



UNIVERSIDAD DE CHILE



FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

POSIBLE USO DE LA SUBUNIDAD REGULATORIA DE LA
PROTEÍNA QUINASA CK2 EN MEDIAR LA EXPORTACIÓN
DE PROTEÍNAS HACIA EL EXTERIOR DE LAS CÉLULAS

CARLOS ANTONIO CONTRERAS GALLARDO

Memoria para optar al Título Profesional
de Médico Veterinario
Departamento de Ciencias Biológicas
Animales

Financiamiento: Proyecto Fondecyt N°
1060107

PROF. GUÍA: DR. JORGE EDUARDO ALLENDE RIVERA

SANTIAGO, CHILE
2008



UNIVERSIDAD DE CHILE



FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

POSIBLE USO DE LA SUBUNIDAD REGULATORIA DE LA PROTEÍNA QUINASA CK2 EN MEDIAR LA EXPORTACIÓN DE PROTEÍNAS HACIA EL EXTERIOR DE LAS CÉLULAS

CARLOS ANTONIO CONTRERAS GALLARDO

Memoria para optar al Título Profesional
de Médico Veterinario
Departamento de Ciencias Biológicas
Animales

Financiamiento: Proyecto Fondecyt N°
1060107

NOTA FINAL:

	NOTA	FIRMA
PROFESOR GUÍA : JORGE E. ALLENDE RIVERA
PROFESOR CONSEJERO: EDUARDO KESSI CAMPOS
PROFESOR CONSEJERO: MARCO GALLEGUILLOS C.

SANTIAGO, CHILE
2008

Esta memoria de título fue realizada en el Instituto de Ciencias Biomédicas de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile y fue financiada por el Proyecto Fondecyt N° 1060107 investigador responsable Dr. Jorge E. Allende Rivera.

INDICE

1. RESUMEN	vi
1.1. SUMMARY.....	vii
2. INTRODUCCIÓN	1
3. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	3
3.1. ASPECTOS GENERALES DE LAS PROTEÍNAS QUINASAS.....	3
3.2. PROTEÍNA QUINASA CK2.....	4
3.2.1. ESTRUCTURA DE CK2.....	5
3.2.2. LOCALIZACIÓN SUBCELULAR.....	6
3.2.3. CK2 ECTOQUINASA.....	7
3.2.4. RELEVANCIA FISIOLÓGICA.....	8
4. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	11
4.1 HIPÓTESIS.....	11
4.2. OBJETIVO GENERAL.....	11
4.3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	11
5. MATERIALES Y MÉTODOS	12
5.1. MATERIALES.....	12
5.1.1. MATERIALES Y REACTIVOS GENERALES.....	12
5.1.2. REACTIVOS Y MATERIALES PARA CULTIVO CELULAR.....	13
5.1.3. OLIGONUCLEÓTIDOS.....	14
5.1.4. ANTICUERPOS.....	14
5.1.5. VECTORES DE EXPRESIÓN.....	14
5.2. MÉTODOS.....	16
5.2.1. CULTIVO CELULAR.....	16
5.2.2. PROTEÍNA DE FUSIÓN GST-CK2 β	16

5.2.3. PROTEÍNA DE FUSIÓN GFP-CK2 β	19
5.2.4. TRANSFECCIÓN DE CÉLULAS HEK 293T.....	19
5.2.5. RECOLECCIÓN DE MUESTRAS.....	20
5.2.6. ENSAYO DE ACTIVIDAD QUINASA.....	21
5.2.7. ENSAYO DE ACTIVIDAD GST.....	21
5.2.8. ANÁLISIS DE WESTERN BLOT.....	22
6. RESULTADOS.....	23
6.1. APLICACIÓN DEL MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO PARA MEDIR ACTIVIDAD CATALÍTICA DE GLUTATIÓN-S-TRANSFERASA (GST), UTILIZANDO LA PROTEÍNA RECOMBINANTE GST-CK2 β	24
6.2. EXPRESIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE PROTEÍNAS DE FUSIÓN QUE COMPRENEN LA PROTEÍNA QUINASA CK2 β	26
6.3. DETERMINACIÓN DE LA EXPORTACIÓN DE LA PROTEÍNA DE FUSIÓN HA- GST-CK2 β MEDIANTE ENSAYO DE ACTIVIDAD QUINÁSICA.....	31
6.4. DETERMINACIÓN DE LA EXPORTACIÓN DE LA PROTEÍNA DE FUSIÓN GFP- CK2 β MEDIANTE ENSAYO DE ACTIVIDAD QUINÁSICA.....	34
6.5. DETERMINACIÓN DE LA EXPORTACIÓN DE PROTEÍNAS QUIMÉRICAS MEDIANTE INMUNOPRECIPITACIÓN Y ANÁLISIS WESTERN.....	36
7. DISCUSIÓN.....	40
8. CONCLUSIONES.....	46
9. BIBLIOGRAFÍA.....	47

1. RESUMEN

La proteína quinasa CK2 es una quinasa ubicua que fosforila serinas y treoninas de un gran grupo número de proteínas celulares. La holoenzima CK2 existe como un tetrámero (CK2 $\alpha_2\beta_2$) donde CK2 α es la subunidad catalítica con actividad proteína quinasa y CK2 β es la subunidad regulatoria que modula la actividad y confiere estabilidad a CK2 α . CK2 es una enzima muy conservada en diferentes especies, es esencial para la viabilidad celular y está presente en distintos compartimientos y organelos celulares. Además, CK2 ha sido encontrada unida a la cara externa de la membrana plasmática, actuando como ectoquinasa, catalizando la fosforilación de distintas proteínas extracelulares y regulando distintos procesos como migración, adhesión y proliferación celular. Estudios previos utilizando la transfección de células HEK293T en cultivo, han demostrado que es necesaria la expresión de ambas subunidades α y β para la aparición de actividad ectoquinasa en la superficie celular. La ectoquinasa se libera de la membrana en la presencia de sustratos específicos.

El presente trabajo exploró la posibilidad de que la subunidad regulatoria CK2 β pudiera exportar al medio extracelular otra proteína unida covalentemente a su cadena polipeptídica. El modelo experimental consistía en la cotransfección de células HEK293T en cultivo celular, con DNAs que codifican para las proteínas de fusión a CK2 β y la CK2 α . Se utilizó dos tipos de de proteínas de fusión: la glutathion S-transferasa unida a CK2 β (GST-CK2 β) y la proteína fluorescente verde también unida a CK2 β (GFP-CK2 β), en ambos casos la unión fue al extremo amino-terminal de CK2 β . Se observó que estas proteínas de fusión se expresan, junto con CK2 α , a niveles de actividad catalítica parecidos, pero siempre menores a los observados con la expresión de CK2 β no modificada. Los resultados mostraron consistentemente a la proteína de fusión en los lisados celulares, pero no fue posible de detectarlas en el medio extracelular. Para estos análisis se utilizaron técnicas muy sensibles como inmunoprecipitación específica, ensayos de actividad catalítica e inmunoblot (*western blot*). Se concluye que la fusión de CK2 β con otra proteína no altera *per se* el proceso de expresión de la proteína ectópica, pero si inhibe su traspaso por la membrana plasmática hacia el medio extracelular, posiblemente debido a la orientación estérica de las moléculas recombinantes usadas.

1.1 SUMMARY

The protein kinase CK2 is a ubiquitous kinase that phosphorylate serines and threonines of a large group of cellular proteins. The CK2 holoenzyme exists as a tetramer (CK2 α $_2$ β $_2$) where CK2 α is the catalytic subunit with kinase activity and CK2 β is the regulatory subunit that modulates the activity and gives stability to CK2 α subunit. CK2 is a highly conserved enzyme in different species, is essential for cellular viability and is present in different compartments and cellular organelles. In addition, CK2 has been found attached to the outside surface of the cell membrane, acting as ectokinase, catalyzing the phosphorylation of different extracellular proteins and regulating various processes such as migration, adhesion and cell proliferation. Previous studies using the transfection of HEK293T cells in culture have demonstrated that the expression of both subunits (α and β) is necessary in order to obtain ectokinase activity on the cell surface. The ectokinase is released from the membrane in the presence of specific substrates. This work explored the possibility that the regulatory subunit CK2 β could export to the extracellular medium another protein covalently bound to its polypeptide chain. The experimental model was the co-transfection of HEK293T cells in cell culture with DNAs that code for CK2 α and the fusion proteins to CK2 β . We used two types of fusion proteins: glutathione S-transferase coupled with CK2 β (GST-CK2 β) and the green fluorescent protein also associated with CK2 β (GFP-CK2) and in both cases the union was to the amino-terminal end of CK2 β . It was observed that these fusion proteins are expressed, along with CK2 α , at similar catalytic activity levels but always lower (25 to 50%) than the activity recovered as compared to that seen with the expression of unmodified CK2 β . The results consistently showed the presence of the fusion proteins in the cell lysates, but it was not possible to detect them in the extracellular medium. In these analyses highly sensitive techniques such as specific immunoprecipitation, immunoblotting (western blot) and catalytic activity measurements using radioactive substrate were used. We conclude that the fusion of CK2 β with another protein does not alter the process of ectopic expression of the protein, but that both fusion proteins tested are not able to pass through the plasma membrane to reach the extracellular medium, possibly due to the steric hindrance of the recombinant molecules utilized.

2. INTRODUCCIÓN

La célula es la unidad estructural de los sistemas vivientes que interactúa con su medio externo para satisfacer una serie de necesidades vitales. Procesos como la migración, adhesión y proliferación celular, además de la regulación del desarrollo y diferenciación en los sistemas multicelulares se deben a las interacciones de células con la matriz extracelular y la capacidad de la célula de recibir y responder a un gran número de señales extracelulares. El organelo responsable de estas interacciones es la membrana plasmática, que delimita a la célula, provee transporte y comunicación con el medio extracelular mediante proteínas y lípidos.

Desde hace 3 décadas que se tiene conocimiento de la presencia de proteínas quinasas en la superficie de diversos tipos celulares. Estudios realizados por Kübler *et al.*, 1983, lograron demostrar la presencia de distintas proteínas quinasas, además de nucleotidasas y ATPasas en la superficie celular, lo que da cuenta de complejos sistemas enzimáticos extracelulares.

Muchos investigadores han demostrado que CK2 es esencial para los distintos procesos celulares, por su amplia cantidad de sustratos y por su localización en la mayoría de los compartimientos subcelulares (Allende & Allende, 1995., Faust & Montenarh, 2000., Litchfield, 2003.,).

Estudios enfocados en determinar la relevancia fisiológica de las proteínas quinasas como ectoquinasas, las vincularían con la regulación de la interacción célula-célula, unión de ligandos a sus respectivos receptores, transducción de señales, control de respuesta inmune y regulación de la adhesión y migración celular (Redegeld *et al.*, 1999). CK2 cobra gran importancia, ya que posee la capacidad de fosforilar distintas proteínas de la matriz extracelular y se ha determinado que la CK2 es uno de las ectoquinasas más abundantes en varias líneas celulares estudiadas.

En este trabajo de Memoria de Título se estudió el rol de la subunidad CK2 β en el proceso de exportación, desde el interior de la célula hacia la superficie exterior de la membrana plasmática. Como se indica en estudios anteriores de este laboratorio (Rodríguez *et al.*, 2005), la evidencia indica que la subunidades CK2 α y CK2 β son exportadas asociadas a la membrana como heterotetrámero y su liberación al medio extracelular se

realiza por adición de un sustrato específico de CK2. El objetivo principal de este trabajo, es examinar mediante la utilización de diversos métodos de biología molecular, la posibilidad de que la subunidad reguladora CK2 β sea capaz de transportar al medio extracelular otra proteína unida covalentemente a ella. Con este propósito, se diseñó un sistema de expresión de proteínas quiméricas recombinantes de CK2 β unida a otra proteína que llevan, además, en sus estructuras una secuencia señalizadora (etiqueta) para facilitar su inmunoprecipitación y identificación en los medios extracelulares. Se eligió dos proteínas de fusión, la CK2 β -glutathion-S-transferasa y la CK2 β -proteína fluorescente verde.

3. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

3.1. ASPECTOS GENERALES DE LAS PROTEÍNAS QUINASAS

Las células regulan muchos de sus procesos vitales por medio de la fosforilación reversible de sus proteínas, dichas reacciones son catalizadas por proteínas quinasas y revertidas por proteínas fosfatasas. Las quinasas tienen la particularidad de participar y coordinar distintas cascadas de señalización que son fundamentales para diversos procesos en la célula como el metabolismo, la transcripción, progresión del ciclo celular, reestructuración del citoesqueleto, movimiento celular, apoptosis, comunicación intercelular durante el desarrollo y funcionamiento de los sistemas nervioso e inmunológico.

La importancia de esta modificación covalente de proteínas es evidente en el hecho que el genoma humano codifica sobre 500 proteínas quinasas, las que constituyen 1,7% del genoma humano, lo que las ubica dentro de las familias de genes más grandes en eucariontes. La gran mayoría de estas proteínas quinasas tienen un dominio catalítico muy conservado y son agrupadas en la superfamilia de proteínas quinasas eucarióticas (ePKs). Las demás proteínas quinasas, que no poseen este dominio catalítico conservado, se clasifican dentro de las proteínas quinasas atípicas (aPKs). A su vez, las ePKs son clasificadas en siete grupos principales (AGC, CAMK, CMGC, CK1, STE, TKL y TK) y estos subdivididos en familias y en algunas ocasiones en subfamilias, basado en la secuencia de sus dominios quinasa (Manning *et al.*, 2002). Es relevante mencionar que una tercera parte de todas las proteínas celulares pueden ser fosforiladas en uno o más sitios (Litchfield, 2003).

Las proteínas quinasas catalizan la fosforilación de residuos de serina, treonina y tirosina, de una proteína sustrato, una reacción que puede resultar en cambios en la actividad, conformación estructural o en la capacidad de la proteína sustrato de asociarse a otra(s) proteína(s), regulando así importantes procesos celulares.

En las últimas décadas, se han descrito la presencia de proteínas quinasas en la superficie de una amplia variedad de células (Redegeld *et al.*, 1999) y por su localización extracelular y por el tipo de sustrato(s) específico(s) que fosforilan, éstas podrían jugar un

papel muy importante en la regulación de interacciones entre células. Además, análisis en bases de datos de proteínas revelan la presencia de sitios de consenso para fosforilación en muchas proteínas de la superficie celular, lo cual sugiere que existen muchos sustratos potenciales para la ecto-fosforilación por ectoquinasas y ATP extracelular.

3.2. PROTEÍNA QUINASA CK2

La proteína CK2 es una enzima serina / treonina quinasa, pleiotrópica, ubicada en eucariontes, que posee subunidades catalítica (α y α') y regulatoria (β) que usualmente conforma tetrámeros con la composición: $\alpha_2\beta_2$, $\alpha\alpha'\beta_2$ o $\alpha'\beta_2$ (Tapia *et al.*, 2002). La CK2 fosforila residuos de serina o treonina próximos a aminoácidos acídicos, a diferencia de la mayoría de las proteínas serina / treonina quinatas que requieren uno o más residuos básicos en sus sitios de fosforilación. La secuencia de consenso mínima que se ha determinado para CK2 es S/T X X D/E, siendo S/T el hidroxilaminoácido serina o treonina a ser fosforilado, X cualquier residuo aminoacídico y D/E ácidos aspártico o glutámico (Meggio *et al.*, 1994., Allende y Allende 1995). CK2 es altamente conservada y es esencial para la vida en organismos eucariontes. Se ha reportado, que la CK2 tiene más de trescientas proteínas como sustratos, en contraste con otras quinatas que son altamente específicas y fosforilan sólo uno o dos sustratos (Litchfield, 2003). CK2 puede utilizar indistintamente ATP o GTP como co-sustrato (dador de grupo fosforilo) lo que puede utilizarse para identificarla, ya que es una propiedad única entre las proteínas quinatas. El uso de GTP requiere la participación de una molécula de agua para posicionarse correctamente en el sitio activo de CK2 y reemplazar al ATP en su función de co-sustrato (Niefind *et al.*, 1999). A su vez, CK2 muestra actividad no sólo en presencia del cofactor natural Mg^{+2} , sino también de otros cationes divalentes tales como Mn^{+2} y Co^{+2} . En presencia de Mg^{+2} es más efectivo ATP como dador de grupo fosforilo mientras que en presencia de Mn^{+2} la situación se revierte a favor del GTP (Gatica *et al.*, 1993).

Las subunidades de CK2 (CK2 α y CK2 β) han sido clonadas en distintas especies (tanto animales como vegetales) facilitando los estudios de esta enzima. De esta manera, en el laboratorio donde se realizó este estudio, se ha reportado la clonación y secuenciación de las subunidades CK2 α y CK2 β de *Xenopus laevis* (Jedlicki *et al.*, 1991) y de *Danio rerio*

(Antonelli *et al.*, 1996). Análisis de estas secuencias muestran un marcado grado de conservación entre especies distanciadas evolutivamente, por ejemplo, las secuencias de la subunidad CK2 α obtenidas de *Xenopus laevis* difieren de la humana sólo en un aminoácido en los primeros 300 aminoácidos, y la subunidad CK2 β de las mismas dos especies difiere sólo en 2 aminoácidos en toda la extensión del péptido (Hinrichs *et al.*, 1993).

3.2.1. ESTRUCTURA DE CK2

La holoenzima de la proteína quinasa CK2 se ha purificado de diferentes tejidos en eucariontes, generalmente formando un heterotetrámero constituido por dos subunidades catalíticas y dos subunidades regulatorias que espacialmente asemejan a una mariposa, en donde el dímero de la subunidad regulatoria forma un puente que une ambas subunidades catalíticas. Se han encontrado diversas isoformas de la subunidad catalítica en los organismos eucariontes, no obstante, en el ser humano se presenta en la célula como un tetrámero compuesto de dos subunidades catalíticas, CK2 α y/o CK2 α' y dos subunidades regulatorias CK2 β , la holoenzima entonces estaría conformada por una estructura $\alpha_2\beta_2$. Existen evidencias que las subunidades aisladas tendrían funciones específicas (Allende y Allende, 1998). Las subunidades CK2 α y CK2 α' son intrínsecamente activas y tienen una masa molecular de 42-44 kDa y 38 kDa, respectivamente. Estas subunidades catalíticas son estructuralmente análogas pero codificadas por genes diferentes. Por su parte, la subunidad regulatoria CK2 β (26 kDa), no posee actividad catalítica. Sin embargo, CK2 β parece cumplir tres funciones: 1) conferir estabilidad a la holoenzima, 2) modular la actividad de la subunidad catalítica e 3) influir sobre la subunidad catalítica en cuanto a la especificidad de su interacción con sustratos o inhibidores (Allende y Allende, 1995). Además, se ha demostrado que la subunidad regulatoria CK2 β posee la capacidad de asociarse a otras proteínas de forma independiente de su interacción con CK2 α , ejemplo de estas interacciones son las proteínas quinasas A-Raf, C-Mos y Chk1 (Bibby y Litchfield, 2005).

Mediante métodos cristalográficos se ha logrado obtener la estructura de CK2 activa de maíz (CK2 α) y humana (CK2 $\alpha_2\beta_2$) a una resolución de 2,1 Å y 3,1 Å, respectivamente (Niefind *et al.*, 2001). Analizando esta estructura se puede apreciar que las subunidades

regulatorias (CK2 β) forman un dímero unido a las subunidades catalíticas (CK2 α), las cuales no hacen contacto entre ellas. Cada subunidad catalítica hace contacto con ambas subunidades regulatorias, predominantemente a través del extremo C-terminal de estas últimas. La subunidad catalítica tiene una arquitectura bilobular. El lóbulo más pequeño (dominio N-terminal) comprende 5 cadenas beta y una alfa hélice denominada α C. Este dominio es el responsable del contacto con las subunidades regulatorias. El lóbulo mayor (dominio C-terminal) está formado por alfa hélices. El sitio activo de la subunidad catalítica se encuentra en la interfase de ambos lóbulos. La superposición estructural de la subunidad catalítica aislada con la que constituye el heterotetrámero lleva a un valor de desviación promedio (r.m.s.ds) de $\sim 0,8 \text{ \AA}$. Este valor demuestra que la estructura de la subunidad catalítica sufre escasos cambios en su transición de monómero a heterotetrámero, lo que explica la actividad catalítica intrínseca de esta subunidad aislada. De manera similar a la subunidad catalítica, la subunidad regulatoria cambia poco como consecuencia de la formación del tetrámero (r.m.s.ds $\sim 0,83 \text{ \AA}$). La estructura de la subunidad CK2 β puede dividirse en un dominio N-terminal (rico en alfa hélices), un dominio de unión a Zn^{2+} (interfase del dímero β/β) y una cola C-terminal que se extiende hacia el exterior del monómero (Niefind *et al.*, 2001).

3.2.2. LOCALIZACIÓN SUBCELULAR

Muchos estudios han demostrado la importancia de la adecuada distribución de CK2 en distintos compartimientos celulares, ya que sustratos fisiológicos de esta proteína quinasa se encuentran por toda la célula. Utilizando experimentos de fraccionamiento subcelular, muchos grupos han detectado proteína quinasa CK2 en el citoplasma y se ha purificado a partir de mitocondria de hígado bovino junto con medir su actividad por utilización de un sustrato específico de CK2. Se ha mostrado su importancia en la fosforilación de distintos componentes del citoesqueleto, también se le ha identificado como una quinasa asociada al retículo endoplásmico (Faust y Montenarh, 2000). CK2 también se encuentra en la fracción nuclear y dependiendo de la etapa del ciclo celular, se encuentra en la matriz nuclear y con el huso mitótico asociándose y fosforilando a varias proteínas nucleares como nucleolina y NOPP140. Vale destacar que un número muy

importante de factores de transcripción (SRF, c-Jun, c-Myb, c-Myc, p53, etc.) son fosforilados por CK2 y esta modificación regula en algunos casos su capacidad de translocarse al núcleo como así también su funcionalidad como factor de transcripción (Allende y Allende, 1995).

3.2.3 CK2 ECTOQUINASA

Desde la década del 70 se tiene conocimiento de la existencia de actividad quinasa en la superficie de diversos tipos celulares. En el año 1976 Mastro y Rozengurt detectaron la presencia de actividad proteína quinasa en la cara externa de la membrana plasmática de células 3T3. En el año 1983 Kübler *et al.* demostraban que esta actividad quinasa podía ser selectivamente liberada a partir de células HeLa intactas mediante el uso de sustratos de CK2 tales como fosvitina o caseína. A este procedimiento de liberación de una proteína desde la superficie celular se le denominó “*shedding*”. Pyerin *et al.* en 1987 demostró que una ectoproteína quinasa altamente purificada a partir del medio de cultivo de células HeLa intactas reunía todas las características de la proteína quinasa CK2. Esta caracterización fue profundizada por el trabajo de Walter *et al.*, 1996. En dicho, trabajo se observó que la actividad quinasa liberada de células HeLa intactas era capaz de fosforilar péptidos sintéticos, que son sustratos específicos de la proteína quinasa CK2. Esta actividad era inhibida por concentraciones bajas de heparina (inhibidor clásico de la proteína quinasa CK2) además de utilizar indistintamente ATP o GTP como co-sustrato. La clasificación de ectoquinasa fue confirmada por otras caracterizaciones que incluyeron: 1) datos de autofosforilación que evidenciaron la existencia de las dos subunidades catalíticas α y α' (43 y 40 kDa) y una subunidad regulatoria de 28 kDa, 2) reacción inmunológica con anticuerpos específicos para la proteína quinasa CK2, 3) mapeo de péptidos trípticos que resultó en fragmentaciones comparables entre la proteína ectoquinasa y la proteína quinasa CK2 de humano y 4) gran homología de secuencia entre la ectoquinasa y la proteína quinasa CK2 de humano mediante espectrometría de masa (MALDI-MS) de péptidos trípticos separados por HPLC y posterior microsecuenciación. La presencia de actividad ectoquinasa de CK2 no está limitada a células HeLa, también se ha observado en otros tipos celulares tales como la línea celular de riñón embrionario humano HEK293 (Walter *et*

al., 2000), neuronas, mastocitos, fibroblastos, células de la musculatura lisa vascular y linfocitos-T (Redegeld *et al.*, 1999). En el caso de las células T, también se ha descrito la presencia de fosfatasas y ATPasas en la cara externa de la membrana plasmática. Esto último sugiere la existencia de un sistema completo de fosforilación/desfosforilación reversible en el espacio extracelular.

Varios trabajos sugieren, que la actividad ectoquinásica de CK2 jugaría un papel fisiológico mediante la fosforilación de proteínas presentes en la matriz extracelular, tales como fibrinógeno, fibrina, lectina L-29, vitronectina y el precursor de proteína β -amiloide (Walter *et al.*, 2000). Se ha demostrado, que la fosforilación selectiva de vitronectina por la ectoquinasa CK2 produce un incremento en la afinidad celular por dicho componente, favoreciendo la adhesión y migración celular. Por otra parte, se ha demostrado que la fosforilación de nucleolina por la ectoquinasa CK2 está relacionada a la capacidad mitogénica de uroquinasa.

En trabajos realizados en el Laboratorio de Biología Celular de la Transducción de Señales Celulares, de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile, se ha logrado determinar mediante transfección de células HEK 293 T con vectores que contienen los genes que codifican para ambas subunidades de CK2, la exportación del 3 al 4% de la holoenzima producida por la célula a la superficie exterior de la membrana plasmática. El proceso de ubicación de CK2 en la membrana celular demora varias horas luego de la co-transfección de las subunidades y posterior cultivo. Para detectar la actividad enzimática en el medio extracelular por la adición del sustrato fosvitina, se requiere entre 13 y 15 horas (Rodríguez *et al.*, 2005) y sólo es posible realizar el proceso de exportación-*shedding* continuo hasta pasadas las 24 horas. También se ha visto que una forma mutante de CK2 α , catalíticamente inactiva, es exportada con la misma eficiencia que la enzima activa. Hasta el momento no se conoce el método por el cual CK2 es exportada hacia la superficie celular, además las subunidades CK2 α y CK2 β no contienen secuencias con las características de péptido señal para dirigir una proteína a través de la vía clásica de exportación (Rodríguez *et al.*, 2005).

3.2.4 RELEVANCIA FISIOLÓGICA

La fosforilación de sustratos en el extracelular, como así también la de dominios extracelulares de proteínas integrales de membrana por proteínas quinasas, se sugiere que estaría vinculada a la regulación de la interacción entre células, unión de ligandos a sus respectivos receptores, transducción de señales, control de respuesta inmune y regulación de la adhesión y migración celular (Redegeld *et al.*, 1999). En el caso particular de la proteína quinasa CK2 cobra relevancia su capacidad de fosforilar distintas proteínas de la matriz extracelular. Al colocar células HeLa sobre una matriz de vitronectina previamente fosforilada por CK2 las mismas mostraron un marcado aumento de su capacidad de adhesión a integrinas, específicamente a la forma $\alpha v \beta 3$ (Seger *et al.*, 2001). En un trabajo posterior, realizado con células de la musculatura lisa, se demostró que la fosforilación de vitronectina por CK2 está regulada por uroquinasa, conocido modulador de la adhesión celular y que formando complejo con la integrina $\alpha v \beta 3$, se encuentra el receptor de dicho modulador (Stepanova *et al.*, 2002). De manera similar, Trachana *et al.*, 2005, demostraron que la glicoproteína laminina-1 es un sustrato de CK2 y que la adhesión y migración de células HEp-2 se ve favorecida en presencia de laminina-1 previamente fosforilada. Todo esto sugiere que CK2 como ectoquinasa cumple un importante papel en la regulación de la adhesión y migración celular.

En 2005, Bohana-Kashtan *et al.*, describieron una ectoquinasa que era capaz de fosforilar el componente C9 del sistema del complemento y con el uso de inhibidores específicos demostraron que se trataba de la proteína quinasa CK2. Cuando células Raji (linfoma B humano) fueron tratadas con estos inhibidores se observó un aumento en el índice de lisis celular mediada por el complemento C9. A su vez, se observó un aumento de la actividad CK2 ectoquinasa sobre C9 en células tumorales en comparación con células normales. Por lo tanto, la actividad CK2 ectoquinasa puede ser considerada como un factor protector contra la lisis celular mediada por el complemento, probablemente mediante la fosforilación de C9 y su consecuente inhibición.

Entre las proteínas fosforiladas en sus dominios extracelulares se encuentra la proteína precursora del péptido β -amiloide (β APP). Dos fueron las ectoproteínas posiblemente responsables de esta fosforilación extracelular, la proteínas quinasas CK1 y

CK2. Estas quinasas fueron capaces de fosforilar, tanto la forma secretada, como la asociada a membrana de la β APP. También se observó, que heparina fue capaz de inhibir la fosforilación de la β APP por CK1 y CK2, sugiriendo que compuestos similares de la matriz extracelular, heparán sulfatos por ejemplo, cumplirían una función regulatoria sobre esta actividad ectoquinasa (Walter *et al.*, 2000).

En un trabajo muy reciente se vincula a CK2 con la fosforilación de la proteólisis del receptor de colágeno XVII. Dicho receptor es una proteína transmembrana responsable de la adhesión de dermis y epidermis. CK2 inhibiría la acción de una metaloproteasa que produciría la proteólisis del receptor, con lo cual CK2 estaría regulando la adhesión de las células epiteliales (Zimina *et al.*, 2007).

4. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

4.1. HIPÓTESIS

La CK2 β , subunidad regulatoria de la proteína quinasa II, es capaz de exportar de la célula a otras proteínas que hayan sido covalentemente fusionadas a ella.

4.2. OBJETIVO GENERAL

Determinar si la subunidad CK2 β recombinante puede servir para causar la exportación de otras proteínas fusionadas a su cadena polipeptídica.

4.3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 4.3.1. Subclonar en el vector de expresión en eucariontes pCEFL-HA el DNA que codifica para la proteína de fusión de glutatión-S-transferasa – proteína quinasa CK2 β .
- 4.3.2. Transfectar células en cultivo HEK293T con DNA de un vector clonado con las secuencias que codifican para la expresión de glutatión-S-transferasa - proteína quinasa CK2 β o *green fluorecent protein* (proteína fluorescente verde) - proteína quinasa CK2 β .
- 4.3.3. Detectar la expresión y exportación de las proteínas de fusión transfectadas e inmunoprecipitadas, glutatión-S-transferasa - proteína quinasa CK2 β y *green fluorecent protein* (proteína fluorescente verde) - proteína quinasa CK2 β , mediante la medición de la actividad quinásica de CK2 y *western blotting*.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 MATERIALES

5.1.1. MATERIALES Y REACTIVOS GENERALES

Las sales, solventes, detergentes y demás reactivos de uso común y de grado analítico o grado biología molecular, fueron adquiridos de Winkler, U. S. Biological, Sigma, J.T. Baker, Merck o Fluka. La fosvitina para el proceso de *shedding*; los detergentes no iónicos Nonidet P-40 y Triton X-100; la acrilamida; el N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine (TEMED); el glutatión reducido; la proteína A conjugada a agarosa; la adenosina 5'-trifosfato (ATP); el 2-mercaptoetanol; el colorante para la preparación de Coomassie Blue (Brillant Blue R-250); el azul de bromofenol para la preparación de las soluciones de carga; el antibiótico cloranfenicol y el reactivo de Bradford se obtuvieron de Sigma. El cóctel de inhibidores de proteasas para lisado de células eucariotas y el péptido sustrato específico de CK2 (RRADDSDDDD) se adquirieron de Calbiochem. Las enzimas de restricción; la DNA ligasa del bacteriófago T4; la *Taq* DNA polimerasa; los marcadores de peso molecular para proteínas (*Protein Molecular Weight Marker* y *Page Ruler Prestained Protein Ladder*) y para DNA (*Gene Ruler 100bp DNA Ladder Plus*) fueron suministrados por Fermentas. El bromuro de etidio; el marcador de peso molecular para DNA (λ DNA / Hind III fragments) y la *Taq* DNA polimerasa de alta fidelidad (*Platinum Taq DNA polymerase High Fidelity*) fueron obtenidos de Invitrogen. La bis-acrilamida y la ampicilina utilizada para selección de bacterias transformadas se adquirieron de Winkler. La triptona y el extracto de levadura para la preparación de medio LB (Luria-Bertoni) para crecimiento de bacterias fueron adquiridos de Mobio. Los desoxinucleotido trifosfato (dNTP) para PCR fueron de Peqlab. Los reactivos para el revelado de inmunoblotting incubados con anticuerpos conjugados a la fosfatasa alcalina (*AP Conjugate Substrate Kit*) fueron obtenidos de Bio-Rad. Los sistemas para purificación de DNA (*Plasmid Purification Midi / Mini* y *Gel Extraction Spin Kit*) fueron de Jetstar. La agarosa para la preparación de geles para DNA (*Agarose Med EEO*) fue de USBiological. El [γ -³²P] ATP fue de Perking Elmer. La membrana de PVDF

(inmobilon) para *western blot*; las unidades de filtración descartables de 0,2 μm y los filtros de PVDF de 0,45 μm y 0,25 μm (25 mm) fueron adquiridos de Millipore. Por su parte, los soportes para los filtros previamente mencionados fueron de Gelman Sciences. Los papeles de filtro 1M, 3M y P81 (papel de fosfocelulosa) fueron adquiridos de Whatman. El 1-Cloro-2,4 Dinitrobenceno del laboratorio Acros, fue donado gentilmente por la Dra. María Eugenia Letelier, de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la U. De Chile.

5.1.2. REACTIVOS Y MATERIALES PARA CULTIVO CELULAR

El medio de cultivo Dulbecco`s Modified Eagle Médium (DMEM) rico en glucosa, el suero fetal bovino, la mezcla penicilina / estreptomycin / L-glutamina 100X y la mezcla tripsina-EDTA 10X fueron obtenidas de Gibco (Invitrogen). Los reactivos lipofectamina y plus fueron de Invitrogen. El material plástico utilizado (placas de 60, 100 mm) fue Falcon, Orange o Nunc. Las pipetas Pasteur fueron adquiridas de Hirschmann Laborgerate. Se emplearon membranas de celulosa de 0,2 μm (Advantec MFS) en equipos autoclavables Nalgene para la filtración de medios y soluciones. Los materiales y soluciones que así lo permitían fueron autoclavados en un autoclave eléctrico VWR modelo AS12. El recuento de células se realizó en cámara de Neubauer (Reichert). Los viales criogénicos utilizados fueron obtenidos de Nalgene. El nitrógeno líquido empleado para la preservación de las líneas celulares fue provisto por la Facultad de Ingeniería de la Universidad de Chile. El CO₂ utilizado para el cultivo de células fue suministrado por la empresa AGA, S.A.

5.1.3. OLIGONUCLEÓTIDOS

BGSTF 5' TAT ATA AGA TCT TCC CCT ATA CTA G 3'
 EGSTR 5' TAT ATA GAA TTC TTA ATC CGA TTT TGG AG 3'
 EGSTF 5' TAT ATA TTG AAT TCC CCT ATA CTA G 3'
 NCK2BR 5' TAT ATA GCG GCC GCT CAA CGC 3'
 XCK2BR 5' TAT ATA TCT AGA CAA CGC ATG GTC 3'

Todos los oligonucleótidos fueron producidos por Primers MWG – Biotech (Bioaxis) a excepción del XCK2BR que fue producido por Centro de Análisis y Síntesis de Biomoléculas, CESAT, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

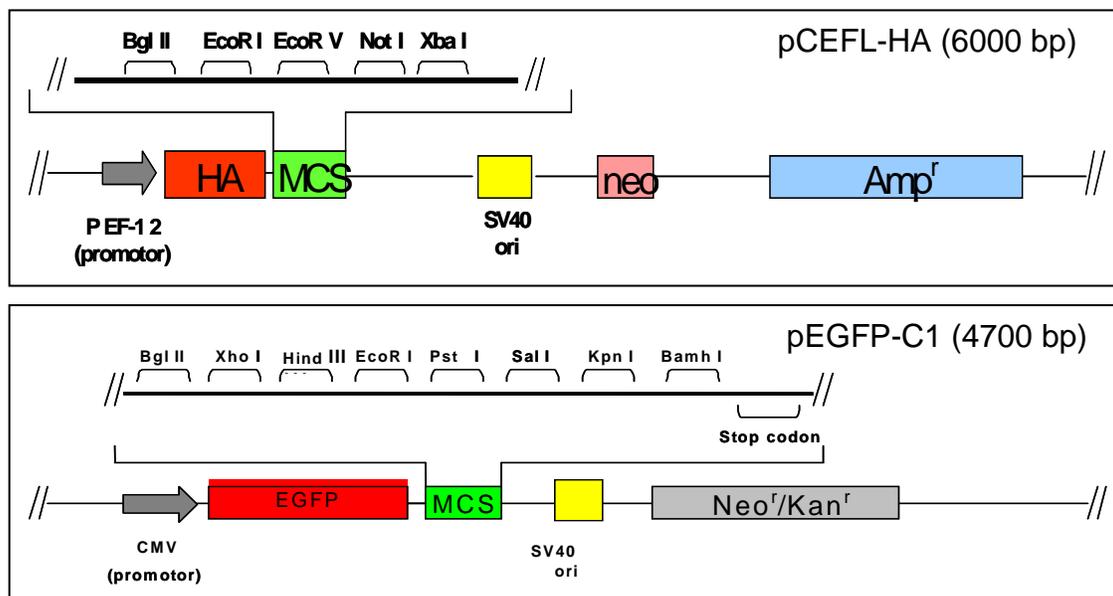
5.1.4. ANTICUERPOS

El anticuerpo anti-HA monoclonal IgG2a de ratón (F-7) de Santa Cruz Biotechnology. Los anticuerpos anti-HA y anti-GST policlonal de conejo fueron suministrados por Upstate. Los anticuerpos secundarios anti-IgG de conejo y anti-IgG de ratón conjugados a fosfatasa alcalina fueron adquiridos de Calbiochem. Otro anticuerpo utilizado, anti-GST policlonal de conejo, fabricado por Sigma, fue donado gentilmente por el Dr. Julio Tapia.

5.1.5. VECTORES DE EXPRESIÓN

La expresión de las proteínas recombinantes en células eucariotas (HEK293T) se realizó con los vectores de expresión pCEFL-HA y pEGFP-C1. El vector pCEFL-HA proporciona un epítipo de hemaglutinina (HA) con un peso de 2 kDa y pEGFP-C1 codifica para la proteína verde fluorescente (*green fluorescent protein*) que tiene un peso de 27 kDa. Todos estos epítipos se encuentran en el extremo amino terminal de la proteína expresada. El vector pCEFL-HA confiere resistencia a ampicilina (Amp^r), en tanto pEGFP-C1 confiere resistencias a Neomicina (Neo^r) y Kanamicina (Kan^r). Ver esquema en página siguiente.

Esquema de vectores eucariontes utilizados.



Abreviaturas y Símbolos:

Promotor.....	→
Epítoto.....	■
Origen de replicación.....	■
MCS (sitio múltiple de clonaje).....	■
Resistencia a ampicilina.....	■
Resistencia a Neomicina /Kanamicina.....	■

5.2 MÉTODOS

5.2.1 CULTIVO CELULAR

La línea celular utilizada en este trabajo fue HEK 293T (*Human Embryonic Kidney*, ATCC número CRL- 11268), una línea celular de morfología epitelial altamente adherentes y transfectables, transformadas con el adenovirus 5 DNA.

Fueron cultivadas en DMEM, al cual se le adicionó 10% de suero fetal bovino (inactivado por 10 minutos a 56°C), 100U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomicina y 0,3 mg/ml de L-glutamina. Las células fueron cultivadas sobre placas descartables (Falcon) y mantenidas en una estufa incubadora (Shellab, modelo IR2424) a 37°C, en una atmósfera con 5% de CO₂ y 80% de humedad relativa. El manejo de los cultivos se realizó en una campana de flujo laminar (Factomet, modelo VR24301).

El subcultivo se realizaba en la campana de flujo laminar ya mencionada, siempre que las células llegaran a confluencia, en tal caso, se retiraba el medio de cultivo y se procedía a lavar las células dos veces con un tampón fosfato salino (PBS). Luego se incubaban las células en una solución de tripsina al 0,05% y EDTA 0,5 mM en PBS. A continuación las células son despegadas de la superficie de la placa, resuspendidas en medio completo y contadas en cámara de Neubauer para luego ser colocadas en una placa con medio completo.

El *stock* de células es mantenido en un termo con nitrógeno líquido. Regularmente, una placa de 100 mm con una confluencia cercana al 90% era tratada con tripsina. Las células obtenidas eran centrifugadas y el sedimento celular se resuspendía en 0,5 ml de medio suplementado con 50% de SFB y 5% de DMSO. Las células así resuspendidas se colocaban en viales criogénicos tras lo cual se enfriaban progresivamente hasta ser colocadas a -70°C. Al día siguiente eran traspasadas a nitrógeno líquido (-196 °C).

5.2.2 PROTEÍNA DE FUSIÓN GST-CK2

Para poder expresar la proteína de fusión GST-CK2 β en células eucariotas se utilizó el vector pCEFL-HA, el cual además confería un epítotope a la proteína expresada que luego

podíamos utilizar para su reconocimiento. En la construcción de GST-CK2 se utilizó un cDNA de un vector de expresión comercial en procariontes (pGEX-2T), el cual había sido clonado previamente CK2 β (Hinrichs *et al.*, 1993) y que ya contenía GST en la región anterior a la caja de clonaje por lo cual se ocupó como templado para PCR. Utilizando los partidores BGSTF (diseñado para hibridar en el cDNA del pGEX-2T en la región que codifica para el N-terminal de la proteína GST) y NCK2B (diseñado para hibridar en el cDNA del pGEX-2T que corresponde a la región que codifica al C-terminal de la proteína CK2 β) se logró amplificar la región codificante para GST-CK2 β . Además BGSTF confirió un sitio de corte para la enzima de restricción Bgl II y NCK2BR un sitio de corte para la enzima de restricción Not I.

El DNA obtenido producto del PCR (amplificado GST-CK2 β) fue suplementado con una solución de 30% de glicerol y 0,25% de azul de bromofenol para ser luego resuelto electroforéticamente en gel de agarosa al 1% suplementado con bromuro de etidio (0,5 μ g/ml). Las bandas de restricción obtenidas eran visualizadas en un transiluminador con luz UV. Al comprobar que las condiciones de PCR eran adecuadas se procede con la PCR preparativa, donde se utiliza un mayor volumen total (150 μ l contra 15 μ l de la PCR anterior), pero con las mismas condiciones que nos dieron el mejor resultado.

Utilizando un kit comercial (*Gel Extraction Spin Kit*) se purificó el DNA a partir del gel, luego se digirió el DNA con las enzimas de restricción Bgl II y Not I, conjuntamente se realizó la digestión del vector pCEFL-HA con las mismas enzimas, para así lograr extremos cohesivos para su posterior ligación. La digestión se realizó en un volumen total de 100 μ l con el *buffer* que recomienda el fabricante para ambas enzimas de restricción. Las enzimas no deben superar el 10% del volumen total de la digestión y en cada reacción se utilizó 5 unidades de enzima. La digestión se realizó a 37° C por 4 horas, luego de lo cual se vuelve a purificar mediante gel de agarosa.

La ligación del inserto GST-CK2 β se logró utilizando 10 veces más de éste sobre la cantidad del vector. El volumen de la reacción fue de 10 μ l con 5 unidades de la DNA ligasa del bacteriófago T4 y el *buffer* de la DNA ligasa (provista por el fabricante). Esta mezcla de ligación se incubó 1 hora a 22°C y luego toda la noche a 16°C. Finalmente se incubó a 65° C durante 10 minutos para inactivar la DNA ligasa. El producto de ligación

fue posteriormente utilizado para la transformación de bacterias *E. coli* DH5 α químiocompetentes.

Para la preparación de bacterias *E. coli* DH5 α químiocompetentes se inoculó 1 ml de medio LB con una colonia obtenida a partir de una placa de LB-agar sembrada con dichas bacterias, todo esto en ausencia de antibióticos. Dicho inóculo fue incubado toda la noche a 37°C con agitación continua (200-250 rpm). El cultivo obtenido se utilizó para inocular 50 ml de medio LB los cuales se incubaron durante 2 horas a 37°C con agitación continua (200-250 rpm) o hasta obtener un cultivo con una densidad óptica de 0,3-0,4 a 600 nm. A continuación, este cultivo fue centrifugado a 1000 Xg durante 10 minutos en centrifuga refrigerada (4°C). El sedimento bacteriano fue resuspendido sobre hielo con 10 ml de solución TSS filtrada (TSS: 10% p/v polietilenglicol 3350, 20 mM MgCl₂, 20 mM MgSO₄, 5% v/v DMSO - agregado después de la filtración- en medio LB) alicuotado y conservado a -70°C.

Para transformar se utilizó 100 μ l de bacterias químiocompetentes a las que se agregaron 10 μ l de la reacción de ligación y esto se incubó durante 30 minutos en hielo tras lo cual se colocó en baño térmico a 42°C durante 90 segundos y luego durante 5 minutos en hielo. A continuación se agregó 200 μ l de medio SOC (20% p/v tritona, 5% p/v extracto de levadura, 9 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl₂ y 20 mM glucosa) y se incubaron durante 1 hora a 37°C con agitación continua (200-250 rpm). Tras esta incubación las bacterias fueron centrifugadas a 3000 Xg durante 4 minutos y el sedimento bacteriano resuspendido en 50 μ l del mismo sobrenadante. Esta resuspensión celular se dispersó en placas de medio LB-agar suplementada con ampicilina por que el vector pCEFL-HA confiere resistencia a este antibiótico. Las placas fueron incubadas a 37°C hasta la aparición de colonias definidas, de las cuales elegimos unas cuantas que utilizamos para realizar una PCR colonia. En una placa de LB-agar se inoculó ordenadamente las colonias elegidas y luego con lo restante en la punta de la micropipeta se inoculó un tubo de PCR. Se efectuó la PCR colonia con los mismos partidores anteriores (BGSTF y NCK2BR) así se pudo distinguir que colonia tenía el inserto que buscábamos.

La/las colonia/s con el inserto (GST-CK2 β) previamente identificadas en la placa de LB-agar, fueron inoculadas en un matraz con 100ml de LB suplementado con ampicilina e incubadas toda la noche en agitación a 37° C. Al día siguiente se realizó la extracción del

DNA plasmidial a partir de las colonias bacterianas que fueron dejadas creciendo el día anterior con el kit comercial *Plasmid Purification Midi* de Jetstar. La concentración del DNA plasmidial obtenido fue determinada mediante lectura en espectrofotómetro a 260 y 280 nm, además se verificó el inserto mediante análisis de restricción con las enzimas Bgl II y Not I, como también una muestra fue enviada para su análisis de secuencia en el Servicio de secuenciación automática de DNA de la Fac. de Ciencias Biológicas de la Pontificia Universidad Católica de Chile.

5.2.3 PROTEÍNA DE FUSIÓN GFP-CK2 β

La construcción GFP-CK2 β fue facilitada gentilmente por el Dr. Fernando Rodríguez. El cDNA de esta construcción se encontraba en muy baja concentración para ser transfectado, por lo cual se decidió realizar la transformación de bacterias DH5 α quimiocompetentes y así procurar mayores concentraciones.

5.2.4 TRANSFECCIÓN DE CÉLULAS HEK293T

Se cultivaron aproximadamente $8,0 \times 10^5$ células HEK- 293T en placa de 60 mm. Veinticuatro horas después (70 – 80% de confluencia) estas células se transfectaron y co-transfectaron con el/los cDNA correspondientes, como se explica en la “Revisión bibliográfica”, experimentos previos realizados en nuestro laboratorio demuestran que la subunidad β de CK2 es exportada junto a la subunidad α , motivo por el cual para realizar nuestros estudios decidimos co-transfectar con CK2 α las proteínas quiméricas. Para ello se preparó una mezcla con un máximo de 4 μ g del DNA (cantidad previamente evaluada para llegar a una transfección óptima), DMEM y reactivo PLUS (Invitrogen) para placa de 60 mm. Esta mezcla se incubó por 15 minutos a temperatura ambiente, luego se le agregó DMEM con lipofectamina y se dejó incubar por otros 15 minutos. En ese lapso se retiró el medio completo de las células, se lavaron 2 veces con PBS y se les agregó DMEM. Transcurridos los 15 minutos se colocó la mezcla (DNA, lipofectamina, DMEM) y se esperó 4 horas para cambiar el DMEM por medio completo.

Luego de la transfección se esperaron alrededor de 20 horas. para dar tiempo a la expresión de las proteínas que codifican a partir del DNA transfectado y proceder a la recolección de las muestras.

5.2.5 RECOLECCIÓN DE MUESTRAS

Al transcurrir 20 horas post transfección se realiza la recolección de muestras, empezando por el retiro del medio condicionado de las placas, que dependiendo del diseño experimental se conserva en hielo. Posteriormente las células son lavadas dos veces con buffer-P (70 mM NaCl, 30 mM Tris-acetato pH 7.2, 5 mM acetato de magnesio, 5 mM K₂HPO₄, 0,5 mM EDTA y 75 mM glucosa) precalentado a 37° C. Para algunos ensayos estos lavados se realizaron con agitación suave a 37° C por 5 minutos y se conservaron en hielo. Luego se realizó la liberación selectiva de ectoproteínas quinasas (*shedding*), proceso diseñado por Kübler *et al.*, 1983. El *shedding* se realiza con una solución de fosvitina (1 mg/ml) en buffer-p en agitación suave por 15 minutos y a 37° C, la presencia de fosvitina produce la liberación selectiva de la ecto-CK2 que se encuentra unida a la superficie celular. Pasados los 15 minutos, se retira el líquido extracelular conteniendo la ecto-CK2 y junto con las muestras de medio condicionado y lavados realizados anteriormente son centrifugados a 2000 Xg durante 5 minutos a 4° C y luego se conserva el sobrenadante en hielo.

Al terminar el *shedding*, las células son lavadas una vez con PBS y luego se les agrega una solución de lisis (0,1% Nonidet P-40 en PBS) suplementada con un cóctel de inhibidores de proteasas (1/100). El producto de la lisis celular, suspendido en la solución de lisis, es agitado vigorosamente y luego se deja incubar por 30 minutos en hielo, posteriormente se centrifuga a 15000 Xg por 15 minutos a 4° C y se conserva el sobrenadante en hielo, y con un alicuota se determina la concentración de proteínas totales mediante el método de Bradford.

Inmunoprecipitación

Las muestras obtenidas anteriormente (líquido extracelular, lisado celular, medio de cultivo, lavados, entre otras) fueron dejadas en agitación suave a 4° C por toda la noche, en presencia de un anticuerpo (1-3 µg de anticuerpo/ml de muestra) que reconoce

específicamente la proteína en estudio. Al día siguiente se agregan a las muestras 20 μ l de proteína A conjugada con agarosa y se deja incubar por 4 a 5 horas más, luego de este tiempo las muestras son lavadas 4 veces con el *buffer* correspondiente (*buffer-p* para muestras del extracelular y *buffer* lisis para el lisado celular) posteriormente se lavan todas las muestras 2 veces con buffer quinasa (10 mM MgCl₂, 0,05 mM DTT y 2 mM Hepes pH 7,5) y se resuspende en 20 μ l de este mismo *buffer*.

5.2.6 ENSAYO DE ACTIVIDAD PROTEÍNA QUINASA

El ensayo de actividad quinasa se realizó en un volumen total 30 μ l, que contiene tampón quinasa (50 mM HEPES a pH 7,5–7,8; 10 mM MgCl₂; 0,5 mM DTT), 100 mM de NaCl, un péptido sustrato específico de CK2 (RRADDSDDDD) a una concentración de 200 μ M y un volumen de 5 μ l de la muestra inmunoprecipitada. La reacción se inicia con la adición de una solución de ATP que contiene [γ ³²P] ATP, con una actividad específica de 500-1000 μ Ci/ μ mol. La incubación será de 30 minutos (Rodríguez *et al.*, 2005). La radioactividad incorporada se determina por conteo en un sistema de centelleo líquido, mediante la utilización de papeles de fosfocelulosa P-81 (2 x 2 cm) con los cuales se detienen la reacción por absorción de la mezcla. Estos papeles se lavan 3 veces con ácido fosfórico (75 mM) y luego se secan y se colocan dentro de viales de vidrio con líquido de centelleo en base de tolueno, la radioactividad asociada a ellos se determina usando un contador de centelleo.

5.2.7 ENSAYO DE ACTIVIDAD GST

La medición de actividad de GST se realizó utilizando el ensayo descrito por Habig *et al.*, 1974. El método es espectrofotométrico, utilizando una longitud de onda de 340 nm con un sustrato estándar (1-cloro-2,4-dinitrobenzenu, CDNB) y un co-sustrato (glutación reducido, GSH), también para establecer la sensibilidad del método se probaron varias temperaturas, desde 20° C a 40° C. El incremento en absorbancia es directamente proporcional a la actividad de GST, al formarse un compuesto aromático, 1-(S-glutationil)-2,4-dinitrobenzenu (GS-DNB) en la muestra. Para este estudio, la medición de actividad

GST se realizó tanto en el Laboratorio de Farmacología en la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, donde se dispuso de un espectrofotómetro de cinética continua (ATI Unicam UV2), como en nuestro laboratorio (Shimadzu UV-150-02). Se utilizaron cubetas de cuarzo de 1 ml en las que se agregaban 500 μ l de una solución 2 mM de CDNB, 100 μ l de GSH 40 mM, las muestras tenían volúmenes variables dependiendo de su procedencia (extracelular o lisado) y completaremos el volumen con buffer fosfato 0,1 M a pH 6,5.

5.2.8 ANÁLISIS DE WESTERN BLOT

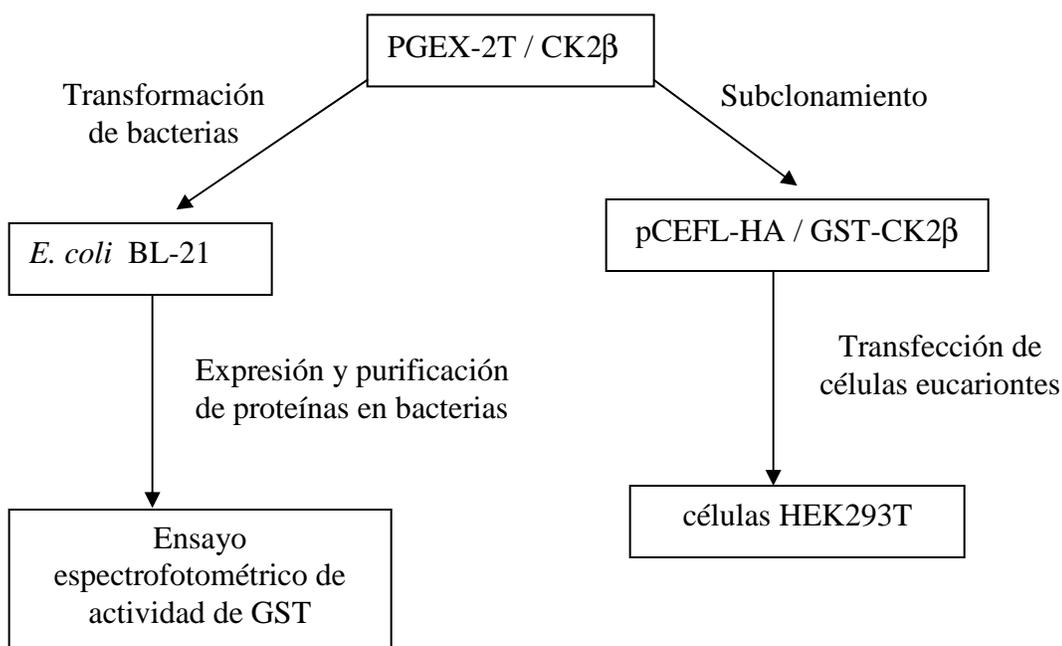
Las muestras inmunoprecipitadas fueron tratadas con solución denaturante de Laemmli suplementada con 2-mercaptoetanol y urea 7 M. A continuación las muestras fueron colocadas en baño térmico a 100° C durante 10 minutos. Luego las muestras fueron resueltas electroforéticamente a 100-200 Volts en un gel de SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE) al 10 o 12,5% de poliacrilamida dependiendo del peso molecular de la proteína de interés. Las proteínas separadas en el gel fueron transferidas electroforéticamente (350 mA / 80 min) a membrana de PVDF. Esta membrana fue incubada durante toda la noche a 4°C y con agitación suave en presencia de un anticuerpo primario que reconoce específicamente la proteína de interés. Los anticuerpos fueron preparados a la concentración recomendada por el proveedor en solución salina de Tris (TBS) suplementada con 0,05% de Tween 20 (TBS-T) y 5% p/v de leche descremada en polvo.

Al día siguiente la membrana fue lavada tres veces (15 min. / lavado) con TBS-T e incubada por 4-5 horas a 4° C con un segundo anticuerpo que reconoce al primero y que a su vez está conjugado a fosfatasa alcalina. Pasado este último periodo de incubación la membrana fue lavada tres veces (15 min. / lavado) con TBS-T y luego se reveló con el sistema *AP Conjugate Substrate Kit*.

6. RESULTADOS

Al comenzar este trabajo nos planteamos utilizar distintos vectores de expresión que nos contribuyeran con diferentes proteínas de fusión, las cuales nos ayudarían a detectar la exportación de éstas unidas a CK2 β . Uno de estos vectores fue el pGEX-2T, que por ser un vector de expresión en procariontes no podíamos utilizarlo directamente en la expresión en células eucariontes (por lo que fue subclonado), pero fue utilizado para la expresión de la proteína GST-CK2 β en bacterias *Escherichia coli* BL-21. La transformación de estas bacterias y la posterior purificación de la proteína recombinante fueron realizadas en nuestro laboratorio. La proteína purificada se usó para comprobar la validez del ensayo espectrofotométrico de actividad de GST utilizando la construcción antes mencionada.

Esquema de la utilización de vectores.



6.1. APLICACIÓN DEL MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO PARA MEDIR ACTIVIDAD CATALÍTICA DE GLUTATIÓN-S-TRANSFERASA (GST), UTILIZANDO LA PROTEÍNA RECOMBINANTE GST-CK2 β .

Para comprobar la sensibilidad del ensayo de la actividad catalítica de GST *in vitro*, se purificó la proteína de fusión GST-CK2 β , la cual se utilizó el ensayo clásico espectrofotométrico para GST-CK2 β descrito en Materiales y Métodos. Primero se determinó la temperatura y el tiempo óptimos para medir la actividad de GST, probando desde los 20°C hasta los 40°C con intervalos de tiempo de 5 a 60 minutos. Los resultados arrojaron que los valores óptimos son 30°C y 45 minutos, respectivamente. Bajo estas condiciones se realizó un estudio para determinar la cantidad mínima de proteína necesaria en solución para detectar actividad de GST. Como se muestra en la figura 1, la concentración mínima de GST-CK2 β que permite detectar su actividad, usando un volumen mínimo permitido por el espectrofotómetro, fue de 1 pmol/ μ l. En base a experimentos previos del laboratorio nos percatamos que la sensibilidad del método espectrofotométrico de análisis de la actividad de la enzima era uno o dos órdenes de magnitud menor que los métodos de inmunodetección o ensayos de actividad enzimática utilizando sustratos radiactivos. Se ha visto en este laboratorio que la concentración de proteínas que se han obtenido al analizar lisados y líquido extracelular de células transfectadas (Rodríguez *et al.*, 2005) es a nivel de femtomoles. Este resultado nos obligó a descartar el ensayo espectrofotométrico de actividad de GST como método de detección de exportación de GST-CK2 β .

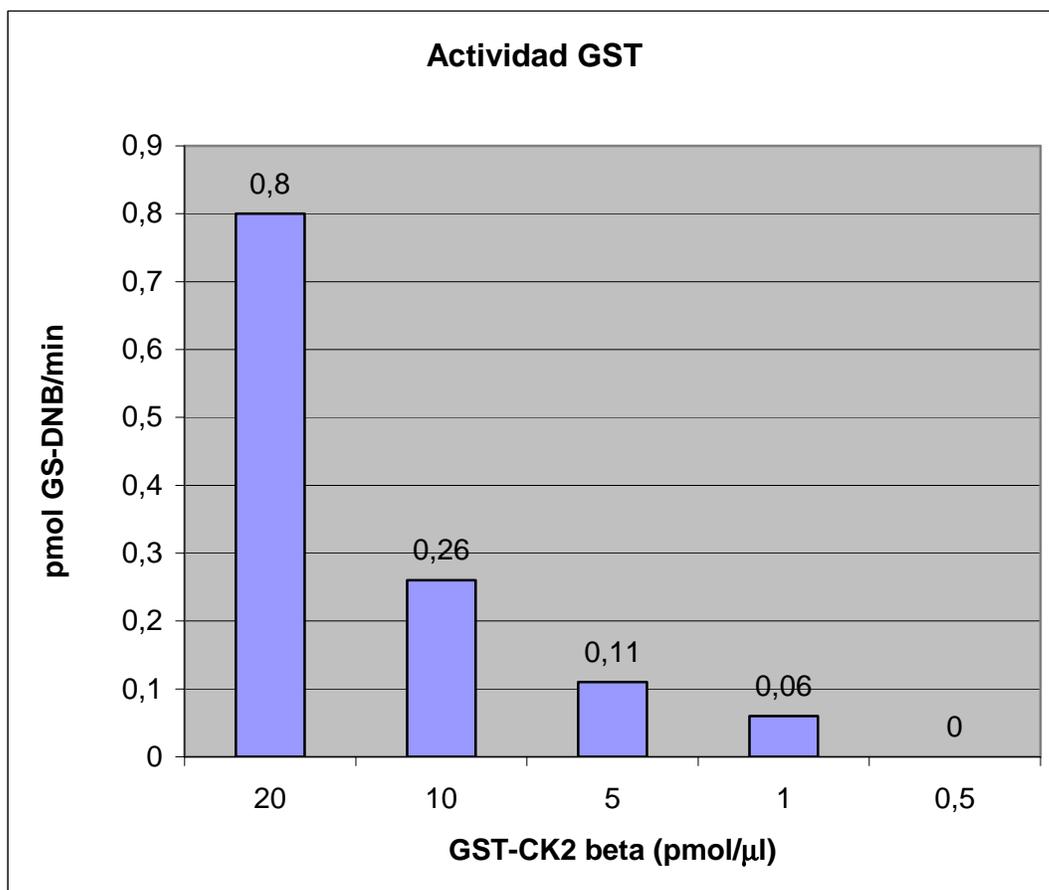


Figura 1. Las barras muestran la cantidad de producto (GS-DNB) obtenido en la reacción catalizada por GST-CK2 β utilizando CDNB y GSH como sustratos, a 30° C por 45', usando el ensayo espectrofotométrico de medición de actividad de la glutatión-s-transferasa.

6.2. EXPRESIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE PROTEÍNAS DE FUSIÓN QUE COMPRENDEN LA PROTEÍNA QUINASA CK2 β .

Un punto muy importante para comenzar con los estudios de exportación de esta tesis fue la construcción de un vector de expresión que incorporara la secuencia codificante de la CK2 β en el marco de lectura de la secuencia codificante de otra proteína específica o de un fragmento proteico "marcador". El constructo recombinante fue diseñado para utilizarlo en la transfección de células eucarióticas en cultivo. Los vectores y los tipos de proteínas de fusión fueron elegidos en relación con los objetivos que nos planteamos, específicamente de determinar si el(los) vector(es) mostraría(n) una alta eficiencia de expresión en las células en cultivo y si la unión covalente entre la subunidad CK2 β y los marcadores elegidos permitiría la detección de una proteína de fusión en estas células transfectadas, utilizando metodologías específicas y sensibles. Entre las proteínas marcadoras seleccionadas para unir a la CK2 β en estos estudios se encuentran:

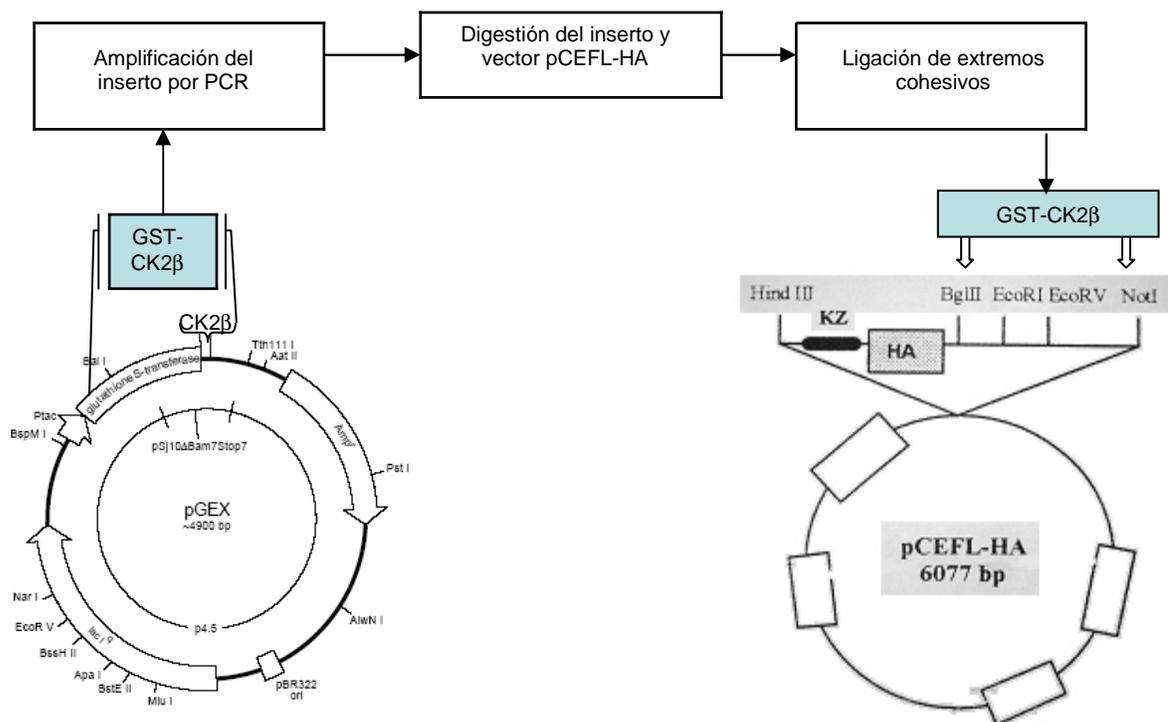
1. La proteína glutation-S-transferasa, (GST), una enzima con características de estabilidad y alta actividad enzimática en tejidos que sugiere que se podría medir su presencia en extractos de células transfectadas. La proteína de fusión GST-CK2 β usada lleva además el epítotope HA (de hemoaglutinina), aportado por el vector que se denominará en este trabajo como **GST-CK2 β** .

2. La proteína de fluorescencia verde del inglés *green fluorescent protein* (GFP), extraída del invertebrado marino *Aequorea victoria*, muy usada como marcador en biología molecular y celular. El DNA que codifica para la proteína de fusión de GFP/CK2 β , el cual fue usado en estos estudios, se encontraba disponible en nuestro laboratorio y lo denominaremos **GFP-CK2 β** .

3. Un tercer marcador que se utilizó contiene un fragmento de 6 copias de un segmento amino terminal de la proteína oncogénica Myc, inserto en un vector río arriba de la secuencia codificante de GST-CK2 β de la misma manera descritas para los otras proteínas de fusión. Este vector fue propuesto debido a su fuerte señal, pero los resultados fueron ambiguos probablemente por el mal funcionamiento de la inmunodetección, por lo que descartamos seguir utilizándolo.

Construcción de los vectores con proteínas de fusión. En nuestro laboratorio se disponía de un vector de expresión en procariontes (pGEX-2T) en el cual ya se había clonado la secuencia que codifica para CK2 β de *Xenopus laevis* (Hinrichs *et al.*, 1993). Las proteínas clonadas en este vector se expresan fusionadas a la proteína de 27 kDa glutatión-S-transferasa (GST) en su extremo amino terminal, es decir "GST-CK2 β ." Como vector de expresión en eucariontes se escogió el vector pCEFL-HA que le confiere a las proteínas expresadas el epítoto de 2 kDa de Hemoaglutinina (HA) fusionado en el extremo amino-terminal. Este fragmento permite la detección de la proteína recombinante en extracto celulares por inmunoprecipitación e inmunoblot (análisis *western*). La figura 2 muestra el esquema de los vectores y la estrategia utilizada mediante técnicas de biología molecular para subclonar GST-CK2 β en pCEFL-HA obteniendo como resultado el vector portador del gen que codifica para la proteína HA-GST-CK2 β . Los detalles del método de clonamiento se encuentran en Materiales y métodos.

A.



B.

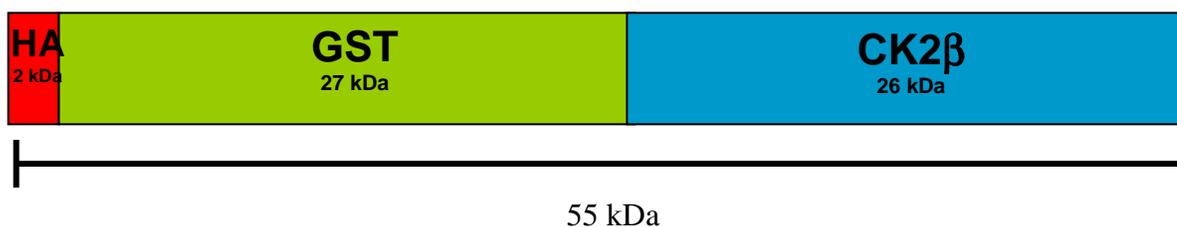


FIGURA 2. Subclonamiento de GST-CK2 β en un vector de expresión eucariótica pCEFL-HA.

(A) Esquema del subclonamiento desde el vector pGEX-2T de procariontes al vector pCEFL-HA. La estructura triangular sobre el vector pCEFL-HA indica el sitio de subclonamiento que adiciona en marco de lectura de la proteína de fusión la secuencia HA que sirve de epítipo para inmunoprecipitaciones y análisis Western. (B) Esquema de la proteína de fusión de 55 kDa resultante de la expresión en el vector pCEFL-HA. Los tamaños de los distintos polipéptidos que conforman esta proteína están a escala.

Análisis de vector HA-GST-CK2 β por PCR. Para confirmar que el fragmento del gen de fusión en el vector de eucariontes era del tamaño esperado, se analizó usando la técnica de PCR. En la figura 3 se observa una electroforesis de DNA en un gel de agarosa al 1 % efectuado para analizar los productos de PCR de varias colonias bacterianas transformadas con el vector pCEFL-HA, lo que permitió comprobar la presencia de colonias positivas a la transformación. Como se obtuvo varias colonias positivas se escogió la n° 11 para los experimentos posteriores de transfección celular, a partir de esta colonia se purificó el DNA plasmidial, el cual fue verificado en geles de agarosa mediante análisis de restricción confirmando la presencia del gen esperado en el vector, además el DNA fue verificado por secuenciación. Este DNA se utilizó en los experimentos de transfección en células HEK293T con HA-GST-CK2 β .

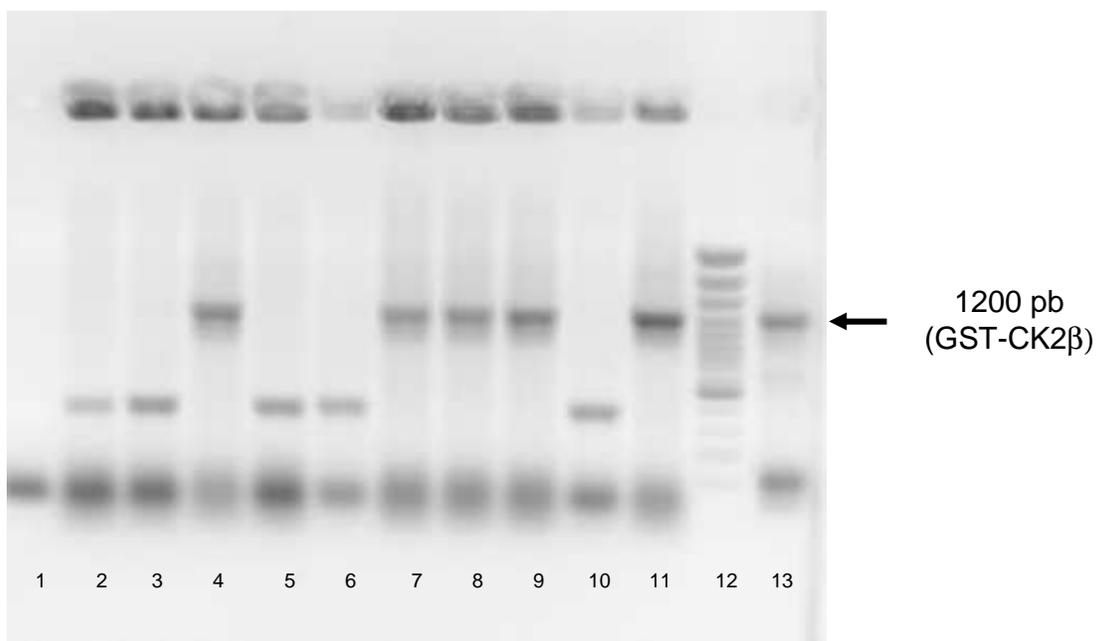


FIGURA 3. Electroforesis de DNA en un gel de agarosa.

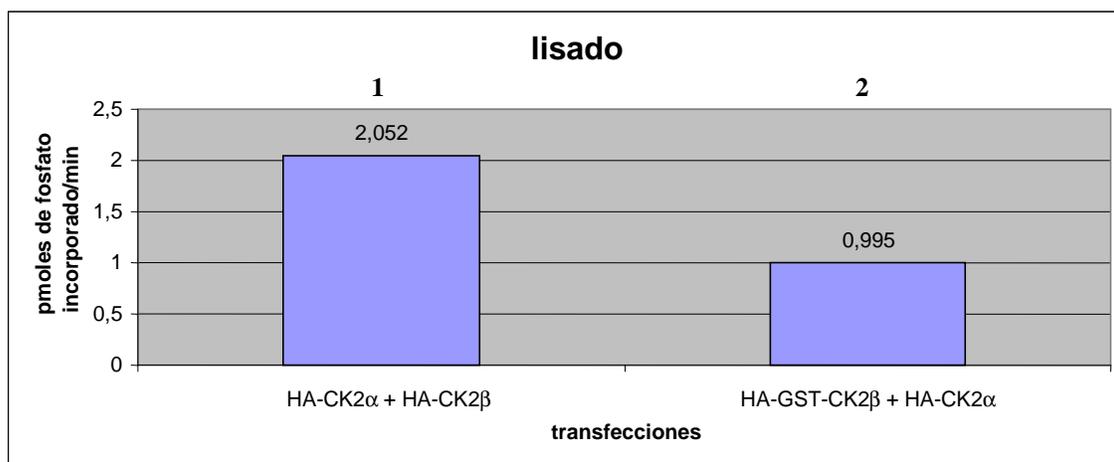
Cada uno de los carriles corresponde al resultado del PCR efectuado a diferentes colonias bacterianas transformadas con el vector en el que se subclonó el DNA de GST-CK2 β . Se puede distinguir que las colonias 4, 7, 8, 9, 11 y 13 fueron positivas, ya que presentan una banda de DNA amplificado del tamaño esperado de acuerdo a los partidores utilizados, que corresponde al tamaño del gen (1200pb, ver flecha). El carril 12 muestra el marcador de tamaño de DNA.

6.3. DETERMINACIÓN DE LA EXPORTACIÓN DE LA PROTEÍNA DE FUSIÓN HA-GST-CK2 β MEDIANTE ENSAYO DE ACTIVIDAD QUINÁSICA.

Este estudio se inició analizando la exportación de la proteína glutathion-S-transferasa fusionada a CK2 β . Para poder determinar la exportación de HA-GST-CK2 β mediante el ensayo de actividad quinásica, es necesario co-transfectar con CK2 α , ya que esta es la subunidad catalítica, que proporciona la ventaja de utilizar ^{32}P como sustrato, permitiendo así un aumento notable en la sensibilidad de detección de la actividad enzimática. Es importante recalcar, que todas las muestras (tanto de líquido extracelular como de lisado de células) fueron inmunoprecipitadas con anticuerpos específicos (anti-HA), lo que nos asegura que los valores medidos sean exclusivamente de proteínas producidas a partir de los DNAs transfectados y no de la CK2 endógena. Además, la inmunoprecipitación y posterior centrifugación de la muestra, permite concentrar la proteína en un volumen mínimo, aumentando la posibilidad de detectar actividad enzimática. En la figura 4 podemos ver dos gráficos que muestran la medida de la actividad quinásica de CK2. La figura 4A corresponde a los resultados de actividad obtenidos en el lisado de células transfectadas y la figura 4B corresponde a la medición realizada al líquido extracelular de estas mismas células. En la figura 4A podemos ver que la muestra control (muestra 1), que corresponde a la co-transfección de HA-CK2 α y HA-CK2 β , que presenta 2.05 picomoles de fosfato incorporado al sustrato específico de CK2 por minuto de incubación con ATP- γ - ^{32}P . En 4B, la muestra control (muestra 1) del líquido extracelular presenta 0,08 picomoles de fosfato incorporado por minuto de incubación, lo que nos indica que en el caso del control la actividad en el líquido extracelular sería de un 3,6% respecto del lisado de estas mismas células, lo que concuerda con estudios de exportación realizados en este mismo laboratorio y utilizando el mismo sistema de análisis en cultivo (Rodríguez *et al.*, 2005). En las muestras experimentales representadas en ambas figuras por el n° 2, podemos ver que en 4A la co-transfección de HA-GST-CK2 β con HA-CK2 α presenta una magnitud de alrededor de 1,0 picomoles de fosfato incorporado por minuto de incubación, lo que nos demuestra que si existió transfección exitosa. En 4B la muestra n° 2 no presenta actividad detectable.

Este resultado nos indica que la transfección de las células y las inmunoprecipitaciones dieron resultado como lo esperado en la expresión y concentración de las proteínas exógenas en formas activas. Es notable que existen significativas diferencias de actividad entre el sistema control (muestra 1) respecto de la muestra 2 de la proteína de fusión. Por el contrario, en la parte B. de la figura, vemos que la muestra 2 que corresponden a HA-GST-CK2 β co-transfectadas con HA-CK2 α no presentó actividad quinásica en circunstancias que la muestra control (muestra 1) sí la presenta y de una magnitud similar a las obtenidas en trabajos previos realizados en nuestro laboratorio, en el caso del líquido extracelular se espera entre 0,03 a 0,04 picomoles de fosfato incorporado por minuto basándose en la exportación usual de 3-4%, cantidad que está dentro del rango de medición de este ensayo (Rodríguez *et al.*, 2005).

A.



B.

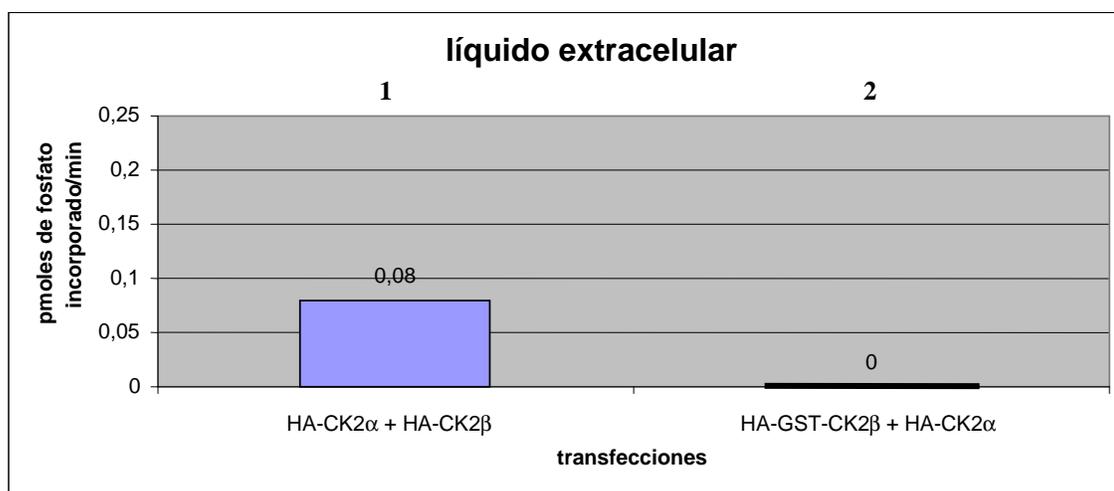


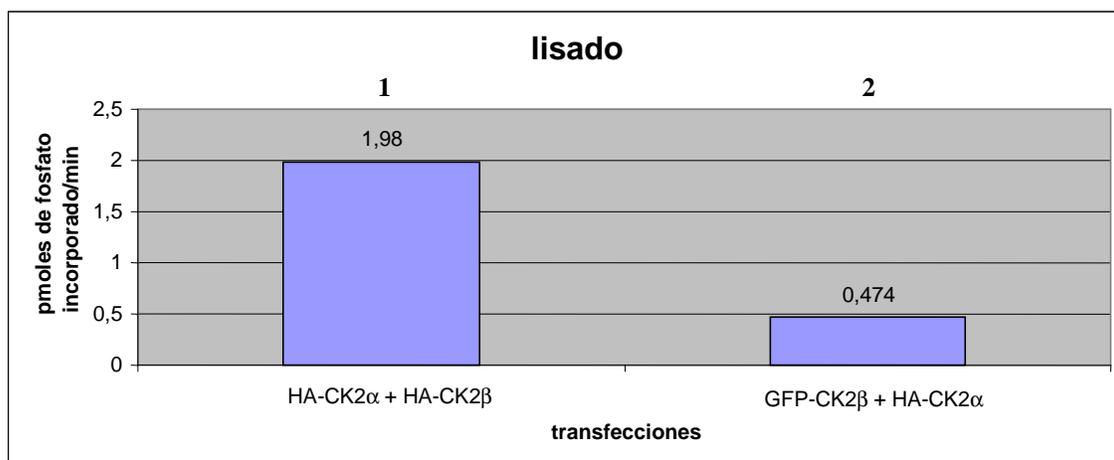
Figura 4. (A) Representa la actividad de CK2 medida en el lisado celular. (B) Representa la actividad de CK2 medida en el líquido extracelular. Las columnas representan la actividad de CK2 medida en pmoles de ^{32}P incorporado por minuto al péptido sustrato específico de CK2. Todas las muestras fueron inmunoprecipitados con anti-HA (monoclonal). Hay que destacar que la escala de actividad usada en (B) es 10 veces menor a la usada en (A).

6.4. DETERMINACIÓN DE LA EXPORTACIÓN DE LA PROTEÍNA DE FUSIÓN GFP-CK2 β MEDIANTE ENSAYO DE ACTIVIDAD QUINÁSICA.

Considerando los resultados negativos obtenidos con la subunidad CK2 β unida a la proteína GST (glutación-S-transferasa) en el sentido que no se logró apreciar la exportación de esta proteína de fusión al medio extracelular de células HEK293T, se utilizó a continuación otra proteína de fusión a CK2 β , en este caso se eligió a la proteína verde fluorescente **GFP-CK2 β** para determinar si esta proteína podría servir mejor como proteína de fusión a CK2 β . Por estudios anteriores en este laboratorio ya se disponía de CK2 β insertada en el vector pEGFP-C1. En la Figura 5 se observa que tampoco se detectó exportación al medio extracelular con GFP-CK2 β , a pesar de tener una buena cantidad de esta proteína de fusión en el lisado celular. Aquí podemos nuevamente comparar las muestras 1 de los dos gráficos (A y B). La muestra control (HA-CK2 α /HA-CK2 β) del líquido extracelular es alrededor de un 3% de la muestra control del lisado lo que concuerda con los estudios realizados en este laboratorio. A su vez, las muestras experimentales repiten el patrón mostrado para la proteína de fusión HA-GST-CK2 β , presentando 0,474 picomoles de fosfato incorporado por minuto de incubación en el lisado, lo que nos llevó a pensar que encontraríamos 0,015 picomoles de fosfato incorporado por minuto (3%) en el líquido extracelular, pero no se detecta actividad (figura 5B, muestra 2).

La nula actividad medida en las muestras correspondientes a la co-transfecciones de las proteínas de fusión con HA-CK2 α (muestras experimentales) nos sugiere que HA-GST-CK2 β y GFP-CK2 β no estarían siendo exportadas a la superficie celular.

A.



B.

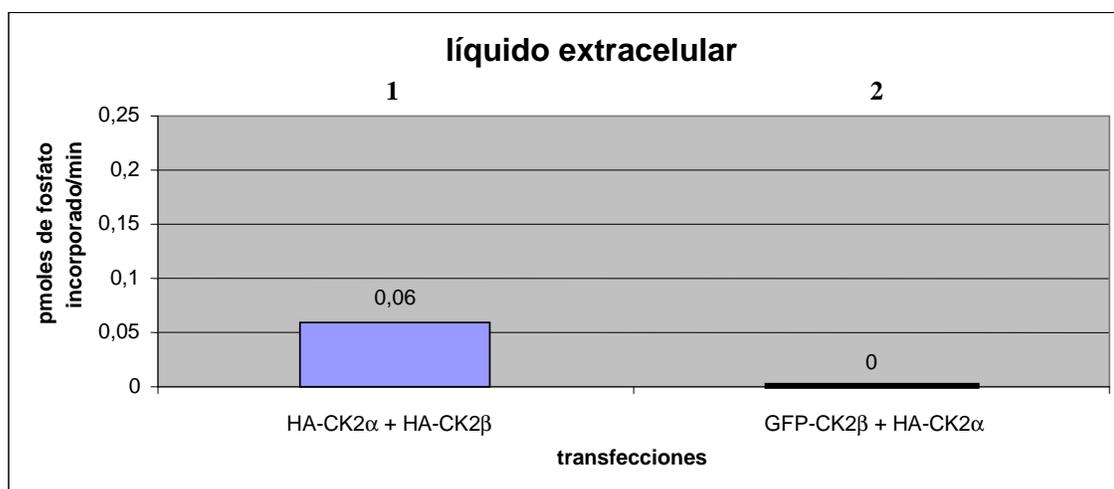


Figura 5. (A) Representa la actividad de CK2 medida en el lisado celular. (B) Representa la actividad de CK2 medida en el líquido extracelular. Las columnas representan la actividad de CK2 medida en pmoles de ^{32}P incorporado por minuto al péptido sustrato específico de CK2. En ambas figuras las muestras 1 fueron inmunoprecipitadas con anti-HA (monoclonal) y las muestras 2 con anti CK2 β (monoclonal). Hay que destacar que la escala de actividad usada en (B) es 10 veces menor a la usada en (A).

6.5. DETERMINACIÓN DE LA EXPORTACIÓN DE PROTEÍNAS QUIMÉRICAS MEDIANTE INMUNOPRECIPITACIÓN Y ANÁLISIS WESTERN.

Para corroborar los resultados obtenidos anteriormente midiendo la actividad catalítica de CK2, introducimos un método adicional para la detección de las proteínas de fusión en el medio extracelular con el fin de aumentar la sensibilidad de detección. Con este propósito se empleó el análisis de *western blot* con las muestras inmunoprecipitadas de lisados y del líquido extracelular.

La figura 6 corresponde a un *western blot* revelado contra el epítotope HA utilizando un anticuerpo anti-HA monoclonal con las muestras que habían sido inmunoprecipitadas anteriormente con un anticuerpo anti-HA policlonal. Se observa que sólo en el lisado celular se revelan las bandas de las proteínas transfectadas. En el carril 1 no se observan bandas, ya que es el control con el vector vacío. En el carril 2 se pueden ver 2 bandas, una de alrededor de 43 kDa que correspondería a HA-CK2 α y otra banda de 26 kDa que correspondería a HA-CK2 β , en tanto en el carril 3 podemos ver 2 bandas una que correspondería a HA-GST-CK2 β de 53 kDa aproximadamente y otra banda más intensa de alrededor de 43 kDa que correspondería HA-CK2 α . En el carril 4 se visualiza una banda de alrededor de 53 kDa que correspondería a HA-GST-CK2 β , lo que se esperaba debido a que estas células sólo se transfectaron con esta proteína de fusión.

Con respecto a los resultados al analizar el líquido extracelular podemos decir que, a pesar que el *western blot* es un método que tiene una sensibilidad muy alta de detección (alrededor de 0,1 pmol de proteína) y al hecho que en nuestro laboratorio ha sido posible ver HA-CK2 β en el líquido extracelular mediante *shedding*, nosotros no pudimos detectar GST-CK2 β ni GFP-CK2 β (5 y 6). En el líquido extracelular de la figura 6 (carriles 6 a 9) sólo se observa una tenue banda de alrededor de 43 kDa (carril 7) que correspondería a HA-CK2 α , la que junto con HA-CK2 β sería parte del control positivo. Tomando en cuenta la diferencia de cantidades entre las bandas de HA-CK2 α y HA-CK2 β (alrededor de 20 veces) del lisado correspondiente (carril n° 2) sería difícil encontrar la banda de HA-CK2 β en el líquido extracelular.

La figura 7 muestra el *western blot* realizado con las muestras obtenidas como resultado de la transfección celular utilizando GFP-CK2 β . Como se ve, los carriles 1 y 2 fueron tratados con el anticuerpo primario anti-HA distinto al utilizado en los carriles 4 a 7, que fue anti-GFP. En los carriles 1 y 2 no se observa CK2 β , ya que el marcador utilizado esta vez (Myc) es distinto al de CK2 α (HA).

En los carriles 4 a 7, al igual que utilizando GST-CK2 β (figura 5) sólo fue posible detectar la presencia de GFP-CK2 β de 52 kDa en el lisado, pero no en el líquido extracelular. Por lo tanto, los resultados obtenidos por *western blot* como los obtenidos midiendo actividad de CK2 sugieren fuertemente que la subunidad CK2 β fusionada a las proteínas Glutación-S-Transferasa (GST) o Proteína Fluorescente Verde (GFP) no son exportadas hacia la superficie celular.

Respecto la recuperación de proteínas en este análisis de *western blot*, se observa en carril 2 (control positivo) que las cantidades de CK2 α y β son similares pero siempre hay 2-3 veces exceso de ck2 α sobre β y este refleja la inestabilidad de CK2 β en el sistema celular. En carril 3 se ve las bandas de CK2 α (43 kDa) y de la proteína de fusión GSH-CK2 β 55 kDa donde la banda de α es muchas veces más fuerte que la de CK2 β . Esto podría reflejar una disminución de la expresión de CK2 β o un aumento en la velocidad de degradación de esta proteína en los extractos. Ambos cambios resultarían en una disminución de la actividad quinásica en estos lisados cuando se transfecta con la proteína de fusión, como se observa en Figura 4.

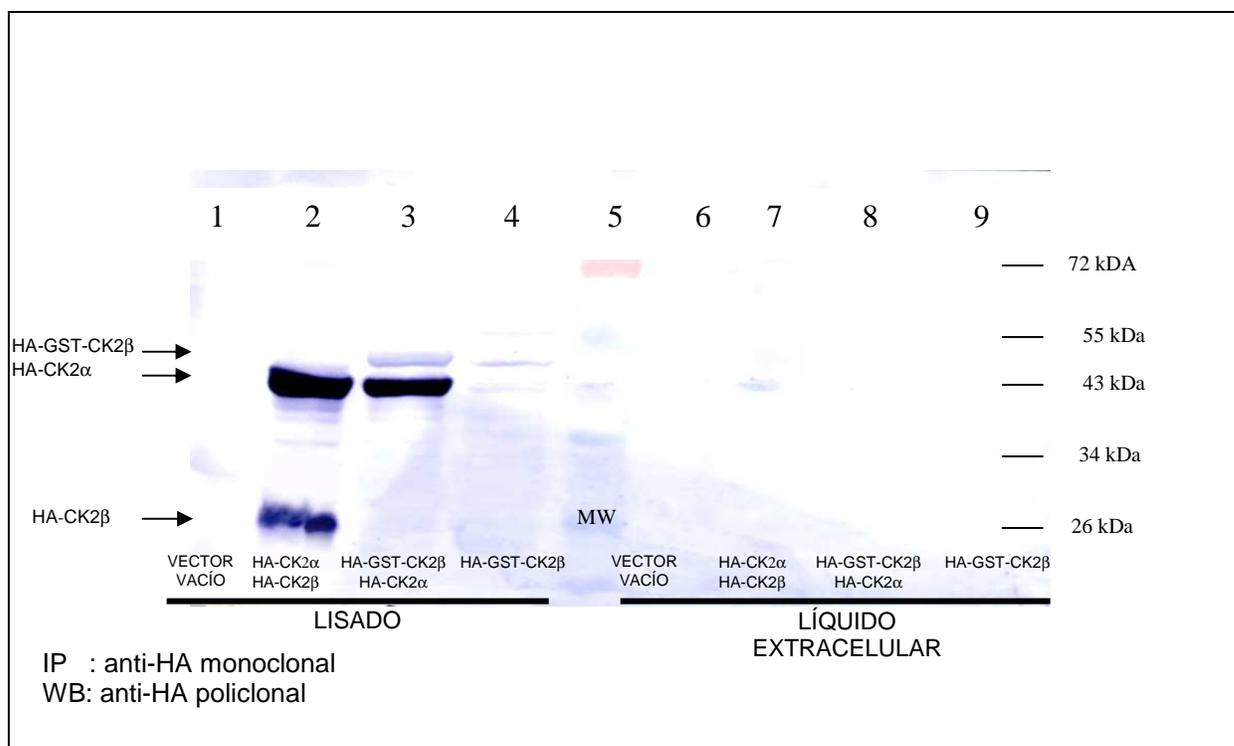


Figura 6. Inmunodetección de proteínas expresadas producto de la transfección de células HEK293T.

Los carriles 1 a 4 corresponden a la inmunodetección de proteínas en el lisado celular, el carril 5 corresponde al marcador de peso molecular y los carriles 6 a 9 corresponden al inmunodetección en el líquido extracelular. Todas las muestras fueron previamente inmunoprecipitadas y concentradas por centrifugación.

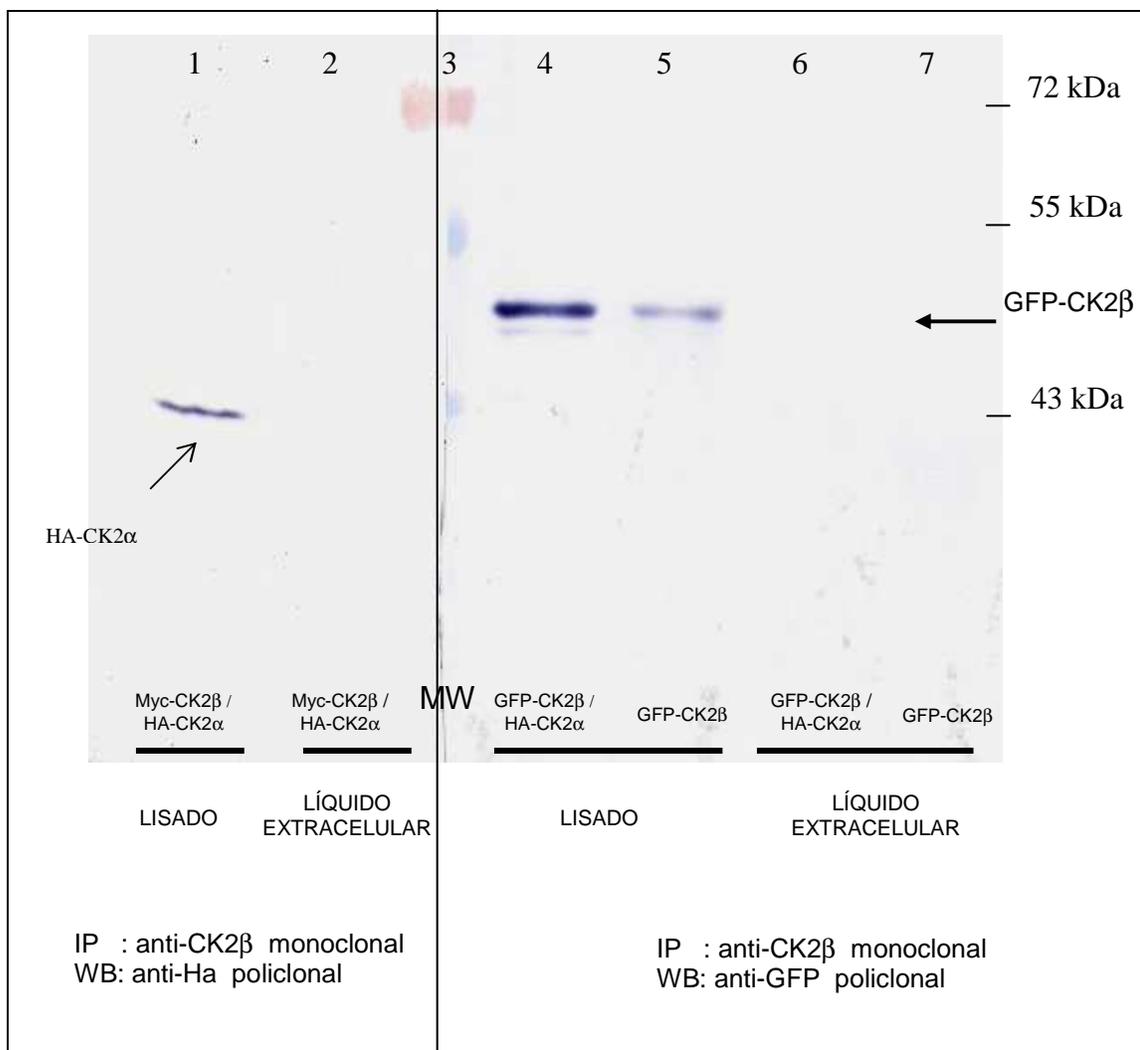


Figura 7. Inmunodetección de proteínas expresadas producto de la transfección de células HEK-293T. Los carriles 1 y 2 corresponden a la inmunodetección de proteínas tanto en del lisado celular (carril 1) como del líquido extracelular (carril 2) que fueron inmunoprecipitados con el anticuerpo Anti-CK2 β y en el western blot fueron tratadas con Anti-HA como anticuerpo primario. Los carriles 4 al 7 en el western blot con Anti-GFP como anticuerpo primario.

7. DISCUSIÓN

Existen numerosos trabajos que evidencian la presencia de proteínas quinasas en la superficie externa de la célula. Estas “ectoquinasas” tendrían un papel fundamental en la fosforilación de proteínas de la superficie externa de las células, fenómeno probablemente relacionado con procesos tales como la interacción célula-célula, migración celular y adhesión a la matriz extracelular.

Los primeros datos obtenidos de estudios relativos a la presencia de actividad ectoquinasa en la superficie celular y la liberación de esta actividad ectoquinasa en respuesta a sustratos, hicieron considerar a la proteína quinasa CK2 dentro de las ectoquinasas. En 1987, Pyerin *et al.*, caracterizó a CK2 como ectoquinasa a partir de un estudio realizado en la superficie externa de células HeLa. Posteriormente Walter *et al.*, 1996 confirmaron este resultado y caracterizaron la CK2 exportada en más detalle. Es importante recalcar que en todos estos estudios, realizados antes del año 2005, los análisis se basaron en la ectoquinasa CK2 endógena y como consecuencia, tuvieron como limitante la pequeña cantidad de quinasas presente en el exterior de las células.

Los estudios de Rodríguez del laboratorio de Biología Celular de Transducción de Señales Celulares, (Rodríguez *et al.*, 2005, 2008) se distinguen de los anteriores realizados en otros laboratorios por el uso de células en cultivo, transfectadas con los genes codificantes para las proteínas recombinantes: CK2 α y CK2 β . Esta técnica permite aumentar la expresión de la quinasa lo que facilita la capacidad de detectar la proteína exportada por otros métodos. Las proteínas transfectadas poseen una etiqueta o epítipo que permite reconocerla por medio de anticuerpos específicos e inmunoprecipitarla, así diferenciarla de las endógenas. Por todas estas razones se utilizó este mismo método en los experimentos realizados en este trabajo.

Los estudios recientes realizados en nuestro laboratorio (Rodríguez *et al.*, 2005, 2008) han enfocado muchos aspectos generales del fenómeno de exportación de CK2 α , pero hasta la fecha, no han determinado varios otros aspectos importantes sobre el(los) mecanismo(s) de exportación. Por ejemplo, no es claro cómo la proteína llega a la membrana desde el citosol, cómo atraviesa la membrana misma, cómo se ancla a la membrana, y cuáles son los eventos posteriores a la liberación mediada por un sustrato

específico. Estas preguntas nos demuestran que aún sabemos poco sobre el proceso de formación y exportación de la ectoquinasa CK2. Estas preguntas tampoco han sido analizadas para otras ectoquinasas como las proteínas quinasa dependiente de cAMP o la proteína quinasa PKC.

Investigaciones realizadas en los últimos cuatro años en nuestro laboratorio, demuestran que la exportación de la proteína quinasa CK2 de las células en cultivo requiere de ambas subunidades, CK2 α y CK2 β . En otras palabras, la subunidad regulatoria CK2 β es esencial para la exportación de la subunidad catalítica CK2 α . Por otro lado células transfectadas con el gen de la subunidad regulatoria CK2 β sola, sin CK2 α , son capaces de exportar a CK2 β , pero la proteína no queda unida a la membrana sino que sale al medio extracelular, y en esta característica difiere de las ectoquinasas estudiadas hasta ahora que se liberan de la membrana solamente con la adición de un sustrato específico (*shedding*).

Estos antecedentes generales y los resultados obtenidos recientemente en el laboratorio, junto al conocimiento de las múltiples interacciones de CK2 β con diversas proteínas celulares (Allende y Allende., 1998, Bibby y Litchfield., 2005) impulsaron el estudio de la posible exportación de otras proteínas unidas covalentemente a la subunidad CK2 β . Es decir, nos motivó estudiar la capacidad de CK2 β recombinante de exportar otras proteínas por medio de la expresión de una proteína de fusión. Esta posibilidad de ubicar una proteína en la membrana exterior de una célula y liberarla específicamente por *shedding* usando un sustrato de CK2 sería de mucho interés para realizar diferentes estudios sobre la regulación de proteínas extracelulares.

El estudio de selección de una proteína para fusionar con CK2 β se inició con la definición de las propiedades necesarias para este propósito:

- que no interactúe con CK2 α ni con CK2 β ,
- que fuese de bajo peso molecular,
- que posea una forma distintiva para identificarla

La primera proteína elegida para este estudio fue la glutatión S-transferasa (GST) porque cumple con varias de las exigencias indicadas arriba, menos la última, la capacidad de participar en forma pasiva en la exportación, que quedaba para comprobar experimentalmente en este trabajo.

Inicialmente un factor importante en elegir GST se relacionaba con el hecho que GST posee una actividad enzimática y es una enzima estable en solución. Como se indica en la sección de RESULTADOS, a pesar de lograr medir una buena actividad enzimática de GST usando la proteína de fusión GST-CK2 β recombinante, este método no resultó ser lo suficientemente sensible para los propósitos de este trabajo. Por ello se utilizaron otros métodos, específicamente el ensayo de actividad de la CK2 α co-exportada utilizando un sustrato radioactivo (ATP- γ -³²P) e *immunoblotting*. La sensibilidad del ensayo de actividad quinásica ya había sido comprobada para medir pequeñas cantidades en el medio extracelular mediante *shedding*. Así, se logró demostrar que las células HEK293 co-transfectadas con GST-CK2 β y CK2 α expresaron estas proteínas, comprobado por la medición de la actividad enzimática de CK2 α y la observación de la proteína de fusión usando análisis de *western blot* en el lisado. Posteriormente al realizar el proceso de *shedding*, no se detectó actividad de CK2 α ni evidencia de la proteínas fusión por *western blot* en el medio extracelular. Es decir, esta proteína de fusión no logra salir de las células aunque esté presente en cantidades apreciables en el citosol.

Uno de las propiedades de GST es la capacidad de formar dímeros (Tudyka y Skerra, 1997) y, como se ha indicado anteriormente, la CK2 β también forma dímeros muy estables en presencia o ausencia de la subunidad catalítica CK2 α . Es posible que esta propiedad de formar dímeros de ambos componentes de la proteína de fusión afecte negativamente la capacidad de CK2 β de estructurarse en la forma requerida para dirigirse al sistema de exportación (unirse a proteínas de membranas específicas o vesículas transportadoras). En Figura 8 se muestra las estructuras obtenidas por cristalografía de CK2 como holoenzima y un modelo estructural de la proteína de fusión diseñado para este trabajo donde se muestra en forma clara la probabilidad de que la proteína de fusión no permita interacciones con otros compuestos celulares y en esta forma explicaría la falta total de exportación que observamos experimentalmente.

El uso de otra proteína de fusión, la GFP-CK2 β dio resultados similares a GST-CK2 β . Se logró medir su presencia en lisados celulares cuando se co-transfectaron células HEK293T con GFP-CK2 β y CK2 α , mediante el ensayo de actividad para la subunidad catalítica y por *western blot*, pero no se detectó actividad o proteína en el medio

extracelular. La proteína GFP no forma dímeros en solución como el caso de la GST pero tiene una forma cilíndrica (como un espiral sobre un barril) que también podría alterar el acceso de proteínas de transporte a CK2 β .

Ambos sistemas diseñados para la expresión de proteínas de fusión en este trabajo dieron resultados positivos en cuanto a lograr detectar la expresión de los genes transfectados como proteínas activas y regulables en los lisados celulares. Los resultados sugieren que la limitación principal de ambos sistemas es la incapacidad de las proteínas fusionadas de generar una estructura apropiada a la subunidad CK2 β que pueda reconocer la maquinaria celular de exportación (la cual no se conoce para CK2).

Es importante notar que otros investigadores han logrado usar proteínas de fusión con GST donde se mantiene la actividad biológica de ambos componentes de la construcción (Smith y Johnson, 1988). En el trabajo de Tudyka y Skerra anteriormente citado, los investigadores logran ver la secreción de GST-cistatina hacia el periplasma de *E. coli*, también conservando su actividad biológica de cistatina y la estructura dimérica de GST. En este trabajo el diseño del vector usado para la expresión en bacteria tenía un "espaciador" de 5 moléculas de glicina entre las secuencias aminoacídicas de las dos proteínas usadas. El vector usado en este trabajo expresa un segmento de 10 aminoácidos (LVPRGSPGIH) entre GST y CK2 β . Este segmento tiene dos prolinas, las cuales son aminoácidos desorganizadores de hélices α e introduce dobleces en las cadenas polipeptídicas. Estos dobleces, en el segmento entre las proteínas GST y CK2 β , podrían favorecer el acercamiento o plegamiento de las dos proteínas y resultar en la formación de una estructura voluminosa. Es posible que, como en el caso citado anteriormente, un inserto de 5 glicinas (aminoácido que tiene solamente hidrógeno en el carbón α), diera una separación más rígida entre las proteínas fusionadas para mantener su propia conformación estructural nativa, sin permitir interacciones entre ellas.

Un posible defecto adicional en el sistema de subclonamiento usado, es el hecho que en ambos casos, la unión de GST o GFP a subunidad CK2 β fue por el extremo amino terminal de CK2 β . Los estudios de cristalografía demuestran que la interacción de CK2 β con la CK2 α es principalmente por el extremo carboxílico de CK2 β y esta interacción es flexible y extendida. Por otro lado, la región amino terminal de CK2 β está orientada hacia el solvente (ver figura 8 A. y D.). Se podría especular que la mayor superficie de CK2 β en

el amino-terminal se encuentra expuesta normalmente para otras interacciones (Allende y Allende 1995), lo que apoya en papel de CK2 β en el traspaso por la membrana plasmática por medio de interacciones con proteínas de membrana. Sería interesante realizar estudios en los cuales la proteína de fusión fuera construida con la subunidad CK2 β fusionada por su extremo carboxi-terminal y donde la unión entre ambas proteínas sea con un espaciador o "*linker*" de 5 o más glicinas.

Independiente de estos aspectos estructurales ya mencionados, algunas posibles causas de las observaciones negativas en relación con la exportación de CK2 β están indicadas a continuación.

Antecedentes previos sobre la estabilidad de CK2 β en células en cultivo demuestran que CK2 β es mucho más estable formando parte del tetrámero. Esto se relaciona con una secuencia de ubiquitinación presente en CK2 β (llamada por algunos autores "caja de destrucción"), por lo cual se degrada por el proteosoma celular (Zhang *et al.*, 2002). Es decir, CK2 β tiene un alto recambio (degradación y re-síntesis) en las células estudiadas y es posible que la degradación sea aún mayor en la proteína de fusión por tener su estructura alterada. Un aumento en el proceso de degradación explicaría también los bajos niveles de actividad de CK2 α en los lisados obtenidos usando ambas proteínas de fusión en lugar de CK2 β normal. La actividad quinásica observada en lisados de células transfectadas con GST-CK2 β y GFP-CK2 β fueron respectivamente: 50 y 25% menores en relación a los controles, además los análisis por geles de electroforesis mostraron muy bajas cantidades de CK2 β .

Se ha visto en estudios realizados en este laboratorio, la menor eficiencia de GST-CK2 β para estimular la actividad catalítica de CK2 α comparada con otra proteína recombinante que posee una "etiqueta" más pequeña compuesta de 6 histidinas y llamada la His-CK2 β . Esto nos permite pensar que distintas proteínas de fusión de CK2 β podrían tener distintos o variadas efectos sobre la actividad catalítica de CK2 α , probablemente por alteraciones en la capacidad de CK2 β para interactuar de CK2 $\alpha_2\beta_2$.

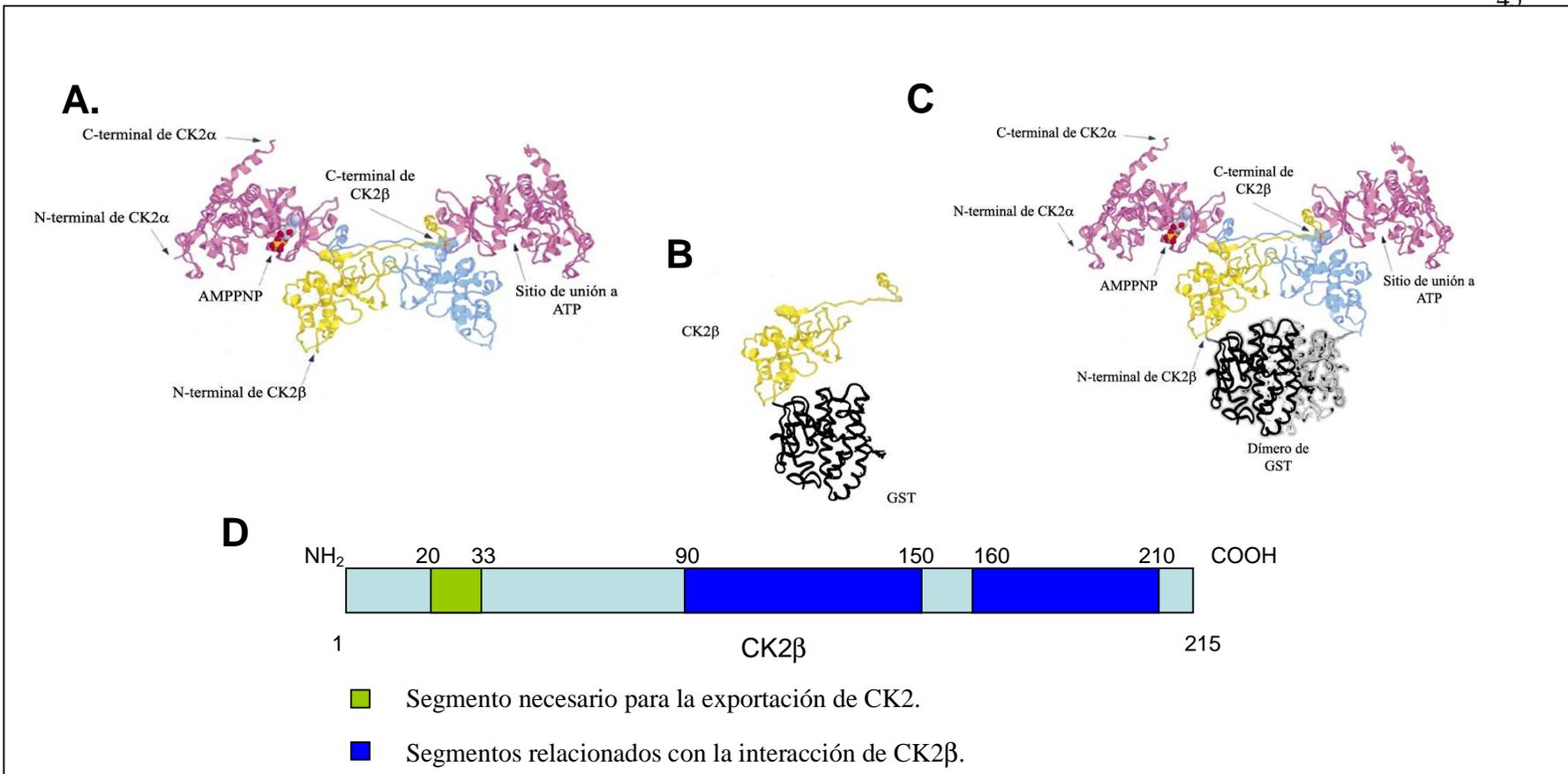


Figura 8. Estructura de la holoenzima CK2 $\alpha_2\beta_2$ y un modelo estructural de la proteína de fusión GST-CK2 β . (A) Estructura cristalográfica de CK2 $\alpha_2\beta_2$, se muestra las regiones amino-terminales de CK2 β (azul y amarillo), libres para interactuar con el medio. (B) Modelo de la estructura tridimensional del monómero de la proteína de fusión GST-CK2 β , (GST en negro y CK2 β en amarillo). (C) Modelo estructural del CK2 $\alpha_2\beta_2$ conformada por dímeros de la CK2 α y de la proteína de fusión GST-CK2 β . Nótese que en esta figura las regiones amino-terminales de las CK2 β quedan obstruidas por el segmento GST, por lo cual la libre interacción en esta zona no sería posible. (D) Esquema de la secuencia aminoacídica (celeste) de CK2 β , donde en verde se enfatiza la zona necesaria para la exportación a la membrana plasmática y en azul oscuro la zona de interacciones tanto de CK2 β para dimerizar con otra CK2 β y para la interacción de CK2 α con CK2 β .

8. CONCLUSIONES

- La fusión de CK2 β a otra proteína no altera *per se* su capacidad de expresión en cultivos celulares.
- La fusión de CK2 β a las proteínas GST-CK2 β y GFP-CK2 β inhibe su exportación al medio extracelular.

9. BIBLIOGRAFÍA

Allende, J; Allende, C. 1995. Protein kinase CK2: an enzyme with multiple substrates and puzzling regulation. *FASEB J.* 9: 313–323.

Allende, C; Allende, J. 1998. Promiscuous subunit interactions: a possible mechanism for the regulation of protein kinase CK2. *J Cell Biochem [Suppl]* 30–31: 129–136.

Antonelli, M; Daniotti, J; Rojo, D; Allende, C; Allende, J. 1996. Cloning, expression and properties of the α' subunit of casein kinase 2 from zebrafish (*Danio rerio*). *Eur. J. Biochem.* 241: 272-279.

Bohana-Kashtan, O; Pinna, L; Fishelson, Z. 2005. Extracellular phosphorylation of C9 by protein kinase CK2 regulates complement-mediated lysis. *Eur. J. Immunol.* 35: 1939-1948.

Bibby, A; Litchfield, D. 2005. The multiple personalities of the regulatory subunit of protein kinase CK2: Dependent and CK2 Independent roles reveal a secret identity for CK2 β . *Int. J. Biol. Sci.* 1: 67-69.

Faust, M; Montenarh, M. 2000. Subcellular localization of protein kinase CK2. A key to its function? *Cell Tissue Res.* 301: 329-340.

Gatica, M; Hinrichs, M; Jedlicki, A; Allende, C; Allende, J. 1993. Effect of metal ions on the activity of casein kinase II from *Xenopus laevis*. *FEBS Letters* 315: 173-177.

Habig, W; Pabst, M; Jakoby W. 1974. Glutathione S-Transferases, The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.* 249: 7130-7139.

Hinrichs, M; Jedlicki, A; Tellez, R; Pongor, S; Gatica, M; Allende, C; Allende, J. 1993. Activity of recombinant α and β subunits of casein kinase II from *Xenopus laevis*. *Biochemistry.* 32: 7310-7316.

Jacoby, W; Ziegler, D. 1990. The enzymes of detoxication. *J. Biol. Chem.* 265: 20715-20718.

Jedlicki, A; Hinrichs, M; Allende, C; Allende, J. 1991. The cDNAs coding for the α - and β -subunits of *Xenopus laevis* casein kinase II. *FEBS Letters.* 297: 280-284.

Kübler, D; Pyerin W; Burrow, E; Kinzel, V. 1983. Substrate-effected release of surface-located protein kinase from intact cell. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80: 4021-4025

Litchfield, W. 2003. Protein kinase CK2: structure, regulation and role in cellular decisions of life and death. *Biochem. J.* 369: 1-15.

Manning, G; Whyte, D; Martinez, R; Hunter, T; Sudarsanam, S. 2002. The protein kinase complement of the human genome. *Science.* 298: 1912-1934.

Mastro, A; Rozengurt, E. 1976. Endogenous protein kinase in outer plasma membrane of cultured 3T3 cells. Nature of the membrane-bound substrate and effect of cell density, serum addition, and oncogenic transformation. *J. Biol. Chem.* 251: 7899-7906.

Meggio, F; Marin, O; Pinna, L. 1994. Substrate specificity of protein kinase CK2. *Cell. Mol. Biol. Res.* 40: 401-409.

Niefind, K; Putter, M; Guerra, B; Issinger, O; Schomburg, D. 1999. GTP plus water mimic ATP in the active site of protein kinase CK2. *Nat Struct Biol.* 12: 1100-1103.

Niefind, K; Guerra, B; Ermakowa, I; Issinger O. 2001. Crystal structure of human protein kinase CK2: insights into basic properties of the CK2 holoenzyme. *The EMBO Journal.* 20: 5320-5331.

Pyerin, W; Burrow, E; Michaely, K; Kübler, D; Kinzel, V. 1987. Catalytic and molecular properties of highly purified phosphotyrosine/casein kinase type II from human

epithelial cells in culture (HeLa) and relation to ecto protein kinase. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler.* 368: 215-227.

Redegeld, F; Caldwell, C; Sitkovsky, M. 1999. Ecto-protein kinases: ectodomain phosphorylation as a novel target for pharmacological manipulation? *Trends Pharmacol. Sci.* 20: 453-459.

Rodríguez, F; Allende, C; Allende J. 2005. Protein kinase casein kinase 2 holoenzyme produced ectopically in human cells can be exported to the external side of the cellular membrane. *PNAS.* 102: 4718-4723.

Rodríguez, F; Contreras, C; Bolanos-García, V; Allende, J. 2008. Protein kinase CK2 as an ectokinase: The role of the regulatory CK2 β subunit. *PNAS.* 105: 5693-5698.

Seger, D; Seger, R; Shaltiel, D. 2001. The CK2 Phosphorylation of vitronectin: Promotion of cell adhesion via the $\alpha\beta$ 3-phosphatidylinositol 3-kinase pathway. *J. Biol. Chem.* 276: 16998-17006.

Sheehan, D; Meade, G; Foley, V; Dowd, C. 2001. Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non- mammalian members of an ancient enzyme superfamily. *Biochem. J.* 360:1-16.

Smith, D; Johnson K. 1988. Single-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as functions with glutathione S-transferase. *Gene.* 67: 31-40.

Stepanova, V; Jerke, U; Sagach, V; Lindschau, C; Dietz, R; Haller, H; Dumler, I. 2002. Urokinase dependent human vascular smooth muscle cell adhesion requires selective vitronectin phosphorylation by ectoprotein kinase CK2. *J. Biol. Chem.* 277: 10265-10272.

Tapia, J; Jacob, G; Allende, C; Allende, J. 2002. Role of the carboxy terminus on the catalytic activity of protein kinase CK2 alpha subunit. *FEBS Letters* 531: 363-368.

Trachana, V; Christophorides, E; Kouzi-Koliakos, K; Koliakos, G. 2005. Laminin-1 is phosphorylated by ecto-protein kinases of monocytes. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 37: 478-492.

Tudyka, Tatjana; Skerra, Arne. 1997. Glutathione S-transferase can be used as a C-terminal, enzymatically active dimerization module for a recombinant protease inhibitor, and functionally secreted into the periplasm of *Escherichia coli*. *Protein Science.* 6: 2180-2187.

Walter, J; Schnölfer, M; Pyerin, W; Kinzel, V; Kübler, D. 1996. Induced release of cell surface protein kinase yields CK1- and CK2-like enzymes in tandem. *J. Biol. Chem.* 271: 111-119.

Walter, J; Schindzierlorz, A; Hartung, B; Haass, C. 2000. Phosphorylation of the β -amyloid precursor protein at the cell surface by ectocasein kinases 1 and 2. *J. Biol. Chem.* 275: 7310-7316.

Zhang, C; Vilk, G; Canton, D; Litchfield, D. 2002. Phosphorylation regulates the stability of the regulatory CK2 beta subunit. *Oncogene.* 21: 3754- 3764.

Zimina, E; Fritsch, A; Schermer, B; Bakulina, A; Bashkurov, M; Benzing, T; Bruckner-Tuderman, L. 2007. Extracellular phosphorylation of collagen XVII by ecto-CK2 inhibits ectodomain shedding. *J. Biol. Chem.* 282: 22737-22746.