveoles a les membranes .....	44
Il·lustració 19 – <i>Lipid raft</i> en 3D .....	45
Il·lustració 20 – Via de senyalització per EGFR en <i>lipid raft</i> .....	49
Il·lustració 21 – Polarització de les neurones .....	52
Il·lustració 22 – Esquema de l'exocitosi a nivell neuronal .....	53
Il·lustració 23 – Cicle d'assemblatge i desassemblatge del complex SNARE en l'exocitosi de vesícules sinàptiques .....	55
Il·lustració 24 – Diferents maneres d'acoblament entre Sintaxina-1 i proteïnes SM (Sec1/Munc18) .....	56
Il·lustració 25 – Retícula de la cambra de Neubauer .....	68
Il·lustració 26 – Exemple de perfil de 254 nm .....	76
Il·lustració 27 – Els sinaptosomes .....	95
Il·lustració 28 – Metil- $\beta$ -ciclodextrina .....	97
Il·lustració 29 – Reacció de la detecció del Colesterol .....	98
Il·lustració 30 – Reacció de la GDH .....	99
Il·lustració 31 – Seqüències d'eIF2 $\beta$ .....	107
Il·lustració 32 – Evolució de publicacions al llarg dels anys .....	161
Il·lustració 33 – Interaccions entre els factors d'iniciació de la traducció en llevats i humans .....	162
Il·lustració 34 – Perfils d'absorció a 254 nm del mutant per RPS6A .....	163
Il·lustració 35 – Contactes entre les subunitats de l'MFC .....	168
Il·lustració 36 – El paper de KSR1 en la senyalització de les MAPK .....	171
Il·lustració 37 – El tractament amb MCD agrupa el receptors d'EGF .....	175
Il·lustració 38 – Receptors d'EGF .....	176

## 11.2 Índex de taules

Taula 1 – Proteïnes que interactuen amb CK2 $\beta$ .....	15
Taula 2 – Substrats de CK2 i funcions .....	22
Taula 3 – Nomenclatura equivalent de les subunitats d'eIF3.....	30
Taula 4 – Modificacions post-transduccionals d'eIF2 $\beta$ .....	35
Taula 5 – Resum de les modificacions post-transduccionals d'eIF3. ....	37
Taula 6 – Recull components presents als microdominis lipídics tant en caveoles com en <i>lipid raft</i> .....	47
Taula 7 – Medis i condicions de cultiu. ....	66
Taula 8 – Formulació del tampó PBS .....	66
Taula 9 – Volums de reactius de cultius. ....	67
Taula 10 – Relació de volums necessaris per la transfecció dels siRNA per CK2 $\beta$ .....	72
Taula 11 – Característiques tècniques del shRNA contra CK2 $\beta$ .....	73
Taula 12 – Característiques tècniques del vector de control per la transfecció del shRNA contra CK2 $\beta$ . ....	73
Taula 13 – Composició del Tampó de Gradients. ....	75
Taula 14 – Tampó de lisi .....	79
Taula 15 – Volum del tampó de lisi.....	79
Taula 16 – Controls d'immunoprecipitació .....	81
Taula 18 – Composició tampó de mostra reductor .....	85
Taula 19 – Composició dels tampons d'electroforesi .....	85
Taula 20 – Composició dels gels .....	86
Taula 21 – Anticossos primaris.....	89
Taula 22 – Anticossos secundaris .....	90
Taula 23 – Valors cinètics de CK2.....	91
Taula 24 – Medi de cultiu pel marcatge .....	93
Taula 25 – Composició dels medis de tractament.....	94
Taula 26 – Composició dels medis de tractament pel marcatge.....	94
Taula 27 – Composició Tampó HB .....	95
Taula 28 – Tampó sodi.....	96
Taula 29 – Els inhibidors de CK2 .....	165
Taula 30 – Associació de proteïnes SNARE amb les membranes resistents a detergent. ....	173

### 11.3 Índex de figures

Figura 1 – Copurificació del <i>Multifactor complex</i> .....	105
Figura 2 – Caracterització de l'anticòs anti-p-eIF2 $\beta$ .....	108
Figura 3 – Sobreexpressió de mutants d'eIF2 $\beta$ .....	110
Figura 4 – Inhibició farmacològica de CK2.....	112
Figura 5 – Inhibició i efecte sobre els complexos de preiniciació.....	113
Figura 6 – Inhibició i efecte sobre la sedimentació.....	114
Figura 7 – Gradient discontinu de sucrosa.....	116
Figura 8 – Marcatge amb <sup>35</sup> S-Met.....	117
Figura 9 – El silenciament de CK2 alterava la fosforilació d'eIF2 $\beta$ .....	119
Figura 10 – Comportament de CK2 després del silenciament.....	121
Figura 11 – L'efecte del silenciament de CK2 sobre els eIFs.....	122
Figura 12 – L'efecte del silenciament de CK2 als perfils de sedimentació.....	123
Figura 13 – L'efecte del silenciament estable de CK2 $\beta$ .....	124
Figura 14 – El silenciament estable de CK2 $\beta$ altera el patró de sedimentació dels eIF.....	126
Figura 15 – Coimmunoprecipitació d'eIF2 $\beta$ .....	127
Figura 16 – CK2 era present a les fraccions DRM de les membranes sinaptosomals.....	132
Figura 17 – Activitat de CK2 en els perfils de flotació.....	133
Figura 18 – La depleció de colesterol provoca desaparició de CK2 de les membranes.....	135
Figura 19 – La depleció de colesterol provoca l'alliberació de CK2 de la membrana.....	137
Figura 20 – La depleció de colesterol provoca l'alliberació de la membrana de diverses proteïnes, entre elles CK2.....	138
Figura 21 – El comportament de KSR1 i el seu paper com a scaffold de CK2.....	139
Figura 22 – La inhibició de CK2 amb DMAT reduïa la fosforilació de Sintaxina-1.....	140
Figura 23 – La inhibició de CK2 amb DMAT augmenta la secreció de glutamat.....	141
Figura 24 – Les condicions del cultiu afecten a la presència de marcadors de <i>lipid raft</i> .....	143
Figura 25 – Caracterització de les DRM en cèl·lules HK-2.....	144
Figura 26 – La proteïna quinasa CK2 és present als <i>lipid raft</i> d'HK-2.....	146
Figura 27 – Precipitació amb TCA de les fraccions membranoses.....	148
Figura 28 – CK2 s'allibera de la cèl·lula en eliminar el colesterol.....	149
Figura 29 – Tractament d'MCD a les cèl·lules HK-2.....	150
Figura 30 – Resposta cel·lular al tractament amb MCD.....	152





# ***ANNEX***

---





FEBS  
Letters

journal homepage: www.FEBSLetters.org



## Protein kinase CK2 associates to lipid rafts and its pharmacological inhibition enhances neurotransmitter release

Carles Gil<sup>a,b,\*</sup>, Anton Falqués<sup>a</sup>, Eduard Sarró<sup>a</sup>, Roger Cubí<sup>a,b</sup>, Juan Blasi<sup>c,d</sup>, José Aguilera<sup>a,b</sup>, Emilio Itarte<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, Universitat Autònoma de Barcelona, Spain

<sup>b</sup>Institut de Neurociències, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra 08193, Catalunya, Spain

<sup>c</sup>Departament de Patologia i Terapèutica Experimental, Universitat de Barcelona-IDIBELL, c/Feixa Llarga s/n, 08907 L'Hospitalet de Llobregat, Catalunya, Spain

<sup>d</sup>Centro de Investigación Biomédica en Red sobre Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED), Spain

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 18 November 2010

Revised 17 December 2010

Accepted 17 December 2010

Available online 28 December 2010

Edited by Maurice Montal

#### Keywords:

Protein kinase CK2

Lipid raft

Cholesterol

Synaptosome

Syntaxin

Glutamate release

### ABSTRACT

**In the present work we report the presence of protein kinase CK2 in lipid raft preparations from rat brain synaptosomes, obtained after detergent extraction and subsequent isolation of detergent-resistant membranes using sucrose gradient ultracentrifugation. Moreover, the phosphorylation of syntaxin-1 at Ser14, a specific CK2 target, has been detected in lipid rafts, as assessed by a phospho-specific antibody. Treatment with DMAT, a specific CK2 inhibitor, results in a decrease of syntaxin-1 Ser14 phosphorylation in lipid rafts, while the glutamate release from synaptosomes is enhanced. In conclusion, CK2 might control neurotransmitter release by acting on SNARE proteins attached to cholesterol-enriched microdomains.**

© 2010 Federation of European Biochemical Societies. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

### 1. Introduction

Protein kinase CK2 (also known as casein kinase II or casein kinase 2) is a ubiquitously expressed pleiotropic serine or threonine kinase essential for life in eukaryotes. In many organisms, protein kinase CK2 is a heterotetramer composed of two catalytic  $\alpha$ - or  $\alpha'$ -subunits and two regulatory  $\beta$ -subunits [1]. Protein kinase CK2 is known to phosphorylate more than 300 different substrates, which include many proteins involved in transcription, RNA processing and translation, and a restricted number of them also exert a regulatory role on CK2 activity [2]. These regulatory effects seem to vary depending on the form of the enzyme (either holoenzyme or free catalytic subunit) and the particular protein substrate. Moreover, CK2 activity towards protein substrates involved in specific functions might also be modulated by the targeting of the kinase to specific subcellular compartments [3]. Detection of protein kinase CK2 activity in plasma membrane preparations has been reported by various authors [4 among others], and some membrane

proteins, such as CKIP-1 (CK2-Interacting Protein-1) [5], have been identified as CK2 partners. In addition, CK2 has been recently identified as a novel component of the KSR1 (kinase suppressor of ras) scaffolding complex found in the plasma membrane that facilitates ERK cascade signaling [6].

Lipid rafts have been proposed to exist in cell membranes as result of the differential affinity associations of some lipids, such as cholesterol and sphingolipids [7]. These microdomains have been shown to be resistant to solubilization with mild detergents and, thus, can be isolated as detergent resistant membranes (DRM) by density ultracentrifugation [8]. Proteins incorporated into lipid rafts are often modified, carrying glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchors, palmitoylation, myristoylation, or they are attached through directly binding cholesterol [7] or by the interaction with rafts constituents [9].

In the present work we show that CK2 is present in membrane microdomains from rat brain nerve endings and that the pharmacological inhibition of CK2 results in enhancement of glutamate release and in impairment of the phosphorylation of a CK2-specific site, such as Ser14 of DRM-attached syntaxin1 (Stx1). These results indicate the potential involvement of CK2 in the control of neurotransmitter release and open the possibility to a new level of CK2 regulation by means of substrate segregation by membrane association.

\* Corresponding author at: Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, Edifici M, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra 08193, Barcelona, Spain. Fax: +34 93 581 1573.

E-mail address: carles.gil@uab.cat (C. Gil).



## 2. Materials and methods

### 2.1. Antibodies

Antibody against transferrin receptor (clone H68.4) was from Zymed Laboratories (San Francisco, CA, USA) and anti-Thy-1 (clone OX7) was a gift from Dr. G. Schiavo (Cancer Research UK; London, UK). Anti-GAP-43 and anti-syntaxin 1a/b (HPC-1) were from Sigma (St. Louis, USA), while anti-phosphoSer14-syntaxin1a was from Abcam (Cambridge, UK), anti-SNAP25 (SM181) from Stenberger-Meyer (Jarrettsville, MD, USA), and anti-Flotillin-1 was from BD-Transduction Laboratories (San Jose, CA, USA). Antibodies against CK2 $\alpha$  (clone H286), against CK2 $\beta$  (clone 6D5), against KSR1 (kinase suppressor of Ras, C19) or against Raf-1 (C12) were from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA).

### 2.2. Isolation of detergent-resistant membranes

Crude synaptosomal fraction (P2) was prepared from Sprague–Dawley as described previously [10], with slight modifications. Aliquots of synaptosomes were disrupted by sonication and membranes precipitated by centrifugation 15 min at 190000 $\times$ g. Protein concentration was determined according to the BCA protocol (Pierce; Rockford, IL, USA). Synaptosomal membranes (3 mg total protein) were solubilized with 2 ml of cold sodium buffer (140 mM NaCl, 5 mM KCl, 5 mM NaHCO<sub>3</sub>, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 1.2 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 20 mM Hepes/NaOH, and 10 mM glucose, pH 7.4) containing 1% Triton X-100 (30 min at 4 °C) or 1% Brij 98 (30 min at 37 °C) by end-over-end mixing. Thereafter, the extracts were adjusted to 45% sucrose, and overlaid with 8 ml of 35% sucrose in sodium buffer and 2.5 ml of 5% sucrose in sodium buffer, inside an ultracentrifugation tube. The DRM were isolated by ultracentrifugation at 35,000 rpm, for 18 h, 4 °C, using a SW41 rotor (Beckman Instruments Inc.). Then the gradient was harvested in 12 fractions of 1 ml. When indicated, synaptosomes were treated with methyl- $\beta$ -cyclodextrin at the indicated concentrations for 60 min, prior to the detergent solubilization, in order to remove cholesterol from the plasma membrane. Cholesterol was determined as in [10].

### 2.3. Electrophoresis and Western blot

Twenty-five micrograms of total cell extract protein was run on SDS–polyacrylamide gel electrophoresis gels, transferred onto polyvinylidene difluoride membranes, and incubated with the corresponding antibodies. The membranes were developed with the enhanced chemiluminescence West-pico method from Pierce.

### 2.4. Determination of CK2 activity

Protein kinase CK2 activity was assayed as described previously [11]. Briefly, 0.2 mM specific CK2 peptide (RRRAADSDDDDD) were used, in the presence of 125  $\mu$ M [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P] ATP and kinase buffer (50 mM Tris/HCl, pH 7.5, 1.5 mM EGTA, 25 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM sodium  $\beta$ -glycerolphosphate and 3 mM DTT) for 30 min at 30 °C. The samples were spotted on P81 papers, washed five times with 0.5% orthophosphoric acid, once with acetone and air dried. Radioactivity was quantified in a scintillation counter.

### 2.5. Glutamate release

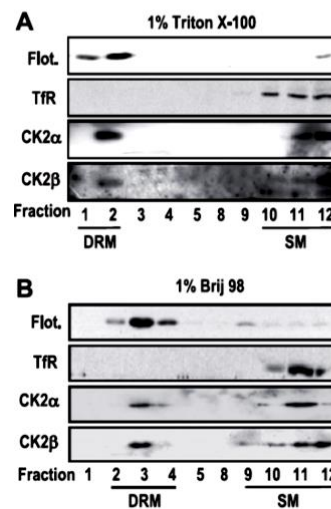
Glutamate release studies were performed as described previously [10]. Briefly, aliquots of the P2 fraction were resuspended in 500  $\mu$ l of prewarmed sodium buffer and incubated at 37 °C. Synaptosomal suspensions were transferred to a cuvette containing 1.5 ml of the same buffer containing 1 mM NADP, 100 U glutamate dehydrogenase (Sigma; Poole Dorset, UK), and 1.3 mM CaCl<sub>2</sub> in a

thermoequilibrated chamber. Glutamate release was monitored with the aid of a spectrofluorophotometer (Shimadzu RF5001PC). Exocytosis was triggered by addition of KCl (50 mM final concentration). L-Glutamate (5 nmol) was added at the end of every determination, as an internal standard for calibration.

## 3. Results

### 3.1. Protein kinase CK2 is present in DRM from rat brain synaptosomes

Immunoblot detection of well established marker proteins shows that TfR is totally solubilized with 1% Triton X-100, appearing only in the fractions corresponding to soluble membranes, while flotillin-1 appears exclusively in DRM fractions (Fig. 1A), demonstrating the correct extraction of DRM (assumed to correspond to membrane rafts). The immuno detection of the CK2 subunits shows that CK2 $\alpha$  and CK2 $\beta$  subunits are distributed in two pools (Fig. 1A), one in the soluble membranes and the other in DRM (approximately 50% of the total for both subunits, as assessed by densitometry with the ImageJ software). Although Triton X-100 is the most commonly used detergent for isolation of rafts, some new detergents with unique properties has been introduced, being Brij 98 one of these [12]. The extraction of membrane microdomains with this detergent can be carried at 37 °C, avoiding the non-specific clustering of lipidic components due to the low temperature conditions used with Triton, that can lead to the mistaken assignment of some proteins as raft residents [13]. The extraction of DRM with 1% Brij 98 at 37 °C shows that TfR is totally solubilized, while flotillin-1 appears exclusively in rafts fractions



**Fig. 1.** CK2 subunits are present in lipid rafts from nerve ending membranes. Membranes from synaptosomal-enriched fraction were solubilized with 1% Triton X-100 for 30 min at 4 °C (A) or with 1% Brij 98 for 30 min at 37 °C (B). Subsequently, each treated sample was fractionated in a discontinuous sucrose gradient. Equal volumes of the recovered fractions were separated by SDS–PAGE and transferred to nitrocellulose for immunoblotting analysis with antibodies against the indicated proteins. Flotillin-1 is used as a lipid rafts marker, while the transferrin receptor (TfR) is used as a marker of soluble membranes. DRM are found in fractions 1 and 2 in the Triton X-100 extraction and in fractions 2–4 in the Brij 98 extraction, corresponding to the top of the ultracentrifuge tube, while fractions 10–12 correspond to the soluble membranes (SM) in both detergents. This analysis was repeated in three independent experiments with similar results. Representative results are shown.



(Fig. 1B). The detection of the CK2 subunits shows similar results, being CK2 $\alpha$  and CK2 $\beta$  subunits distributed, also in this case, in two pools, one in DRM (approximately 35% of the total for both subunits) and the second in the non-DRM fractions (Fig. 1B).

CK2 activity in the gradients obtained with Triton X-100 or with Brij 98 was determined by phosphorylation of a specific substrate peptide (Fig. 2A, Triton, CK2 pept. or Brij 98, CK2 pept.), as well as the endogenous phosphorylation in absence of the substrate peptide (Fig. 2A, Triton, endo or Brij 98, endo). The presence of CK2 activity in the fractions corresponding to the DRM is evident in the treatments with each detergent, being also present in the fractions corresponding to the soluble membranes (Fig. 2A). These results totally agree with the immunoblot detection of CK2 subunits shown in Fig. 1. In the solubilization with Triton X-100, a higher content of unspecific endogenous phosphorylation is observed in the rafts fraction than in the solubilization with Brij 98. This drove us to use Brij 98 in the rest of the work. In order to confirm the presence of CK2 activity in the ultracentrifugation gradient after Brij 98 treatment, phosphorylation of the substrate peptide in presence of 25  $\mu$ M 2-dimethylamino-4,5,6,7-tetrabromo-1H-benzimidazole (DMAT) was performed, observing a clear decrease of peptide phosphorylation (Fig. 2B).

### 3.2. Cholesterol depletion results in CK2 detachment from the membrane

The removal of cholesterol from the plasma membrane by methyl- $\beta$ -cyclodextrin (MCD) disaggregates lipid rafts and allows

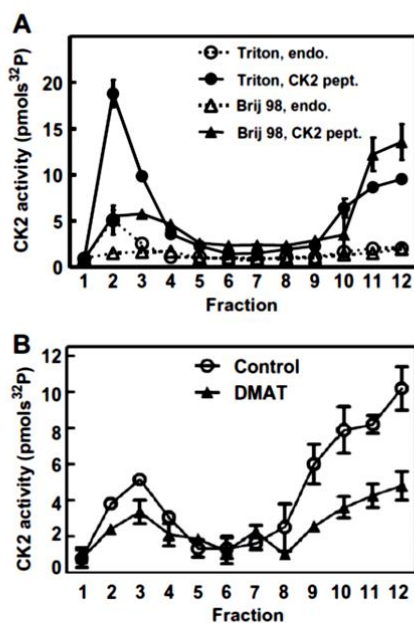


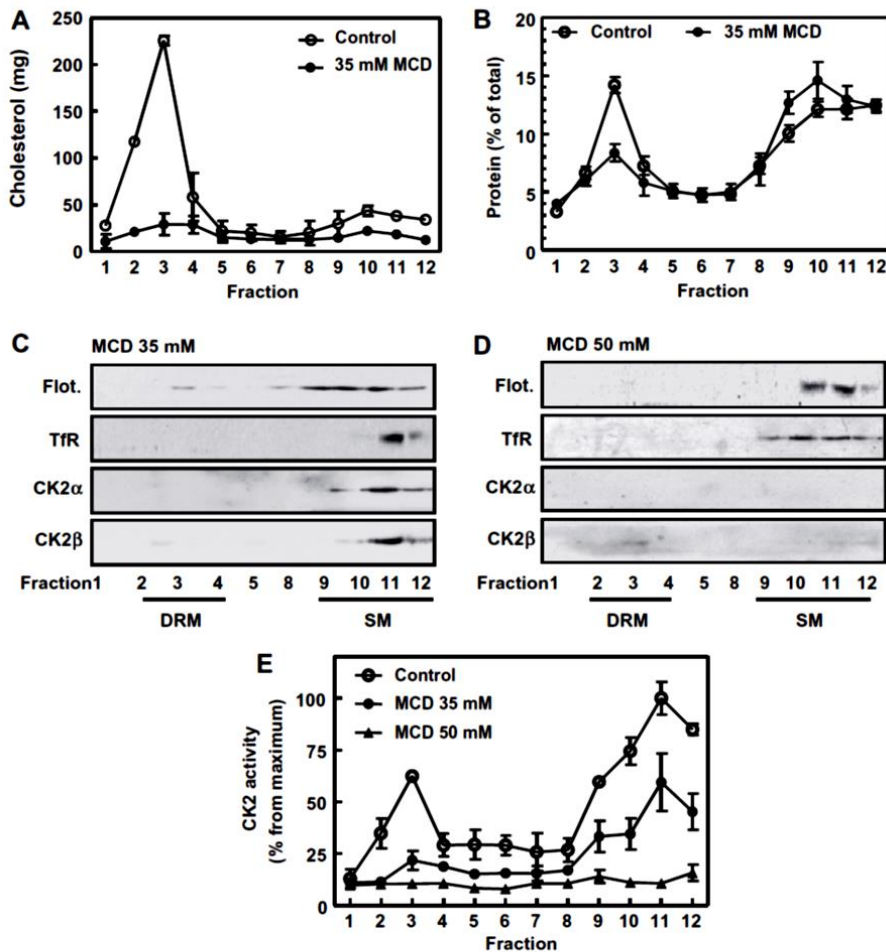
Fig. 2. CK2 activity in DRM is inhibited by DMAT. (A) CK2 activity (as pmols of <sup>32</sup>P incorporated to substrate) in the gradient fractions after extraction with 1% Triton X-100 (empty circles, endophosphorylation; filled circles, RADA peptide phosphorylation) or with 1% Brij 98 (empty triangles, endophosphorylation; filled triangles, RADA peptide phosphorylation). (B) CK2 activity on the RADA peptide in the gradient fractions after extraction with 1% Brij 98 in the absence (empty circles) or presence of DMAT 25  $\mu$ M (filled triangles), a CK2 inhibitor. This analysis was repeated in three independent experiments with similar results. Graphics show mean  $\pm$  SEM.

its solubilization with detergents. Synaptosomal membranes were treated with 35 mM MCD for 60 min at 37  $^{\circ}$ C and subsequently solubilized with 1% Brij 98. After sucrose gradient ultracentrifugation, the cholesterol content in each fraction was determined, showing that MCD treatment totally eliminates the cholesterol (Fig. 3A). The disruption of lipid rafts after 35 mM MCD treatment can also be observed when the total protein content is determined, since cholesterol removal dramatically decreases the protein peak from rafts fractions and induces an increase in the protein content in the solubilized membranes (Fig. 3B). The analysis by immunoblot shows that 35 mM MCD allows the solubilization of the proteins which were previously detected in DRM, since flotillin-1, CK2 $\alpha$  and CK2 $\beta$  virtually disappear from DRM fractions, demonstrating that the association of the studied proteins is cholesterol-dependent. When the MCD concentration is raised to 50 mM, CK2 subunits are detached from the membrane, since no signal corresponding to CK2 $\alpha$  or CK2 $\beta$  appears in any fraction from the gradient, while the marker proteins, i.e., flotillin-1 and TfR, give the same result than with 35 mM MCD (Fig. 3D). The determination of CK2 activity from the gradients resulting from the treatments with 35 or 50 mM MCD totally confirm the results observed with the immunoblots (Fig. 3E). It is noteworthy that, in the alternative treatments with both MCD concentrations, a general loss of CK2 activity exists, being total in the case of 50 mM MCD (Fig. 3E).

In order to confirm the CK2 detachment from the membrane, synaptosomal membranes were treated with increasing concentration of MCD (10, 35 or 50 mM) for 60 min. The membranes were subsequently precipitated by centrifugation and the resulting membrane-free medium taken for its analysis. MCD induces the release to the medium of approximately 30% of the total protein initially present in the membrane (Fig. 4A) and virtually depletes CK2 activity from the membrane, resulting the medium highly enriched in CK2 activity (Fig. 4B). This observation is confirmed by immunoblot analysis, being both CK2 subunits gradually detached from the membrane with the increasing MCD concentrations. In contrast, the treatment with increasing concentrations of MCD has no effect on flotillin-1 or either Stx1, two integral membrane proteins, or on SNAP-25, a peripheral protein linked to the membrane by palmitoylation (Fig. 4C). In contrast, a high concentration of MCD such as 50 mM has dramatic effects on Thy-1, a GPI-anchored protein, and on GAP43, a membrane-attached protein via a dual palmitoylation, both being totally removed from the membrane and released to the medium (Fig. 4C). Since it has been described that CK2 is a component of the KSR1 scaffold complex that contributes to Raf kinase activation [6], western blots for KSR1 and for Raf-1 were also performed, showing that both KSR and Raf-1 are also gradually detached from the membrane with the increasing MCD concentrations. Thus, these results imply that a pool that corresponds to the 30% of the total protein can be completely detached from synaptosomal membranes where they are initially bound. This detachment is not general, being specific of certain proteins, including CK2 subunits. Thus, peripheral membrane proteins seem to be more sensible to the action of MCD than integral membrane proteins. The immunodetection of KSR1 and of Raf-1 from the Brij 98-extracted DRM show that both proteins are present in DRM fractions (Fig. 4D). Treatment with MCD 50 mM (see Fig. 3) detaches KSR1 and Raf-1 from membrane, as observed for CK2 subunits.

### 3.3. Pharmacological CK2 inhibition results in glutamate release enhancement

Since syntaxin-1 (Stx1) is a CK2 substrate, a relevant protein in nerve endings physiology and found in DRM from this cellular region [10,14], the presence of Ser14 phosphorylated-Stx1 was



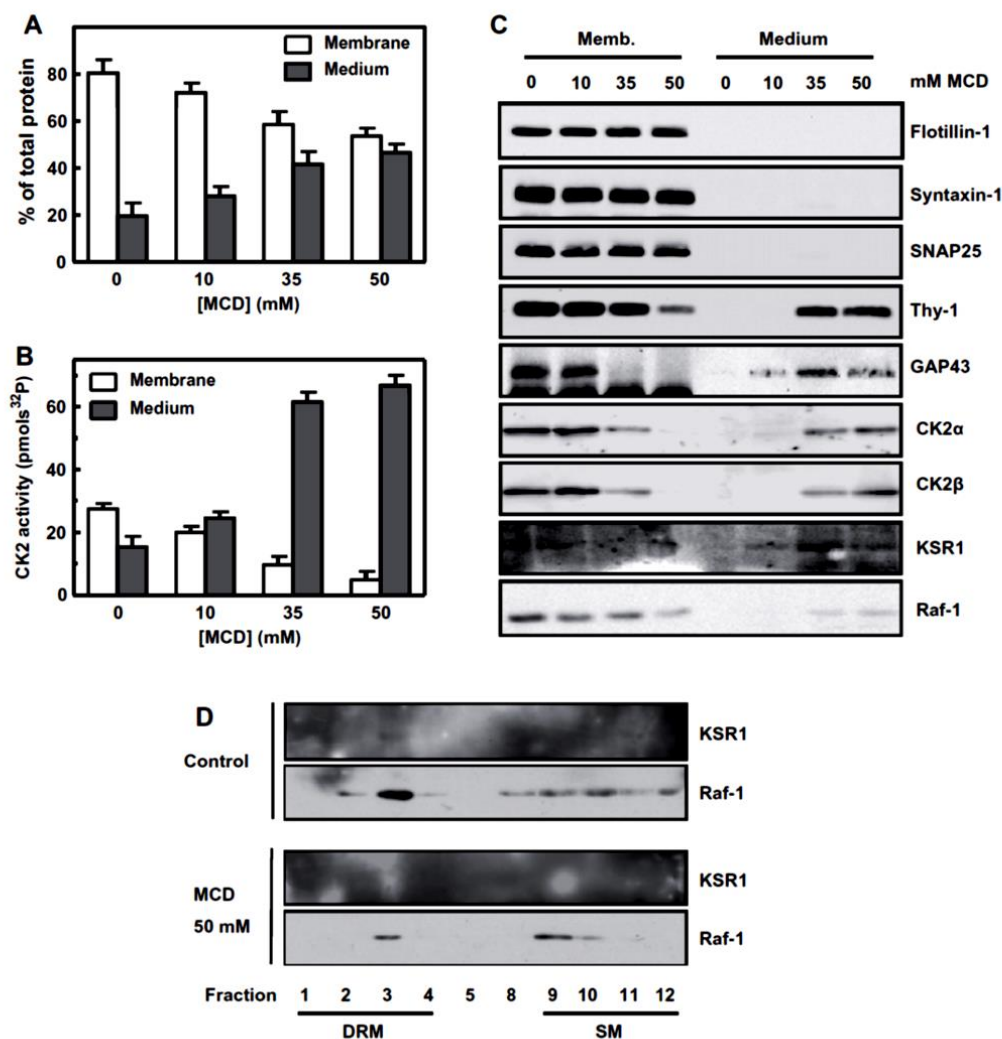
**Fig. 3.** CK2 binding to DRM is cholesterol-dependent. Synaptosomal membranes were treated, where indicated, with 35 mM MCD for 60 min prior to solubilization in 1% Brij 98 and fractionation on a discontinuous sucrose gradient. The cholesterol distribution in both treatments with or without 35 mM MCD (A) and the protein distribution (B) along the gradients were determined. (C) The fractions were also analyzed by immunoblot with antibodies for flotillin-1, transferrin receptor (TfR), CK2 $\alpha$  and CK2 $\beta$ . (D) Synaptosomal membranes were also treated with 50 MCD for 60 min prior to DRM extraction and subsequent immunoblots. (E) CK2 activity in the samples from the gradients analyzed in C and D were determined and expressed as percentage of maximum. These analyses were repeated on two separate experiments. Graphics show mean  $\pm$  SEM.

assessed by means of a phospho-specific antibody. The presence of the phosphorylated Stx1 was found in DRM at a similar level than the total Stx1 (Fig. 5A), corroborating the presence of physiologically active CK2 in DRM from nerve endings and also pointing to the fact that the phosphorylation state of Stx1 does not affect its localization in lipid rafts. Inhibition of CK2 with 25  $\mu$ M DMAT results in a clear decrease in the Stx1 phosphorylation in DRM, but was not apparent in the SM fractions (Fig. 5A). Since Stx1 is component of the soluble *N*-ethylmaleimide sensitive factor attachment protein receptor complex (SNARE complex), which is essential for neurotransmitter release to occur, the effect of DMAT-mediated CK2 inhibition in glutamate release from nerve endings was assessed. Treatment of synaptosomes with 25  $\mu$ M DMAT increased approximately twofold the potassium-induced glutamate release, indicating a negative regulation of CK2 on release (Fig. 5B).

#### 4. Discussion

Protein kinase CK2, one of the more conserved protein kinases in evolution, is also one of the more challenging enzymes in the cellular signaling field, since it is ubiquitously expressed in nearly every tissue of eukaryotes and it is also found in nearly every compartment of eukaryotic cells, even found as an ectokinase [15], but any effective type of activity regulation has been described until now. It is well known that CK2 activity is greater in all the brain regions studied than in most of other tissues, and compelling evidences demonstrate that CK2 phosphorylates an array of substrates that have clear implications in neuritogenesis, synaptic transmission, synaptic plasticity and neuronal development. Early studies have shown a rapid increase of CK2 activity in hippocampal Long Term Potentiation (LTP), a prevailing neurobiological model for learning and memory [16]. In accordance to this observation,





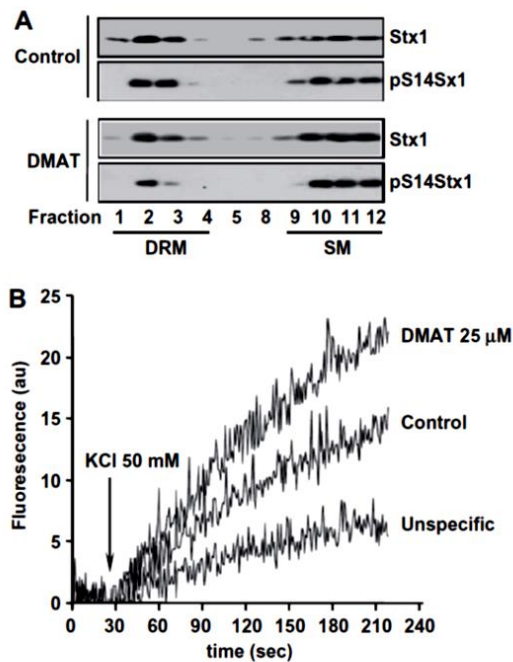
**Fig. 4.** Cholesterol depletion releases CK2 holoenzyme from the membrane. Aliquots of membranes from brain nerve endings were treated for 60 min at 37 °C with 10, 35 or 50 mM MCD. After that, membranes were precipitated by ultracentrifugation (190000×g, 30 min), and the supernatants were collected (medium). Membranes were solubilized with 1% Brij 98 at 37 °C for 15 min. The analysis of the protein content in the membranes is shown in (A). Bars show mean ± SEM. (B) CK2 is totally released from the membrane after 50 mM MCD treatment, as assessed by phosphorylation of the RADA peptide. Bars show mean ± SEM. (C) Equal volumes of the same treatments from membrane or medium were analyzed by immunoblot with specific antibodies against the indicated proteins. This analysis was repeated on three separate experiments with similar results. Representative results are shown. (D) After treatment of synaptosomal membranes with MCD 50 mM, fractions from sucrose gradients after DRM extraction with 1% Brij 98 were analyzed by immunoblot with antibodies against KSR1 or Raf-1. This analysis was repeated on two separate experiments with similar results.

It has been recently demonstrated, also in hippocampal neurons, that Nerve Growth Factor activates CK2, then phosphorylating and inhibiting the Phosphatase and Tensin Homologue Deleted on Chromosome 10 (PTEN), leading to the inhibition of glycogen synthase kinase-3β and to the stimulation of axonal growth [17]. It is noteworthy that PTEN contains a caveolin-1-binding motif and can be recruited into lipid rafts from neurotumor cell lines after C2-ceramide treatment [18]. Furthermore, it is known that caveolin-2 (Cav-2) is phosphorylated *in vivo* by CK2 at two residues (Ser23 and Ser36) and that phosphorylation of Cav-2 is necessary for its actions as a positive regulator of caveolin-1 during

caveolae biogenesis [19]. Furthermore, detergent insolubility and sucrose flotation gradient experiments revealed that Ser23 phosphorylation of Cav-2 preferably occurs in DRM [20], pointing to a possible interaction of CK2 with lipid rafts by means of, at least, a substrate-driven mechanism. Pharmacological inhibition of CK2 also envisages an important role of CK2 in synaptic plasticity, since pharmacological CK2 inhibition, affects LTP by selective modification in the location of synaptic NMDA (*N*-methyl-D-aspartate) receptors [21].

Other CK2 membrane action that has been described is the one that involves members of the KSR1 scaffolding complex. This





**Fig. 5.** Protein kinase CK2 inhibition by DMAT impairs phosphorylation of Stx1 in Ser14 and enhances glutamate release. (A) Synaptosomes were treated with DMAT 25 μM for 30 min, and subsequent extraction of DRM was performed. The levels of Stx1 phosphorylation at Ser14 were assessed by western blot. Representative results are shown from two separate experiments with similar results. (B) Synaptosomes were treated with or without DMAT 25 μM for 30 min prior to induction of glutamate release with 50 mM KCl, which was followed by fluorescence for 4 min. The calcium dependence of the process was demonstrated by induction of glutamate release in calcium-free conditions (unspecific). Graphs shown are representative of three experiments, with similar results.

complex is formed when KSR1 translocates to the cell membrane upon signal activation, colocalizes MEK and ERK with the Raf family kinases and also delivers the CK2 holoenzyme, which contributes to Raf activation [6]. The association of CK2 with rafts, described in the present work, together with the known affinity of KSR for ceramide-rich membrane macro-domains [22] might promote the interaction between CK2 and KSR. Since rafts play a crucial role in regulating the phosphatidylinositol-3 kinase/Akt signaling pathway [23], membrane rafts might also act as a meeting platform allowing the convergence of CK2 and Akt signaling. Additional CK2 substrates that have been described as present in lipid rafts in the system used in the present work [12] are synaptotagmin I [24], VAMP/synaptobrevin [25] and Stx1 [26]. Stx1 is phosphorylated at Ser14 exclusively by CK2 [27]. The published data suggest a role for CK2 and phospho-Stx1 in defining specific subdomains in the axonal plasma membrane that are segregated from the synaptic active zones [28]. In spite of the fact that the functional significance and the stimuli that control the phosphorylation of SNARE proteins remain unclear, several lines of evidence indicate that this phosphorylation could have an important role in the control of the calcium regulated exocytosis [29]. The data shown in the present work are in support of this hypothesis. Moreover, Ser14 site in Stx1 is a critical modulator of mode 2/3 interaction with Munc18-1, which controls vesicle immobilization at the plasma membrane with the consequent control of exocytosis [30].

In fact, deficits in CK2-mediated phosphorylation of Stx1 have been recently described as playing a role in the pathophysiology of schizophrenia [31]. Moreover, a potential link between CK2 activity and inhibition of neurotransmission can be envisaged from the reports on hippocampal neurons showing long-term depression by the proBDNF-triggered activation of p75<sup>NTR</sup> [32] and the activation of CK2 by the neurotrophin receptor p75<sup>NTR</sup> [17]. Thus, it is feasible to hypothesize a mechanism in hippocampal neurons in which neurotransmitter release can be impaired by CK2, after being activated in a presynaptic receptor dependent-manner, e.g., by a p75<sup>NTR</sup> ligand. Thus, although most studies focus on lipid rafts at the postsynaptic site, the present work suggests that lipid rafts act also presynaptically to regulate neuronal function, as has been suggested in previous works [10,14].

In conclusion, the association of CK2 to membrane rafts in neuronal tissue described in the present work opens the possibility to an additional control mechanism of this intriguing kinase, by means of a putative raft-targeted mobilization towards protein substrates or by control of the CK2 presence in the extracellular medium, as well as supports the CK2-mediated modulation of exocytotic events.

#### Acknowledgements

This work was supported by Grants BFU2009-10189, SAF2009-13626 and SAF2008-00732 from the Ministerio de Ciencia e Innovación from the Spanish Government. We thank G. Schiavo (Cancer Research UK; London, UK) for the generous gift of the Thy-1 antibody.

#### References

- [1] Pinna, L.A. (2002) Protein kinase CK2: a challenge to canons. *J. Cell Sci.* 115, 3873–3878.
- [2] Meggio, F. and Pinna, L.A. (2003) One-thousand-and-one substrates of protein kinase CK2? *FASEB J.* 17, 349–368.
- [3] Olsten, M., Weber, J.E. and Litchfield, D.W. (2005) CK2 interacting proteins: emerging paradigms for CK2 regulation? *Mol. Cell. Biochem.* 274, 115–124.
- [4] Wei, T.-Q. and Tao, M. (1993) Human erythrocyte casein kinase II: characterization and phosphorylation of membrane cytoskeletal proteins. *Arch. Biochem. Biophys.* 307, 206–216.
- [5] Bosc, D.G., Graham, K.C., Saulnier, R.B., Zhang, C., Prober, D., Gietz, R.D. and Litchfield, D.W. (2000) Identification and characterization of CKIP-1, a novel Pleckstrin Homology domain-containing protein that interacts with Protein Kinase CK2. *J. Biol. Chem.* 275, 14295–14306.
- [6] Ritt, D.A., Zhou, M., Conrads, T.P., Veenstra, T.P., Copeland, T.D. and Morrison, D.K. (2007) CK2 is a component of the KSR1 scaffold complex that contributes to Raf Kinase activation. *Curr. Biol.* 17, 179–184.
- [7] Simons, K. and Ikonen, E. (1997) Functional rafts in cell membranes. *Nature* 387, 569–572.
- [8] Brown, D.A. and Rose, J.K. (1992) Sorting of GPI-anchored proteins to glycolipid-enriched membrane subdomains during transport to the apical cell surface. *Cell* 69, 533–544.
- [9] Pike, L.J., Han, X. and Cross, R.W. (2005) Epidermal growth factor receptors are localized to lipid rafts that contain a balance of inner and outer leaflet lipids. *J. Biol. Chem.* 280, 26796–26804.
- [10] Gil, C., Soler-Jover, A., Blasi, J. and Aguilera, J. (2005) Synaptic proteins and SNARE complexes are localized in lipid rafts from rat brain synaptosomes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 329, 117–124.
- [11] Llorens, F., Duarri, A., Sarro, E., Roher, N., Plana, M. and Iartre, E. (2006) The N-terminal domain of the human eF2β subunit and the CK2 phosphorylation sites are required for its function. *Biochem. J.* 394, 227–236.
- [12] Drevot, P., Langlet, C., Guo, X., Bernard, A., Colard, O., Chauvin, J., Lasserre, R. and He, H. (2002) TCR signal initiation machinery is pre-assembled and activated in a subset of membrane rafts. *EMBO J.* 21, 1899–1908.
- [13] Brown, D.A. and London, E. (1998) Functions of lipid rafts in biological membranes. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 14, 111–136.
- [14] Gil, C., Cubi, R., Blasi, J. and Aguilera, J. (2006) Synaptic proteins associate with a sub-set of lipid rafts when isolated from nerve endings at physiological temperature. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 348, 1334–1342.
- [15] Rodriguez, F.A., Contreras, C., Bolanos-Garcia, V. and Allende, J.E. (2008) Protein kinase CK2 as an ectokinase: the role of the regulatory CK2β subunit. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105, 5693–5698.
- [16] Charriaud-Marlangue, C., Otani, S., Creuzet, C., Ben-Ari, Y. and Loeb, J. (1991) Rapid activation of hippocampal casein kinase 2 during long-term potentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 10232–10236.

- [17] Arevalo, M.A. and Rodriguez-Tébar, A. (2006) Activation of casein kinase II and inhibition of phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10 phosphatase by nerve growth factor/p75NTR inhibit glycogen synthase kinase-3 $\beta$  and stimulate axonal growth. *Mol. Biol. Cell* 17, 3369–3377.
- [18] Goswami, R., Singh, D., Phillips, G., Kilkus, J. and Dawson, G. (2005) Ceramide regulation of the Tumor Suppressor Phosphatase PTEN in rafts isolated from neurotumor cell lines. *J. Neurosci. Res.* 81, 541–550.
- [19] Sowa, G., Pypaert, M., Fulton, D. and Sessa, W.C. (2003) The phosphorylation of caveolin-2 on serines 23 and 36 modulates caveolin-1-dependent caveolae formation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 100 (11), 6511–6516.
- [20] Sowa, G., Xie, L., Xu, L. and Sessa, W.C. (2008) Serine 23 and 36 phosphorylation of caveolin-2 is differentially regulated by targeting to lipid raft/caveolae and in mitotic endothelial cells. *Biochemistry* 47, 101–111.
- [21] Kimura, R. and Matsuki, N. (2008) Protein kinase CK2 modulates synaptic plasticity by modification of synaptic NMDA receptors in the hippocampus. *J. Physiol.* 586.13, 3195–3206.
- [22] Yin, X., Zafrullah, M., Lee, H., Haimovitz-Friedman, A., Fuks, Z. and Kolesnick, R. (2009) Ceramide-binding C1 Domain mediates Kinase Suppressor of Ras membrane translocation. *Cell Physiol. Biochem.* 24, 219–230.
- [23] Lasserre, R., Guo, X., Conchonaud, F., Hamon, Y., Hawchar, O., Bernard, A., Soudja, S., Lenne, P., Rigneault, H., Olive, D., Bismuth, G., Nunes, J., Payrastrre, B., Marguet, D. and He, H. (2008) Raft nanodomains contribute to Akt/PKB plasma membrane recruitment and activation. *Nat. Chem. Biol.* 4, 538–547.
- [24] Davletov, B., Sontag, J.M., Hata, Y., Pretrenko, A., Fykse, E.M., Jahn, R. and Sudhof, T.C. (1993) Phosphorylation of synaptotagmin I by Casein Kinase II. *J. Biol. Chem.* 268, 6816–6822.
- [25] Nielander, H.B., Onofri, F., Valtorta, F., Schiavo, G., Montecucco, C., Greengard, P. and Benfenati, F. (1995) Phosphorylation of VAMP/synaptobrevin in synaptic vesicles by endogenous protein kinases. *J. Neurochem.* 65, 1712–1720.
- [26] Bennett, M.K., Miller, K.G. and Scheller, R.H. (1993) Casein Kinase II phosphorylates the synaptic vesicle protein p65. *J. Neurosci.* 13 (4), 1701–1707.
- [27] Dubois, T., Kerai, P., Learmonth, M., Cronshaw, A. and Aitken, A. (2002) Identification of syntaxin-1A sites of phosphorylation by casein kinase I and casein kinase II. *Eur. J. Biochem.* 269, 909–914.
- [28] Foletti, D.L., Lin, R., Finley, M.A.F. and Scheller, R.H. (2000) Phosphorylated syntaxin 1 is localized to discrete domains along a subset of axons. *J. Neurosci.* 20, 4535–4544.
- [29] Shu, Y., Liu, X., Yang, Y., Takahashi, M. and Gillis, K.D. (2008) Phosphorylation of SNAP-25 at Ser187 mediates enhancement of exocytosis by a phorbol ester in INS-1 cells. *J. Neurosci.* 28, 21–30.
- [30] Rickman, C. and Duncan, R.R. (2009) Munc18/syntaxin interaction kinetics control secretory vesicle dynamics. *J. Biol. Chem.* 285, 3965–3972.
- [31] Castillo, M.A., Ghose, S., Tamminga, C.A. and Ulerly-Reynolds, P.G. (2010) Deficits in syntaxin 1 phosphorylation in schizophrenia prefrontal cortex. *Biol. Psychiatry* 67, 208–216.
- [32] Woo, N.H., Teng, H.K., Siao, C., Chiaruttini, C., Pang, P.T., Milner, T.A., Hempstead, B.L. and Lu, B. (2005) Activation of p75<sup>NTR</sup> by proBDNF facilitates hippocampal long-term depression. *Nat. Neurosci.* 8:8, 1069–1077.

