

Desregulació dels nivells de les subunitats alfa i beta de la proteïna quinasa CK2 en carcinoma renal de cèl·lules clares (ccRCC)

TESI DOCTORAL

Memòria presentada per

JORDI VILARDELL VILÀ

Llicenciat en Bioquímica, per optar al Grau de Doctor en Bioquímica, Biologia Molecular i Biomedicina de la Universitat Autònoma de Barcelona

Treball realitzat al Departament de Bioquímica i Biologia Molecular de la Universitat Autònoma de Barcelona, sota la direcció del Dr. Emilio Itarte Fresquet i de la Dra. Anna Meseguer Navarro.

**Dr. Emilio Itarte
Fresquet**

**Dra. Anna Meseguer
Navarro**

Jordi Vilardell Vilà

Bellaterra, Octubre del 2013

Agraïments especials:

Agraeixo a la Dra. Inés de Torres i Mayte Salcedo del Servei d'Anatomia Patològica de l'Hospital Vall d'Hebron així com al Dr. Enric Trilla del Servei d'Urologia de l'Hospital Vall d'Hebron per tot el suport donat durant la l'avaluació de les mostres i les dades patològiques i clíniques aportades. Dono també les gràcies a la Dra. Meseguer, que m'ha permès poder realitzar llargues estades de treball en el seu grup i de tot el suport donat durant aquests anys de tesi, així com del Dr. Emilio Itarte per haver confiat en mi, sense l'ajut dels quals aquesta tesi no hauria pogut estar realitzada.

Aquest estudi ha estat realitzat gràcies al finançament concedit pel següent projecte:

“Proteína quinasa CK2 y respuesta a HB-EGF: Implicación en carcinoma renal de células claras” del *Ministerio de Ciencia e Innovación (MICINN)* amb referència BFU2009-10189.

*Als meus pares,
al meu avi i a la meva àvia
i també a l'Ana,
per haver-me recolzat en tot moment.*

ÍNDIX

ÍNDIX	i
ÍNDIX DE TAULES I FIGURES	vii
LLISTAT D'ABREVIATURES	ix
RESUM	xi
I. INTRODUCCIÓ	1
1. EL CARCINOMA DE CÈL·LULES RENALS (<i>Renal Cell Carcinoma, RCC</i>)	3
1.1. CARCINOMA DE CÈL·LULES RENALS	3
1.1.1. Carcinoma renal de cèl·lules clares (ccRCC).....	3
1.1.2. Carcinoma de cèl·lules renals papil·lar (PRCC)	4
1.1.3. Oncocitoma i carcinoma de cèl·lules renals cromòfob	5
1.1.4. Carcinoma de cèl·lules renals de túbul col·lector	6
1.2. ESTADIATGES I GRAU TUMORAL.....	7
1.2.1. Sistema d'estadiatge TNM	7
1.2.2. Sistema d'estadiatge de Robson	9
1.2.3. Gradació Nuclear de Führman.....	9
1.3. EPIDEMIOLOGIA I INCIDÈNCIA DEL RCC	10
1.4. ETIOLOGIA	12
1.5. SIMPTOMATOLOGIA I DIAGNOSTIC DEL RCC	13
1.5.1. Simptomatologia del RCC.....	13
1.5.2. Diagnòstic del RCC.....	14
1.5.2.1. Anàlisis sanguinis i d'orina	14
1.5.2.2. Tècniques d'imatge	15
Tomografia computacional (CT, <i>Computed Tomography</i>).....	15
Tècnica d'Imatge per Ressonància Magnètica (MRI, <i>Magnetic Resonance Imaging</i>)	15
Ultrasonografia.....	15
PET scan (PET, <i>Positron Emission Tomography</i>).....	15
Angiografia.....	16
Radiografia de Raigs X	16
1.5.2.3. Biòpsia.....	16
1.6. TRACTAMENT DEL CARCINOMA RENAL	16
1.6.1. RCC localitzat	16
1.6.1.1. Intervenció Quirúrgica.....	16

1.6.2. RCC avançat.....	17
1.6.2.1. Intervenció Quirúrgica.....	17
1.6.2.2. Quimioteràpia.....	18
1.6.2.3. Radioteràpia.....	18
1.6.2.4. Immunoteràpia.....	18
1.6.2.5. Teràpies dirigides.....	19
2. BIOLOGIA, ASPECTES I CARACTERÍSTIQUES MOLECULARS DEL CARCINOMA RENAL DE CÈL·LULES CLARES (ccRCC).....	20
2.1. MARCADORS MOLECULARS DEL CARCINOMA RENAL.....	20
2.1.1. Biomarcadors de ccRCC en teixit renal.....	20
2.1.1.1. Biomarcadors proteics en teixit renal.....	20
2.1.1.2. Biomarcadors transcripcionals.....	22
2.1.2. Biomarcadors de ccRCC en fluids: sèrum i orina.....	23
2.2. VIES DE SENYALITZACIÓ IMPLICADES EN EL DESENVOLUPAMENT DEL ccRCC..	24
2.2.1. Via de resposta a hipòxia: VHL-HIF.....	24
2.2.1.1. Funcionament de la via VHL-HIF.....	24
2.2.1.2. Paper del Factor Induïble per Hipòxia (HIF) en el ccRCC.....	26
2.2.2. Altres vies afectades per VHL i alterades en el ccRCC.....	27
2.2.2.1. pVHL i efectes en la formació de cilis.....	27
2.2.2.2. pVHL i regulació de la matriu extracel·lular.....	27
2.2.3. Via PI3K /Akt i PTEN.....	28
2.2.4. Via mTOR.....	30
2.2.5. Via JAK-STAT.....	30
2.2.6. Cicle de Krebs.....	31
3. PROTEÏNA QUINASA CK2.....	32
3.1. ASPECTES BIOQUÍMICS GENERALS DE LA PROTEÏNA QUINASA CK2.....	32
3.1.1. Manipulació genètica de les subunitats de CK2.....	33
3.2. ESTRUCTURA GENERAL I MOLECULAR DE CK2.....	34
3.2.1. Estructura de CK2 α	34
3.2.1.1. Bases estructurals de les propietats de CK2.....	35
Funció catalítica: el <i>loop</i> catalític de CK2 α	35
Bases estructurals de l'activitat constitutiva de CK2 α	36
Regions implicades en el reconeixement de substrat.....	36
Regions implicades en la especificitat de cosubstrat.....	36
Formació de l'holoenzim i inhibició no competitiva: Loop β 4/ β 5 de CK2 α	37
3.2.1.2. Les subunitats catalítiques de CK2: Compensació funcional i especialització.....	37

3.2.2. Subunitat reguladora CK2 β	38
3.2.2.1. Bases estructurals de les propietats de CK2 β	38
Dits de Zinc de CK2 β	38
Interfase d'unió de CK2 β amb CK2 α	39
Loop acídic de CK2 β com a punt d'agregació.....	40
Contribució de CK2 β a l'estructura holoenzimàtica de CK2.....	40
3.2.2.2. Altres regions funcionals de CK2 β	41
Llocs de fosforilació de CK2 β	41
CK2 β : Motius de degradació putatius.....	42
3.3. FUNCIONS DE CK2 β INDEPENDENTS DE CK2: PROTEÏNES D'INTERACCIÓ AMB CK2 β	42
3.3.1. Proteïnes d'interacció amb CK2 β dependents de CK2.....	43
3.3.2. Proteïnes d'interacció CK2 β independents de CK2.....	43
A-Raf.....	44
c-Mos.....	44
Chk1.....	45
3.4. REGULACIÓ CEL·LULAR DE L'ACTIVITAT CK2.....	45
3.4.1. Regulació transcripcional de CK2.....	45
3.4.2. Mecanismes de regulació post-traduccional.....	46
3.4.2.1. Modificació covalent de CK2: Fosforilació de les subunitats.....	46
3.4.2.2. Interaccions reguladores amb altres biomolècules.....	46
3.4.2.3. Interaccions proteïna-proteïna.....	47
3.4.2.4. Regulació mitjançant l'assemblatge de les subunitats de CK2.....	47
3.5. IMPORTÀNCIA FISIOLÒGICA DE CK2.....	48
3.6. LOCALITZACIÓ DE LES SUBUNITATS DE CK2.....	49
4. CK2 I CÀNCER.....	51
4.1. CK2 I CÀNCER.....	51
4.2. PAPER DE CK2 EN LA PROLIFERACIÓ I CARACTERÍSTIQUES CEL·LULARS.....	51
4.3. INCREMENT D'ACTIVITAT CK2 EN BIÒPSIES DE TUMORS HUMANS.....	52
4.4. PRINCIPALS ALTERACIONS DE CK2 EN LES CÈL·LULES TUMORALS HUMANES.....	52
4.4.1. Nivells d'expressió de CK2 i correlació amb paràmetres fisiopatològics tumorals.....	52
4.4.2. Alteracions en la localització cel·lular i distribucions asimètriques de les subunitats de CK2.....	53
4.5. POTENCIAL ONCOGÈNIC DE CK2 EN MODELS MURINS.....	53
4.6. CK2 I APOPTOSIS.....	54
4.7. IMPLICACIÓ DE CK2 EN EL FENOTIP GLOBAL DE LES CÈL·LULES TUMORALS.....	54

4.8. CK2 I CARCINOMA RENAL DE CÈL·LULES CLARES (ccRCC).....	55
4.9. LA TRANSICIÓ EPITELI-MESÈNQUIMA EN LA DISSEMINACIÓ DEL CÀNCER	57
4.9.1. Característiques de la EMT, i la migració cel·lular col·lectiva	57
4.9.2. Transició Epiteli–Mesènquima Parcial i fenotips intermedis	59
4.9.3. Implicació de CK2 en la EMT.....	59
4.10. CK2 I ANOIKIS: RELACIÓ ENTRE APOPTOSI I EMT.....	60
II. OBJECTIUS	61
1. OBJECTIUS	63
III. MATERIALS I MÈTODES	65
1. OBTENCIÓ I ANÀLISI IMMUNOLÒGIC DE MOSTRES DE TEIXIT RENAL HUMÀ	67
1.1. SELECCIÓ DELS CASOS CLÍNICS.....	67
1.2. Construcció de Microarrays de teixit.....	67
1.3. Immunohistoquímica	67
1.4. Valoració de l'expressió de CK2 α i CK2 β en mostres de teixit renal	70
1.5. Extracció de proteïnes de teixit renal humà.....	70
2. LÍNIES CEL·LULARS	72
2.1. Característiques de les línies cel·lulars.....	72
2.2. Manteniment Cel·lular.....	73
2.3. Recompte cel·lular.....	74
2.4. Obtenció línies silenciades estables.....	76
2.4.1. Vectors i shRNA (<i>short hairpin RNA</i>).....	76
2.4.2. Transducció cel·lular mitjançant partícules lentivirals.....	77
2.5. Corbes de creixement	78
2.5.1. Assaig de Proliferació en MTT	78
2.5.2. Recompte del creixement cel·lular en resuspensió.....	80
2.5.3. Recompte del creixement cel·lular en placa i tinció amb cristall violeta	80
2.6. Obtenció d'extractes cel·lulars totals	81
2.7. Assaig de Wound-Healing.....	82
2.8. Assaig de creixement cel·lular en agar tou.....	83
2.9. Immunocitofluorescència	84
2.10. RT-qPCR (Real Time- quantitative Polymerase chain reaction).....	87
2.10.1. Extracció del RNA total	87
2.10.2. Quantificació del RNA total.....	88
2.10.3. Valoració de la qualitat del RNA total	88
2.10.4. RT-PCR (<i>Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction</i>).....	88
2.10.5. RT-qPCR (<i>Real Time- quantitative Polymerase Chain Reaction</i>)	90

3. WESTERN BLOT.....	93
3.1. Electroforesis en gel de poliacrilamida en condicions desnaturalitzants (<i>SDS-PAGE</i>).....	93
3.1.1. Tinció dels gels SDS-PAGE en blau de coomassie:.....	94
3.2. Anàlisi immunològic per western blot.....	94
3.2.1. Electrotransferència de proteïnes:	95
3.2.2. Immunodetecció:	95
3.3. LLISTA D'ANTICOSSOS UTILITZATS.....	97
IV. RESULTATS	99
1. CARCINOMA RENAL	101
1.1. NIVELLS DE CK2 EN EXTRACTES RENALS DE PACIENTS AFECTATS PER ccRCC .	101
1.2. NIVELLS DE CK2 EN TISSUE MICROARRAYS DE PACIENTS AFECTATS DE ccRCC	110
.....	
2. LÍNIES SILENCIADES.....	120
2.1. NIVELLS D'EXPRESSIÓ DE LES SUBUNITATS DE CK2 EN LÍNIES RENALS	
HUMANES	120
2.2. NIVELLS DE CK2 α , CK2 α ' I CK2 β EN LÍNIES RENALS SILENCIADES PER LES	
SUBUNITATS DE CK2.	122
2.3. EFECTES DEL SILENCIAMENT DE CK2 SOBRE LA FOSFORILACIÓ DE eIF2 β	124
2.4. LOCALITZACIÓ SUBCEL·LULAR DE CK2 α EN LES LÍNIES HK-2 I 786-O	
SILENCIADES PER CK2	125
2.5. CARACTERITZACIÓ MORFOLÒGICA DE LES LÍNIES RENALS SILENCIADES	128
2.6. TAXES DE PROLIFERACIÓ CEL·LULAR DE LES LÍNIES RENALS SILENCIADES	130
2.7. MIGRACIÓ CEL·LULAR EN LÍNIES RENALS SILENCIADES: ASSAIG DE <i>WOUND</i>	
<i>HEALING</i>	133
2.8. TRAJECTÒRES DE LES MIGRACIONS CEL·LULARS.....	138
2.9. CREIXEMENT INDEPENDENT D'ANCORATGE EN LÍNIES RENALS SILENCIADES:	
CREIXEMENT DE COLÒNIES EN SOFT AGAR.....	140
2.10. MARCADORS DE TRANSICIÓ EPITELI-MESÈNQUIMA EN LÍNIES RENALS	
SILENCIADES PER CK2	142
2.11. EXPRESSIÓ TRANSCRIPCIONAL DE E-CADHERINA I N-CADHERINA	144
2.12. RESUM DE LES PRINCIPALS CARACTERÍSTIQUES DE LES LÍNIES SILENCIADES	
PER CK2	146
V. DISCUSSIÓ	149
1. DISCUSSIÓ	151
1.1. ELS NIVELLS I LES RELACIONS ENTRE LES SUBUNITATS DE CK2 ESTAN	
ALTERADES EN ccRCC.....	151
1.2. EL SILENCIAMENT DE LES SUBUNITATS DE CK2 TÉ EFECTE SOBRE ELS NIVELLS	
DE LES ALTRES SUBUNITATS DE CK2.....	153

1.3. DISTRIBUCIÓ DE CK2 α EN LES CÈL·LULES SILENCIADES.....	156
1.4. CK2 ESTÀ IMPLICADA EN LA PROLIFERACIÓ CELULAR.....	157
1.5. ALTERACIONS EN CK2 CAUSEN CANVIS FENOTÍPICS EN LES LÍNIES CELULARS.....	158
1.6. CK2 AFECTA A L'EXPRESSIÓ DE LA E-CADHERINA	159
1.7. LA DESREGULACIÓ DE LES SUBUNITATS DE CK2 CAUSA UNA EMT-PARCIAL. ...	160
1.8. LES DESREGULACIONS EN ELS NIVELLS DE LES SUBUNITATS DE CK2 AFECTEN TRES ELEMENTS CLAU DE LA PROGRESSIÓ TUMORAL.....	161
VI. CONCLUSIONS	163
1. CONCLUSIONS	165
VII. BIBLIOGRAFIA	169
1. BIBLIOGRAFIA.....	171
VIII. ANNEX	181

ÍNDIX DE TAULES I FIGURES

Índex de Figures

Figura 1	6
Figura 2	8
Figura 3	10
Figura 4	25
Figura 5	29
Figura 6	35
Figura 7	39
Figura 8	41
Figura 9	44
Figura 10	58
Figura 11	91
Figura 12	102
Figura 13	103
Figura 14	104
Figura 15	105
Figura 16	106
Figura 17	108
Figura 18	112
Figura 19	113
Figura 20	115
Figura 21	116
Figura 22	117
Figura 23	118
Figura 24	120
Figura 25	123
Figura 26	125
Figura 27	127
Figura 28	130
Figura 29	132
Figura 30	133
Figura 31	136
Figura 32	137
Figura 33	139
Figura 34	141
Figura 35	143
Figura 36	145
Figura 37	145

Índex de Taules

Taula 1	7
Taula 2	8
Taula 3	9
Taula 4	9
Taula 5	11
Taula 6	12

Taula 7	14
Taula 8	43
Taula 9	48
Taula 10	69
Taula 11	73
Taula 12	74
Taula 13	76
Taula 14	89
Taula 15	89
Taula 16	91
Taula 17	92
Taula 18	92
Taules 19	93
Taula 20	97
Taula 21	97
Taula 22	111
Taula R1	147
Taula 1A	183
Taula 2A	184

LLISTAT D'ABREVIATURES

ACIX	Anhidrasa Carbònica IX
AJCC	<i>American Joint Commitee on Cancer</i>
AQP1	aquaporina 1
AURKB	aurora quinasa B
BAD	<i>Bcl-2-Associated Death promotor</i>
BHD	<i>Birt-Hogg-Dube</i>
CBC	<i>Complete Blood Count</i>
ccRCC	<i>clear cell Renal Cell Carcinoma</i>
CDK1	quinasa depenent de ciclina 1
ChRCC	<i>Chromophobe Renal Cell Carcinoma</i>
CIL	<i>Contact Inhibition of locomotion</i>
CIL	<i>Contact Inhibition of Locomotion</i>
CK	Citoqueratina
CK2	proteïna quinasa CK2
CT	<i>Computed Tomography</i>
CT	<i>threshold cycle</i>
Dbox	<i>Destruction Box</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	<i>Dimethyl Sulfoxide</i>
ECM	<i>ExtraCellular Matrix</i>
EGFR	<i>Epithelial Growth Factor Receptor</i>
EMSA	<i>Electrophoretic mobility shift assays</i>
EMT	<i>Epithelial-Mesenchymal Transition</i>
ENaC	canals Epiteliais de Na ⁺
EPK	Família de les proteïnes quinases Eucariotes
FBS	<i>Fetal Bovine Serum</i>
FH	fumarat hidratasa
FITC	<i>fluorescein isothiocyanate</i>
GSK	Glicogen Sintases Quinases
HAVCR/KIM-1	<i>Hepatitis A Virus Cellular Receptor I/Kidney Injure Molecule-1</i>
HGFR	<i>Hepatocyte Growth Factor Receptor</i>
HIF	<i>Hypoxia Inducible Factor</i>
HPRCC	<i>Hereditary Papillary Renal Cell Carcinoma</i>
HRE	<i>Hypoxia Response Elements</i>
IHC	Immunohistoquímica
IL-2	interleuquina-2
INF-α	interferó- α
IP	Immunoprecipitació
MAPK	quinases activades per mitògens
MDM2	<i>murine doble minute 2</i>
MDR-1	<i>Multidrug Resistance -1</i>
MKI	<i>Multyrosine kinase Inhibidor</i>
MMPs	metaloproteïnases de la matriu extracel·lular

MRI	<i>Magnetic Resonance Imaging</i>
MTT	<i>3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide</i>
Nav	canals de Na ⁺ dependents de voltatge
NFQ	<i>Non-Fluorescent Quencher</i>
NHS	<i>Normal Horse Serum</i>
NLS	<i>Nuclear Localizing Signals</i>
PAI-1	l'inhibidor de l'activador del plasminògen-1
PDGF	<i>Plateled Derived Growth Factor</i>
PET	<i>Positron Emision Tomography</i>
PFA	Paraformaldehid
PH	<i>Plekstrin Homology Domains</i>
PI3K	fosfatidilinositol 3-quinasa
PLK1	<i>polo-like kinase 1</i>
PRCC	<i>Papillary Renal Cell Carcinoma</i>
pVHL	proteïna VHL
RCC	<i>Renal Cell Carcinoma</i>
RQ	<i>Relative quantification</i>
RTKs	Receptors Tirosina Quinasa
RT-PCR	<i>Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction</i>
RT-qPCR	<i>Real Time- quantitative Polymerase Chain Reaction</i>
SAGE	Anàlisi Seriat de l'Expressió Gènica
SDH	succinat deshidrogenasa
shRNA	<i>short hairpin RNA</i>
Síndrome VHL	Síndrome de Von Hippel-Lindau
siRNA	<i>small interfering RNAs</i>
Sistema TNM	Sistema de Tumor, Nòduls i Metàstasi
TGF-α	<i>Tumoral Growth Factor-α</i>
TGF-β	<i>tumoral Growth Factor-β</i>
T_m	<i>melting temperature</i>
TMA_s	<i>Tissue MicroArrays</i>
TβRII	receptor TGF- β
UICC	<i>International Union Against Cancer</i>
VEGF	<i>VasoEndotelial Growth Factor</i>
WHO	<i>World Health Organisation</i>

RESUM

1.1. RESUM

La proteïna CK2 és una serina/treonina quinasa present en tots els organismes eucariotes i que actua sobre una àmplia varietat de substrats cel·lulars, implicats en una àmplia gamma de funcions diferents, moltes de les quals són essencials per la cèl·lula. De fet, CK2 ha estat considerada com una proteïna quinasa essencial per la viabilitat de les cèl·lules eucariotes.

Les alteracions de CK2 en una àmplia varietat de tumors malignes s'han confirmat en diversos estudis, mostrant-se una activitat quinasa i nivells de subunitats catalítiques incrementades en diferents tipus de tumors humans. Curiosament el paper de CK2 en el carcinoma renal de cèl·lules clares (ccRCC) –un càncer altament agressiu i que constitueix la major part de càncers renals humans- ha estat poc estudiada, malgrat el fet que un informe preliminar indicava que en aquest tipus de tumor la subunitat reguladora CK2 β augmentava fins i tot en quantitats superiors que la subunitat catalítica CK2 α .

L'objectiu d'aquest treball ha estat profunditzar en el coneixement de la situació de CK2 en el ccRCC i estudiar com alteracions i desregulacions entre les seves subunitats poden afectar a la progressió del ccRCC. Amb aquesta finalitat s'han usat d'extractes de teixits i *Tissue MicroArrays* (TMAs) de biòpsies de pacients amb ccRCC i amb línies renals humanes derivades de túbul proximal silenciades de forma estable per les subunitats reguladores CK2 β o les catalítiques CK2 α de CK2, les quals han estat usades com a model *ex vivo* per l'estudi de la patologia.

Els resultats obtinguts en aquest treball indiquen que en el ccRCC, no només apareixen alteracions en l'expressió dels nivells de CK2 β (donant lloc a relacions CK2 α /CK2 β diferents en funció del grau i estadiatge tumoral) sinó que hi ha també canvis significatius en les localitzacions d'aquestes subunitats en les etapes més primerencs del tumor.

D'altra banda, la disminució de l'expressió mitjançant el silenciament estable de les subunitats reguladores o catalítiques en línies renals humanes, fa que les línies adquireixin un fenotip EMT parcial, presentant característiques pròpies de cèl·lules mesenquimàtiques tals com la pèrdua del marcador epitelial E-cadherina, així com canvis en la morfologia i capacitat de creixement independent d'ancoratge. El fet que alteracions en les relacions de les subunitats de CK2 donin lloc a aquestes propietats mesenquimàtiques, acompanyades per canvis en les seves propietats migratòries i proliferatives, suggereix que alteracions en les relacions entre les subunitats durant el procés neoplàsic participarien en les diferents etapes de la progressió tumoral.

———— I. INTRODUCCIÓ

1. EL CARCINOMA DE CÈL·LULES RENALS (*Renal Cell Carcinoma, RCC*)

1.1. CARCINOMA DE CÈL·LULES RENALS

El carcinoma de cèl·lules renals (*RCC, Renal Cell Carcinoma*), també conegut com a adenocarcinoma renal, és la forma més freqüent de càncer renal en adults, representant el 85% dels casos de càncers renals diagnosticats. El 15% restant està constituït per nefroblastomes (corresponent entre el 5-6% del total de casos de RCC a Tumor de Wilms), neoplasmes cel·lulars transicionals de la pelvis renal (7-8%) i diferents sarcomes d'origen renal.

El carcinoma de cèl·lules renals (*RCC*) s'origina a partir de les cèl·lules epitelials dels túbuls renals. En funció del tipus de cèl·lula epitelial que originarà el tumor i de la seva localització dins de la nefrona, la *World Health Organization* (*WHO*) subdivideix el *RCC* en:

- Carcinoma renal de cèl·lules clares (*ccRCC*).
- Carcinoma de cèl·lules renals papil·lar (*PRCC*).
- Oncocitoma i carcinoma de cèl·lules renals cromòfob (*ChRCC*).
- Carcinoma de cèl·lules renals de túbul col·lector.

Aquesta classificació és important, ja que al derivar de cèl·lules diferents, cadascun d'aquests subtipus presenta una evolució clínica pròpia donant lloc a tumors amb respostes diferencials front a les teràpies aplicades. A més, diferents alteracions gèniques han estat correlacionades amb el desenvolupament del subtipus de *RCC*, usant-se com a marcadors moleculars per la seva classificació.

La malaltia pot presentar-se de forma esporàdica, apareixent generalment en edats avançades, o bé de manera hereditària, sorgint en edats més primerenques. En tot els casos, el tractament inicial és quirúrgic, ja que presenta la particularitat de ser resistent tant a la quimioteràpia com a la radioteràpia. Malgrat això hi ha casos de pacients que han respost positivament al tractament amb immunoteràpia o teràpies antitumorals dirigides mitjançant fàrmacs.

1.1.1. Carcinoma renal de cèl·lules clares (*ccRCC*)

El carcinoma renal de cèl·lules clares (*ccRCC, clear cell Renal Cell Carcinoma*) representa el subtipus de *RCC* més freqüent, constituint el 80-90% dels tumors malignes renals en adults [1,2]. Davant del fet que a vegades pot presentar un elevat contingut en cèl·lules eosinofíliques, se l'ha designat també amb el nom de carcinoma de cèl·lules granulats. Malgrat que també a la literatura se'l pot conèixer com a tumor de Grawitz o Hipernefoma, actualment s'ha estandarditzat *ccRCC* com la forma més habitual d'anomenar-lo.

Afecta més a homes que a dones, presentant una relació de 2-3:1, apareixent de forma esporàdica al voltant dels 60-70 anys. Les formes hereditàries del tumor apareixen més primerencament, al voltant dels 40 anys i constitueixen només un 5% dels càncers renals totals [2].

El ccRCC té el seu origen en les cèl·lules epitelials del túbul contort proximal. Les cèl·lules transformants presenten un citoplasma de color clar degut a l'elevat contingut de vesícules riques en greixos i glicogen, característica que li dona nom a aquest tumor [1,2]. Macroscòpicament és un tumor cortical, de forma arrodonida i sovint es presenta encapsulat, quedant ben delimitat al parènquima renal adjacent. Macroscòpicament sol presentar una coloració groguenca amb àrees de necrosi que poden ser extenses, hemorràgies multifocals, al torn que pot ser sòlid, cístic o mixt, presentant incusions lipídiques o també calcificacions [1,2].

El 50% dels casos es presenten en estadiatges baixos (T1 i T2) i el 45% en estadi T3, mentre que només el 5% dels casos apareixen en l'estadi T4. Cal destacar també que només el 5% dels casos de ccRCC presenten multi centralitat i bilateralitat, essent aquestes propietats freqüents en pacients afectats pel síndrome de Von Hippel Lindau [2].

La disseminació hematògena més freqüent del ccRCC es dona per la vena renal i a través de la vena cava, tendeix a metastatitzar a pulmó. No obstant també pot disseminar-se de manera retrògrada, per les venes paravertebrals cap a testicles, ovaris i ossos, així com llocs menys usuals com determinats teixits tous tals com el pàncrees i el cor [2].

Microscòpicament, apart de la ja esmentada aparença clara de les cèl·lules tumorals, el ccRCC pot presentar una varietat de patrons histològics diferents, essent els més típics els patrons alveolars i sòlids, envoltats de vasos primis [2,3]. Els seus nuclis presenten relacions baixes nucli:citoplasma i l'avaluació histopatològica d'aquests és usada per a establir la gradació nuclear de Führman, la qual dona informació pronòstica important (Figura 1A, A).

1.1.2. Carcinoma de cèl·lules renals papil·lar (PRCC)

El carcinoma de cèl·lules renals papil·lar (*PRCC, Papillary Renal Cell Carcinoma*) igual que el ccRCC, s'origina també a partir de les cèl·lules epitelials del túbul contort proximal.

És el segon tipus més comú de RCC, comprenent entre el 10-15% dels casos totals de RCC. Tant l'edat d'aparició com la incidència en funció del sexe és semblant a la del ccRCC, apareixent la forma esporàdica d'aquest també a partir dels 60-70 anys, trobant-se una afectació en homes 5 vegades superiors a les dones. Malgrat que la majoria de casos diagnosticats apareixen de forma esporàdica, alguns casos corresponen a membres de famílies amb PRCC hereditari. L'agressivitat del tumor és menor que la del ccRCC, presentant-se una taxa de supervivència als 5 anys del 90% [4].

Macroscòpicament presenta una massa ben delimitada embolcallada per una pseudocàpsula, observant-se en alguns dels tumors una aparença totalment necròtica i fragmentable. Microscòpicament està constituït per diferents proporcions de cèl·lules papil·lars i tubulars cobertes per les cèl·lules tumorals [4].

El PRCC es caracteritza perquè es subdivideix en dos subtipus: el tipus 1 i el tipus 2, que es caracteritzen per tenir diferent origen, pronòstic i estructura microscòpica.

El PRCC tipus 1 són esporàdics i d'aparició tardana [1]. Apareixen com lesions papil·lars, cobertes per una capa de petites cèl·lules tumorals de forma cúbica, amb un citoplasma pàl·lid i escàs, nucli ovalat i nuclèols indistingibles [3,4] (Figura 1, B).

El PRCC tipus 2 solen correspondre's amb els casos de PRCC hereditari (encara que també poden desenvolupar-se a partir dels de tipus 1) apareixent en etapes més primerenques i essent diagnosticats quan presenten graus de Fùhrman avançats, presentant d'aquesta manera un pitjor pronòstic [1]. Sorgeixen com lesions papil·lars cobertes per cèl·lules tumorals de mida gran i citoplasma eosinofílic. Aquestes cèl·lules es disposen de forma pseudoestratificada i tenen un nucli esfèric amb varis nuclèols [3,4] (Figura 1, C). Tal com s'ha dit, apareix principalment en individus afectats per carcinoma renal papil·lar hereditari (HPRCC) presentant un patró d'herència autosòmica dominant. El gen responsable és el proto-oncogen MET, present al cromosoma 7 i que codifica per el receptor tirosina quinasa activat pel factor de creixement d'hepatòcits (*HGFR, Hepatocyte Growth Factor Receptor*). En aquests casos, el HGFR té mutacions per substitucions aminoacídiques autoactivants, encara que situacions en les que hi ha la duplicació del cromosoma 7, l'augment de la càrrega gènica de MET es la responsable d'ocasionar la mateixa conseqüència [4].

1.1.3. Oncocitoma i carcinoma de cèl·lules renals cromòfob

Tant el carcinoma renal cel·lular cromòfob (*ChRCC, Chromophobe Renal Cell Carcinoma*) com l'oncocitoma (Figura 1, D i E respectivament) s'originen a partir de les cèl·lules epitelials del túbul col·lector. Malgrat això, les cèl·lules epitelials de les quals provenen són diferents. Així, els oncocitomes s'originen a partir de les cèl·lules intercalades tipus A del túbul col·lector, mentre que el ChRCC s'origina a partir de les cèl·lules intercalades tipus B. Aquests dos tipus de tumors també presenten un pronòstic molt diferent, així els oncocitomes es caracteritzen per ser tumors benignes, mentre que els ChRCC són malignes. Malgrat que el ChRCC es considera un tumor maligne, es tracta del subtipus de RCC amb millor pronòstic, tenint un curs benigne després de la malaltia si tant l'estadiatge com el grau del tumor són favorables, presentant una supervivència al cap dels 5 anys després del diagnòstic superior al 90%. Ambdós tipus constitueixen el 5% de les nefrectomies realitzades quan es sospita d'un carcinoma renal cel·lular [4].

Microscòpicament els dos són molt semblants entre sí, havent de recórrer moltes vegades als seus perfils immunohistoquímics (clarament diferenciats) per a la seva correcta identificació [1].

Sota microscopi, el ChRCC presenta unes cèl·lules tumorals llargues amb un abundant citoplasma eosinofílic acompanyat d'uns nuclis hipercromàtics de forma irregulars, caracteritzats per la presentació d'una estructura en forma de halo al seu voltant [3,4].

La majoria de casos corresponen també a la seva forma esporàdica, però també pot manifestar-se de forma hereditària, associant-se la seva aparició amb el Síndrome de *Birt-Hogg-Dube* (BHD). En aquest síndrome, el gen *bhd*, el qual codifica pel repressor tumoral fol·liculina, es troba mutat. S'ha observat

també que en els casos ocasionals de carcinomes renals esporàdics rarament es dona la mutació en bhd [4].

1.1.4. Carcinoma de cèl·lules renals de túbul col·lector

El carcinoma de cèl·lules renals de túbul col·lector (o carcinoma de túbuls col·lectors de Bellini) representa menys del 1% del total de càncers renals i és un tumor altament agressiu (Figura 1, F). S'originen a partir de les cèl·lules epitelials dels túbuls col·lectors medul·lars i presenta un mal pronòstic, ja que el 70% dels pacients moren durant els primers dos anys després del diagnòstic. Cal destacar que en el 33 % dels casos, els afectats ja presenten metàstasis en el moment de la detecció, contribuint d'aquesta manera a la baixa taxa de supervivència dels pacients. Sol presentar-se predominantment en homes (relació de 2:1 respecte a les dones) i sovint d'edat jove, a partir dels 40 anys d'edat [4]. També s'ha observat una major incidència d'aquest tumor renal en joves afectats per anèmia falciforme o trets falciformes [1].

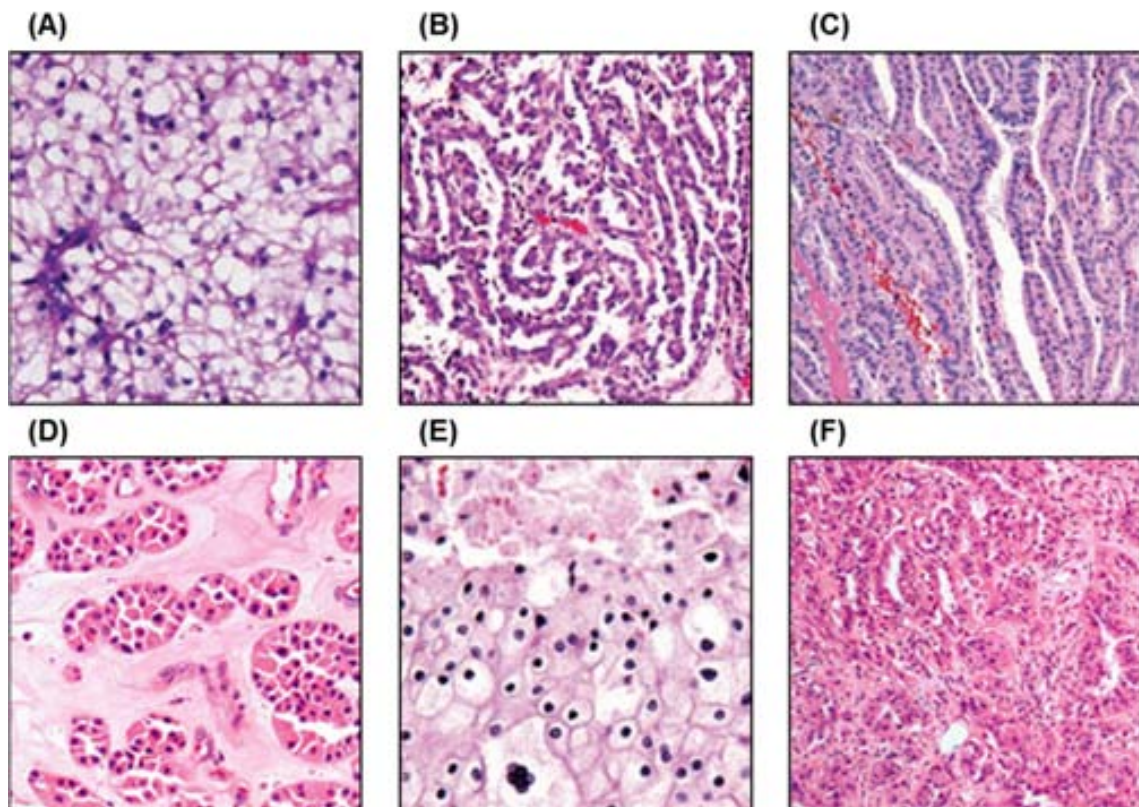


Figura 1: Imatges histopatològiques de diferents tipus de carcinomes renals cel·lulars (RCC)

(A) Carcinoma renal de cèl·lules clares (ccRCC), **(B)** Carcinoma renal papil·lar tipus I, **(C)** carcinoma renal papil·lar tipus II; **(D)** oncocitoma; **(E)** carcinoma renal cel·lular cromòfob; **(F)** carcinoma renal de túbul col·lector.

1.2. ESTADIATGES I GRAU TUMORAL

1.2.1. Sistema d'estadiatge TNM

Per tal d'establir el pronòstic, tractaments i la probabilitat de supervivència dels pacients afectats, s'ha ideat un sistema de classificació basat en l'estadiatge tumoral [1]. Aquest sistema d'estadiatge ha estat modificat al llarg del temps, adaptant-se a les noves tècniques diagnòstiques i a l'increment del coneixement en els diferents subtipus de RCC [5].

D'aquesta manera, l'anterior sistema de classificació del càncer renal modificat per Robson ha estat gradualment substituït pel sistema de Tumor, Nòduls i Metàstasi (TNM) usat en altres tipus de càncer i validat l'any 1985 per l'Associació Internacional Contra el Càncer (*International Union Against Cancer*, UICC) [5], essent també acceptat pel Comitè Nord-americà Conjunt sobre el Càncer (*American Joint Committee on Cancer*, AJCC), establint-se un consens a nivell mundial per les normes de classificació del tumor i l'avaluació del grau de disseminació del tumor més enllà del ronyó.

Taula 1: Classificació TNM de carcinoma renal cel·lular (Revisió 2002)	
T- Tumor primari	
TX	No es pot avaluar el tumor primari
T0	No hi ha evidència de tumor primari
T1	El tumor fa un màxim de 7cm a la seva major dimensió i està limitat a ronyó.
T1a	El tumor fa menys de 4 cm a la seva major dimensió i es limita a ronyó.
T1b	El tumor fa entre 4 i 7 cm (sense superar-lo) a la seva major dimensió i es limita a ronyó.
T2	El tumor fa més de 7 cm a la seva major dimensió i es limita a ronyó.
T3	El tumor envaeix les venes principals, la glàndula suprarenal ipsolateral, teixits perinèfrics però no envaeix més enllà de la Gerota Fascia.
T3a	El tumor envaeix la glàndula suprarenal o teixits perinèfrics, però no supera la Gerota Fascia.
T3b	El tumor s'estén a venes renals o a la cava, sense superar la Gerota Fascia.
T4	El tumor envaeix més enllà de la Gerota Fascia.
N- Nòduls limfàtics locals	
NX	No es poden avaluar els ganglis limfàtics regionals.
N0	No hi ha metàstasi en els ganglis limfàtics regionals.
N1	Hi ha metàstasi a només 1 gangli limfàtic regional.
N2	Hi ha metàstasi en més de 1 gangli limfàtic regional.
M- Metàstasi distals	
MX	No es poden avaluar la presència de metàstasi distals.
M0	No hi ha metàstasi a distància .
M1	Hi ha metàstasi a distància.
Nota: Adaptació de la revisió del 2002 del AJCC (<i>American Joint Comitee on Cancer</i>)	

Taula 2: Agrupació per estadiatge del carcinoma renal cel·lular.			
Estadiatge			
Estadi I	T1	N0	M0
Estadi II	T2	N0	M0
Estadi III	T3	N0	M0
	T1, T2, T3	N1	M0
Estadi IV	T4	N0, N1	M0
	Qualsevol T	N2	M0
	Qualsevol T	Qualsevol N	M1
Nota: Adaptació de la revisió del 2002 del AJCC (American Joint Comitee on Cancer)			

El sistema de classificació TNM va ser inicialment ideat per Pierre Denoix al 1952 i es basa en l'avaluació del grau de disseminació de tumors sòlids considerant la mida i invasió del tumor en teixits propers (T), els ganglis limfàtics regionals afectats (N) i les metàstasis (M). A partir d'aquests paràmetres, els tumors es classifiquen en 4 estadis diferents (del I al IV) tals com es mostren a les taules inferiors (Taula 1 i Taula 2) [1].

El sistema ha tingut al llarg del temps un total de 7 revisions. La mostrada correspon a la sisena revisió, publicada al 2002 i posada en vigor el 2003, ja que durant l'avaluació de les nostres mostres tumorals era la revisió vigent. Actualment hi ha una última revisió, que va ser publicada al 2009 i posada en vigor al 2010 i que s'adjunta al material annex (Taula 1A i Taula 2A). Aquesta última revisió incorpora petits canvis front la usada, tal com la subdivisió en funció de la mida del tumor del T2 en T2a i T2b, la desaparició de N2 (quedant integrada dins del valor N1) i la desaparició de MX en l'anàlisi de les metàstasis.

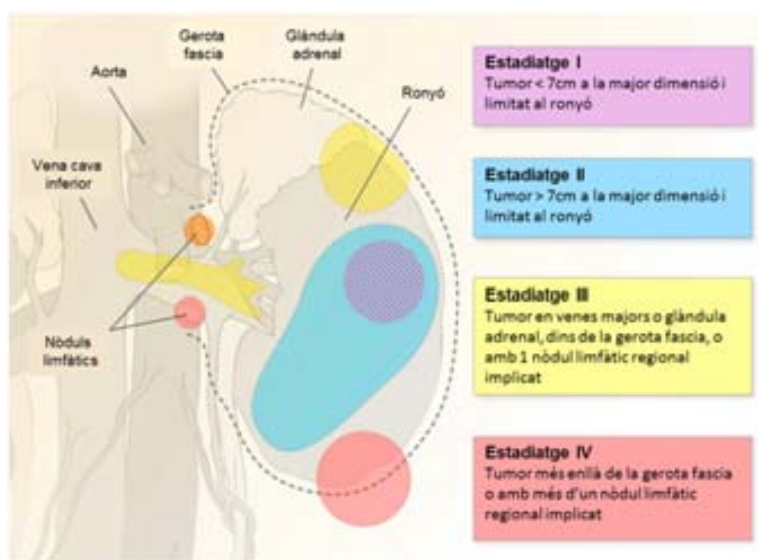


Figura 2: Diagrama esquemàtic dels sistema d'estadiatge TNM en el carcinoma de cèl·lules renals (RCC) Extret de Hebert & Cohen [6].

1.2.2. Sistema d'estadiatge de Robson

Tal com s'ha comentat, moltes vegades en bibliografia més antiga es troben els tumors renals classificats segons un altre sistema d'estadiatge tumoral, proposat per Flocks i Kadesky [7] i modificat per Robson [8] i designat com estadiatge de Robson.

Aquest sistema (actualment substituït pel sistema TNM) està basat en la invasivitat del tumor a diferents estructures renals.

Taula 3: Gradació patològica de Robson del Carcinoma de Cèl·lules Renals	
Grau	Característiques
1	El tumor està confinat dins de la capsula renal
2	El tumor envaeix el greix perinèfric però està confinat dins de la Gerota Fascia.
3	El tumor envaeix la vena renal o bé els ganglis limfàtics.
3a	El tumor envaeix la vena renal.
3b	El tumor envaeix els ganglis limfàtics.
3c	El tumor envaeix tant els ganglis limfàtics com la vena renal.
4	Hi ha indicis de invasió a òrgans adjacents diferents a la glàndula suprarenal o indicis de metàstasis.
4a	El tumor envaeix òrgans o estructures adjacents.
4b	Hi ha presència de metàstasis distals.

1.2.3. Gradació Nuclear de Fùhrman

Malgrat que un dels factors predictius més potents continua essent l'esmentat estadiatge del tumor, aquest sol anar acompanyat també del grau histològic, en el qual s'aplica la gradació nuclear de Fùhrman i que manté una forta correlació amb la supervivència [2]. Aquest sistema es basa en classificar el carcinoma renal en 4 graus en funció de la morfologia nuclear. S'ha observat com a mesura que el grau augmenta, la supervivència esdevé menor i per tant, té un pitjor pronòstic [9].

Taula 4: Gradació Nuclear de Fùhrman (objectiu 10X)	
Grau 1	Nucli petit de 10 µm, hipercromàtic, sense nuclèol visible
Grau 2	Nucli de 15 µm, irregular i nuclèol conspicu (visible només a 400X)
Grau 3	Nucli de 20 µm, irregular i nuclèol (visible a 100X)
Grau 4	Nucli pleomòrfic > 20 µm, hipercromàtic i amb macronuclèol.
(adaptació de Torres et al, [2])	

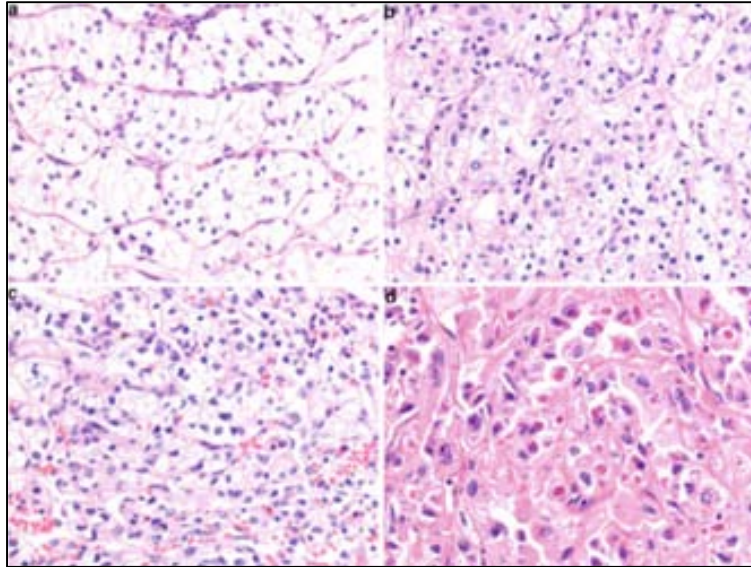


Figura 3: Sistema de gradació nuclear de Fùhrman en mostres de RCC.

Talls histològics de ccRCC classificats segons la seva gradació nuclear en **(a)** Grau 1 (GF1), **(b)** Grau 2 (GF2), **(c)** Grau 3 (GF3) **(d)** Grau 4 (GF4). Les mostres estan contratenyides amb hematoxilina-eosina (Extret de *Zhu et al.* [4])

1.3. EPIDEMIOLOGIA I INCIDÈNCIA DEL RCC

A nivell mundial, el RCC és la tretzena malinitat més comuna, amb 271.000 nous casos diagnosticats al 2008 [3]. Es caracteritza per augmentar amb l'edat, apareixent un màxim a edats compreses entre 70-75 anys. La seva incidència geogràfica és variable, essent les regions més afectades Europa, Estats Units i Austràlia mentre que les que menys, l'Índia, Japó, Àfrica i Xina.

A Europa durant el 2008 es van registrar 88.400 nous casos i és la desena forma més comuna de càncer dins de la Unió Europea [4].

Estudis de la patologia realitzats al 2008 en els 27 països de la Unió Europea, indiquen que el RCC afecta més a homes que a dones, trobant-se 15,8 casos/100.000 homes respecte a 7,1 casos/100.000 dones. Aquestes estadístiques també són variables en funció dels països de la unió, presentant els valors més alts d'afectació en països com la República Txeca, Lituània, Letònia i Islàndia i els valors més baixos a Romania, Xipre i Portugal (mirar taula adjunta). Malgrat que el RCC ha anat creixent anualment un 2% anual a nivell global, alguns països com Suècia, Finlàndia, Polònia i Holanda han registrat una baixada des casos diagnosticats.

Pel què fa a la mortalitat a nivell mundial, durant el 2008 el RCC va causar 116.000 morts, essent 2 vegades superior en homes front les dones i essent encapçalada per Estats Units, Austràlia i Europa, mentre que tant al continent Africà com l'Asiàtic eren els països amb menor mortalitat.

Cal destacar que la mortalitat per RCC a Europa va anar augmentant fins a inicis dels 90's, moment en el qual va patir un estancament i fins i tot una regressió durant els últims anys. D'aquesta manera al 2008 Europa va registrar 39.300 morts per RCC. Igual que amb la incidència, la mortalitat per RCC dins de la

unió varia, observant-se l'esmentada disminució als països escandinaus, França, Alemanya, Itàlia, Àustria i Holanda.

Taula 5: Incidència i taxes de mortalitat per RCC a la Unió Europea				
País	Incidència		Mortalitat	
	Homes	Dones	Homes	Dones
República Txeca	33.6	15.0	12.6	5.3
Lituània	24.8	11.0	11.9	4.3
Estònia	24.2	9.5	12.3	1.9
Letònia	26.1	13.2	12.4	4.3
Islàndia	21.6	10.4	10.2	4.4
Polònia	15.5	7.1	8.7	3.4
França	15.9	5.7	6.3	2.5
Hongria	17.2	6.5	8.4	3.4
Àustria	18.0	9.1	6.3	3.1
Irlanda	13.4	9.1	5.3	3.2
Bèlgica	16.2	8.3	4.9	2.8
Alemanya	21.7	10.2	7.6	3.1
Eslovàquia	20.6	10.5	10.4	4.3
Eslovènia	18.2	6.4	7.3	3.2
Luxemburg	9.6	9.7	3.9	3.0
Finlàndia	13.8	8.3	6.1	2.8
Itàlia	15.2	6.1	5.0	2.0
Noruega	15.3	7.5	6.0	2.8
Grècia	10.0	4.3	4.4	1.9
Dinamarca	13.0	6.9	6.3	3.2
Regne Unit	6.9	6.2	6.4	3.1
Països Baixos	8.4	7.0	8.9	4.2
Xipre	6.9	2.6	2.5	1.0
Malta	8.4	2.2	7.9	3.2
Suècia	10.8	6.6	6.2	3.6
Bulgària	12.4	6.2	4.1	1.2
Espanya	12.3	4.4	4.6	1.7
Suïssa	13.6	5.6	5.2	2.1
Portugal	7.2	3.4	3.5	1.2
Romania	8.1	4.2	4.4	1.8
Unió Europea	15.8	7.1	6.5	2.7

Taula 5: Incidència i taxes de mortalitat de RCC en 27 països de la Unió Europea a l'any 2008 (ratios estandaritzades per edat per cada 100.000 habitants)

Adaptat de *Ljungberg et al, 2011* [10]

Moltes vegades s'ha relacionat la incidència del RCC amb la raça, així s'ha observat que apart d'afectar menys als països asiàtics, els asiàtics que viuen a Estats Units també es veuen menys afectats respecte a la població general. El cas contrari passa amb els afroamericans, molt més afectats per la malaltia que les altres ètnies. Cal tenir present que molts paràmetres com l'accés a la salut, la freqüència del diagnòstic,

estil de vida i factors ambientals poden afectar les variacions en les incidències front països o ètnies, dificultant així l'observació de l'efecte del rerefons genètic en l'aparició de la malaltia [10].

1.4. ETIOLOGIA

Tal com s'ha esmentat, la incidència del RCC varia en funció de l'àrea geogràfica, de la població i en menor mesura, a factors hereditaris. Existeixen certs factors de risc ambientals associats amb l'aparició de carcinoma cel·lular renal, malgrat això n'hi ha d'altres que la seva implicació en l'etiologia de la malaltia estan en controvèrsia. D'altra banda existeixen factors de risc hereditaris, que presenten un origen genètic i que estan implicats amb els casos hereditaris de RCC, apareixent en edats més primerenques.

Els principals factors de risc ambientals en RCC estan relacionats amb l'estil de vida, destacant l'obesitat, el tabaquisme i la hipertensió [11]. Altres agents com l'exposició al cadmi, amiant, plom, petroli i dissolvents clorats també se'ls ha relacionat amb l'aparició de la malaltia, malgrat que encara no s'han obtingut resultats totalment concloents sobre la seva implicació [10,12].

També s'ha registrat que entre el 30 i el 50% dels pacients sotmesos a llargs períodes de diàlisi, tendeixen a generar quists als seus ronyons nadius i un 6% d'entre els quals acabaran desenvolupant un carcinoma renal [1]. Això fa que el risc de patir RCC en casos de diàlisi cròniques és unes 30 vegades més que la població general [13].

Taula 6: Factors hereditaris implicats en RCC	
Subtipus de RCC	Alteracions genètiques
Carcinoma renal de cèl·lules clares (ccRCC)	<ul style="list-style-type: none"> - Inactivació del gen VHL per mutació o hipermetilació del promotor. - Guany del cromosoma 5q. - Pèrdua dels cromosomes 8p, 9p i 14q. - Alteracions en el cromosoma 3p (el 70-90% de ccRCC ho presenten) - Mutacions en els gens KDM6A/UTX, SETD2, KDM5C/JARID1C i MLL2
Carcinoma de cèl·lules renals papil·lars (PRCC)	<ul style="list-style-type: none"> - Trisomia o tetrasomia dels cromosomes 7 i 17. - Pèrdua del cromosoma Y en homes. - Guany de cromosomes 12, 16 i 20.
Carcinoma de cèl·lules renals cromòfob (ChRCC)	<ul style="list-style-type: none"> - Pèrdua dels cromosomes: Y, 11, 2, 6, 10, 13, 17 i 21.
Carcinoma de cèl·lules renals de túbul col·lector	<ul style="list-style-type: none"> - Pèrdua d'heterozigositat als cromosomes 1q, 6p, 8p,9p, 13q, 19q32 i 21q. - Amplificació de c-erB2 associada a pronòstic desfavorable
Adaptació de Ming et al [4]	

Els factors hereditaris causants de RCC constitueixen només el 3-4% dels casos diagnosticats, no obstant és un dels càncers que presenta major nombre de predisposicions genètiques [14].

Entre aquestes, cal destacar que el Síndrome de von Hippel-Lindau, la translocació del cromosoma 3 i la esclerosi tuberosa, predisposen a patir ccRCC; el carcinoma papil·lar hereditari i el síndrome de Reed estan implicats en pRCC i en el Síndrome de Birt-Hogg-Dubé. A la taula adjunta es mostren els principals factors genètics implicats en els diferents subtipus de RCC [1,14,15].

1.5. SIMPTOMATOLOGIA I DIAGNOSTIC DEL RCC

1.5.1. Simptomatologia del RCC

Històricament, la majoria de casos de RCC (i per tant, també de ccRCC) eren diagnosticats radiològicament en pacients que presentaven l'anomenada tríada clàssica del carcinoma renal. La simptomatologia de la tríada consisteix en hematúria, dolor abdominal i una massa renal abdominal palpable [1,5,16], presentant-se només en un 10-15% dels casos i sent característica de fases més avançades de la malaltia [6]. Aquesta simptomatologia sol ser causada pel creixement o invasió del tumor a òrgans adjacents [5]. Aquest fet feia que la majoria de casos es diagnosticuessin en estadis avançats (estadi III i IV), tenint un mal pronòstic i una baixa esperança de vida.

Cal esmentar que els afectats també poden tenir l'anomenat síndrome paraneoplàsic, un conjunt de simptomatologies que són degudes al RCC però no per la presència local de les cèl·lules tumorals, sinó per factors hormonals generats per aquestes o bé respostes de l'organisme a conseqüència del tumor, entre les qual cal destacar [1,5,16]:

- Pèrdua de pes.
- Anorèxia
- Fatiga crònica.
- Febres recurrents.
- Suors nocturnes i desvetllament nocturn.
- Hipertensió, generada per l'increment de secreció de renina pel tumor.
- Aparició de varicocele, una dilatació de les venes del cordó espermàtic generada en aquest cas, per l'aparició de trombus tumorals a la vena renal esquerra o a al cava inferior (ICV).
- Policitemia secundària, causada per l'excessiva secreció d'eritropoetina.
- Anèmia ocasionada per la baixada dels nivells de eritropoetina.
- Hipercalcèmia secundària.
- Disfunció hepàtica (Síndrome Stauffer).

Les freqüències d'aquests símptomes es mostren a la taula inferior:

Taula 7: Simptomatologies del ccRCC		
Síntoma	Incidència	%
ESR elevat	362/651	55.6
Anèmia	409/991	41.3
Hipertensió	89/237	37.6
Caquèxia	338/979	34.5
Pirèxia	164/954	17.2
Test de funció hepàtica anormal	60/400	15.0
Fosfatasa alcalina elevada	64/434	14.7
Hipercalcèmia	33/557	5.7
Policitèmia	33/903	3.7
Neuromiopia	13/400	3.3
Amiloïdosi	12/573	2.1
<i>ESR: Taxa de sedimentació d'eritròcits</i>		

Taula 7: Simptomatologies més freqüents en ccRCC
Adaptat de Chisholm and Roy, 1971

La detecció de tumors en individus asimptomàtics ha anat augmentant per l'increment en l'ús de tècniques d'imatges com la Tomografia Computacional (CT), la Resonància Magnètica (MR) i la sonografia, passant de ser del 10% dels anys 70's al 60% dels tumors renals diagnosticats a final dels 90's [1]. Aquesta detecció asimptomàtica del tumor, diagnosticada per l'examinació del pacient davant altres malalties, ha permès augmentar la freqüència de la detecció de tumors de mida més petita i en etapes més inicials, fent que el 50% dels pacients passin a detectar-se en l'actualitat en una fase primerenca de la neoplàsia (fases I i II) [5].

1.5.2. Diagnòstic del RCC

Existeixen diferents tècniques que ens faciliten el diagnòstic dels diferents tipus de RCC. Aquestes es poden agrupar en tres grans grups:

- Anàlisis sanguinis i d'orina
- Tècniques d'imatge
- Biòpsies

1.5.2.1. Anàlisis sanguinis i d'orina

Els dos tipus d'anàlisis permeten avaluar l'estat global de salut del pacient, així com si el càncer s'ha dispersat cap altres teixits i si el pacient es troba en condicions a sotmetre's a la cirurgia.

L'anàlisi d'orina és el primer que es realitza en tenir la sospita d'un RCC. En aquest s'intenta detectar tant la presència de sang en l'orina o altres compostos implicats en un mal funcionament renal així com la presència de cèl·lules canceroses (citologia urinària).

En l'anàlisi sanguini es mesura el comptatge total de cèl·lules sanguínies (*CBC, Complete Blood Count*), ja que els nivells d'eritròcits, plaquetes i glòbuls blancs es troben afectats en RCC [16].

Altres factors com els nivells de creatinina en sèrum, la proteïna c-reactiva, la taxa de filtració glomerular, la taxa de filtració i sedimentació de l'hemoglobina, els nivells de fosfatasa alcalina i de calci també són considerats com a elements de diagnòstic del RCC [16,17].

1.5.2.2. Tècniques d'imatge

Aquestes permeten determinar quina àrea està afectada, l'extensió del tumor i l'evolució del tractament. Molt sovint permeten determinar el tipus de tumor renal, encara que en certs casos cal realitzar una biòpsia. Entre aquestes tècniques, les més usades són les següents:

Tomografia computacional (CT, *Computed Tomography*)

La tomografia computacional és una tècnica de raigs X on es capten les imatges en diferents angles, les quals seran combinades per un programa informàtic donant lloc a imatges detallades de la regió analitzada. Per tal de realitzar-la, el pacient incorpora via oral o intravenosa, líquids de contrast. Els agents de contrast de subministració oral, permeten marcar el sistema intestinal per a descartar-lo, mentre que els de tipus intravenós, generen imatges més precises al donar més contrast al sistema renal. Alguns d'aquests agents de contrast són tòxics pel ronyó, motiu pel qual la tècnica s'evita depenent de l'estat fisiològic renal del pacient.

És una de les tècniques més efectives i més usades per a veure el tumor renal al donar informació de la mida, forma, localització i l'extensió tumoral als nòduls limfàtics [1,16,17].

Tècnica d'Imatge per Ressonància Magnètica (MRI, *Magnetic Resonance Imaging*)

Consisteix en la utilització de la Ressonància Magnètica Nuclear enlloc dels raigs X per a l'obtenció de la imatge. En el RCC es realitza de forma menys habitual que la TC, tot i això és molt útil sobretot en els casos d'al·lèrgies a agents de contrast o pacients amb un mal funcionament renal [16,17].

Ultrasonografia

Permet elaborar imatges del ronyó mitjançant ultrasons. És un mètode indolor i que no utilitza radiacions, usat moltes vegades per guiar l'agulla durant les biòpsies. Permet determinar si el tumor té una estructura sòlida o líquida, malgrat tot, té menor resolució que les tècniques anteriorment comentades [16,17].

PET scan (PET, *Positron Emission Tomography*)

Es basa en incorporar un glúcid marcat radioactivament al cos, fent que les cèl·lules canceroses, les quals presenten una elevada captació de glucosa, l'absorbeixin. Les càmeres registren on es troba el sucre

marcat i per tant, on hi ha les cèl·lules tumorals. S'usa molt per a veure l'extensió del RCC als nòduls limfàtics o en casos en el que es sospita de metàstasis renals i no les han pogut localitzar [16,17].

Angiografia

Es basa en l'ús d'agents de contrast, que incorporats per catèters a l'artèria renal, permeten veure mitjançant raigs X els vasos que irriguen al tumor, permetent planificar millor el procés quirúrgic [1,16].

Radiografia de Raigs X

Usada principalment per a detectar una possible metàstasi del RCC al pulmó, que és un dels punts habituals de formació [16].

1.5.2.3. Biòpsia

La biòpsia generalment no s'usa pel diagnòstic del tumor renal, ja que a partir de les anteriors tècniques d'imatge el cirurgià ja pot prendre la decisió de si cal o no la intervenció quirúrgica. D'aquesta manera la biòpsia es realitza només quan les altres tècniques d'anàlisi no han acabat de ser concloents [1,16,17].

Les biòpsies es realitzen usant anestèsia local i de forma percutània, guiant l'agulla usant tècniques d'imatge com la TC o els ultrasons i aspirant petites parts del teixit a analitzar (tècnica coneguda com aspiració en agulla fina) [16].

1.6. TRACTAMENT DEL CARCINOMA RENAL

El tractament del RCC variarà en funció de l'etapa de la malaltia, així en estadis primerencs, on el tumor encara està molt localitzat, la intervenció quirúrgica és la millor opció. Per contra en etapes més avançades, on ja trobem invasió a altres teixits, s'ha de recórrer a l'ús de quimioteràpia, radioteràpia, immunoteràpia i teràpies dirigides, combinant-les en alguns casos amb la cirurgia del teixit afectat [1,5].

1.6.1. RCC localitzat

1.6.1.1. Intervenció Quirúrgica

Tal com s'ha esmentat, l'extirpació quirúrgica és l'únic mètode efectiu per tumors localitzats. Clàssicament es realitzava una nefrectomia radical (també coneguda com a total), però cada cop més és substituïda per la nefrectomia parcial, molt menys invasiva i igualment efectiva [1,5].

-La nefrectomia radical es caracteritza per l'extracció en bloc de tots els components de la *Gerota Fascia*, incloent així tot el ronyó, el greix perirenal, els nòduls limfàtics i la corresponent glàndula adrenal ipsolateral [1]. Es sol aplicar quan no es disposa d'informació acurada de la mida, la extensió i l'afectació del tumor, portant-se a terme la intervenció mitjançant una cirurgia oberta [5].

-La nefrectomia parcial és més recent i ha mostrat ser tan eficaç com la total, amb una recurrència <2% i taxes de supervivència als 5 anys compreses entre el 87-90%, obtenint resultats comparables als de la nefrectomia radical [1].

Per tal de realitzar una nefrectomia parcial cal que es compleixin algunes de les situacions esmentades a continuació [1]:

- Que la mida del tumor sigui inferior a 4 cm (corresponent a estadis baixos).
- Que el tumor estigui localitzat a la perifèria.
- Que al pacient li manqui el ronyó contralateral.
- Que l'afectat presenti tumors bilaterals.
- Que el pacient pateixi insuficiència renal.
- Que hi hagi el risc futur de desenvolupar un tumor bilateral (com per exemple, els afectats pel Síndrome de VHL)

La nefrectomia parcial es pot fer laparoscòpicament, reduint la mortalitat post-operativa i la durada del període de recuperació a l'hospital [1,5]. Malgrat això, el temps de la intervenció quirúrgica és major, fent que la manipulació de la mostra dificulti la identificació de l'estadiatge i s'introdueixi el risc de la possible dispersió del tumor [1].

En general, la recurrència local de RCC és poc habitual després de sotmetre's a una nefrectomia parcial, apareixent únicament en menys del 2-3% dels pacients sotmesos a una nefrectomia radical i parcial, respectivament [5].

Un cop realitzada la nefrectomia, com a norma general no es solen aplicar altres teràpies adjuvants, ja que no semblen mostrar millores tant en la recurrència com en la supervivència de la malaltia [5].

1.6.2. RCC avançat

1.6.2.1. Intervenció Quirúrgica

Actualment, els tractaments en casos avançats de RCC basats en teràpies sistèmiques o quirúrgiques no solen ser eficaços, fent que els pacients tinguin un mal pronòstic [5]. Malgrat això, encara que el carcinoma presenti metàstasis, es continua aconsellant la realització d'una nefrectomia del tumor primari, ja que s'han registrat regressions de les metàstasis en casos en els que s'ha eliminat el tumor primari [1]. Apart d'això, la resecció renal és un mètode útil per a l'obtenció de mostres biològiques per aplicar les tècniques basades en la immunoteràpia.

En determinats casos s'aplica també el que s'anomena cirurgia citoreductiva, basada en les escissions de les lesions metastàtiques quan els afectats tenen metàstasis ben aïllades i presenten llargs períodes en què estan lliures de la malaltia [5].

1.6.2.2. Quimioteràpia

La quimioteràpia citotòxica, comunament usada en les fases més avançades d'altres tumors sòlids no sembla tenir efecte en RCC [5]. Estudis realitzats sobre RCC usant una varietat de 50 agents quimioteràpics diferents, han mostrat que cap dels agents quimioteràpics convencionals testats generen una resposta superior al 6% [5].

La manca d'eficàcia als agents quimioteràpics ve explicada per dues hipòtesis diferents [5]:

La primera, proposa que el gen MDR-1 (*Multidrug Resistance*) expressat en càncers renals i cèl·lules del túbul proximal, neutralitzaria de forma efectiva els agents citotòxics més usats. Aquesta explicaria perquè el ccRCC i el PRCC (originats en túbul proximal) presenten una menor resposta als agents quimioteràpics que la resta de tumors [5].

La segona teoria suggereix que la taxa de creixement lenta i no previsible present en els tumors renals els protegeix de la quimioteràpia, ja que la majoria de citotòxics actuen sobre cèl·lules amb elevada proliferació [5].

1.6.2.3. Radioteràpia

No és per si un tractament contra el RCC, però s'usa com una mesura pal·liativa en pacients que no poden sotmetre's a intervencions quirúrgiques, a causa de l'extensió de la neoplàsia o la mala condició de salut general.

La resposta del RCC a la radiació és menys efectiva també que en altres tumors (essent un 50% menor) [5], usant-se habitualment pel control del dolor o del sagnat en el lloc del tumor primari, així com per tractar els símptomes associats a metàstasis a teixits cerebrals i ossis [5].

1.6.2.4. Immunoteràpia

S'ha observat que el tractament immunoterapèutic amb citocines és una de les principals teràpies en RCC i sobretot en ccRCC d'etapa avançada [5]. El mecanisme exacte d'actuació d'aquestes encara ha de ser caracteritzat, però sembla ser que les citocines generarien una resposta en cascada que acabarien activant leucòcits antitumorals, els quals eliminarien les cèl·lules transformants [5].

Els principals agents immunoterapèutics utilitzats són l'interleuquina-2 (IL-2) i l'interferó- α (INF- α) [1]. La primera citocina investigada i que va ser aprovada per la comunitat europea en tractaments de casos avançats de RCC va ser l'INF- α . La seva eficàcia és major que la quimioteràpia, tenint una eficiència del 14% i una remissió de la malaltia en menys de 2 anys [1,5]. La teràpia amb dosis altes de IL-2 s'ha convertit en el mètode estàndard de tractament. Aquesta genera entre el 15-20% de resposta, un 6-8% de reemissió total de les metàstasis i un 5% de cura total de la malaltia [1].

Per contra mostra una major toxicitat i una pitjor administració que el tractament amb INF- α [1,5].

1.6.2.5. Teràpies dirigides

Es basen en l'ús de nous fàrmacs que actuen directament sobre dianes moleculars implicades en l'angiogènesis tals com: VHL, HIF i VEGF i PDGF . Aquestes s'apliquen com a teràpies adjuvants que complementen els anteriors tractaments. Malgrat tots els esforços aplicats en el camp de la teràpia dirigida contra les dianes angiogèniques, molts dels tumors acaben generant una resistència inherent o adquirida front aquests agents. A més a més cal destacar que els tumors renals diferents al ccRCC, mostren respostes més baixes a l'acció d'aquests fàrmacs. Entre aquests cal destacar-ne 4, molt usats en l'àmbit clínic contra el RCC metastàtic [1,5]:

-Sunitinib (Suten, Pfizer): És un inhibidor d'ampli espectre de les tirosina quinases (*MKI, Multityrosine kinase Inhibidor*). Inhibeix un total de 80 quinases diferents, algunes de les quals estan implicades en el creixement tumoral, angiogènesis i metastasi. Entre les tirosina quinases que inhibeix hi ha els receptors alfa i beta del PDGF i els receptors de VEGF (1, 2 i 3). Genera una resposta del 31% i una taxa de supervivència de 11 mesos als pacients tractats. És el tractament estàndard per pacients en fase avançada i amb risc moderat en ccRCC [1,5].

-Sorafenib (Nexavar, Bayer, HealthCare): és un altre MKI d'administració oral i inhibeix la proliferació tumoral actuant a nivell de Raf i de VEGFR i PDGFR, afectant a les cascades associades. Ha mostrat tenir bon efecte en estudis clínics en fase I i II, aplicant-se quan hi ha fallada de les teràpies amb citoquines [1,5].

-Temsirolimus (Torisel, Wyeth): És un inhibidor de les vies PI3K/Akt/mTOR i s'usa en pacients amb metastasis de RCC i que presenten un mal pronòstic. Es tracta d'un anàleg a la rapamicina, que s'uneix *in vitro* a la proteïna FKBP12. El complex temsirolimus-FKBP12 generat s'uneix a mTOR, inhibint al·lostèricament la seva activitat quinasa, donant lloc a la reducció final dels nivells de HIF-1 α i VEGF. Sol aplicar-se com a teràpia de segona línia quan han els pacients han estat tractats amb sunitinib i sorafenib [1,5].

-Bevacizumab (Avastin, Genentech): és un anticòs monoclonal humanitzat contra VEGF, actuant com a anticòs neutralitzant i inhibint la angiogènesis tumoral. Actualment es troba en fase clínica II en pacients afectats per metastasis i que tenen RCC amb un risc intermedi [1,5].

2. BIOLOGIA, ASPECTES I CARACTERÍSTIQUES MOLECULARS DEL CARCINOMA RENAL DE CÈL·LULES CLARES (ccRCC)

2.1. MARCADORS MOLECULARS DEL CARCINOMA RENAL

Les tècniques d'imatge han permès millorar el diagnòstic accidental dels carcinomes renals en etapes més primerenques, però malgrat tot no poden determinar l'estadiatge del tumor ni el tipus de carcinoma renal, factors essencials per determinar el pronòstic i l'estratègia terapèutica a usar. D'aquí que cal acabar recorrent a la biòpsia i usar diferents tipus de biomarcadors que permetin discernir el subtipus de RCC, el seu estadiatge o potencial metastàtic. Malgrat tot, en el cas del ccRCC, no s'han trobat marcadors que es poguessin obtenir mitjançant mètodes no invasius com mostres de orina i sanguínies. De la mateixa manera, tampoc s'han trobat molècules que permetin la detecció primerenca del ccRCC, permetent aplicar teràpies més eficients [18].

D'aquesta manera, els biomarcadors es subclassifiquen en quatre grups en funció de la informació que donen: els de detecció primerenca (pel cribratge de càncer en pacients), de diagnòstic (per determinar el tipus i la presència o absència de la neoplàsia), de pronòstic (que permeten correlacionar el tumor amb el comportament i la supervivència) i els predictius (que es correlacionen amb respostes a teràpies). De tots ells, en el cas del ccRCC, solen ser principalment de diagnòstic, encara que n'hi ha un baix nombre de pronòstic i de predictius [19].

Apart de poder classificar els biomarcadors segons la seva finalitat, també es poden classificar en funció del seu origen molecular (essent proteics o mRNA) o segons on s'expressen (teixit renal, sang i orina).

2.1.1. Biomarcadors de ccRCC en teixit renal

2.1.1.1. Biomarcadors proteics en teixit renal

Molts dels marcadors proteics de RCC usats en mostres de teixit s'usen per a discernir el subtipus de tumor renal existent, o bé distingir la font d'origen de les metàstasis neoplàsiques. Aquests marcadors estan basats en el principi que les cèl·lules sanes presenten ja proteïnes específiques que es continuen expressant en les cèl·lules tumorals. Malgrat això, aquests marcadors presenten el problema que alguns d'ells apart de trobar-se en cèl·lules sanes, s'expressen a més d'un subtipus de RCC (així com en altres tipus de càncers no renals) o bé que mostren una reducció de l'expressió en cèl·lules metastàtiques causat pel seu elevat grau de desdiferenciació. D'aquí que en general s'usen un conjunt de marcadors que permeten elucidar un perfil immunohistoquímic característic per a cada neoplàsia renal [20].

Perfil immunohistoquímic del ccRCC:

Cada subtipus de RCC presenta un perfil immunohistoquímic clarament diferenciat, malgrat això aquest treball es centra només amb els marcadors del ccRCC, el subtipus de neoplàsia renal estudiada en aquest estudi.

El ccRCC es caracteritza per expressar citoqueratines de baix pes molecular (CK8, CK19) (+), vimentina (+), CDC10 (+), RCC (+) i l'anhidrasa carbònica IX (ACIX) (+). Al torn que no expressa CD117 (-), la *kidney-specific cadherin* (-) i la parvalbúmina (-). Altres marcadors també són expressats en aquest carcinoma, encara que no en tots els casos, per la qual cosa no solen ser considerats. A continuació es destaquen les funcions i característiques dels marcadors [2,20].

- Citoqueratines (CK): són proteïnes fibroses que formen els filaments intermedis del citoesquelet de les cèl·lules epitelials. El seu origen cel·lular fa que es trobi en abundància en el RCC, usant-se l'anticòs AE1/AE3 per la detecció d'un ampli grup de citoqueratines. Cal destacar que en el ccRCC també es troben com molts altres tumors renals expressades les CK8 (reconeguda per l'anticòs Cam5.2) i la CK19.
- Vimentina: forma part dels filaments intermedis de les cèl·lules mesenquimàtiques. Malgrat que està present a molts RCC, en el ccRCC és el subtipus que presenta una major expressió.
- Anhidrasa Carbònica IX (ACIX): És un enzim de membrana plasmàtica, involucrat en l'equilibri del pH cel·lular. Aquesta isoforma es caracteritza per no expressar-se en teixit renal sa, però sí en alguns RCC com en el ccRCC, on la seva expressió és induïda sota hipòxia, afectant a l'acidosi del microambient tumoral i a la desestabilització dels contactes intercel·lulars al reduir la unió de la E-cadherina amb la β -catenina [21–23].
- RCC: Es tracta del nom comercial designat a un anticòs que reconeix una glicoproteïna identificada en el *brush border* de les cèl·lules del túbul proximal renal. Aquest marcador és positiu en la majoria de ccRCC així com els papil·lars.
- CD10: és una glicoproteïna de superfície cel·lular present a cèl·lules sanes que té una funció hidrolasa. En ronyó sa, s'expressa a les cèl·lules proximals i podòcits, de forma semblant a l'antigen RCC i que en ccRCC presenta una expressió difusa molt intensa.
- Kidney-Specific cadherin: és una isoforma de E-cadherina que s'expressa a les regions basolaterals de les cèl·lules del túbul contort distal i del col·lector. Com a tal, la seva expressió és negativa en el ccRCC, mentre que en altres RCC com l'oncocitoma i el cromòfob presenten tinció positiva per aquesta proteïna
- Parvalbúmina: és una proteïna d'unió a calci que regula la homeòstasi del calci citoplasmàtic. Aquesta proteïna és exclusiva a les cèl·lules epitelials del túbul distal i col·lector, essent característica de les línies tumorals derivades d'aquestes regions i absents en ccRCC.

Biomarcadors de pronòstic:

Diferents estudis han identificat certes proteïnes que poden actuar també com a biomarcadors de pronòstic en el ccRCC. Així s'ha observat que l'expressió de marcadors com Ki67, EpCAM i p53 estan significativament associats a la recurrència del ccRCC [18].

L'expressió de l'inhibidor de l'activador del plasminògen-1 (PAI-1) en ccRCC també se l'ha associat a graus nuclears alts, estadiatges avançats i a metàstasis distals, associant-se a una reducció de la taxa de supervivència del pacient. Per altra banda, disminucions en l'expressió del receptor TGF- β tipus II (T β RII) s'ha associat en un fenotip tumoral menys agressiu que presenta una major taxa de supervivència que pacients amb una elevada expressió d'aquest mateix receptor [24].

De forma conjunta, l'expressió dels marcadors B7-H1 i de la survivina (inhibidora de l'activació de la via de les caspases) es correlaciona com a predictors de la supervivència en ccRCC.

Altres marcadors incrementats com la p53 i Ki-67, juntament amb la disminució de l'expressió de la CAIX s'han correlacionat amb pronòstics desfavorables.

S'ha observat que HAVCR/KIM-1 està incrementada en aproximadament el 60% dels ccRCC [25] així com en cèl·lules epitelials del túbul proximal que han patit un dany agut, causat per fenòmens de isquèmia o toxicitat [26]. HAVCR (*Hepatitis A Virus Cellular Receptor I*) també conegut amb el nom de la proteïna ortòloga de rata KIM-1 (*Kidney Injure Molecule-1*) es tracta d'una glicoproteïna de membrana tipus I que conté a la regió extracel·lular un domini tipus immunoglobulina que precedeix un domini glicosilat de mucina. El domini de mucina pot fragmentar-se per part de metal·loproteases alliberant-se al medi extracel·lular l'ectodomini [27], podent ser detectat en orina i proposant-se com un bon biomarcador no invasiu pel grup de Meseguer et al [26].

Apart de actuar com un marcador per discernir el ccRCC front altres carcinomes renals, estudis recents han mostrat una correlació entre els nivells d'expressió citoplasmàtics de HAVCR/KIM-1 amb la gradació i l'estadiatge tumoral. Així s'ha observat un increment de l'expressió citosòlica d'aquesta proteïna tant en estadiatge avançats com en la seva gradació. De la mateixa manera s'ha observat que pacients que pertanyen a grup UICC d'alt risc tenen uns nivells citoplasmàtics alts de HAVCR/KIM-1 [26].

2.1.1.2. Biomarcadors transcripcionals

Dins d'aquí es troben un seguit de biomarcadors que mostren un canvi a nivell transcripcional en les mostres de ccRCC respecte a les de teixit renal sa. Igual que en els anteriors biomarcadors proteics de teixit, presenten el problema de que s'ha de realitzar prèviament una biòpsia, de tal manera que tampoc es poden usar de forma rutinària com a biomarcadors de detecció primerenca. Malgrat això, aquests donen informació de vies que són modulades a les etapes inicials de la tumorigenesis.

Entre aquests s'ha identificat que en ccRCC primerencs, hi ha una pèrdua d'expressió del receptor tipus III del TGF- β (T β RIII) ocasionada pel silenciament epigenètic del factor de transcripció GATA3, un regulador transcripcional positiu pel T β RIII. La reexpressió de T β RIII en aquestes cèl·lules causa una

disminució de la proliferació i inducció de l'apoptosi. D'aquesta forma, es creu que la pèrdua de T β RIII en els estadis inicials, així com la posterior pèrdua de T β RII en estadiatges intermitjos i més avançats del ccRCC (estadis 2 i 3) explicaria la incapacitat que aquestes cèl·lules puguin respondre a TGF- β , procés que seria important en la iniciació i progressió neoplàsica.

L'increment de transcripció d'altres gens relacionats amb el cicle cel·lular com: l'aurora quinasa B (AURKB), la quinasa dependent de ciclina 1 (CDK1) i la *polo-like kinase 1* (PLK1) s'han associat també amb ccRCC avançats i la reducció de la supervivència en els pacients [18].

2.1.2. Biomarcadors de ccRCC en fluids: sèrum i orina

Els biomarcadors presents en fluids biològics com l'orina o el sèrum, apart de l'avantatge de la seva fàcil adquisició, permeten fer un bon monitoratge de la malaltia al llarg del temps. No obstant això, la seva rellevància es basa en el seu ús com biomarcadors de detecció primerenca, permetent la detecció del tumor a les etapes inicials, moment en el qual les teràpies existents són més eficients. Malgrat que existeixen alguns d'aquests marcadors en certs tipus de càncer com el de pròstata, encara no se n'ha trobat un que sigui específic del ccRCC i que hagi estat totalment validat per la seva aplicació diagnòstica.

Així en el ccRCC s'ha trobat diferents proteïnes presents en sèrum i que es trobaven incrementades també en biòpsies tumorals. Entre aquestes cal destacar el VEGF, incrementada en sèrum juntament amb la osteopontina, associades les dues amb metàstasis distals i el mal pronòstic de la patologia [18].

Altres marcadors sèrics com B7x, involucrada en la progressió cel·lular dels limfòcits T, així com proteïnes transportadores de coure tals com la ceruloplasmina, han estat trobades en nivells elevats en mostres de sèrums de pacients afectats per ccRCC. Altres proteïnes com TGF- β 1 també s'han trobat augmentades en el plasma de pacients afectats de ccRCC [18].

Pel què fa als biomarcadors presents en orina, recentment s'han identificat dos possibles candidats: la aquaporina 1 (AQP1) i l'adipofilina, trobant-se altament expressats en tots els RCC originats a partir dels túbuls proximals, entre ells el ccRCC i el carcinoma renal papil·lar [18]. Mentre que la primera està implicada en la regulació del flux d'aigua a la cèl·lula, la segona (expressada sota condicions d'hipòxia) intervé en l'acumulació lipídica de les cèl·lules, trobant-se augmentada en adipòcits i ccRCC, contribuint també a la morfologia d'aquestes cèl·lules [28].

Tal com s'ha esmentat anteriorment, l'ectodomini resultant de la proteòlisis (procés conegut com a *shedding*) de HAVCR/KIM-1, detectable en orina, ha estat proposat com un bon biomarcador no invasiu tant pel diagnòstic precoç del ccRCC com del pronòstic de la patologia. Així s'ha descrit que pacients amb estadiatges i graus avançats, presenten majors nivells de l'ectodomini en orina, al torn que disminueixen els nivells de HAVCR/KIM-1 de la membrana cel·lular [26].

Apart d'aquests marcadors, en el ccRCC trobem altres tipus de molècules relacionades amb alteracions en les vies de senyalització implicades en el desenvolupament d'aquesta neoplàsia, tals com el VHL, que

intervé en la hipòxia i l'angiogènesi, podent ser considerades també com a biomarcadors del ccRCC i que es comentaran a la part de les vies de senyalització implicades en el desenvolupament del ccRCC.

2.2. VIES DE SENYALITZACIÓ IMPLICADES EN EL DESENVOLUPAMENT DEL ccRCC

Les principals alteracions moleculars registrades en el ccRCC corresponen a la via dels elements de resposta a hipòxia. Aquesta via és regulada per diferents factors, però de tots ells, el que presenta un paper més rellevant és el pVHL, proteïna que es troba inactiva en un elevat nombre de casos hereditaris i esporàdics del ccRCC. Així s'ha observat que el 100% dels casos hereditaris tenen una mutació en un dels al·lels de VHL, mentre que només en una part dels casos esporàdics de ccRCC s'han descrit mutacions en aquest gen [4].

Altres alteracions moleculars han estat documentades en el ccRCC, encara que de forma menys freqüent, tal com alteracions en proteïnes del cicle de Krebs o elements de la via mTOR, que de forma paral·lela, poden acabar afectant proteïnes de les vies de resposta a l'hipòxia.

2.2.1. Via de resposta a hipòxia: VHL-HIF

El síndrome de von Hippel-Lindau, és una malaltia rara hereditària de caràcter autosòmic dominant, que pot donar lloc a angiomes retinals, hemangioblastomes del SNC, feocromocitomes i ccRCC. En aquest síndrome, un dels dos al·lels del gen supressor de tumors VHL es troba mutat, apareixent la malaltia quan s'inactiva o es silencia l'al·lel normal restant [6]

El gen VHL codifica per la proteïna VHL (pVHL), donant lloc a dues isoformes: la pVHL₃₀ i una variant més curta, la pVHL_{18/19} [13].

pVHL actua com un supressor tumoral, al unir-se als factors induïbles per hipòxia HIF- α i permetre la seva ubiquitinització, impedit així que aquests actuïn promovent la transcripció de gens de resposta a la hipòxia. Mutacions en pVHL porten com a resultat final l'acumulació de HIF [29].

2.2.1.1. Funcionament de la via VHL-HIF

En condicions d'hipòxia, la subunitat HIF α heterodimeritza amb HIF β , translocant-se al nucli i juntament amb el coactivador p300 s'uneix als HRE (*Hypoxia Response Elements*) presents als promotors dels gens de resposta a la hipòxia, promovent la seva transcripció [6,13,19,30].

En condicions de normòxia, pVHL s'uneix a les elonguines B i C, juntament amb cul2 (una ubiquitina lligasa) i la Rbx (una ubiquitina transferasa) donant lloc al complex d'ubiquitinització SCF. La unió de pVHL del complex SCF amb HIF α permet que aquesta sigui ubiquitinada i degradada via proteasomal [6,13].

Per tal de què pVHL s'uneixi a HIF α i pugui promoure la seva degradació cal què prèviament HIF α estigui hidroxilada en certs residus. Així en condicions de normòxia HIF α presenta la hidroxilació de dues prolines i de dues asparagines en un procés dependent dels nivells d'oxigen i d'oxoglutarat, realitzat per

una prolil-hidroxilasa i una asparagina-hidroxilasa respectivament. Mentre que la hidroxilació de la prolina és necessària per tal de què pVHL s'uneixi a HIF α i pugui promoure la seva degradació, la hidroxilació de l'asparagina bloqueja la interacció de HIF α amb el coactivador p300, impedit d'aquesta forma la transcripció dels gens induïbles per hipòxia [6,13].

Les cèl·lules deficientes en pVHL, es comporten igual que davant condicions hipòxiques, acumulant HIF α hidroxilada, la qual dimeritza amb HIF β , i activant d'aquesta forma la transcripció dels gens de resposta a hipòxia anteriorment esmentats (Figura 4B) [6,13].

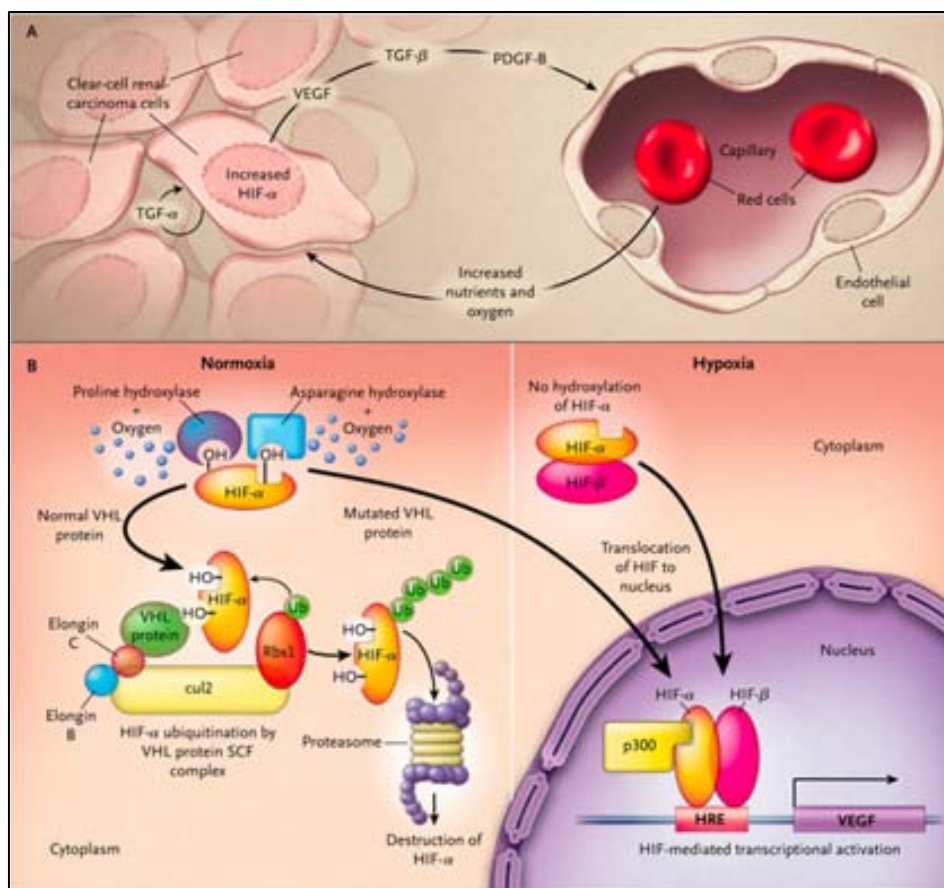


Figura 4: Paper de la via de resposta a la hipòxia en el desenvolupament del ccRCC

(A) Efectes cooperatius entre les cèl·lules renals tumorals de ccRCC i la vasculatura adjacent

(B) Paper de pVHL i HIF en la via pVHL-HIF en condicions de normòxia (panell esquerre) i d'hipòxia (panell dret) (Extret de *Cohen et al., 2005*) [6]

Així s'ha observat que en el ccRCC, els factors induïbles per hipòxia α (HIF- α) s'acumulen, resultant en la sobreexpressió de proteïnes que normalment s'indueixen sota condicions d'absència de oxigen. Entre aquestes trobem:

- Proteïnes implicades en l'angiogènesis (VEGF).
- Proteïnes implicades en el creixement cel·lular (TGF- α , TGF- β i PDGF).
- Proteïnes implicades en la captació de glucosa (GLUT-1).

- Proteïnes implicades en el balanç àcid-base (CAIX).

La sobreexpressió de TGF- β , VEGF i PDGF actuarà sobre les cèl·lules vasculares pròximes, incrementant l'angiogènesis tumoral; promovent d'aquesta forma l'increment de la captació dels nutrients addicionals per les noves necessitats energètiques d'aquestes cèl·lules [6]. TGF- α tindrà un efecte autocrí sobre la cèl·lula, activant el receptor EGFR (*Epithelial Growth Factor Receptor*) i generant un increment de la proliferació i la supervivència cel·lular (Figura 4B) [6].

2.2.1.2. Paper del Factor Induïble per Hipòxia (HIF) en el ccRCC

Existeixen tres isoformes de HIF α (HIF-1 α , HIF-2 α i HIF-3 α) essent les dues primeres les millor caracteritzades. Malgrat la similitud mostrada entre les isoformes HIF-1 α i HIF-2 α , s'ha observat que les funcions entre aquestes dues no són totalment redundants entre elles. Així s'ha vist que HIF-1 α s'associa a la regulació de gens implicats en vies del metabolisme glucídic com: SLC2A1 (GLUT1), LDHA, BNIP3; mentre que HIF-2 α és responsable de la transcripció de gens associats amb la proliferació i diferenciació: TGF α , CCND1 (ciclina D1) i Oct4 [30].

Mentre que a tots els ccRCC sembla donar-se una sobreexpressió de HIF-2 α , en un terç dels casos no s'expressa HIF-1 α , degut a la pèrdua del braç llarg 14q, punt on resideix el locus de HIF-1 α [30].

Experiments en línies derivades de RCC que expressaven la isoforma salvatge de pVHL i en les que es suprimia l'expressió de HIF-1 α , mostraven un increment en el seu creixement. De la mateixa manera, la sobreexpressió de HIF-1 α a aquestes línies, les retornava a les taxes de proliferació usuals.

Aquest fet fa que molts autors considerin el paper de HIF-1 α com a supressor de tumors en el desenvolupament del càncer renal mentre que HIF-2 α seria un element clau per la progressió del càncer renal [30].

Així mateix, ambdues isoformes de HIFs tenen papers diferencials en la regulació de l'activitat c-Myc. Els tumors que només expressen HIF-2 α presenten una major activitat c-Myc i una major taxa de proliferació respecte als que expressen tant HIF-1 α i HIF-2 α [19].

Malgrat que l'acumulació de HIF és important per la patogènesis i la progressió tumoral, no és suficient per induir la tumorigènesis en ccRCC per sí sola, ja que dins dels casos de pacients afectats pel Síndrome de VHL només un petit subgrup d'ells generen ccRCC. D'igual forma en un 25-50% dels cassos esporàdics de ccRCC no s'han observat alteracions en el gen VHL. La implicació d'altres gens que predisposarien a la tumorigènesis del ccRCC (afectant a elements comuns a la via de VHL) o bé mitjançant altres mecanismes d'inactivació de VHL explicarien aquest fenomen [13].

2.2.2. Altres vies afectades per VHL i alterades en el ccRCC

2.2.2.1. pVHL i efectes en la formació de cilis

Les cèl·lules epitelials del túbul proximal renal es caracteritzen per presentar cilis primaris que es projecten des de la superfície apical cap al lumen renal. Sembla ser que la inactivació dels dos al·lels de VHL s'associa a la pèrdua de cilis, observant-se en ccRCC associats a la pèrdua de pVHL una marcada reducció en la formació de cilis quan són comparats amb altres carcinomes. La pèrdua d'aquests cilis causa desregulacions de les vies de senyalització cel·lular i la generació de cists i tumors. Moltes de les vies de senyalització relacionades amb la tumorigènesis es localitzen en aquesta zona apical o bé estan espacialment organitzades per aquesta estructura, tals com la via Wnt, hedgehog i PDGF [30].

2.2.2.2. pVHL i regulació de la matriu extracel·lular

La matriu extracel·lular (ECM, *ExtraCellular Matrix*) és un complex estructural que envolta a les cèl·lules i els hi dóna suport. Està constituïda per proteoglicans, àcid hialurònic, glicoproteïnes (entre les que cal destacar la fibronectina) i diferents tipus de col·làgens. La seva formació s'inicia amb la unió de la fibronectina a receptors de superfície cel·lular tals com l'integrina $\alpha 5 \beta 1$. A continuació es recluten diverses proteïnes als dominis citoplasmàtics d'aquestes integrines, actuant com a nexes amb el citoesquelet d'actina. Fenòmens de contractilitat cel·lular generats pel citoesquelet acaba de dirigir tot el procés cap a la formació de la matriu fibril·lar estable [31]. La pèrdua de la integritat de la ECM ha estat associada a la progressió tumoral i metàstasi, al facilitar una ruta per les vesícules sanguínies als tumors infiltrants durant l'angiogènesi [30,32].

Diferents estudis han evidenciat que pVHL actua sobre la fibronectina i el col·lagen IV, mantenint la constitució de la ECM i dificultant els processos d'invasió cel·lular [30].

S'ha descrit que línies cel·lulars renals deficientes en pVHL tenen defectes en l'assemblatge de la fibronectina, així com que la reintroducció exògena d'aquesta pVHL restaura parcialment la capacitat de formar una matriu de fibronectina en les mateixes línies [33]. Aproximacions fetes mitjançant immunoprecipitació, fraccionament cel·lular i colocalització indiquen que la interacció entre pVHL i la fibronectina és directa, donant-se a les regions de la membrana plasmàtica [30,32,33]. D'altra banda, mitjançant espectrometria de masses s'ha observat que pVHL també s'uneix directa al col·lagen IV quan està hidroxilat, concordant també en què molts defectes en la formació de la ECM venen generats per problemes en la unió d'aquest col·lagen [34].

Malgrat que existeix una interacció entre pVHL amb el col·lagen IV i la fibronectina, encara queda per esbrinar com pVHL pot actuar sobre components de la matriu extracel·lular, al manca de seqüències de secreció cel·lular i al no presentar immunoreactivitat extracel·lular [34].

Tot això fa que tumors alterats en pVHL presentin una elevada vascularització, una matriu extracel·lular remodelada i una gran invasivitat. Per contra, els tumors amb alteracions que causin l'acumulació de les HIF, tenen nivells elevats de VEGF, malgrat estar poc vascularitzats [30].

De forma paral·lela, les vies activades per pVHL, s'encarreguen també de regular les metaloproteïnases de la matriu extracel·lular (MMPs), implicades en el reciclatge d'aquesta. Així línies cel·lulars deficientes en pVHL mostren increments en l'expressió de les metaloproteïnases MMPs 2 i 9, fet reflectit amb l'increment de la seva invasivitat en matrigel [30].

S'ha registrat també que la inactivació de pVHL disminueix les unions adherents de la E-cadherina, estimulants la invasivitat en el RCC. De la mateixa manera, l'activació de la via de les HIF causada per la pèrdua de pVHL disminueix els nivells de ocludina i claudina, les quals formen part de les unions estretes cel·lulars [30].

2.2.3. Via PI3K /Akt i PTEN

En eucariotes superiors aquesta via de senyalització regula diferents processos cel·lulars tals com: metabolisme, supervivència, apoptosi, creixement i migració, apart d'altres funcions més específiques que depenen del context cel·lular [35].

La PI3K (fosfatidilinositol 3-quinasa) i PTEN són respectivament els principals reguladors positius i negatius de la via PI3K/Akt, trobant-se freqüentment mutades en càncers humans. S'ha descrit en un elevat nombre de càncers, una activació constitutiva d'aquesta via, associada a la pèrdua d'expressió de PTEN, entre els que hi ha el RCC [36]. La pèrdua de funció de PTEN ha estat associada de forma més concreta a ccRCC d'estadiatge avançat, observant-se que pacients de ccRCC amb baixa expressió de PTEN tenen una mortalitat pròxima al 90% durant els 5 primers anys després del tractament, mentre que en els que la expressen, aquesta es redueix al 45% [37].

Les PI3Ks són una família de quinases lipídiques citosòliques que fosforilen el grup 3'-hidroxil dels fosfatidilinositols i fosfoinositols, trobant-se subdividida en tres classes (I-III) en funció del substrat sobre el qual actuen. De totes elles s'ha observat que la classe I de PI3K (i de forma més concreta subclasse IA de PI3K) són les que tenen un paper essencial i rellevant en el càncer.

En resposta a senyals extracel·lulars, la PI3K és reclutada cap als receptors tirosina quinasa (RTKs) prèviament activats. Aleshores les PI3Ks actives fosforilen el PIP₂ (fosfatidilinositol-4,5-bisfosfat), generant el PIP₃ (fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfat). Aquest procés és revertit per la fosfatasa lipídica PTEN, que s'oposa de forma directa al paper de la PI3K al defosforilar el PIP₃ i obtenir de nou el PIP₂.

PIP₃ té la propietat d'unir-se als dominis d'homologia a plekstrina (PH) presents en determinades proteïnes, reclutant-les d'aquesta forma a la membrana plasmàtica i transduint les senyals a la via. Un dels efectors centrals activats per la PIP₃ és la Akt. El domini PH de Akt fa que aquesta proteïna s'uneixi a PIP₃, quedant reclutada a la membrana plasmàtica, on serà fosforilada a la Thr308 per la quinasa PDK1 i a la Ser473 pel complex mTOR (mTORC2) [35]. Akt pot ser també fosforilada per altres quinases, entre

les quals hi ha CK2, que fosforila la Ser129 donant com a resultat una activació més sostinguda de la via, encara que no se sap si causada per un increment de l'activació de Akt, o bé actuant com a mecanisme protector de la seva defosforilació per PTEN [38,39].

Akt fosforila una gran varietat de substrats implicats en apoptosi, cicle cel·lular, traducció proteica o el metabolisme de glucosa entre d'altres.

Així se sap que la fosforilació de FOXO (una activador de apoptosi i inhibidor de cicle cel·lular) per Akt, fa que aquest quedi retingut al citoplasma, causant un increment de la proliferació i de la supervivència cel·lular [35].

La fosforilació per Akt també actua sobre TSC2, que forma en condicions normals un complex amb TSC1. El complex TSC1/2 inhibeix l'activitat de la Rheb, una proteïna G petita essencial per l'activació del complex mTORC1, i que com es comenta al següent apartat està implicat en la traducció proteica i el creixement cel·lular. La fosforilació de la TSC2 per Akt fa que el complex TSC1/2 redueixi el seu efecte inhibitor sobre Rheb, donant lloc a una activació de la via mTOR [35].

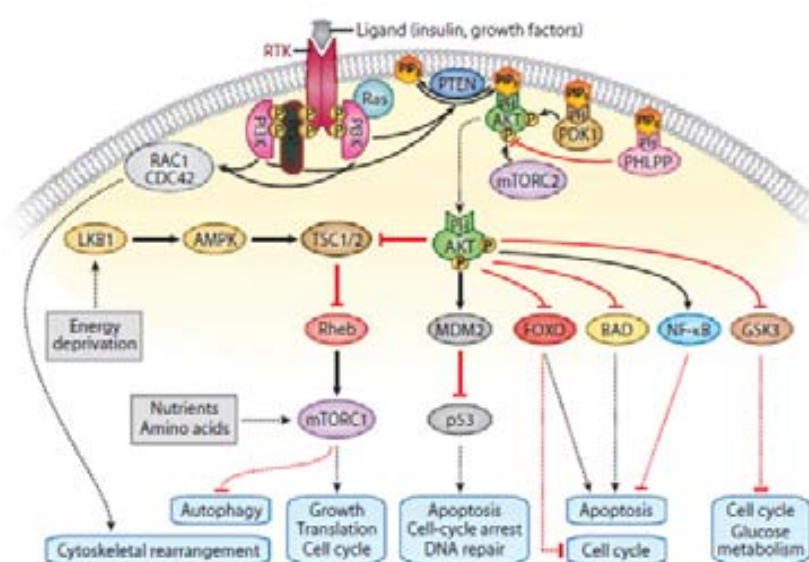


Figura 5: Via d'activació de la PI3K.

L'activació dels receptors tirosina quinasa (RTKs) recluten al torn quan activen la PI3K, generant un increment dels nivells de fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfat (PIP₃). El PIP₃ recluta diferents proteïnes a la membrana unint-se als seus dominis PH, entre les quals cal destacar Akt, PDK1 o la fosfatasa PHLPP. La Akt unida a la membrana, és fosforilada per PDK1 i el complex mTORC2, activant-la i fosforilant diferents substrats, activant o inhibint-los, donant lloc a creixement, supervivència i proliferació cel·lular per diferents mecanismes. L'activació del complex mTORC1, és inhibida per l'acció del complex TSC1/2, el qual és regulat per l'Akt i per la AMPK.

Figura adaptada de Chalnoub et al. [35]

La implicació de Akt en l'apoptosi cel·lular es dona a través de 3 proteïnes diferents: BAD, MDM2 i NF-κB. D'una banda la proteïna iniciadora de l'apoptosi BAD (*Bcl-2-Associated Death promotor*) és inhibida per Akt, mentre que MDM2 (*murine double minute 2*), proteïna que promou la degradació de la p53, és

activada en fosforilar-se per Akt. NF- κ B, en canvi és inactivada per Akt, causant a l'igual que en els anteriors casos, la inhibició de l'apoptosi cel·lular.

Akt està també implicada en el metabolisme glucídic, al fosforilar la GSK3, inhibint-la i impedit el seu paper en el metabolisme de la glucosa [35].

2.2.4. Via mTOR

Tal com s'ha mencionat, mTOR actua com a un regulador central del mecanisme de la traducció proteica, en funció de les disponibilitats energètiques, dels factors de creixement i d'oxigen de les cèl·lules.

S'ha vist que situacions de hipòxia disminueixen l'activació de la via mTOR, causant una reducció de les fosforilacions de 4E-BP1 i de S6K, reduint la traducció proteica [35,40].

Sembla ser que la regulació de mTOR per hipòxia depèn també del complex TSC1/TSC2, el qual actua a upstream de mTOR, activant o inhibint-la en funció de la disponibilitat de nutrients i factors de creixement [35]

Així tal com passa en les línies deficientes en pVHL, les deficientes en TSC2 presenten augments dels nivells de HIF-2 α , especialment sota situacions de deprivació. S'ha proposat que aquesta acumulació de HIF seria causada per l'increment de l'activitat mTOR, donant lloc a l'estabilització de HIF- α . La qual cosa contribuiria a l'expressió de gens relacionats amb la hipòxia i afectant al desenvolupament del ccRCC. Així tractaments d'aquestes línies amb inhibidors de mTOR com rapamicina, causen un retorn als nivells normals de HIF [30,40].

2.2.5. Via JAK-STAT

La via de les JAK-STAT intervenen en la proliferació, diferenciació i apoptosi cel·lular. Entre les diferents STAT cal destacar l'STAT1, la qual s'ha observat que és activada després de patir una doble fosforilació en el residu Tyr701 per part de una JAK quinasa i una altra en el residu Ser727, després de l'activació d'altres rutes de senyalització tas com la via de les ERK1/2.[41]

Estudis previs han demostrat que en carcinomes renals cel·lulars papil·lars i ccRCC, la isoforma STAT1 es troba sobreexpressada i fosforilada en la Ser727. Malgrat que es desconeix quina quinasa és la que fosforila Ser727, s'ha observat que en tumors de Wilms, la fosforilació d'aquest residu és realitzada per la proteïna quinasa CK2 [42].

De la mateixa manera, la supressió de STAT1 o la inhibició de la fosforilació en la Ser727, causen un increment de la sensibilització de les línies a radiacions ionitzants actuant com a una possible diana terapèutica per tal d'incrementar l'efecte dels tractaments radioterapèutics [43].

2.2.6. Cicle de Krebs

Determinats gens que codifiquen per enzims del cicle de Krebs també participen en la tumorigenesis renal. Entre aquests cal destacar mutacions en la succinat deshidrogenasa (SDH) i la fumarat hidratasa (FH) associada a carcinomes renals [30].

La SDH catalitza la conversió del succinat a fumarat, mentre que la FH converteix aquest fumarat a malat. L'acumulació de succinat o fumarat en aquesta via a causa de mutacions en els gens que les codifiquen, generen la inhibició d'una família de dioxigenases dependents de 2-oxoglutarat que estan implicades en la hidroxilació de HIF α . Com a conseqüència, pVHL no pot reconèixer HIF α i s'activen les vies de resposta a hipòxia.

Cal destacar que el trencament del cicle de Krebs ocasionat per les anteriors mutacions donen lloc a un increment compensatori de la captació de la glucosa i de la glicòlisis. D'aquesta forma, les alteracions metabòliques que afectarien als elements de resposta a hipòxia serien en part les responsables de l'acumulació de vesícules riques amb lípids i glicogen, donant l'aparença clara a les cèl·lules del ccRCC després del processat tissular. Així s'ha observat en models murins que mutacions en VHL causen que les cèl·lules hepàtiques mimetitzin les típiques vesícules de lípids i glicogen de les cèl·lules del ccRCC [30].

3. PROTEÏNA QUINASA CK2

3.1. ASPECTES BIOQUÍMICS GENERALS DE LA PROTEÏNA QUINASA CK2

La fosforilació reversible de les proteïnes és un dels principals mecanismes de regulació de la majoria de processos cel·lulars. Davant del fet que un terç de les proteïnes existents es troben fosforilades no és gens rar que es trobin centenars de quinases diferents codificades en el genoma humà [44–47].

De totes les quinases, les primeres en ser descrites varen ser la família de les caseïna quinases, presentant com a característica principal la capacitat de fosforilar la caseïna *in vitro*. Dins d'aquesta família, cal destacar la proteïna quinasa CK2, una quinasa d'ampli espectre que curiosament, es considera que *in vivo* no fosforila la caseïna, proteïna per la qual es va descobrir [45].

CK2 ha estat tradicionalment descrita com una Ser/Thr quinasa independent de missatger essencial per la viabilitat cel·lular, trobant-se ubiqüament expressada eucariotes, donant lloc a complexos tetramèrics, formats per les seves subunitats catalítiques i reguladores [45]. Malgrat això, en els últims anys, nous descobriments en CK2 han fet que s'anés canviant aquest concepte estàtic de CK2, cap a una visió molt més flexible i complexa d'aquesta proteïna quinasa.

Cal destacar, que CK2 és un enzim altament conservat entre les diferents espècies, constituïda en el cas dels mamífers per dues subunitats catalítiques (CK2 α i CK2 α') i dues de reguladores (CK2 β) podent donar lloc a tres possibles formes tetramèriques diferents: CK2 $\alpha\alpha\beta\beta$, CK2 $\alpha\alpha'\beta\beta$, CK2 $\alpha'\alpha'\beta\beta$ [46,48–52].

En altres organismes, tals com plantes i llevats, presenten una major diversitat de isoformes per les dues subunitats d'aquesta quinasa. Així en el model vegetal *Arabidopsis*, s'han identificat fins a quatre gens codificants per la subunitat catalítica (CK2 α A, CK2 α B, CK2 α C, CK2 α cp) i quatre per la subunitat reguladora (CK2 β 1, CK2 β 2, CK2 β 3, CK2 β 4) [53]. En llevats en canvi, presenten menys isoformes per a cada subunitat quan es comparen respecte als vegetals, presentant dues isoformes per la subunitat catalítica (CK2 α i CK2 α') i dues per la reguladora (CK2 β 1 i CK2 β 2) [54].

Les subunitats catalítiques CK2 α i CK2 α' (de 42 i 38 KDa respectivament) són molt semblants entre sí, variant només el seu extrem C-terminal, venint codificades per gens diferents. D'aquesta forma el gen CSNK2A1, present al cromosoma 20, codifica per la CK2 α , mentre que el CSNK2A2, situat al cromosoma 16, codifica per CK2 α' . La subunitat CK2 β (de 27 KDa), es caracteritza per no tenir cap mena d'homologia amb CK2 α ni tampoc amb cap altra proteïna existent [46]. Encara que CK2 α mostri activitat catalítica per si sola, la visió tradicional en aquest camp és que la subunitat CK2 β té un paper en la regulació de l'holoenzim, incrementant l'estabilitat de les subunitats catalítiques i modulant la selectivitat front determinats substrats [55].

No obstant això en l'actualitat està augmentant l'evidència que ambdós tipus de subunitats no estan sempre associades, suggerint que en les cèl·lules vives, la seva associació dinàmica i el marcatge del substrat depenent de la localització subcel·lular, són un possible punt de regulació en resposta a elements de senyalització [50].

La seqüència consens de fosforilació reconeguda per aquesta quinasa és S/T-XX-E/D, essent el residu acídic de la posició +3 (en general una E/D) indispensable, tenint la capacitat d'usar com a donador de fosfats tant l'ATP com el GTP, característica poc usual a la resta de proteïna quinases [46].

La proteïna CK2 s'expressa ubiqüament en una àmplia varietat de tipus cel·lulars i teixits eucariotes, considerant-se constitutivament activa, ja que no sembla estar subjecte a la una activació o desactivació per part d'altres quinases o missatgers secundaris més clàssics tals com el Ca^{2+} , el fosfatidil inositol o dels nucleòtids cíclics [46]. Existeixen però, diferents mecanismes en el què l'activitat de l'enzim pot ser modulada o dirigida cap a determinats substrats, al torn que en pot excloure d'altres, tals com la localització subcel·lular, la fosforilació o la interacció amb altres proteïnes [46,56,57].

3.1.1. Manipulació genètica de les subunitats de CK2

Per tal d'estudiar millor la funcionalitat de les subunitats de CK2 en les cèl·lules s'han realitzat diferents aproximacions basades en l'obtenció de models murins *knock out* en alguna de les subunitats, o bé la sobreexpressió o silenciament de l'expressió d'aquestes en diferents línies de mamífers o de llevats, obtenint resultats variables en funció del model utilitzat.

Així en llevats que presentaven disrupció de una de les subunitats catalítiques (podent ser CK2 α o CK2 α') continuaven essent viables, mentre que la manca simultània de les dues subunitats catalítiques era letal. Aquest fet indicava que una podia suplir la funció de l'altra, calent d'aquesta manera la presència de com a mínim una isoforma catalítica per la viabilitat cel·lular en aquest grup d'organismes. En canvi, la disrupció simultània de les dues subunitats CK2 β , no afectava a la seva viabilitat, indicant que en llevats la subunitat catalítica era suficient per la seva supervivència [55,58–60].

Models de ratolins transgènics en els que s'havia truncat CK2 α' , mostraven que els individus homozigots deficients en la subunitat CK2 α' (CK2 $\alpha'^{-/-}$) malgrat continuar essent viables, presentaven problemes de espermatogènesis. Fet que suggeria que en mamífers, CK2 α podia compensar la pèrdua de la isoforma CK2 α' en les funcions elementals per la supervivència cel·lular [55,60].

No obstant a diferència dels llevats, en mamífers CK2 β té un paper essencial en la viabilitat cel·lular, ja que ratolins homozigots deficients en la subunitat reguladora (CK2 $\beta'^{-/-}$) són letals durant el desenvolupament embrionari, observant-se aquests embrions són reabsorbits al voltant dels dies 7 i 8 (Estadi 7.5) [55,60]. El fet que els intents per a obtenir cèl·lules mare homozigòtiques deficients per CK2 β hagin estat infructuosos, han donat lloc a la idea tradicional que en mamífers, CK2 β és indispensable per la viabilitat cel·lular [55,60].

Cal destacar que estudis recents de silenciament de les subunitats reguladores en línies tumorals humanes, han mostrat que per contra de l'observat en models murins, el silenciament de CK2 β , no compromet a la seva viabilitat, indicant que la subunitat reguladora és en aquestes línies necessària per altres activitats cel·lulars [50].

D'aquesta manera, mentre que en llevats l'activitat d'una sola subunitat catalítica (CK2 α o CK2 α') és suficient per a mantenir les funcions bàsiques de la cèl·lula; en mamífers CK2 intervindria en processos més complexos, precisant tant de les isoformes catalítiques com les reguladores, essent aquesta última no només necessària per la modulació de l'activitat catalítica, sinó també per la possibilitat que pugui intervenir en altres funcions independents de l'holoenzim.

3.2. ESTRUCTURA GENERAL I MOLECULAR DE CK2

Tal com anteriorment s'ha mencionat, CK2 es troba formant complexos tetramèrics constituïts per dues subunitats catalítiques unides a un homodímer de subunitats reguladores.

Malgrat que en mamífers es coneixen dues subunitats catalítiques diferents (CK2 α i CK2 α') cal mencionar que existeix una tercera isoforma, expressada a nivell de mRNA i designada com a CK2 α'' [61,62].

L'anàlisi de les seqüències aminoacídiques així com l'obtenció durant els últims anys de models cristal·logràfics d'alta resolució, tant de les subunitats de CK2 lliures com de l'holoenzim han permès elucidar moltes de les propietats d'aquesta quinasa, així com les interrelacions entre les subunitats i la d'aquestes amb el seu substrat.

A finals del 2008 hi havia dipositades unes 40 estructures de CK2 (incloent-hi tant subunitats com holoenzims) a la basa de dades del *Protein Data Bank* (PDB) [63]. El model de CK2 α amb millor resolució, té l'inconvenient de no presentar un *ATP binding site* actiu, per la qual cosa s'usa el model de blat de moro de CK2 α unida a ATP com a millor estructura de CK2 α en estat funcional [63–65] (Figura6). De totes les estructures existents, es consideren com a models de referència per CK2 β , la estructura de *hsCK2 β ¹⁻¹⁸²* [66] (que malgrat tenir una alta resolució, li manca l'extrem C-terminal) així com *hsCK2 β ¹⁻¹⁹³* [67] (de menor resolució) i amb l'extrem C-terminal, permetent completar el model de la subunitat reguladora (Figura7).

Fins al dia d'avui, només s'ha pogut obtenir una estructura de l'holoenzim, que malgrat presentar una menor resolució, s'usa també com a model de referència, essent complementat pels altres models [68] (Figura 8).

3.2.1. Estructura de CK2 α

CK2 α pertany a la família de les proteïnes quinases eucariotes (EPK, *Eukaryotic Protein Kinases*). Estructuralment CK2 α està constituïda per dos dominis de plegament: el domini N-terminal i el domini C-terminal els quals alberguen entre ells el lloc actiu.

El domini N-terminal és el de menor mida i es troba constituït per 5 fulles beta antiparal·leles (β 1- β 5), seguides d'una llarga hèlix alfa (α C) que precedeix a l'anomenada regió interdomini [63].

El domini C-terminal, de major mida, està format essencialment per hèlixs alfa a excepció de dues fulles beta (β 7/ β 8 i β 6/ β 9) presents a la regió interdomini i que són essencials per la seva funció. La majoria de

les hèlixs d'aquest domini estan altament conservades en les EPK, essent tres d'elles (α H, α I, α J) característiques del grup de les CMGC de les EPK. Aquest fet fa que CK2 α se la consideri com un parent dels membres del grup de les CMGC, grup constituït per vàries famílies de quinases: les quinases dependents de ciclines (CDK), les quinases activades per mitògens (MAPK), les glicogen sintases quinases (GSK) i les quinases semblants a CDK [63,69].

L'estructura de CK2 α es pot subdividir en un seguit de regions, cadascuna d'elles responsable de les principals característiques funcionals d'aquesta subunitat, tals com: la seva activitat catalítica constitutiva i les zones de reconeixement de substrat i cosubstrat que es comenten a continuació.

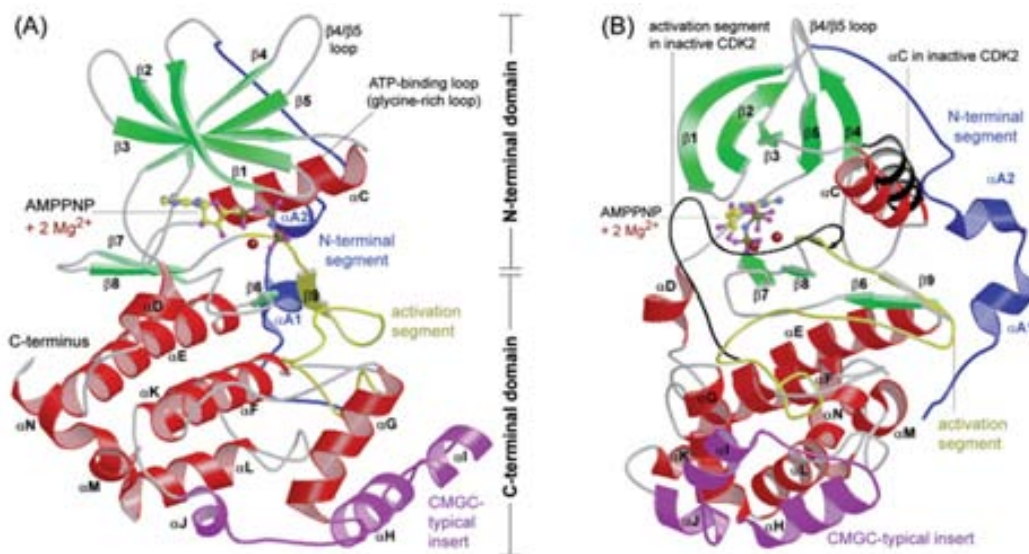


Figura 6: Estructura molecular de la subunitat catalítica CK2 α :

(A) Estructura de CK2 α de blat de moro (*Zea mays*) formant un complex amb AMPPNP i Mg^{2+} . **(B)** Imatge anterior girada 90° sobre el seu eix vertical en la que a més es mostren en negre les conformacions inactives de regions que es troben presents en altres quinases de la família de les EPKs i no en CK2 α (hèlix α C, inactiva en la CDK2). Les dues figures mostren els dominis N-terminal i C-terminals separats per la regió interdomini. En verd s'indiquen les fulles beta de l'estructura, situades majoritàriament al domini N-terminal, mentre que les hèlixs alfa es troben principalment al C-terminal i s'indiquen majoritàriament en verd. El segment d'activació es mostra de color groc al torn que en blau s'indica l'extrem N-terminal.

3.2.1.1. Bases estructurals de les propietats de CK2

Funció catalítica: el *loop* catalític de CK2 α

El procés de transferència específica d'un fòsfat d'alta energia d'un nucleòtid trifosfat a un substrat acceptor és un procés químicament complex, en el que cal reconeixement, unió, l'alineació correcta de les dues molècules i l'estabilització de l'estat de transició. Aquestes funcions intervenen diferents cadenes laterals dels diferents dominis, fet pel qual totes les EPK actives presenten una mateixa semblança conformacional [63].

S'ha observat que en CK2 α , per permetre l'alineació correcta dels substrats, cal contrarestar la càrrega negativa del ATP, mitjançant grups carregats positivament (2 ions Mg^{2+} i les Lys68 i Lys158). Al seu

torn, la Lys68 cal que sigui estabilitzada per la Glu81 de l'hèlix α C. La Lys158 forma part de l'anomenat *loop* catalític, que comprèn els residus Arg155 i Asn161 i que en CK2 α és conformacionalment invariable.

Per la unió del Mg²⁺ cal l'acció de dos residus més: Asn161 i Asp175 i que constitueixen part de l'anomenat *loop* d'unió al magnesi.

D'aquesta manera, la unió del *loop* catalític, el *loop* d'unió al magnesi, la fulla β 9 i el *loop* P+1 donen lloc al que es designa com al segment d'activació, necessari per les funcions abans esmentades [63].

Bases estructurals de l'activitat constitutiva de CK2 α

L'activació de les proteïnes de la família de les EPK ve controlada per modificacions postraduccionals (com fosforilacions) i canvis conformacionals al ja descrit segment d'activació.

CK2 α presenta una alteració en la seqüència del segment d'activació (concretament en el *loop* d'unió a magnesi) en la que el motiu DGF present en les EPK és substituït pel DWG. Aquest fet és important, ja que en la resta de quinases, la fenilalanina de la seqüència DGF, pot generar un gir (anomenat *DGF-out*) que inactivaria l'enzim [63].

Així la forta estabilització d'aquesta regió DWG de CK2 α per aquestes restriccions intramoleculares fixa la seva conformació activa i genera la característica activitat constitutiva de CK2, fent que la seva activitat passi a dependre d'altres factors externs com: la fosforilació i desfosforilació, la unió a segons missatgers o la coordinació amb diferents proteïnes reguladores[63].

Regions implicades en el reconeixement de substrat

El fet pel qual CK2 reconeix substrats amb la seqüència consens S/T-(E/D)-X-E/D, preferint residus amb càrrega negativa a les posicions P+1 i P+3 de la serina o treonina fosfoacceptora encara no ha estat totalment elucidat [63].

Molts membres semblants a CK2 α del grup de les CMGC, presenten punts d'unió a anions en el segment d'activació, que es creu que podrien albergar els grups fosfats de residus fosforilables presents al *loop* d'activació. El fet que CK2 α no presenti aquests residus fosforilables, però mantingui la propietat d'albergar dos sulfats en aquesta regió, concordaria amb el fet que podria actuar com a punt de reconeixement dels residus amb càrrega negativa de la seqüència consens de CK2 [63].

Regions implicades en la especificitat de cosubstrat

CK2 presenta una especificitat cosubstrat dual, ja que pot usar com a donador de fosfats tant ATP com GTP amb la mateixa eficiència.

La CK2 α presenta una substitució de la Ile66, present en la resta de EPK, per la Val66, permetent que es puguin estabilitzar els ponts d'hidrogen dels dos tipus de nucleòtids. Canvis en els residus d'aquest punt

que mimetitzen els que es troben en les CAPK causen un canvi de pla, fent que tingui preferència per l'ATP front el GTP [63,65].

Formació de l'holoenzim i inhibició no competitiva: Loop $\beta 4/\beta 5$ de CK2 α

El loop $\beta 4/\beta 5$ genera un espai que és el punt d'unió de CK2 β o de petites molècules. El loop $\beta 4/\beta 5$ forma part de la interfase CK2 α /CK2 β i pot adoptar una conformació oberta, però també una de tancada. S'ha observat que aquesta conformació tancada és incompatible amb la unió de CK2 β , essent necessària la obertura del *loop* per la formació de l'holoenzim [67]. Aquest fet ha hipotetitzat que la dificultat de dissociar les subunitats de l'holoenzim (amb una constant de dissociació $K_d = 12,6$ nM) podria venir explicat per la realització d'aquest canvi conformacional [63,67].

Així mateix s'ha observat que quan presenta una conformació tancada poden unir-se molècules petites, causant un impacte inhibitori sobre CK2, implicant d'aquesta forma també la unió de CK2 β [63].

Molècules com el glicerol s'uneixen a aquesta regió, causant un efecte no massa evident per la seva mida reduïda, no obstant no passa el mateix amb altres compostos de mida major, que sí que són capaços d'inactivar l'activitat de CK2. La unió del dímer de CK2 β a CK2 α , protegeix aquesta regió, implicant d'aquesta manera la unió de les molècules inhibidores. Això fa que molts autors considerin que dins de la cèl·lula hi hauria una població de CK2 α lliure inactiva i una d'activa, la qual seria seleccionada específicament per CK2 β i estabilitzada per la seva funcionalitat [63].

3.2.1.2. Les subunitats catalítiques de CK2: Compensació funcional i especialització

Tal com s'ha dit anteriorment, malgrat estar molt relacionades, CK2 α i CK2 α' són producte de diferents gens. Molta literatura no fa distinció entre les diferents formes isoenzimàtiques de CK2, ja que les isoformes CK2 α i CK2 α' (i possiblement CK2 α'') tenen característiques enzimàtiques molt semblants, essent impossible distingir amb els assaigs de fosforilació quina isoforma contribueix a l'activitat sota investigació [45,70].

Així mateix s'ha observat que els dominis catalítics N-terminal de CK2 α i CK2 α' mostren 90% de identitat, explicant el fet pel qual aquestes isoformes presentarien activitats enzimàtiques semblants *in vitro* (incloent-hi taxes de *turnover* i especificitat de substrats) [45,70].

Els dominis C-terminal de les CK2 α i CK2 α' , a diferència del que passa amb els anteriors N-terminal, no estan gens relacionats entre ells. Malgrat tot, sí que s'ha observat que entre espècies els dominis C-terminal d'una mateixa isoforma estan altament conservats, suggerint l'existència d'alguna funció important en aquests dominis [45].

Molt poc es coneix del pseudogen CK2 α'' , però la seqüència aminoacídica deduïda seria més propera a CK2 α que no pas a CK2 α' . D'aquesta forma, els primers 353 residus (a excepció d'una Ala en la posició 127 de CK2 α'') són idèntics entre les dues subunitats, presentant-se les principals diferències en els 32 últims residus del C-terminal, clarament diferents entre les dues isoformes [45,55,62].

Aquesta elevada similitud entre les isoformes catalítiques explica els fenòmens de compensació funcional observats en diferents organismes models.

Així tal com s'ha esmentat anteriorment, malgrat que no s'han pogut obtenir *knockouts* de CK2 α (o CK2 α') en ratolins, sí que s'ha aconseguit *knockouts* de CK2 α' , observant-se que els homozigots deficients en CK2 α' continuen sent viables, suggerint que CK2 α (o CK2 α') podria compensar la seva manca. Malgrat això l'esterilitat observada en aquests mascles indicaria que CK2 α no pot suplementar totalment la funció de CK2 α' [45].

En llevats la manca de una de les dues isoformes de CK2 α (CKA1 i CKA2) fan que siguin viables, però no passa quan falten les dues, suggerint també una funció compensatòria. Igual com passava en ratolins, al·lels de CKA1 i CKA2 sensibles a temperatura donen lloc a diferents fenotips, causant alteracions tant en la mida de les colònies com a la morfologia cel·lular, indicant així que en llevat, igual com passa en mamífers, la compensació funcional de les subunitats catalítiques no acaba tampoc de ser total [58,71,72].

3.2.2. Subunitat reguladora CK2 β

A diferència de les subunitats catalítiques, en humans només es coneix una forma de subunitat reguladora (CK2 β) [55,73]. CK2 β no presenta una gran homologia amb les subunitats reguladores d'altres proteïna quinases, però és altament conservada entre les diferents espècies. Així per exemple, la seqüència de CK2 β és idèntica en ocells i en mamífers. Diferents estudis han conclòs que el dímer de CK2 β constituïria el nucli de l'estructura tetramèrica de la forma holoenzimàtica de CK2 (Figura 7, B) [55].

3.2.2.1. Bases estructurals de les propietats de CK2 β

La principal propietat estructural de CK2 β és la presència de un dit de zinc, necessari per a la dimerització de les subunitats reguladores i que recorda a una regió del factor d'elongació de la transcripció TFIIS [63].

Estructuralment, el monòmer de CK2 β presenta un nucli de dos dominis. El domini N-terminal és el de major mida i es troba constituït principalment per hèlixs alfa, mentre que el C-terminal és el domini de menor mida i presenta com a estructures bàsiques la fulla beta i el ja mencionat dit de zinc [63].

D'aquesta forma les 3 regions més importants a destacar en cK2 β són: els dits de zinc, el loop acídic i la interfase d'interacció amb CK2 α [63].

Dits de Zinc de CK2 β

El dit de zinc genera una interfície entre les dues subunitats que permet la dimerització de CK2 β , procés essencial per la constitució de l'holoenzim. Formes mutades de CK2 β en aquesta regió no poden dimeritzar entre elles, així com no poden coordinar la unió amb CK2 α [74]. Estan formats per 4 cisteïnes coordinades mitjançant ponts disulfur amb un amb un àtom de Zn situat just al centre [63]. La

importància funcional d'aquesta estructura explica perquè tant les cisteïnes com les distàncies existents entre elles estan perfectament conservades al llarg de l'evolució [63].

L'àtom de Zn, genera una àrea hidrofòbica al voltant del seu eix de rotació, originant un nucli hidrofòbic entre les dues subunitats reguladores. Aquest nucli presenta una interfase petita (540 Å) donant lloc a un dímer de CK2β allargat, amb una gran superfície respecte al seu pes molecular. Aquesta gran superfície permet que pugui ser un potencial punt d'ancoratge per altres substrats, fet pel qual cada cop més es parla de CK2β com a un *multivariant docking partner* per part d'altres substrats [63].

Interfase d'unió de CK2β amb CK2α

La dimerització de CK2β és essencial per la posterior coordinació amb dues subunitats catalítiques de CK2. D'aquesta manera les hèlix αF així com la cua C-terminal de CK2β, donen lloc a una interfase d'unió amb CK2α rígida, de només 832 Å, que explica el caràcter no permanent d'unió de l'holoenzim.

Cal esmentar que en la cua de CK2β es troben dues petites fulles beta antiparal·leles (β4 i β5) que no arriben a contactar amb CK2α [63].

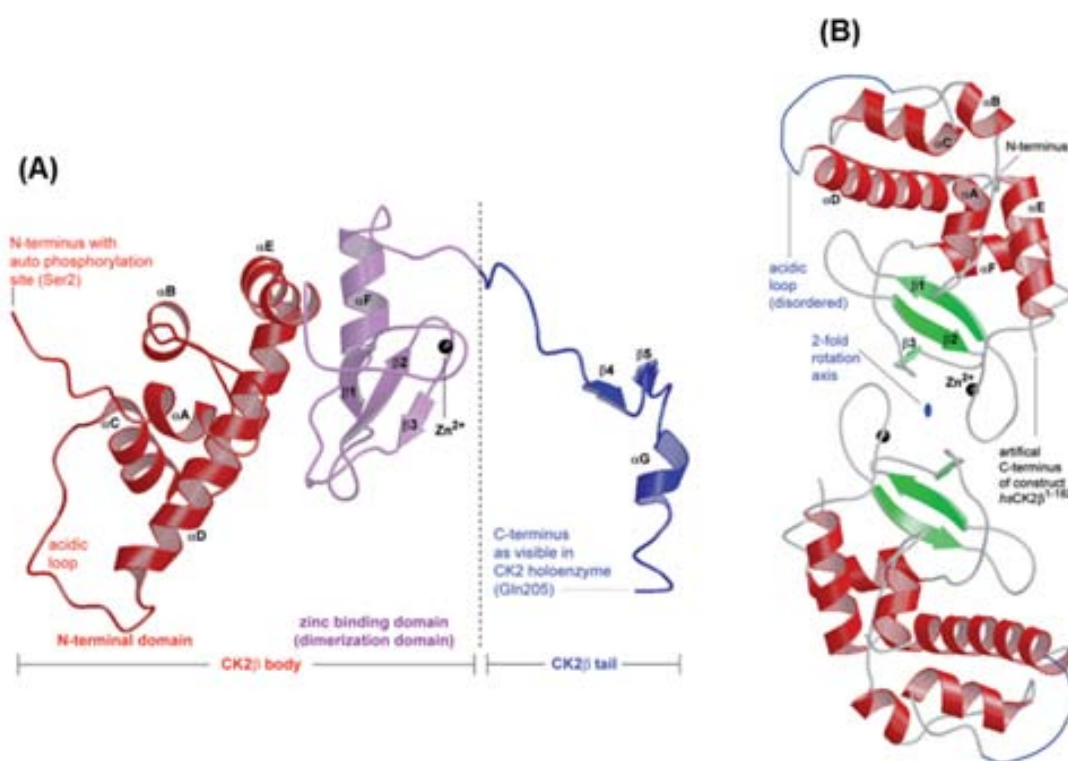


Figura 7: Estructura molecular de la subunitat i del dímer CK2β:

(A) Estructura de CK2β extreta a partir de l'estructura holoenzimàtica humana de CK2. En aquesta es mostra el cos de CK2β, constituït per el domini N-terminal de hèlixs alfa (vermell) i el domini de dimerització del dit de zinc (lila), seguit de la cua C-terminal (blau). S'indiquen també el loop àcidic i el lloc d'autofosforilació (Ser2) de l'extrem N-terminal **(B)** Estructura humana del dímer CK2β (hsCK2β1-182) on es mostra la regió de dimerització (verd) amb l'eix de rotació generat en la dimerització. En blau es marquen els loops àcids de cadascuna de les subunitats.

Loop acídic de CK2 β com a punt d'agregació

Entre les hèlix α C i α D de CK2 β hi ha un loop acídic que interacciona amb el loop P+1 de la CK2 α , generant una estructura holoenzimàtica simètrica. Es creu que aquesta interacció, intervindria en la formació d'agregats, associant-se a la possible regulació de l'enzim per inactivació.

S'ha observat *in vitro* que les agregacions de l'holoenzim permetrien la fosforilació en *trans* de CK2 β [75]. El fet que *in vivo* hi ha fosforilació en *trans* de CK2 β , fa pensar que la formació d'aquestes estructures es dona en les cèl·lules vives. De la mateixa manera, es creu que el loop acídic actuaria com a punt d'ancoratge de l'holoenzim a altres molècules [63].

Contribució de CK2 β a l'estructura holoenzimàtica de CK2

Les estructures de CK2 β acabades de mencionar tenen com a principal paper la constitució del complex heterotetramèric de CK2. Diferents estudis han confirmat que durant l'assemblatge de les subunitats de CK2, la dimerització de CK2 β precedeix a la unió de les subunitats catalítiques, procés en el que els dits de zinc tenen un paper essencial (Figura 8, colorejat en verd) [76].

Aquest motiu està constituït per 4 cisteïnes (Cys109, Cys114, Cys137 i Cys140), permetent que un dímer de CK2 β formi el *core* del holoenzim [55,66,74]. Així mutacions en la Cys114 causa tant la pèrdua de l'estructura del dit de Zn com de la capacitat de dimerització de CK2 β , fallant també en la capacitat de interaccionar tant *in vivo* com *in vitro* amb CK2 α [55,74].

Les associacions de les subunitats catalítiques amb les reguladores de CK2 es dona pel domini regulador positiu de l'extrem C-terminal de CK2 β (figura 8, colorejat en lila) i que és el responsable de que CK2 β potenciï i estabilitzi l'activitat de CK2 [55].

Pel què fa al loop acídic de CK2 β (Figura 8, colorejat en vermell), en un primer moment es va creure que podria interaccionar amb un clúster bàsic present entre els residus 78 i 80 de CK2 α , actuant com una seqüència autoinhibitòria per CK2 α , tal com s'havia observat prèviament en altres quinases. La cristal·lització de l'holoenzim ha descartat aquesta hipòtesis, al trobar-se que aquestes regions es troben separades per més de 30Å [55]. S'ha vist en canvi que aquesta regió acídica de CK2 β , és el punt d'unió de les poliamines, es quals causen un increment de l'activitat de l'holoenzim *in vitro*. El fet que mutacions que redueixen les càrregues negatives d'aquest *loop*, generen una pujada de l'activitat basal de CK2 al torn que redueix la seva capacitat d'unió a poliamines, confirma l'important paper que desenvolupa aquesta regió en la regulació de l'activitat holoenzimàtica de CK2 [55,77,78].

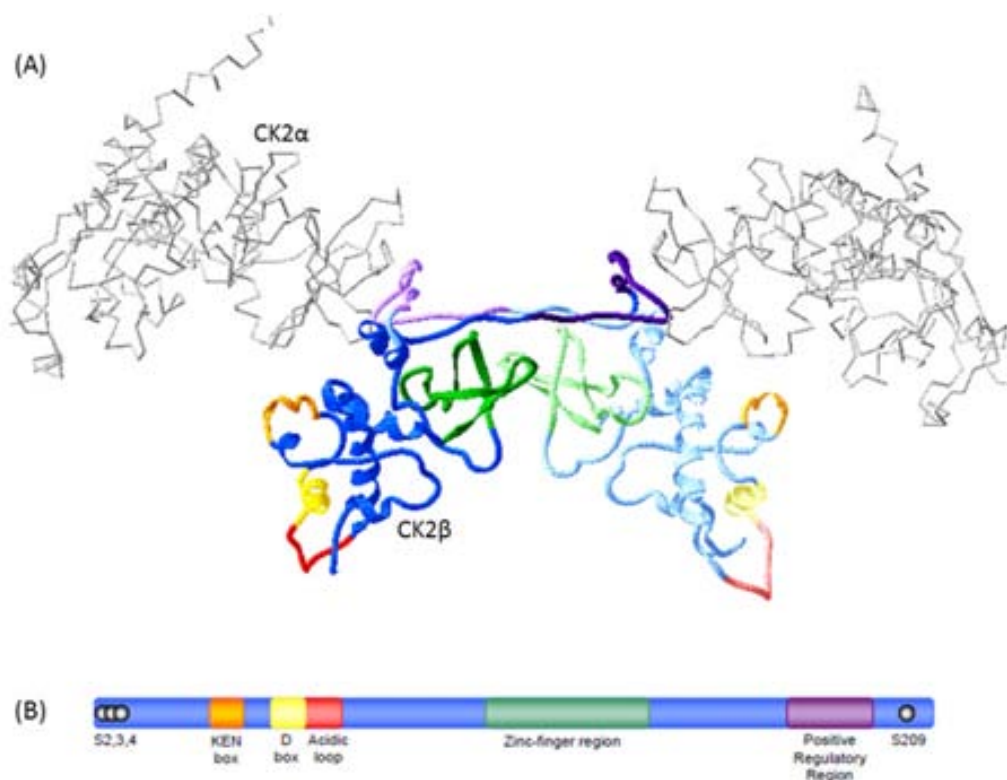


Figura 8: (A) Estructura cristal·logràfica d'alta resolució de l'holoenzim de CK2. Els esquelets de carbonis alfa de les subunitats catalítiques estan traçats en gris mentre que els dímers de CK2 β que formen el core del enzim estan representats en blau. Els motius importants estan acolorits com s'indica al diagrama inferior (B). **(B) Diagrama esquemàtic de CK2 β representant les regions més importants.** Les esferes fosques representen els llocs de fosforilació mentre que la caixa KEN (taronja) i la caixa D (groc) representen motius putatius de degradació. El loop acídic (vermell), punt d'unió a poliamines i involucrat en la modulació de l'activitat catalítica està situat de forma adjacent a la caixa D. Les regions del dit de zinc (verd) intervenen en la dimerització de CK2 β , mentre que la regió reguladora positiva (lila) permet l'unió amb la subunitat catalítica.

3.2.2.2. Altres regions funcionals de CK2 β

Llocs de fosforilació de CK2 β

L'extrem N-terminal de CK2 β , presenta una regió d'autofosforilació constituïda per les Ser2, Ser3 i Ser4. Inicialment mitjançant estudis cinètics, es va arribar a la conclusió que la fosforilació ocorria per un mecanisme intramolecular a través de les subunitats catalítiques del mateix holoenzim. No obstant això, actualment aquest mecanisme està contradit per la determinació de l'estructura tetramèrica de l'holoenzim, en la que es mostra que els extrems de N-ter estan localitzats a més de 40 Å del lloc actiu de les dues subunitats catalítiques. D'aquesta manera actualment s'hipotetitza la formació de estructures de CK2 de major ordre i que podrien explicar la fosforilació d'aquests residus [55]. Malgrat que el significat de la autofosforilació en aquesta regió roman desconeguda, estudis fets per Zhang suggereixen que serviria per incrementar l'estabilitat amb CK2 β [79].

Cal destacar que apart de la regió d'autofosforilació, CK2 β presenta a l'extrem C-terminal una Ser209 que és fosforilada tant *in vivo* com *in vitro* per p34^{cdc42} desconeixent-se encara el significat biològic que pot tenir aquesta fosforilació [55,80].

CK2 β : Motius de degradació putatius

Malgrat que no s'ha trobat encara cap mecanisme que reguli els nivells de les subunitats de CK2, CK2 β es caracteritza per presentar dos motius de degradació putatius que recorden a una *destruction box* (DBox) i un motiu KEN box (Figura 8, colorejats en groc i taronja, respectivament).

Així, CK2 β presenta una seqüència de 9 aminoàcids (RXXLXXXXN/D) que recorda a la *destruction box* present en la ciclina B i que s'encarrega de degradar-la específicament al final de la mitosis. Curiosament aquest domini està situat a la hèlix alfa més exposada, podent quedar disponible per la maquinària de degradació cel·lular [55].

L'altre domini de degradació presenta un motiu que recorda al KEN box presents en algunes proteïnes com ciclins mitòtiques o les Aurora quinases A i B. En aquestes, el motiu presenta la seqüència consens mínima KEN flanquejada per un residu N/D (N/DKENX₀₋₄N/D). De forma semblant, CK2 β té una seqüència similar (DKFNTGLN), entre els residus 32 i 40 que varia únicament per la substitució d'un residu de la seqüència KEN, fet que no sigui funcional [55].

3.3. FUNCIONS DE CK2 β INDEPENDENTS DE CK2: PROTEÏNES D'INTERACCIÓ AMB CK2 β

Malgrat que tradicionalment s'ha considerat CK2 β com un component dels complexos tetramèrics de CK2, que actua potenciant tant l'estabilitat i l'activitat de l'holoenzim així com la selectivitat front determinats substrats, també s'ha observat que té la important funció d'actuar com a un punt d'ancoratge tant per certs substrats (Nopp140, p53, FAF-1, topoisomerasa II, CD5) com per alguns reguladors de CK2 (FGF-2) [45].

No obstant això, durant els últims anys ha augmentat l'evidència que CK2 β no existeix exclusivament com part de l'holoenzim i realitza funcions independents de CK2 [45,46]. Aquest últim fet és molt important, ja que explicaria la observació de regions cel·lulars on es troba CK2 β de forma lliure, així com la importància de la desregulació entre els nivells de les dues subunitats, fet observat en moltes patologies cel·lulars tals com els càncers.

Durant la última dècada, mitjançant estudis tant *in vivo* com *in vitro* s'han descrit una gran quantitat de molècules que interaccionarien amb CK2 β , algunes de les quals ja han estat validades, mentre que d'altres encara manquen per confirmar [46]. Aquestes molècules d'interacció amb CK2 β s'agrupen en dos grups que es detallen breument a continuació: molècules d'interacció amb CK2 β dependents o independents de CK2. (Taula 8)

Taula 8: Proteïnes d'interacció amb CK2β		
Proteïnes d'interacció	Funció	Tipus de detecció
Proteïnes d'interacció amb CK2β dependents de CK2		
p90^{Rsk}	S/T proteïna quinasa	<i>in vitro</i>
PKCζ	S/T proteïna quinasa, intervén en l'activació de NF- κ B	<i>in vitro</i>
Topoisomerase II	Remodelació del DNA, essencial durant la mitosi i la meiosi	<i>in vitro</i>
p53	Supressor tumoral	<i>in vitro/in vivo</i>
P27^{KIP1}	Inhibidor CDK, progressió cicle cel·lular	<i>in vitro</i>
P21^{WAF1/CIP1}	Inhibidor CDK, progressió cicle cel·lular	<i>in vitro/in vivo</i>
Cdc25B	Fosfatasa, activador CDK, progressió cicle cel·lular	<i>in vitro/in vivo</i>
CD5	Receptor superfície cel·lular, timòcits, limfòcits T	<i>in vitro</i>
FGF-2	<i>Fibroblast Growth Factor-2</i> , proliferació cel·lular	<i>in vitro</i>
Nopp 140	Proteïna nucleolar, possible xaperona de transport nuclear	<i>in vitro</i>
L5	Proteïna ribosomal	<i>in vitro/in vivo</i>
L41	Proteïna ribosomal	<i>in vitro</i>
HHV-6 IE2	<i>Human herpesvirus 6 immediate-early protein</i> , activador transcripcional	<i>in vitro/in vivo</i>
Proteïnes d'interacció amb CK2β independents de CK2		
c-Mos	S/T proteïna quinasa, activador MAPK, progressió cicle cel·lular	<i>in vitro/in vivo</i>
Chk1	S/T proteïna quinasa, Dany DNA	<i>in vitro/in vivo</i>
A-Raf	S/T proteïna quinasa, proliferació cel·lular	<i>in vitro/in vivo</i>

Taula 8. Proteïnes d'interacció específica amb CK2 β . Adaptat de Bibby *et al.* [55]

3.3.1. Proteïnes d'interacció amb CK2 β dependents de CK2

Aquest grup està constituït per aquelles proteïnes o substrats que s'uneixen al complex tetramèric de CK2, a través de llocs d'unió amb CK2 β . D'aquesta manera, aquestes molècules al unir-se a CK2 β podrien acabar modulant les funcions cel·lulars de l'holoenzim, tal com ocorre amb les poliamines.

Entre aquests hi ha el FGF-2, que en unir-se a CK2 β estimula l'activitat envers la nucleolina *in vitro* [46].

3.3.2. Proteïnes d'interacció CK2 β independents de CK2

Dins d'aquest grup trobem aquelles proteïnes o substrats que s'uneixen a CK2 β en l'absència de les subunitats catalítiques, indicant tal com s'ha dit, funcions independents de l'holoenzim. En aquest grup hi trobem tres Ser/Thr quinases: A-Raf, c-Mos i Chk-1 [46].

Totes aquestes tres proteïnes es caracteritzen perquè a les regions d'unió amb CK2 β (present als extrems N-terminals) tenen seqüències aminoacídiques molt semblants a les presents en les subunitats catalítiques CK2 α i CK2 α' (figura 9) [46].



Figura 9: Alineament de les seqüències aminoacídiques de diferents Ser/Thr quinases amb dominis d'unió a CK2β putatius. Comparació de la regió d'unió a CK2β de les subunitats catalítiques de CK2 (α i α') amb les regions putatives d'unió a CK2β identificades en altres Ser/Thr proteïnes quinasa, en concret Chk1 (aa 1-87), c-Mos (aa 52-115) i A-Raf (aa 323-373). Els residus bàsics estan marcats en negre, els àcids en blau, residus petits o hidrofòbics en verd, i la resta en verd. Els residus invariables estan ressaltats en groc mentre que altres altament conservats es troben marcats amb un asterisc (*).

A-Raf

A-Raf forma part d'una família de Serina/Treonina quinases citoplasmàtiques essencials en les cascades de fosforilació, al fosforilar i activar les seves corresponents MAPK quinases [46].

Amb tècniques de doble híbrid, A-Raf interacciona amb la regió compresa entre els residus 255 i 569 de CK2β, part dels quals interaccionen amb les subunitats catalítiques CK2α. [46]. La unió de CK2β amb A-Raf incrementa 10 vegades l'activitat d'aquesta quinasa front el seu substrat MEK, fet observat en experiments de coexpressió en cèl·lules d'insecte. La coexpressió de la subunitat catalítica juntament amb la reguladora i A-Raf, reduïa de nou la seva activitat, indicant la competència entre CK2α i A-Raf, pel punt d'unió amb CK2β [46].

c-Mos

C-Mos (una Ser/Thr quinasa de línia germinal) intervé en la maduració meiótica dels oòcits de *Xenopus*, al iniciar la senyalització de la via de les MAP quinases quan es troba induïda per progesterona.

La regió d'interacció amb c-Mos està a 55 aminoàcids del C-terminal de CK2β, una regió que media també la interacció amb les subunitats CK2α i CK2α'. A diferència de A-Raf, *in vitro* CK2β inhibeix C-Mos interferint d'aquesta forma en la maduració de l'oòcit induïda per progesterona. Això indicaria que CK2β causaria un arrest mitòtic en cèl·lules embrionàries amb una elevada divisió al inhibir c-Mos.

D'aquesta manera, Chen *et al.*, van proposar un mecanisme en el qual la inhibició ocasionada per CK2β desapareixeria quan c-Mos s'expressés per sobre d'un determinat llindar en què CK2β fos insuficient per bloquejar-lo, coincidint amb estudis previs en què l'expressió en excés de CK2β en llevats, apareixia una inhibició del creixement [45,46].

Chk1

S'ha determinat que cal la regió C-terminal de CK2 β per què es pugui unir amb Chk1, una serina/treonina quinasa, que en *Schizosacharomyces pombe* causa un arrest cel·lular en G2 davant dels danys induïts sobre el DNA. En mamífers, cal Chk1 pel *checkpoint* a G2, essent essencial per la viabilitat de les cèl·lules mares embrionàries [46].

La unió de CK2 β a Chk1, causa un increment de la seva activitat. L'observació de que el domini quinasa lliure de Chk1 és 20 vegades més actiu que el Chk1 complet fa pensar que la regió C-terminal de Chk1 presenta un efecte autoinhibitori, essent eliminat en el moment que es dona la interacció amb CK2 β [46].

3.4. REGULACIÓ CEL·LULAR DE L'ACTIVITAT CK2

El fet de poder detectar activitat CK2 en extractes de cèl·lules no sotmeses a l'estimulació per determinats factors, així com quan es sobreexpressa en soques bacterianes, ha portat a la consideració que CK2 és una proteïna constitutivament activa [45].

Malgrat que durant aquests anys s'han realitzat diferents estudis que indicarien que la regulació de CK2 es portaria a terme de moltes maneres, la manca d'una conclusió del mecanisme exacte de regulació d'aquesta quinasa continua sent un dels principals temes de controvèrsia [45].

Així, els principals factors que contribuirien a la regulació cel·lular de CK2 serien:

- Regulació de l'expressió i assemblatge de les subunitats de CK2
- Regulació per modificació covalent de les subunitats de CK2.
- Regulació per interaccions amb altres biomolècules.

3.4.1. Regulació transcripcional de CK2

Les regions promotores de CK2 β han estat caracteritzades i presenten les típiques propietats de un gen *housekeeping* tals com la manca de una TATA box i la presència de múltiples caixes GC, una illa CpG i caixes CAAT posicionades a llocs no convencionals. Però també cal destacar que al regió promotora presenta elements d'unió a factors de transcripció com SP1, NF1 i p53 [81].

Aproximacions mitjançant *Electroforetic mobility shift assays* (EMSA) suggereixen que CK2 α pot unir-se a la regió promotora de CK2 β . De la mateixa manera, la sobreexpressió de CK2 α causava un augment de CK2 β , fet que podria venir explicat per aquest control transcripcional [82]. Així molts grups han proposat que existiria un mecanisme coordinat del control de l'expressió de les diferents subunitats i que seria responsable de mantenir l'estequiometria de CK2 α /CK2 β , basat en que CK2 α actuaria com a factor de transactivació en la transcripció de CK2 β . Mentre que això ofereix un mecanisme atractiu per una expressió coordinada de les subunitats de CK2 alhora de formar complexos tetramèrics, aquests resultats no concorden amb els estudis primerencs que indicaven que CK2 β es sintetitzava en excés respecte a la subunitat catalítica en cèl·lules de cultiu en fase de creixement exponencial [55,83].

El fet que l'activitat transcripcional de CK2 es troba reduïda en fibroblasts de pulmó senescents i cultius envellits, on hi ha metilació del DNA, ha fet que certs grups considerin que la metilació dels promotors de les subunitats de CK2 podrien actuar també com a mecanisme general de regulació de l'expressió de CK2. Malgrat això, ara per ara no s'ha trobat una metilació directa d'aquestes regions [82].

Estudis recents fets per el grup de Lupp han evidenciat que tant CK2 α com CK2 α' estimulen la transcripció dels gens de les subunitats de CK2 (CK2 α i CK2 β), malgrat que amb tècniques de immunoprecipitació de cromatina no han observat la unió. De la mateixa forma han mostrat que la reducció de l'activitat de CK2 amb inhibidors disminueixen la transcripció dels gens de CK2, indicant que l'activitat CK2 seria necessària per la transcripció d'aquestes dues subunitats [82].

3.4.2. Mecanismes de regulació post-traduccionals

3.4.2.1. Modificació covalent de CK2: Fosforilació de les subunitats

En moltes de les quinases, la seva activació o desactivació depèn de la fosforilació per part d'altres quinases en dianes específiques presents als anomenats dominis d'activació, de tal manera que quan són expressades en bacteris moltes no solen trobar-se actives. Les subunitats catalítiques de CK2, en canvi, són catalíticament actives quan s'expressen en bacteris, tant amb la presència com en l'absència de CK2 β . L'observació de l'existència de diferents dianes de fosforilació tant en CK2 α com en CK2 β , fa pensar que malgrat que la fosforilació no sigui totalment indispensable per l'activitat, podria contribuir en certa manera a la seva regulació [45].

Entre aquestes regions de fosforilació cal destacar l'autofosforilació de la Ser209 de CK2 β així com les dianes de fosforilació presents a l'extrem C-terminal de CK2 α . Malgrat que aquestes fosforilacions no afecten la seva activitat, s'ha observat que la fosforilació de la subunitat reguladora estabilitza l'holoenzim, així com que en manca de CK2 β , la subunitat CK2 α pot presentar una autofosforilació a la Tyr182 que es troba situada dins del domini d'activació [45,84].

3.4.2.2. Interaccions reguladores amb altres biomolècules

Malgrat que CK2 sigui considerada una quinasa independent de missatger i que la seva activitat no depengui de missatgers clàssics com nucleòtids cíclics, calci o lípids, no exclou que petites molècules puguin participar en la seva regulació o modulació de l'activitat en unir-se a les seves subunitats.

Entre aquestes cal destacar les molècules carregades negativament (com l'heparina) que *in vitro* causen una inhibició de CK2, mentre que molècules carregades positivament (com les poliamines) causen l'efecte contrari [45]. Els resultats obtinguts d'aquesta observació *in vivo* són més dispersos, observant que mentre ratolins amb alts nivells de poliamines presenten activitats de CK2 incrementades, experiments en els que es mutava el domini d'unió a poliamines de CK2 β presentaven també un increment en la seva activitat basal [45].

3.4.2.3. Interaccions proteïna-proteïna

Les interaccions entre proteïnes representen el major mecanisme de regulació de quinases. Mentre que certes interaccions entre proteïnes poden regular directament la seva activitat, d'altres actuaran com a proteïnes dirigides o d'ancoratge [45]. CK2 no s'escapa tampoc d'aquest mecanisme de regulació trobant-se proteïnes que la regulen directament o indirectament.

Així la interacció de CK2 amb FGF-1, FGF-2, Hsp90, Cdc37 actuen directament estabilitzant o alterant l'activitat catalítica de CK2, mentre que la interacció amb tubulina, FAF-1 o CKIP-1 redistribueixen CK2 cap a localitzacions subcel·lular específiques [45]. Moltes d'aquestes proteïnes actuen sobre la subunitat reguladora de la forma holoenzimàtica de CK2, mencionant-se alguns exemples a la Taula 8 anteriorment comentada.

3.4.2.4. Regulació mitjançant l'assemblatge de les subunitats de CK2

Tal com s'ha dit, els primers estudis en cèl·lules de cultiu en creixement exponencial, havien indicat que CK2 β s'expressava en excés respecte a la subunitat catalítica [55,83]. De forma similar, diferents resultats mostren l'evidència d'un desequilibri en l'expressió de la subunitat catalítica i reguladora en una àmplia varietat de teixits i situacions [49,85].

Per exemple, un anàlisi de diferents òrgans de ratolí mostrava que les subunitats de CK2 eren expressades al màxim nivell en cervell i testicles [85]. No obstant, en comparació amb els nivells de CK2 α , CK2 β en testicles tenia molta més expressió que en cervell, indicant una distribució asimètrica d'aquestes subunitats en aquests teixits. L'existència de CK2 β lliure en aquests teixits ha estat també confirmada per tècniques de immunoprecipitació (IP) [85].

De la mateixa manera alts nivells aberrants de CK2 β respecte CK2 α han estat observats en tumors [55]. Així mateix, molts grups també han registrat oscil·lacions de la seva activitat durant el cicle cel·lular [45]. Així, sembla ser que els nivells de CK2 es correlacionen amb la taxa de proliferació cel·lular, observant-se que generalment, les cèl·lules amb una major taxa de divisió tenen majors nivells de CK2. De manera semblant, s'ha vist que CK2 α' , és un gen d'expressió primerenca que s'indueix després de l'estimulació quiescent en fibroblast [45].

Malgrat que s'ha considerat CK2 com un enzim tetramèric en el que CK2 β s'encarregava de la regulació de l'activitat, evidències indiquen que CK2 α (igual que CK2 β) existeix també en forma lliure. Així hi ha substrats com calmodulina que es fosforila per CK2 α o CK2 α' , però no per l'holoenzim. Aquestes fluctuacions en els nivells de l'holoenzim observades en diferents situacions cel·lulars, així com les variacions entre els nivells de CK2 α /CK2 β que donarien lloc a formes lliures de les subunitats de CK2, fan pensar en l'existència real d'un mecanisme general de regulació dels nivells CK2 [45].

3.5. IMPORTÀNCIA FISIOLÒGICA DE CK2

Una de les principals complexitats que porta l'estudi de CK2 és l'elevada quantitat de substrats existents per aquesta quinasa, implicats en una àmplia varietat de processos cel·lulars clarament diferenciats.

Aquest fet dificulta saber quines de les funcions de CK2 poden resultar més essencials per la cèl·lula, mentre quines altres són més secundàries, així com pot ser capaç la cèl·lula de discernir aquesta àmplia varietat de senyals i generar la resposta apropiada.

Al genoma humà, les seqüències consens de CK2 són molt abundants, i s'ha vist que la fosforilació per CK2 representa fins a ¼ part del fosfoproteoma [45,63].

Malgrat que una proteïna presenti la seqüència consens de fosforilació per CK2, no vol dir necessàriament que sigui fosforilable per aquesta, així com també el fet de què si una proteïna no presenta exactament aquesta diana, no vol dir que CK2 no la pugui fosforilar. D'aquí el fet de que perquè es pugui confirmar que és una diana de CK2, cal demostrar que tant *in vitro* com *in vivo* siguin fosforilables per CK2, així com que al mutar la diana de CK2, deixi de ser fosforilable per aquesta quinasa [45].

Actualment es coneixen més de 300 substrats de CK2, localitzats en diferents compartiments cel·lulars i que presenten funcions tan diverses com: la replicació i transcripció del DNA, la síntesi proteica, la regulació del cicle i el manteniment de l'estructura cel·lular, així com transducció de senyals, metabolisme cel·lular o fins i tot infeccions virals i transformació cel·lular [45].

Taula 9: Agrupació de substrats de CK2 segons la funció	
Categoria Funcional	Nº de proteïnes
Proteïnes de senyalització β-catenina, disheveled, calmodulina, caveolina, CD44, CD45, , receptor d'insulina IRS-1, PKC, subunitat reguladora de PKA, Inhibidor 2 de la PP1, receptor d'IFG-II,...	87
Factors de transcripció c-Myc, c-Myb, p53, CREB, CREM, SRF, Hoxb-6, Hoxb-7, IκBα, IκBβ, MAX, Tal-1,...	60
Proteïnes implicades en replicació, transcripció i síntesi proteica B23, DNA lligasa, DNA topoisomerasa I i IIα, eIF2B, eIF2β, eIF3, eIF4B, eIF5, nucleolina, RNA polimerasa I, Nopp140, TBP, RNA polimerasa III, hnRNP A2,...	50
Proteïnes Virals EBNA-2, HPV E7, HSV IE63, antígen gran de SV40, PA del virus de la grip, HIV-1 Rev, HIV Vpu, HIV RT, HSV VP1, VZV-glp,...	38
Proteïnes estructurals de citoesquelet Espectrina, β-tubulina, conexina, vibronectina,...	14
Enzims metabòlics Glicogen sintasa, AcetylCoA carboxilasa, ornitina decarboxilasa,...	9
Altres funcions Cadena lleugera i pesada de la miosina, bPRP, CDC34,...	49

Dels 300 substrats de CK2, la majoria (més de 80) corresponen a proteïnes implicades en la senyalització (trobat entre elles 10 quinases, 8 fosfatases i 11 proteïnes d'unió a calci), factors de transcripció (60

substrats) i proteïnes implicades en l'estructura dels àcids nucleics, transcripció o traducció (40 substrats) i proteïnes d'origen viral (40 substrats). Els enzims implicats en el metabolisme corresponen al grup més reduït de substrats de CK2, trobant-se només 9 enzims entre els substrats de CK2 [86].

A la taula anterior (Taula 9), es resumeixen breument el nombre de substrats de CK2 que es troben implicats en diferents processos, així com alguns dels exemples més destacats.

Així la presència en els organismes d'una quinasa ubiquament expressada, d'activitat constitutiva i amb una àmplia varietat de substrats no sembla ser una qüestió d'atzar i ha de tenir una explicació per la seva existència, encara que a simple vista no tingui sentit. Així s'ha suggerit que a diferència del paper lineal i vertical en la senyalització realitzada per la majoria de les quinases, CK2 podria tenir un paper més ramificat al ser més aviat lateral, actuant com un possible element integrador i de control global sobre diferents vies de senyalització, consolidant l'acció d'aquestes vies sobre la cèl·lula [63].

3.6. LOCALITZACIÓ DE LES SUBUNITATS DE CK2

Encara que els primers estudis amb immunofluorescència emfatitzaven una predominança nuclear de CK2, hi havia nombroses evidències que indicaven la seva presència a altres regions cel·lulars. De la mateixa forma, la colocalització de les dues subunitats en aquests estudis emfatitzaven la visió tradicional de CK2 com un complex heterotetramèric estable, malgrat el fet que els mateixos grups havien registrat poblacions de CK2 β que no colocalitzaven amb CK2 α o CK2 α' , associant-ho a reminiscències de complexos abortius de CK2 [55,87].

Posteriors aproximacions experimentals de localització van indicar que les subunitats de CK2 no es trobaven exclusivament colocalitzades, apareixent tant CK2 α com CK2 β en el que anomenaven *pools* lliures d'holoenzim [55,88]. Estudis d'immunofluorescència amb cèl·lules de mamífers han permès observar que mentre les tres subunitats de CK2 es poden localitzar també al reticle endoplasmàtic llis (REL) i a l'aparell de Golgi, només CK2 α i CK2 α' han estat localitzades en el Reticle Endoplasmàtic Rugós (RER) [55,89]. Aquests resultats lliguen amb el model cristal·logràfic de l'holoenzim de CK2, en el qual es posa en dubte l'exclusivitat de CK2 com a un complex estable.

Aproximacions realitzades amb estratègies de *live cell imaging* en les quals s'usaven variants fluorescents de les subunitats de CK2 han confirmat que malgrat que CK2 té una localització predominantment nuclear, les subunitats de CK2 s'importaven de forma independent cap al nucli. De la mateixa manera, s'ha observat amb tècniques de FRAP (*Fluorescent Recovery After Photobleaching*) que les subunitats CK2 α i CK2 β presenten una velocitat de mobilització nuclear alta, relocalitzant-se a l'àrea fotoblanquejada en 10 segons [90,91].

Cal destacar que apart del nucli, l'aparell de Golgi, i el reticle endoplasmàtic, s'ha aconseguit purificar CK2 de les membranes plasmàtiques tant en hepatòcits de rata com en les línies cel·lulars d'insecte SF9, on s'ha vist que CK2 β seria la responsable de mediar la unió de CK2 amb estructures membranoses [52,92].

Dominis com l'homòleg d'unió a plekstrina (PH) de CKIP-1 (*CK2 Interacting Protein-1*) poden unir-se també a CK2, dirigint-la d'aquesta forma a la membrana plasmàtica, així com els canals Epitelials de Na⁺ (ENaC), situats també en aquesta regió, poden associar-se *in vitro* amb CK2 [93]. També s'ha observat l'associació de CK2 amb els canals de Na⁺ dependents de voltatge (Nav), fosforilant-los i incrementant la unió d'aquests amb l'ankirina G, una proteïna citoesquelètica que permet localitzar aquests canals als nòduls de Ranvier i al segment axonal inicial de les neurones [52,94].

D'aquesta manera, tots aquests resultats suggereixen que el tetràmer de CK2 no és un complex estable sinó un heterocomplex dinàmic transitori, al torn que dins de la cèl·lula existeix una distribució asimètrica de les subunitats de CK2, donant peu a possibles funcions independents del tetràmer tal com es comenta més endavant [55].

La ja mencionada manca fins al dia d'avui d'un model unificant per la seva regulació, ha fet que la focalització dels diferents substrats a diferents compartiments i la mobilització d'aquestes subunitats seria clau en la regulació de l'activitat CK2, donant lloc al model de senyalització basat en la compartimentació [52].

4. CK2 I CÀNCER

4.1. CK2 I CÀNCER

Durant molts anys, s'ha associat els nivells alts d'activitat CK2 amb l'increment de la proliferació cel·lular així com el seu paper com a potent supressor de l'apoptosi. El fet que en tots els càncers examinats fins ara presenten augment en les activitats de CK2 (trobant-se incrementada entre 2 i 8 vegades) i les principals característiques de les cèl·lules tumorals (proliferació cel·lular i apoptosi) corresponen amb funcions on intervé CK2, ha fet que es relacionés CK2 amb la formació de tumors.

D'aquesta forma, tots els càncers que s'han examinat fins al moment mostren un increment de l'expressió de CK2, el qual també es pot relacionar amb el pronòstic de la patologia. Així, experiments realitzats en els que es realitza una disminució de l'expressió d'aquesta quinasa, solen acabar desembocant en la inducció de l'apoptosi en un cultiu cel·lular, així com diferents models xenografts de càncer suggereixen el potencial terapèutic de la inhibició de CK2 en la progressió tumoral [95].

4.2. PAPER DE CK2 EN LA PROLIFERACIÓ I CARACTERÍSTIQUES CEL·LULARS

El fet observat que CK2 està associada amb l'increment de la proliferació cel·lular tant en cèl·lules sanes com en canceroses, ha fet que moltes vegades se la correlacioni directament amb l'estat proliferatiu cel·lular. Malgrat això els nivells d'expressió de les cèl·lules canceroses no es relaciona només amb la proliferació, sinó amb la displàsia cel·lular [95]. Un exemple d'això són els teixits com el cervell, que no presenten divisió cel·lular i per contra són un dels que presenten major activitat CK2 [96]. D'aquesta forma, la implicació de CK2 en una elevada quantitat de funcions cel·lulars, fa que el nivell de CK2 existent en una determinada cèl·lula depengui de les necessitats de la cèl·lula en qüestió.

Diversos estudis han mostrat que lleugeres desregulacions en els nivells cel·lulars de CK2, presenten ja un efecte oncogènic per la cèl·lula [97]. En aquest sentit cal destacar que els efectes de la sobreexpressió de CK2 en la proliferació pot donar efectes contradictoris segons el tipus cel·lular usat. D'aquesta manera, els nivells basals de CK2 en la línia serien determinats per l'efecte que podria tenir l'alteració de l'expressió de CK2 en aquell tipus cel·lular en concret [96]. Així mentre que la sobreexpressió de CK2 α i CK2 α' potencia la proliferació en fibroblasts, pot causar una reducció de la proliferació en altres línies [96,98].

Un exemple de què CK2 té altres implicacions apart de la proliferació es que s'ha observat que mentre que el marcador de la proliferació cel·lular Ki-67 s'expressa de forma constant en molts carcinomes, l'expressió de CK2 és molt marcada en tumors poc diferenciats mentre que disminueix en carcinomes ben diferenciats. Aquest fet fa que CK2, no s'hagi d'associar de nou només amb la proliferació sinó altres característiques de les cèl·lules tumorals tals com el grau de desdiferenciació [96].

4.3. INCREMENT D'ACTIVITAT CK2 EN BIÒPSIES DE TUMORS HUMANS

Diferents estudis han mostrat que CK2 es troba incrementada en un alt nombre de càncers. Dins d'aquesta àmplia varietat de tumors en els que s'ha observat un increment de l'activitat CK2 trobem:

- Leucèmies i limfomes [97,99–101].
- Càncer de pròstata [102,103].
- Càncer Renal [49,104].
- Càncer de colon [105].
- Càncer hepàtic [106].
- Càncer pulmonar [107].
- Carcinomes esquamosos del cap i coll (*Head and Neck carcinoma*) [108]
- Càncer de mama [109]

Com a norma general, l'activitat de CK2 presenta un increment entre 2-8 vegades en aquests tumors, variant depenent del tipus de tumor. Cal destacar però que els valors obtinguts procedeixen d'extractes tissulars totals, els quals contenen també altres tipus cel·lulars i l'activitat necessàriament no reflecteix la naturalesa real de les cèl·lules tumorals. D'aquí que durant els últims anys, es complementen els estudis amb anàlisis immunològics de les mostres [96].

L'increment d'activitat CK2 en càncers, sembla estar relacionada més aviat a nivell proteic, ja que estudis realitzats en càncer de pròstata i carcinoma escamós del cap i coll mostren que els nivells de mRNA de les subunitats de CK2 no es troben alterades en aquestes neoplàsies [96]. El fet que no s'han registrat tampoc mutacions en el gen que codifica per CK2 α en neoplàsies confirmaria aquesta hipòtesis [95].

4.4. PRINCIPALS ALTERACIONS DE CK2 EN LES CÈL·LULES TUMORALS HUMANES

4.4.1. Nivells d'expressió de CK2 i correlació amb paràmetres fisiopatològics tumorals

Molts estudis realitzats en mostres de teixit tumorals han indicat l'existència d'una correlació directe entre els nivells de CK2 i els graus i estadiatges del tumor així com amb el pronòstic de la malaltia. Aquest fet és important, ja que les correlacions entre CK2 i aquests paràmetres confirma la implicació de l'enzim en altres funcions característiques de les fases del procés tumoral, tal com la proliferació, la invasió o metàstasis [96].

Entre aquests casos trobem el càncer de coll uterí en el que apart dels nivells alts de CK2, la presència d'aquest enzim a la cromatina es correlaciona també amb la transformació maligna [108]. De la mateixa manera, els nivells de CK2 es correlacionen amb el grau de Gleason en el càncer de pròstata [103].

És també de destacar el fet que diferents estudis mostren que els nivells de CK2 presents a les cèl·lules no són uniformes dins del mateix teixit tumoral, trobant-se incrementats a les zones més perifèriques del tumor o a les zones d'infiltració tumoral. Molts autors han justificat aquest fenomen amb el fet que en

aquestes àrees d'infiltració les cèl·lules secretarien factors que facilitarien els fenòmens de invasió cap a teixits adjacents [96].

Amb SAGE (Anàlisi Seriat de l'Expressió Gènica) s'ha observat també que en molts tumors metastàtics, hi ha una elevada expressió de la isoforma CK2 α ', destacant la possibilitat que les isoformes catalítiques realitzarien diferents funcions segons l'etapa de la patologia [45].

4.4.2. Alteracions en la localització cel·lular i distribucions asimètriques de les subunitats de CK2

Apart de les alteracions en les activitats i nivells de CK2, una de les principals característiques a destacar de CK2 en tumors és que presenta alteracions en la seva localització cel·lular. Així, en diferents neoplàsies s'ha observat que CK2 es localitza preferentment als compartiments nuclears [103,110].

Cal destacar també el fet que malgrat que CK2 α es troba preferentment als nuclis tumorals, no tots ells són tenyits amb la mateixa intensitat. De la mateixa forma, el patró de tinció de CK2 α en tumors escamosos del cap i coll benignes son diferents a les formes neoplàsiques malignes. No obstant això, totes les cèl·lules tumorals continuen compartint el fet de presentar un increment de CK2 α nuclear en contrast a la tinció predominant citosòlica de CK2 α present en el teixit mucós sa. De la mateixa manera, en aquest càncer també s'ha observat una forta tinció positiva de CK2 α a les zones de infiltració tumoral, tal com s'havia observat en altres càncers [96].

És de destacar el fet que també en el tumor escamós del cap i coll s'ha observat patrons de tinció puntuats a la presència de CK2 α nuclear, que podria correspondre's amb l'associació de la subunitat amb altres estructures com cromatina i matriu nuclear, tal com s'havia documentat en altres estudis [96].

Altres aproximacions amb immunoblots han mostrat la detecció de múltiples formes de CK2 α en determinats tumors, que han estat associades a la proteòlisis d'aquesta subunitat [101].

Altres estudis usant també les mateixes aproximacions han permès observar que en determinats tumors apareix una distribució asimètrica de les subunitats de CK2, com en el cas del carcinoma renal de cèl·lules clares (ccRCC) tal com es comentarà més detingudament a l'apartat corresponent [49].

4.5. POTENCIAL ONCOGÈNIC DE CK2 EN MODELS MURINS

Malgrat que CK2 no és un oncogen en sí, molts experiments indiquen un potencial oncogènic en les desregulacions de CK2. Així la desregulació aparent de CK2 en diversos càncers suggereix que en alguna etapa del procés de transformació, apareixen canvis significatius en el seu estatus, conferint el potencial oncogènic a les cèl·lules [95].

D'aquesta manera s'han realitzat diferents aproximacions experimentals en models murins per a veure el potencial oncogènic de CK2. Així ratolins que sobreexpressaven CK2 α , tendien a desenvolupar limfomes en edats avançades, indicant el possible paper oncogenètic de la proteïna [111].

De la mateixa manera, experiments en els que es sobreexpressava de forma ectòpica CK2 α amb c-Myc o amb Tal-1, causaven un augment de la incidència tant de leucèmies com de limfomes en aquests organismes [96,112,113].

De forma semblant la expressió de CK2 α en glàndules mamàries de ratolins transgènics fa que desenvolupin càncer de mama, amb propietats molt semblants a les humanes [95,114].

Davant del fet que en tots aquests casos, només una modesta sobreexpressió de CK2 α és la responsable de generar un potencial oncogènic en ratolí, suggereix que la implicació de CK2 en aquest procés es basaria en la capacitat de modular l'activitat d'altres senyals oncogèniques cel·lulars [95].

4.6. CK2 I APOPTOSIS

La mort cel·lular programada o apoptosi és un component clau de la fisiologia cel·lular i la seva desregulació està reconeguda com un factor crític en la oncogènesis.

Estudis primerencs en pròstata, mostren que la deprivació d'andrògens fa que les cèl·lules presentin una ràpida pèrdua de CK2 de la cromatina i matriu nuclear, fenomen que precedeix l'apoptosi.

De forma inversa, l'adició d'andrògens a les mateixes cèl·lules causa una entrada de CK2 cap a nucli [95,96]. El desplaçament de CK2 cap a la matriu nuclear és registrat també quan s'apliquen inductors apoptòtics (tals com etoposide i DES) sobre línies cel·lulars tumorals, fet que es creu que actuarà com un mecanisme protector front la toxicitat. És important destacar que observacions similars han estat observades en resposta a radiacions ionitzants [95,115].

La prova del paper protector de la CK2 nuclear es va obtenir amb experiments de sobreexpressió de CK2 α prèvia al tractament amb inductors apoptòtics en els que s'observava que protegia fortament les cèl·lules front l'apoptosi. Aquest paper residia només en la subunitat catalítica, ja que CK2 β no mostrava aquest comportament protector [95].

De la mateixa manera, estudis en els que s'aplicaven siRNA contra CK2 α en les línies cel·lulars tumorals Ca9-22 mostraven que malgrat que les cèl·lules continuaven presentant un 40% de la seva activitat CK2 habitual, la seva mortalitat cel·lular associada a l'apoptosi rondava al 100% [96,116]. Aquest fet indica doncs que alteracions modestes en els nivells intrínsecs de CK2, poden comprometre la viabilitat del tumor.

4.7. IMPLICACIÓ DE CK2 EN EL FENOTIP GLOBAL DE LES CÈL·LULES TUMORALS

El principal problema que planteja la implicació de CK2 en el desenvolupament tumoral és que encara no es coneix el mecanisme de regulació d'aquesta quinasa.

Cal destacar que les cèl·lules canceroses presenten un seguit de característiques distintives, entre les quals hi ha les següents [117]:

- Creixement desregulat
- Resistència a l'apoptosi

- Angiogènesis sostinguda
- Invasió tissular i metàstasi
- Inestabilitat genòmica

Aquestes característiques són presents en major o menor grau en tots els càncers existents, però les més importants a considerar són el creixement incontrolat i la resistència apoptòtica.

El fet de que CK2 tingui una àmplia diversitat de substrats clarament diferenciats, fa que les alteracions tant en les quantitats com en l'estequiometria i la localització de les subunitats observades en tumors puguin donar lloc a aquest ampli ventall de característiques fenotípiques tumorals.

S'ha observat que en les cèl·lules normals, la proliferació causa un increment provisional del nivell de CK2, el qual retorna al seu nivell basal just després de la divisió. Es creu que en les cèl·lules canceroses aquestes adquireixen un nou nivell estable de CK2, essent major que en les cèl·lules normals [95].

Ja s'ha comentat en l'anterior apartat que l'increment de CK2 és un mecanisme supressor de l'apoptosi i que CK2 actuaria mitjançant diferents senyals tant sobre les vies intrínseques i extrínseques. Malgrat tot, existeix una altra forma d'apoptosis, coneguda amb el nom d'anoikis, basada en la inducció d'una mort cel·lular programada quan aquesta perd l'adherència a un suport sòlid (característica típica de les cèl·lules invasives). Estudis recents han mostrat que CK2 també actua com a mecanisme supressor de l'anoikis [117], mecanisme que es comentarà més tard [117]. L'angiogènesi sostinguda és responsable que les cèl·lules tumorals tinguin l'aportació de sang necessària per a mantenir la seva proliferació. Malgrat que no es coneix com pot actuar exactament CK2 en aquest mecanisme, s'ha observat que la inhibició de CK2 α redueix la neovascularització i microvascularització tant a les cèl·lules retinals com les de càncer de pròstata en ratolins. De la mateixa manera, el factor de resposta a la hipòxia HIF-1, implicat també en la neovascularització, és un substrat de CK2 [95,118].

Pel què fa a la invasió tissular i metàstasi, malgrat que encara no hi hagi massa coneixement del paper que pot tenir CK2, sí que s'ha observat que els càncers que tenen major activitat CK2 són més agressius i per tant més invasius. Així s'ha vist que CK2 fosforila la E-cadherina, influint d'aquesta manera la interacció amb la β -catenina, regulant d'aquesta forma la dinàmica de les unions adherents [119]. Els canvis en aquestes unions, sol causar l'anomenat *E-cadherin switch*, un fenomen pel qual les cèl·lules epitelials adquireixen un fenotip mesenquimàtic, molt característic de les cèl·lules tumorals i que es coneix amb el nom de Transició Epiteli-Mesenquima (EMT) [50,51].

4.8. CK2 I CARCINOMA RENAL DE CÈL·LULES CLARES (CCRCC)

Malgrat que s'han realitzat molts estudis sobre la implicació de CK2 en diferents tipus de càncers, s'ha investigat molt poc sobre el seu paper en carcinomes renals, i més concretament, el carcinoma renal de cèl·lules clares (ccRCC). La principal investigació realitzada en aquest camp es basa en el treball realitzat pel grup d'Issinger al 1994 [49].

Igual que en altres càncers, el grup d'Issinger va corroborar un increment de l'activitat CK2 en les mostres de ccRCC quan es comparaven amb les del teixit sa, trobant-se incrementada gairebé dues

vegades en les mostres tumorals. De la mateixa manera, i coincidint amb estudis realitzats en altres neoplàsies, va observar que en extractes totals de mostres de ccRCC presentaven un increment de la subunitat CK2 α respecte als teixits sans. Així mateix, va observar que no només augmentava la subunitat catalítica en tumors, sinó que també ho feia CK2 β , i sorprenentment l'increment d'aquesta en tumors era significativament superior a la de CK2 α . Aquest estudi suggeria que en tumors, del total de CK2 β , només una part s'associaria a la major activitat CK2 que seria la necessària per a constituir l'excés d'holoenzim. Així l'excés de CK2 β en la majoria de neoplàsies estaria involucrada en altres funcions. D'aquesta forma, no únicament l'increment de activitat CK2 sinó també desequilibris en les subunitats podrien estar implicades en processos patològics com el càncer [49].

Així, s'ha observat que la proteïna quinasa CK2 actua directament o bé indirectament en diferents proteïnes de vies de senyalització que s'han trobat alterades en el ccRCC, podent contribuir d'aquesta manera en el desenvolupament i la progressió tumoral. D'aquesta forma, el factor de transcripció c-Myc, és fosforilat per CK2, trobant-se incrementat en molts tumors. De la mateixa manera, l'expressió combinada de CK2 α amb c-Myc, causen un increment de leucèmies i de limfomes en ratolins [95].

CK2 també pot actuar en el mecanisme de degradació de pVHL, a través de la xaperona Hsp90, fosforilant-la i permetent que aquesta pugui plegar correctament diferents proteïnes, com pVHL, evitant així la seva degradació [120].

CK2 actua també directament sobre el domini N-terminal de pVHL (present únicament a la isoforma pVHL₃₀) fosforilant-la i formant complexos amb aquesta proteïna [121].

Les cèl·lules de ccRCC defectives en pVHL, mostren un increment de l'activitat NF- κ B, afectant a la carcinogènesis i a la resistència a agents terapèutics. S'ha observat que pVHL s'uneix a Card9 (un agonista de NF- κ B), però enlloc de dirigir-lo cap a la seva ubiquitinització com passa amb HIF α , actua com a coadaptador que promou la fosforilació de Card9 per CK2, inactivant-lo [121].

CK2 també intervé en la formació i manteniment dels cilis primaris en les cèl·lules epitelials del túbul renal així com en l'assemblatge de la matriu extracel·lular, vies en les que també intervenia pVHL. Així en el primer cas, la fosforilació de Dsh per CK2, permet l'estabilització de β -catenina, la qual entra al nucli i promou la transcripció de gens diana de Wnt. Recentment s'ha vist en embrions de *Xenopus* que CK2 β s'uneix a la proteïna PAPC (*Paraxial protocaderin*) de forma independent de l'holoenzim. La unió de CK2 β amb PAPC, generaria una reducció de l'holoenzim CK2 cel·lular, incrementant la degradació de la β -catenina al desestabilitzar-se el complex E-caderina/ β -catenina [122].

Aquest fet reprimiria l'expressió dels gens diana de Wnt afectant també l'expressió de la E-caderina i facilitant d'aquesta forma la gastrulació en embrions. Aquesta disminució dels nivells i de les unions cel·lulars per E-caderina també han estat observades en el ccRCC, fet que relacionaria aquesta via en el desenvolupament d'aquesta neoplàsia [122,123].

Per altra banda, la fosforilació de la fibronectina per CK2, permet el seu assemblatge amb la matriu cel·lular, procés alterat també en les cèl·lules de ccRCC [124]. L'occludina, una altra proteïna implicada en aquest procés i que es troba alterada en ccRCC, és fosforilable també per CK2. Malgrat això, s'ha

observat que la seva fosforilació en embrions de *Xenopus* per CK2 i p34^{cdc2}/ciclina B impedeix que aquesta intervingui en la formació de les unions estretes cel·lulars, mentre que en les línies renals epitelials MDCK, la seva fosforilació facilita la formació d'aquestes unions estretes, oposant-se amb els anteriors resultats [125].

En ccRCC la via mTOR es troba activa. S'ha observat que la fosforilació de la Ser129 de Akt per CK2, incrementa l'activitat catalítica de Akt. De la mateixa manera, CK2 fosforila la Ser370 i Ser385 de PTEN, inhibint la seva activitat front el PIP₃, portant a l'activació de la via PI3K-Akt-mTOR [126].

4.9. LA TRANSICIÓ EPITELI-MESÈNQUIMA EN LA DISSEMINACIÓ DEL CÀNCER

La Transició Epiteli-Mesènquima (EMT; *Epithelial-Mesenchymal Transition*) és el procés en què les cèl·lules epitelials són convertides en cèl·lules migratòries i invasives, essent fonamental per la morfogènesis dels organismes tant vertebrats com invertebrats. D'aquesta manera la majoria de teixits s'originen com a resultat de una o varies rondes de EMT o MET (el fenomen invers). Malgrat que el seu paper en processos neoplàsics ha estat molt debatuda, actualment és considerada com una etapa molt important en la metàstasi dels tumors epitelials.

La implicació de la EMT en el càncer va ser descrita per primer cop al 1890 per Ramón i Cajal (Ramón y Cajal S. 1890. *Manual de Anatomia Patològica General*), que va observar com les cèl·lules epitelials adquirien una nova morfologia, podent envair l'estroma adjacent en càncers de mama. En condicions normals, la EMT actua com un mecanisme essencial per la generació dels diferents òrgans durant el desenvolupament, al torn que també pot aparèixer apart de la tumorigènesi en altres condicions patològiques, tals com en la hipòxia [127].

4.9.1. Característiques de la EMT, i la migració cel·lular col·lectiva

En termes tant de morfologia com de comportament, es defineix que durant la EMT, les cèl·lules epitelials perden la seva polaritat, al torn que produeixen fil·lopodis a la seva part basal així com els contactes entre cèl·lules veïnes passen a ser només transitoris [128].

Cal destacar però que no tots els processos que impliquen la mobilització cel·lular en càncer es tracten de EMT. D'aquí el fet que cal distingir entre EMT i la migració cel·lular col·lectiva.

La migració cel·lular col·lectiva es caracteritza perquè les cèl·lules migren conjuntament, mantenint els contactes entre sí, al torn que mantenen la expressió de la E-cadherina, considerat com el principal marcador epitelial. Aquest tipus de fenomen ha estat observat a les regions perifèriques de carcinoma cel·lulars escamosos [129].

En la EMT en canvi, s'activen els factors de transcripció de les famílies de Snail, Twist i Zeb, que s'encarreguen de reprimir la expressió de la E-cadherina. Aquest fet fa que les cèl·lules perdin les unions intercel·lulars, permetent que aquestes adquireixin propietats migratòries i invasives [130]. Aquest fenomen ha estat observat en càncers de mama [131] i càncers de colon [132].

La pèrdua de la polaritat cel·lular és una altra característica de la EMT, generada per la repressió dels gens de polaritat tals com *Crumbs*, per part de Snail i Zeb.

Cal destacar que mentre que en la migració col·lectiva les cèl·lules desenvolupen diferents tipus de protrusions que mantenen el contacte cel·lular entre sí i permeten que es moguin de forma més aviat coordinada, en la EMT malgrat que no siguin tan visibles, es poden generar diferents tipus de contactes transitoris amb les cèl·lules veïnes, tal com ha estat descrit per altres grups [128]. Així es creu que durant la EMT, aquests contactes entre cèl·lules ajudarien a interpretar la direccionalitat de la migració cel·lular.

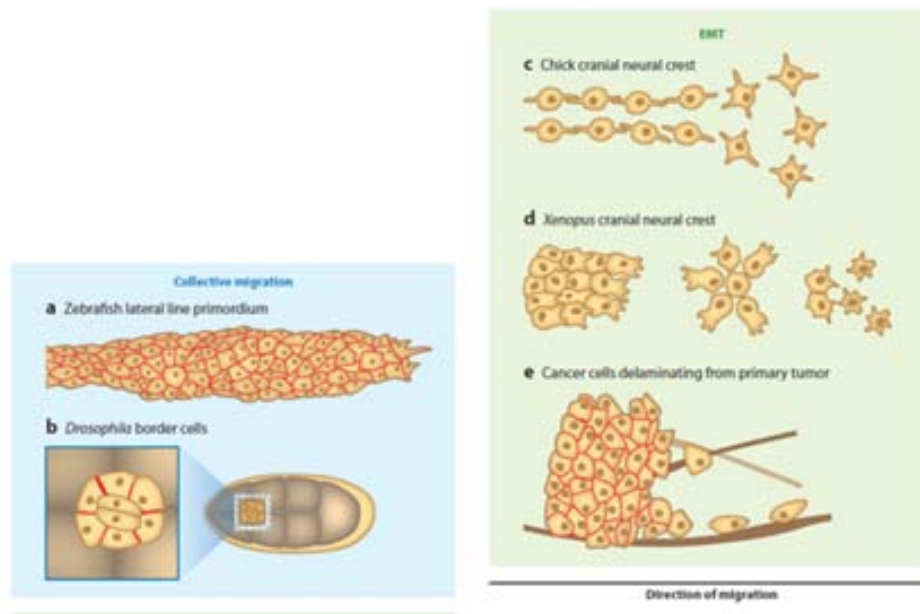


Figura 10: Diferència entre migració cel·lular col·lectiva i EMT

Migració cel·lular col·lectiva durant la formació de la línia primordial lateral en Zebrafish (A) i en les cèl·lules del marge de *Drosophila* (B). Fenomen de EMT durant la formació de la cresta neural en aus (C) i en *Xenopus* (D) així com en el procés de delaminació i migració de les cèl·lules tumorals a partir del tumor primari (E) (extret de Nieto, 2011 [127])

Durant la EMT mostrada tant en tumors com durant el desenvolupament embrionari, la disminució de la E-cadherina va acompanyada de l'increment de les cadherines mesenquimàtiques, tals com la N-cadherina, afavorint els dèbils contactes transitoris ocasionats pels fil·lopodis [133,134].

Un altre fenomen que es dona durant la migració de les cèl·lules sotmeses a una EMT és l'anomenada inhibició de la locomoció per contacte (*CIL*, *Contact Inhibition of Locomotion*), mecanisme pel qual les cèl·lules en contactar amb cèl·lules similars retreen les seves protuberàncies i canvien la direcció del desplaçament. Experiments tant *in vivo* com *in vitro* indicarien que el CIL promouria la dispersió cel·lular, permetent la distribució de les cèl·lules en el nou teixit, essent també important per la invasivitat de les cèl·lules neoplàsiques. [135]

4.9.2. Transició Epiteli–Mesènquima Parcial i fenotips intermedis

Cal destacar que les cèl·lules epitelials i les mesenquimàtiques serien exemples de fenotips més extrems del fenomen de la EMT. Malgrat això s'ha observat en un elevat nombre de casos que les EMT poden donar lloc a cèl·lules amb caràcters fenotípics intermedis entre aquests dos tipus cel·lulars. Aquests fenotips intermedis s'anomenen EMT parcials o pseudo-EMT, caracteritzats perquè mantenen l'expressió de certs marcadors de EMT al torn que poden mantenir part de les característiques epitelials. S'ha registrat doncs que en els carcinosarcomes de mama i en les fibrosis hepàtiques i renals, aquestes cèl·lules presenten una pseudo-EMT [127].

De tots els marcadors indicadors d'una Transició Epiteli-Mesenquima cal destacar la E-cadherina. Així s'ha observat que en totes les EMT, incloses les pseudo-EMT, es caracteritzen per presentar la pèrdua de les unions cel·lulars, generades en tots els casos per la repressió de la E-cadherina. Per contra, encara no s'ha registrat en cap tipus de migració cel·lular col·lectiva la repressió de la E-cadherina i la pèrdua de les unions cel·lular [127].

4.9.3. Implicació de CK2 en la EMT

Existeixen diferent aproximacions experimentals que han mostrat la implicació de les subunitats de CK2 en el fenomen de la transició epitel mesènquima. Així s'ha registrat que el silenciament o inhibició de la subunitat CK2 α en cèl·lules de càncer colorectal pot alterar l'expressió de la E-cadherina i vimentina, al torn que pot revertir la translocació nuclear de la β -catenina induïda per EGF. Així semblaria ser que el silenciament de CK2 α redueix l'expressió de Snail i Smad2/3, dos reguladors transcripcionals de la EMT i que reprimeixen l'expressió de la E-cadherina unint-se a les E-box (5'-CANNTG-3') dels seus promotors. D'aquesta manera, el silenciament de CK2 α reprimeix la EMT al permetre que s'expressi la E-cadherina [51].

Coincidint amb aquests resultats, estudis realitzats en cèl·lules epitelials mamàries no transformades, l'expressió ectòpica de CK2 α facilita l'expressió de gens relacionats amb la EMT [51].

Estudis realitzats sobre la línia cel·lular epitelial mamària MCF10A, mostren que el silenciament de CK2 β fa que adquireixin característiques mesenquimàtiques. Així les línies silenciades en CK2 β presenten una morfologia allargada que recorda als fibroblasts quan es comparen amb les control, amb un fenotip epitelial semblant al cuboïdal.

De la mateixa manera, les cèl·lules silenciades per CK2 β mostren pèrdues de les unions intercel·lulars, de l'adherència i una dispersió en el cultiu (*cell scattering*) característiques de les cèl·lules que han sofert una EMT [50].

La observació que les cèl·lules mesenquimàtiques presenten una secreció autocrina de TGF β , un dels principals inductors de la EMT és compartit també per les línies silenciades per CK2 β , les quals expressen TGF2 β [50]. De la mateixa manera els medis condicionats obtinguts d'aquestes cèl·lules silenciades causen l'activació de la EMT sobre línies normals [50].

No obstant això, el fenotip EMT induït en resposta al silenciament de CK2 β no s'aboleix bloquejant la via de TGF2 β a nivell del receptor de TGF2 β , suggerint una via alternativa [50].

S'ha proposat que la polarització s'estableix inicialment a través de la generació de un complex de senyalització PAR actiu, a través de la relocalització de PAR4 (LKB1). Estudis en línies intestinals humanes han mostrat també que cal la presència de CK2 β per que la cèl·lula executi de forma autònoma una polarització completa induïda per LKB1 [50]. Aquests estudis confirmarien que cal CK2 β per mantenir el fenotip epitelial i evitar la EMT [50].

En càncer de mama s'ha observat que desequilibris entre les subunitats CK2, ocasionades per la disminució dels nivells de CK2 β , es correlaciona amb l'expressió de marcadors de la EMT.

Les principals característiques de la EMT necessiten la inducció per part de Snail1, trobant-se afectat per CK2 a nivell de mRNA i proteïna. Així l'holoenzim fosforila Snail a la Ser92 unint-se a través de la seva subunitat reguladora, permetent la posterior fosforilació de Snail per GSK3 β i dirigint-lo a la seva degradació. De la mateixa manera s'ha observat que els silenciament de CK2 β causa una inducció de l'expressió del mRNA de Snail 1 [136].

Alguns grups com Deshieri et al, han proposat un model en el qual l'holoenzim CK2 actuaria com a una quinasa *upstream* de la regulació negativa de la inducció del programa de la EMT, i l'excés dels nivells de la subunitat CK2 β mantindrien un llindar d'expressió que reprimiria la EMT [136].

4.10. CK2 I ANOIKIS: RELACIÓ ENTRE APOPTOSI I EMT

L'anoikis és un tipus d'apoptosi característica de les cèl·lules epitelials que és induïda per la pèrdua d'adhesió cel·lular a la matriu extracel·lular (ECM) [117].

Així, s'ha observat que una de les principals propietats de les cèl·lules neoplàsiques és la capacitat de sobreviure en circulació i en condicions no adherents, essent insensibles a aquest tipus d'apoptosi.

L'anoikis relaciona dues característiques de les cèl·lules tumorals, la insensibilitat a l'apoptosi i la EMT comentades anteriorment. Estudis realitzats en línies cel·lular de càncer esofàgic, mostraven que línies que presentaven una baixa activitat CK2 o silenciaven CK2 α eren sensibles a l'anoikis, al torn que expressaven marcadors típicament epitelials com la E-cadherina. Per contra, línies que sobreexpressaven CK2 α o que tenien una activitat CK2 elevada, eren insensibles a l'anoikis, podien créixer en suspensió i presentaven el marcadors de la EMT, tals com la pèrdua de l'E-cadherina i l'increment de l'expressió de marcadors mesenquimàtics com N-cadherina i vimentina. Malgrat tot continuaven presentant l'expressió de certs marcadors epitelials com l'involucrina [117].

Aquest intercanvi E-cadherina/N-cadherina en la EMT, ha fet que certs grups com els de Ko et al, suggerissin que CK2, no només regularia els nivells de E-cadherina, sinó que també ho faria amb els de N-cadherina en els fenòmens de EMT [117].

II. OBJECTIUS

1. OBJECTIUS

La proteïna quinasa CK2 s'ha descrit com una quinasa ubiquament expressada en les cèl·lules eucariotes i que intervé en una àmplia varietat de processos cel·lulars. De la mateixa manera, alteracions en l'expressió d'aquesta proteïna han estat registrades en una àmplia varietat de patologies, entre les quals cal destacar el càncer, on s'ha observat un augment de la seva activitat, associada moltes vegades amb la proliferació cel·lular. Encara que s'han realitzat molts estudis de la implicació de CK2 en diferents neoplàsies, molts pocs han estudiat el paper d'aquesta quinasa en el carcinoma renal de cèl·lules clares (ccRCC), en el qual s'han registrat tant increments de la subunitat reguladora com de la catalítica de CK2. En aquest treball s'ha volgut aprofundir més en el paper que realitza CK2 en el desenvolupament del ccRCC. Per a dur-ho a terme, ens vam plantejar els següents objectius:

- 1- Determinar en extractes tissulars i en talls histològics de pacients afectats de ccRCC si hi ha alteracions en l'expressió de les subunitats de CK2, així com canvis en la distribució de les seves subunitats.
- 2- Observar si existeix una correlació entre els nivells de CK2 i l'estadiatge tumoral, podent actuar com un potencial marcador de pronòstic de la patologia.
- 3- Obtenir línies cel·lulars renals humanes derivades de túbul proximal silenciades de forma estable per CK2 α o CK2 β , com a model d'estudi de la patologia *ex vivo*.
- 4- Caracteritzar les línies renals interferides per les subunitats de CK2 i determinar si el silenciament de les subunitats indueixen un fenotip indicatiu de propietats neoplàsiques i similars al del ccRCC.

III. MATERIALS I MÈTODES

1. OBTENCIÓ I ANÀLISI IMMUNOLÒGIC DE MOSTRES DE TEIXIT RENAL HUMÀ

1.1. SELECCIÓ DELS CASOS CLÍNICS

Es van analitzar les dades clíniques i patològiques d'un total de 168 pacients amb masses renals tractades per nefrectomia parcial o radical, entre gener del 2002 i desembre del 2005 a l'Hospital Vall d'Hebron. D'entre aquests casos només es va aconseguir disposar de dades d'estadiatge clínic, grau nuclear de Führman, data de diagnòstic, informació demogràfica, etc. d'un total de 98 pacients afectats per ccRCC. Les mostres de teixit renal provinents d'aquests 98 pacients eren incloses en TMAs (*Tissue MicroArrays*) i es varen usar per avaluar l'expressió de les subunitats de CK2 en nucli i citoplasma.

També es va disposar de mostres de teixits renals procedents de 26 pacients afectats per diferents carcinomes renals (entre ells, 15 casos de ccRCC) que no coincidien amb els analitzats en els TMAs.

1.2. CONSTRUCCIÓ DE MICROARRAYS DE TEIXIT

Els microarrays de teixit (TMAs) van ser cedits pel Departament de Patologia de l'Hospital Universitari de la Vall d'Hebron. Els TMAs presenten l'avantatge de permetre l'estudi de l'expressió de diferents proteïnes en un ampli nombre de mostres, reduint el nombre de tincions i, per tant, la variabilitat entre experiments.

La construcció de cadascun dels TMAs s'havia portat a terme mitjançant l'ús del *Advanced Tissue Arrayer* [Chemicon International], el qual permet muntar múltiples mostres de teixit en un sol bloc de parafina. Un patòleg, analitzant les seccions tissulars tenyides amb Hematoxilina-Eosina, va identificar les àrees normals, tumorals i transicionals d'interès per a cadascun dels pacients. Per a cadascuna d'aquestes àrees es van fer perforacions diferents de 1,2 mm de diàmetre que van ser finalment incloses en un bloc de parafina receptor. D'aquesta manera es van construir els TMAs que recullen les mostres dels 98 pacients afectats de ccRCC comentats en l'apartat anterior. Per a cadascun dels pacients es varen disposar de triplicats de perforacions de diferents àrees tumorals, normals i transicionals.

1.3. IMMUNOHISTOQUÍMICA

L'immunohistoquímica (IHC) és una metodologia basada en la detecció d'antígens en les cèl·lules d'un teixit a partir de la premissa de que els anticossos s'uneixen específicament al seu corresponent antigen en un teixit biològic. La tinció immunohistoquímica és àmpliament utilitzada en recerca bàsica per a conèixer la distribució, localització i expressió diferencial de diferents proteïnes d'un teixit, així com en el diagnòstic de cèl·lules anormals tals com les trobades en els teixits tumorals. En aquest cas s'ha utilitzat per a la identificació de determinats antigens (CK2 α i CK2 β) en mostres de talls tissulars procedents de tumors renals.

La interacció antigen-anticòs pot visualitzar-se de diferents formes, encara que en aquest cas s'han usat mètodes colorimètrics, basats en la producció d'un precipitat acolorit per part d'un anticòs conjugat amb

una peroxidasa. Quan aquest anticòs està conjugat enlloc d'un enzim, a un fluoròfor la tècnica passa a designar-se immunofluorescència.

Un altre paràmetre a destacar de la tècnica és la preparació de les mostres, essencial pel manteniment de la morfologia tissular i que requereix tres etapes: la dissecció, fixació i la selecció del teixit. Així depenent del mètode de fixació i preservació del teixit, caldrà portar a terme processos per exposar els antigens als seus anticossos, com el desparafinat i el desenmascarament dels epítops.

En aquest cas, els talls de mostres tissulars, TMA's i biòpsies, van ser fixades en formaldehid, integrades en parafina i es van tallar en seccions de 5 µm per elaborar les immunohistoquímiques.

Materials i reactius:

- Xilè
- Etanol
- H₂O milli-Q estèril
- PBS 1X (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂PO₄·2H₂O, 1.8 mM KH₂PO₄, pH 7.4)
- PBS-T [PBS 1X + 0,1% Tween-20]
- Tampó citrat [DAKO] (S2031 Dako)
- DakoPen [DAKO] (S2002 Dako)
- Peroxidase-Blocking Solution [DAKO] (Dako S2023)
- *Normal Horse Serum* (NHS)
- Anticòs primari (veure Taula 10)
- Dako Real EnVision HRP Rabbit/Mouse [DAKO] (K5007 Dako)
- DAB [DAKO] (K5007 Dako)
- Hematoxilina de Harris [DAKO]
- DPX Mountant for histology [Fluka] (44581 Fluka)

Procediment:

- Incubar les mostres parafinades a 55°C durant tota la nit. Els portaobjectes es col·locaran protegits i en posició vertical per tal de què eliminin l'excés de parafina.
- Desparafinat: Procés per acabar d'eliminar restes de parafina i que consta de 3 etapes seqüencials:
 - 3 rentats en xilè de 15 minuts cadascun (pot ser necessari un rentat extra).
 - 1 rentat en etanol 100% de 10 minuts.
 - 1 rentat en etanol 100% de 5 minuts.
- Hidratació: Incubacions seqüencials de 45 segons cadascuna en etanol 100%, 95%, 85%, 70%, 50%, 30% i H₂O o PBS 1X.
- Rentat de 5 minuts en PBS-T (PBS + 0,1% Tween-20).
- Desemmascarament de l'epítop:
 - Tractament amb tampó citrat 10 mM pH 6,0 al microones durant 5 minuts a màxima potència, evitant que bulli i cobrint amb més tampó si és necessari.
 - Deixar refredar a temperatura ambient fins a 75°C.
 - Escalfar de nou durant 15 min al microones a mínima potència.
 - Deixar refredar fins a assolir la temperatura ambient.

- Rentar 5 minuts amb aigua milli-Q.
 - Rentar durant 5 minuts amb PBS 1X.
- Immunotinció:
- Assecar els portaobjectes al voltant dels talls evitant que s'assequin i dibuixar un cercle al voltant amb el DakoPen.
 - Bloquejar la peroxidasa endògena durant 10 minuts amb 100 µL de 3% Peroxidase-Blocking Solution a les fosques.
 - Rentar 5 minuts en PBS-T.
 - Bloquejar els llocs inespecífics amb 70 µL de solució de bloqueig (10% *Normal Horse Serum*; 0,1% T-20 en PBS 1x) durant 1 hora a temperatura ambient.
 - Treure l'excés suaument i incubar el teixit durant la nit a 4 ° C amb l'anticòs primari corresponent en les condicions mostrades a la taula inferior (Taula 10).
 - Fer 2 rentats de 5 minuts en PBS-T.
 - Assecar els portes al voltant dels talls.
 - Incubar el teixit amb dues gotes del sistema Dako Real EnVision HRP Rabbit/Mouse durant 40 min a temperatura ambient.
 - Fer 3 rentats de 5 minuts en PBS-T.
 - Revelar incubant amb DAB durant 4 minuts. El DAB es prepara mantenint la proporció de 1 ml Buffer B (Dako Real Substrate Buffer) amb 20 µL de DAB (Buffer C, DAB+Chromogen x50).
 - Rentar durant 5 minuts en PBS.
 - Contratenyir els nuclis amb hematoxilina de Harris durant 45 seg.
 - Rentar abundantment amb H₂O destil·lada.
- Deshidratació: Incubacions seqüencials de 45 segons cadascuna en H₂O, etanol 30%, 50%, 70%, 85%, 95% i 100%. Rentar en xilè durant 3 minuts dues vegades.
- Muntatge: S'utilitza el medi de muntatge orgànic DPX (*DPX Mountant for histology*)
- S'elimina la tinta del DakoPen amb un paper, ja que malgrat que no interfereix amb la mostra, en col·locar-hi el medi de muntatge esdevé un residu visualment desagradable.
 - Es col·loquen 2 o 3 gotes del medi de muntatge DPX amb una pasteur.
 - Amb compte es posa a sobre el portaobjectes un cobreobjectes llarg, evitant generar bombolles d'aire entre aquest i la mostra.

Taula 10: Condicions IHQ

Anticòs Primari	Referència	Origen	Dilució	Temps
CK2α (H286)	SC-9030	Rabbit	Dil 1/50	O/N 4°C
CK2β (6D5)	SC-12739	Mouse	Dil 1/50	O/N 4°C

1.4. VALORACIÓ DE L'EXPRESSIÓ DE CK2A I CK2B EN MOSTRES DE TEIXIT RENAL

Els nivells de les subunitats de CK2 en teixit renal van ser avaluats mitjançant el mètode semiquantitatiu del *Hscore*. Aquest mètode es basa en calcular el percentatge de cèl·lules epitelials tenyides i la intensitat de tinció en cada cas. Per a cada mostra es va analitzar l'expressió de CK2 α i CK2 β tan a nucli com a citoplasma de forma simultània per dos avaluadors diferents al Servei d'Anatomia Patològica sota la supervisió de les doctores Inés de Torres i Mayte Salcedo.

Els valors de *Hscore* oscil·len entre 0 (sense tinció) i 300 (mostra intensament tenyida) i es calcula mitjançant la fórmula següent:

$$Hscore = 0x (\% \text{ cèl. sense tinció}) + 1x (\% \text{ cèl. tinció dèbil}) + 2x (\% \text{ cèl. tinció moderada}) + 3x (\% \text{ cèl. tinció intensa}).$$

Per a cada pacient es va obtenir la mitjana dels *Hscores* de les tres mostres recollides i les dades van ser analitzades mitjançant distribució t-Student, o ANOVA d'una via (amb la correcció de Bonferroni) segons procedís mitjançant el programa GraphPad Prism 5.

1.5. EXTRACCIÓ DE PROTEÏNES DE TEIXIT RENAL HUMÀ

El teixit renal es caracteritza per ser un teixit molt compacte i cal un tractament més agressiu per a l'obtenció d'extractes. És necessari complementar l'acció del tampó de lisis amb mecanismes físics com la pressió exercida per èmbols, xeringues o sonicadors.

Per a l'obtenció dels extractes renals utilitzats en aquest treball es va fer ús del tampó de llisi següent: 50 mM TrisHCl pH 7.7, 150 mM NaCl, 15 mM MgCl₂, 0,4 mM EDTA, 0,5% Tritó-X-100 (s'addiciona després de la sonicació), 0,5 mM DTT, 100 µg/ml Leupeptina, 100 µg/ml Aprotinina, 10 mM Benzamidina, 2 mM PMSF.

Materials i reactius:

- Tampó de llisi de teixits renals
- Èmbol
- Agulles hipodèrmiques de 20 gauge
- Tubs Eppendorf
- Sonicador
- Microcentrífuga refrigerada

Procediment:

- Es pesen les mostres de teixit renal congelat i es deixen en un eppendorf. Es deixa que les mostres de teixit es descongelin en gel.
- S'addiciona per a 100 mg de teixit renal, 250 µL de tampó de llisi fred (sense Tritó).
- Amb l'ajut d'un èmbol, i sempre en gel, es disgrega enèrgicament el teixit. És recomanable que just abans de afegir-hi el tampó, es pressioni el teixit amb l'èmbol, ja que facilita la seva posterior disgregació.
- Es soniquen les mostres a potència màxima mantenint-les en gel. Es realitzen 10 polsos de 5 segons amb un interval de descans de 10 segons entre sonicacions. Es poden també passar per una xeringa

d'insulina de 20 *gauge* uns 10 cops, però a vegades és difícil homogenitzar amb elles i es recomana allargar les sonicacions.

- S'afegeix el volum de Tritó necessari a la mostra per tal de què quedi a una concentració final del 0,5%.
- S'incuben els extractes en gel durant 30 minuts, mesclant per inversió les mostres cada 5 minuts.
- Es centrifuguen les mostres a 10.000 xg durant 20 minuts a 4°C. Es recupera el sobrenedant i es congela a -80°C.

2. LÍNIES CEL·LULARS

2.1. CARACTERÍSTIQUES DE LES LÍNIES CEL·LULARS

Les línies cel·lulars emprades en aquest treball van ser obtingudes de l'ATCC (*American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA*) i són línies humanes derivades de cèl·lules renals embrionàries i teixit epitelial renal humà. Les línies i les seves característiques s'indiquen a continuació.

- **HEK293T (CRL-11268TM): BSL-2**

Es tracta d'una variant de la línia cel·lular humana HEK293 (*Human Embryonic Kidney 293 cells*), transformades amb el gen que codifica per l'antigen T gran del virus SV40. Aquesta línia és originària de cèl·lules embrionàries de ronyó humà. Es caracteritzen per presentar una morfologia epitelial i créixer de forma adherent. Cal destacar que presenten un ampli ús en el camp experimental, ja que són unes línies de proliferació ràpida, amb una elevada facilitat de transfecció i expressió dels transgens. Aquesta elevada expressió del transgen ve donada per l'amplificació episomal d'aquells plàsmids transfectats que contenen l'origen de replicació del SV40.

- **786-O (CRL-1932TM): BSL-1**

Línia derivada d'un adenocarcinoma de cèl·lules clares primari, obtinguda d'un home caucàsic de 58 anys. Presenten hipertriploidia i en més del 60% de les cèl·lules examinades es manté la presència Y. La línia es caracteritza per presentar una morfologia epitelial, tenir tant microvil·lis com desmosomes i malgrat que sigui adherent, pot créixer en agar tou. S'ha determinat que també presenta capacitat tumorigènica en hámsters immunodeprimits.

La línia produeix també *Parathyroidal like peptides* (PTH), generats també en càncers de mama i pulmó.

- **HK-2 (CRL-2190TM): BSL-2**

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

La línia es caracteritza per ser una línia de morfologia epitelial i que manté un creixement dependent d'ancoratge, la qual cosa impossibilita la seva expansió en metilcel·lulosa, agar tou o suspensió. La línia reté característiques funcionals de l'epiteli tubular, tals com transportadors de glúcids Na⁺ dependents, resposta de l'adenilat ciclase dependent de l'hormona paratiroidea (PTH) però no la antidiürètica (ADH). Poden generar també gluconeogènesis i emmagatzemar glicogen.

Tot això fa que les línies HK-2 es considerin adequades per a reproduir resultats experimentals obtinguts de cèl·lules del túbul proximal de cultius primaris.

2.2. MANTENIMENT CEL·LULAR

Les línies cel·lulars renals emprades en aquest treball, es mantenen en creixement en flascs T75 fins que assoleixen 80-90% de confluència, moment en el qual es realitza el passatge de la línia a un nou flasc. El temps transcorregut entre passatges varia en funció de la velocitat de creixement de la línia i de la densitat de cèl·lules sembrades en el nou passatge. És important remarcar el fet que cal conèixer en tot moment quants passatges presenten les línies del cultiu, ja que a mesura que aquests augmenten, les línies cel·lulars van canviant les seves característiques. Aquest fet és molt important sobretot en el cas de les línies silenciades de manera estable mitjançant shRNA, ja que diferents estudis han comprovat que amb els passatges elevats, desapareixen els silenciaments gènics de la línia modificada. Per tal de poder reduir aquesta variabilitat, les línies quan assoleixen 15 passatges són eliminades i es descongela un nou estoc de cèl·lules.

En principi, totes les línies renals emprades creixen en medi DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) complet. Malgrat això, en certs casos (com en el cas de les línies silenciades per les subunitats de CK2) el medi presentarà un antibiòtic de selecció per assegurar que les línies que continuen creixent són les silenciades de forma estable. A continuació s'adjunta una taula on hi ha els medis emprats en funció de la línia o tractament:

Taula 11: Composició dels medis cel·lulars emprats			
Medi	Composició	Línia	Condicció
DMEM complet	DMEM (10% FBS, 1 Mm piruvat sòdic, 1% (v/v) Glutamina, 1% (v/v) Penicilina Estreptomicina)	HEK293T	Creixement i manteniment de línies <i>wild type</i>
		786-O	
		HK-2	
DMEM antibiòtics de selecció	DMEM (10% FBS, 1Mm piruvat sòdic, 1% Glutamina, 1% Penicilina Estreptomicina) + 1µg/mL puomicina	786-O shCK2α	Creixement, manteniment i selecció de línies silenciades per CK2 i control
		786-O shCK2β	
		786-O shCV	
		HK-2 shCK2α	
		HK-2 shCK2β	
	HK-2 shCV		

Materials i Reactius:

- DMEM complet
- Tripsina
- PBS 1x estèril (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂PO₄·2H₂O, 1,8 mM KH₂PO₄, pH 7,4)
- Pipetes Pasteur
- Pipetes serològiques
- Flascs T75

Procediment:

- El procediment comentat està basat en el manteniment en un flasc de 75 cm². Per flascs o plaques de altres mides els volums emprats són els mostren a la taula adjunta.
- S'aspira el medi i es renta el flasc amb 10 ml de PBS 1x estèril.

- S'afegeix 2 mL de tripsina i s'incuba el flasc a l'incubador de 37°C per permetre que les cèl·lules es desenganxin. El temps variarà en funció de la línia, però sol ser de 2-4 minuts.
- Amb petits cops laterals al flasc, s'acaben de desenganxar les cèl·lules i s'addicionen 8 mL de medi complet per tal d'inactivar la tripsina.
- Es resuspenen les cèl·lules del flasc i s'afegeixen 2 mL de resuspensió cel·lular a un nou flasc. D'aquesta forma es sembla aproximadament el 20% de les cèl·lules del cultiu original. Depenent de la situació es poden variar aquests volums per a tenir un cultiu amb major o menor densitat cel·lular.
- Al nou flasc s'afegeix medi complet fins a un volum final de 10 mL.
- El flasc es manté en un incubador a 37°C, al 5% CO₂ i en una atmosfera humida.

Taula 12: Volums de medi, dels rentats i tripsina usats per a les diferents plaques i flascs de cultiu emprats:

Plaques i flascs	Rentats PBS	Tripsina	Medi resuspensió	Volum final medi
Plaques de 24 pous	0,5 mL	0,1 mL	0,250 mL	0,5 mL
Plaques de 12 pous	1 mL	0,2 mL	0,5 mL	1 mL
Plaques de 6 pous	2 mL	0,4 mL	1 mL	2 mL
Plaques de 35 mm diàmetre	2 mL	0,4 mL	1 mL	2 mL
Plaques de 60 mm diàmetre	6 mL	1 mL	2 mL	6 mL
Flascs T25	5 mL	1 mL	2 mL	5 mL
Flascs T75	15 mL	3 mL	5 mL	15 mL

2.3. RECOMPTE CEL·LULAR

En moltes de les metodologies emprades en aquest treball cal partir d'una concentració coneguda de cèl·lules. Per aquest recompte cel·lular s'han usat dues metodologies diferents: el recompte amb cambra de Neubauer i el comptatge mitjançant l'ús del comptador automàtic de cèl·lules *Cell Counter* [Bio-Rad].

- **Recompte amb cambra de Neubauer**

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

Materials i Reactius:

- Tripan blue
- Cambra de Neubauer
- Cobreobjectes
- PBS 1x estèril (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂PO₄·2H₂O, 1,8 mM KH₂PO₄, pH 7,4)

Procediment:

- S'agafa una petita alíquota de la resuspensió cel·lular d'interès.
- En un tub eppendorf estèril afegim 50 µL de resuspensió cel·lular, 150 µL PBS 1X i 50µL de Tripan blue, un colorant que tenyeix les cèl·lules mortes.
- Es mescla bé amb un pols de vòrtex i s'omplena la cambra de Neubauer amb la resuspensió de cèl·lules.
- Es comptaran el número de cèl·lules viables (que no queden tenyides pel colorant) en quatre camps diferents.
- A partir del nombre de cèl·lules comptades en els 4 camps i seguint la fórmula següent es podrà conèixer la quantitat de cèl·lules que tenim en resuspensió.

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

- Recompte amb comptador automàtic de cèl·lules Cell Counter

Aquest mètode és més senzill ja que fa ús d'un comptador automàtic cel·lular i no cal utilitzar ni la cambra de Neubauer ni el microscopi invertit. Té l'avantatge que és ràpid i àgil, resultant útil en els casos en que es treballa amb múltiples línies de forma simultània i no poden estar massa temps en resuspensió. Té l'inconvenient de que no pot detectar densitats inferiors a les 25.000 cèl·lules/mL ni superiors a 2.000.000 cèl·lules/mL, així com línies cel·lulars que tinguin una mida petita (< 25µm diàmetre) i que es trobin agrupades.

Material i Reactius

- Tripan blue
- TC10™ Automated Cell Counter [Bio-Rad]
- Cambra de recompte cel·lular automatitzada.

Procediment:

- S'afegeix 50 µL de resuspensió cel·lular en un tub eppendorf estèril i s'addiciona 50 µL de tripan blue.
- Es dóna un pols de vòrtex a la mostra
- Es carreguen 20 µL a una de les cavitats de recompte de la cambra de recompte cel·lular automatitzada.
- Es col·loca la cambra de recompte dins del comptador cel·lular. L'aparell ens donarà el nombre de cèl·lules viables de la mostra.

2.4. OBTENCIÓ LÍNIES SILENCIADES ESTABLES

2.4.1. Vectors i shRNA (*short hairpin RNA*)

Els siRNAs (*small interfering RNAs*) processats a partir dels shRNAs (*short hairpin RNA*) són un bon mecanisme per tal de realitzar una interferència específica de determinats mRNA, donant lloc a la supressió de la proteïna codificada per un gen d'interès. En aquest cas es va decidir usar shRNA comercials contra les subunitats de CK2, clonats dins d'un vector integratiu que havia estat prèviament empaquetat dins d'una partícula lentiviral (MISSION® *Lentiviral Transduction Particles*).

Els shRNA contra les subunitats de CK2 i el shRNA control estan clonats dins de dos tipus de vectors diferents (pLKO.1-puro vector i TRC2-pLKO-puro vector) presentant els dos vectors capacitat integrativa, un promotor constituït per l'expressió del shRNA (*U6 promoter*) i un gen de resistència a la puromicina (*puroR*) per a seleccionar les línies que l'expressen.

Les característiques dels shRNA usats pel silenciament de les subunitats de CK2 i que estaven empaquetats en les partícules lentivirals es detallen a continuació.

Taula 13: Característiques dels shRNA usats pel silenciament de les subunitats de CK2	
shRNA contra CK2β	
Referència	NM_001320.x-823s1c1
Nº Clon	TRCN0000003796
Gen	CSNK2B
Plàsmid	pLKO.1-puro (U6, cppt, hPGK, puroR, SIN/3' LTR, fl ori, ampR, pUC ori, 5' LTR, Psi, RRE)
Seqüència	5'- CCGGTGGTTTCCCTCACATGCTCTTCTCGAGAAGAGCATGTGAGGGAAACCAT TTTT-3'
Diana	CDS (unió a nucleòtids 823-844 de CSNK2B mRNA)
shRNA contra CK2α	
Referència	NM_177559.2-1895s21c1
Nº Clon	TRCN000032085
Gen	CSNK2A1
Plàsmid	TRC2-pLKO-puro (U6, cppt, hPGK, puroR, SIN/3' LTR, fl ori, ampR, pUC ori, 5' LTR, Psi, RRE, WPRE)
Seqüència	5'- CCGGCAATCCCGGCTGCTGCATTTACTCGAGTAAATGCAGCAGCCGGGATTGT TTTTG-3'
Diana	3'UTR de CSNK2A1 mRNA
shRNA control (<i>target not known mammalian genes</i>)	
Referència	SHC202V
Nº Clon	nd
Gen	Non target
Plàsmid	TRC2-pLKO-puro (U6, cppt, hPGK, puroR, SIN/3' LTR, fl ori, ampR, pUC ori, 5' LTR, Psi, RRE, WPRE)
Seqüència	nd
Diana	Non target
nd (<i>informació no disponible</i>)	

2.4.2. Transducció cel·lular mitjançant partícules lentivirals

Per tal d'obtenir línies estables renals que presentessin un silenciament de l'expressió de les subunitats de CK2 α o CK2 β , es va decidir usar partícules lentivirals empaquetades de la casa comercial Sigma-Aldrich (MISSION® Lentiviral Transduction Particles) portadores de un shRNA clonat dins d'un plàsmid integratiu, tal com s'ha detallat a l'apartat anterior.

Aquestes partícules tenen l'avantatge de permetre una eficient infecció i integració del constructe de shRNA en cèl·lules que presenten dificultats per ser transfectades amb tècniques més convencionals tals com HK-2 i 786-O.

D'aquesta manera es van obtenir línies cel·lulars HK-2 i 786-O estables que expressaven de forma constitutiva shRNA contra CK2 α (HK-2 shCK2 α i 786-O shCK2 α) o contra CK2 β (HK-2 shCK2 β i 786-O shCK2 β), així com línies que havien incorporat un shRNA control que no interaccionava amb cap mRNA de mamífer (HK-2 shCV i 786-O shCV). L'obtenció d'aquestes línies es va portar a terme en el Servei de Cultius Cel·lulars, Producció d'Anicossos i Citometria (SCAC) de la UAB.

Materials i reactius:

- Plaques multipous de 6 pous
- PBS 1X (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂PO₄·2H₂O, 1,8 mM KH₂PO₄, pH 7,4)
- Tripsina
- DMEM complet
- DMEM complet + 1 μ g/mL puromicina
- Polybrene (hexadimethrine bromide)

Procediment:

Dia 1:

- Es plaqueja la línia cel·lular d'interès (en el nostre cas HK-2 i 786-O) en medi complet les 24h prèvies a la transducció a la densitat desitjada. La sembra s'ha de realitzar de tal forma que, en el moment de la transducció amb les partícules lentivirals, les cèl·lules no superin el 50-80% de confluència per a facilitar la futura selecció de les línies.

De la mateixa forma, es sembra per a cada cas una placa control a la mateixa densitat cel·lular.

Dia 2:

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

Per a calcular els volums de partícules a afegir es van usar les següents fórmules:

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

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

Dia 3:

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

Dia 4 i posteriors:

- Per a realitzar una transducció estable, cal que es seleccionin les cèl·lules que han integrat el vector al seu genoma. Per a fer-ho es renova el medi amb medi complet amb 1 µg/mL de puromicina. La concentració de puromicina escollida per a la selecció depèn de la sensibilitat de la línia a l'antibiòtic, i es va determinar prèviament amb una corba de mort cel·lular per a cadascuna de les línies.
- Es canvia el medi cada 2-3 dies per medi complet amb 1 µg/mL de puromicina, fins a tenir la línia seleccionada. La selecció dura entre 5 i 6 dies, moment en el qual les cèl·lules necessiten ser ressebrades degut al seu creixement i les cèl·lules de la placa control presenten el 100% de mortalitat.

2.5. CORBES DE CREIXEMENT

Un dels principals factors a considerar a l'hora de poder caracteritzar el comportament d'una línia cel·lular és la seva taxa de proliferació. Així doncs, depenent de l'origen de la línia, de si prové d'un organisme adult o presenta un origen embrionari, o de si ha estat transformada o no, presentarà taxes de divisió diferenciades.

L'augment d'una taxa de proliferació d'una línia davant de certs compostos, o bé davant de la seva modificació gènica, ens indicarà el seu creixement (descontrolat/anormal) una de les principals característiques de les línies tumorals.

Hi ha diferents metodologies per a estudiar la taxa de proliferació de les línies cel·lulars, encara que en aquest treball s'han usat tres tècniques diferents: l'assaig de proliferació en MTT, el recompte de les cèl·lules en cristall violeta i el recompte de creixement en suspensió.

2.5.1. Assaig de Proliferació en MTT

La reducció de les sals de tetrazolium és un mètode àmpliament acceptat per a la mesura de la proliferació cel·lular. L'assaig del MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] descrit per primer cop per Mosmann [137], es basa en l'habilitat de les deshidrogenases mitocondrials (succinat

deshidrogenasa) de les cèl·lules vives de trencar els anells de tetrazolium del MTT, donant lloc a cristalls de formazan, que es caracteritzen per la seva coloració blavosa i ser impermeables a les membranes cel·lulars, permetent la seva acumulació dins de les cèl·lules sanes. L'addició de DMSO a les cèl·lules, causa la llisi de les seves membranes i també la solubilització dels cristalls de formazan. Mitjançant l'ús d'un espectrofotòmetre, es podrà determinar la concentració de formazan format, que serà directament proporcional al de cèl·lules viables de les que partiem i per tant s'incrementarà a mesura que augmenti la taxa de divisió cel·lular.

Materials i Reactius:

- Plaques de 24 pous
- DMEM
- MTT (5 mg/mL)
- DMSO
- Lector de plaques (Synergy HT Bio-Tek)

Procediment:

- Es sembren varies plaques de 24 pous amb les línies d'interès. Es realitza una mesura cada dia durant 6 dies, sense comptar una mesura inicial el dia de la resembra, que serà el temps 0.
- Per a cada placa es sembren en medi complet 4 pous (tetraplicats) de cada línia a dues densitats diferents: 2.500 cèl·lules/pou i 5.000 cèl·lules/pou. El volum final de medi a cada pou serà de 500 µL.
- Per tal d'assegurar que cada placa i cada pou rep la mateixa quantitat de cèl·lules, es mescla prèviament en un falcon estèril la mescla necessària de resuspensió cel·lular amb medi que necessitem per a totes les plaques i es sembren ràpidament a cada pou mesclant prèviament les cèl·lules del falcon.
- La placa per calcular la densitat inicial de cèl·lules (temps 0) serà analitzada al cap de 5 hores de la resembra (el temps necessari perquè les cèl·lules s'hagin adherit). La resta de les plaques es mesuraran cada dia a la mateixa hora seguint la metodologia de mesura del MTT mostrada a continuació.
- S'afegeixen 50 µL MTT/pou a la campana i en fosc per a tenir una concentració final de 0,5 mg/mL de MTT.
- S'incuben les cèl·lules a 37°C, protegides de la llum durant 40 minuts. Cada 5 minuts s'agita la placa per assegurar que el MTT es mescla bé.
- S'aspira el medi amb el MTT de cadascun dels pous.
- S'afegeix per a cada pou 400 µL de DMSO i s'agita. El DMSO trencarà les membranes plasmàtiques de les cèl·lules i es solubilitzarà els cristalls de formazan generats.
- Es procedeix a la lectura en un lector de plaques a 560 nm i a 620 nm. La ratio A_{560}/A_{620} obtinguda es correlaciona amb el nombre de cèl·lules viables.

2.5.2. Recompte del creixement cel·lular en resuspensió

Aquest recompte es basa simplement en anar mesurant al llarg dels dies, l'increment de cèl·lules obtingudes de la resuspensió d'un flasc. Per a realitzar-lo, s'usa un protocol basat en el del manteniment dels cultius cel·lulars (apartat 2.2), només amb la diferència que la resuspensió sempre es realitzarà mantenint el mateix volum final i que un cop realitzat el recompte, la totalitat de cèl·lules de la resuspensió es sembrarà de nou al mateix flasc. El recompte de les cèl·lules es realitza amb cambra de Neubauer o bé comptador automàtic de cèl·lules.

Materials i Reactius:

- DMEM complet
- Tripsina
- PBS 1x estèril (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂PO₄·2H₂O, 1,8 mM KH₂PO₄, pH 7,4)
- Pipetes serològiques
- Flasc T75
- Tripán blue

Procediment:

- Sembrem 50.000 cèl·lules en un flasc de 75 cm². Afegim medi complet fins a un volum final de 10 mL. Per a cada dia de recompte es realitzarà el següent:
- S'aspira el medi i es renten les cèl·lules amb 10 mL de PBS 1x estèril.
- S'afegeixen 2 mL de tripsina i es deixa el flasc a l'incubador 2 minuts per tal de afavorir l'acció de la tripsina. S'acaben de desenganxar les cèl·lules del flasc amb petits copets.
- S'afegeixen 8 mL de medi complet i es resuspenen les cèl·lules.
- Es recompten les cèl·lules de la resuspensió amb cambra de Neubauer. Es comptaran les cèl·lules de 8 camps i a partir del nombre de cèl·lules /mL i el volum de la resuspensió es determinarà el nombre de cèl·lules del flasc.
- Es resembra de nou la totalitat de la resuspensió a un nou flasc.
- Al cap de 5 hores, quan les cèl·lules s'hagin adherit, es renovarà el medi per evitar l'acumulació de tripsina a mesura que augmenten els recomptes.

2.5.3. Recompte del creixement cel·lular en placa i tinció amb cristall violeta

Aquest assaig permet obtenir informació de la densitat relativa de cèl·lules que creixen adherides en una placa. La metodologia emprada es basa en l'ús d'un colorant, el cristall violeta que té la capacitat de tenyir el DNA de les cèl·lules. Per a portar-ho a terme, les cèl·lules sembrades seran prèviament fixades amb 4% paraformaldehid (PFA) i posteriorment tenyides amb el colorant.

El creixement podrà mesurar-se mitjançant el recompte de cèl·lules en un elevat nombre de camps mitjançant l'ús d'un microscopi invertit, o bé mitjançant la llisis de les cèl·lules per a posteriorment mesurar amb l'espectrofotòmetre el cristall violeta alliberat.

Materials i Reactius:

- Paraformaldehid 4% (PFA 4%)
- PBS 1X (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂PO₄·2H₂O, 1,8 mM KH₂PO₄, pH 7,4)
- Solució cristall violeta (0,05% p/v cristall violeta en H₂O milli-Q, prefiltrada)
- Plaques de 6 cm diàmetre
- Microscopi invertit.

Procediment:

- Es sembren 2.500 cèl·lules en una placa de 6 cm de diàmetre per a cada dia d'estudi i per línia i es deixen a l'incubador fins al moment de la mesura.
- En el moment de la quantificació es fixen les cèl·lules durant 5 minuts amb PFA 4%
- S'elimina el PFA 4% i es tenyeixen 30 minuts amb la solució de cristall violeta 0,05%.
- Es fan 2 rentats de les plaques amb H₂O.
- S'elimina l'excés d'H₂O i es deixa assecar per inversió.
- En el nostre cas el creixement es mesurava per comptatge directe de les cèl·lules, ja que la llisi, quan hi ha una baixa densitat de cèl·lules dona poca coloració. Per a fer-ho es quadriculava la placa en 20 seccions de la mateixa superfície mitjançant l'ús d'un retolador permanent. Sota el microscopi es comptaven les cèl·lules presents a un camp de cada secció.
- El nombre de cèl·lules per dia s'obtenia a partir de la mitjana dels 20 camps.
- En el cas que es vulgui determinar el creixement de forma espectrofotomètrica, les plaques fixades i tenyides es poden guardar a 4°C i a continuació es llisten amb 500 µL de metanol.
- A continuació es realitza la mesura a 540 nm mitjançant un espectrofotòmetre.

2.6. OBTENCIÓ D'EXTRACTES CEL·LULARS TOTALS

Per a l'obtenció d'extractes cel·lulars totals de les línies cel·lulars renals *wild type* com de les silenciades per les subunitats de CK2 es va fer ús del següent tampó de llisi: 50 mM Tris-HCl pH 7,4, 150 mM NaCl, 1 % triton-X-100, 1 mM DTT, 1 mM PMSF, 1 mM EDTA, 25 mM NaF, 0,2 mM Na₂VO₃, 2 mM PPI, 1 µg/mL d'inhibidors de proteases (leupeptina, benzamidina, aprotinina, pepstatina).

Materials i reactius:

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

Procediment:

- Es renten les cèl·lules amb PBS1x i s'addicionen 750 µL de tampó de llisi fred per a cada placa de 10 cm de diàmetre. En funció de la mida de la placa i de la concentració de l'extracte desitjat aquests volums seran majors o menors.

- Es deixa actuar el tampó de lisis durant 10 minuts mantenint la placa en gel.
- Es desenganxen les cèl·lules amb un *scraper*. Les cèl·lules són recuperades amb una pipeta Pasteur en un eppendorf.
- Les mostres es centrifuguen a 14.000 xg, durant 10 minuts a 4°C.
- Es recupera el sobrenedant, el qual contindrà l'extracte cel·lular total.
- La concentració proteica de l'extracte es determina mitjançant el mètode colorimètric de Bradford [138], seguint el procés descrit en el mateix article.

2.7. ASSAIG DE WOUND-HEALING

L'assaig de *wound-healing* (traduït com assaig de tancament de ferida) és un dels mètodes més usats per l'estudi de la migració cel·lular *in vitro*, en part per la seva simplicitat i pel seu baix cost de realització.

Aquest mètode es basa en l'observació de la migració cel·lular a través d'una ferida (*wound*) ocasionada en una monocapa de cèl·lules. Encara que no sigui considerat com una rèplica exacta de la migració cel·lular *in vivo*, aquest assaig mimetitzava en certa mesura la migració de les línies en les ferides. Depenent del tipus cel·lular, les cèl·lules poden migrar per la ferida com a poblacions dèbilment connectades (cas dels fibroblasts) o com a grups de cèl·lules (cèl·lules epitelials i endotelials), les quals mimetitzen la migració d'aquests tipus cel·lulars *in vivo*.

Les etapes bàsiques de la metodologia es basen en fer créixer les cèl·lules d'estudi en placa fins assolir la confluència, per a posteriori arrencar les cèl·lules d'una petita regió mitjançant una ratllada lineal de la superfície cel·lular. A continuació es procedeix a la captura d'imatges a l'inici de la ferida com a intervals regulars de temps durant el fenomen de migració, fins al tancament de la ferida així com la comparació de les imatges per a la determinació de la taxa de migració.

Materials

- Plaques multipou de 6
- DMEM complert
- Tripsina
- PBS1X estèril (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂PO₄·2H₂O, 1.8 mM KH₂PO₄, pH 7.4)
- Regle estèril
- Puntetes de pipetes grogues esterilitzades
- Pipetes serològiques
- Microscopi òptic invertit Olympus IX71 adaptat a un incubador d'atmosfera humida (5% CO₂ a 37°C)
- Software Olympus CellR

Procediment:

- Es sembren les cèl·lules en una placa multipou a la densitat corresponent perquè aquestes estiguin confluents en el dia de la realització de l'experiment. Generalment s'usen plaques de 6 pous, per la seva millor facilitat en el maneig i realització de la ferida, malgrat tot es poden usar plaques de major nombre de pous. L'únic factor important a considerar és que el microscopi només podrà prendre mesures d'una sola placa, així que depenent de les línies que tinguem per analitzar, caldrà fer

l'experiment en varies tandes. En un primer assaig es van sembrar les línies 786-O shCV, 786-O shCK2 α i 786-O shCK2 β en forma de duplicats en una placa multipou de 6. En un segon assaig es va realitzar el mateix per les línies HK-2 shCV, HK-2 shCK2 α i HK-2 shCK2 β .

- A la campana i amb ajut d'un regle (prèviament esterilitzat) s'agafa una punta de pipeta groga i inclinant-la 30°, es fa un solc vertical que vagi de banda a banda del pou.
- A continuació es realitzen 3 rentats per pou amb medi de creixement per tal d'eliminar les cèl·lules que hagin quedat flotant i que podrien unir-se de nou sobre la superfície del solc generat, afectant així als resultats.
- La placa es col·loca al microscopi amb cambra d'incubació i s'ajusten els paràmetres.
- Es busca al microscopi per a cada pou, dos camps on es vegin els solcs generats i es programen les coordenades al microscopi, el nombre d'imatges que es captaran per a cada coordenada i l'interval de temps en el que es realitzaran les captures. En aquest cas es van fer captures de 30 minuts durant 48h.
- Els resultats són analitzats amb el programa cellR. Les velocitats es calculen a partir del temps en què els marges dels solcs tarden a contactar entre sí. Les velocitats es determinen a partir de un mínim de 10 punts diferents del marge dels solcs per a cadascun dels camps. El seguiment de les cèl·lules (*tracking*) s'ha portat a terme amb el programa imageJ, usant el *plug-in* de *Manual Tracking*.

2.8. ASSAIG DE CREIXEMENT CEL·LULAR EN AGAR TOU

Els mètodes de detecció de transformació cel·lular *in vitro* són assaigs semi-quantitatius i es basen en mesurar la transformació morfològica de les colònies cel·lulars quan són induïdes per compostos químics. Aquesta transformació cel·lular és associada amb certs canvis fenotípics tals com la pèrdua de la inhibició per contacte (permetent que les cèl·lules puguin créixer les unes sobre les altres) i el creixement amb independència d'ancoratge (permetent que puguin formar colònies en el soft agar). La independència d'ancoratge pot ser descrita en cultius primaris de fibroblasts i certes línies cel·lulars fibroblàstiques, que han d'ancorar-se a una superfície sòlida abans que es puguin dividir. Aquestes línies fallen a l'hora de créixer quan són suspeses en un fluït viscos o en un gel (p.ex agar o agarosa), no obstant això quan aquestes línies són transformades, són capaces de créixer en un fluid viscos o gel i esdevenen independents d'ancoratge.

El procés en el què aquests canvis fenotípics apareixen sol associar-se íntimament a processos de carcinogènesi *in vivo*. Així aquests sistemes es consideren com a bons predictors de l'activitat tumoral *in vivo*, i resultats positius són considerats com a indicadors potencials de carcinogènesi.

L'assaig de soft agar per la formació de colònies, és un assaig de creixement independent d'ancoratge en agar tou, que és considerat l'assaig de més estringència per a la detecció de la transformació maligna en cèl·lules. En aquest assaig les cèl·lules són cultivades en els controls apropiats en soft agar durant 21-28 dies. Després d'aquest període les colònies formades poden ser analitzades morfològicament usant tincions cel·lulars i quantificant el nombre de colònies formades per cada pou.

Materials:

- Agar noble al 6% estèril (prèviament diluït H₂O i autoclavat) [BD-DIFCO](Ref. 214220)
- Agar noble al 3% o 4% estèril (prèviament diluït en H₂O i autoclavat)
- Bany d'aigua
- Plaques multipous de 6 pous
- Nitroblue tetrazolium chloride monohydrate [Sigma]

Procediment:

Dia1: Preparació de l'agar base al 6%

- Fondre l'agar 6% al microones. Estabilitzar-lo durant 15 min a 50°C i després 30 min a 42-44°C al bany.
- Diluir l'agar (dilució 10X) per a tenir una concentració final de 0,6% d'agar en medi complet pre-atemperat a 42-44°C.
- Afegir 4 mL de la mescla d'agar i medi a cadascun dels 6 pous.
- Permetre que es solidifiqui a temperatura ambient durant 30 min. Després les plaques es poden guardar a 4°C fins que siguin usades.

Dia 2: Preparació de la capa d'agar superior al 0,3-0,4% (depèn de la capacitat de creixement de la línia cel·lular)

- S'incuben les plaques amb l'agar base a 37°C.
- Es fon l'agar 3-4% en el microones. S'estabilitza 15 min a 50°C i després 30 min a 42°C.
- Es tripsinitza i es compten les cèl·lules. Es prepara una alíquota amb suficients cèl·lules per a cada pou (5000 cèl·lules) i es resuspenen en medi amb 0.3%-4% agar fins a un volum per pou de 2 mL.
- Es deixa solidificar a temperatura ambient durant 30 min i després es posa la placa a l'incubador.
- Al dia següent s'addicionen 0.5-1 mL de DMEM complet/pou.
- S'incuben les plaques a 37°C fins que s'observa la formació de colònies. Canviar el medi tantes vegades com un cregui convenient per tal d'evitar que la capa d'agar superior s'assequi.

Quan les colònies siguin visibles, es tenyeix amb 1mg/mL de nitroblue tetrazoliummonohydrate (500 µL/pou). S'incuba O/N a 37°C i al dia següent les colònies adquireixen un color blau. S'escaneja la placa i s'analitza el nombre de colònies formades amb el programa ImageJ.

2.9. IMMUNOCITOFUORESCÈNCIA

L'immunofluorescència permet la visualització d'un antigen específic en cèl·lules en cultiu (immunocitofluorescència) o en cèl·lules d'un teixit (immunohistofluorescència) mitjançant l'ús d'un anticòs específic conjugat amb una molècula fluorescent. En aquest cas s'ha usat un mètode d'immunofluorescència indirecta, en la que el portador de la molècula fluorescent (FITC, *fluorescein isothiocyanate*) és un anticòs secundari específic contra el primari.

La tècnica es basa en la sembra de les cèl·lules en un cobreobjectes a l'ús, per després fixar-les usant diferents metodologies. Segons la tècnica de fixació emprada, es variaran les següents etapes de la immunodetecció. En aquest cas s'utilitza el paraformaldehid (PFA), ja que permet una fixació menys agressiva per les estructures cel·lulars que no pas el metanol. Quan s'usa el PFA com a mètode de fixació, és necessari realitzar també un procés de permeabilització de la mostra amb detergents. En aquest cas s'ha realitzat una permeabilització continuada amb diferents solucions que contenen concentracions variables del detergent saponina.

Les mostres, un cop són incubades amb anticossos primaris i secundaris, es contrateneyeixen amb el colorant fluorescent DAPI o Hoescht per a marcar els nuclis i posteriorment s'analitzen al microscopi de fluorescència o el confocal.

Materials i reactius:

- Cobreobjectes circulars
- Portaobjectes
- Plaques multipous 24 pous
- DMEM complet
- PBS 1X (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂PO₄·2H₂O, 1.8 mM KH₂PO₄, pH 7.4)
- DAPI
- Medi de muntatge Fluoroprep
- PFA (Paraformaldehid) 4% en PBS
- Placa de petri
- Paper d'alumini
- Vileda humitejada
- Parafilm
- Anticòs 1ari (CK2α, H-286, sc-9030)
- Anticòs 2ari (Anti Rabbit IgG Alexa 488)
- Solució A (0,02% Saponina en PBS)
- Solució B (0,01% Saponina, 10 mM Gly en PBS)
- Solució C (0,01% Saponina, 10 mM Gly, 5% BSA en PBS)
- Solució D (0,01% Saponina, 1% BSA en PBS)

Procediment:

- Es sembren 50.000 cèl·lules en medi complet sobre cobreobjectes circulars prèviament disposats en plaques de 24 pous. Es deixen les plaques a l'incubador fins el dia següent, quan s'inicia el procés de fixació i immunodetecció.
- Es retira el medi de cadascun dels pous de la placa i els cobreobjectes es renten 2 vegades amb PBS.
- Es fixen les cèl·lules durant 20 minuts amb 4% PFA en PBS a temperatura ambient.
- Es fan 2 rentats en PBS. Es poden conservar els cobreobjectes amb PBS a la nevera per a posteriors usos.
- Es fan 3 rentats amb PBS a temperatura ambient de 5 minuts cadascun, mantenint les plaques en agitació molt suau.
- Es permeabilitzen les cèl·lules amb tampó A durant 7 minuts, a temperatura ambient i sense agitació. Per a cadascun dels pous s'afegeix 450 µL del tampó. És important no passar-se amb el temps ja que la integritat de les estructures membranoses de la cèl·lula podria quedar afectada.
- Es renten les cèl·lules amb PBS durant 5 minuts en agitació suau.

- S'afegeix a cadascun dels pous, 450 μ L de tampó B. Es deixa actuar el tampó durant 15 minuts a temperatura ambient i sense agitació.
- Es bloquegen les mostres durant 1 hora a temperatura ambient sense agitació. Per a fer-ho s'apliquen 450 μ L de tampó C per pou.
- S'aplica a cadascun dels cobreobjectes l'anticòs primari CK2 α (H-286, SC-9030) (dilució 1:50) en solució D. Per a fer-ho es treuen els cobreobjectes de la placa multipou i es disposen en una placa de petri revestida de paper d'alumini i amb una vileda humida disposada a sota d'un tros de paper parafilm. Els cobreobjectes es disposaran cara avall (les cèl·lules estarien en contacte amb el parafilm) després d'haver-hi disposat prèviament 12 μ L de la dissolució d'anticòs corresponent.
- Es deixa incubant amb l'anticòs a 4°C durant tota la nit
- L'endemà es retornen els cobreobjectes a la placa multipou i es realitzen 3 rentats amb PBS de 5 minuts cadascun en agitació suau.
- S'incuben els cobreobjectes amb anticòs secundari *Anti Rabbit IgG Alexa 488* (dilució 1:500) en solució D, durant 1 hora a temperatura ambient, protegit de la llum i sense agitació. Per a fer-ho s'usa de nou la placa de petri i es repeteix el procediment usat en la incubació amb el primari, incubant el cobreobjectes amb 12 μ L de solució d'anticòs. L'anticòs secundari porta conjugat un fluoròfor, per la qual cosa cal protegir el procés de la llum.
- Es treuen els cobreobjectes de la placa de petri i es disposen de nou a la placa multipous, on es realitzaran 4 rentats en PBS de 5 minuts cadascun en agitació suau. Aquest procés es realitza tapant la placa amb paper d'alumini per a protegir-ho de la llum.
- Es tenyeixen els nuclis de les cèl·lules amb 400 μ L de DAPI (0,1 μ g/mL PBS) per pou durant 5 minuts a RT sense agitació.
- Es realitzen 4 rentats en PBS de 5 minuts cadascun, protegint de nou la placa de la llum i en agitació suau.
- Es realitza el muntatge de les mostres als portaobjectes. Per a fer-ho s'afegeix 1 gota de medi de muntatge (Fluoroprep) sobre el portaobjectes i es col·loca a sobre el cobreobjectes. Es pressiona per eliminar la presència de bombolles d'aires i es deixa assecat mitja hora.
- Un cop assecat el medi de muntatge es segellen els marges dels cobreobjectes aplicant-los laca d'ungles transparent.
- Les mostres es conserven a 4°C i protegides de la llum per posteriorment analitzades mitjançant microscòpia confocal amb un microscopi *Olympus FluoViewTM FV1000 laser scanning confocal microscope* o bé un *Leica TCS SP5 microscope*. Es van prendre seccions de 1 μ m de gruix per a cadascuna de les mostres al llarg de l'eix de les Z.

2.10. RT-QPCR (REAL TIME- QUANTITATIVE POLYMERASE CHAIN REACTION)

2.10.1. Extracció del RNA total

L'extracció de RNA de les cèl·lules silenciades per les subunitats de CK2 s'ha portat a terme mitjançant l'ús del RNeasy Mini Kit [Qiagen]. El kit combina l'ús de columnes cromatogràfiques d'afinitat amb tècniques de microcentrifugació, que junt amb l'acció de diferents tampons permeten que tots els RNA de més de 200 bases de longitud puguin unir-se a la columna.

Les mostres biològiques són primerament llisades i homogenitzades mitjançant un tampó desnaturalitzant que conté tiocianat de guanidina, permetent la inactivació de les RNAses cel·lulars i la preservació del RNA d'interès. A continuació s'addiciona etanol a la mostra per a permetre la seva unió posterior a la resina de la columna, per a continuació eliminar mitjançant rentats i centrifugacions els RNAs de mida petita i la resta de contaminants, per finalment eluir els mRNA en H₂O.

Amb aquesta tècnica, totes les molècules de RNA de més de 200 nucleòtids són purificades. La columna, al excloure els RNAs de menys de 200 bases (que constitueixen el 20% dels RNAs totals de les cèl·lules i que comprenen els 5,8S rRNA, 5S rRNA i tRNAs,) permet un enriquiment de la quantitat de mRNA obtingut (fins 100 µg de RNA total).

Materials i reactius:

- | | |
|--|-------------------|
| - RNeasy Mini Spin Columns | - Buffer RLT |
| - Tubs col·lectors de 2 mL | - Buffer RW1 |
| - Tubs eppendorfs de 1,5 mL RNase free | - Buffer RPE |
| - H ₂ O RNase free | - Microcentrífuga |
| - Etanol 70% | |

Procediment:

- Es sembren 1×10^6 cèl·lules en una placa de 6 cm de diàmetre. Es deixen créixer fins assolir la confluència. Un cop assolida la confluència es tripsinitzen, es resuspenen i es centrifugen, obtenint un pellet cel·lular que es conservarà a -80°C fins al seu moment d'utilització.
- Es descongelen els pellets cel·lulars en gel, s'afegeix 350 µL de RTL Buffer i es mescla amb la micropipeta.
- S'homogeneïtza el llisat fent-lo passar un mínim de 5 cops a través d'una agulla de 0,33 mm de diàmetre (29-gauge).
- S'addiciona 1 volum d'etanol 70% (350 µL) i es mescla per pipeteig.
- Es transfereix l'extracte a la columna *RNeasy spin column* prèviament col·locada en un tub col·lector de 2 mL i es centrifuga a 8000 xg durant 15 segons. El través serà descartat.
- Es renta la resina amb 350 µL de RW1 buffer i posterior centrifugació a 8000 xg durant 15 segons.

- S'afegeixen 80 μL de *DNaseI incubation mix* (preparada prèviament mesclant 70 μL de buffer RDD i 10 μL de *DNaseI stock solution*) i es deixa incubar durant 15 minuts a temperatura ambient, per tal de digerir el DNA.
- Es renta de nou la columna amb 350 μL de Buffer RW1 i es centrifuga a 8000 xg durant 15 segons per a descartar el través.
- Es fa un primer rentat addicionant 500 μL de buffer RPE i es centrifuga a 8000 xg durant 15 segons. Es descarta el través.
- Es fa un segon rentat amb 500 μL de buffer RPE i es centrifuga a 8000 xg durant 2 minuts.
- Es disposa de nou la columna a un nou tub col·lector i es centrifuga a velocitat màxima durant 1 minut.
- A continuació es disposa la columna a un tub eppendorf RNase free, s'addicionen 50 μL de H_2O RNase free i es centrifuga 1 minut a 8000 xg per tal d'eluir el RNA.
- Es recomana mantenir les mostres de RNA congelades a -80°C per a una millor preservació.

2.10.2. Quantificació del RNA total

La concentració del RNA es determina mesurant l'absorbància a 260 nm (A_{260}) mitjançant l'ús d'un espectrofotòmetre (Nanodrop). La concentració es determina considerant que 1 U.A. a A_{260} corresponen a 44 μg de RNA/mL.

2.10.3. Valoració de la qualitat del RNA total

Per a valorar la integritat del RNA obtingut es realitza una electroforesis d'agarosa al 1,5% en condicions no desnaturalitzants. La relació d'intensitats de les bandes dels rRNA 28S i 18S indicarà la qualitat del RNA total de la mostra. Si les bandes superiors (28S rRNA) són 3 cops més intenses que les inferiors (18S RNA) indica que no hi ha degradació del RNA total.

2.10.4. RT-PCR (*Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction*)

La reacció en cadena de la polimerasa amb transcripció inversa o RT-PCR és una variant de la PCR que permet amplificar a partir d'un RNA motlle un DNA complementari (cDNA). En general la tècnica consta de dues fases, una en la que es realitza la transcripció inversa (RT) a partir dels mRNA usant un oligo-dT o bé un *primer* antisentit, i una segona etapa on s'amplifica per PCR la cadena de cDNA sintetitzada en la primera fase. Encara que en principi aquestes dues fases es realitzaven de forma independent, actualment existeixen gran diversitat de kits comercials que permeten fer tot el procés en poc temps i en un sol pas.

En aquest cas s'ha fet ús del kit comercial *High Capacity RNA-to-cDNA kit* [Life Technologies, #4387406]. Aquest kit, està optimitzat per a futures reaccions de PCR quantitativa (qPCR) i a diferència d'altres kits, permet l'obtenció de un cDNA d'una sola cadena (ss cDNA) a partir de cadenes motlles de

RNA. Per assolir-ho fa ús de la transcriptasa reversa *MultiScribe MuLV* i de dNTPs i oligo-dT presents en el buffer mix. El resultat final del procés és l'obtenció d'una quantitat de ss cDNA equivalent a la quantitat de RNA de partida inicial.

Materials i Reactius:

- 2x RT Buffer Mix (dNTPs, random octàmers, oligo dT-16)
- 20x RT Enzyme Mix (MuLV, RNase inhibidor protein)
- H₂O nuclease free
- Microcentrifuga
- Termociclador
- Tubs ependorff de 0,2mL RNase free

Procediment:

- Es descongela el RNA extret prèviament guardat a -80°C i es preserva en gel.
- Es preparen dues mastermix. Una en la què es donarà la reacció de retrotranscripció (RT master mix) i una altra que actuarà com a control (RT control mix). Les mastermix es preparen tal com s'indica a la taula inferior.

Taula 14: RT master mix		
Component	Volum per 1 reacció (µL)	
	RT master mix (+RT)	RT Control mix (-RT)
2x RT buffer	10 µL	10 µL
20 X RT enzyme Mix	1 µL	-----
H₂O nuclease free	Fins a 20 µL	Fins a 20 µL
RNA	Fins a 9 µL	Fins a 9 µL
Volum final	20 µL	20 µL

- Es barreja 1 µg de RNA d'interès en H₂O milli-Q estèril fins assolir un volum final de 9 µL. Per a cada mostra de RNA s'usaran dos tubs, un per a la reacció de retrotranscripció i una altra per la control.
- Per a cada mostra de RNA s'afegeixen 11 µL de RT master mix o de control master mix i es barregen.
- S'afegeixen els tubs al termociclador i s'executa el següent programa:

Taula 15: Programa RT PCR			
Condicions	Step 1	Step 2	Step 3
Temperatura (°C)	37°C	95 °C	4 °C
Temps (min)	60 min	5 min	∞

2.10.5. RT-qPCR (*Real Time- quantitative Polymerase Chain Reaction*)

La RT-qPCR és una variant de la PCR convencional en la que es pot monitoritzar el progrés de la reacció a temps real. Aquesta propietat fa que es designi també com a PCR a temps real i és útil per a quantificar la presència d'una determinada seqüència a la mostra. En aquest treball s'ha utilitzat per a veure l'expressió de certs mRNA, per la qual cosa ha calgut prèviament realitzar una transcripció inversa del RNA (RT-PCR).

La RT-qPCR consta d'una primera fase exponencial en què la quantitat de producte de PCR es duplica per a cada cicle, i una fase de *plateau* en la que els components de la reacció s'han anat consumint i per tant es redueix l'obtenció de producte. Malgrat que en els primers cicles de la fase exponencial es genera fluorescència, aquesta no es detectarà fins superar un límit de sensibilitat de l'aparell. El punt en què la fluorescència passa a ser detectable es designa com a CT (*threshold cycle*) i depèn de la quantitat de cDNA de la mostra. D'aquesta forma quan més cDNA hi hagi de partida, més ràpid s'assolirà el CT corresponent, permetent establir una correlació dels nivells d'expressió del nostre mRNA amb el valor de CT.

Per a la realització de la PCR a temps real s'usen com a molècules fluorescents les sondes TaqMan® MGB [Applied Biosystems]. Aquestes sondes són oligonucleòtids que porten conjugades dos tipus de molècules: un fluorocrom reporter (FAMTM) a l'extrem 5' i una substància no fluorescent a l'extrem 3' (NFQ, *Non-Fluorescent Quencher*) que actua com un reductor de l'emissió. El *quencher* està acompanyat per MGB (*Minor Groove Binder*), que permet augmentar la temperatura de fusió (T_m , *melting temperature*) sense que s'hagi d'incrementar la mida de la sonda.

Durant la reacció d'amplificació, la sonda TaqMan® s'uneix específicament a una seqüència situada entre els encebadors *forward* (F) i *reverse* (R). Mentre la sonda es mantingui intacta, la proximitat del quencher absorbeix la fluorescència emesa pel fluorocrom reporter, impedit que emeti fluorescència. En el moment que es dona el procés d'amplificació i la polimerasa arriba a l'extrem 5' de la sonda, allibera el fluorocrom gràcies a la seva activitat exonucleasa, i al separar-se del *quencher* permet que s'emeti fluorescència. Finalment es produeix la separació de la sonda i continua el procés d'extensió fins a completar el cicle. D'aquesta forma el sistema esdevé altament específic ja que només s'emet fluorescència per part de la nostra cadena d'interès.

La PCR en temps real permet dos tipus de quantificacions: la quantificació absoluta i la quantificació relativa del nombre de còpies de mRNA. En aquest cas s'ha usat la quantificació relativa (RQ, *Relative quantification*) basat en la relació de CT entre el gen problema i un gen endogen (usat com a element normalitzador de la quantitat de cDNA existent a la mostra). El valor obtingut pot ser utilitzat per a comparar les quantitats de cDNA entre diferents extractes. Això s'assoleix designant una de les mostres com a calibrador (pot ser la mostra control no tractada, el temps zero d'un tractament, etc) permetent referenciar els resultats i té el valor 1 d'expressió. En aquest cas, els calibradors van ser les línies HK-2

shCV i 786-O shCV. La quantitat de mostra normalitzada respecte a un gen endogen i relativa a una mostra calibradora ve donada per la fórmula:

$$2^{-\Delta\Delta CT}$$

On :

$$\Delta CT = CT \text{ gen problema} - CT \text{ gen control endogen}$$

$$\Delta\Delta CT = \Delta CT \text{ mostra problema} - \Delta CT \text{ calibrador}$$

Aquest $\Delta\Delta CT$ seria el que s'anomena quantificació relativa i també s'abreua com a RQ.

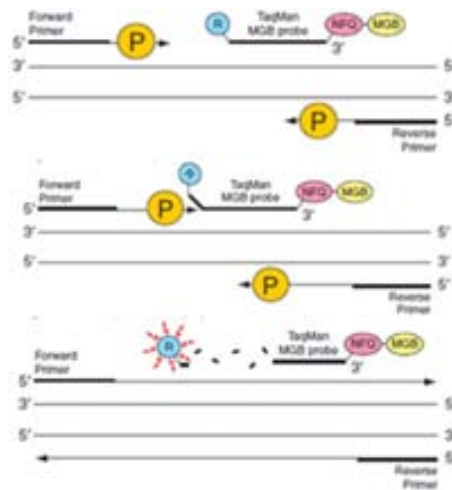


Figura 11: Esquema del funcionament de una sonda taqMan® en la RT-qPCR

Materials i reactius:

- 20x TaqMan® Gene Expression Assay (mirar la Taula 16 on hi ha les sondes emprades)
- 2x Taqman® Gene Expression Master Mix
- cDNA
- H₂O RNase free
- Plaques de 96 pous [Applied Biosystems]
- Tapa per plaques de 96 pous [Applied Biosystems]
- Termociclador 7500 Real Time PCR System [Applied Biosystems]

Taula 16: Sondes TaqMan® emprades en RT-qPCR	
Gen	Codi identificador sonda
CDH2 (human N-cadherin)	Hs00983056_m1 CDH2
CDH1 (human E-cadherin)	Hs01023894_m1 CDH1
TBP (TATA Binding Protein)	H0-TBP

Procediment:

- Es dilueix el cDNA a 1:10 o 1:50 per a un millor pipeteig.

- Per a cada mostra (per triplicats) es pipetegen els components mostrats a la taula inferior (a excepció del cDNA) en un tub eppendorf de 1,5 mL en gel. Aquest càlcul es realitzarà per a cada sonda i cada gen endogen.

Taula 17: Mastermix de les RT-qPCR		
	Quantitat per mostra	Mix de n mostres x3 (Triplicat)
20x TaqMan® Gene Expression Assay (és la sonda amb el fluoròfor)	0.5 µL	(n+1) x 0,5 x 3
2x Taqman® Gene Expression Master Mix	5 µL	(n+1) x 5 x 3
cDNA	2 µL max	
H₂O RNase free	Fins als 10 µL de Vf	
Volum final	10 µL	

- Es deixa la placa en gel.
- Es mesclen els components i s'addiciona a cada pou de la placa el volum corresponent.
- S'afegeixen 10 ng de cDNA als pous corresponents. La quantitat de cDNA dependrà del volum (1-50 ng en 10 µL).
- Es sella la placa amb la tapa i es centrifuga.
- La placa es col·loca a l'aparell de PCR quantitativa (7500 Real Time PCR System, Applied Biosystems) i s'executa el següent programa:

Taula 18: Programa RT-qPCR		
Temperatura	Temps	Cicles
50 °C	2 minuts	1
95 °C	10 minuts	40 cicles
95 °C	15 segons	
60 °C	1 min	
4 °C	∞	1

PCR volume: 10 µL

Reporter: FAM

3. WESTERN BLOT

3.1. ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA EN CONDICIONS DESNATURALITZANTS (SDS-PAGE)

L'electroforesis en gels de poliacrilamida (PAGE) és una tècnica usada per a la separació i visualització de proteïnes per pes molecular, encara que també es pot aplicar per a la separació de RNA i DNA de baix pes molecular. Quan en aquests gels se'ls hi addiciona Dodecil sulfat sòdic (SDS) la electroforesis passa a realitzar-se en condicions desnaturalitzants, designant-se com a SDS-PAGE.

Materials i reactius:

- Acrilamida-bisacrilamida (Acril-bis acril 30%) [CONDA]
- Solució B (Tris/HCl 1 M, 0,4% SDS, pH 8,8)
- Solució C (Tris/HCl 0,5 M, 0,4% SDS, pH 6,8)
- H₂O milli-Q
- TEMED
- Persulfat amoni 10%
- Tampó de Mostra Reductor 5X (TMR 5X) (350 mM Tris, 10% SDS, 50 % glicerol, 0,0125 % blau de bromofenol, 0,5% β-mercaptoetanol)
- Tampó d'electroforesis (25mM Tris, 192mM glicina, 0,1% SDS)
- Mini Protean 3

Procediment:

- Per a la preparació dels gels s'utilitzen plaques de vidre per gels de 10x7 cm de 1,5 mm de gruix. El gel apilador presenta una concentració d'acrilamida constant (3,5%) i el separador variable (en general del 10%). Les proporcions de cada gel es preparen tal com es mostra a la taula adjunta:

Composició	Gel Separador		
	% Acrilamida		
	10%	12%	15%
Acrilamida (mL)	2,5	3	3,75
Solució B (mL)	1,875	1,875	1,875
H ₂ O mQ (mL)	3,125	2,625	1,875
TEMED (μL)	10	10	10
PSA 10% (μL)	100	100	100

Composició	Gel Apilador
	3,5%
Acrilamida (mL)	0,7
Solució B (mL)	1,5
H ₂ O mQ (mL)	3,8
TEMED (μL)	10
PSA 10% (μL)	100

Taules 19: Composició dels gels de SDS-PAGE per a un gel de 1,5 mm de gruix.

- Es preparen les mostres diluint-les en tampó de mostra reductor 5x (TMR 5X), s'escalfen a 100°C durant 5 minuts, es vortexen i se'ls hi dona un pols de centrífuga.
- Es disposen els gels dins de la cubeta d'electroforesis, s'afegeix tampó d'electroforesis dins de la cubeta i es carreguen les butxaques del gel amb les mostres a analitzar.

- Les mostres es corren a amperatge constant de (30-35 mA/gel) fins que el front estigui apunt de sortir del gel separador.

3.1.1. Tinció dels gels SDS-PAGE en blau de coomassie:

Un cop les mostres han estat separades en el gel, aquest podrà ser usat per a transferir les proteïnes a una membrana (electrotransferència) o bé podrà ser tenyit per tal de visualitzar i determinar la presència de proteïnes en el gel. La tinció del gel es realitza amb una solució de blau de coomassie i és usada quan s'analitzen proteïnes purificades o per a determinar que la concentració dels extractes proteics siguin els correctes. La tinció de gels en coomassie és irreversible, per la qual cosa un cop tenyits no es podran usar mai per a realitzar una posterior electrotransferència.

Materials i Reactius:

- Solució de Coomassie (50% metanol, 10% àcid acètic, 40% H₂O, 0,1% coomassie brilliant blue)
- Solució destenyir (50% metanol, 10% àcid acètic, 40% H₂O)
- H₂O destil·lada

Procediment:

- Es desmunten els gels dels vidres i es deixen en aigua.
- Es tenyeixen els gels amb solució Coomassie durant 10 minuts.
- Es fan 3 rentats de 15 minuts en solució de destinció.
- Es fa un últim rentat de 1 hora amb solució de destinció.
- El gel es deixa durant tota la nit amb H₂O destil·lada.

3.2. ANÀLISIS IMMUNOLÒGIC PER WESTERN BLOT

El western blot és una tècnica d'anàlisi semiquantitativa que permet la detecció de proteïnes d'una mostra mitjançant l'ús d'anticossos específics contra els epítops de la proteïna d'interès. La tècnica parteix d'una electroforesis en gels d'acrilamida i es pot dividir en dues etapes. La primera etapa es basa en la transferència de les proteïnes del gel a una membrana amb afinitat per la unió de proteïnes (generalment PVDF o nitrocel·lulosa). Aquest procés de transferència pot realitzar-se de diferents formes, però en aquest cas s'usa un mètode basat en la transferència per camp elèctric, o electrotransferència.

La segona etapa és l'anomenada immunodetecció i es basa en l'aplicació d'una sèrie d'anticossos específics sobre la membrana on s'han transferit les proteïnes. En general, en aquest procés s'incuba la membrana amb un anticòs específic front la proteïna a detectar per a continuació incubar-la amb un anticòs secundari conjugat amb una molècula que actua com a reporter i que pot reconèixer la presència de l'anticòs primari. En aquest cas, la molècula conjugada es tracta d'una peroxidasa (HRP, *Horseradish Peroxidase*) que permet generar llum en interaccionar amb determinats substrats. Aquest mètode de

detecció, anomenat quimioluminescent, anirà acompanyat de la seva detecció per part d'un film fotogràfic fotosensible, o bé de sistemes més moderns com càmeres CCD.

3.2.1. Electrotransferència de proteïnes:

Materials i reactius:

- Tampó de transferència (192mM glicina, 25mM Tris, 10% metanol)
- Metanol absolut
- Membranes PVDF Immobilion-P
- Dispositiu de transferència Mini-Protean 3
- Ponceau-S red (0,1% (p/v) en 5% d'àcid acètic)
- Solució bloquejant (TTBS 1X + 5% llet en pols)

Procediment:

- En finalitzar l'electroforesis, els gels s'equilibren en tampó de transferència durant 10 minuts.
- S'activa la membrana de PVDF (immobilon P) amb metanol durant 15 segons. A continuació es fa un rentat de 2 minuts en H₂O destil·lada i s'equilibra durant 5 minuts amb tampó de transferència.
- Es munta el dispositiu de transferència seguint les instruccions de l'aparell i es transfereix a un voltatge constant de 100 v durant 1 hora.
- Es desmunta el dispositiu de transferència i es renta la membrana amb H₂O durant uns minuts.
- Per a comprovar que la transferència s'ha realitzat correctament, es tenyeix la membrana reversiblement amb Ponceau-S red durant 5 minuts. La tinció s'elimina fent un primer rentat amb H₂O i un segon rentat amb tampó de transferència.

3.2.2. Immunodetecció:

Materials i reactius:

- TTBS 1X (50mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0,1% tween-20, pH 7.4)
- Solució de bloqueig (TTBS 1X + 5% llet en pols)
- Solució d'anticòs 1ari (TTBS 1X, 5% BSA, 0.02% azida sòdica)
- Anticòs 1ari (veure taula dels anticossos primaris usats, apartat 3.3)
- Anticòs 2ari conjugat amb peroxidasa (veure taula d'anticossos secundaris usats, apartat 3.3)
- Quits quimioluminescents Roche lumilight i Roche lumilight plus
- Amersham Hyperfilm ECL [GE-Healthcare]
- Chemidoc MP Image System [Bio-Rad]

Procediment:

- Es bloqueja la membrana amb solució bloquejant durant 1 hora a temperatura ambient i en agitació constant.
- Es fan 3 rentats de 10 minuts en TTBS 1x.

- S'incuba la membrana amb l'anticòs primari desitjat (seguint la dilució recomanada per la casa comercial) durant tota la nit a 4°C i en agitació constant. La llista i característiques dels anticossos usats es troben a la taula d'anticossos de l'apartat 3.4.
- Es recupera l'anticòs primari i es fan 3 rentats amb TTBS1x a la membrana de 10 minuts cadascun.
- S'incuba la membrana durant 1h, en agitació constant i a temperatura ambient amb un anticòs secundari conjugat amb peroxidasa (diluït 1:5000 en solució de bloqueig).
- Es fan 3 rentats de 10 minuts cadascun en TTBS1x.
- Es procedeix al revelat usant el quims de quimioluminescència Roche lumilight o Roche lumilight plus en funció de la sensibilitat de l'anticòs a la proteïna d'interès seguint les condicions del fabricant.
- El revelat es realitza mitjançant l'exposició a un film fotogràfic (Amersham Hyperfilm ECL) o bé mitjançant el sistema d'enregistrament de CCD *Chemidoc MP Image System*.

3.3. LLISTA D'ANTICOSSOS UTILITZATS

Taula 20: Llistat d'anticossos primaris usats en WB				
Anticòs	Referència	Pes Molecular	Dilució	Espècie produïda
CK2α (H-286)	sc-9030	38-44 kDa	Dil 1:500	Rabbit
CK2α (1AD9)	05-1431	38-44 kDa	Dil 1:1000	Mouse
CK2α'	A300-199A	38 kDa	Dil 1:1000	Rabbit
CK2β home	<i>homemade</i>	28 kDa	Dil 1:4000	Rabbit
CK2β (6D5)	sc-12739	28 kDa	Dil 1:125	Mouse
β-Actina	sc-47778	43 kDa	Dil 1:1000	Mouse
N-Cadherina	610920	130 kDa	Dil 1:1000	Mouse
E-Cadherina	610181	120 kDa	Dil 1:2000	Mouse
α-SMA	A5228	42 kDa	Dil 1:1000	Mouse
Slug	9585	30 kDa	Dil 1:1000	Rabbit
β-Catenina	610154	92 kDa	Dil 1:10.000	Mouse
eIF2β	Sc-9978	50 KDa	Dil 1:1000	Mouse
p-eIF2β (Ser2)	<i>Cedit pel Dr. Oriano Univ. Padova</i>	50 KDa	Dil 1:1000	Rabbit

Taula 21: Llistat d'anticossos secundaris usats en WB			
Anticòs	Referència	Dilució	Espècie produïda
IgG Goat Anti-Rabbit IgG (H+L)-HRP conjugate	170-6515 (Bio-Rad)	Dil 1:3000	Goat
IgG Goat-Anti-Mouse IgG (H+L)-HRP conjugate	170-6516 (Bio-Rad)	Dil 1:3000	Goat

IV. RESULTATS

1. CARCINOMA RENAL

1.1. NIVELLS DE CK2 EN EXTRACTES RENALS DE PACIENTS AFECTATS PER CCRCC

Estudis previs realitzats en tumors humans havien evidenciat que l'activitat CK2 i els nivells de les subunitats catalítiques a la majoria de càncers estan incrementats. Així en un estudi previ sobre el comportament de CK2 en tumors renals, es postula que a diferència d'altres càncers, presentaria un augment molt marcat de la subunitat reguladora, encara que continuï compartint amb la resta de tumors l'augment de la subunitat catalítica i de la activitat CK2 [49].

Davant d'aquest fet es va decidir estudiar en més detall si hi havia canvis tant en els nivells d'expressió com en la localització subcel·lular de les subunitats catalítiques i reguladores de CK2 en tumors renals, concretament el ccRCC.

Per tal de comprovar si realment hi havia diferències d'expressió de CK2 en aquest tipus de tumor, es va decidir analitzar per western blot els nivells de CK2 α i CK2 β en extractes tissulars sans i tumorals renals d'un grup de 15 pacients afectats per ccRCC. Simultàniament es va decidir analitzar també pel mateix mètode els nivells de les mateixes subunitats en altres tipus de càncers renals (oncocitoma, carcinoma papil·lar, carcinoma de cèl·lules cromòfobes i histocitomes) d'un total de 11 mostres de pacients diferents, amb la finalitat de determinar si aquests canvis eren exclusius del ccRCC o bé dels càncers renals en general.

A la Figura 12 es mostren els nivells de CK2 α i CK2 β en extractes totals de diferents mostres representatives de teixit normal i tumoral de 15 casos de ccRCC, classificats segons l'estadiatge tumoral (pT1, pT2 i pT3+pT4). Les característiques i classificacions de les mostres biològiques analitzades es troben resumides a la taula de la Figura 15. Amb l'anàlisi immunològic per western blot, els nivells de CK2 β , malgrat presentar certa dispersió en els resultats, augmenten considerablement en els estadiatges més baixos dels tumors (pT1), mostrant un comportament més variable en estadis tumorals intermedis (pT2) i una clara tendència a disminuir els nivells en estadis avançats del tumor (pT3+pT4). Cal destacar també el fet que en estadiatges baixos, que és on s'observa major expressió de CK2 β , aquesta apareix com una banda més ampla i difosa en tumors, mentre que en teixit sa del mateix pacient apareix de forma més definida i perfilada.

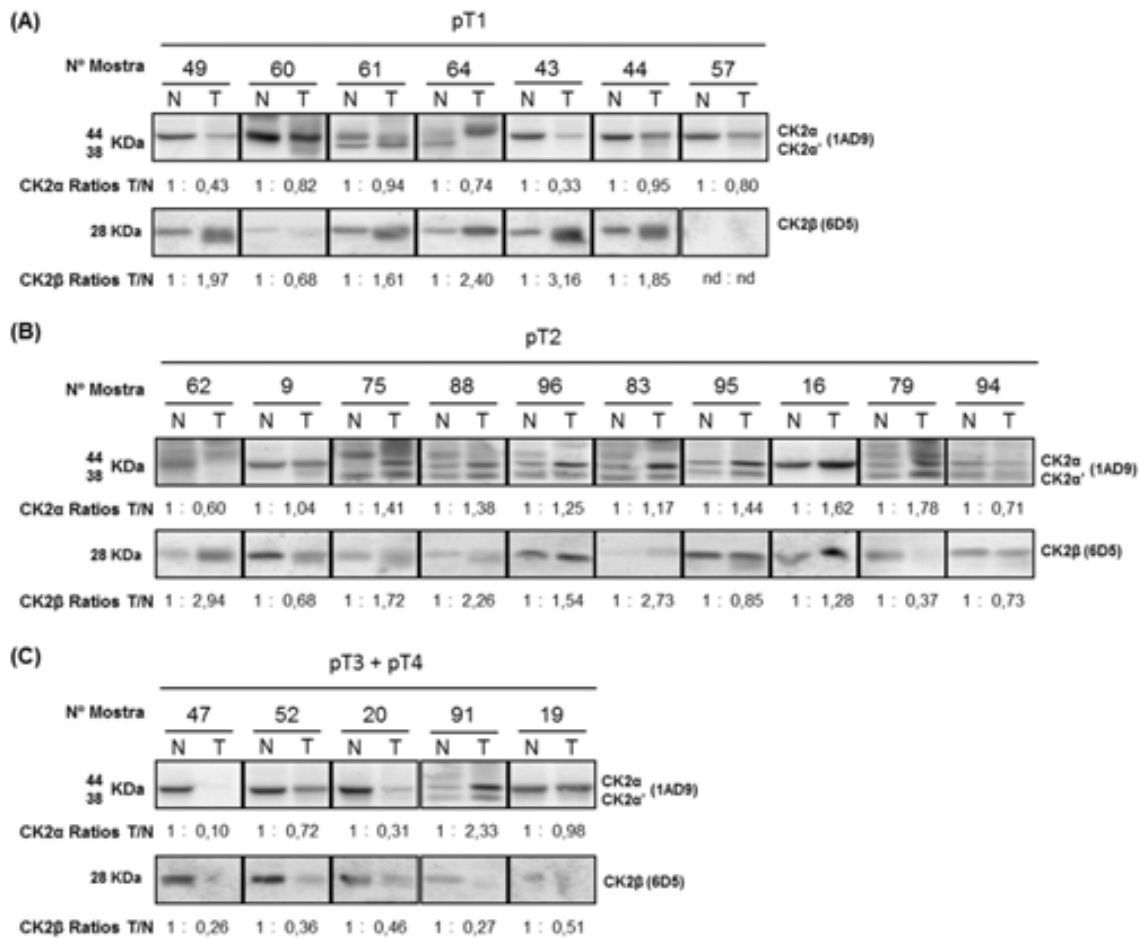


Figura 12: Nivells d'expressió de les subunitats de CK2 segons l'estadiatge del ccRCC.

Immunodetecció per western blot dels nivells d'expressió de CK2 en extractes cel·lulars de mostres de teixit tumoral i sa de pacients afectats per ccRCC. Es van analitzar els nivells de CK2α i CK2β en extractes d'un total de 22 mostres de pacients afectats. Les mostres han estat classificades segons el seu estadiatge en pT1 (A), pT2 (B) i pT3+pT4 (C), amb 7, 10 i 5 casos respectivament.

Al mateix temps, es mostra per a cada anticòs les relacions d'expressió entre teixit tumoral (T) i teixit sa (N) (ratios T/N) per a cadascuna de les mostres.

(nd, banda no detectable)

Pel què fa al comportament de la subunitat catalítica CK2α, els valors obtinguts presenten uns resultats més variables, trobant-nos mostres en què els nivells de CK2α tumorals baixen en major o menor grau (pacients 49, 60, 61, 43, 44, 57, 47, 52, 20, 19), d'altres que pugen (pacients 9, 96, 95, 16, 91) o bé d'altres que es mostra un increment simultani de la subunitat CK2α' (pacients 95) contribuint a l'augment de subunitats catalítiques totals, independent de l'agrupació de les mostres en els diferents estadiatges mostrats a la figura.

La reorganització d'aquestes mateixes mostres considerant tant el seu estadiatge com la seva gradació nuclear de Führman (figura 13) mostra clarament que els grups que tenen una disminució més marcada de CK2β corresponen a les mostres tumorals amb un estadiatge avançat o bé amb un grau elevat (figura 13, C)

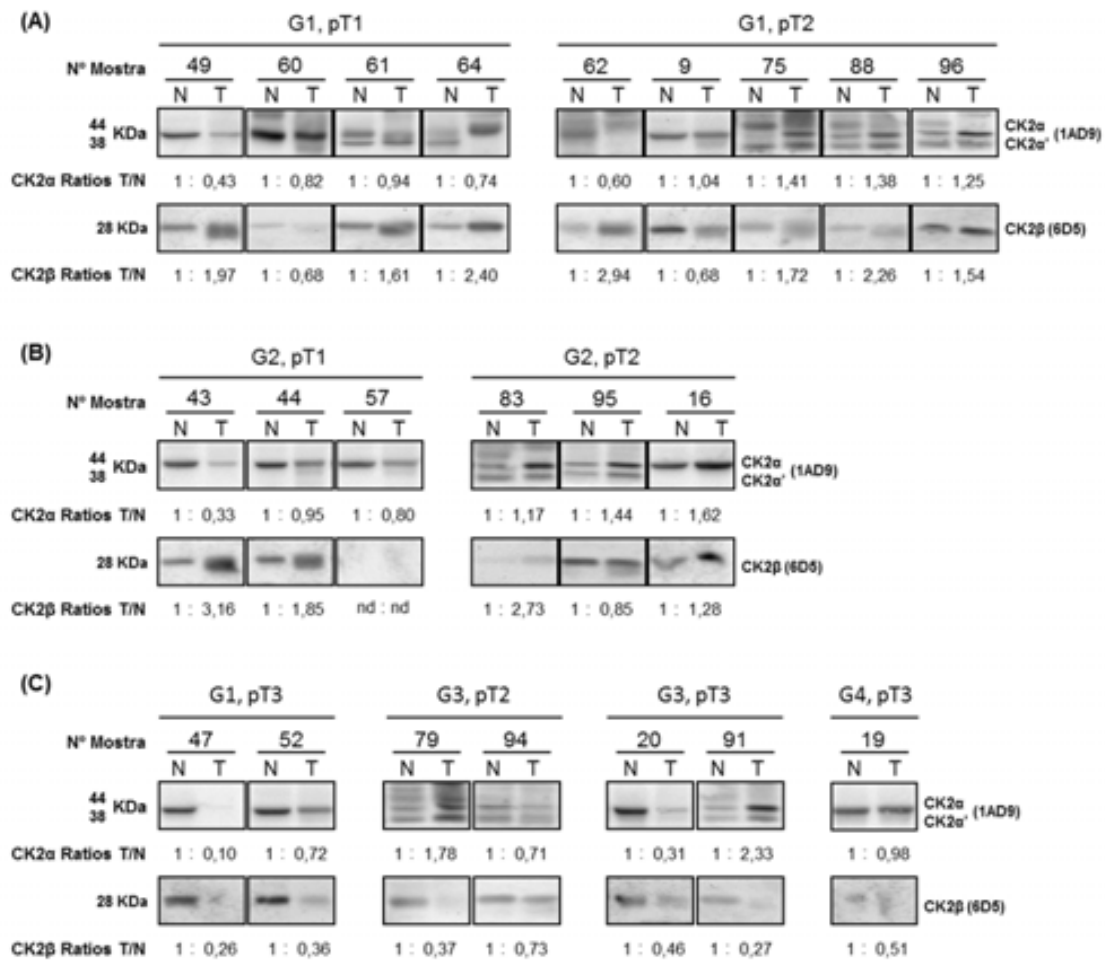


Figura 13: Nivells d'expressió de les subunitats de CK2 segons l'estadiatge i la gradació nuclear de Fühman del ccRCC.

Immunodetecció per western blot dels nivells d'expressió de CK2 en extractes cel·lulars de mostres de teixit tumoral i sa de pacients afectats per ccRCC. Es van analitzar els nivells de CK2α i CK2β en extractes d'un total de 22 mostres de pacients afectats. Les mostres han estat classificades segons el seu estadiatge en G1(pT1-pT2) (A), en G2(pT1-pT2) (B) i en G1(pT3)/G3(pT2-pT3)/G4(pT3) amb 9, 6 i 7 casos respectivament.

Al mateix temps, es mostra per a cada anticòs les relacions d'expressió entre teixit tumoral (T) i teixit sa (N) (ratios T/N) per a cadascuna de les mostres.

(nd, banda no detectable)

Es va decidir analitzar també de forma simultània extractes de mostres provinents de pacients diagnosticats per altres tipus de carcinomes renals cel·lulars (RCC) amb la finalitat de comprovar si CK2β es trobava incrementada a la resta càncers renals, tal com havia descrit Stalter [49] en el ccRCC. A la Figura 14 es mostren els nivells d'expressió de les subunitats catalítiques i reguladores de CK2 en 4 tipus de tumors renals diferents: oncocitoma (A, Figura 14), carcinoma renal papil·lar (B, Figura 14), carcinoma de cèl·lules cromòfobes (C, Figura 14) i histocitoma (D, Figura 14). Es van analitzar mostres de 3 pacients diferents en els 3 primers tipus de tumors i mostres de 2 pacients en el cas dels histocitomes.

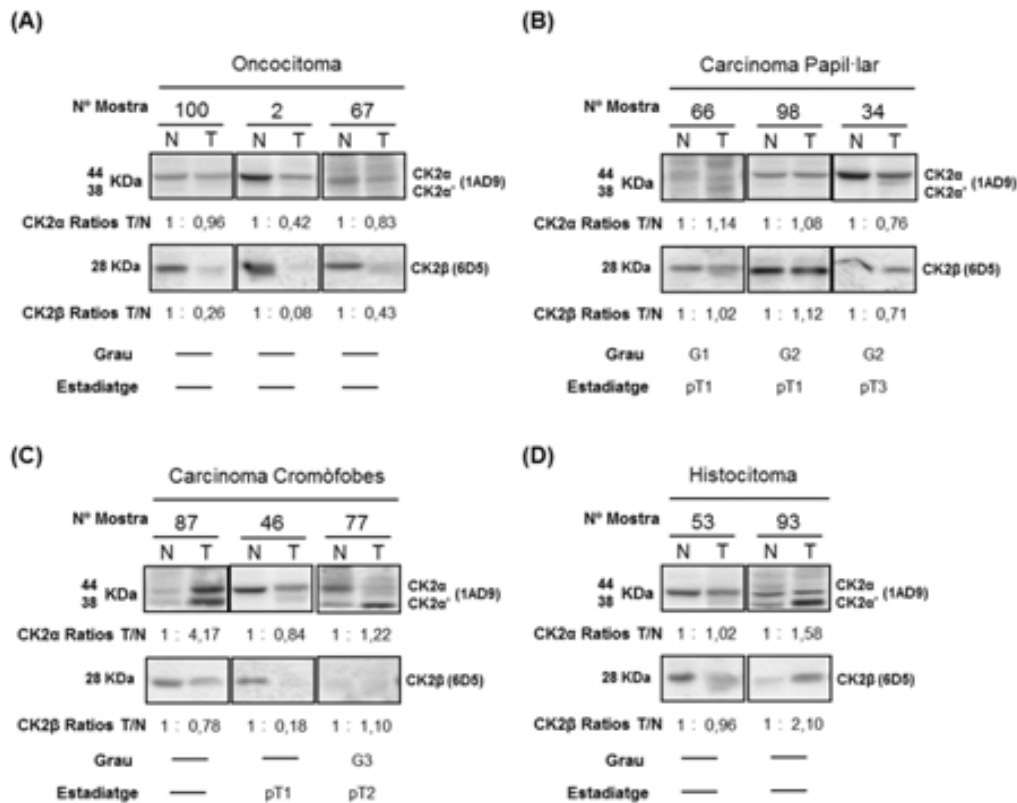


Figura 14: Nivells d'expressió de les subunitats de CK2 en diferents classes de carcinomes renals (RCC)

Immunodetecció per western blot dels nivells d'expressió de CK2 en extractes cel·lulars de mostres de teixit tumoral i sa de pacients afectats per altres tipus de carcinomes renals (RCC). Es van analitzar els nivells de CK2α i CK2β en extractes cel·lulars de 3 oncocitomes (A), 3 carcinomes papil·lars (B), 3 carcinomes de cèl·lules cromòfobes (C) i dos histocitomes (D) d'un total de 15 mostres de pacients afectats.

Al mateix temps, es mostra per a cada anticòs les relacions d'expressió entre teixit tumoral (T) i teixit sa (N) (ratios T/N) per a cadascuna de les mostres.

(nd, banda no detectable)

D'aquesta manera, es pot observar que els oncocitomes presenten baixos nivells d'expressió de CK2β, acompanyats d'una reducció de CK2α, recordant al comportament mostrat en ccRCC d'estadiatges alts. Pel què fa al carcinoma papil·lar, malgrat presentar certa dispersió en els resultats per CK2α, mostren valors de CK2β incrementats en tumors recordant en certa manera als estadiatges intermitjos (pT2) dels ccRCC. Tant els carcinomes de cèl·lules cromòfobes com els histocitomes (un tipus de sarcoma renal maligne poc habitual) tendeixen a presentar un major nivell d'expressió de la subunitat catalítica, ocasionat en certs casos per un increment de l'expressió de CK2α', però difereixen pel què fa als nivells de les subunitats reguladores CK2β, trobant-se reduïts en els primers casos mentre que en els segons es mantenen o tendeixen a pujar.

A la Figura 15 es mostren les relacions d'expressió tant de CK2α com de CK2β quan es comparen els extractes de teixits tumorals respecte als normals de les biòpsies dels 15 pacients anteriorment analitzats, així com una taula resum on s'agrupen els pacients segons el seu grau o estadiatge tumoral. Les relacions

entre teixit tumoral i sa per a cada subunitat ajuden a entendre millor el comportament de cadascuna d'elles en tumors.

Així s'observa que els nivells de CK2 β tendeixen a augmentar en extractes tumorals respecte als del teixit sa (T/N ratios >1) independent del grau o estadiatge al qual pertanyin. Aquest augment dels nivells de CK2 β en ccRCC coincideix amb els pocs estudis que es tenien d'aquests tumors [49], en els quals s'havia registrat que a diferència d'altres càncers, en el ccRCC hi havia era un increment major de la subunitat reguladora que de la catalítica de CK2.

Els nivells de la subunitat catalítica CK2 α en canvi, quan es miren de forma global, sembla ser que tendeixen mantenir-se en les mostres de ccRCC (T/N ratios pròximes a 1).

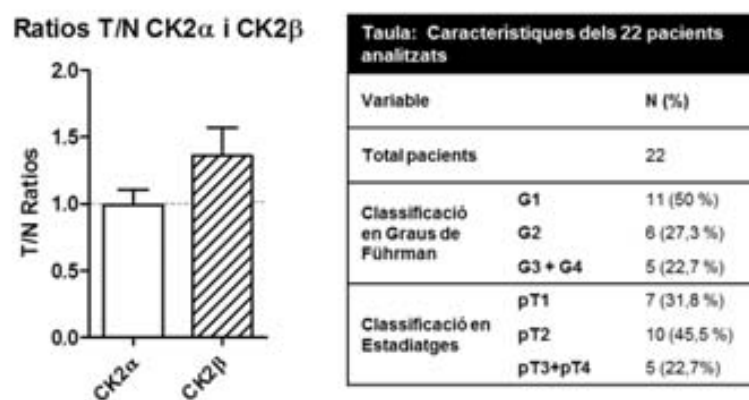


Figura 15: Relacions d'expressió entre teixit tumoral (T) i sa (N) de les subunitats de CK2 en pacients afectats per ccRCC.

Diagrama de barres on es mostren les ratios dels nivells d'expressió de CK2 α i CK2 β en teixit tumoral (T) respecte al nivell en teixit normal (N) (T/N ratios) analitzats per western blot. La línia discontinua senyala la relació 1:1 entre els dos teixits. Valors superiors a 1 indiquen major expressió de la subunitat en teixit tumoral respecte al sa.

Les mostres analitzades corresponen a un total de 22 casos analitzats i que es detallen a la taula adjuntada.

Les variacions de les subunitats de CK2 en els extractes tumorals, va plantejar si hi havia alguna correlació entre aquests canvis i paràmetres relacionats amb el pronòstic, així com si hi existien alteracions en els nivells de CK2 α i CK2 β en aquests subgrups i que quedaven emmascarats quan es tractaven de forma conjunta.

D'aquesta manera, a la Figura 16 es mostren les relacions d'expressió entre teixit tumoral i sa (T/N ratios) de les subunitats de CK2 agrupades segons la seva gradació nuclear (A, Figura 16), el seu estadiatge tumoral (B, Figura 16) o bé segons ambdós paràmetres (C, Figura 16).

Quan s'observen les relacions d'expressió de CK2 α i CK2 β en funció de la classificació segons els graus nuclears de Führtman (G1, G2, G3+G4) (A, Figura 16) es pot veure que els nivells d'expressió de CK2 α no varien massa respecte els dos teixits (independent del grau nuclear al qual pertanyin) mostrant relacions T/N pròximes a 1. Únicament en els graus baixos (G1) és on s'observa una lleugera tendència a

la reducció de l'expressió en tumors, encara que els anàlisis estadístics realitzats no indicaven canvis significatius respecte els altres graus.

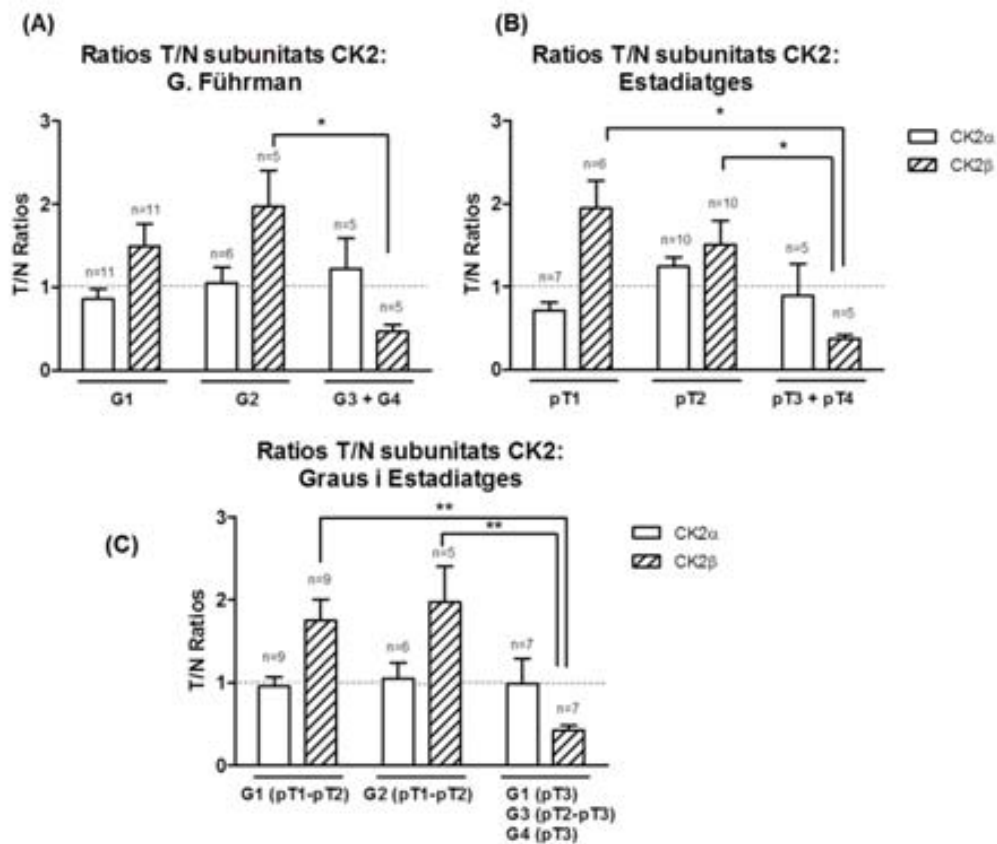


Figura 16: Relacions d'expressió entre teixit tumoral (T) i sa (N) de les subunitats de CK2 en pacients afectats per ccRCC classificats segons la gradació nuclear de Fühman i l'estadiatge.

Diagrama de barres on es mostren les ratios dels nivells d'expressió de CK2α i CK2β en extractes totals de teixit tumoral (T) respecte al teixit normal (N) (T/N ratios) analitzats per western blot.

Les mostres han estat agrupades en diferents subgrups segons el seu grau nuclear de Fühman (A) en funció del seu estadiatge tumoral (B) o en funció tant del grau com de l'estadiatge tumoral (C).

La línia discontinua senyala la relació 1:1 entre els dos teixits. Valors superiors a 1 indiquen major expressió de la subunitat en teixit tumoral respecte al sa.

Les mostres analitzades corresponen a un total de 22 casos analitzats. S'indica per a cada subgrup (G1, G2, G3+G4) i (pT1, pT2, pT3+pT4) la mida mostral analitzada.

Els resultats van ser analitzats estadísticament amb una ANOVA de 1 via usant l'algoritme de correcció de Bonferroni, amb un IC del 95% ($p < 0,05$).

A la gràfica s'han indicat únicament les diferències significatives al 95% (*) i 99% (**) de CI entre grups, les diferències no significatives no es mostren indicades.

D'altra banda, CK2β presenta un comportament característic quan els extractes s'agrupen segons aquesta gradació mostrant que en tumors, de baix grau (G1) els seus nivells augmenten respecte als del teixit sa (T/N ratios >1), observant-se una pujada encara major dels nivells de CK2β als graus intermedis (G2) (T/N ratios >1) quan es comparen amb els respectius teixits renals normals. Per altra banda en els graus alts (G3+G4), CK2β presenta una clara disminució de la seva expressió en tumors (T/N ratios < 1),

corroborat pels estudis estadístics que indiquen una reducció significativa d'expressió d'aquesta subunitat quan es comparen amb els graus intermitjos.

L'agrupació de les mostres segons els estadiatges (B, Figura 16), mostra un comportament de les subunitats de CK2 lleugerament diferent als dels graus. Així els nivells de CK2 α , s'observa una important variabilitat en el comportament d'aquesta subunitat en tumors segons l'estadiatge de la mostra, mostrant-se que en estadiatges baixos (pT1) presenta una reducció de l'expressió en tumors (T/N ratios <1), mentre que en intermitjos (pT2) tendeixen a ser majors en tumors (T/N ratios >1) per acabar reduint-se de nou en tumors amb estadiatges avançats (pT3+pT4) (T/N ratios <1). Pel que fa a la subunitat CK2 β , presenta una clara tendència a la disminució de la seva expressió en tumors a mesura que s'incrementa l'estadiatge. D'aquesta forma, en estadiatges baixos (pT1) s'observa un increment de l'expressió d'aquesta subunitat respecte al teixit sa (T/N ratios >1), que tendeix a reduir-se en estadis intermedis, per acabar presentant una important disminució de l'expressió d'aquesta subunitat reguladora (T/N ratios <1) en els tumors d'estadiatge avançat (pT3+pT4).

L'agrupació de les mostres de forma conjunta segons el seu grau i l'estadiatge tumoral (C, Figura 16) mostren que els nivells de CK2 α no presenten diferències significatives d'expressió entre el teixit sa i el tumoral, independentment del grup en el que pertanyin. Per contra s'observa que els grups constituïts per la combinació d'estadiatges baixos-intermitjos i gradacions nuclears baixes o intermitjes (G1(pT1-pT2) i G2 (pT1-pT2) respectivament) mostren un clar augment dels nivells de CK2 β en tumors. Per altra banda, les mostres que presenten estadiatges avançats lligats també a un major grau nuclear (G1 (pT3)/G3 (pT2-pT3)/G4 (pT3)) presenten en tumors una reducció estadísticament significativa dels nivells de la subunitat reguladora quan es comparen amb els altres dos grups.

Per tal de tenir una idea de quantes vegades es trobava incrementada o disminuïda la subunitat catalítica front la reguladora de CK2 en tumors, es va decidir establir una relació d'expressió entre CK2 α i CK2 β (CK2 α /CK2 β ratios) en funció de la gradació nuclear (A, Figura 17), de l'estadiatge tumoral (B, Figura 17), o considerant els dos paràmetres conjuntament (C, Figura 17). En tots els casos es van comparar les ratios de CK2 α /CK2 β dels graus i estadiatges dels tumors (columnes ratllades) amb les corresponents de teixit normal (blanques) usades com a referència.

D'aquesta manera es pot observar que malgrat que varien els nivells entre teixit tumoral i sa per a cadascuna de les subunitats de l'enzim quan es valoren de forma independent en funció dels graus nuclears (A, Figura 16), la variació dels nivells de la subunitat CK2 α respecte la CK2 β no es fan evidents en graus baixos i mitjos dels tumors. Així a la figura (A, Figura 17) s'observa com les relacions entre aquestes dues subunitats es mantenen relativament constants en G1 i G2, amb ratios entre les dues subunitats pròximes a 1 (CK2 α /CK2 β =1). Això indicaria que canvis d'expressió per una subunitat concreta de CK2 mostrats en els tumors de grau baix i mitjà queden compensats per canvis proporcionals de l'altra subunitat de CK2, mantenint-se així les relacions entre subunitats catalítiques i reguladores que es trobarien en teixits normals.

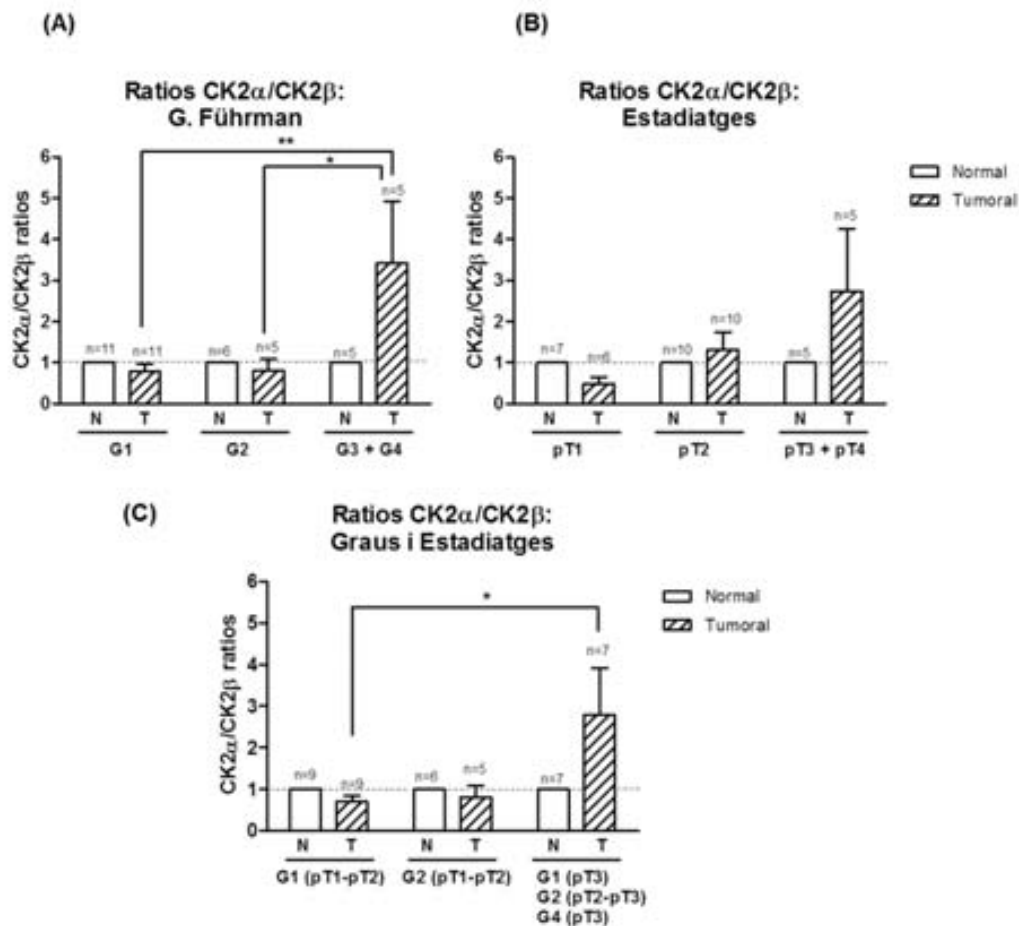


Figura 17: Relacions d'expressió entre subunitats catalítiques (CK2 α) i reguladores (CK2 β) en teixit tumoral (T) i sa (N) de pacients afectats per ccRCC classificats segons la gradació nuclear de Führman i l'estadiatge.

Diagrama de barres on es mostren les relacions dels nivells d'expressió de CK2 α respecte CK2 β (CK2 α /CK2 β ratios) en extractes totals de teixit sa (N) i tumoral (T) analitzats per western blot.

Les mostres han estat agrupades en diferents subgrups segons el seu grau nuclear de Führman (A) en funció del seu estadiatge tumoral (B) o en funció tant del grau com de l'estadiatge tumoral (C).

La línia discontinua senyala la relació 1:1 entre els dos teixits. Valors superiors a 1 indiquen major expressió de la subunitat en teixit tumoral respecte al sa.

Les mostres analitzades corresponen a un total de 15 casos analitzats. S'indica per a cada subgrup (GF.1, GF.2, GF3+GF.4) i (pT1, pT2, pT3+pT4) la mida mostral analitzada.

Els resultats van ser analitzats estadísticament amb una ANOVA de 1 via usant l'algorisme de correcció de Bonferroni, amb un IC del 95% ($p < 0,05$).

A la gràfica s'han indicat únicament les diferències significatives al 95% (*) i 99% (**) de CI entre grups, les diferències no significatives no es mostren indicades.

És únicament en els graus elevats (G3+G4) on s'observa una alteració real en les proporcions d'aquestes dues subunitats quan es miren els extractes de tumors. Així s'observa un increment significatiu de la subunitat catalítica front la reguladora en tumors de graus avançats (CK2 α /CK2 β >1), que ve causada per la forta reducció dels nivells de CK2 β mostrada en aquests graus, indicant una important descompensació de les subunitats de CK2 quan es comparen amb el teixit normal.

Quan les mostres s'agrupen en funció de l'estadiatge tumoral (B, Figura 17), es pot observar la clara tendència a l'increment de la subunitat catalítica front la reguladora a mesura que s'avança en l'estadiatge tumoral. Així en estadiatges baixos (pT1) és on s'observa la predominància de les formes CK2 β front les

CK2 α (Ratios CK2 α /CK2 β <1), ocasionada sobretot pels elevats nivells d'expressió de la subunitat reguladora en aquests estadis (B, Figura 16).

És en estadiatges intermedis (pT2) on es mostra de nou un desequilibri de l'expressió entre subunitats quan es compara amb el teixit normal, aquest cop ocasionat per una major relació de CK2 α front CK2 β (Ratios CK2 α /CK2 β >1) causada principalment per la progressiva disminució de la subunitat reguladora mostrada en aquests estadiatges (B, Figura 16). En estadiatges avançats (pT3+pT4) és on s'observa un major desequilibri entre subunitats, mostrant-se relacions molt elevades de subunitat catalítica CK2 α front la reguladora CK2 β , causada per la gairebé total desaparició de l'expressió d'aquesta última subunitat en tumors.

De nou, l'agrupació de les mostres segons estadiatges i graus baixos, intermedis i alts (mostrats a la Figura 17.C) corroboren els resultats obtinguts de la Figura 16, en el què només en el grup de mostres constituïts per graus i estadiatges avançats (G1(pT1-pT2) i G2 (pT1-pT2)) són els que presenten un desequilibri a favor de la forma CK2 α front CK2 β , atribuïble també a la reducció de l'expressió de de la subunitat reguladora de CK2 en aquest grup.

D'aquesta manera, l'increment dels nivells de CK2 β en tumors mostrats a la Figura 15 és explicable perquè a efectes pràctics, la majoria de casos analitzats de ccRCC corresponen a estadiatges i graus baixos-intermedis (pT1-pT2 i G1-G2, respectivament), caracteritzats per presentar elevats nivells d'expressió de la subunitat reguladora de CK2, contribuint de forma neta a l'increment de CK2 β en tumors, tal com s'havia descrit en estudis previs de CK2 en aquest càncer [49].

Aquest fet és important, ja que malgrat que la majoria de casos registrats de ccRCC en l'actualitat corresponen a estadiatges primerencs i intermedis del tumor, segons de la proporció de mostres analitzades de cada grau podria donar resultats diferents. Aquest fet podria explicar moltes contradiccions que es troben en els nivells d'expressió d'aquesta proteïna en càncers.

1.2. NIVELLS DE CK2 EN TISSUE MICROARRAYS DE PACIENTS AFECTATS DE CCRCC

L'anàlisi dels nivells de CK2 en extractes de teixits dels 22 casos de ccRCC havien mostrat que en tumors hi havia canvis d'expressió de la subunitat reguladora CK2 β . De forma més concisa, aquesta subunitat presentava una expressió major en aquests, causada sobretot per l'increment dels seus nivells en estadiatges tumorals menors (pT1) i la reducció de l'expressió a mesura que aquest augmentava, reduint-se a nivells gairebé indetectables en els càncers renals amb un major estadi tumoral (pT3+pT4). Aquestes reduccions de l'expressió dels nivells de CK2 β , causaven al seu torn un desequilibri en les relacions existents entre les subunitats catalítiques i reguladores de CK2, presentant-se en tumors d'estadis avançats, un predomini de la subunitat CK2 α front CK2 β .

Davant del fet que les desregulacions en els nivells de les subunitats de CK2 poden donar lloc a formes lliures d'aquestes subunitats, i ja s'havien descrit canvis en la localització subcel·lular de les subunitats de CK2 en tumors, es va decidir intentar esbrinar si el canvi en l'expressió d'aquestes anava acompanyada també de canvis en les seves localitzacions intracel·lulars.

D'aquesta manera es va decidir determinar les localitzacions de les subunitats en mostres de tumors de pacients de ccRCC mitjançant mètodes immunohistoquímics, ja que en l'anàlisi immunològic per western blot de teixit permetia només obtenir informació dels nivells d'expressió globals d'aquestes subunitats.

Per a fer-ho es va decidir usar TMAs (*Tissue MicroArrays*) que contenien mostres de teixit d'un total de 98 pacients afectats per ccRCC. Tal com s'ha descrit a l'apartat de materials i mètodes, els TMAs disposaven per cadascun dels pacients un triplicat de mostres de teixit normal, tumoral i transicional, constituït per tres seccions tissulars representatives de cadascuna d'aquestes tres regions. Els nivells de CK2 es van determinar mitjançant mètodes immunohistoquímics i la valoració dels nivells d'expressió de les subunitats en els diferents compartiments es va realitzar tal com es descriu a l'apartat de materials i mètodes.

A la Taula 22 mostrada a continuació hi ha el resum de les principals característiques clinicopatològiques dels 98 pacients estudiats, així com l'agrupació dels casos segons el seu grau nuclear o l'estadiatge tumoral.

Taula 22: Clinicopathological characteristics of the 98 patients	
Variable	N (%)
Gender	
Male	56 (57,1 %)
Female	42 (42,9 %)
Patient age (years)	
Median	68,4
Mean (range)	64,8
Tumour side	
Rt	58 (59,1 %)
Lt	40 (42,9 %)
Clinical Presentation	
Radical	92 (92,9 %)
Neph. Sparing	6 (6,1 %)
Führman grade	
G1-G2	61 (62,2 %)
G3-G4	37 (37,7 %)
pT stage	
pT1a	26 (26,5 %)
pT1b	27 (27,5 %)
pT2	16 (16,3 %)
pT3a	10 (10,2 %)
pT3b	15 (15,3 %)
pT4	4 (4,08 %)
Lymphovascular invasion	
pN	8 (8,1 %)
pM	15 (15,3 %)
Risk group (Union Internationale Contre le Cancer (UICC))	
I	71 (72,4 %)
II	27 (27,5 %)
Follow-up (months)	
Median for all patients	39,7
Mean for all patients	42,3
Neph. Sparing, nephron-sparing surgery; pT, tumour size; pN, nodal involvement; pM, metastasis	

Taula 22: Característiques clinicopatològiques dels 98 pacients de ccRCC examinats en els TMA's.

A la Figura 18 es mostra la valoració dels nivells de CK2 α (A, Figura 18) i CK2 β (B, Figura 18) tant al nucli com al citoplasma de les mostres de teixit sa i tumoral dels 98 casos de ccRCC.

En aquesta gràfica es pot observar que en tumors hi ha un clar augment dels nivells de CK2 α nuclear, mentre que els nivells de CK2 α citoplasmàtics pateixen una davallada quan es comparen amb el teixit sa (A, Figura 18). Malgrat que l'anàlisi estadístic ha confirmat que tant l'increment nuclear de CK2 α com la seva disminució en el citoplasma dels tumors són significatius, la davallada dels nivells de CK2 α al citoplasma no es corresponen amb el fort augment d'aquesta senyal en nucli. D'aquesta manera, l'augment de CK2 α nuclear és molt major que la disminució d'aquesta al citoplasma, explicat possiblement pel fet que CK2 α al translocar-se cap al nucli, causa un augment de la intensitat de senyal al concentrar-se en un volum molt reduït.

Pel què fa a la subunitat reguladora CK2 β (B, Figura 18), s'observa que en tumors hi ha una tendència a augmentar en nucli, encara que estadísticament no hi hagi diferències significatives pel què fa als nivells quan es comparen amb el teixit normal. Per contra, CK2 β pateix una important reducció en el citoplasma de les cèl·lules tumorals quan es compara amb el de les cèl·lules sanes. En aquest cas, igual que passava amb el cas de CK2 α , la disminució de la intensitat de senyal de la subunitat reguladora en el citoplasma de les cèl·lules tumorals no es correspon amb la pujada observada en nucli, fet que vindria explicat principalment pel desplaçament de la subunitat reguladora cap a regions pròximes a la membrana plasmàtica, tal com es comentarà detalladament més endavant.

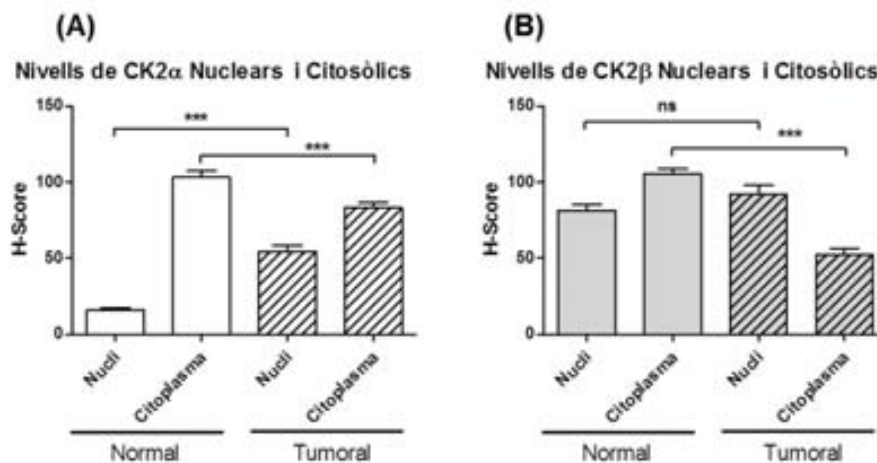


Figura 18: Valors de H-score en les mostres de TMA.

Nivells d'expressió de CK2 α (A) i CK2 β (B) tant a nucli com al citoplasma de les mostres de teixit tumoral i normal d'un total de 98 pacients afectats per ccRCC. Els resultats mostren que en tumors hi ha un augment significatiu (***) en els nivells de CK2 α nuclears, ha expenses d'una lleugera disminució dels seus nivells citoplasmàtics (***) . Els nivells de CK2 β tendeixen a augmentar al nucli dels tumors, encara que les diferències no siguin estadísticament significatives (ns), mentre que el seu citoplasma pateix una important caiguda dels nivells de CK2 β .

Els valors de H-score obtinguts van ser analitzats mitjançant una distribució T-student amb un IC=99% ($p < 0,0001$). (***) diferències significatives a IC 99 %; ns, diferències no significatives)

La figura inferior (Figura 19) mostra imatges representatives de les tincions immunohistoquímiques per cadascuna de les subunitats de CK2 en teixit normal i tumoral renal d'un dels 98 pacients analitzats en els TMA. Tal com es pot observar en les imatges normals com en les ampliades, la intensitat de senyal tant de CK2 α com de CK2 β són semblants en el citoplasma de les cèl·lules dels túbuls proximals renals, trobant-se uniformement tenyit. En les mostres tumorals del mateix pacient és on s'observen tant els canvis en la localització subcelular de les subunitats de CK2, com els canvis morfològics cel·lulars ja descrits en aquest tipus de tumor (coincidint amb els resultats reflectits a la Figura 18). D'aquesta manera, s'observa en el cas de CK2 α una important disminució en el citoplasma de les cèl·lules tumorals, mostrant certa tinció per sobre de les vesícules glucolípidiques característiques de les cèl·lules. Al mateix

temps cal destacar com en la majoria de nuclis tumorals es pot observar un increment de la senyal de CK2 α (imatge ampliada).

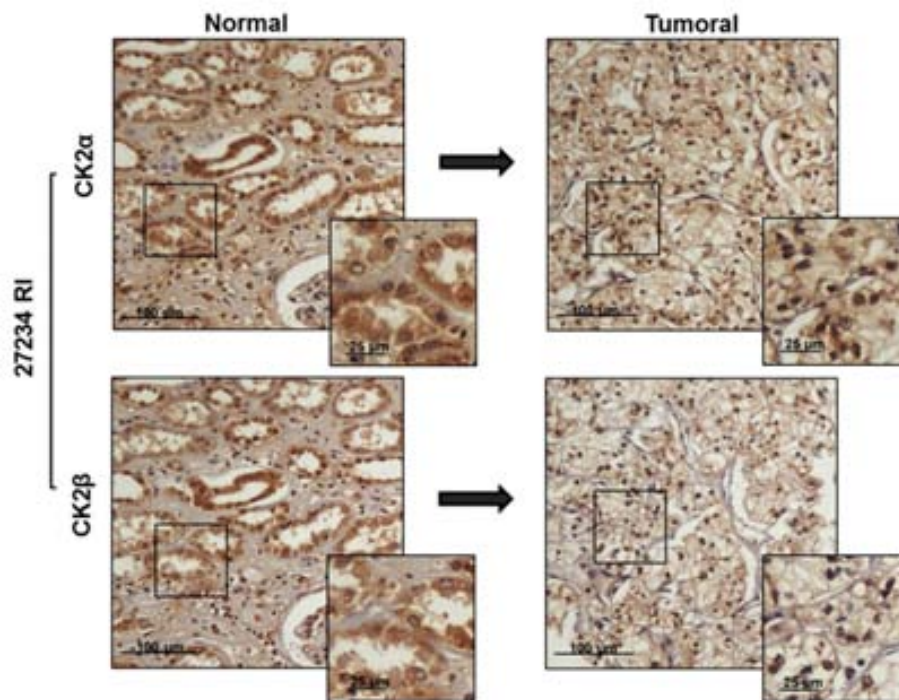


Figura 19: Nivells de CK2 α i CK2 β en TMAs d'un pacient afectat per ccRCC

Nivells tant nuclears com citoplasmàtics de CK2 α i CK2 β en teixit normal i tumoral determinats per immunohistoquímica (IHC). Les mostres es van contratenyir amb hematoxilina.

Les imatges corresponen a una mostra representativa de teixit normal i tumoral d'un mateix pacient afectat per ccRCC (27234 RI)(G3, pT1a).

La subunitat CK2 β , també pateix una important davallada en el citoplasma de les cèl·lules tumorals, més dràstica que la mostrada per l'anterior subunitat, mostrant les vesícules de glicogen i lípids clares, lliures del recobriment per part de CK2 β . Aquesta disminució de CK2 β a citoplasma va acompanyada d'un augment de senyal a molts nuclis, a causa de la seva translocació (encara que no tant evident com en el cas de la subunitat catalítica). Malgrat això, tal com s'ha dit, la desaparició de la subunitat CK2 β al citoplasma en tumors no es pot explicar únicament per la seva translocació al nucli. D'aquesta manera, la presència de senyal a les regions immediatament pròximes a les membranes plasmàtiques de les cèl·lules tumorals podrien donar lloc a aquesta disminució, donant peu al fet que hi hagués també una translocació de CK2 β cap a la membrana plasmàtica o bé un desplaçament d'aquesta cap a les seves proximitats causada per les voluminoses vesícules glucolípidiques característiques de les cèl·lules clares.

Per tal de veure si existia alguna correlació entre els nivells de les subunitats de CK2 i la seva localització en funció de la gradació nuclear, es va decidir agrupar els valors obtinguts de la valoració en funció del grau nuclear de Führman segons si el que es valorava eren els nivells de CK2 α /CK2 β citosòlics o nuclears. La Figura 20 mostra els valors de H-score obtinguts en els 98 casos de ccRCC en un diagrama

de dispersió, ordenats en funció de grau de Fühman creixent (G1 al G3+G4) i acompanyats de la valoració obtinguda sobre el teixit sa dels mateixos pacients que constitueixen el grau. Les dades corresponents als G3 i G4 van ser agrupades en un sol grup (G3 + G4) degut a la baixa mida mostral que presentaven aquests grups i davant del fet que ambdós es poden considerar com a graus avançats. Els resultats s'han separat en 4 gràfics de dispersió diferents, en funció de si el que s'analitzava eren els nivells d'expressió nuclears de CK2 α (A, Figura 20) o de CK2 β (B, Figura 20) o dels nivells citoplasmàtics de CK2 α (C, Figura 20) o de CK2 β (D, Figura 20). Al mateix temps cal destacar que les dades van ser analitzades estadísticament mitjançant una distribució ANOVA d'una via amb l'algorisme de correcció de Bonferroni usant intervals de confiança del 99% i 95%.

El primer que cal destacar és l'elevada dispersió dels nivells de CK2 mostrada en tumors (sobretot en el cas dels nivells de CK2 α i CK2 β nuclears) independent del grau, així com el baix nombre de mostres d'individus amb la major gradació nuclear (G3 + G4).

Els anàlisis estadístics realitzats confirmen que hi ha diferències significatives en els nivells de CK2 α nuclear entre teixit tumoral i sa quan es comparen dins del mateix grau, mostrant un increment de la intensitat de senyal de CK2 α en els nuclis de les cèl·lules tumorals (Figura 20.A) coincidint amb els resultats obtinguts quan es comparen de forma conjunta (Figura 18). Cal esmentar també que malgrat que s'observen aquests canvis quan es comparen dins del mateix grau, no hi ha diferències significatives pel que fa als nivells de CK2 α nuclear entre els diferents graus, mostrant ja a partir del G1 un important increment en la seva senyal, que es manté en els graus següents.

Pel que fa als nivells de CK2 α citoplasmàtics de les mostres tumorals, s'observa una tendència a la seva disminució de senyal quan es comparen les mostres normals amb les tumorals dins d'un mateix grau, encara que l'anàlisi estadístic indica que aquests canvis no són significatius (cosa que sí que ho eren quan es valoraven els valors de forma conjunta).

Els nivells de CK2 β nuclears en canvi, no varien quan es comparen les mostres de teixit tumoral amb les sanes dins d'un mateix grau, ni tampoc reflecteixen diferències en els nivells entre els diferents graus.

Pel que fa als nivells de CK2 β citoplasmàtics, sí que presenten una important reducció dels nivells d'expressió quan es comparen amb les mostres normals dins d'un mateix grau (confirmat també per l'anàlisi estadístic), però igual que en els anteriors casos, la variació es dona ja als primers graus i tendeix a mantenir-se en els següents, fent que no hi hagi diferències significatives en els nivells d'expressió quan es comparen els graus entre ells.

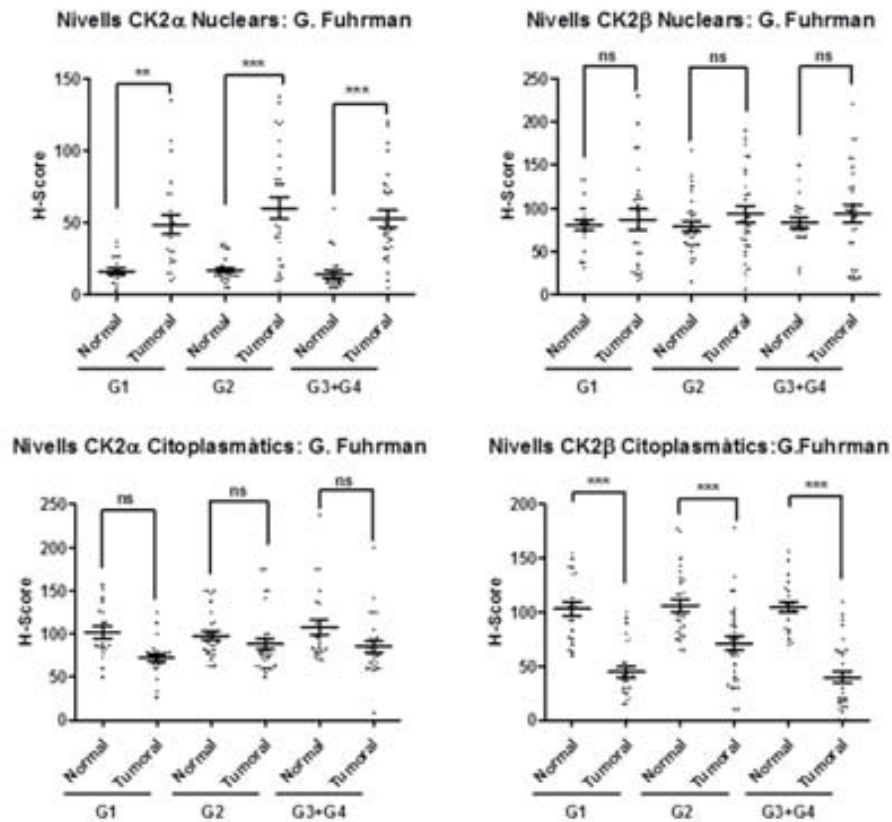


Figura 20: Agrupació dels valors de H-score obtinguts segons el sistema de gradació nuclear de Fuhrman en un diagrama de dispersió.

Nivells d'expressió de CK2α (A, C) i CK2β (B, D) tant a nucli (A, B) com al citoplasma (C, D) de les mostres de teixit normal i tumoral d'un total de 98 pacients afectats per ccRCC agrupats segons el grau nuclear de Fuhrman (G1, G2, G3+G4). Les escales són diferents per a cadascuna de les gràfiques.

Els nivells nuclears de CK2α augmenten de forma significativa en tots els graus de Fuhrman (**, ***) excepte en el G4 (ns) quan es comparen amb les mostres normals. Les diferències d'expressió de CK2α entre els graus per contra no són significatives entre sí (ns). Pel que fa als nivells citoplasmàtics de CK2α, no s'observen canvis (ns) al comparar les mostres tumorals amb els normals, així com tampoc s'observen diferències entre els diferents graus (ns).

Els nivells de CK2β tumorals no mostren diferències significatives en els nuclis quan es comparen amb les mostres normals (ns). Els valors citoplasmàtics de CK2β pateixen una forta reducció en tumors (***) en tots els casos, magrat això no es troben diferències significatives al comparar-se els diferents graus entre ells.

Els valors de H-score obtinguts van ser analitzats mitjançant una distribució ANOVA d'una via usant l'algoritme de correcció de Bonferroni i amb un IC=99,9 % i del 95% (p<0,0001).

(*** diferències significatives a IC 99 %; ** diferències significatives al 95 % IC, ns diferències no significatives).

La pèrdua de significança obtinguda en la subclassificació segons els graus en determinats casos (i no observada quan s'analitzaven els valors de forma conjunta) vindria explicada per la disminució de la mida mostral al generar subgrups, acompanyada per la major dispersió de resultats en les mostres tumorals, donant unes condicions més restrictives per a la determinació de la significança.

A la Figura 21 es mostren les immunotincions contra les subunitats de CK2 de 4 de les 98 mostres de pacients valorades en els TMAs, classificades en funció del grau nuclear de Fuhrman. Es pot observar com els nivells citoplasmàtics de CK2β i CK2α es mantenen més o menys constants independent del

grau, al torn que cal destacar com els nivells de CK2 β continuen sent sempre inferiors als de CK2 α citoplasmàtics, independent del grau que s'estigui analitzant. A les imatges es pot observar l'increment de la mida nuclear, així com alteracions en la seva morfologia com la mida dels nuclèols a mesura que augmenta el grau (sobretot en els graus més avançats) tal com s'ha descrit anteriorment. Pel que fa a les tincions nuclears de CK2 α com CK2 β no mostren diferències significatives entre els 3 primers graus (G1 al G3), però sí en el grau G4 en el que s'observen apart de la tinció nuclear, uns nuclèols fortament tenyits per les subunitats de CK2 i un increment de senyal sobretot a la cara interna de la membrana nuclear.

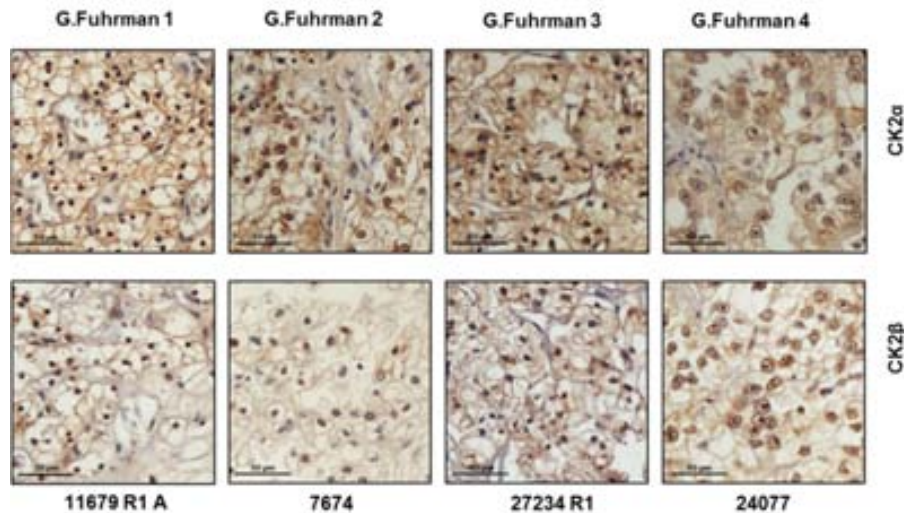


Figura 21: Nivells de CK2 α i CK2 β classificades segons el mètode de Gradació Nuclear de Fùhrman.
 Determinació immunohistoquímica (IHC) dels nivells de CK2 α i CK2 β en mostres de teixit tumoral classificades segons la gradació nuclear de Fuhrman. Les mostres es van contratenyir amb hematoxilina.
 Les imatges corresponen a diferents mostres de pacients afectats per ccRCC (11679 R1A, 7674, 27234 R1, 24077).

És important també destacar que en el cas de CK2 β , s'observa una forta tinció d'aquesta subunitat a les proximitats de la membrana plasmàtica de les cèl·lules tumorals, difícilment quantificable a causa de l'elevada intensitat de senyal que presenta. L'observació més acurada d'aquesta regió en tumors, mostra que la membrana plasmàtica presenta una tinció més acusada per CK2 β en la majoria dels estadis tumorals més baixos (pT1) i que aquesta esdevé més tènue a mesura que augmentem els estadiatges, essent els pT3 i pT4 els que menor tinció presenten (Figura 22).

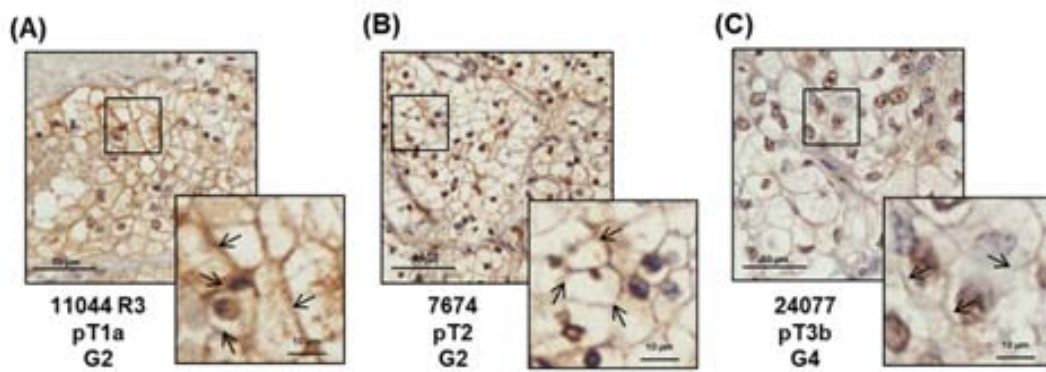


Figura 22: Marcatge de CK2 β a membrana plasmàtica en TMA, en funció de l'estadiatge.

Determinació immunohistoquímica (IHC) dels nivells de CK2 β en membrana plasmàtica de tumors classificades segons estadiatges creixents. Les mostres es van contratenyir amb hematoxilina.

Les imatges corresponen a diferents mostres de pacients afectats per ccRCC: 11044 R3 (pT1a, G2) **(A)** ; 7674 (pT2,G2) **(B)** , 24077 (pT3b, G4) **(C)**.

Actualment el factor més usat per al pronòstic de pacients afectats per ccRCC és l'estadiatge del tumor. Per aquest motiu, es va decidir agrupar les valoracions dels nivells de les subunitats de CK2 segons els diferents estadiatges, per tal de comprovar si existien correlacions entre els nivells d'expressió de les subunitats de CK2 en els diferents compartiments cel·lulars i l'estadiatge tumoral (Figura 23). Igual que l'anterior cas, les dades també van ser agrupades en tres grups: pT1, pT2 i pT3+pT4 (constituït per la suma dels dos grups). La fusió dels pT3 i pT4 en un nou grup va ser decidida per la baixa mida mostral dels pT4 (només 4 casos) i degut al pronòstic similar que mostren amb els pT3.

Així a la Figura 23 hi ha de nou els valors de H-score obtinguts en els 98 casos de ccRCC, ordenats en estadiatges creixents acompanyats de la valoració obtinguda sobre teixit sa dels mateixos pacients que constitueixen el grau. Els resultats s'han separat en 4 diagrames de barres diferents en funció de si s'analitzaven els nivells d'expressió nuclears de CK2 α (A, Figura 23) o de CK2 β (B, Figura 23) o dels nivells citosòlics de CK2 α (C, Figura 23) o CK2 β (D, Figura 23). Les dades van ser també analitzades mitjançant una ANOVA d'una via amb l'algoritme de correcció de Bonferroni usant intervals de confiança del 99,9%.

Tal com es pot observar (A, Figura 23) els nivells de CK2 α nuclears augmenten significativament en les cèl·lules tumorals quan es comparen amb els nivells de les cèl·lules sanes dins del mateix estadiatge tumoral. Aquest important augment dels nivells de CK2 α nuclears ja es donen als primers estadiatges dels tumors i tendeixen a patir poques variacions a mesura que els estadis van augmentant, fent que no es puguin observar diferències pel què fa a l'expressió dels nivells de CK2 α nuclears en funció de l'estadiatge.

Els nivells de CK2 α citoplasmàtics (C, Figura 23), en canvi mostren una tendència a disminuir en tumors quan es comparen amb els nivells mostrats en el teixit normal per a un mateix grau, malgrat tot, no s'observen variacions d'expressió quan es comparen els nivells d'expressió entre els diferents graus. Encara que l'anàlisi estadístic indiqui que aquests canvis no siguin significatius entre sí (cosa que sí que

s'observava quan es comparaven els nivells de CK2 α citoplasmàtics) s'observa aquesta tendència, i l'explicació de nou es basaria amb la reducció de la mida mostral causada per la subdivisió en estadiatges i la dispersió dels valors obtinguts.

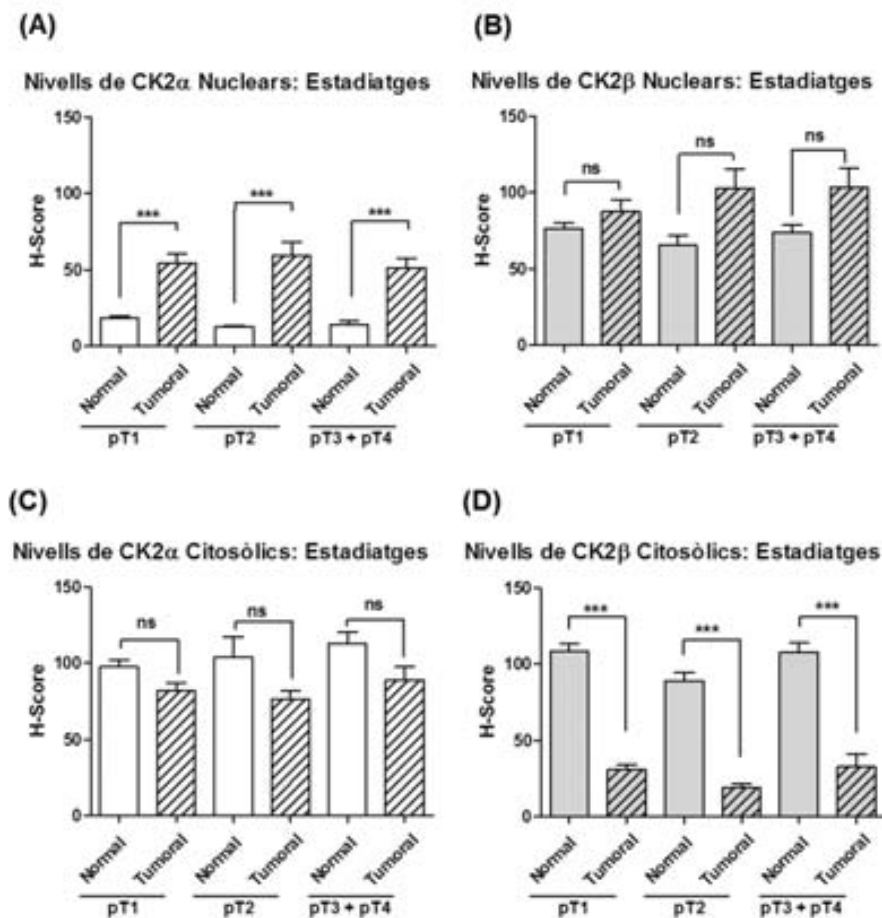


Figura 23: Agrupació dels valors de H-score obtinguts segons l'estadiatge.

Nivells d'expressió de CK2 α (A, C) i CK2 β (B, D) tant a nucli (A, B) com al citoplasma (C, D) de les mostres de teixit normal i tumoral d'un total de 98 pacients afectats per ccRCC agrupats segons l'estadiatge (pT1, pT2, pT3+pT4).

Els valors obtinguts indiquen que hi ha un augment significatiu (***) dels nivells de CK2 α nuclears en tots els estadis dels tumors (pT1, pT2 i pT3+pT4), però no s'observen diferències d'expressió entre els diferents estadiatges. Malgrat que s'observa una disminució en els nivells de CK2 α en els citoplasmes tumorals, les diferències no són significatives (ns).

Els nivells de CK2 β tumorals tendeixen a augmentar en nuclis (sobretot a estadiatges avançats pT2 i pT3+pT4), encara que els augments no són significatius en cap dels casos (ns). Els nivells de CK2 β nuclears en canvi disminueixen significativament en tots els estadiatges tumorals (***) i tal com passava amb el cas de la subunitat CK2 α , no s'observen diferències significatives d'expressió quan es comparen els diferents estadiatges entre sí.

Els valors de H-score obtinguts van ser analitzats mitjançant una distribució ANOVA d'una via usant l'algorisme de correcció de Bonferroni i amb un IC=99,9 % (p<0,0001).

(*** diferències significatives a IC 99 %; ns, diferències no significatives).

Pel què fa als nivells de CK2 β nuclears (Figura 23.B) es pot observar que dins d'un mateix estadiatge, hi ha una tendència a augmentar els nivells de CK2 β en el teixit tumoral quan es compara amb el sa. En aquest cas també s'observa una tendència a augmentar els nivells de CK2 β nuclears a mesura que

incrementem l'estadiatge del tumor. Malgrat això, l'anàlisi estadístic indica que les diferències observades en els nivells de CK2 β nuclears en tots els casos no són significatives.

Per altra banda, cal destacar que l'anàlisi estadístic realitzat sobre els nivells de CK2 β citosòlics (C, Figura 23C) en tumors, mostren que hi ha diferències significatives d'expressió quan es comparen amb els normals. Així hi ha una important disminució dels nivells de CK2 α citoplasmàtics en les cèl·lules tumorals quan es comparen amb els nivells de les cèl·lules tubulars del teixit normal dins 'un mateix grau. Igual que els altres casos, la disminució de l'expressió de CK2 β ja es dona al primer estadiatge tumoral i té tendència de nou a mantenir-se en els següents, fet que fa que no es mostrin diferències significatives d'expressió de CK2 β citoplasmàtica en tumors en funció dels diferents estadiatges.

Els resultats obtinguts en l'anàlisi dels TMAs en primer moment sembla que es contradiguin amb els prèviament obtinguts de l'anàlisi per *western blot* de extractes de teixits tumorals de pacients afectats per ccRCC. Així, en els extractes de teixit s'havia observat que en tumors hi havia un increment de l'expressió de CK2 β (ocasionada sobretot per l'augment d'aquesta subunitat) en estadiatges tumorals primerencs (pT1) que s'anava reduint als estadis intermitjos (pT2) per finalment presentar una expressió gairebé irrisòria als estadis més avançats del tumor (pT3+pT4). La quantificació dels nivells d'aquesta mateixa subunitat en el cas dels TMAs, mostra una reducció molt important de la seva expressió en citoplasma dels tumors, independentment del seu estadiatge tumoral, contradient-se amb aquests resultats. La possible explicació d'aquesta diferència rau en què en l'anàlisi dels extractes de teixit per *western blot*, s'analitzaven els nivells totals tant de CK2 α com de CK2 β (independent de que es localitzessin a nucli, al citoplasma o a la membrana plasmàtica), mentre que en els TMAs es van analitzar únicament els nivells citoplasmàtics i nuclears d'aquestes subunitats, ignorant els valors de tinció a membrana, difícils de quantificar. El fet que a més a més, és en els estadis menors on hi ha més CK2 β a la membrana plasmàtica, mentre que en els majors és on se'n troba menys, és correlaciona de forma directa amb els nivells d'expressió d'aquesta subunitat en els extractes tumorals quan s'analitzen en funció del seu estadiatge.

2. LÍNIES SILENCIADES

2.1. NIVELLS D'EXPRESSIONIÓ DE LES SUBUNITATS DE CK2 EN LÍNIES RENALS HUMANES

Les diferències en els nivells d'expressió de les subunitats de CK2 obtingudes tant en els anàlisis de teixit com en les immunotincions de les biòpsies de ccRCC, va fer-nos plantejar usar línies renals humanes establertes derivades de túbul proximal, com a model d'estudi de la patologia *ex vivo*. D'aquesta forma es va decidir treballar amb les línies renals humanes HK-2 i 786-O com a models cel·lulars de túbul proximal renal sa i tumoral (derivat de ccRCC) respectivament. Així, es va decidir primerament determinar per western blot els nivells de CK2 existents en aquestes línies.

Per a fer-ho es va decidir incloure també una tercera línia que s'usaria com a model de referència per a les altres dues i que el nostre grup ja hi havia treballat amb anterioritat: la línia HEK-293T, una línia renal humana d'origen embrionari.

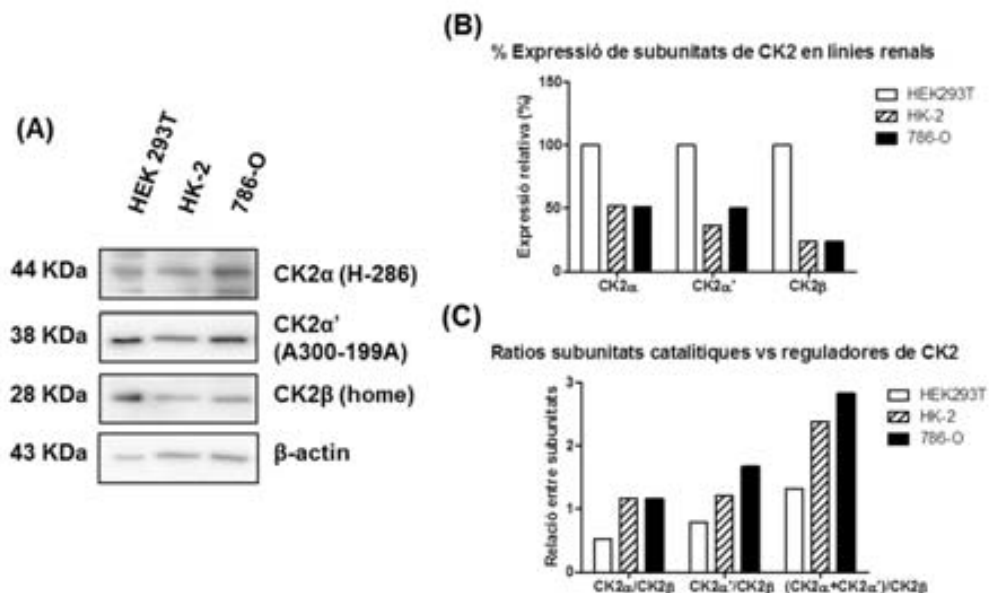


Figura 24: Nivells d'expressió de les subunitats de CK2 en línies renals.

(A) Anàlisi immunològic per Western Blot dels nivells de CK2 α , CK2 α' i CK2 β en tres línies renals humanes diferents (HEK 293T, HK-2, 786-O)

(B) Expressió relativa (%) de CK2 α , CK2 α' i CK2 β en les línies HEK-293T, HK-2 i 786-O prèviament estandarditzats per actina. Els nivells d'expressió de les subunitats en HEK293T han estat usades com a referència.

(C) Nivells d'expressió de les subunitats catalítiques de CK2 (CK2 α , CK2 α' i CK2 $\alpha+\alpha'$) respecte a les reguladores CK2 β en les línies renals HEK-293T, HK-2 i 786-O.

A la Figura 24.A es veuen els nivells d'expressió de les subunitats catalítiques CK2 α i CK2 α' així com de la reguladora CK2 β i de la β -actina en les tres línies cel·lulars abans esmentades mitjançant l'anàlisi immunològic per western blot.

Per a veure les variacions en els nivells d'expressió d'aquestes subunitats, es van estandarditzar els nivells d'expressió de cadascuna d'elles per actina i es va decidir usar els nivells d'expressió de les subunitats en HEK-293T com a valors de referència. Aquesta expressió relativa en % de CK2 α i CK2 β es representa en el diagrama de barres de la Figura 24.B. En aquesta es pot ratificar que HEK-293T és la línia que presenta uns majors nivells de totes les subunitats de CK2, trobant-se els nivells tan de CK2 α , CK2 α' i CK2 β més elevats (especialment en el cas de la subunitat reguladora) que les altres dues línies. A la mateixa figura s'il·lustra també com les línies HK-2 i 786-O tenen valors molt semblants de les subunitats CK2 α i CK2 β , exceptuant el cas de CK2 α' que té poca expressió en la línia HK-2 (tal com es veu al western blot de la Figura 24.A).

El fet que cada cop estan adquirint més importància les relacions entre els nivells de les diferents subunitats de CK2 que no pas les variacions de cadascuna d'elles de forma independent en diferents patologies com els càncers, va fer decidir analitzar les relacions entre aquestes subunitats en les tres línies cel·lulars. De fet, els resultats previs obtinguts tant en els extractes de teixit tumoral com en l'anàlisi immunohistoquímic de biòpsies de ccRCC, ja indicaven que hi havia un desequilibri entre les subunitats de CK2, mostrant-se un increment de CK2 α front CK2 β en els estadis més avançats del tumor (pT3+pt4). Així a la Figura 24.C es mostren les ratios de la subunitat catalítica CK2 α , CK2 α' i els nivells conjunts de CK2 α i CK2 α' respecte la subunitat reguladora CK2 β per a cadascuna de les línies. En aquesta figura es pot observar que mentre les ratios CK2 α /CK2 β de les línies renals HK-2 i 786-O són molt iguals entre elles, les HEK-293T manifesten una relació molt més baixa entre aquestes subunitats, generada per l'alta proporció de CK2 β que presenten. Pel què fa a la ratio CK2 α' /CK2 β , aquesta varia en les 3 línies, trobant-se de nou més baixa en la HEK293T (causat pels nivells elevats de CK2 β) mentre que en 786-O i HK-2 apareixen diferències, essent menor en les HK-2.

El fet de que tant CK2 α com CK2 α' tradicionalment se les hagi considerat com isoformes que no mostren diferències entre elles pel que fa a la funcionalitat com activitat de CK2, ens va fer calcular una nova relació que considerés les dues subunitats de forma conjunta respecte els nivells de CK2 β . Així quan es consideren de forma conjunta les subunitats catalítiques CK2 α + α' respecte a les reguladores CK2 β s'observa que les línies derivades de túbul proximal renal (786-O i HK-2) són les que major ratio CK2 α + α' /CK2 β presenten (observant-se valors més alts en les 786-O), mentre que la línia renal embrionària HEK293T presenta ratios molt menors a les anteriors, fet explicable de nou pels seus alts nivells de CK2 β .

Aquests resultats indicaven d'aquesta forma que les tres línies renals presentaven nivells clarament diferenciats pel què fa a les ratios entre les subunitats catalítiques i reguladores de CK2, coincidint el fet que les línies de túbul proximal renal tenien nivells semblants tant de subunitats catalítiques (CK2 α) i reguladores (CK2 β), observant-se una lleugera disminució de la isoforma CK2 α' en línies tubulars derivades de teixit sa HK-2. Per contra les línies HEK293T es caracteritzaven per presentar principalment uns nivells molts alts de les subunitats reguladores CK2 β (així com també de CK2 α') la qual contribuïa d'aquesta forma a les baixes ratios CK2 α /CK2 β característica d'aquesta línia. Així, a efectes pràctics, les

línies renals derivades de túbul proximal analitzades presenten unes ratios CK2 α /CK2 β elevades, tal com s'ha registrat a les etapes més avançades del ccRCC, essent en el cas de 786-O lleugerament més altes que les HK-2, derivades de túbul proximal sa.

2.2. NIVELLS DE CK2 α , CK2 α' I CK2 β EN LÍNIES RENALS SILENCIADES PER LES SUBUNITATS DE CK2.

Tal com s'ha esmentat, molts estudis previs realitzats sobre tumors o bé línies tumorals havien mostrat canvis en l'activitat o bé en els nivells d'algunes de les subunitats de CK2. Anteriorment altres grups havien efectuat moltes aproximacions diferents sobre línies cel·lulars establertes d'origen tumoral basades en sobreexpressió o repressió d'algunes de les seves subunitats, però pocs d'ells tractaven el comportament simultani de les subunitats catalítiques i reguladores d'aquesta quinasa. Aquest fet ens va fer plantejar la possibilitat de utilitzar línies renals obtingudes de túbul contort proximal humà, les HK-2 (línies estables obtingudes de cèl·lules sanes) i 786-O (línies estables obtingudes d'un pacient afectat per ccRCC, generat a partir de les mateixes cèl·lules del túbul) com a model d'estudi.

Així mateix es va decidir efectuar per a cada línia un silenciament independent estable tant per a la subunitat catalítica CK2 α com per la reguladora CK2 β , per tal de generar per primera vegada un model d'estudi amb un comportament de les subunitats comparable a l'observat en les mostres de biòpsies de pacients afectats per ccRCC. D'aquesta forma, les línies cel·lulars silenciades per la subunitat reguladora presentarien unes relacions CK2 α /CK2 β elevades (semblant a les relacions observades a estadiatges tumorals avançats) mentre que les silenciades en la subunitat catalítica tindrien unes relacions CK2 α /CK2 β baixes (observat en els estadiatges primerencs del ccRCC).

Per aquesta finalitat, mitjançant partícules lentivirals portadores d'un plàsmid integratiu codificant per un shRNA contra CK2 α o CK2 β , es van obtenir línies cel·lulars silenciades per la subunitat catalítica de CK2 (786-O shCK2 α i HK-2 shCK2 α), línies silenciades per la subunitat reguladora (786-O shCK2 β i HK-2 shCK2 β) i línies control que havien estat transfectades per partícules lentivirals portadores d'un vector buit (786-O shCV i HK-2 shCV). L'obtenció de les línies es descriu detalladament a l'apartat de materials i mètodes corresponent i l'anàlisi dels nivells de cadascuna de les subunitats en aquestes línies es mostra a la Figura 25.

El primer que cal destacar de la Figura 25 és que els nivells de les subunitats de CK2 (CK2 α , CK2 α' i CK2 β) varien entre les dues línies renals control HK-2 shCV i 786-O shCV, essent semblants als mostrats per les mateixes línies *wild type* (wt) en l'apartat anterior, podent-se considerar com bones mostres de referència per a les corresponents línies silenciades.

Per tal d'assegurar que el silenciament de les diferents subunitats eren específics, les subunitats es van analitzar amb una combinació de tres anticossos contra la subunitat catalítica (1AD9, específic front CK2 α i CK2 α' ; H-286, contra CK2 α i A300-199A, contra CK2 α') i dos anticossos front la reguladora (CK2 β 6D5 i el CK2 β *homemade*).

Així la línia 786-O shCV (Figura 25) es caracteritza per presentar uns nivells de CK2 α i CK2 α' molt semblants entre sí, corroborades usant un anticòs específic contra les dues subunitats. El silenciament estable de la subunitat CK2 α en la línia 786-O (786-O shCK2 α) mostra que l'expressió d'aquesta subunitat es redueix dràsticament, encara que no arriba mai a ser total (tenint uns valors de silenciament que oscil·len entre el 40-60% de l'expressió), mentre que els nivells de CK2 α' es mantenen inalterats, donant lloc a una línia cel·lular que presenta com a forma predominant de subunitat catalítica la CK2 α' . El silenciament de CK2 α en aquesta línia sembla causar una reducció dels nivells d'expressió de la subunitat reguladora CK2 β , propietat que és compartida també per la línia HK-2 shCK2 α . De forma semblant, altres grups recentment han observat que el silenciament simultani de les dues subunitats CK2 α en les línies MCF-10A causen una disminució dràstica dels nivells de la subunitat reguladora [139].

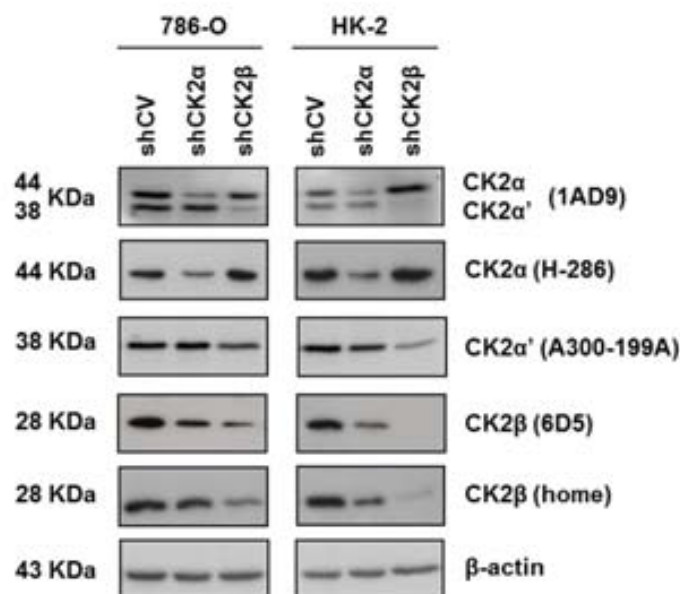


Figura 25: Nivells d'expressió de CK2 α , CK2 α' i CK2 β de les línies 786-O i HK-2 silenciades per les subunitats de CK2.

Detecció immunològica per Western blot dels nivells de CK2 α (H-286), CK2 α + α' (1AD9), CK2 α' (A300-199A), CK2 β (6D5) i CK2 β (*homemade*).

Es va usar com a control de càrrega la β -actina.

El silenciament de la subunitat reguladora CK2 β en 786-O (786-O shCK2 β), presenta una reducció en l'expressió d'aquesta subunitat, encara que igual com passava amb CK2 α , el silenciament tampoc és total (presentant una expressió en torn del 30%). És també de destacar que per contra de l'esperat, el silenciament de CK2 β té efectes molt importants sobre la subunitat CK2 α' , causant una dràstica reducció de l'expressió d'aquesta subunitat, fet recentment observat també per Deshiere et al. [139]

Tal com s'ha mencionat, la línia HK-2 shCV (igual que la corresponent línia HK-2 *wild type*) té una expressió desigual de les dues subunitats catalítiques, essent la subunitat CK2 α la que presenta una major expressió i uns nivells de senyal molt semblants als mostrats a la línia 786-O shCV.

De la mateixa manera que passa en 786-O, el silenciament de CK2 α en HK-2 (HK-2 shCK2 α) no arriba a ser total, tenint una reducció de l'expressió molt semblants a les equivalents 786-O shCK2 α (presentant al voltant del 40% de l'expressió). De la mateixa manera, el silenciament d'aquesta, causa també una reducció en l'expressió de la subunitat reguladora CK2 β , mantenint-se inalterats els nivells de la subunitat catalítica CK2 α' . Malgrat que els efectes del silenciament per CK2 α sobre les altres subunitats són els mateixos entre les dues línies (HK-2 i 786-O), no ho són pel què fa a les proporcions de formes holoenzimàtiques i lliures resultants. Així, la línia HK-2 shCK2 α , hauria de tenir formes holoenzimàtiques de CK2 constituïdes a parts iguals per CK2 α o CK2 α' , presentant una possible reducció de les formes lliures. Malgrat això en el cas de les dues línies silenciades per CK2 α presentarien una reducció de les subunitats catalítiques front les reguladores, semblant a l'observat en les cèl·lules tumorals d'estadiatges baixos (pT1).

La línia silenciada HK-2 shCK2 β presenta una forta reducció dels nivells de CK2 β (essent molt major que l'obtinguda en 786-O shCK2 β) donant lloc al que es podria considerar un silenciament gairebé total (valors d'expressió romanents del 5-10%). Aquest fort silenciament de la subunitat reguladora també va acompanya per una forta reducció d'expressió de la subunitat CK2 α' (la qual també és molt superior a la de 786-O shCK2 β). La subunitat CK2 α no presenta canvis significatius pel que fa a l'expressió quan es compara amb la corresponent línia control HK-2 shCV. Aquest fet fa pensar que la línia HK-2 shCK2 β hauria de presentar una predominança de CK2 α lliure, mentre que els nivells de formes holoenzimàtiques i de CK2 α' lliures haurien de ser molt reduïdes. D'aquesta manera, les dues línies silenciades per CK2 β , tindrien unes relacions CK2 α /CK2 β elevades, coincidint en aquest cas amb els estadiatges més avançats del tumor (pT4) tal com s'havia proposat durant l'obtenció d'aquestes línies.

2.3. EFECTES DEL SILENCIAMENT DE CK2 SOBRE LA FOSFORILACIÓ DE eIF2 β

Tal com s'ha descrit anteriorment, la unió de la subunitat reguladora CK2 β pot atorgar canvis en l'activitat de les subunitats catalítiques, així com canvis en l'especificitat front determinats substrats. La subunitat eIF2 β del factor d'iniciació de la traducció eIF2 es caracteritza per ser un dels pocs substrats que són fosforilables únicament per la forma holoenzimàtica de CK2, presentant una diana de fosforilació de CK2 a la Ser2.

Davant de què el silenciament estable de les subunitats catalítiques i reguladores en les línies renals causava canvis en les proporcions de les formes lliures i tetramèriques de les diferents subunitats de CK2, es va voler veure si aquests canvis es reflectien també en la seva activitat front els nivells de fosforilació d'aquest substrat.

La Figura 26 mostra l'expressió dels nivells tant de eIF2 β com de p-eIF2 β (Ser2) així com els de l'expressió de CK2 α i CK2 β de les línies renals HK-2 i 786-O silenciades. Tal com es pot observar, la disminució de la fosforilació de eIF2 β només apareix en les línies HK-2 shCK2 α i HK-2 shCK2 β (essent molt major en aquesta última). Pel què fa a les línies 786-O shCK2 α i 786-O shCK2 β no presenten

reducció en els nivells de fosforilació quan es comparen respecte als nivells totals de eIF2 β i també amb la seva respectiva línia control 786-O shCV.

El fet que s'observi encara fosforilació de la Ser2 en eIF2 β , en les línies HK-2 shCK2 β , vindria atribuïda que la poca expressió de CK2 β mostrada en aquesta línia (al voltant del 5-10%) estaria formant part del complex tetramèric de CK2, obtenint una quantitat d'holoenzim suficient per a continuar fosforilant part d'aquest substrat (30% de fosforilació). De la mateixa manera, el silenciament de CK2 α a la mateixa línia també causa una disminució de la fosforilació de eIF2 β , encara que en molt menor grau (60% de fosforilació) en part ocasionada per la davallada de CK2 β ja registrada en aquestes línies, com la davallada parcial de CK2 α , donant lloc a una major quantitat de holoenzim que en l'anterior cas.

El fet que tant les línies 786-O shCK2 α com 786-O shCK2 β no mostrin cap disminució en els nivells de p-eIF2 β podria venir explicat pel fet que en ambdós casos presenten valors superiors de holoenzim que en les equivalents línies HK-2. Així cal destacar que per una banda en 786-O shCK2 β tenim un silenciament molt menor que en HK-2 shCK2 β (30% de silenciament contra el 5-10% respectivament) i que la línia 786-O shCK2 α (a diferència de HK-2 shCK2 α) presenta nivells majors de CK2 α ' (Figura 25), que supliria la disminució de CK2 α de la línia.

D'aquesta manera, els resultats acabarien confirmant que en la línia HK-2 shCK2 β , hi hauria una major relació de CK2 α front CK2 β , que vindria reflexada amb un increment de la forma CK2 α lliure front la forma holoenzimàtica de CK2, la qual es veuria reduïda.

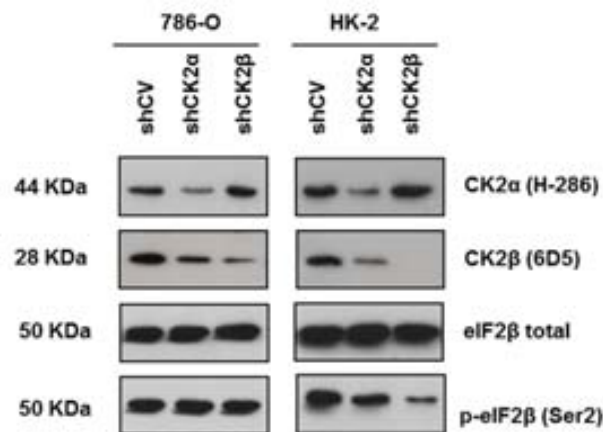


Figura 26: Efectes del silenciament de les subunitats CK2 α i CK2 β sobre la fosforilació de eIF2 β .
 Detecció immunològica per western blot de CK2 α (H-286), CK2 β (6D5), eIF2 β total i p-eIF2 β (Ser2) en les línies HK-2 i 786-O silenciades per CK2 α o CK2 β .

2.4. LOCALITZACIÓ SUBCEL·LULAR DE CK2 α EN LES LÍNIES HK-2 I 786-O SILENCIADES PER CK2

Tal com s'ha descrit en anteriors apartats, CK2 es caracteritza per ser una proteïna que presenta certa mobilitat intracel·lular. D'aquesta manera estudis previs havien mostrat canvis en les distribucions de CK2 en els diferents compartiments cel·lulars; canvis tant pel què fa a l'holoenzim en sí, com de les

subunitats que componen la proteïna, que es mobilitzen de forma independent front certs estímuls. De la mateixa manera, tant els canvis en la localització com en els nivells de les subunitats han estat descrits en diferents patologies destacant entre elles diferents tipus de tumors. Els canvis prèviament observats en els nivells de les subunitats així com en la localització en mostres de pacients de ccRCC, ens va portar a intentar veure si s'observaven també a la subunitat catalítica en les línies HK-2 i 786-O silenciades per ambdues subunitats.

A la Figura 27 es pot observar la immunolocalització de CK2 α (mostrada amb fluorescència verda) tant de les línies HK-2 com 786-O silenciades per les subunitats de CK2, mitjançant microscòpia confocal. Les línies han estat contratenyides amb Hoescht, mostrant la disposició nuclear (fluorescència blava).

Tal com s'observa a la Figura 27, les línies HK-2 silenciades per CK2 (columna esquerra, imatges A-C) es caracteritzen per presentar una major mida tant cel·lular com nuclear quan es comparen amb les línies equivalents de 786-O (columna dreta, imatges D-F). L'efecte del silenciament de les subunitats catalítiques i reguladores de CK2 en les dues línies és diferent pel què fa tant als canvis en els nivells com en la localització de la subunitat CK2 α . D'aquesta manera, HK-2 shCK2 α (B) mostra una reducció molt marcada en els nivells d'aquesta subunitat, quan es compara amb la HK-2 shCV (A). En canvi, a la línia 786-O shCK2 α (E), malgrat que hi ha disminució en els nivells de CK2 α quan es compara amb la seva respectiva línia control 786-O shCV (D), la disminució de senyal no és tan marcada com la observada en HK-2 shCK2 α . Aquest fet ve explicat pels majors nivells de CK2 α ' en aquesta última línia (tal com s'ha comentat anteriorment) i que seria també reconeguda pel mateix anticòs. La diferència en els nivells de les dues isoformes de CK2 també és observable entre les dues línies controls, en les que es veu una major intensitat de senyal en les línies 786-O shCV respecte HK-2 shCV (imatges D i A respectivament) causada de nou pel seu major nivell de CK2 α ', tal com s'ha descrit en els anteriors apartats.

Respecte al silenciament de la subunitat reguladora de CK2 en ambdues línies (HK-2 shCK2 β i 786-O shCK2 β) no sembla generar canvis detectables pel què fa als nivells de CK2 α , però sí que causa diferències pel què fa a la distribució intracel·lular d'aquesta subunitat en la línia HK-2 shCK2 β . D'aquesta manera es pot observar que la línia HK-2 shCK2 β (imatge C) presenta una localització majoritàriament nuclear, a diferència de HK-2 shCV (A) i shCK2 α (B) on és citosòlica, concordant de nou amb els resultats obtinguts dels TMAs, en el què s'observava una translocació de CK2 α cap al nucli en les mostres de ccRCC. Les línies 786-O shCK2 β en canvi, no semblen presentar variacions en les distribucions intracel·lulars d'aquesta subunitat, fet segurament explicable pel menor grau de silenciament de CK2 β que presenten.

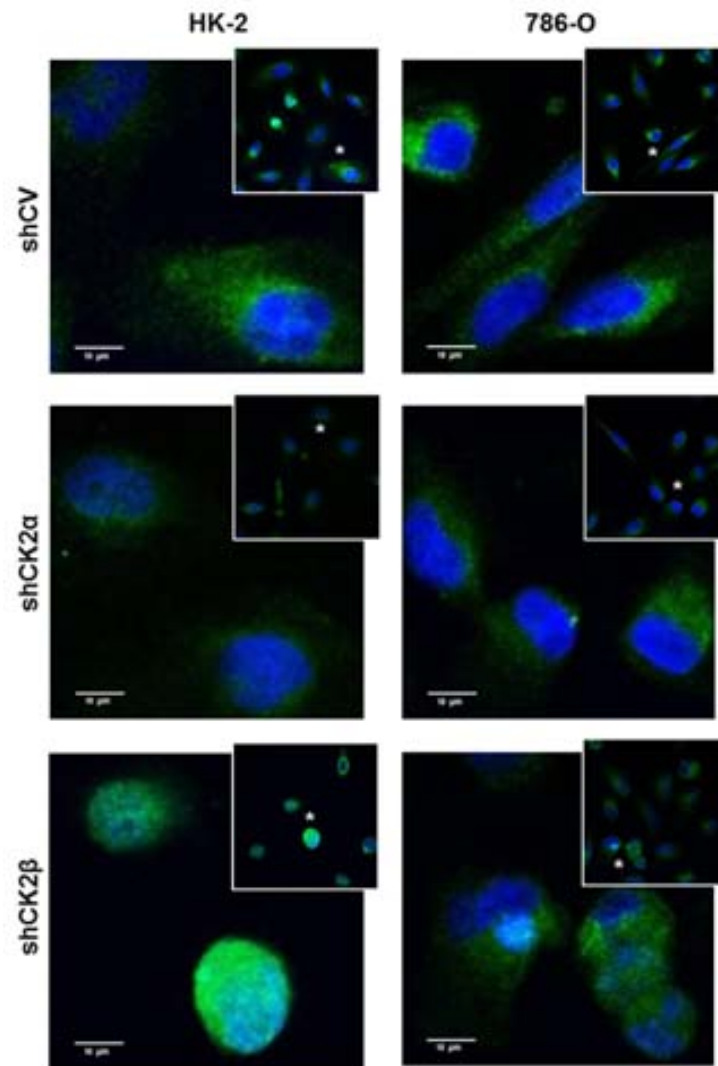


Figura 27: Localització subcel·lular de CK2 α en línies HK-2 i 786-O silenciades per les subunitats de CK2. Immunolocalització de CK2 α (verd) usant microscopia confocal en les línies HK-2 i 786-O silenciades en CK2 α i CK2 β . Els nuclis cel·lulars (blau) van ser tenyits amb Hoescht. Les imatges mostrades en cada línia (**quadres A-F**) corresponen a una regió ampliada del camp captat (mostrada amb un asterisc en el quadrat petit corresponen a cada imatge) (barra d'escala 10 μ m). Les línies HK-2 (**columna esquerra, imatges A-C**) es caracteritzen per presentar una major mida cel·lular i nuclear que les equivalents 786-O (**columna dreta, imatges D-F**) en tots els casos. HK-2 shCK2 α (**B**) mostren una reducció molt marcada de CK2 α en el citosol quan són comparades amb les línies control HK-2 shCV. 786-O shCK2 α (**E**) en canvi presenten una reducció molt menor dels nivells de la subunitat catalítica quan es compara amb l'equivalent HK-2 shCK2 α (**B**) ja que la línia presenta majors nivells de CK2 α tal com s'ha comentat anteriorment. Les diferències en els nivells de les isoformes catalítiques de CK2 es fa evident també en les línies HK-2 shCV i 786-O shCV (imatges **A** i **D** respectivament). El silenciament de la subunitat reguladora en la línia HK-2 shCK2 β afecta a la localització de la subunitat catalítica, passant majoritàriament al nucli i desapareixent del citoplasma (**C**) mentre que en la línia equivalent 786-O shCK2 β (**F**) no presenta cap canvi en la seva distribució cel·lular.

2.5. CARACTERITZACIÓ MORFOLÒGICA DE LES LÍNIES RENALS SILENCIADES

Un cop comprovat el silenciament de les diferents subunitats de CK2 en les línies renals, es va procedir a la seva caracterització morfològica mitjançant microscòpia òptica, la qual va permetre observar que el silenciament de les subunitats d'aquesta quinasa causava canvis morfològics importants en comparar-ho amb les corresponents línies control.

Totes les línies es van sembrar al 50% de confluència, per tal que al cap de 24h es realitzessin fotografies dels diferents camps, evitant que assolissin una confluència massa elevada que dificultés la observació de la seva morfologia. La Figura 28 mostra imatges representatives de cadascuna de les línies cel·lulars captades amb microscopi de camp clar. A continuació es detallen les característiques observades per a cadascuna d'elles.

Tal com mostra la imatge A1, la línia 786-O shCV es caracteritza per presentar una morfologia més aviat fusiforme, amb la presència ocasional d'alguns fil·lopodis (*f*) de longitud molt curta (marcats en la secció ampliada). Aquests fil·lopodis tendeixen a observar-se en casos de baixa confluència, quan intenten establir contactes entre cèl·lules. A mesura que les cèl·lules assoleixen la confluència, es compacten entre sí, reduint el citoplasma (*l*) més aviat lax present en les cèl·lules individualitzades (2). La línia es caracteritza també per presentar un nucli (*n*) de mida gran respecte al volum citoplasmàtic existent (3).

El silenciament de CK2 α a la línia cel·lular 786-O shCK2 α , mostrada a la imatge A2, fa que aquesta presenti una morfologia ja més aberrant, encara que predominen les formes cel·lulars fusiformes (*l*). Es caracteritza també per presentar un increment en el nombre de fil·lopodis (*f*), així com que no assoleixen ni el grau d'organització ni la compactació present a l'anterior línia 786-O shCV quan adquireixen la confluència. Pel què fa a la seva morfologia nuclear continua mantenint la presència de nuclis voluminosos (*n*) respecte al seu volum citoplasmàtic (*c*), tal com passava amb la seva línia control (2).

La característica més evident de la línia 786-O shCK2 β , mostrada a la imatge A3, és el seu augment de mida (*l*). Tant el nucli (*n*) com el citoplasma (*c*) d'aquestes pateixen un augment, però la relació de volum nucli:citoplasma disminueix degut al major augment del citoplasma (2). Aquest augment de la mida cel·lular ocasionat tant en el nucli com el citoplasma és observable també en tumors que presenten un grau de Führman elevat, tal com es mostrava a la Figura 21. La línia també adquireix canvis variables en les seves morfologies presentant formes amorfes, fusiformes així com també lanceolades. A diferència de les altres dues línies quan assoleixen la confluència, el contacte entre cèl·lules no és total, al mantenir-se uns espais entre elles en les que no mostren contactes (3).

També cal esmentar que mai arriben a donar "estructures tissulars" organitzades (observades en les línies 786-O shCV). Igual que les línies 786-O shCK2 α , presenten una alta abundància de fil·lopodis (*f*), donant lloc a unes cèl·lules amb unes estructures altament ramificades (4). A més a més, en assolir la confluència són més visibles les superposicions cel·lulars i l'aparició de nombroses vesícules (*v*) a les zones perinuclears.

La imatge B1 correspon a la línia cel·lular HK-2 shCV, que es diferencia de la 786-O shCV per presentar una mida més gran així com un nucli major (*n*) amb un citoplasma (*c*) molt més voluminos (*l*). En certes

ocasions pot presentar fil·lopodis (*f*), que es caracteritzen també per ser de longitud molt més curta així com més prims. Són cèl·lules que presenten una morfologia lanceolada o fusiforme (2), tendint a buscar contactes entre les cèl·lules. Quan contacten i assoleixen la densitat pròxima a la confluència, a diferència de les 786-O shCV, no mostren cap tipus de compactació, malgrat que no es generen espais buits intercel·lulars (3) (cosa que sí passava a la línia 786-O shCK2 β).

Les línies cel·lulars HK-2 silenciades per la subunitat catalítica, HK-2 shCK2 α , presenten com a principal característica la pèrdua de forma, adquirint una morfologia amorfa (1) enlloc de la més típicament fusiforme, tal com es mostra a la imatge B1. Cal destacar també que la línia redueix el seu volum (2), causat principalment per la reducció del citoplasma, encara que també apareix una reducció en la mida dels nuclis (*n*) així com el seu desplaçament cap a regions més perifèriques de la cèl·lula. Cal mencionar que aquesta línia és la que s'observa un major increment en el nombre de fil·lopodis (*f*) i els contactes entre cèl·lules ocasionats per aquests. En assolir un creixement que s'aproxima a la confluència, s'observa la presència d'espais entre les cèl·lules, a causa de les nombroses prolongacions cel·lulars (3).

Les aparicions de grànuls (*v*) en aquesta línia també són evidents així com que també cal destacar que existeix un elevat nombre de cèl·lules que presenten morfologies amb nombroses prolongacions com 786-O shCK2 β abans esmentades (4).

La línia HK-2 shCK2 β mostrada a la imatge B3, a diferència de les HK-2 shCK2 α , pateixen un augment de la seva mida (1) (tal com passava amb les 786-O shCK2 β) superant la mida de les HK-2 shCV. Igual com passava amb la línia equivalent 786-O, la línia presenta nombrosos grànuls (*v*) al voltant dels nuclis (*n*). La seva forma tendeix a ser de nou fusiforme, amb nuclis poc definits i més aviat allargats (2) (a diferència d'altres casos). La seva morfologia també pot ser amorfa, apareixent també fil·lopodis (*f*), però mai assolint el nombre dels presents en HK2 shCK2 α .

En assolir la confluència, no sembla que presentin compactació, però sí que redueixen la superfície existent entre línies i adquireixen una estructura més desorganitzada.

D'aquesta manera es pot observar que el silenciament de les subunits de CK2 ocasionen canvis en la morfologia de les línies, algun dels quals (HK-2 shCK2 α) recorden als mostrats en graus de Führman avançats del ccRCC, així com canvis morfològics basats en la pèrdua d'estructures i unions intercel·lulars, elements indicadors de comportaments cel·lulars més proliferatius i invasius.

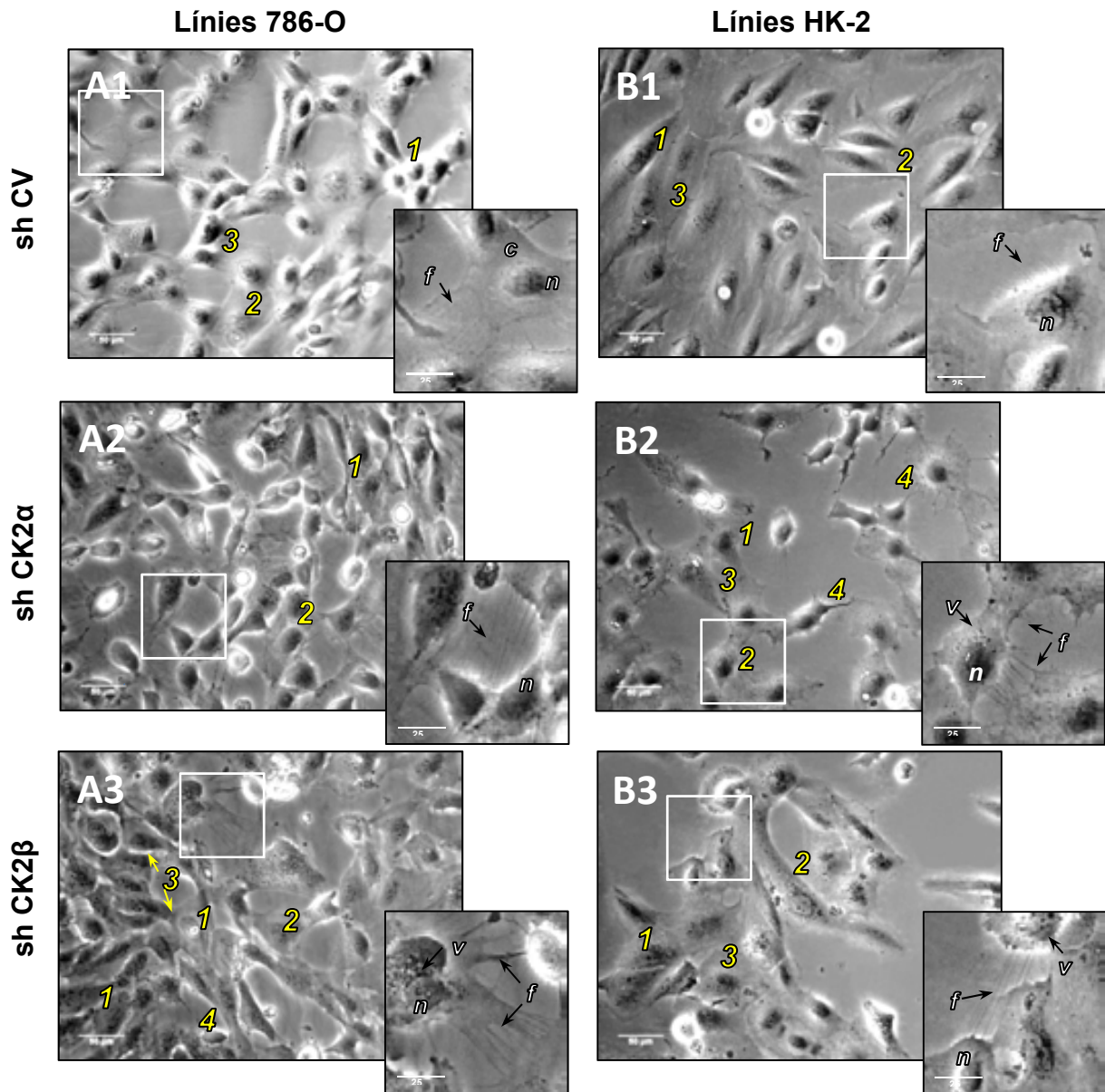


Figura 28: Morfologia línies 786-O/HK-2 silenciades per diferents subunitats de CK2.

Línies 786-O i HK-2 silenciades per la subunitat catalítica CK2 α [sh CK2 α] (A2 i B2) i la reguladora CK2 β [sh CK2 β] (A3 i B3), així com les control [sh CV] (A1 i B1). Les imatges van ser captades amb un augment de 20X, mostrant per cada cas una regió ampliada per una millor observació de l'estructura.

Nucli (n), citoplasma (c), grànuls i vesícules (v), fil·lopodis (f)

2.6. TAXES DE PROLIFERACIÓ CEL·LULAR DE LES LÍNIES RENALS SILENCIADES

Una de les principals característiques que presenten les cèl·lules neoplàsiques és la seva taxa de divisió cel·lular, que es troba tant incrementada com desregulada en aquest procés patològic [117]. Estudis realitzats per altres grups havien mostrat que diferents tipus de tumors humans presentaven alteracions tant en les activitats CK2 com també en els nivells d'alguna de les seves subunitats [96].

Davant del fet que havíem observat canvis tant en els nivells, com en la localització de les diferents subunitats de CK2 en mostres de pacients afectats per ccRCC, es va decidir veure si l'alteració dels

nivells de les subunitats catalítiques i reguladores de CK2 en les línies renals silenciades tenien algun tipus d'efecte sobre la seva taxa de divisió cel·lular.

Les corbes de creixement de les línies renals HK-2 i 786-O control o silenciades per CK2 α o CK2 β es van portar a terme mitjançant tres tècniques diferents: recompte cel·lular en suspensió, recompte en placa i assaigs de proliferació mitjançant MTT. Els tres mètodes van donar resultats similars, no obstant això en aquest treball s'han usat els valors de creixement obtinguts mitjançant el mètode del MTT, per la seva major precisió i repetibilitat (tal com es detalla a l'apartat de materials i mètodes).

Tal com mostra la Figura 29, la taxa de proliferació entre les dues línies cel·lulars: HK-2 (Figura 29.A) i 786-O (Figura 29.B) és clarament diferent, observant-se en tots els casos un menor creixement en les línies HK-2 quan es comparen amb les respectives línies 786-O, fet que es podria explicar en l'origen tumoral d'aquesta última caracteritzada també per presentar majors nivells de CK2 α '. D'aquesta manera, diferents estudis havien trobat elevades expressions de CK2 α ' en diferents tumors metastàtics [140] o del paper d'aquesta isoforma catalítica en la viabilitat de línies tumorals humanes [98]

Un anàlisi més exhaustiu de les línies HK-2 (Figura 29.A), mostra que les línies cel·lulars silenciades per la subunitat catalítica CK2 α (HK-2 shCK2 α) caracteritzades per presentar una major proporció de CK2 α ' que les línies control (HK-2 shCV), incrementen considerablement la seva taxa de proliferació quan es comparen tant amb aquestes últimes com en les línies silenciades per CK2 β (HK-2 shCK2 β). L'anàlisi estadístic mitjançant una distribució T-Student mostra que les diferències en la velocitat de proliferació de HK-2 shCK2 α són significatives a partir del segon dia post-sembrat quan es compara amb la línia control HK-2 shCV, moment en el qual les diferències del creixement són més detectables. Per contra la línia HK-2 shCK2 β , no mostra diferències significatives pel que fa a la proliferació quan són comparades amb la mateixa línia control, mantenint temps de duplicació d'aproximadament 96 h.

Les línies 786-O (Figura 29.B) presenten ja per sí una major taxa de divisió cel·lular, però cal destacar el fet que el silenciament de les mateixes subunitats en aquestes línies no generen el mateix tipus de canvi proliferatiu observat en HK-2. D'aquesta manera tant les línies 786-O shCK2 α com les 786-O shCK2 β presenten un creixement alentit quan es comparen amb les 786-O shCV, mostrant diferències significatives pel que fa al seu creixement a partir del tercer dia, essent les línies 786-O shCK2 β les que tenen un menor creixement, presentant també una menor expressió de CK2 α ' respecte les altres dues línies. L'explicació per la qual les diferències es detectin al tercer dia en aquestes cèl·lules serien degudes a que les velocitats de creixement són més semblants entre les tres línies.

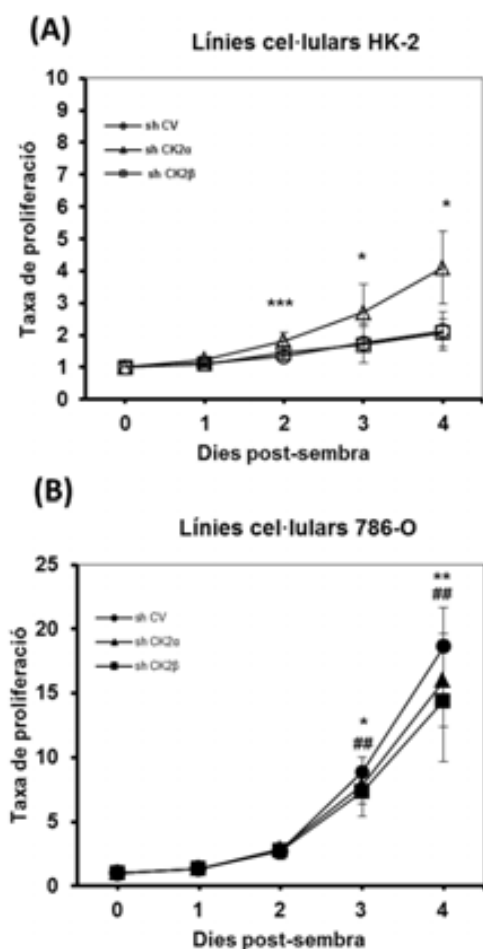


Figura 29: Assaig de proliferació per MTT en les línies cel·lulars HK-2 i 786-O silenciades per les subunitats de CK2.

(A) Les línies HK-2 shCK2α presenten un increment en la velocitat de creixement quan es comparen amb les línies control HK-2 shCV. Les diferències en les velocitats de proliferació són significatives a partir del dia 2 (***) i als dies 3 i 4 següents a la sembra (*). Les línies HK-2 shCK2β, no mostren diferències significatives pel que fa a la seva taxa de proliferació quan són comparades amb la mateixa línia control.

(B) Tant les línies 786-O shCK2α com 786-O shCK2β tenen una menor taxa de divisió quan són comparades amb les línies control 786-O shCV, essent la línia silenciada per CK2β la que presenta un creixement més lent. Les diferències en les velocitats de creixement han mostrat ser significatives en les 786-O shCK2α a partir del dia 3 (*) i 4 (**), mentre que en 786-O shCK2β les diferències ho són també als dies 3 (##) i 4 (##) post-sembrats.

Les dades han estat analitzades mitjançant una distribució T-Student de 2 cues usant el programa estadístic GraphPad Prism. Els intervals de confiança usats (CI) han estat del 99,9%, 99% i 95% dependent dels casos.

(***)(###), (**)(##), (*)(#) diferències significatives a 99,9%, 99% i 95% de IC respectivament.

Cal notar que les escales entre **(A)** i **(B)** són diferents per una millor interpretació.

La Figura 30 permet veure millor el creixement diferencial de les línies interferides per les subunitats de CK2, així com la comparació dels efectes dels diferents silenciaments entre sí dins d'una mateixa línia: HK-2 (Figura 30.A) o 786-O (Figura 30.B). Per tal de poder comparar totes les línies entre elles, l'anàlisi estadístic s'ha portat a terme amb una ANOVA de una via usant l'algoritme de correcció de Bonferroni. L'anàlisi estadístic de la línia HK-2 (Figura 30.A) continua indicant que la línia HK-2 shCK2α mostra diferències significatives pel que fa a la proliferació quan es compara amb HK-2 shCV, però també quan es compara amb HK-2 shCK2β. Per contra el silenciament de CK2β en aquesta última línia no presenta canvis en la proliferació quan es compara amb la control, concordant amb l'anterior anàlisi estadístic. Pel que fa a les línies 786-O (Figura 30.B) tant 786-O shCK2α com 786-O shCK2β mostren un alentiment significatiu pel que fa a la seva divisió quan es comparen amb les 786-O shCV. Malgrat que 786-O shCK2β presenta una menor taxa de creixement quan es compara amb 786-O shCK2α, l'estudi estadístic indica que és només una tendència i que les diferències observades entre sí no són significatives.

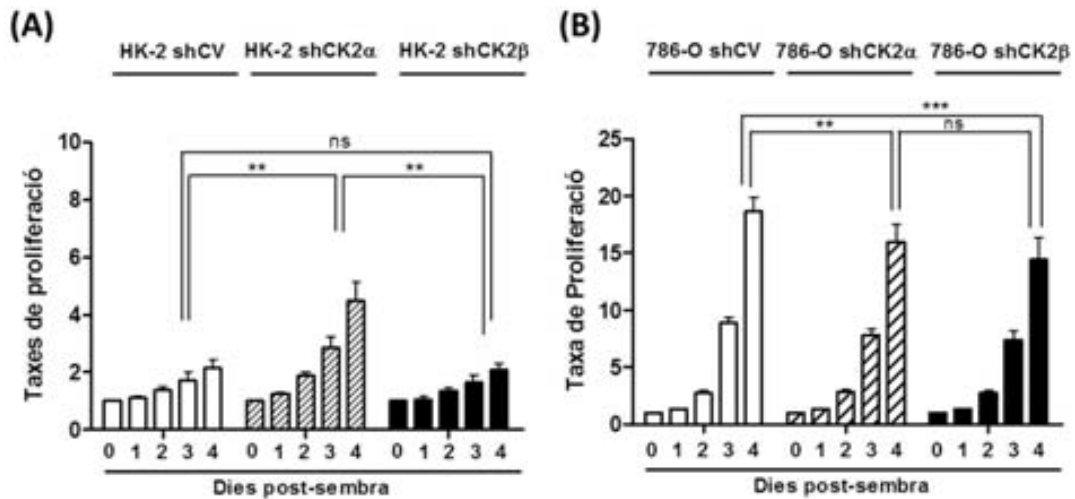


Figura 30: Corbes de creixement de les línies HK-2 i 786-O silenciades per les subunitats de CK2.

Anàlisi de les corbes de creixement per MTT de les línies HK-2 **(A)** i 786-O **(B)** silenciades per les diferents subunitats de CK2

(A) HK-2 shCK2 α presenta un increment significatiu (**) en la taxa de proliferació cel·lular quan és comparada amb HK-2 shCK2 β i HK-2 shCV. HK-2 shCK2 β no mostra diferències significatives pel que fa a la proliferació quan és comparada amb la respectiva línia control (*ns*)

(B) Tant 786-O shCK2 α (**) com 786-O shCK2 β (***) mostren una menor proliferació quan es comparen amb les respectives línies control 786-O shCV. Per contra no es veuen diferències significatives en proliferació quan es comparen 786-O shCK2 α amb 786-O shCK2 β (*ns*).

Tots els estudis estadístics es van realitzar usant el 4rt dia post-seembra, mitjançant una ANOVA de una sola via i l'algoritme de correcció de Bonferroni amb el programa GraphPad Prism. Els intervals de confiança usats van ser del 99,9% ($p < 0,0001$) i del 99% ($p < 0,001$) depenent dels casos.

(***),(**) diferències significatives a 99,9% i 99% de IC respectivament; (*ns*), sense diferències significatives.

Cal notar que les escales entre **(A)** i **(B)** són diferents per una millor interpretació.

El motiu pel qual el silenciament d'una determinada subunitat tingui diferents efectes en la taxa de proliferació de 786-O i HK-2 podria venir explicat de nou per les relacions entre subunitat catalítiques i reguladores resultants. Així, les línies HK-2 shCK2 α (caracteritzades per l'augment de la proliferació) presentarien baixos nivells de CK2 α , probablement formant part de l'holoenzím. A diferència de les anteriors, les HK-2 shCK2 β tindrien molt poc holoenzím i una important quantitat de CK2 α lliure.

En les línies 786-O, al presentar majors nivells de CK2 α i un menor silenciament de la subunitat reguladora, no és tan pronunciat el desequilibri de relacions entre ambdues subunitats i la quantitat de holoenzím format en cada cas. Aquest fet explicaria també perquè en les línies 786-O, les diferències existents en la proliferació en funció de la subunitat de CK2 silenciada són menys evidents que en HK-2.

2.7. MIGRACIÓ CEL·LULAR EN LÍNIES RENALS SILENCIADES: ASSAIG DE *WOUND HEALING*

Les cèl·lules tumorals es caracteritzen per presentar una major capacitat migratòria, fet que es correlaciona moltes vegades amb la seva potencialitat metastàtica. Davant del fet que els estudis de

creixement mostraven canvis importants pel què fa a la taxa de proliferació d'alguna de les línies, es va voler veure si també es produïen canvis en les seves propietats migratòries.

Tal com es pot observar a la Figura 31.A, les línies HK-2 silenciades per les subunitats de CK2 mostren velocitats de migració clarament diferenciades, avaluables pel mètode anomenat *wound healing* o de tancament de la ferida. D'aquesta manera podem observar que 9 hores després d'haver realitzat la ferida, tant les línies silenciades per CK2 α com per CK2 β (HK-2 shCK2 α i HK-2 shCK2 β respectivament) presenten un major grau de tancament. Aquest fet és remarcable a les 18 hores, en el qual es pot observar que la línia HK-2 shCK2 β ja ha tancat la ferida, mentre que la línia HK-2 shCK2 α està apunt de fer-ho (presentant zones de contactes i d'espais entre fronts). Pel què fa a la línia control HK-2 shCV encara no ha aconseguit que els dos fronts entressin en contacte.

Per tal d'obtenir una millor avaluació de la capacitat migratòria de les línies es va decidir calcular la velocitat de migració de cadascuna d'elles. Aquest càlcul es va fer independentment per a cada línia, a partir del quocient entre la distància recorreguda per les cèl·lules i el temps transcorregut fins al tancament de la ferida, tal com s'ha descrit a l'apartat de materials i mètodes.

Les diferents velocitats de migració de les línies s'han representat a la Figura 31.B i l'anàlisi estadístic mitjançant una ANOVA de una via ha confirmat que existeixen diferències significatives pel què fa a la seva taxa de migració. Així es pot observar que la línia control HK-2 shCV té una menor migració que les línies HK-2 shCK2 α i les HK-2 shCK2 β , essent aquestes últimes les que tenen una major mobilitat. Aquests resultats coincideixen (en part) amb els resultats obtinguts recentment per un altre grup, en el què el silenciament de CK2 β causava un augment de la capacitat migratòria de les línies [139] i a la vegada mostren que aquest efecte també s'observa amb el silenciament de CK2 α .

Pel què fa a les línies 786-O silenciades per les subunitats de CK2, mostrades a la Figura 32.A, també presenten velocitats de migració diferenciades entre elles, essent en tots els casos més ràpids que en HK-2. Així, la línia control 786-O shCV mostra una velocitat de tancament de la ferida inferior a les línies silenciades per les subunitats catalítiques o reguladores de CK2, fet que ja s'evidencia a les 5 hores després d'haver realitzat la ferida. A les 10 hores, els dos fronts de la línia 786-O shCK2 β han aconseguit contactar en molts punts, tancant la totalitat de la ferida. Malgrat que la línia 786-O shCK2 α ha mostrat a les 10 hores una major migració que la línia control 786-O shCV, encara no ha aconseguit tancar el tall, presentant d'aquesta manera una menor taxa de migració que la línia 786-O shCK2 β .

Les velocitats de desplaçament per les línies 786-O es representen a la Figura 32.B, on es pot veure clarament que totes les línies 786-O presenten una major mobilitat respecte a les seves equivalents HK-2 (Figura 31.B). L'estudi estadístic realitzat sobre les velocitats de migració de les línies 786-O mostren que les línies 786-O shCK2 β migren significativament més ràpid que les control 786-O shCV.

Igual que en el cas de HK-2, les línies silenciades per la subunitat reguladora tenen una major velocitat de migració que les silenciades per la subunitat catalítica. No obstant això, les diferències observades en la

mobilitat de les 786-O shCK2 α respecte a la línia 786-O shCV no són estadísticament significatives entre sí.

D'aquesta manera s'observa que els efectes sobre els nivells i equilibris entre subunitats de CK2, apart d'afectar a la proliferació, afecten també sobre la migració cel·lular, donant lloc a que les línies silenciades per CK2 β tinguin una major migració. Aquest fet de nou coincidiria també en tumors, en el què els estadiatges avançats (pT4) presenten una major capacitat invasiva i els estadis primerencs i entremitjos (pT1-pT2) l'incrementen en menor grau, considerant-se les línies shCK2 β com un model cel·lular d'estadiatge avançat i les shCK2 α com a estadiatges primerencs.

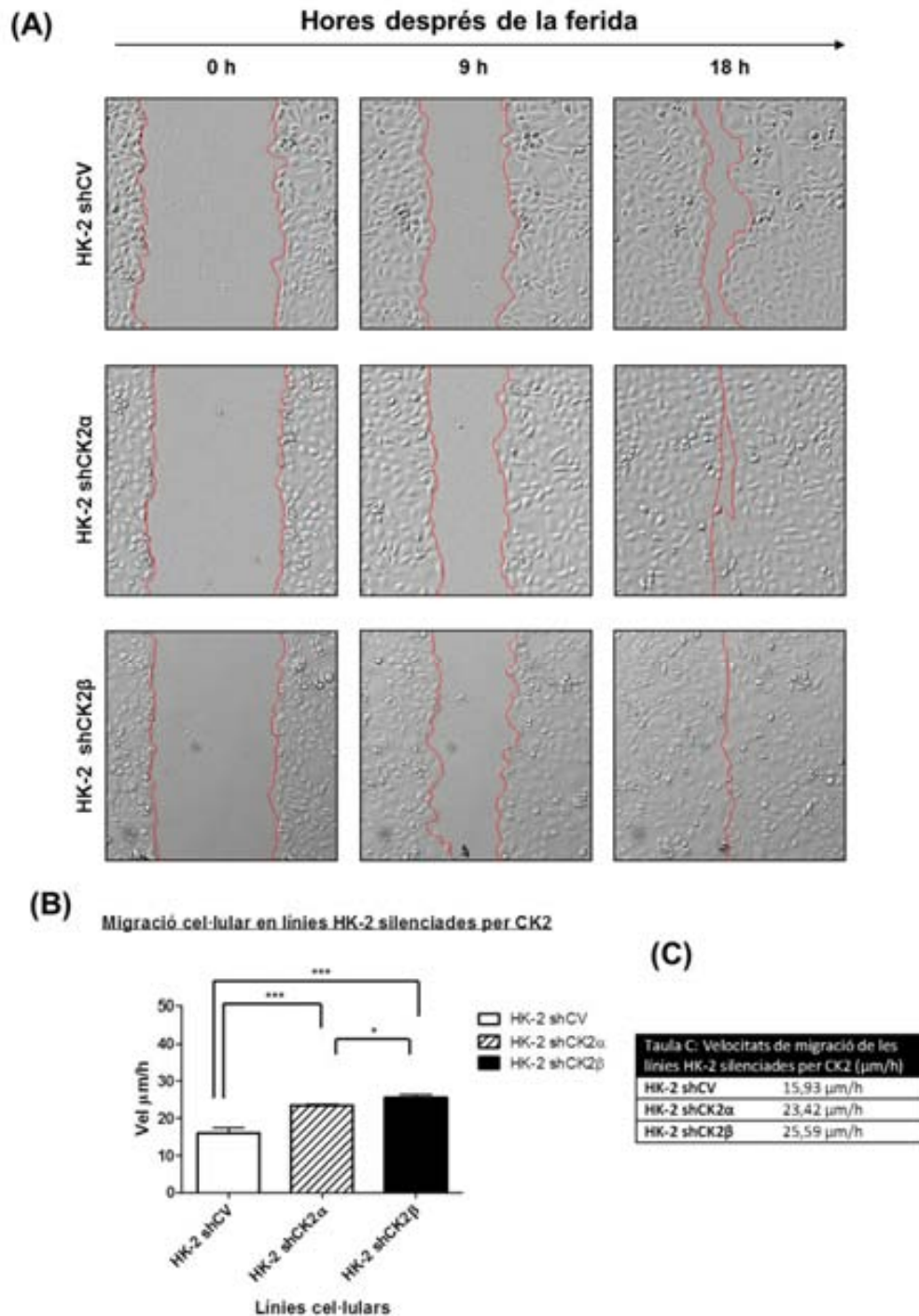


Figura 31: Taxes de migració cel·lular de les línies cel·lulars HK-2 silenciades per CK2α o CK2β en un assaig de Wound healing .

(A) Assaig de *Wound healing* en línies cel·lulars HK-2 silenciades per CK2α o CK2β. Les imatges van ser agafades amb intervals de 30 minuts durant 24h després d'haver realitzat la ferida. La figura mostra les imatges preses als 0 minuts, 9 h i 18 h després d'haver realitzat la ferida.

(B) Tant les línies HK-2 shCK2α com HK-2 shCK2β mostren un increment en la seva taxa de migració quan es comparen amb la respectiva línia control HK-2 shCV (***) (0,001%<P) però només mostren canvis migratoris significatius quan es comparen entre elles a menors intervals de confiança (IC 95%) (*). Tots els resultats van ser analitzats mitjançant una ANOVA de una via usant la correcció de Bonferroni (amb IC del 99,9%, 99% i del 95%).

(C) Velocitat mitjana de la migració de les línies HK-2 silenciades (calculada en $\mu\text{m/h}$)

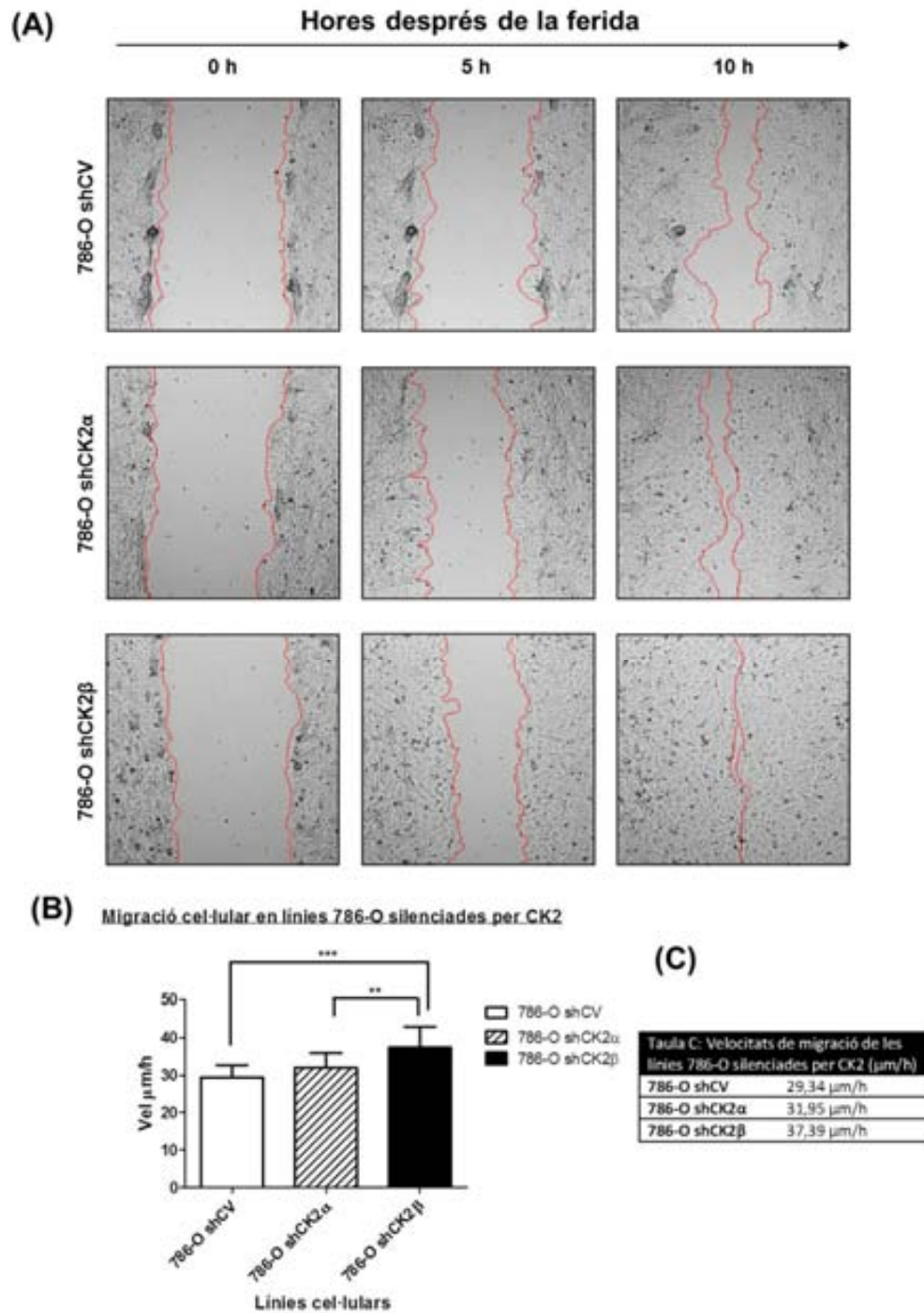


Figura 32: Taxes de migració cel·lular de les línies cel·lulars 786-O silenciades per CK2 α o CK2 β en un assaig de Wound healing .

(A) Assaig de Wound healing en línies cel·lulars 786-O silenciades per CK2 α o CK2 β . Les imatges van ser agafades amb intervals de 30 minuts durant 24h després d'haver realitzat la ferida. La figura mostra les imatges preses als 0 minuts, 5 h i 10 h després d'haver realitzat la ferida.

(B) 786-O shCK2 β mostra una major taxa de migració quan es compara amb la línia 786-O shCV (***) (0,001%<P). Les línies 786-O shCK2 α i 786-O shCK2 β tenen diferències significatives pel que fa a la migració quan es comparen entre sí (**)(0,01%<P). No s'observen diferències shCK2 α pel que fa a la taxa de migració entre les línies 786-O shCK2 α i el control 786-O shCV a cap interval de confiança usant una ANOVA amb la correcció de Bonferroni.

Tots els resultats van ser analitzats mitjançant una ANOVA de una via usant la correcció de Bonferroni (amb IC del 99,9%, 99% i del 95%).

(C) Velocitat mitjana de la migració de les línies 786-O silenciades (calculada en $\mu\text{m/h}$)

2.8. TRAJECTÒRES DE LES MIGRACIONS CEL·LULARS

Apart dels canvis mostrats en les velocitats de migració entre línies, també s'observa que aquestes poden presentar unes trajectòries de migració clarament diferenciades. A la Figura 33.A hi ha el seguiment de les trajectòries cel·lulars al llarg del temps (*cell tracking*) de 6 cèl·lules concretes de cadascuna de les línies cel·lulars renals silenciades per CK2 fins al moment de finalització de l'enregistrament de les imatges (23 hores per les línies HK-2 i 24 hores per les 786-O). Els patrons de migració de dues cèl·lules representatives de cadascuna de les línies és presentat a la Figura 33.B, on es mostra el desplaçament en píxels respecte als eixos de coordenades, així com el punt de contacte entre les cèl·lules dels dos fronts.

Quan s'analitzen les trajectòries de migració de totes les línies cel·lulars (Figura 33.A i Figura 33.B) s'observa que en la majoria del casos segueixen una trajectòria lineal, transversal al tall inicial realitzat sobre les plaques. Les diferències entre línies en les trajectòries de migració es fan només evidents en el moment del contacte entre els fronts.

D'aquesta manera, les dues línies de referència, considerades com a controls (HK-2 shCV i 786-O shCV) mostren diferències en aquest aspecte quan es comparen entre elles. Així mentre que les HK-2 shCV en el moment que contacten els fronts les cèl·lules mantenen la seva posició, variant poc les seves disposicions respecte als eixos de coordenades, les 786-O shCV tenen la propietat de poder penetrar entre les cèl·lules del front oposat, variant la seva posició tant en l'eix de les ordenades com el de les abscisses.

La línia HK-2 shCK2 α , es diferencia de les HK-2 shCV per presentar certa capacitat de infiltrar-se entre les cèl·lules del front contrari, encara que no tan pronunciada com en el cas de 786-O shCV, adquirint unes trajectòries ja més aberrants, en les que varien les coordenades que ocupen respecte als dos eixos. El silenciament en la subunitat reguladora de CK2 per aquesta mateixa línia, HK-2 shCK2 β , causa que aquestes incrementin la seva capacitat de penetrar entre les cèl·lules veïnes, mostrant un major recorregut que ve acompanyat d'uniques trajectòries encara més aberrants que les HK-2 shCK2 α .

Les línies 786-O shCK2 α , quan es comparen amb la seva corresponent línia control 786-O shCV, no semblen mostrar canvis pel que fa a la capacitat d'infiltrar-se entre les cèl·lules del front contrari (fet que sí que s'observa en les HK-2 shCK2 α). Malgrat tot cal destacar 786-O shCK2 α presenta una trajectòria molt menys lineal i molt més aberrant que la línia control 786-O shCV, tendint a generar trajectòries de desplaçament circular mentre s'infiltra al front contrari. Les 786-O shCK2 β , són de totes les línies, les que presenten un major recorregut, caracteritzat per una important capacitat de infiltrar-se entre les cèl·lules del front contrari, al torn que presenten un important desplaçament de les seves posicions inicials respecte a l'eix de les Y.

Aquests canvis de direccions de desplaçament cel·lular en el moment de donar-se un contacte entre els dos fronts és el que ja s'ha descrit a l'apartat de introducció com a CIL, un fenomen característic de les línies mesenquimàtiques i invasives.

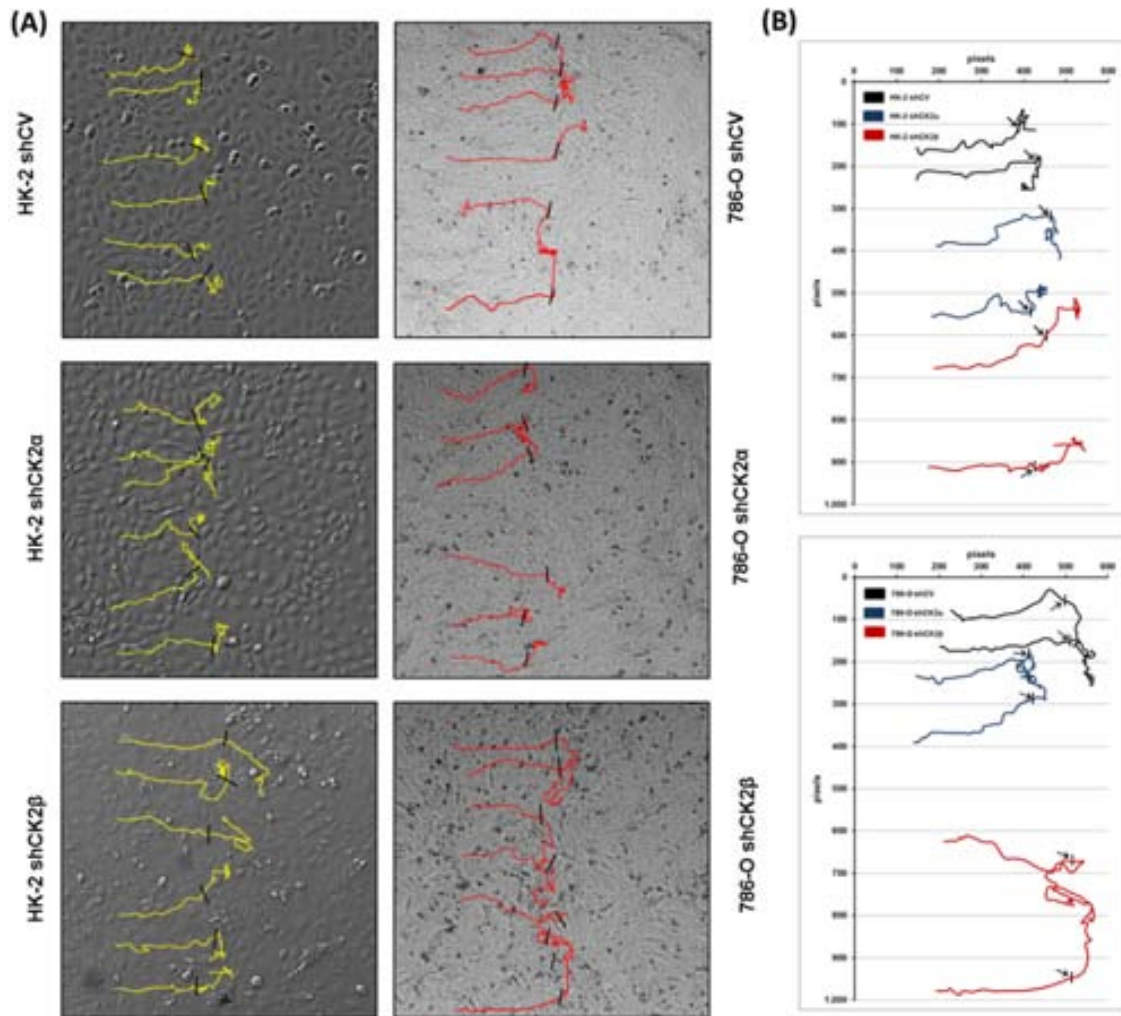


Figura 33: Patró de migració de les línies HK-2 i 786-O silenciades per les subunitats de CK2

(A) Anàlisi del patró de migració de cèl·lules individuals de les línies HK-2 (columna esquerra) i 786-O (columna dreta) shCV, shCK2α i shCK2β. Per a cada línia es va traçar el moviment de 6 cèl·lules originàries del marge de la ferida, captant la seva posició en cadascun dels fotogrames. Els fotogrames es van prendre en intervals de 30 minuts i el moviment de la línia es va representar sobre la imatge de les cèl·lules a l'últim fotograma. Les línies negres indiquen el punt de contacte entre fronts.

(B) Representació del perfil de migració sobre eixos X i Y d'un parell de cèl·lules representatives per a cadascuna de les 6 línies (separant HK-2 i 786-O en dos grups diferenciats). Les fletxes indiquen el moment de contacte entre fronts. Les coordenades de l'eix estan mesurades en píxels.

Aquest fet confirmaria que el silenciament de les subunitats causa canvis no només en les velocitats de migració de les cèl·lules, sinó també en el seu comportament, mostrant que les línies amb una major migració (i que són les que presenten una reducció de l'expressió de CK2β) tenen major capacitat de penetrar entre cèl·lules veïnes, a causa de les dèbils unions intercel·lulars que presenten i que ja han estat observades en l'apartat de morfologies cel·lulars. Aquesta propietat segueix la tendència observada en les mostres tumorals, en les què tumors d'un estadiatge elevat, presenten una major invasivitat en teixits perifèrics adjacents o llunyans.

2.9. CREIXEMENT INDEPENDENT D'ANCORATGE EN LÍNIES RENALS SILENCIADES: CREIXEMENT DE COLÒNIES EN SOFT AGAR

Una de les propietats de les cèl·lules canceroses és la seva invasivitat, que moltes vegades ha d'anar acompanyada amb la capacitat de supervivència en suspensió o creixement independent d'ancoratge per tal de que es doni la incursió a teixits adjacents o llunyans. Per analitzar la capacitat de proliferació de les línies en situacions de baixa adherència es realitza l'assaig del creixement de colònies en agar tou (*soft agar*).

Tal com s'ha descrit anteriorment a l'apartat de línies cel·lulars, en condicions normals HK-2 és incapaç de créixer en agar tou, ja que necessita un suport totalment sòlid per al seu creixement. Aquesta característica es continua mantenint a la línia control HK-2 shCV, en la qual podem veure que ha estat incapaç d'originar colònies després de 22 dies de creixement (Figura 34.A). El silenciament de les subunitats de CK2 mostrat en les línies HK-2 shCK2 α i HK-2 shCK2 β causa que aquestes adquireixin la capacitat de poder créixer independentment de l'ancoratge, una propietat usual en les línies amb característiques invasives. Malgrat que tant HK-2 shCK2 α com HK-2 shCK2 β mostren diferències significatives per la formació de colònies quan es comparen amb les HK-2 shCV, aquestes dues línies no mostren diferències importants en nombre de colònies quan es comparen entre sí (Figura 34.C). No obstant això si que s'observen diferències pel què fa a la seva mida, essent colònies de major mida en les HK-2 shCK2 α , fet que es correlacionaria amb la seva major taxa de divisió cel·lular ja anteriorment comentada.

Ja s'havia descrit que les línies 786-O, a diferència de les HK-2, podien créixer en condicions normals en suports com l'agar, com es veu a la línia control 786-O shCV, en la que s'observa l'elevat nombre de colònies obtingudes després de 22 dies de creixement (Figura 34.A i C). Tant les línies 786-O shCK2 α com 786-O shCK2 β continuen mantenint la capacitat de formar colònies en l'agar, no obstant això el seu comportament és diferent entre sí, a diferència de l'observat en HK-2.

D'aquesta manera, mentre que 786-O shCK2 α manté una tendència a augmentar lleument la seva capacitat de formació de colònies (encara que no sigui significativa) respecte 786-O shCV, la línia 786-O shCK2 β , sorprenentment mostra una reducció considerable en la formació de colònies quan es compara tant amb la línia control com amb la silenciada en CK2 α (Figura 34.C).

Cal esmentar també que la capacitat de formació de colònies de les línies HK-2 silenciades per les subunitats de CK2 mai assoleix els valors observats en les 786-O (Figura 34.C)

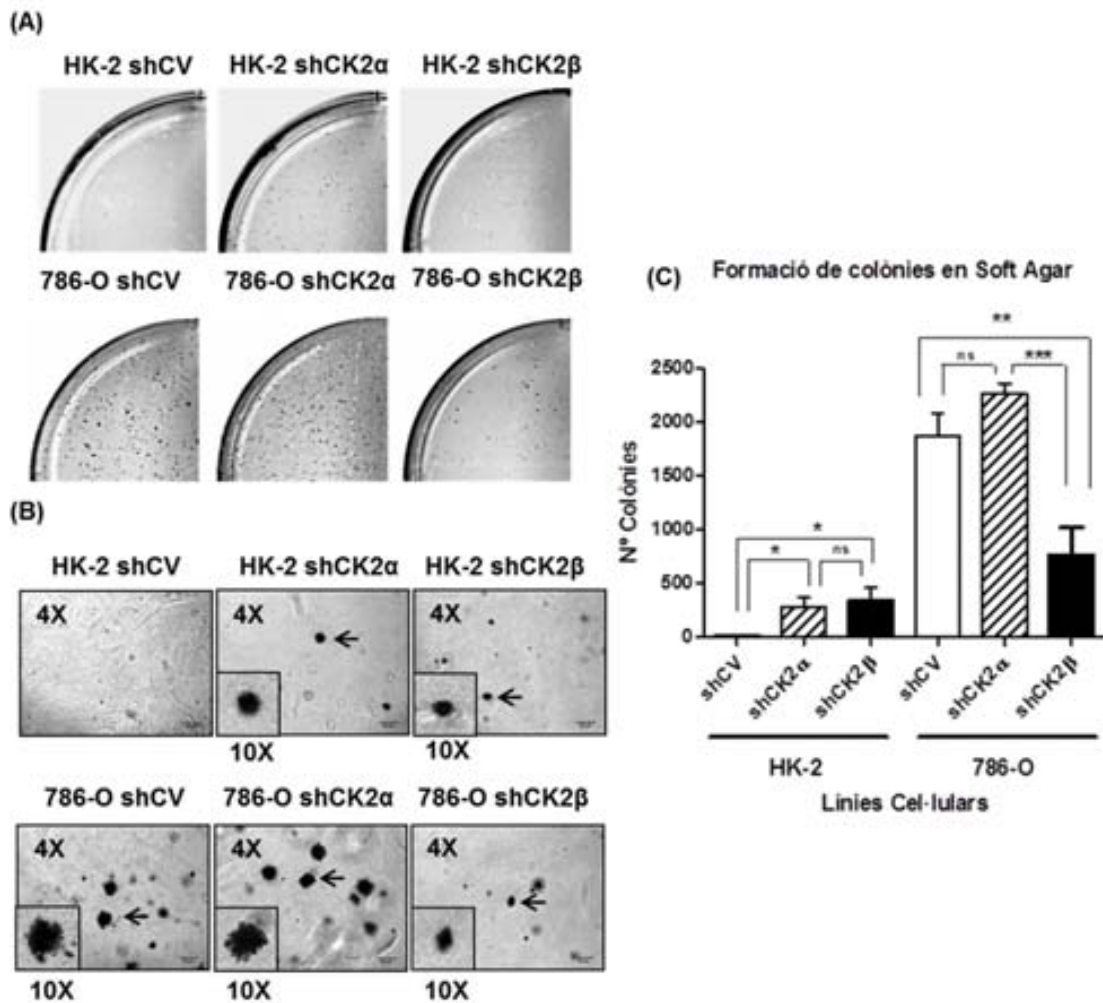


Figura 34: Formació de colònies en agar tou: capacitat de creixement de les línies HK-2 i 786-O silenciades per les subunitats de CK2.

(A) Fotografies de les plaques on es mostren les colònies obtingudes després de 22 dies de creixement. **(B)** Imatges i morfologies de les colònies a 4X i a 10X.

(C) Nombre de colònies obtingudes en cadascuna de les línies cel·lulars així com el seu anàlisi estadístic.

En condicions normals, HK-2 és incapaç de créixer en agar tou, propietat que es manté en la línia HK-2 shCV (A, B i C). Les línies HK-2 shCK2α i HK-2 shCK2β poden créixer en aquest medi, mostrant diferències significatives en el creixement i formació de colònies quan es comparen amb les línies HK-2 shCV (*). No obstant això no es veuen diferències en la capacitat de formació de colònies entre HK-2 shCK2α i HK-2 shCK2β (ns).

Les línies 786-O shCK2α i 786-O shCK2β poden créixer en agar tou, igual que la línia control 786-O shCV, però sorprenentment 786-O shCK2α no mostra diferències significatives quan es compara amb les control (ns) mentre que les 786-O shCK2β presenten una important disminució en la formació de colònies (**). Les dues línies silenciades, 786-O shCK2α i 786-O shCK2β mostren diferències significatives en la capacitat de formació de colònies entre sí (**).

Les dades van ser analitzades amb una ANOVA de dues vies, usant la correcció de Bonferroni. Els intervals de confiança usats van ser del 99,9%, 99% i 95%, i les diferències significatives per a cadascun d'aquests intervals s'han representat respectivament per (**), (*) i (*). La manca de significança s'ha representat per ns.

Apart del nombre de colònies obtingudes, és important considerar també la morfologia i la mida d'aquestes. Així quan ens fixem amb les línies HK-2 podem veure en tots els casos unes colònies de forma més arrodonida i de mida molt menor que les observades en les 786-O, molt més grans i més amorfes (Figura 34.B), la qual cosa ens dona informació sobre la seva taxa de proliferació. D'aquesta

manera les colònies 786-O mostren sempre una major mida que les HK-2, indicatiu de la seva major proliferació, així com les línies silenciades per CK2 α tenen una mida molt major que les silenciades per CK2 β coincidint d'aquesta forma amb els anteriors resultats de proliferació de les línies cel·lulars.

2.10. MARCADORS DE TRANSICIÓ EPITELI-MESÈNQUIMA EN LÍNIES RENALS SILENCIADES PER CK2

El fet que el silenciament de les diferents subunitats de CK2 en les línies renals hagués causat alteracions tant a la morfologia cel·lular, com també en les taxes de proliferació i migració, així com canvis en el creixement dependent d'ancoratge, ens va fer pensar en la possibilitat de que haguessin adquirit un fenotip mesenquimàtic. Tal com s'ha descrit en l'apartat de la introducció, una de les principals característiques de les cèl·lules tumorals és la seva desdiferenciació cap a un fenotip mesenquimal, fet que afavoreix la dispersió de les línies tumorals a nous teixits. El fenomen pel qual les línies epitelials canvien, mostrant característiques mesenquimàtiques es coneix com a Transició Epiteli-Mesenquima (EMT), que es pot confirmar amb les alteracions en els nivells d'un seguit de proteïnes marcadores d'aquesta transició. Malgrat que existeixen molts marcadors moleculars relacionats amb la EMT, no necessàriament es troben alterats en la seva totalitat, de tal manera que moltes vegades quan es donen aquestes situacions en una línia es parlen de pseudo-EMT o EMT parcials.

El TGF β 1 és considerat un bon inductor de la EMT en línies cel·lulars, i es va usar com un control positiu per a determinar aquests canvis en les línies cel·lulars shCV per a comparar-les amb les línies silenciades per CK2. A la Figura 35.A es mostren les dues línies renals controls (HK-2 shCV i 786-O shCV), tractades (+) o no tractades (-) amb 1,5 ng/mL de TGF β 1 durant 24 h.

En aquesta figura es pot observar com el TGF β 1, causa una disminució dels nivells de E-cadherina a les línies HK-2 shCV, la qual va acompanyada per una pujada de la N-cadherina així com l' α -SMA quan es comparen amb les no tractades. En relació als nivells d'altres marcadors com, slug i β -catenina no varien quan tractem la línia amb el TGF β 1.

En referència a la línia 786-O shCV, el tractament amb TGF β 1 causava igual que en HK-2 un augment en els nivells de N-cadherina. Respecte a la E-cadherina, aquesta línia es caracteritza per presentar ja uns nivells molt baixos d'aquest marcador, visible només amb exposicions molt llargues dels films fotogràfics (tal com s'observa a la Figura 35.B). En relació amb α -SMA i slug, ambdós presenten un augment dels nivells en la línia tractada, mentre que no s'observen canvis en els nivells de β -catenina, tal com passava amb la línia HK-2 shCV.

A la Figura 35.B es mostren els nivells dels diferents marcadors de EMT en les línies 786-O i HK-2 silenciades per les subunitats catalítiques CK2 α o reguladores CK2 β de CK2. Tal com s'ha mencionat abans, els nivells de E-cadherina de la línia control HK-2 shCV és molt superior al de la seva homòloga 786-O shCV, que gairebé no en presenta. Quan es silencien les subunitats de CK2 es pot observar que tant la línia HK-2 shCK2 α com HK-2 shCK2 β presenten una disminució dels nivells de E-cadherina, essent molt més dràstica en aquesta darrera línia. Malgrat això, l'augment de N-cadherina que s'observa

en moltes de les EMT, no apareix en aquestes línies silenciades, sinó el fenomen contrari, fet que sí s'observava en les línies HK-2 shCV tractades amb TGFβ1 de la Figura 35.A. Pel què fa a slug, tant les línies HK-2 shCK2α com HK-2 shCK2β presenten una disminució d'igual magnitud en els seus nivells quan es comparen amb la línia control HK-2 shCV. El marcador α-SMA no varia en les línies HK-2 shCV i HK-2 shCK2α, apareixent en les cèl·lules HK-2 shCK2β una lleugera tendència a la disminució de la seva expressió.

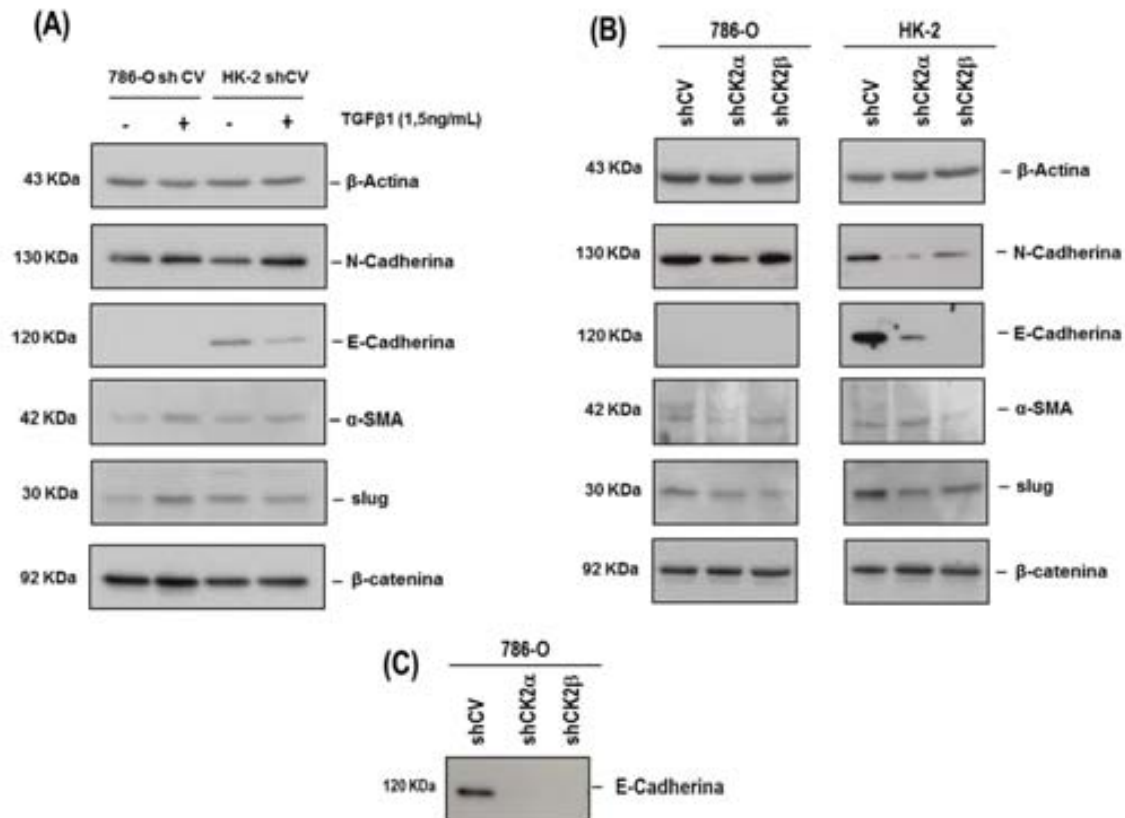


Figura 35: Nivells de marcadors de transició epitelí-mesènquima (EMT) en línies HK-2 i 786-O silenciades per CK2α o CK2β

(A) Detecció immunològica per western blot de β-Actina, N-cadherina, E-cadherina, α-SMA, Slug i β-catenina en les línies HK-2 shCV i 786-O shCV tractades prèviament amb (+) o sense (-) 1,5 ng/mL de TGFβ1 durant 24h a 37°C.

(B) Nivells de β-Actina, N-cadherina, E-cadherina, α-SMA, Slug i β-catenina en les línies HK-2 i 786-O silenciades per les subunitats catalítiques CK2α i reguladores CK2β de CK2.

(C) Nivells de E-cadherina de les línies 786-O silenciades després de la sobreexposició del film fotogràfic.

La línia 786-O, tal com s'ha dit, destaca per presentar nivells molt baixos de E-cadherina, que acaben de reduir-se en les dues línies silenciades: 786-O shCK2α i 786-O shCK2β, en les que no s'observa senyal d'aquesta proteïna ni amb sobreexposició dels films. Els nivells de N-cadherina per contra són més alts en la línia control 786-O shCV front la HK-2 shCV, i cal destacar que el silenciament tant de CK2α com de CK2β no sembla afectar als nivells de N-cadherina en aquesta línia. Pel que es refereix als altres marcadors, les 786-O shCK2α i 786-O shCK2β mostren disminució en els seus nivells de slug (que són més reduïts en les 786-O shCV que en les HK-2 shCV) així com s'observa poca variació en els nivells de

α -SMA, que ja són baixos de per sí, característica compartida per HK-2 shCK α i HK-2 shCK2 β , però no per les cèl·lules 786-O shCV quan són tractades amb el TGF β 1. D'aquesta manera el tractament de TGF β 1 causa un lleuger augment tant dels nivells de α -SMA com slug, oposant-se als resultats de les 786-O silenciades per CK2. En canvi els nivells de β -catenina de 786-O shCV, 786-O shCK2 α i 786-O shCK2 β no varien entre sí, tal com passa després de induir 786-O shCV amb TGF β 1.

D'aquesta forma s'observa que el silenciament afecta sobretot a l'expressió de E-cadherina, essent la principal molècula implicada en la EMT. Aquesta disminució seria en part responsable de la major capacitat invasiva de les línies. El fet que els altres marcadors es comportin de manera diferent a l'esperat fa pensar que el silenciament de CK2 en certes línies (sobretot HK-2) causa una pseudo-EMT, la qual tindria implicacions funcionals sobre la invasió cel·lular.

2.11. EXPRESSIÓ TRANSCRIPCIONAL DE E-CADHERINA I N-CADHERINA

Les diferències d'expressió observades a nivell de proteïna tant per la E-cadherina com per la N-cadherina en les línies renals silenciades per CK2 ens va fer pensar si aquestes eren conseqüència de possibles canvis a nivell transcripcional o únicament a nivell traduccional/postraduccional. Per aquest motiu es va decidir determinar els nivells d'expressió de mRNA tant de la E-cadherina, com la N-cadherina en les línies 786-O (786-O shCV, 786-O shCK2 α i 786-O shCK2 β) i HK-2 (HK-2 shCV, HK-2 shCK2 α i HK-2 shCK2 β). Les figures que es mostren a continuació corresponen als nivells relatius d'expressió dels mRNA usant l'expressió del gen TBP (*TATA binding protein*) com a estandaritzador endògen, tal i com es descriu a l'apartat de metodologia corresponent.

La Figura 36 mostra els nivells d'expressió relativa del mRNA de la E-cadherina (CDH1, Figura 36.A) i de la N-cadherina (CDH2, Figura 36.B) de les línies HK-2 silenciades per les subunitats de CK2. Els nivells d'expressió s'han representat de forma logarítmica i usant com a calibrador la línia control HK-2 shCV. Tal com s'observa a la Figura 36.A, les línies HK-2 silenciades per la subunitat catalítica (HK-2 shCK2 α) i la reguladora (HK-2 shCK2 β) mostren una disminució de l'expressió de CDH1, essent major en la línia silenciada per la subunitat reguladora CK2 β , coincidint d'aquesta forma amb els anteriors resultats a nivell d'expressió proteica.

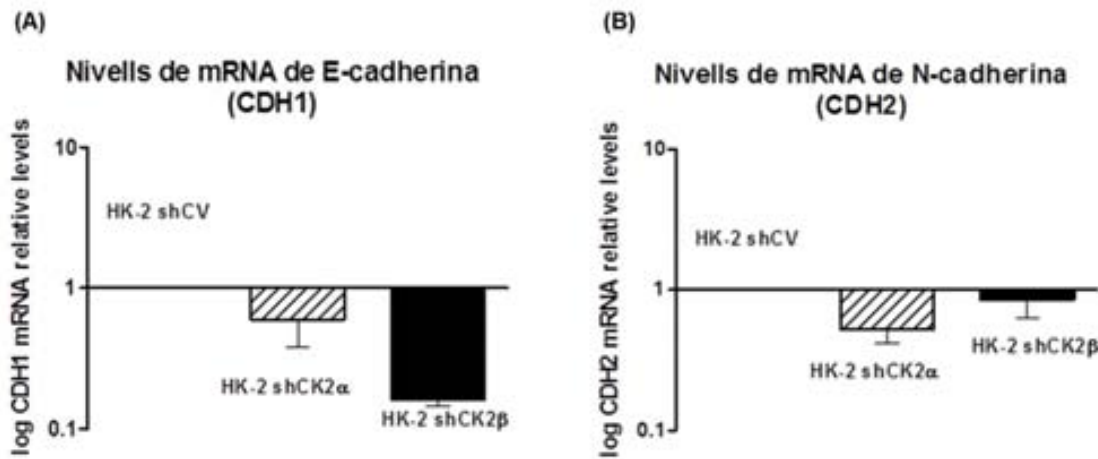


Figura 36: Nivells d'expressió de mRNA de E-cadherina (CDH1) i N-cadherina (CDH2) en les línies HK-2 silenciades per les subunitats CK2α o CK2β.

L'expressió dels nivells de mRNA de CDH1(A) i de CDH2 (B) van ser analitzats per qRT-PCR. L'expressió relativa dels nivells de mRNA es va representar amb el $\log 2^{-\Delta\Delta Ct}$, usant l'expressió de TBP com a gen endogen.

L'expressió de CDH2 (Figura 36.B) també disminueix en les línies silenciades per aquestes subunitats, però a diferència de l'anterior cas, és en les línies HK-2 shCK2α on mostra una major disminució de l'expressió, mentre que la reducció en les HK-2 shCK2β és molt menor, coincidint de nou amb els resultats a nivell de proteïna, tal com passava amb l'anterior cas.

A la Figura 37 es mostra els nivells d'expressió de mRNA tant del CDH1 com del CDH2 (Figura 37.A i 37.B respectivament), però aquest cop corresponent a les línies 786-O silenciades per les mateixes subunitats de CK2.

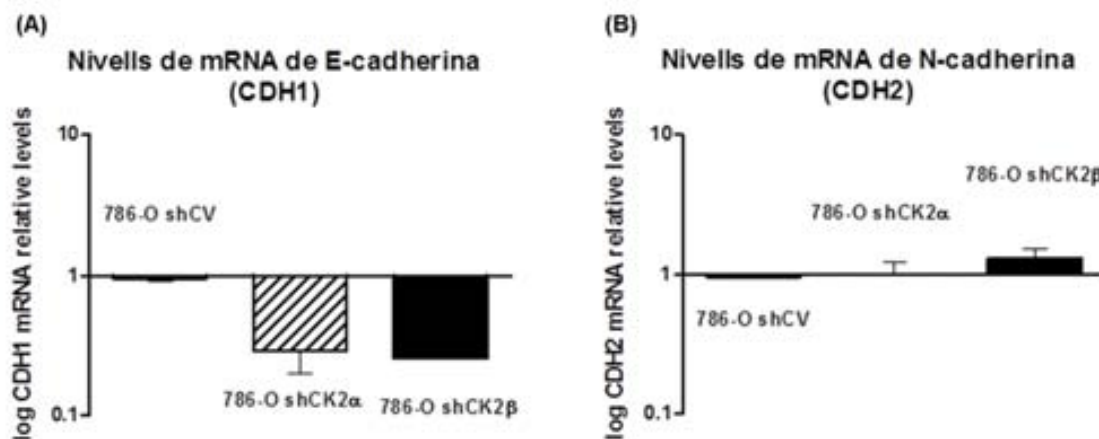


Figura 37: Nivells d'expressió de mRNA de E-cadherina (CDH1) i N-cadherina (CDH2) en les línies 786-O silenciades per les subunitats CK2α o CK2β.

L'expressió dels nivells de mRNA de CDH1(A) i de CDH2 (B) van ser analitzats per qRT-PCR. L'expressió relativa dels nivells de mRNA es va representar amb el $\log 2^{-\Delta\Delta Ct}$, usant l'expressió de TBP com a gen endogen.

Tal com es veu a la Figura 37.A, els nivells d'expressió relatius de CDH1 disminueixen considerablement tant a la línia silenciada per la subunitat catalítica com per la reguladora de CK2 (786-O shCK2 α i 786-O shCK2 β respectivament) quan es comparen amb la corresponent línia calibradora 786-O shCV. Els valors absoluts d'expressió de CDH1 en aquesta mateixa línia control ja mostraven ser molt més baixos que en la respectiva línia HK-2 shCV, indicant de nou la baixa expressió de E-cadherina que expressa aquesta línia, corroborada prèviament a nivell proteic per *western blot*. Pel què fa al grau de disminució de l'expressió de CDH1 és lleugerament major en la línia 786-O shCK2 β , trobant-se en ambdós casos en el límit de detecció de la tècnica, fet que explicaria la dificultat en l'observació dels nivells de E-cadherina amb mètodes de immunodetecció, tal com ja s'ha mencionat. A diferència del que s'observa a les línies HK-2, en les 786-O s'observa un augment de l'expressió de CDH2 a nivell de les línies silenciades per la subunitat reguladora 786-O shCK2 β , coincidint amb els resultats observats a nivell de western blot. Pel què fa als nivells de CDH2 observats en la línia 786-O shCK2 α , són molt semblants a la control 786-O shCV, mostrant certa dispersió en els resultats.

Aquests resultats confirmarien que el silenciament de CK2 té un efecte en la reducció de l'E-cadherina a nivell transcripcional. Aquest fet concorda amb resultats recentment publicats [141], els quals han proposat recentment un model de regulació de la EMT a través del silenciament de CK2 β . No obstant en el nostre cas, no només el silenciament de la subunitat reguladora té efectes sobre la TEM, sinó que també el silenciament de la subunitat CK2 α promou aquest fenomen en les nostres línies renals.

2.12. RESUM DE LES PRINCIPALS CARACTERÍSTIQUES DE LES LÍNIES SILENCIADES PER CK2

Davant del fet que la caracterització de les 6 línies renals silenciades ha donat lloc a una àmplia varietat de fenotips diferents per a cadascuna de les línies, s'ha decidit elaborar un recopilatori de les principals característiques que presenta el silenciament de les subunitats reguladores i catalítiques de CK2 sobre les línies renals HK-2 i 786-O. Aquestes característiques estan breument resumides a la taula adjuntada a continuació.

Taula-Resum R1: caracterització línies renals silenciades per CK2						
Característiques	HK-2			786-O		
	shCV	shCK2α	shCK2β	shCV	shCK2α	shCK2β
Expressió de CK2						
Nivells CK2 α	++++	++	++++	++++	++	++++
Nivells CK2 α'	++	++	-	++++	++++	+
Nivells CK2 β	++++	+++	-	++++	+++	+
Subunitat catalítica predominant	CK2 α	CK2 $\alpha+\alpha'$	CK2 α	CK2 $\alpha+\alpha'$	CK2 α'	CK2 α
Predomini d'holoenzim o formes lliures	Holoenz.	Holoenz.	Lliures	Holoenz.	Holoenz.	Lliures
Relacions CK2 α /CK2 β	Baixes	Baixes	Altes	Baixes	Baixes	Altes
Fosforilació eIF2β (Ser2)						
Nivells p-eIF2 β	+++++	+++	++	++++	++++	+++
Localització subcel·lular CK2α						
Localització CK2 α	Cito.	Cito.	Nucli	Cito.	Cito.	Cito.
Nivells CK2 α	+++	+	+++	++++	++	++++
Morfologia cel·lular						
Morfologia cel·lular	Lanceolada. o fusiforme	Amorfa	Amorfa (fusiforme)	fusiforme	Amorfa (fusiforme)	Variades (amorfa, fusiforme i lanc.)
Mida cel·lular	Gran	↓	↑	Mitjana	=	↑
Volum Nucl/Cit	N>C	N>C	N>C	N>C	N>C	N<C
Fil·lopodis	+	++	++	+	++	++
Long. i n ^o fil·lopodis	Pocs i curts	Augmenten	Augmenten	Pocs i curts	Augmenten	Augmenten
Confluència	No compact. cel·lular	No compact. cel·lular	No compact. cel·lular	Compact.	Menor compact. (- -)	Menor compact. (- - -)
Grànuls	No	Sí	Sí	No	No	Sí
Proliferació cel·lular						
Velocitat	shCK2 α > shCV = shCK2 β			shCV > shCK2 α > shCK2 β		
Migració cel·lular						
Velocitat	shCK2 β > shCK2 α > shCV			shCK2 β > shCK2 α > shCV		
Migració no linial	-	+	++	+	++	+++
Infiltració al front contrari	+	++	++	++	+++	++++
CIL (inhibició de locomoció per contacte)	No	No	Sí	No	Sí	Sí
Creixement Soft Agar						
Formació colònies	No	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí
N ^o de colònies (mitjana)	0	287	347	1872	2266	763
Mida colònies		Grans	Petites	Grans	Grans	Petites
Morfologia colònies		Arrodonides	Arrodonides	Amorfes	Amorfes	Amorfes
Marcadors EMT						
E-cadherina	+++	+	0	+	0	0
N-cadherina	++	+	+	+++	+++	+++
α -SMA	+	+	+	+	+	+
slug	++	+	+	++	+	+
β -catenina	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Nivells de mRNA						
E-cadherina	+	↓	↓↓	+	↓↓	↓↓
N-cadherina	+	↓↓	↓	+	↑	↑↑

Taula R1: Recopilatori de les característiques de les línies cel·lulars silenciades per les subunitats de CK2. Les línies silenciades per CK2 α o CK2 β s'han comparat amb la corresponent línia silenciada control shCV. S'ha indicat amb (-) l'absència i amb (+) la presència d'aquesta característica a les línies. Els nivells d'aquesta s'indiquen amb un major o menor nombre de (+ o -). Les línies que presenten un augment de l'expressió o de mida respecte la línia control s'ha indicat amb (↑), mentre que la disminució s'ha indicat amb (↓).

V. DISCUSSIÓ

1. DISCUSSIÓ

1.1. ELS NIVELLS I LES RELACIONS ENTRE LES SUBUNITATS DE CK2 ESTAN ALTERADES EN CCRCC

En tots els càncers humans s'ha trobat un increment de l'activitat quinasa CK2. Aquest augment de l'activitat associat a l'increment de la subunitat catalítica CK2 α registrada en tumors, mentre que la subunitat reguladora CK2 β no ha estat considerada en molts dels estudis. Cada cop, però es posa més en dubte la fiabilitat dels resultats obtinguts en les mesures d'activitat CK2 de les mostres tissulars, ja que estudis realitzats amb els substrats sintètics DSD i ETE (àmpliament usats per aquesta finalitat) han mostrat resultats clarament diferenciats [142].

Estudis anteriors portats a terme per Stalter [49] en ccRCC van registrar que apart de trobar-se un augment tant de l'activitat com de la subunitat catalítica de CK2, fet compartit a la resta de neoplàsies, també es trobava incrementada la subunitat reguladora CK2 β , presentant un increment molt major que el mostrat en CK2 α .

En aquest treball l'anàlisi de diferents extractes de teixits de pacients afectats per ccRCC ha mostrat que malgrat que hi ha certa dispersió en els nivells d'expressió de les diferents subunitats en els pacients, s'observa clarament un increment dels nivells d'expressió de la subunitat reguladora front la catalítica, tal com havia estat descrit en l'estudi anteriorment mencionat. No obstant, en el nostre cas, s'ha observat una clara correlació inversa entre els nivells de la subunitat reguladora CK2 β i l'estadiatge tumoral, detectant-se un increment d'expressió en tumors d'estadياتges baixos (pT1) i disminuint a mesura que augmenta l'estadi tumoral, trobant-se que en estadis avançats (pT3+pT4) els ccRCC tenen uns nivells menors de CK2 β que els del teixit renal sa. De la mateixa manera cal destacar que en tumors que mostren un elevat nivell d'expressió de CK2 β , aquesta apareix com una banda ampla i més difosa, que recordaria a fenòmens de proteòlisi. Estudis realitzats per Roig [101] havien observat la presència de diferents formes de CK2 obtingudes per fenòmens de proteòlisi en les línies derivades de leucèmia HL60, observant-se *in vitro* que les subunitats lliures eren més sensibles a aquest fenòmens que no pas quan constituïen part de l'holoenzim. El fet que en els tumors on s'expressa més CK2 β són els que presenten unes bandes més difoses, suggeriria que un augment de les formes lliures d'aquesta subunitat serien més sensibles a fenòmens de proteòlisi, concordant amb els resultats de Roig [101].

Pel què fa als nivells de CK2 α , els canvis no són tan marcats com en el cas de CK2 β , fent que la mitjana dels nivells tumorals de CK2 α sigui menor que la de les mostres de teixits sans, al contrari del que havia estat observat pel treball de Stalter [49]

Les variacions en els nivells de CK2 β en funció del grau i estadiatge tumoral, causa canvis en les relacions existents entre les subunitats catalítiques i reguladores de CK2 en aquests subgrups. D'aquesta manera els resultats obtinguts mostren que en els estadياتges baixos (pT1), hi ha una predominança de la forma reguladora front la catalítica, mentre que als intermitjos (pT2) i avançats (pT3+pT4) les relacions s'inverteixen, augmentant la subunitat catalítica front la reguladora, observant-se que en el cas dels més

avançats són els que presenten majors nivells de CK2 α respecte CK2 β . La classificació d'aquestes mostres segons la gradació nuclear de Fürhman, mostren que només en els graus més avançats (G3+G4) apareix una major relació CK2 α /CK2 β , atribuïble per la seva correlació amb el major estadiatge neoplàsic.

Aquests resultats presenten similituds amb estudis previs de càncer de cap i de coll, en el que l'augment d'activitat CK2 mantenia una correlació amb el grau, l'estadiatge i el pronòstic tumoral [108]. En el nostre cas, la correlació vindria deguda a l'increment de les subunitats catalítiques lliures front les reguladores, ocasionada per la reducció dels nivells d'aquesta última, a mesura que s'incrementa l'estadiatge tumoral.

D'aquesta forma, les variacions de les relacions entre les subunitats causarien canvis en la predominança de les formes holoenzimàtiques i lliures de les subunitats de CK2, que podrien estar implicades en altres funcions en el procés neoplàsic de les cèl·lules tumorals. De la mateixa manera, és important destacar que els resultats obtinguts en realitzar la mitjana global dels nivells d'expressió de CK2 β poden diferir considerablement segons el nombre de mostres disponibles de cada estadiatge, donant lloc a resultats contradictoris en funció de si es disposa d'una major mida mostral d'estadiatges baixos o bé d'elevats.

El fet que en els extractes tissulars, existeixen altres tipus cel·lulars que no corresponen a les cèl·lules neoplàsiques d'estudi, les quals poden mostrar diferent patró d'expressió de CK2, podent afectar d'aquesta forma als resultats, es va procedir a l'anàlisi immunohistoquímic d'un major nombre de mostres de ccRCC, que es trobaven incorporades en diferents TMAs. En aquest es va valorar l'expressió dels nivells de cada subunitat de CK2 tant al nucli com al citoplasma cel·lular, obtenint que apart de les variacions en l'expressió de les subunitats observades en els extractes totals, hi ha variacions en la localització subcel·lular de les subunitats de CK2 en els tumors.

D'aquesta manera s'ha observat que en ccRCC, hi ha un fort increment dels nivells nuclears de CK2 α mentre que els citoplasmàtics pateixen una lleugera davallada quan es comparen amb el teixit renal sa. Aquest fet coincideix amb resultats previs d'altres grups, en els que ja havien registrat alteracions en la distribució de la subunitat catalítica en tumors, trobant-se incrementada en el nucli tumoral al torn que s'observava una reducció dels seus nivells citoplasmàtics quan eren comparats amb el teixit sa [110]. De la mateixa manera, havien destacat patrons puntuats de CK2 α dins del nucli, mostrant una associació amb estructures de la cromatina o la matriu cel·lular; propietat observada també en el nostre cas, on CK2 α presenta una forta tinció dins de certes regions nuclears, tals com la membrana interna i nuclèols, fet clarament observable en els graus de Fürhman avançats (GF3+GF4).

Pel que fa a la subunitat CK2 β , els resultats indiquen també un augment en nucli i una reducció en el citoplasma de les cèl·lules de ccRCC, no obstant a diferència de CK2 α , la presència citoplasmàtica és dràsticament reduïda en cèl·lules tumorals, al torn que la porció nuclear pateix només un lleuger augment. És de destacar també que en les mostres tumorals s'observa una forta tinció de CK2 β a la membrana plasmàtica, sobretot en estadis baixos, fet no observat en el cas de CK2 α .

Molts autors han considerat l'increment dels nivells nuclears de CK2 α com un mecanisme de resistència a l'apoptosi, observant-se que durant l'apoptosi hi ha una disminució de CK2 α nuclear i que tractaments inductors de l'apoptosi, causen la translocació de CK2 α cap a nucli, actuant com un possible mecanisme protector cel·lular front a aquests agents [95,115].

Les variacions en els nivells de les subunitats de CK2 en citoplasma i nucli de les cèl·lules tumorals, ja són significatives en els estadiatges primerencs i graus menors del ccRCC, no observant-se diferències respecte a la resta d'estadis i graus, causant que no hi hagi correlació entre els nivells d'expressió de les subunitats en els compartiments cel·lulars i l'estadiatge o gradació del tumor. Aquest fet fa hipotetitzar que els canvis en les distribucions de les subunitats de CK2 és un fet primerenc en el desenvolupament de les neoplàsies, i que no es pot correlacionar amb el pronòstic de la patologia.

El fet que en l'anàlisi immunohistoquímic de teixit s'observi una forta reducció de CK2 β citoplasmàtica en els estadiatge tumorals primerencs, mentre que l'anàlisi dels extractes tumorals s'observi un fort augment de la mateixa subunitat, s'explica perquè en aquest últim s'analitzen els nivells totals de cada subunitat, independent de la seva localització; mentre que en els TMAs es van analitzar únicament els nivells citoplasmàtics i nuclears d'aquestes subunitats, si s'ignora els valors de tinció a la membrana, que són difícilment quantificables.

El fet que CK2 β presenta una forta tinció a la membrana plasmàtica en les mostres de ccRCC, essent major en els estadiatge inicials front els més avançats, coincidiria de forma directa amb els nivells d'expressió d'aquesta subunitat en els extractes de ccRCC quan són analitzats en funció del seu estadiatge.

Diferents grups han descrit ja interaccions de CK2 amb components de la membrana plasmàtica, observant-se la seva interacció a través de la subunitat reguladora CK2 β . De la mateixa forma, moltes de les molècules d'interacció es troben a les zones apicals de les cèl·lules, permetent la correcta disposició d'elements del citoesquelet així com la disposició de canals epitelials de sodi (ENaC) o canals de sodi dependents de voltatge (Nav) [52,92]. La pèrdua d'aquestes estructures i de la polaritat cel·lular han estat considerades per molts grups com elements claus i primerencs en la TEM i la progressió tumoral, fet pel qual la unió de CK2 β a la membrana plasmàtica podria afectar a aquestes vies i contribuir també a la progressió tumoral.

1.2. EL SILENCIAMENT DE LES SUBUNITATS DE CK2 TÉ EFECTE SOBRE ELS NIVELLS DE LES ALTRES SUBUNITATS DE CK2

Per tal de mimetitzar les alteracions en els nivells i les relacions entre les subunitats de CK2 observades en les mostres de ccRCC, en aquest treball s'han generat línies cel·lulars estables silenciades de forma independent per CK2 α o per CK2 β . Les línies escollides han estat les línies renals humanes HK-2 (derivades de túbul proximal sa) i les 786-O (derivades de ccRCC), permetent observar millor els efectes de les alteracions dels nivells d'aquestes subunitats en línies renals sanes i neoplàsiques.

És de destacar que el silenciament estable tant per CK2 α com per CK2 β obtingut en aquest treball no compromet a la viabilitat d'aquestes línies cel·lulars, oposant-se als resultats obtinguts anteriorment per altres grups, els quals indicaven que la presència tant de CK2 α com de CK2 β era essencial per la supervivència de la cèl·lula eucariota. Així en llevats només cal que presentin funcionals una de les dues subunitats catalítiques de CK2 per tal de que siguin viables, independentment de si els hi manca l'altra isoforma catalítica o la subunitat reguladora de CK2 [55,58]. Per altra banda, models murins transgènics homozigots deficientes en CK2 β , presenten problemes durant el desenvolupament embrionari, no podent progressar més enllà del 8è dia del desenvolupament [60], essent considerat per molts autors indispensable per la viabilitat. A diferència de la subunitat reguladora, la subunitat catalítica CK2 α' no sembla ser essencial pel desenvolupament, existint ratolins transgènics homozigots deficientes en CK2 α' . Per altra banda, la subunitat CK2 α es considera essencial per la viabilitat de les cèl·lules de mamífers, al no haver-se pogut obtenir encara ratolins homozigots deficientes en aquesta subunitat [55].

Aquests resultats han donat lloc a la hipòtesi que durant l'evolució CK2 β ha anat adquirint noves funcions cel·lulars (algunes essencials per la formació de les estructures embrionàries) mentre que CK2 α' ha adquirit funcions especialitzades front CK2 α , observant-se que la compensació funcional de CK2 α front CK2 α' en mamífers no arriba a ser total, ja que els ratolins homozigots deficientes en CK2 α' són estèrils [55].

Estudis recents per part de Deshiere et al [141], en els que s'havia silenciat CK2 β en línies cel·lulars de glàndules mamàries, havien destacat que aquest silenciament no comprometia a la viabilitat cel·lular, oposant-se també als estudis abans mencionats. Aquests resultats clarament diferenciats davant de la mateixa alteració d'una subunitat de CK2 en funció del tipus cel·lular o organisme, ha fet que alguns autors hagin considerat que les diferents línies cel·lulars tindrien diferents requeriments de subunitats de CK2, al torn que presentarien un fenotip proteic característic que requeriria una major proporció de formes holoenzimàtiques o lliures de CK2, que serien essencials per la seva funció.

En els nostres resultats, la viabilitat observada en les línies HK-2 i 786-O silenciades per CK2 α vindria explicada pel fet que el silenciament no arriba mai a ser total, quedant una part de CK2 α disponible per a portar a terme les necessitats bàsiques cel·lulars, al torn que la presència de CK2 α' , podria suplir parcialment la CK2 α silenciada. Malgrat que el silenciament de CK2 β no és total en cap de les dues línies, en el cas de HK-2 s'aproxima al 100% de silenciament, indicant que la seva funció estaria més que implicada en la viabilitat, implicada en la formació de les estructures embrionàries en les quals un error en la formació de l'embrió durant les etapes primerenques, dóna lloc a la letalitat i la reabsorció d'aquest.

En quant al silenciament de les subunitats, els resultats obtinguts mostren que les dues línies interferides en CK2 α , no presenten un silenciament total al torn que els nivells de CK2 α' no es veuen afectats. Per contra, causa una reducció de l'expressió de la subunitat CK2 β en les dues línies. Tal com s'ha dit, el silenciament de la subunitat reguladora CK2 β és superior en la línia HK-2 que en la 786-O, observant-se en les dues línies que aquest té un efecte sobre CK2 α' (reduint-ne dràsticament els nivells d'expressió)

mentre que no afecta als nivells de CK2 α . Aquest fenomen de regulació al silenciar les subunitats ha estat també descrit per Deshiere [136], observant que el silenciament estable de CK2 β causava una disminució dels nivells de la isoforma CK2 α' , mentre que el doble silenciament de CK2 α i CK2 α' afectava els nivells de la subunitat reguladora CK2 β . Aquest fenomen podria donar llum al possible mecanisme de coordinació de l'expressió de les subunitats de CK2, que continua essent un dels principals temes de controvèrsia d'aquesta proteïna, ja que s'han obtingut resultats contradictoris entre sí.

Així, molts autors consideren que la possible regulació de les subunitats vindria a nivell de estabilitat de la proteïna, ja que els estudis inicials havien demostrat que CK2 β s'expressava en excés respecte la subunitat catalítica dins de la cèl·lula [83], al torn que s'havia observat que els promotors dels gens codificants de les subunitats presentaven característiques de promotors constitutius. No obstant això certs grups havien registrat la unió de CK2 α a regions a upstream del promotor de CK2 β , proposant la idea de que la regulació de la subunitat reguladora vindria coordinada per la subunitat catalítica, malgrat no poder registrar alteracions en els nivells d'expressió de les subunitats. Malgrat l'existència de KEN boxes i Destruction boxes en CK2 β , s'ha observat que aquestes no són funcionals al presentar alteracions en la seva seqüència, oposant-se en certa manera a l'hipòtesi d'un possible mecanisme de regulació basat en la degradació a nivell proteic [55]. Malgrat que ara per ara la majoria d'autors consideren que els promotors semblen ser constitutius, estudis recents, tornen a posar en dubte aquesta hipòtesi. Així Lupp et al [82] han mostrat l'existència de regions a upstream dels promotors tant de CK2 α com de CK2 β que vindrien regulades més que per la unió de CK2 α i CK2 α' , per l'activitat de CK2, observant-se variacions en els nivells d'expressió dels mRNAs de les subunitats de CK2 quan aquesta es troba afectada.

El resultat del silenciament de CK2 α i CK2 β en les dues línies renals i els efectes colaterals d'aquest silenciament sobre la expressió de les altres subunitats, ha donat lloc a que les línies presentin canvis en les relacions entre les dues subunitats catalítiques i la reguladora de CK2; afectant d'aquesta manera tant a les subunitats que constitueixen l'holoenzim, així com la presència i predominància de les formes lliures de CK2 α , CK2 α' o CK2 β front les formes holoenzimàtiques de CK2. Així les línies silenciades en CK2 β , caracteritzades per la reducció tant de CK2 α' com de CK2 β , presentarien uns nivells baixos d'holoenzim i uns nivells elevats de la isoforma CK2 α lliure, coincidint així amb els desequilibris registrats en els ccRCC d'estadiatges avançats (pT3+pT4) on hi havia també una predominància de CK2 α .

D'altra banda, el silenciament de CK2 α en ambdues línies (caracteritzat per causar una lleugera davallada en els nivells de CK2 β) presentarien una major proporció de les formes holoenzimàtiques de CK2 i de CK2 β lliure, d'una forma anàloga a l'observada en els ccRCC d'estadiatge baix (pT1) en els que la predominança de l'holoenzim és causada per increments en la subunitat reguladora enlloc de disminucions en la catalítica. És de destacar però que els nivells d'expressió basals de CK2 α' són diferents entre les línies HK-2 i 786-O, observant-se una baixa expressió d'aquesta en les HK-2 respecte les 786-O. Això fa que el silenciament estable de CK2 α en aquestes dues línies, malgrat donar un increment de les formes holoenzimàtiques, les isoformes de les subunitats catalítiques que les

constituïrien serien hipotèticament diferents, trobant-se la 786-O shCK2 α teòricament formada per CK2 α' $\beta\beta$, mentre que en HK-2 shCK2 α seria per CK2 $\alpha\alpha'$ $\beta\beta$.

Així aquesta diferència en les formes holoenzimàtiques de CK2 podria explicar els diferents comportaments cel·lulars en el silenciament de CK2 α en les dues línies, indicant funcions específiques de CK2 α' dins de la cèl·lula tal com ha estat registrat per diferents grups [61].

Els nivells de formes holoenzimàtiques de CK2 és en part també observable per la fosforilació del eIF2 β (substrat fosforilable només per l'holoenzim), en el qual s'observa una davallada de la fosforilació en les línies HK-2 shCK2 α i HK-2 shCK2 β . Tal com s'ha comentat a l'apartat de resultats, el fet que HK-2 shCK2 β tingui encara fosforilació d'aquesta subunitat, indicaria que lleugers nivells d'expressió de CK2 β en aquesta línia serien suficients per promoure certa capacitat de fosforilació basal; mentre que en el cas de HK-2 shCK2 α , la lleugera disminució de fosforilació del substrat indicaria majors nivells de formes holoenzimàtiques, coincidint amb majors nivells d'expressió de CK2 β . El fet que les línies anàlogues 786-O shCK2 α i 786-O shCK2 β no mostrin disminucions en la fosforilació d'aquest substrat vindria explicat pel fet que ja per sí, el silenciament de CK2 β en aquesta línia és menor que en HK-2, donant lloc a una major presència d'holoenzim, mentre que al presentar majors nivells de CK2 α' en les línies silenciades per CK2 α , serien suficients per compensar aquesta davallada.

1.3. DISTRIBUCIÓ DE CK2A EN LES CÈL·LULES SILENCIADES

Tal com ja s'ha mencionat, la translocació de CK2 α cap al nucli cel·lular s'ha considerat un mecanisme de resistència a l'apoptosi, essent també un mecanisme protector front determinats agents tòxics o radiacions ionitzants [95,115]. El fet que el ccRCC s'ha considerat un tumor altament resistent a agents quimioteràpics i radiacions ionitzants, al torn que els resultats obtinguts mostraven que el desequilibri en les relacions entre les subunitats de CK2 en mostres de ccRCC anaven acompanyades de la translocació de la subunitat catalítica, va fer que en l'estudi s'analitzés la localització de CK2 α en les diferents línies cel·lulars renals silenciades. Per a portar-ho a terme es va usar el mateix anticòs que en els TMA's, essent específic front les dues subunitats catalítiques de CK2 (CK2 α i CK2 α').

Els resultats obtinguts indiquen que només la línia cel·lular HK-2 shCK2 β presenta increments de la translocació de la subunitat catalítica al nucli. Pel què fa a la resta de les línies, es continua trobant predominantment al citoplasma, contradient-se amb els primers estudis realitzats en els quals es considerava que CK2 tenia una presència principalment nuclear [90,143]. Coincidint també amb els anteriors resultats de l'anàlisi immunològic per western blot, les línies HK-2 shCK2 α i 786-O shCK2 α , presenten una menor senyal de CK2 α al citoplasma, essent menor en les HK-2 shCK2 α a causa del menor nivell de CK2 α' .

De totes les línies, HK-2 shCK2 β i 786-O shCK2 β són les que presentarien una predominança de la isoforma CK2 α lliure, essent en el primer cas superior a causa del major silenciament de la subunitat reguladora. Això ens ha fet plantejar la hipòtesi de que l'excés de CK2 α lliure podria explicar la promoció de la seva translocació nuclear. El fet que en les mostres de ccRCC s'hagi registrat aquest augment de

CK2 α independentment de l'estadiatge i dels nivells de holoenzim, indicaria que aquest procés també es podria donar per altres mecanismes independents de les formes lliures de CK2 α , malgrat que un excés de subunitat catalítica lliure podria facilitar aquest procés, concordant amb la mobilització intracel·lular de CK2 descrita per altres grups. Així el grup de Cochet [91] havien descrit que les subunitats catalítiques i reguladores de CK2 podien translocar-se de forma independentment cap al nucli cel·lular, a través de diferents senyals de localització nuclear (NLS) presents en CK2 α i suposadament en CK2 β . Per contra, l'holoenzim no podia translocar-se en condicions normals cap al nucli cel·lular, necessitant la presència de determinats lligants d'unió a CK2 (com el FGF-2) que actuessin com a transportadors [91].

1.4. CK2 ESTÀ IMPLICADA EN LA PROLIFERACIÓ CELULAR

Tal com s'ha dit, l'activitat CK2 s'ha relacionat amb la proliferació cel·lular, a l'observar-se que les cèl·lules en creixement així com els teixits amb un elevat nivell proliferatiu mostren una major activitat d'aquesta quinasa, que es correlaciona amb un increment d'expressió de les seves subunitats [55]. El fet que en tumors s'hagi registrat nivells alts d'activitat CK2, al torn que la proliferació és un dels trets diferencials de les cèl·lules tumorals, molts autors han atribuït que l'increment d'aquesta quinasa té com a principal efecte el creixement sostingut de les cèl·lules neoplàsiques. No obstant això, els seus nivells d'expressió no es correlacionen només amb la proliferació, sinó també amb la displàsia cel·lular [95]. De la mateixa manera, s'ha observat que en molts tumors, l'augment de la massa tumoral no és dona per un increment en la taxa de proliferació cel·lular, sinó per defectes en els mecanismes d'apoptosi d'aquestes cèl·lules. Aquests resultats coincideixen amb el fet que alguns dels teixits que presenten major activitat CK2, tals com el nerviós, són els que tenen una menor taxa de divisió cel·lular.

Els nostres resultats indiquen que el silenciament de les subunitats de CK2 en les diferents línies renals té un efecte sobre la seva proliferació cel·lular. Així en 786-O el silenciament tant de CK2 α com de CK2 β redueix la seva taxa de divisió quan són comparades amb la corresponent línia control 786-O shCV, essent lleugerament majors en la 786-O shCK2 α que la 786-O shCK2 β . D'aquesta manera la línia 786-O amb majors nivells de CK2 β són les que tenen major proliferació, concordant amb resultats obtinguts per Litchfield en el que s'observava que les línies que tenien majors nivells d'aquesta subunitat tenien una major divisió cel·lular [83]. El silenciament de les mateixes subunitats a la línia HK-2, en canvi genera efectes totalment diferents als observats en les 786-O. Així les línies HK-2 shCK2 α quan es comparen amb les control, s'observa un clar augment de la taxa de divisió cel·lular, mentre que les HK-2 shCK2 β hi ha una lleugera disminució de la proliferació (encara que no és significativa) quan es comparen amb les mateixes línies control. Tal com s'ha dit, l'explicació podria ser deguda a les relacions entre les subunitats catalítiques i reguladores resultants, observant-se que en les línies HK-2 shCK2 β tenen poc holoenzim i una important quantitat de CK2 α lliure, mancant de la presència de CK2 α' . Per altra banda les línies HK-2 shCK2 α hi ha un predomini de la forma holoenzimàtica de CK2 al torn que la subunitat de CK2 lliure resultant en aquestes es tractaria de CK2 β . També cal destacar que aquesta darrera línia es caracteritza per presentar menys CK2 α' que la 786-O shCK2 α . La línia 786-O shCK2 α , al presentar uns majors nivells de

CK2 α' i un menor silenciament de la subunitat reguladora, el desequilibri en les relacions entre les diferents subunitats no és tan evident com el mostrat en HK-2 shCK2 α , fet que podria explicar el diferent comportament proliferatiu entre les dues línies silenciades per la mateixa subunitat.

D'altra banda, existeixen també estudis en llevats i en oòcits de ratolins en què mostren que l'expressió en excés de CK2 β causa una disminució del seu creixement. Així Chen et al proposen un model en què l'excés de CK2 β cel·lular s'uniria a c-mos, una proteïna d'unió específica de la forma CK2 β lliure, inhibint-lo i reduint així la proliferació cel·lular [144].

De nou, l'explicació proposada dels efectes oposats en les alteracions de les subunitats en funció del model d'estudi vindrien degudes a les necessitats de CK2 per la funcionalitat d'aquell tipus cel·lular en qüestió, considerant que alteracions entre les relacions de les subunitats juntament amb la combinació de proteïnes d'interacció amb les formes de CK2 específiques o més expressades podrien donar lloc a les diferents respostes cel·lulars observades.

1.5. ALTERACIONS EN CK2 CAUSEN CANVIS FENOTÍPICS EN LES LÍNIES CELULARS

S'ha descrit que un dels processos essencials per què continuï la progressió tumoral és la invasió tissular i metastasis, processos facilitats per l'adquisició d'un fenotip mesenquimal per part de les cèl·lules epitelials i que es coneix com a EMT.

En l'estudi, l'anàlisi de la morfologia de les línies renals silenciades per les subunitats de CK2 va mostrar que aquestes adquirien característiques pròpies de les cèl·lules sotmeses a una EMT. Així el silenciament tant de CK2 α com de CK2 β causa un canvi de la morfologia de HK-2 i de 786-O, observant-se un increment de cèl·lules amb forma amorfa, front les més típicament fusiformes de les línies control shCV. D'altra banda, aquestes línies presenten un augment del nombre de fil·lopodis de contacte entre cèl·lules, característica observada a la línies sotmeses a EMT totals i parcials, probablement implicada a la migració cel·lular coordinada de les cèl·lules mesenquimals [128]. Una altra característica observada en les línies 786-O shCK2 α i 786-O shCK2 β és que en assolir la confluència mostren un menor grau de compactació entre cèl·lules (indicant una reducció de les unions intercel·lulars). Aquesta propietat juntament amb la ja esmentada presència de fil·lopodis de contacte es consideren trets propis de les cèl·lules sotmeses a EMT.

Apart d'aquests canvis morfològics, el silenciament de les subunitats causa canvis en la mida cel·lular així com en les relacions entre nucli i citoplasma. D'aquesta manera, les silenciades en CK2 β incrementen el seu volum, tal com hem registrat en els estadiatge més avançats del ccRCC, caracteritzats també per presentar uns nivells baixos de les subunitats reguladores i unes relacions CK2 α /CK2 β elevades. En el cas de la línia 786-O shCK2 β , l'increment de volum va associat en un augment de la mida del nucli, característica de ccRCC amb grau nuclear avançat i predominants en estadiatge elevats del tumor. Així mateix cal destacar que en les línies silenciades per CK2 β s'observen estructures vesiculars i granulars al voltant dels nuclis que podrien coincidir amb vesícules primerenques dels grànuls rics en lípids i glicogen característics de les cèl·lules de ccRCC. Molts grups han associat la formació d'aquestes

vesícules amb alteracions del metabolisme glucídic i en la via d'hipòxia, punt on CK2 està implicada. Així estudis en els quals s'observava l'acumulació de intermediaris del cicle de Krebs, hi havia alteracions en les vies de resposta a hipòxia, al torn que apareixia un increment de la captació de glucosa per suplir aquestes alteracions [30].

És també destacable el fet que les línies silenciades per qualsevol de les dues subunitats de CK2 augmenten la seva migració cel·lular, fenomen atribuïble de nou a les cèl·lules neoplàsiques metastàsiques i a línies mesenquimals. De forma més concreta, el silenciament de CK2 β en les dues línies renals causa un augment en la taxa de migració cel·lular superior al obtingut en línies interferides per CK2 α . Apart de les diferències en les velocitats de migració, també s'observa que les línies amb major migració tenen un comportament migratori més aberrant, presentant també una major capacitat d'infiltració al front contrari, indicant la possibilitat del seu major potencial invasiu. És important destacar, que tant les línies HK-2 shCK2 β i les 786-O silenciades tant per CK2 α com per CK2 β , presenten el fenomen de inhibició de locomoció per contacte (CIL) en el qual les cèl·lules canvien la direcció del seu desplaçament, considerada per molts autors com un mecanisme de dispersió de les cèl·lules mesenquimàtiques i tumorals dins del teixit [127].

La capacitat de creixement independent de l'ancoratge és una altra característica de les cèl·lules tumorals i que s'ha trobat alterada en les línies cel·lulars silenciades per les subunitats de CK2. Aquest fenomen és molt important a la línia HK-2 shCV, que igual que la línia parental HK-2 wt, és incapaç de créixer en agar tou, indicant la necessitat de créixer adherides al substrat. El silenciament tant de CK2 α com de CK2 β en HK-2 dóna lloc a la formació de colònies, caracteritzant-se les HK-2 shCK2 β per presentar unes colònies de menor mida que les HK-2 shCK2 α , fet atribuïble a la ja mencionada menor taxa de proliferació cel·lular. Els efectes del silenciament de CK2 β sobre el creixement independent d'ancoratge han estat també observats per altres grups en les línies MCF10A, les quals després de ser silenciades per la subunitat reguladora de CK2, adquirien també la propietat de créixer en agar tou [136]. Les línies 786-O, en canvi, poden créixer ja per si en aquest medi, però a diferència de les anteriors línies, el silenciament de CK2 α és el que causa un major increment en el nombre de colònies obtingudes, fet atribuïble de nou a les diferents relacions existents entre subunitats de CK2 en ambdues línies. Igual com passava amb les anteriors línies, la mida de les colònies s'associa amb la taxa de proliferació en 786-O, observant-se que les 786-O shCK2 β són les que menor nombre i mida de colònies generen.

El conjunt de característiques descrites com els canvis en les morfologies i estructures, així com en la migració i el creixement independent d'ancoratge indica que desregulacions en els nivells de CK2 generen canvis en les cèl·lules epitelials renals, induint-los un fenotip mesenquimàtic.

1.6. CK2 AFECTA A L'EXPRESSION DE LA E-CADHERINA

La disminució dels nivells de E-cadherina en les cèl·lules epitelials, acompanyada per l'augment de proteïnes d'expressió mesenquimàtiques tals com N-cadherina, ha estat tradicionalment considerada com a marcadors moleculars del fenomen de EMT [127].

L'anàlisi immunològic per western blot de les línies renals silenciades han mostrat que el silenciament de les subunitats de CK2 tenen efectes sobre l'expressió de la E-cadherina, observant-se una reducció dels nivells d'aquesta proteïna en les línies silenciades HK-2 shCK2 α i shCK2 β , essent major en aquestes últimes. A les línies 786-O interferides també s'observa aquesta disminució en augmentar l'exposició dels films fotogràfics, ja que de per sí, aquestes línies tenen nivells baixos de E-cadherina, atribuïble en part per la absència de pVHL. Pel què fa als nivells de la resta de marcadors proteïcs mesenquimàtics tals com N-caderina, no augmenten les seves expressions tal com s'esperaria d'una EMT convencional, obtenint diferents resultats en funció de la línia davant del mateix tipus de subunitat de CK2 silenciada. Així mentre en les HK-2 interferides els seus nivells pateixen una lleugera reducció, en les 786-O silenciades la seva disminució és clarament més marcada. Cal destacar que la reducció de l'expressió d'aquestes cadherines ocorre també a nivell del mRNA, indicant que la regulació dels nivells d'aquestes esdevé a nivell transcripcional. Resultats semblants han estat descrits també per altres grups com Deshiere [50,136,145], en el que han proposat que el silenciament de CK2 β és responsable de generar una TEM de les cèl·lules epitelials en càncer de mama i que la seva presència fa que les cèl·lules mantinguin l'expressió de E-cadherina, essencial pel manteniment de les característiques epitelials cel·lulars. De forma més concreta han elaborat un model que explicaria com els nivells de CK2 β cel·lulars tindrien efectes en el manteniment del fenotip epitelial [141]

El fet que el silenciament de la subunitat catalítica en les nostres línies (shCK2 α) donin també lloc a una reducció dels nivells de E-cadherina, és atribuïble a la disminució dels nivells de CK2 β registrades en aquestes línies, concordant també amb els resultats observats en el silenciament de CK2 β per Deshiere [141]

1.7. LA DESREGULACIÓ DE LES SUBUNITATS DE CK2 CAUSA UNA EMT-PARCIAL.

El conjunt de resultats obtinguts durant la caracterització fenotípica de les línies silenciades per CK2 han mostrat que el silenciament de tant de CK2 α com de CK2 β causa una disminució dels nivells de E-cadherina, la qual es considera com a principal indicador del fenomen de EMT. El fet que en aquestes línies no s'observi un augment de l'expressió de marcadors mesenquimàtics, indica que no ens trobem davant d'una EMT completa, sinó d'una EMT parcial o també anomenada pseudo-EMT. Aquesta EMT parcial està caracteritzada per la disminució de la E-cadherina i l'aparició d'altres característiques fenotípiques típicament pròpies de cèl·lules mesenquimàtiques, com són el creixement independent d'ancoratge, l'augment de la invasivitat cel·lular o l'aparició de fil·lopodis transitoris de connexió intercel·lulars, característiques observades en les nostres línies interferides per les subunitats de CK2.

Així s'observa que les línies HK-2 shCK2 β , que presenten un menor nivell d'expressió de E-cadherina, són les que presenten una major velocitat de migració, una major taxa d'infiltració en les cèl·lules del front contrari i un moviment cel·lular menys lineal acompanyat pel fenomen de inhibició de locomoció per contacte. De la mateixa manera són les que presenten un major increment del nombre de colònies en agar tou així com una morfologia més amorfa, un augment dels fil·lopodis i una menor compactació

cel·lular en assolir la confluència. De forma molt semblant, les línies 786-O shCK2 β presenten molts d'aquests mateixos trets fenotípics quan es comparen amb les 786-O shCV, mostrant una major velocitat de migració, així com una moviment més aberrant i una major infiltració dins del front contrari. Les 786-O shCK2 β també mostren menor compactació en assolir l'estat de confluència així com una morfologia més amorfa i un augment del volum cel·lular i del nombre de fil·lopodis.

D'aquesta manera, coincidint amb el model de Deshiere [136], les línies amb menor nivell de CK2 β i per tant d'holoenzim (HK-2 shCK2 β i 786-O shCK2 β) presenten característiques de cèl·lules mesenquimàtiques. Aquest mateix fet explicaria també perquè les dues línies silenciades en CK2 α presenten un fenotip mesenquimàtic menys pronunciat, indicant que la reducció de CK2 β observada en aquestes línies podria ser-ne la responsable.

El fet que les 786-O shCK2 β presentin menors canvis cap al fenotip mesenquimàtic podria ser explicat per dos motius, d'una banda el menor silenciament de CK2 β compensaria aquestes diferències en certes característiques i d'altra banda, el caràcter ja parcialment mesenquimàtic mostrat en les cèl·lules 786-O shCV, ocasionat per la manca de pVHL, implicat també en el desenvolupament de característiques mesenquimàtiques [30].

1.8. LES DESREGULACIONS EN ELS NIVELLS DE LES SUBUNITATS DE CK2 AFECTEN TRES ELEMENTS CLAU DE LA PROGRESSIÓ TUMORAL.

Els resultats obtinguts podrien indicar que els desequilibris en les subunitats de CK2 actuen sobre tres característiques claus de la progressió tumoral: l'increment de la proliferació, la migració i invasivitat cel·lular i probablement la inhibició apoptòtica.

Així s'ha observat que les línies HK-2 shCK2 β i 786-O shCK2 β , caracteritzades per presentar majors capacitats migratòries i invasives, són les que menors nivells de CK2 β presenten, trobant-se relacions elevades de CK2 α /CK2 β tal com ocorria en els ccRCC d'estadiatges avançats (pT4) caracteritzats per ser més invasius i metastàsics. També cal dir que aquestes tenen petites vesícules que podrien correspondre a les vesícules de lípids i glicogen presents en els ccRCC, així com una major mida (fet característic també dels ccRCC de estadiatge avançat).

Per altra banda, l'increment de CK2 α nuclear observat en tots els estadiatges del ccRCC podria estar relacionat amb una funció protectora de la cèl·lula davant l'apoptosi cel·lular, fenomen documentat en altres estudis [115][95] i que permetrien a les cèl·lules transformants evadir la mort cel·lular programada durant la progressió tumoral.

Pel què fa a la proliferació, s'ha observat que aquesta no es correlaciona amb la capacitat invasiva de la cèl·lula, observant-se que el silenciament d'una mateixa subunitat pot causar un increment o disminució del creixement en funció de la línia cel·lular, fet possiblement explicable per les composicions diferencials de les formes holoenzimàtiques i lliures de CK2 cel·lulars, així com la composició de les diferents proteïnes d'interacció i substrats de CK2 que serien característiques de la línia cel·lular en qüestió. En el mateix sentit, el silenciament d'aquestes subunitats afecta a la capacitat de créixer en

condicions independents d'ancoratge, propietat característica també de les cèl·lules que presenten característiques invasives.

Això fa hipotetitzar que les variacions en les relacions entre subunitats de CK2 al llarg de la tumorigènesis intervindrien de forma progressiva en les diferents etapes de la progressió neoplàsica, donant lloc a les diferents característiques tumorals.

Així en els estadiatges primerencs del tumor, hi ha una translocació de CK2 α a nucli, probablement protegint la cèl·lula transformant de l'apoptosi. El fet que els nivells de CK2 α nuclears es mantinguin constants durant tota la progressió del ccRCC podria explicar la possible resistència del ccRCC als agents radioteràpics i quimioteràpics [5].

De la mateixa manera, l'increment de la subunitat reguladora causaria el desplaçament d'aquesta a estructures membranoses, podent contribuir a la pèrdua de la polaritat cel·lular, procés en el qual CK2 sembla intervenir i que s'ha considerat previ a la EMT. A mesura que el tumor progressa disminueixen els nivells de CK2 β , fins que als estadiatges avançats (pT3 i pT4) els nivells de CK2 β disminueixen suficientment per ser incapaços de mantenir les propietats epitelials de la cèl·lula, apareixent la despolarització i pèrdua d'interaccions intercel·lulars. Això permetria la migració i invasió cel·lular als teixits pròxims i més distals, dispersant-se dins del teixit i donant lloc als tumors metastàtics.

Malgrat això, encara falta per elucidar els mecanismes que donarien lloc a les desregulacions inicials de les subunitats de CK2. El fet que en les línies cel·lulars el silenciament de les subunitats catalítiques tingui un efecte reductor en els nivells de CK2 β , al torn que el silenciament de CK2 β tingui un efecte recíproc sobre els nivells de CK2 α , indicant la possible existència d'un mecanisme ràpid de regulació entre subunitats, que intervindria en el manteniment de l'equilibri estequiomètric entre aquestes, evitant així possibles processos patològics cel·lulars.

VI. CONCLUSIONS

1. CONCLUSIONS

1. En ccRCC existeix una correlació inversa entre els nivells d'expressió de CK2 β i l'estadiatge tumoral, observant-se un increment de la seva expressió en els estadiatges primerencs (pT1) respecte al teixit normal i una disminució a mesura que augmenta l'estadiatge, presentant en els estadiatges avançats (pT3+pT4) nivells de CK2 β menors que els del teixit renal sa. Els nivells de CK2 α en les mostres analitzades mostren una elevada dispersió i no s'observa cap correlació amb l'estadiatge.

Com a conseqüència de les variacions dels nivells de CK2 β en funció de l'estadiatge, apareixen canvis en les relacions existents entre les subunitats catalítiques i reguladores de CK2. D'aquesta forma, en estadiatges baixos (pT1) les relacions CK2 α /CK2 β són baixes, mentre que als avançats (pT3+pT4) les relacions CK2 α /CK2 β són altes.

2. Apart dels canvis en els nivells d'expressió de les subunitats, en ccRCC s'ha observat canvis en la localització d'aquestes ja a les etapes més primerenques de la neoplàsia (pT1) i es mantenen durant tota la progressió tumoral. D'aquesta forma hi ha un augment considerable dels nivells de CK2 α nuclears a expenses d'una lleugera reducció dels seus nivells citoplasmàtics. CK2 β s'ha detectat una dràstica reducció dels nivells citoplasmàtics, acompanyats per l'increment d'aquesta tant a nucli com a la membrana plasmàtica, observant-se una disminució de la tinció a membrana a mesura que augmenta l'estadiatge.
3. La disminució de l'expressió mitjançant el silenciament estable de CK2 α o de CK2 β en les línies HK-2 i 786-O no compromet a la seva viabilitat.
4. S'ha observat que el silenciament estable de CK2 α causa una lleugera disminució dels nivells de CK2 β en les línies HK-2 i 786-O, mentre que el silenciament de CK2 β redueix dràsticament els nivells de CK2 α en les mateixes línies renals. Això genera apart dels esmentats canvis en les relacions entre subunitats, variacions en el tipus de subunitats catalítiques que constituiran l'holoenzim així com canvis en la predominança del tipus de forma holoenzimàtica i subunitats lliures de CK2 en funció del tipus cel·lular.
5. Les línies silenciades en CK2 β presenten nivells baixos de holoenzim i uns nivells elevats de CK2 α lliure, coincidint amb els estadiatges avançats del ccRCC (pT3+pT4). Les línies silenciades per CK2 α tenen en canvi una predominança de les formes holoenzimàtiques de CK2 així com un augment dels nivells de CK2 β lliure, de forma anàloga als estadiatge baixos del ccRCC (pT1).

6. Només la línia HK-2 shCK2 α presenta un augment de la translocació de la subunitat catalítica a nucli. El fet que aquesta sigui la línia amb majors nivells de CK2 α lliures s'hipotetitzaria que un excés de CK2 α lliure podria promoure la seva translocació nuclear.
7. El silenciament de les subunitats de CK2 té efectes diferents segons la línia cel·lular silenciada. Així el silenciament tant de CK2 α com de CK2 β en les cèl·lules 786-O causen una reducció significativa en la velocitat de creixement quan són comparades amb les línies control 786-O shCV, mentre que només el silenciament de CK2 α causa canvis en la proliferació de HK-2, augmentant significativament quan es comparen amb les línies control HK-2 shCV.
8. Les línies interferides per les subunitats CK2 α i CK2 β presenten canvis morfològics propis de les cèl·lules sotmeses a una EMT, tals com una morfologia més amorfa, l'increment de fil·lopodis de contacte entre cèl·lules així com un menor grau de compactació en assolir la confluència. De la mateixa manera, el silenciament de la subunitat CK2 β tant en 786-O com en HK-2 genera un augment de la seva mida cel·lular, característica compartida també per els ccRCC de graus i estadiatge avançats.
9. El silenciament de les subunitats de CK2 tant en 786-O com en HK-2, causen canvis en la capacitat de formació de colònies en agar tou. Aquest fet és destacat sobretot en HK-2, en què les HK-2 shCV són incapaces de créixer en aquest suport, mentre que les HK-2 shCK2 α i HK-2 shCK2 β sí, observant-se una major formació de colònies en aquestes últimes.
10. El silenciament tant de CK2 α com de CK2 β causa un increment de la taxa de migració cel·lular tant en HK-2 com en 786-O, observant-se en les dues línies que les interferides en CK2 β són les que presenten major migració. Al seu torn les línies amb major migració presenten també un comportament migratori més aberrant, una major capacitat d'infiltració al front contrari i fenòmens de inhibició de locomoció per contacte (CIL).
11. El silenciament de CK2 α i de CK2 β en les línies HK-2 i 786-O causa una reducció de l'expressió del marcador epitelial E-cadherina, essent major en el cas de les línies interferides per CK2 β . Aquesta reducció en l'expressió de E-cadherina actua a nivell transcripcional, afectant d'aquesta forma els nivells de la proteïna. Les línies 786-O ja presenten per sí uns nivells molt baixos de E-cadherina, disminuint encara més en donar-se el silenciament de les subunitats de CK2.
12. El silenciament de les subunitats de CK2 en aquestes línies els hi causa una EMT parcial o pseudo-EMT, caracteritzada per no presentar totes les característiques d'una EMT completa.

13. Els desequilibris en les subunitats de CK2 actuen en punts claus de la progressió tumoral tals com l'augment de la proliferació, la migració cel·lular i l'adquisició d'un fenotip cel·lular mesenquimàtic.

14. Els resultats obtinguts ens fan plantejar que els canvis en les relacions entre les subunitats de CK2 al llarg de la neoplàsia, intervindria de manera progressiva en les diferents etapes de la progressió tumoral.

VII. BIBLOGRAFIA

1. BIBLIOGRAFIA

- 1 Ng, C. S., Wood, C. G., Silverman, P. M., Tannir, N. M., Tamboli, P. and Sandler, C. M. (2008) Renal cell carcinoma: diagnosis, staging, and surveillance. *AJR. Am. J. Roentgenol.* **191**, 1220–32.
- 2 Torres, I. (2005) Carcinoma de Células Claras y Carcinoma de Células Renales Quístico Multilocular. *Comun. XXII Congr. la Soc. Española Anatomía Patológica* 20–23.
- 3 Ljungberg, B., Cowan, N., Hanbury, D. C., Hora, M., Kuczyk, M. A., Merseburger, A. S., Mulders, P. F. A., Patard, J. and Sinescu, I. C. (2010) Guidelines on Renal Cell Carcinoma.
- 4 Zhou, M. and He, H. (2013) Pathology of Renal Cell Carcinoma. *Curr. Clin. Urol.* (Campbell, S. C., and Rini, B. I., eds.), Humana Press, Totowa, NJ 23–41.
- 5 Drucker, B. J. (2005) Renal cell carcinoma: current status and future prospects. *Cancer Treat. Rev.* **31**, 536–45.
- 6 Cohen, H. T. and McGovern, F. J. (2005) Renal-cell carcinoma. *N. Engl. J. Med.* **353**, 2477–90.
- 7 Flocks, R. H. and Kadesky, M. C. (1958) Malignant neoplasms of the kidney; an analysis of 353 patients followed five years or more. *J. Urol.* **79**, 196–201.
- 8 Robson, C. J., Churchill, B. M. and Anderson, W. (1969) The results of radical nephrectomy for renal cell carcinoma. *J. Urol.* **101**, 297–301.
- 9 López, R. A. M., Sánchez, J. M. C., Ruiz, C. B. C., Resina, R. G., Navarro, S. M. and Romero, F. J. T. (2009) Factores pronósticos del carcinoma de células renales. *Actas Urol. Esp.* **33**, 575–583.
- 10 Ljungberg, B., Campbell, S. C., Choi, H. Y., Cho, H. Y., Jacqmin, D., Lee, J. E., Weikert, S. and Kiemeny, L. a. (2011) The epidemiology of renal cell carcinoma. *Eur. Urol.* **60**, 615–21.
- 11 Häggström, C., Rapp, K., Stocks, T., Manjer, J., Bjørge, T., Ulmer, H., Engeland, A., Almqvist, M., Concin, H., Selmer, R., et al. (2013) Metabolic factors associated with risk of renal cell carcinoma. *PLoS One* **8**, e57475.
- 12 Kume, H., Takahashi, S., Teramoto, S. and Isurugi, K. (2001) Risk factors for adult renal cell carcinoma: a systematic review and implications for prevention. *BJU Int.* **88**, 804.
- 13 Baldewijns, M. M. L., van Vlodrop, I. J. H., Schouten, L. J., Soetekouw, P. M. M. B., de Bruïne, A. P. and van Engeland, M. (2008) Genetics and epigenetics of renal cell cancer. *Biochim. Biophys. Acta* **1785**, 133–55.
- 14 Lipworth, L., Tarone, R. E., Lund, L. and McLaughlin, J. K. (2009) Epidemiologic characteristics and risk factors for renal cell cancer. *Clin. Epidemiol.* **1**, 33–43.
- 15 Rini, B. I., Campbell, S. C. and Escudier, B. (2009) Renal cell carcinoma. *Lancet*, Elsevier Ltd **373**, 1119–32.
- 16 American Cancer Society. Kidney Cancer (Adult) - Renal Cell Carcinoma Overview.

- 17 Ljungberg, B., Cowan, N. C., Hanbury, D. C., Hora, M., Kuczyk, M. a, Merseburger, A. S., Patard, J.-J., Mulders, P. F. a and Sinescu, I. C. (2010) EAU guidelines on renal cell carcinoma: the 2010 update. *Eur. Urol., European Association of Urology* **58**, 398–406.
- 18 J. Cooper, S., W. Tun, H., M. Roper, S., Kim, Y., Kislinger, T., Drake, R. R. and Copland, J. A. (2012) Current Status of Biomarker Discovery in Human clear Cell Renal Cell Carcinoma. *J. Mol. Biomark. Diagn.* **01**, 1–10.
- 19 Li, B. M. and Rathmell, W. K. (2011) The Current Status of Biomarkers for Renal Cell Carcinoma. *Am. Soc. Clin. Oncol.* 153–157.
- 20 Truong, L. D. and Shen, S. S. (2011) Immunohistochemical diagnosis of renal neoplasms. *Arch. Pathol. Lab. Med.* **135**, 92–109.
- 21 Svastova, E., Witariski, W., Csaderova, L., Kosik, I., Skvarkova, L., Hulikova, A., Zatovicova, M., Barathova, M., Kopacek, J., Pastorek, J., et al. (2012) Carbonic anhydrase IX interacts with bicarbonate transporters in lamellipodia and increases cell migration via its catalytic domain. *J. Biol. Chem.* **287**, 3392–402.
- 22 Radvak, P., Repic, M., Svastova, E., Takacova, M., Csaderova, L., Strnad, H., Pastorek, J., Pastorekova, S. and Kopacek, J. (2013) Suppression of carbonic anhydrase IX leads to aberrant focal adhesion and decreased invasion of tumor cells. *Oncol. Rep.* **29**, 1147–53.
- 23 Monroy, L. E., Patricia, M. and Vargas, S. (2011) Anhidrasa carbónica, nuevas perspectivas. *Neumol Cir Torax* **69**, 200–209.
- 24 Vilà, M. R., Nicolás, a, Morote, J., De, I. and Meseguer, a. (2000) Increased glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase expression in renal cell carcinoma identified by RNA-based, arbitrarily primed polymerase chain reaction. *Cancer* **89**, 152–64.
- 25 Vilà, M. R., Kaplan, G. G., Feigelstock, D., Nadal, M., Morote, J., Porta, R., Bellmunt, J. and Meseguer, A. (2004) Hepatitis A virus receptor blocks cell differentiation and is overexpressed in clear cell renal cell carcinoma. *Kidney Int.* **65**, 1761–1773.
- 26 Cuadros, T., Trilla, E., Vilà, M. R., de Torres, I., Vilardell, J., Messaoud, N. Ben, Salcedo, M., Sarró, E., López-Hellin, J., Blanco, A., et al. (2013) Hepatitis A virus cellular receptor 1/kidney injury molecule-1 is a susceptibility gene for clear cell renal cell carcinoma and hepatitis A virus cellular receptor/kidney injury molecule-1 ectodomain shedding a predictive biomarker of tumour progression. *Eur. J. Cancer* **49**, 2034–47.
- 27 Bailly, V., Zhang, Z., Meier, W., Cate, R., Sanicola, M. and Bonventre, J. V. (2002) Shedding of kidney injury molecule-1, a putative adhesion protein involved in renal regeneration. *J. Biol. Chem.* **277**, 39739–48.
- 28 Yao, M., Tabuchi, H., Nagashima, Y., Baba, M., Nakaigawa, N., Ishiguro, H., Hamada, K., Inayama, Y., Kishida, T., Hattori, K., et al. (2005) Gene expression analysis of renal carcinoma: adipose differentiation-related protein as a potential diagnostic and prognostic biomarker for clear-cell renal carcinoma. *J. Pathol.* **205**, 377–87.
- 29 Linehan, W. M. and Zbar, B. (2004) Focus on kidney cancer. *Cancer Cell* **6**, 223–8.
- 30 Giaccia, A., Kurban, G., Pause, A. and Frydman, J. (2013) State-of-the-science : An update on renal cell carcinoma. *Mol. Cancer Res.* **10**, 859–880.

- 31 Singh, P., Carraher, C. and Schwarzbauer, J. E. (2010) Assembly of fibronectin extracellular matrix. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **26**, 397–419.
- 32 Kurban, G., Hudon, V., Duplan, E., Ohh, M. and Pause, A. (2006) Characterization of a von Hippel Lindau pathway involved in extracellular matrix remodeling, cell invasion, and angiogenesis. *Cancer Res.* **66**, 1313–9.
- 33 Ohh, M., Yauch, R. L., Lonergan, K. M., Whaley, J. M., Stemmer-Rachamimov, a O., Louis, D. N., Gavin, B. J., Kley, N., Kaelin, W. G. and Iliopoulos, O. (1998) The von Hippel-Lindau tumor suppressor protein is required for proper assembly of an extracellular fibronectin matrix. *Mol. Cell* **1**, 959–68.
- 34 Grosfeld, A., Stolze, I. P., Cockman, M. E., Pugh, C. W., Edelmann, M., Kessler, B., Bullock, A. N., Ratcliffe, P. J. and Masson, N. (2007) Interaction of hydroxylated collagen IV with the von hippel-lindau tumor suppressor. *J. Biol. Chem.* **282**, 13264–9.
- 35 Chalhoub, N. and Baker, S. J. (2009) PTEN and the PI3-kinase pathway in cancer. *Annu. Rev. Pathol.* **4**, 127–50.
- 36 Liu, S., Ma, X., Ai, Q., Huang, Q., Shi, T., Zhu, M., Wang, B. and Zhang, X. (2013) NOTCH1 functions as an oncogene by regulating the PTEN/PI3K/AKT pathway in clear cell renal cell carcinoma. *Urol. Oncol.* **31**, 938–48.
- 37 Velickovic, M., Delahunt, B., McIver, B. and Grebe, S. K. G. (2002) Intragenic PTEN/MMAC1 loss of heterozygosity in conventional (clear-cell) renal cell carcinoma is associated with poor patient prognosis. *Mod. Pathol.* **15**, 479–85.
- 38 Di Maira, G., Salvi, M., Arrigoni, G., Marin, O., Sarno, S., Brustolon, F., Pinna, L. a and Ruzzene, M. (2005) Protein kinase CK2 phosphorylates and upregulates Akt/PKB. *Cell Death Differ.* **12**, 668–77.
- 39 Di Maira, G., Brustolon, F., Pinna, L. a and Ruzzene, M. (2009) Dephosphorylation and inactivation of Akt/PKB is counteracted by protein kinase CK2 in HEK 293T cells. *Cell. Mol. Life Sci.* **66**, 3363–73.
- 40 Brugarolas, J., Lei, K., Hurley, R. L., Manning, B. D., Reiling, J. H., Hafen, E., Witters, L. A., Ellisen, L. W. and Jr, W. G. K. (2004) Regulation of mTOR function in response to hypoxia by REDD1 and the TSC1 / TSC2 tumor suppressor complex 2893–2904.
- 41 Imada, K. and Leonard, W. J. (2000) The Jak-STAT pathway. *Mol. Immunol.* **37**, 1–11.
- 42 Timofeeva, O. a, Plisov, S., Evseev, a a, Peng, S., Jose-Kampfner, M., Lovvorn, H. N., Dome, J. S. and Perantoni, a O. (2006) Serine-phosphorylated STAT1 is a prosurvival factor in Wilms' tumor pathogenesis. *Oncogene* **25**, 7555–64.
- 43 Hui, Z., Tretiakova, M., Zhang, Z., Li, Y., Wang, X., Zhu, J. X., Gao, Y., Mai, W., Furge, K., Qian, C.-N., et al. (2009) Radiosensitization by inhibiting STAT1 in renal cell carcinoma. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **73**, 288–95.
- 44 Cohen, P. (2000) The regulation of protein function by multisite phosphorylation--a 25 year update. *Trends Biochem. Sci.* **25**, 596–601.

- 45 Litchfield, D. W. (2003) Protein kinase CK2: structure, regulation and role in cellular decisions of life and death. *Biochem. J.* **369**, 1–15.
- 46 St-Denis, N. a and Litchfield, D. W. (2009) Protein kinase CK2 in health and disease: From birth to death: the role of protein kinase CK2 in the regulation of cell proliferation and survival. *Cell. Mol. Life Sci.* **66**, 1817–29.
- 47 Johnson, S. A. and Hunter, T. (2005) Kinomics : methods for deciphering the kinome **2**, 17–25.
- 48 Pallares, J., Llobet, D., Santacana, M., Eritja, N., Velasco, A., Cuevas, D., Lopez, S., Palomar-Asenjo, V., Yeramian, A., Dolcet, X., et al. (2009) CK2beta is expressed in endometrial carcinoma and has a role in apoptosis resistance and cell proliferation. *Am. J. Pathol., American Society for Investigative Pathology* **174**, 287–96.
- 49 Stalter, G., Siemer, S., Becht, E., Ziegler, M., Remberger, K. and Issinger, O. G. (1994) Asymmetric expression of protein kinase CK2 subunits in human kidney tumors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **202**, 141–147.
- 50 Deshiere, A., Duchemin-Pelletier, E., Spreux, E., Ciais, D., Forcet, C., Cochet, C. and Filhol, O. (2011) Regulation of epithelial to mesenchymal transition: CK2 β on stage. *Mol. Cell. Biochem.* **356**, 11–20.
- 51 Zou, J., Luo, H., Zeng, Q., Dong, Z., Wu, D. and Liu, L. (2011) Protein kinase CK2 α is overexpressed in colorectal cancer and modulates cell proliferation and invasion via regulating EMT-related genes. *J. Transl. Med., BioMed Central Ltd* **9**, 97.
- 52 Filhol, O. and Cochet, C. (2009) Protein kinase CK2 in health and disease: Cellular functions of protein kinase CK2: a dynamic affair. *Cell. Mol. Life Sci.* **66**, 1830–9.
- 53 Moreno-Romero, J., Armengot, L., Marquès-Bueno, M. M., Cadavid-Ordóñez, M. and Martínez, M. C. (2011) About the role of CK2 in plant signal transduction. *Mol. Cell. Biochem.* **356**, 233–40.
- 54 Kubiński, K., Domańska, K., Sajnaga, E., Mazur, E., Zieliński, R. and Szyszka, R. (2007) Yeast holoenzyme of protein kinase CK2 requires both beta and beta' regulatory subunits for its activity. *Mol. Cell. Biochem.* **295**, 229–36.
- 55 Bibby, A. C. and Litchfield, D. W. (2005) The multiple personalities of the regulatory subunit of protein kinase CK2: CK2 dependent and CK2 independent roles reveal a secret identity for CK2beta. *Int. J. Biol. Sci.* **1**, 67–79.
- 56 Olsten, M. E. K. and Litchfield, D. W. (2004) Order or chaos ? An evaluation of the regulation of protein kinase CK2 **1** **693**, 681–693.
- 57 Olsten, M. E. K., Weber, J. E. and Litchfield, D. W. (2005) CK2 interacting proteins: emerging paradigms for CK2 regulation? *Mol. Cell. Biochem.* **274**, 115–24.
- 58 Glover, C. V. (1998) On the physiological role of casein kinase II in *Saccharomyces cerevisiae*. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* **59**, 95–133.
- 59 Pinna, L. a. (2002) Protein kinase CK2: a challenge to canons. *J. Cell Sci.* **115**, 3873–3878.

- 60 Buchou, T., Vernet, M., Blond, O., Hans, H., Pointu, H., Olsen, B. B., Cochet, C., Issinger, O., Boldyreff, B. and Jensen, H. H. (2003) Disruption of the Regulatory β Subunit of Protein Kinase CK2 in Mice Leads to a Cell-Autonomous Defect and Early Embryonic Lethality Disruption of the Regulatory β Subunit of Protein Kinase CK2 in Mice Leads to a Cell-Autonomous Defect and Early Embryonic.
- 61 Litchfield, D. W., Bosc, D. G., Canton, D. a, Saulnier, R. B., Vilks, G. and Zhang, C. (2001) Functional specialization of CK2 isoforms and characterization of isoform-specific binding partners. *Mol. Cell. Biochem.* **227**, 21–9.
- 62 Shi, X., Potvin, B., Huang, T., Hilgard, P., Spray, D. C., Suadicani, S. O., Wolkoff, a W., Stanley, P. and Stockert, R. J. (2001) A novel casein kinase 2 alpha-subunit regulates membrane protein traffic in the human hepatoma cell line HuH-7. *J. Biol. Chem.* **276**, 2075–82.
- 63 Niefind, K., Raaf, J. and Issinger, O.-G. (2009) Protein kinase CK2 in health and disease: Protein kinase CK2: from structures to insights. *Cell. Mol. Life Sci.* **66**, 1800–16.
- 64 Niefind, K., Pütter, M., Guerra, B., Issinger, O. G. and Schomburg, D. (1999) GTP plus water mimic ATP in the active site of protein kinase CK2. *Nat. Struct. Biol.* **6**, 1100–3.
- 65 Yde, C. W., Ermakova, I., Issinger, O.-G. and Niefind, K. (2005) Inclining the purine base binding plane in protein kinase CK2 by exchanging the flanking side-chains generates a preference for ATP as a cosubstrate. *J. Mol. Biol.* **347**, 399–414.
- 66 Chantalat, L., Leroy, D., Filhol, O., Nueda, a, Benitez, M. J., Chambaz, E. M., Cochet, C. and Dideberg, O. (1999) Crystal structure of the human protein kinase CK2 regulatory subunit reveals its zinc finger-mediated dimerization. *EMBO J.* **18**, 2930–40.
- 67 Raaf, J., Brunstein, E. and Issinger, O. (2008) The interaction of CK2 a and CK2 b , the subunits of protein kinase CK2 , requires CK2 b in a preformed conformation and is enthalpically driven 2180–2186.
- 68 Niefind, K., Guerra, B., Ermakowa, I. and Issinger, O. G. (2001) Crystal structure of human protein kinase CK2: insights into basic properties of the CK2 holoenzyme. *EMBO J.* **20**, 5320–31.
- 69 Kannan, N. and Neuwald, A. F. (2004) Evolutionary constraints associated with functional specificity of the CMGC protein kinases MAPK , 2059–2077.
- 70 Bodenbach, L., I, J. F., Robitzki, A., Krehan, A., Lorenz, P. and Lozeman, F. J. (1994) Recombinant human casein kinase II site-directed autophosphorylation mutants and a bicistronically expressed holoenzyme **273**, 263–273.
- 71 Padmanabha, R., Chen-Wu, J. L., Hanna, D. E. and Glover, C. V. (1990) Isolation, sequencing, and disruption of the yeast CKA2 gene: casein kinase II is essential for viability in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **10**, 4089–99.
- 72 Channavajhala, P. and Seldin, D. C. (2002) Functional interaction of protein kinase CK2 and c-Myc in lymphomagenesis. *Oncogene* **21**, 5280–8.
- 73 Biologla, D. and Pp-, D. A. R. Protein kinase an enzyme with multiple substrates and a puzzling 313–323.
- 74 Canton, D. A., Zhang, C. and Litchfield, D. W. (2001) mutant of CK2 β **94**, 87–94.

- 75 Pagano, M. a, Sarno, S., Poletto, G., Cozza, G., Pinna, L. a and Meggio, F. (2005) Autophosphorylation at the regulatory beta subunit reflects the supramolecular organization of protein kinase CK2. *Mol. Cell. Biochem.* **274**, 23–9.
- 76 Graham, K. C. (2000) The Regulatory beta Subunit of Protein Kinase CK2 Mediates Formation of Tetrameric CK2 Complexes. *J. Biol. Chem.* **275**, 5003–5010.
- 77 Leroy, D., Heriché, J., Filhol, O., Chambaz, E. M. and Cochet, C. (1997) Binding of polyamines to an autonomous domain of the regulatory subunit of protein kinase CK2 induces a conformational change in the holoenzyme. A proposed role for the kinase stimulation. *J. Biol. Chem.* **272**, 20820–20827.
- 78 Meggio, F., Boldyreff, B., Issinger, O. G. and Piñna, L. A. (1994) Casein kinase 2 down-regulation and activation by polybasic peptides are mediated by acidic residues in the 55-64 region of the beta-subunit. A study with calmodulin as phosphorylatable substrate. *Biochemistry* **33**, 4336–42.
- 79 Zhang, C., Vilk, G., Canton, D. A. and Litch, D. W. (2002) Phosphorylation regulates the stability of the regulatory CK2b subunit 3754–3764.
- 80 Litchfield, D. W., Bosc, D. G. and Slominski, E. (1995) The protein kinase from mitotic human cells that phosphorylates Ser-209 on the casein kinase II beta-subunit is p34cdc2. *Biochim. Biophys. Acta* **1269**, 69–78.
- 81 Vosss, H., Wirknerq, U., Jakobiq, R., Hewitts, N. A., Schwagers, C., Zimmermanns, J., Ansorges, W. and Pyerinql, W. (1991) Structure of the gene encoding human casein kinase II subunit beta 13706–13711.
- 82 Lupp, S., Gumhold, C., Ampofo, E., Montenarh, M. and Rother, K. (2013) CK2 kinase activity but not its binding to CK2 promoter regions is implicated in the regulation of CK2 α and CK2 β gene expressions. *Mol. Cell. Biochem.*
- 83 Lüscher, B. and Litchfield, D. W. (1994) Biosynthesis of casein kinase II in lymphoid cell lines. *Eur. J. Biochem.* **220**, 521–6.
- 84 Donella-deana, A., Cesaro, L., Sarno, S., Brunati, A. M., Ruzzene, M., Pinna, L. A. and Biologica, C. (2001) α h subunits : implication of Tyr 182 **567**, 563–567.
- 85 Guerra, B., Siemer, S., Boldyreff, B. and Issinger, O. G. (1999) Protein kinase CK2: evidence for a protein kinase CK2beta subunit fraction, devoid of the catalytic CK2alpha subunit, in mouse brain and testicles. *FEBS Lett.* **462**, 353–7.
- 86 Meggio, F. and Pinna, L. a. (2003) One-thousand-and-one substrates of protein kinase CK2? *FASEB J.* **17**, 349–68.
- 87 Krek, W., Maridor, G. and Nigg, E. a. (1992) Casein kinase II is a predominantly nuclear enzyme. *J. Cell Biol.* **116**, 43–55.
- 88 Stigare, J., Buddelmeijer, N., Pigon, A. and Egyhazi, E. (1993) A majority of casein kinase II alpha subunit is tightly bound to intranuclear components but not to the beta subunit. *Mol. Cell. Biochem.* **129**, 77–85.

- 89 Faust, M., Jung, M., Günther, J., Zimmermann, R. and Montenarh, M. (2001) Localization of individual subunits of protein kinase CK2 to the endoplasmic reticulum and to the Golgi apparatus. *Mol. Cell. Biochem.* **227**, 73–80.
- 90 Martel, V., Filhol, O., Nueda, a, Gerber, D., Benitez, M. J. and Cochet, C. (2001) Visualization and molecular analysis of nuclear import of protein kinase CK2 subunits in living cells. *Mol. Cell. Biochem.* **227**, 81–90.
- 91 Filhol, O., Nueda, A., Gerber-scokaert, D., Jose, M., Souchier, C., Saoudi, Y. and Cochet, C. (2003) Live-Cell Fluorescence Imaging Reveals the Dynamics of Protein Kinase CK2 Individual Subunits. *Mol. Cell. Biol.* **23**, 975–987.
- 92 Sarrouilhe, D., Filhol, O., Leroy, D., Bonello, G., Baudry, M., Chambaz, E. M. and Cochet, C. (1998) The tight association of protein kinase CK2 with plasma membranes is mediated by a specific domain of its regulatory beta-subunit. *Biochim. Biophys. Acta* **1403**, 199–210.
- 93 Bachhuber, T., Almaça, J., Aldehni, F., Mehta, A., Amaral, M. D., Schreiber, R. and Kunzelmann, K. (2008) Regulation of the epithelial Na⁺ channel by the protein kinase CK2. *J. Biol. Chem.* **283**, 13225–32.
- 94 Bréchet, A., Fache, M.-P., Brachet, A., Ferracci, G., Baude, A., Irondelle, M., Pereira, S., Leterrier, C. and Dargent, B. (2008) Protein kinase CK2 contributes to the organization of sodium channels in axonal membranes by regulating their interactions with ankyrin G. *J. Cell Biol.* **183**, 1101–14.
- 95 Trembley, J. H., Wang, G., Unger, G., Slaton, J. and Ahmed, K. (2009) Protein kinase CK2 in health and disease: CK2: a key player in cancer biology. *Cell. Mol. Life Sci.* **66**, 1858–67.
- 96 Tawfic, S., Yu, S., Wang, H., Faust, R., Davis, a and Ahmed, K. (2001) Protein kinase CK2 signal in neoplasia. *Histol. Histopathol.* **16**, 573–82.
- 97 Landesman-Bollag, E., Channavajhala, P. L., Cardiff, R. D. and Seldin, D. C. (1998) p53 deficiency and misexpression of protein kinase CK2alpha collaborate in the development of thymic lymphomas in mice. *Oncogene* **16**, 2965–74.
- 98 Vilk, G., Saulnier, R. B., Pierre, R. S. and Litchfield, D. W. (1999) Inducible expression of protein kinase CK2 in mammalian cells. Evidence for functional specialization of CK2 isoforms. *J. Biol. Chem.* **274**, 14406–14414.
- 99 Pena, J. M., Itarte, E., Domingo, A., Pena, M. and Cusso, R. (1983) -independent Protein Kinases in Human Leukemic Cells 1172–1175.
- 100 Wang, L. G., Liu, X. M., Wikel, H. and Bloch, A. (1995) Activation of casein kinase II in ML-1 human myeloblastic leukemia cells requires IGF-1 and transferrin. *J. Leukoc. Biol.* **57**, 332–334.
- 101 Roig, J., Krehan, a, Colomer, D., Pyerin, W., Itarte, E. and Plana, M. (1999) Multiple forms of protein kinase CK2 present in leukemic cells: in vitro study of its origin by proteolysis. *Mol. Cell. Biochem.* **191**, 229–34.
- 102 Rayan, A., Goueli, S. A., Lange, P., Prostate, H. and Ahmed, K. (1985) Chromatin-associated Protein Kinases in Human Normal and Benign Hyperplastic Prostate Chromatin-associated Protein Kinases in Human Normal and Benign 2277–2282.

- 103 Yenice, S., Davis, A. T., Goueli, S. A., Akdas, A., Limas, C. and Ahmed, K. (1994) Nuclear casein kinase 2 (CK-2) activity in human normal, benign hyperplastic, and cancerous prostate. *Prostate* **24**, 11–6.
- 104 Münstermann, U., Fritz, G., Seitz, G., Lu, Y. P., Schneider, H. R. and Issinger, O. G. (1990) Casein kinase II is elevated in solid human tumours and rapidly proliferating non-neoplastic tissue. *Eur. J. Biochem.* **189**, 251–7.
- 105 Seitz, G., Münstermann, U., Schneider, H. R. and Issinger, O.-G. (1989) Characterization of casein kinase II in human colonic carcinomas after heterotransplantation into nude mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **163**, 635–641.
- 106 Ahmed, K. (1974) Increased phosphorylation of nuclear phosphoproteins in precancerous liver. *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.* **9**, 771–8.
- 107 Daya-makin, M., Sanghera, J. S., Mogentale, T. L., Squamous, H., Carcinomas, C., Hogg, J. C., Pelech, S. L. and Mogentale, L. (1994) Activation of a Tumor-associated Protein Kinase (p40 TAK) and Casein Kinase 2 in Human Squamous Cell Carcinomas and Adenocarcinomas of the Lung Activation of a Tumor-associated Protein Kinase (@ 40T @) and Casein Kinase 2 in 2262–2268.
- 108 Gapany, M., Faust, R. a, Tawfic, S., Davis, a, Adams, G. L. and Ahmed, K. (1995) Association of elevated protein kinase CK2 activity with aggressive behavior of squamous cell carcinoma of the head and neck. *Mol. Med.* **1**, 659–66.
- 109 Landesman-Bollag, E., Romieu-Mourez, R., Song, D. H., Sonenshein, G. E., Cardiff, R. D. and Seldin, D. C. (2001) Protein kinase CK2 in mammary gland tumorigenesis. *Oncogene* **20**, 3247–57.
- 110 Faust, R. a, Niehans, G., Gapany, M., Hoistad, D., Knapp, D., Cherwitz, D., Davis, a, Adams, G. L. and Ahmed, K. (1999) Subcellular immunolocalization of protein kinase CK2 in normal and carcinoma cells. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **31**, 941–9.
- 111 Xu, X., Landesman-Bollag, E., Channavajhala, P. L. and Seldin, D. C. (1999) Murine protein kinase CK2: gene and oncogene. *Mol. Cell. Biochem.* **191**, 65–74.
- 112 Seldin, D. C. and Leder, P. (1995) Casein kinase II alpha transgene-induced murine lymphoma: relation to theileriosis in cattle. *Science* **267**, 894–7.
- 113 Kelliher, M. a, Seldin, D. C. and Leder, P. (1996) Tal-1 induces T cell acute lymphoblastic leukemia accelerated by casein kinase IIalpha. *EMBO J.* **15**, 5160–6.
- 114 Landesman-Bollag, E., Song, D. H., Romieu-Mourez, R., Sussman, D. J., Cardiff, R. D., Sonenshein, G. E. and Seldin, D. C. (2001) Protein kinase CK2: signaling and tumorigenesis in the mammary gland. *Mol. Cell. Biochem.* **227**, 153–65.
- 115 Yamane, K. and Kinsella, T. J. (2005) CK2 Inhibits Apoptosis and Changes Its Cellular Localization Following Ionizing Radiation CK2 Inhibits Apoptosis and Changes Its Cellular Localization Following Ionizing Radiation 4362–4367.
- 116 Faust, R. a, Tawfic, S., Davis, a T., Bubash, L. a and Ahmed, K. (2000) Antisense oligonucleotides against protein kinase CK2-alpha inhibit growth of squamous cell carcinoma of the head and neck in vitro. *Head Neck* **22**, 341–6.

- 117 Ko, H., Kim, S., Jin, C.-H., Lee, E., Ham, S., Yook, J. I. and Kim, K. (2012) Protein kinase casein kinase 2-mediated upregulation of N-cadherin confers anoikis resistance on esophageal carcinoma cells. *Mol. Cancer Res.* **10**, 1032–8.
- 118 Ljubimov, A. V., Caballero, S., Aoki, A. M., Pinna, L. a, Grant, M. B. and Castellon, R. (2004) Involvement of protein kinase CK2 in angiogenesis and retinal neovascularization. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **45**, 4583–91.
- 119 Serres, M., Filhol, O., Lickert, H., Grangeasse, C., Chambaz, E. M., Stappert, J., Vincent, C. and Schmitt, D. (2000) The disruption of adherens junctions is associated with a decrease of E-cadherin phosphorylation by protein kinase CK2. *Exp. Cell Res.* **257**, 255–64.
- 120 Miyata, Y. (2009) Protein kinase CK2 in health and disease: CK2: the kinase controlling the Hsp90 chaperone machinery. *Cell. Mol. Life Sci.* **66**, 1840–9.
- 121 Yang, H., Minamishima, Y. A., Yan, Q., Schlisio, S., Benjamin, L., Zhang, X., Zhang, L., Kim, W. Y., Olumi, A. F., William, G., et al. (2008) NIH Public Access **28**, 15–27.
- 122 Kietzmann, A., Wang, Y., Weber, D. and Steinbeisser, H. (2012) Xenopus paraxial protocadherin inhibits Wnt/ β -catenin signalling via casein kinase 2 β . *EMBO Rep.*, Nature Publishing Group **13**, 129–34.
- 123 Thoma, C. R., Frew, I. J., Hoerner, C. R., Montani, M., Moch, H. and Krek, W. (2007) pVHL and GSK3 β are components of a primary cilium-maintenance signalling network. *Nat. Cell Biol.*, Nature Publishing Group **9**, 588–95.
- 124 Lolkema, M. P., Gervais, M. L., Snijckers, C. M., Hill, R. P., Giles, R. H., Voest, E. E. and Ohh, M. (2005) Tumor suppression by the von Hippel-Lindau protein requires phosphorylation of the acidic domain. *J. Biol. Chem.* **280**, 22205–11.
- 125 Cordenonsi, M., Mazzon, E., De Rigo, L., Baraldo, S., Meggio, F. and Citi, S. (1997) Occludin dephosphorylation in early development of *Xenopus laevis*. *J. Cell Sci.* **110** (Pt 2), 3131–9.
- 126 Al-Khoury, A. M., Ma, Y., Togo, S. H., Williams, S. and Mustelin, T. (2005) Cooperative phosphorylation of the tumor suppressor phosphatase and tensin homologue (PTEN) by casein kinases and glycogen synthase kinase 3 β . *J. Biol. Chem.* **280**, 35195–202.
- 127 Nieto, M. A. (2011) The ins and outs of the epithelial to mesenchymal transition in health and disease. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **27**, 347–76.
- 128 Hay, E. D. (1995) An Overview of Epithelio-Mesenchymal Transformation. *Cells Tissues Organs*, Karger Publishers **154**, 8–20.
- 129 Wicki, A., Lehembre, F., Wick, N., Hantusch, B., Kerjaschki, D. and Christofori, G. (2006) Tumor invasion in the absence of epithelial-mesenchymal transition: podoplanin-mediated remodeling of the actin cytoskeleton. *Cancer Cell* **9**, 261–72.
- 130 Peinado, H., Olmeda, D. and Cano, A. (2007) Snail, Zeb and bHLH factors in tumour progression: an alliance against the epithelial phenotype? *Nat. Rev. Cancer*, Nature Publishing Group **7**, 415–28.
- 131 Wang, W., Wyckoff, J. B., Frohlich, V. C., Oleynikov, Y., Hu, S., Zavadil, J., Cermak, L., Bottinger, E. P., Singer, R. H., White, J. G., et al. (2002) Single cell behavior in metastatic primary

- mammary tumors correlated with gene expression patterns revealed by molecular profiling. *Cancer Res.* **62**, 6278–6288.
- 132 Prall, F. (2007) Tumour budding in colorectal carcinoma. *Histopathology* **50**, 151–62.
- 133 Oda, H., Tsukita, S. and Takeichi, M. (1998) Dynamic behavior of the cadherin-based cell-cell adhesion system during *Drosophila* gastrulation. *Dev. Biol.* **203**, 435–50.
- 134 Peinado, H., Portillo, F. and Cano, A. (2004) Transcriptional regulation of cadherins during development and carcinogenesis. *Int. J. Dev. Biol.* **48**, 365–75.
- 135 Nieto, M. A. (2011) The Ins and Outs of the Epithelial to Mesenchymal Transition in Health and Disease. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **27**, 347–76.
- 136 Deshiere, A., Duchemin-Pelletier, E., Spreux, E., Ciais, D., Combes, F., Vandenbrouck, Y., Couté, Y., Mikaelian, I., Giusiano, S., Charpin, C., et al. (2012) Unbalanced expression of CK2 kinase subunits is sufficient to drive epithelial-to-mesenchymal transition by Snail1 induction. *Oncogene* **32**, 1373–83.
- 137 Mosmann, T. (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* **65**, 55–63.
- 138 Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248–54.
- 139 Deshiere, A., Duchemin-Pelletier, E., Spreux, E., Ciais, D., Combes, F., Vandenbrouck, Y., Couté, Y., Mikaelian, I., Giusiano, S., Charpin, C., et al. (2012) Unbalanced expression of CK2 kinase subunits is sufficient to drive epithelial-to-mesenchymal transition by Snail1 induction. *Oncogene* 1–11.
- 140 Saha, S., Bardelli, a, Buckhaults, P., Velculescu, V. E., Rago, C., St Croix, B., Romans, K. E., Choti, M. a, Lengauer, C., Kinzler, K. W., et al. (2001) A phosphatase associated with metastasis of colorectal cancer. *Science* **294**, 1343–6.
- 141 Deshiere, A., Duchemin-Pelletier, E., Spreux, E., Ciais, D., Combes, F., Vandenbrouck, Y., Couté, Y., Mikaelian, I., Giusiano, S., Charpin, C., et al. (2012) Unbalanced expression of CK2 kinase subunits is sufficient to drive epithelial-to-mesenchymal transition by Snail1 induction. *Oncogene* **32**, 1373–83.
- 142 Homma, M. K., Wada, I., Suzuki, T., Yamaki, J., Krebs, E. G. and Homma, Y. (2005) CK2 phosphorylation of eukaryotic translation initiation factor 5 potentiates cell cycle progression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 15688–93.
- 143 Filhol, O., Nueda, A., Martel, V., Gerber-scokaert, D., Benitez, M. J., Souchier, C., Saoudi, Y. and Cochet, C. (2003) Live-cell fluorescence imaging reveals the dynamics of protein kinase CK2 individual subunits. *Mol. Cell. Biol.* **23**, 975–87.
- 144 Chen, M., Li, D., Krebs, E. G. and Cooper, J. a. (1997) The casein kinase II beta subunit binds to Mos and inhibits Mos activity. *Mol. Cell. Biol.* **17**, 1904–12.
- 145 Zou, J., Luo, H., Zeng, Q., Dong, Z., Wu, D. and Liu, L. (2011) Protein kinase CK2a is overexpressed in colorectal cancer and modulates cell proliferation and invasion via regulating EMT-related genes. *J. Transl. Med.*, **9**, 97.

VIII. ANNEX

Taula 1A: Classificació TNM de carcinoma renal cel·lular (Revisió 2009)	
T- Tumor primari	
TX	No es pot avaluar el tumor primari
T0	No hi ha evidència de tumor primari
T1	El tumor fa un màxim de 7cm a la seva major dimensió i està limitat a ronyó.
T1a	El tumor fa menys de 4 cm a la seva major dimensió i es limita a ronyó.
T1b	El tumor fa entre 4 i 7 cm (sense superar-lo) a la seva major dimensió i es limita a ronyó.
T2	El tumor fa més de 7 cm a la seva major dimensió i es limita a ronyó.
T2a	El tumor fa més de 7 cm però menys de 10 cm a la seva major dimensió i es limita a ronyó.
T2b	El tumor fa més de 10 cm i es limita a ronyó
T3	El tumor envaeix les venes principals o el teixit perirrenal, però no a la glàndula suprarenal ipsilateral i no supera la Gerota Fascia.
T3a	El tumor envaeix la vena renal o les seves divisions segmentàries (que contenen músculs) o envaeix el teixit adipós perirrenal, però no envaeix la Gerota Fascia.
T3b	El tumor envaeix la vena cava per sota del diafragma.
T3c	El tumor envaeix de manera macrocítica la vena cava per sobre del diafragma o envaeix la paret de la vena cava.
T4	El tumor envaeix més enllà de la Gerota Fascia.
N- Nòduls limfàtics locals	
NX	No es poden avaluar els ganglis limfàtics regionals.
N0	No hi ha metàstasis en els ganglis limfàtics regionals.
N1	Hi ha metàstasi a un o més ganglis limfàtics regionals.
M- Metàstasis distals	
M0	No hi ha metàstasis a distància .
M1	Hi ha metàstasis a distància.
Nota: Adaptació de la revisió del 2009 del AJCC (American Joint Comitee on Cancer)	

Taula 2A: Agrupació per estadiatge del carcinoma renal cel·lular.			
Estadiatge			
Estadi I	T1	N0	M0
Estadi II	T2	N0	M0
Estadi III	T1 o T2	N1	M0
	T3	N0 o N1	M0
Estadi IV	T4	Qualsevol N	M0
	Qualsevol T	Qualsevol N	M1
Nota: Adaptació de la revisió del 2009 del AJCC (American Joint Comitee on Cancer)			