

INDICE

ABSTRACT.....	I
RIASSUNTO.....	III
Abbreviazioni per gli aminoacidi.....	VI
Abbreviazioni.....	VII
 CAPITOLO 1: Introduzione	
1. LA FOSFORILAZIONE PROTEICA.....	3
2. L'APOPTOSI.....	4
3. LA PROTEINCHINASI CK2.....	6
3.1 Struttura e proprietà enzimatiche.....	7
3.2 Gli inibitori di CK2.....	10
3.3 Ruolo fisiologico di CK2.....	12
3.3.1 <u>CK2: una proteinchinas di sopravvivenza "a tutti i costi"</u>	13
3.3.2 <u>Ruolo antiapoptotico di CK2</u>	14
3.3.3 <u>La via di segnale NF-κB</u>	16
3.3.4 <u>La via di segnale Wnt</u>	16
3.3.5 <u>La via di segnale PI3K/Akt</u>	17
3.3.6 <u>Risposte cellulari a condizioni di stress</u>	17
3.3.7 <u>Ruolo di CK2 nell'infezione virale</u>	18
4. LA PROTEINCHINASI Akt.....	19
4.1 Struttura di Akt.....	19
4.2 Attivazione di Akt.....	20
4.2.1 <u>La chaperonina Hsp90</u>	23
4.3 Regolazione della sopravvivenza cellulare da parte di Akt.....	24
4.3.1 <u>Regolazione diretta dell'apoptosi</u>	24
4.3.2 <u>Controllo trascrizionale dell'apoptosi</u>	25
4.3.3 <u>Controllo metabolico dell'apoptosi</u>	26
5. LA PROTEINCHINASI PRPK.....	27
5.1 Struttura e regolazione di PRPK.....	27
5.2 Funzioni di PRPK.....	28
 CAPITOLO 2: Materiali e Metodi.	
1. MATERIALI.....	33

2. METODI

Coltura cellulare.....	34
Trattamento cellulare.....	34
Preparazione del lisato proteico totale.....	34
Determinazione della concentrazione proteica.....	35
SDS/PAGE e Western Blot.....	35
Trasfezione cellulare.....	36
Fosforilazione di Akt da parte di CK2 α , CK2 α' e dei deleti CK2 α Δ C336-391 e CK2 α Δ N2-6.....	37
Immunoprecipitazione.....	37
Fosforilazione da parte di PDK1 di Akt immunoprecipitata da lisati.....	38
Fosforilazione di Akt da parte di PDK1, in seguito a fosfori- lazione da parte di CK2.....	38
Autofosforilazione di lisati.....	38
<i>Crosslinking</i> con formaldeide in cellule trasfettate con Akt wt e Ser129Ala.....	39
Associazione di Hsp90 ricombinante ad Akt wt e Ser129A immobilizzate su resina.....	39
Far Western.....	39
Saggio di vitalità cellulare MTT.....	40

CAPITOLO 3: *CK2 modula indirettamente lo stato di fosforilazione della Thr308 di Akt.*

INTRODUZIONE

Correlazioni fra le proteinchinasi CK2 ed Akt.....	43
--	----

OBIETTIVI.....	45
----------------	----

RISULTATI

1. Stato di fosforilazione della Thr308 di Akt in relazione all'attività di CK2.....	45
2. Fosforilazione di Akt da PDK1, dopo fosforilazione da parte di CK2.....	48
3. Effetto della mutazione della Ser129 sulla risposta di Akt pThr308 all'aggiunta di fattori di crescita.....	49
4. Effetti del trattamento con acido okadaico su Akt, in cellule trasfettate con Akt wt e Ser129Ala.....	49
5. Co-immunoprecipitazione di Hsp90 con Akt wt e con Akt mutante Ser129Ala.....	50
6. Fosforilazione <i>in vitro</i> di Akt da parte di CK2: un con- fronto fra le subunità catalitiche α e α'	53

DISCUSSIONE.....	57
------------------	----

CAPITOLO 4: *Farmacoresistenza e proteinchinasi di sopravvivenza.*

INTRODUZIONE

1. La farmacoresistenza.....	63
------------------------------	----

2. Proteinchinasi di sopravvivenza e farmacoresistenza.....	65
OBIETTIVI.....	67
RISULTATI	
1. Espressione di CK2 ed Akt in cellule CEM-S e CEM-R.....	68
2. L' eccesso di CK2 α protegge le cellule CEM-R dall'a- poptosi chimica.....	69
3. Espressione di CK2 ed Akt in altri modelli cellulari, ca- ratterizzati da farmacoresistenza.....	71
DISCUSSIONE.....	75
 CAPITOLO 5: <i>Regolazione di PRPK da parte di Akt.</i>	
INTRODUZIONE	
Regolazione di PRPK da parte di Akt.....	79
OBIETTIVI.....	80
RISULTATI	
1. Fosforilazione di PRPK sulla Ser250 in cellule HEK 293T.....	81
DISCUSSIONE.....	83
 CONCLUSIONE GENERALE.....	 87
 BIBLIOGRAFIA.....	 91
 PUBBLICAZIONI.....	 105

ABSTRACT

In this work I focused on functional correlations between some important protein kinases, tightly involved in cell viability. The project was divided in the following major parts:

a) CK2 indirectly modulates phosphorylation state of Akt pThr308.

Protein kinase CK2 is a Ser/Thr protein kinase composed of two catalytic (α and/or α') and two regulatory (β) subunits. It is ubiquitous, constitutively active, and pleiotropic, with more than 300 protein substrates known so far. CK2 plays an antiapoptotic role, coordinating a network of signaling pathways essential for cell survival. One of these is represented by Akt, a kinase whose mechanism of activation is based on the phosphorylation of two key residues: Thr308 (by the PDK1 kinase) and Ser473 (by the mTOR/Rictor complex). On the other side, the dephosphorylation of Thr308 and Ser473 is accounted for by PP2A phosphatase and PHLPP, respectively.

CK2 acts directly on Akt, phosphorylating its Ser129 residue, both *in vitro* and *in vivo*, thus enhancing its catalytic activity.

Here we also show that downregulation of CK2 activity by inhibitors, or mutation of the CK2-dependent site in Akt (Ser129Ala), induce a lower phosphorylation of Thr308, which is not a direct target for CK2. This finding can be explained assuming that phosphorylation of Akt at Ser129 by CK2 facilitates the recognition of Thr308 by the kinase PDK1 or, alternatively, makes Akt less accessible to the phosphatase PP2A. We found that PDK1 does not discriminate between the two different forms of Akt, phosphorylated or not at the CK2 site; on the contrary, our data show that, in case of Ser129 phosphorylation, a lower degree of T308 dephosphorylation occurs. In fact, when we treat cells with the PP2A inhibitor okadaic acid, any difference at Thr308 phosphorylation is abrogated between wt Akt (phosphorylated at Ser129 by CK2) and Ser129Ala Akt mutant. We also found that Hsp90, involved in preserving the Thr308 phosphorylation state, is less tightly associated to Akt in case of the Ser129Ala mutation. This indicates that the regulation operated by CK2 on Akt can be ascribed, at least in part, to a protection from the pThr308-dephosphorylation process, possibly involving other protein partners, such as the Cdc37/Hsp90 complex.

b) Drug resistance and pro-survival protein kinases.

Given the pro-survival and anti-apoptotic function of CK2 and Akt, we also investigated their possible involvement in the multidrug resistance phenotype, a condition where a high proliferation rate and a reduced cell death degree result in the failure of cancer therapy.

We analysed the expression level of these two kinases and their role in some cell lines, available in the two variants normally sensitive (S) or resistant (R) to chemical apoptosis. Most of the work was focused on T-lymphoblastoid cells (CEM-S and CEM-R), but we also extended our analyses to other cell models, particularly to an osteosarcoma cell line (U2OS-S and U2OS-R) and to ovarian carcinoma cells (2008-S and 2008-R). We found that CK2 and Akt are differently expressed throughout our cellular models, causing different panels of endogenous substrates phosphorylation, whose identification can be useful to understand the drug resistance phenomenon.

We also compared CK2 activity of sensitive and resistant cells, and we evaluated the effect of CK2 specific inhibitors on cell viability, showing that CK2 blockade is effective in inducing cell death of resistant lines tested so far. We therefore conclude that inhibition of CK2, also considering the connections of this kinase with other survival pathways, such as Akt, can be considered as a promising tool to sensitize resistant cells to drug-induced apoptosis.

c) Regulation of PRPK by Akt.

Finally we analysed the functional correlation between Akt and PRPK (p53-related protein kinase), the human homologue of yeast Bud32. PRPK and Bud32 belong to a small subfamily of atypical protein kinases, called piD261. Despite Bud32, which is a kinase essential for yeast survival and morphology, the role of PRPK in the cell is still unclear. It is inactive unless it is previously incubated with cell lysates. We have seen that such an activation of PRPK is mediated by Akt, which phosphorylates PRPK at Ser250. Recombinant PRPK was shown to be phosphorylated *in vitro* by Akt and its phospho-form is recognized by a Ser250-phospho-specific antibody. Here we demonstrate that this phosphorylation takes place also *in vivo*: in fact cell co-transfection with Akt along with wild-type PRPK, but not with its Ser250Ala mutant, results in increased PRPK phosphorylation; moreover, the phosphorylation of p53 at Ser15, the only known substrate of PRPK, is markedly increased by co-transfection of Akt with wild-type PRPK and is abrogated by cell treatment with the Akt pathway inhibitor LY294002. Our data disclose an unanticipated mechanism by which PRPK can be activated and provide a functional link between this enigmatic kinase and the Akt signalling pathway.

The general conclusion from this work is that different survival kinases are connected and cooperate to the final purpose of ensuring a high degree of cell survival. It is therefore conceivable that even a small dis-regulation of one of them can in turn produce dramatic and pathological

efforts. Thus, whenever therapeutic strategies are based on targeting one of these enzymes, this complex network of cross-talk should be always taken into account.

RIASSUNTO

In questa tesi ho puntato l'attenzione sulle relazioni funzionali tra alcune importanti proteinchinasi, che svolgono un ruolo chiave per la vitalità della cellula, focalizzando lo studio sui seguenti aspetti principali:

a) Interconnessioni fra le due proteinchinasi di sopravvivenza CK2 ed Akt.

CK2 è una proteinchinasi Ser/Thr, composta da due subunità catalitiche (α e/o α') e due regolatorie (β). Essa è ubiquitaria, costitutivamente attiva e pleiotropica, andando ad agire su una lista di oltre 300 substrati noti. CK2 ha un importante ruolo antiapoptotico, andando a coordinare una rete di vie di segnale essenziale per la sopravvivenza della cellula. Una di queste è la via di Akt, una chinasi il cui meccanismo di attivazione si basa sulla fosforilazione di due residui chiave: Thr308 (da parte della chinasi PDK1) e Ser473 (da parte del complesso mTOR/Rictor). Questi siti vengono defosforilati dalle fosfatasi PP2A e PHLPP, rispettivamente.

CK2 agisce direttamente su Akt, fosforilando il suo residuo Ser129, sia in vitro sia in vivo, portando ad un aumento della sua attività catalitica.

Abbiamo però anche osservato che l'abbattimento dell'attività di CK2 mediante inibitori, o la mutazione del sito CK2-dipendente in Akt (Ser129Ala), inducono una riduzione del livello di fosforilazione della Thr308, che non è un bersaglio diretto di CK2. Questa osservazione può essere spiegata ipotizzando che la fosforilazione di Akt sulla Ser129 da parte di CK2 sia importante o per facilitare il riconoscimento della Thr308 da parte della chinasi PDK1 o per rendere questo sito meno accessibile alla fosfatasi PP2A. Abbiamo visto che PDK1 non è in grado di discriminare fra le due forme di Akt, fosforilata o meno da CK2; al contrario, i nostri dati mostrano che, quando Akt è fosforilata da CK2 sulla Ser129, la Thr308 è meno soggetta a defosforilazione. Infatti, trattando le cellule con l'inibitore della PP2A acido okadaico, ogni differenza nello stato di fosforilazione della Thr308, fra Akt wt (fosforilata sulla Ser129 da CK2) e Akt mutante Ser129Ala, viene a mancare. Abbiamo anche osservato che Hsp90, coinvolta nel preservare la forma fosforilata della Thr308, associa meno stabilmente con Akt, quando questa è mutata Ser129Ala. Ciò indica che la regolazione operata da CK2 su Akt può essere attribuita, almeno in parte, ad una protezione della

Thr308 dalla defosforilazione, probabilmente coinvolgendo altri fattori proteici, come il complesso Cdc37/Hsp90.

b) Farmacoresistenza e proteinchinasi di sopravvivenza.

Visto il ruolo pro-sopravvivenza ed antiapoptotico di CK2 ed Akt, si è voluto indagare il loro possibile coinvolgimento nel fenomeno della farmacoresistenza, una condizione in cui un elevato grado di proliferazione e una maggior vitalità cellulare si traducono nell'insuccesso della terapia antitumorale.

Abbiamo pertanto analizzato i livelli di espressione di questi due enzimi e il loro ruolo in alcune linee di cellule, disponibili ciascuna nelle due varianti, normalmente sensibili (S) o resistenti (R) all'apoptosi chimica. La maggior parte dello studio è stato svolto in particolare su cellule linfoblastoidi di tipo T (CEM-S e CEM-R), ma abbiamo anche esteso la nostra analisi ad altri modelli cellulari, in particolare a una linea cellulare di osteosarcoma (U2OS-S e U2OS-R) e a cellule di carcinoma ovarico (2008-S e 2008-R). Abbiamo visto come CK2 ed Akt siano diversamente espresse ed attive nei diversi modelli cellulari analizzati, e come questo si traduca in un quadro di fosforilazioni di substrati endogeni assai variegato, e la cui identificazione può essere preziosa per la comprensione del fenomeno della farmacoresistenza.

Abbiamo anche confrontato l'attività di CK2 in cellule sensibili e resistenti, e abbiamo valutato gli effetti di inibitori selettivi di CK2 sulla vitalità cellulare, dimostrando che l'inibizione di CK2 induce a morte tutte le linee farmacoresistenti analizzate. Abbiamo quindi concluso che l'inibizione di CK2, anche tenendo conto delle sue connessioni con altre vie di segnale di sopravvivenza, quali quella di Akt, può essere uno strumento promettente per sensibilizzare le cellule farmacoresistenti all'apoptosi indotta farmacologicamente.

c) Regolazione di PRPK da parte di Akt.

Infine abbiamo analizzato la correlazione funzionale fra Akt e PRPK (*p53-related protein kinase*), l'omologo umano dell'enzima di lievito Bud32. PRPK e Bud32 appartengono ad una piccola famiglia di proteinchinasi atipiche, dette piD261. A differenza di Bud32, che è una chinasi essenziale per la vitalità e la morfologia del lievito, il ruolo di PRPK nella cellula è ancora oscuro. L'enzima ricombinante è cataliticamente inattivo, a meno che non venga previamente incubato con un lisato cellulare. In questa tesi abbiamo dimostrato che tale attivazione di PRPK è mediata da Akt, che fosforila PRPK sulla Ser250. E' stato precedentemente dimostrato che PRPK viene fosforilata in vitro da Akt e che la sua forma fosforilata è riconosciuta da un anticorpo fosfospecifico anti-pSer250. Si è qui osservato che questa fosforilazione ha luogo anche *in vivo*:

infatti la co-trasfezione di Akt e di PRPK *wild type* (wt) determina un aumento della fosforilazione di PRPK, che non si osserva invece co-trasfettando Akt e il mutante PRPK Ser250Ala; inoltre, la fosforilazione della Ser15 di p53, unico substrato noto di PRPK, è vistosamente aumentata in seguito alla co-trasfezione di Akt e PRPK wt ed è abbattuta dall'uso di LY294002, inibitore della via di segnale che porta all'attivazione di Akt. Questi risultati evidenziano una connessione regolatoria fra Akt e PRPK e gettano luce sul meccanismo di attivazione di questa enigmatica proteinchinasi. La conclusione generale di questo lavoro è che differenti chinasi di sopravvivenza sono connesse e cooperano, allo scopo di assicurare un elevato grado di sopravvivenza cellulare. E' perciò comprensibile come anche solo una piccola deregolazione di una di esse possa produrre esiti drammatici e patologici. Di conseguenza, nel caso in cui uno di questi enzimi sia usato come bersaglio terapeutico, questa complessa rete di interconnessioni va sempre tenuta in considerazione.

ABBREVIAZIONI PER GLI AMINOACIDI

A	Ala	Alanina
C	Cys	Cisteina
D	Asp	Acido aspartico
E	Glu	Acido glutammico
F	Phe	Fenilalanina
G	Gly	Glicina
H	His	Istidina
I	Ile	Isoleucina
K	Lys	Lisina
L	Leu	Leucina
M	Met	Metionina
N	Asn	Asparagina
P	Pro	Prolina
Q	Gln	Glutamina
R	Arg	Arginina
S	Ser	Serina
T	Thr	Treonina
V	Val	Valina
W	Trp	Triptofano
Y	Tyr	Tirosina
X	aminoacido generico	

ABBREVIAZIONI

[γ - ³³ P] ATP	ATP marcato con fosforo radioattivo sul fosfato γ
cpm	conte per minuto
BSA	siero albumina bovina
C-terminale	carbossi-terminale
DTT	ditiotreitolo
EDTA	acido etilendiamino tetracetico
EGTA	acido etilenglicolaminoetiletere tetracetico
FBS	<i>fetal bovine serum</i> (siero fetale bovino)
IgG	immunoglobuline G
MTT	3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolo bromuro
N-terminale	amino-terminale
OL	<i>overlay</i>
PBS	<i>phosphate buffer solution</i> (soluzione tampone fosfato)
PM	peso molecolare
SDS	sodio dodecil solfato
SDS-PAGE	elettroforesi su gel di poliacrilamide in SDS
TBS	<i>tris buffer solution</i> (soluzione tampone Tris-HCl)
Tris	tris (idrossimetil) aminometano
WB	Western blot

CAPITOLO 1: *Introduzione*

1. LA FOSFORILAZIONE PROTEICA.

La fosforilazione proteica è una modifica post-traduzionale semplice e reversibile, tramite cui vengono controllati numerosi processi cellulari. Si tratta di una modifica covalente, che avviene a carico di gruppi alcolici di residui amminoacidici quali serina o treonina, o di gruppi fenolici di residui tirosinici; prevede il trasferimento verso questi substrati del γ -fosfato di una molecola donatore, che può essere ATP o, più raramente, GTP. Gli enzimi che catalizzano questo tipo di reazione sono le proteinchinasi, che rappresentano una delle più grandi famiglie di proteine: se ne contano oltre cinquecento, codificate dal genoma umano (Venter et al., 2001).

Dal punto di vista strutturale, le proteinchinasi presentano un dominio catalitico molto conservato, costituito da circa 250-300 residui (Hanks e Quinn, 1991). Grazie al numero crescente di sequenze di proteinchinasi disponibili, è stato possibile generare alberi filogenetici, che hanno permesso di classificare i vari membri di questa superfamiglia (Hanks and Hunter, 1995).

Sono quattro i gruppi principali:

- 1) Il gruppo AGC, che include la famiglia delle PKC, delle PKA e delle PKG, la famiglia dei recettori chinasi β -adrenergici e delle chinasi ribosomiali S6;
- 2) Il gruppo delle chinasi Ca^{++} /calmodulina dipendenti;
- 3) Il gruppo CMGC, che include la famiglia delle chinasi ciclina-dipendenti, la famiglia Erk e la famiglia delle glicogeno sintasi 3;

Quelle appartenenti a questi primi 3 gruppi sono esclusivamente Ser/Thr chinasi, cioè enzimi in grado di fosforilare in maniera specifica residui di serina o treonina.

- 4) Il gruppo delle Tyr chinasi, che catalizzano il trasferimento di un fosfato alla tirosina.

La fosforilazione può modulare le proprietà biologiche di una proteina. Per esempio può indurre cambiamenti conformazionali, che possono stimolarne o sopprimerne l'attività biologica; può determinarne la localizzazione intracellulare o la degradazione; può favorirne l'interazione con altre proteine. Il processo di fosforilazione proteica è un modo talmente semplice e versatile per regolare l'attività biologica delle proteine, che ad esempio in un organismo pluricellulare semplice come *Caenorhabditis elegans* una parte significativa del genoma (circa quattrocento geni) codifica per delle proteinchinasi. Questo dato non sorprende, se si considera che alcune proteinchinasi svolgono ruoli essenziali per la sopravvivenza cellulare, essendo coinvolte ampiamente in processi chiave che vanno, ad esempio, dal metabolismo alla trasduzione del segnale, dalla proliferazione all'apoptosi. Ciò è reso possibile grazie ad una ricca rete di connessioni regolatorie, di cui molti aspetti sono già noti, mentre altri rimangono tuttora inesplorati. In questa tesi verrà dapprima

fatta una panoramica su tre proteinchinasi, note per il loro ruolo essenziale nella vitalità cellulare: CK2, Akt e PRPK. Verranno poi presentati dei dati, che hanno lo scopo di approfondire le strette interconnessioni, esistenti fra questi enzimi, e il loro significato biochimico.

2. L' APOPTOSI.

E' importante per un tessuto tenere sotto stretto controllo il numero delle proprie cellule. L'apoptosi, o morte cellulare programmata, è un processo complesso finalizzato a tale scopo. Presenta delle caratteristiche tipiche, che la distinguono dalla necrosi, e che ne evidenziano la natura di programma ben definito.

Un ruolo da protagonista lo svolgono le caspasi, una famiglia di proteasi cisteiniche omologhe, altamente conservate nei processi evolutivi e responsabili della gran parte degli eventi salienti nell'apoptosi (Hengartner, 2000). Se ne conoscono attualmente almeno dodici; quelle importanti per l'apoptosi sono in particolare le caspasi 2, 3, 6, 7, 8, 9 e 10. Esse sono in grado di operare un taglio in corrispondenza del legame fra un residuo di aspartato e un residuo aminoacidico acido, in uno o pochi punti di ben precisi substrati proteici. Ciò comporta nella gran parte dei casi un'inattivazione del substrato, ma in altri una attivazione, per rimozione (diretta o meno) di una subunità inibitoria.

Ad esempio un evento distintivo nell'apoptosi è la frammentazione del DNA ad opera della nucleasi CAD, ovvero *Caspase-Activated DNase*. Questa esiste inattiva nelle cellule, in complesso con una subunità inibitoria (Nagata, 2000). La sua attivazione è dovuta all'eliminazione della subunità inibitoria da parte della caspasi-3 (Enari et al., 1998).

E, ancora, le caspasi rendono possibili altri eventi caratteristici, come la contrazione del nucleo in seguito a taglio della lamina nucleare (Rao, 1996) e la totale perdita della morfologia cellulare, probabilmente causata da taglio delle proteine del citoscheletro (Kothakota et al., 1997).

Del resto i substrati delle caspasi finora riconosciuti sono moltissimi, forse non tutti centrali nei processi biochimici, ma comunque numerosi. Le caspasi nascono come degli zimogeni inattivi, che vengono attivati in seguito a proteolisi in siti ben precisi, in generale comunque fra un residuo di aspartato e un residuo aminoacidico acido, quindi sito bersaglio delle caspasi stesse, il che suggerisce un'attivazione autocatalitica, o meglio ancora un'attivazione "a cascata", in cui le caspasi si attivano reciprocamente le une le altre (Thornberry et al., 1997). L'interazione reciproca è resa possibile grazie a un modulo presente nel prodominio (cioè quella regione che viene poi

persa nello stato attivato delle caspasi) di ciascuna di esse e destinato proprio a questo scopo (e probabilmente ad ospitare anche altre molecole necessarie ad ottimizzare l'interazione).

Ci sono due vie confluenti, che danno l'avvio al processo apoptotico coinvolgente le caspasi e che possono essere riassunte come segue (Hengartner, 2000).

1. La prima via (detta estrinseca o recettoriale) è mediata da recettori di membrana, che rispondono a segnali esterni. Ad esempio il recettore Fas o il TNF-RI (*Tumor Necrosis Factor Receptor I*), che in risposta ai loro rispettivi ligandi formano degli oligomeri. Questi – tramite delle proteine adattatrici – interagiscono con parecchie molecole di procaspasi-8, portando ad una elevata concentrazione locale del proenzima. Tante molecole di procaspasi-8 si trovano a stretto contatto e ciò sembra bastare a far sì che esse si attivino reciprocamente.
2. La seconda via (detta intrinseca o chimica) consegue invece a eventi intracellulari, come danni al DNA. In questo caso la caspasi-8 non è responsabile dell'inizio degli eventi apoptotici, mentre un ruolo fondamentale – come prima classe di caspasi attivata – ha la caspasi-9, che opera “a valle” del mitocondrio.

Infatti il punto di convergenza delle due vie è proprio il mitocondrio. Esso contiene un “mix esplosivo” di fattori pro-apoptotici, di cui fa parte anche il citocromo c. Durante l'apoptosi la membrana esterna del mitocondrio consente l'uscita di questi fattori pro-apoptotici. Come esattamente ciò avvenga non è ancora noto, ma sicuramente nella regolazione di questo fenomeno sono coinvolte le proteine della famiglia Bcl-2, i cui componenti possono sia inibire sia promuovere l'apoptosi. In particolare si sono fatte alcune ipotesi su come i membri pro-apoptotici della famiglia Bcl-2 possono regolare l'uscita del citocromo c dai mitocondri:

- inserendosi nella membrana esterna, per formare dei canali o delle ampie “aperture” (Reed, 1997);
- attirando altre proteine della membrana esterna, con lo scopo di formare dei pori nella stessa (Shimizu et al., 1999);
- alterando l'equilibrio osmotico del mitocondrio, che andrebbe incontro a rigonfiamento ed esplosione, con fuoriuscita dell'arsenale in esso contenuto.

Il risultato è comunque la liberazione dal mitocondrio di varie molecole, primo fra tutte il citocromo c, che va ad interagire con Apaf1 (*Apoptosis Protease Activating Factor*) e procaspasi-9 (e forse con altre proteine) per formare il cosiddetto *apoptosoma*. In tal modo la caspasi-9 risulta

attivata e può a sua volta attivare la procaspasi-3 a caspasi-3, che andrà ad agire sui suoi substrati apoptotici.

Anche la caspasi-8, oltre a poter agire di per sé su vari substrati apoptotici, è in grado di attivare la caspasi-3. Inoltre, attivando un membro pro-apoptotico della famiglia Bcl-2 (Bid), può promuovere l'uscita del citocromo c dal mitocondrio. Si distinguono quindi caspasi "iniziatrici" (caspasi-8 e caspasi-9, rispettivamente per l'apoptosi recettoriale e per quella chimica) e caspasi "esecutrici" (ad esempio la caspasi-3), che operano il grosso dei tagli proteolitici, per consentire il completamento del programma apoptotico.

Questi meccanismi a catena consentono una notevole amplificazione dei segnali pro-apoptotici. Ma al tempo stesso le vie dell'apoptosi sono attentamente controllate da fattori che impediscono loro di scatenarsi senza criterio. Ad esempio, come detto in precedenza, la famiglia Bcl-2 possiede anche membri anti-apoptotici e vi sono anche altre molecole a significato inibitorio, che intervengono a diversi livelli nella cascata delle caspasi. In questo contesto va sottolineato che alcune proteinchinasi sono coinvolte in vari modi nel controllo dell'apoptosi. In particolare le proteinchinasi di sopravvivenza svolgono una funzione protettiva, che si esplica attraverso diversi meccanismi e rende le cellule resistenti all'apoptosi variamente indotta. Come si vedrà nei capitoli relativi, Akt e CK2 sono entrambe note per il loro ruolo antiapoptotico (Song et al., 2005; Litchfield, 2003).

Nell'insieme quindi l'apoptosi è un processo complesso, ma attentamente programmato, che contribuisce a conservare il delicato equilibrio che presiede alla vita di ogni organismo, e nel quale anche piccole alterazioni possono causare gravi danni e condizioni patologiche.

3. LA PROTEINCHINASI CK2.

La proteinchinasi CK2 appartiene al gruppo CMGC. In origine era chiamata *caseinchinasi2*, poiché in grado di fosforilare la caseina *in vitro*. Attualmente tale nome è stato sostituito, visto che questo enzima è in realtà estremamente pleiotropico ed è attivo su oltre trecento substrati *in vitro* e *in vivo*: per questo viene ora chiamato *proteinchinasi CK2*.

Si tratta di un enzima altamente conservato, distribuito ubiquitariamente negli organismi eucariotici ed espresso in tutti i tessuti. A differenza della maggior parte delle proteinchinasi, che vengono attivate in risposta a specifici stimoli, presenta un'attività costitutiva, indipendente da secondi messaggeri o da eventi fosforilativi. Un'altra caratteristica distintiva di CK2 è che essa è in grado di utilizzare indifferentemente, come donatore di fosfato, sia ATP sia GTP (Issinger, 1993).

Riveste un ruolo molto importante, poiché fra i suoi numerosi substrati molti sono coinvolti in processi chiave della vita cellulare, come la regolazione del metabolismo, la traduzione del segnale, la proliferazione e l'apoptosi (Meggio e Pinna, 2003).

Proprio la molteplicità dei processi a cui prende parte e il suo pleiotropismo rendono complesso e affascinante lo studio di CK2, il cui ruolo nella cellula resta ancora in buona parte da chiarire.

3.1 Struttura e proprietà enzimatiche.

Nella gran parte degli organismi, CK2 presenta una struttura tetrameric, composta di due subunità catalitiche α (44 kDa) e/o α' (38 kDa) e da due subunità non catalitiche β (25 kDa). Nel tetramero le subunità si possono trovare combinate in modo variabile, a dare complessi del tipo $\alpha_2\beta_2$, $\alpha\alpha'\beta_2$, $\alpha'_2\beta_2$.

Le subunità catalitiche, pur essendo codificate da due geni distinti (Olsten e Litchfield, 2004), mostrano un'elevata omologia e si differenziano soltanto per la composizione dell'estremità C-terminale, che in α' è più corta di 41 aminoacidi rispetto ad α . Sono entrambe attive *in vitro* anche in forma monomerica e ci sono evidenze di una loro specializzazione funzionale nella cellula (Buchou et al., 2003; Escalier et al., 2003).

La subunità β non presenta omologia con le subunità regolatorie di altre proteinchinasi note. E' in grado di formare un omodimero β - β , grazie ad una regione contenente quattro residui cisteinici (*zinc finger*) (Chantalat et al., 1999); possiede inoltre una regione C-terminale, fondamentale per la stabilizzazione e il potenziamento dell'attività catalitica di CK2 stessa (Sarno et al., 2000).

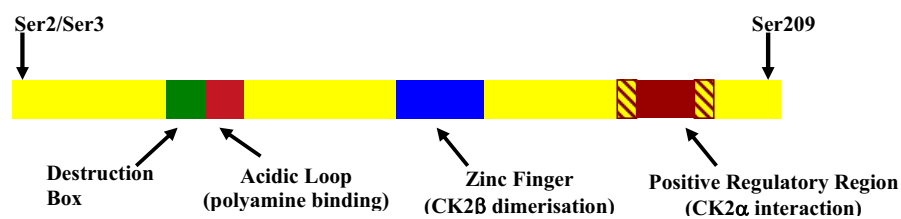


Figura 1. Rappresentazione schematica della subunità β (Litchfield, 2003).

All'estremità N-terminale è presente un sito di autofosforilazione, che comprende la serina 2, la serina 3 e, verosimilmente, la serina 4 (Boldyreff et al., 1993; Bodenbach et al., 1994). Si possono inoltre evidenziare dei domini caratteristici, evidenziati in Figura 1. In prossimità dell'N-terminale è stato individuato un motivo simile al *destruction box*, presente in alcune proteinchinasi cicline-dipendenti e importante per controllare la stabilità di queste ultime. Tale motivo sembra regolare

la stabilità anche nel caso della subunità β di CK2 (Zhang et al., 2002), probabilmente in concomitanza con altri eventi. Vicino a questa regione si trova una sequenza ricca di aminoacidi: essa è essenziale per la regolazione di CK2, poiché interagisce con le poliamine, che ne stimolano l'attività (Meggio et al, 1994).

La struttura tridimensionale di CK2 in forma tetrameric (Figura 2) mostra un complesso "a farfalla", in cui il dimero β - β serve da piattaforma di assemblaggio per le due subunità catalitiche (Niefind et al., 2001). Queste ultime non sembrano interagire direttamente l'una con l'altra, ma esclusivamente con il dimero β - β . Un tratto distintivo di questa struttura è il carattere flessibile dei contatti tra le subunità α e le subunità β di CK2: infatti è stato ipotizzato che l'oloenzima sia in realtà un eterocomplesso transitorio, che si può formare o dissociare, così da assicurare *in vivo* specificità di substrato all'enzima (Pinna e Meggio, 1997; Niefind et al., 2001). A parziale conferma di questa ipotesi, recenti studi di localizzazione intracellulare hanno messo in evidenza un possibile equilibrio, all'interno della cellula, tra le forme associata e non associata delle due subunità (Martel et al., 2002). Inoltre già da tempo è noto che nelle piante (Yan e Tao, 1982; Dobrowolska et al, 1992) e in *Dictyostelium discoideum* (Ospina et al., 1992) CK2 α può essere spontaneamente presente in forma monomerica e che CK2 β può anch'essa avere delle funzioni autonome, agendo ad esempio da fattore regolatorio per diverse preteinchinasi, con cui interagisce (Guerra e Issinger, 1999; Bren et al., 2000; Guerra et al., 2003).

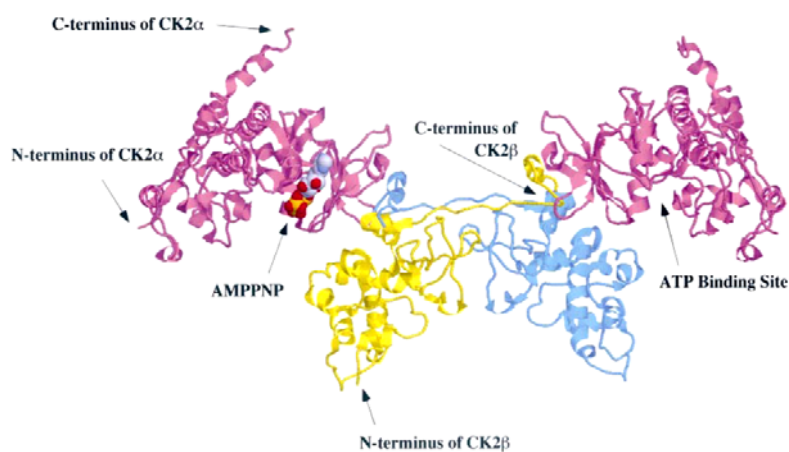


Figura 2. Rappresentazione della struttura tridimensionale di CK2 tetrameric (Litchfield, 2003)

Come detto in precedenza, CK2 è un enzima costitutivamente attivo, sia nella sua forma tetramERICA, sia come subunità catalitica isolata, non associata cioè alle subunità β . Queste ultime sono importanti per regolare la specificità di substrato dell'oloenzima (Pinna, 2002; Litchfield, 2003) e per mantenere il suo *loop* di attivazione in conformazione attiva. Il *loop* di attivazione è la regione che controlla l'accesso dei substrati al sito catalitico. Nel caso di CK2 monomerica la sua attività costitutiva è garantita invece da una forte interazione fra il segmento N-terminale della subunità catalitica stessa e il *loop* di attivazione (Niefind et al., 1998; Sarno et al., 2002).

Entrambe le forme di CK2, monomerica e tetramERICA, sono in grado di fosforilare *in vitro* la maggior parte dei substrati, anche se normalmente l'oloenzima risulta essere più attivo del monomero e la subunità β svolge quindi una funzione attivatoria, nei confronti della subunità catalitica. Nel caso di alcuni substrati, β risulta essere addirittura indispensabile e il monomero da solo è su di essi inattivo o solo debolmente attivo (Blaydes e Hupp, 1999; Marin et al., 2000; Theis-Febvre et al., 2003). Sono stati infine individuati alcuni casi in cui la fosforilazione avviene ad opera di CK2 α monomerica e non dell'oloenzima: due esempi significativi sono la calmodulina (Marin et al., 1999) e la proteina HS1 (Ruzzene et al., 2000). Qui la subunità β ha effetto inibitorio e solo in presenza di peptidi poliaminici (ad esempio la polilisina) l'attività del tetramero può essere ripristinata. Probabilmente le poliamine riescono a facilitare l'interazione fra questi substrati e l'oloenzima stesso. Quanto detto a proposito dei substrati di CK2 è schematizzato in Figura 3.

CK2	Monomero		Tetramero
	$2\alpha/\alpha' + \beta_2$	$\rightleftharpoons$	$(\alpha/\alpha')_2\beta_2$
Substrato peptidico	Attivo		Attivo
Substrato proteico			
CLASS I (e.g. I-2)	Attivo		Attivo
CLASS II (e.g. CaM)	Attivo		Inattivo
CLASS III (e.g. Rev)	Inattivo		Attivo

Figura 3: Rappresentazione schematica dei tre principali gruppi di substrati di CK2. (Sarno et al., 2001)

Per quanto riguarda la specificità di sequenza, CK2 appartiene ad un piccolo gruppo di proteinchinasi che richiedono aminoacidi acidi o residui fosforilati, come determinanti di specificità. La sequenza consenso minima per CK2 è la seguente: **S/T**-X-X-E/D/Sp/Yp (dove X = aminoacido generico, S = serina, T = treonina, E = acido glutammico, D = acido aspartico, Sp = serina fosforilata, Yp = tirosina fosforilata). Il determinante aminoacidico più importante si trova in posizione $n + 3$ (dove n indica la posizione del residuo fosforilabile) (Pinna, 1990; Meggio et al., 1994), anche se la presenza di ulteriori aminoacidi acidi, in qualsiasi posizione tra $n - 2$ e $n + 5$,

aumenta l'efficienza di fosforilazione; al contrario, la presenza di un aminoacido basico in questa regione o di una prolina in posizione $n + 1$ fungono invece da forti determinanti negativi per la fosforilazione da parte di CK2.

3.2 Gli inibitori di CK2.

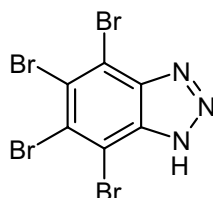
Come detto, CK2 è costitutivamente attiva e non dipende quindi da alcun meccanismo di attivazione noto. Per questo è piuttosto difficile comprenderne in dettaglio il ruolo all'interno della cellula. Poter disporre di composti chimici, in grado di inibirne l'attività in modo efficace ed altamente selettivo, può essere di conseguenza molto utile. Per questo negli ultimi anni sono stati sviluppati e via via perfezionati numerosi inibitori (Sarno et al., 2001, 2002, 2003), che si sono dimostrati preziosi strumenti per studiarne il ruolo fisiologico. Inoltre, poiché la sovraespressione di CK2 è stata associata a diverse condizioni patologiche, l'uso degli inibitori può trovare interessanti risvolti terapeutici. A questo proposito bisogna sottolineare che, per un gran numero di questi inibitori, vi è una buona correlazione fra l'efficacia *in vitro* e la capacità di indurre apoptosi in diverse cellule tumorali in coltura.

I composti finora a disposizione sono molecole eterogenee dal punto di vista della struttura chimica, di piccole dimensioni, idrofobiche, facilmente permeabili attraverso le membrane biologiche. Vanno tutte ad agire sul medesimo bersaglio: sono infatti inibitori competitivi per il sito di legame dell'ATP. Questo sito è altamente conservato nelle diverse proteinchinasi, ma presenta delle caratteristiche peculiari nel caso di CK2: infatti la tasca idrofobica ad esso adiacente è molto più piccola in CK2, rispetto alla maggior parte delle altre proteinchinasi, e ciò è alla base della selettività degli inibitori. Mutando due residui aminoacidici chiave (Val66 e Ile174) della tasca idrofobica con residui più piccoli (Ala), si ottiene un aumento di dimensione della tasca stessa e un calo di efficacia degli inibitori (Sarno et al., 2005). Ciò conferma il concetto che le dimensioni e la forma della tasca idrofobica, adiacente al sito di legame per l'ATP/GTP, sono cruciali per la potenza degli inibitori.

Esistono quattro principali classi di inibitori di CK2: i flavonoidi, che comprendono quercetina ed apigenina; gli idrossiantrachinoni, di cui fanno parte emodina, MNA, MNX; i derivati (aza)tetrabromobenzotriazolici, che hanno come capostipite il TBB (4,5,6,7-tetrabromobenzotriazolo); gli indolchinazoloni, fra cui l'IQA (acido [5-oxo-5,6-diidroindol(1,2-a)chinazolin-7-il]acetico) (Sarno et al., 2003).

I flavonoidi, pur avendo una discreta efficacia, presentano tuttavia una scarsa specificità, andando ad inibire uno spettro piuttosto ampio di proteinchinasi. Per questo non sono generalmente usati come inibitori di prima scelta.

In questa tesi sono stati usati innanzitutto il TBB ed alcuni suoi derivati, in particolare, DMAT, K27 e K64. Il TBB (4,5,6,7-tetrabromobenzotriazolo), la cui struttura è qui di seguito illustrata, rappresenta il primo composto ad esser stato sviluppato ed impiegato diffusamente, per la sua specificità: infatti, in un gruppo di trenta proteinchinasi prese in esame, solo CK2 è stata marcatamente inibita (Sarno et al., 2002; Sarno et al., 2003; Meggio et al., 2004; Pagano et al., 2004) in presenza di TBB 10 μ M. Anche se in seguito si è visto che alcune altre chinasi (in realtà davvero poche), non incluse nel gruppo sopra detto, risentono dell'effetto del TBB, tuttavia esso viene ancora ampiamente utilizzato.



TBB

Figura 4: Struttura del TBB (4,5,6,7-tetrabromobenzotriazolo).

Nel tentativo di ottimizzare il TBB e ottenere composti maggiormente selettivi, si sono in realtà ottenute molecole dotate di ancor maggiore efficacia, ma che non hanno del tutto risolto il problema della selettività. Fra questi ci sono il DMAT (4,5,6,7-tetrabromo-2-dimetilaminobenzimidazolo) (Pagano et al., 2004) e, assai di recente, il K64 (3,4,5,6,7-pentabromoindazolo).

COMPOSTO	IC ₅₀ (μ M)
TBB (4,5,6,7-tetrabromobenzotriazolo)	0.50
DMAT (4,5,6,7-tetrabromo-2-dimetilaminobenzimidazolo)	0.14
MNA (1,8-diidrossiantrachinone)	0.30
MNX (1,8-diidrossixantenone)	0.30

Tabella 1: IC₅₀ *in vitro* di vari inibitori di CK2 (Sarno et al., 2003; Pagano et al., 2004; Salvi et al., 2006).

In Tabella 1 sono riportati i valori di IC_{50} (concentrazione necessaria per avere il 50 % di inibizione *in vitro*) di alcuni inibitori: tali valori rappresentano l'indice di efficacia dei relativi composti. Come si può osservare si tratta in tutti i casi di molecole molto potenti, in grado di inibire CK2 a concentrazioni inferiori al micromolare.

Per quanto riguarda i composti idrossiantrachinonici, l'emodina non è molto specifica, ma alcuni derivati ad essa strutturalmente correlati si sono dimostrati piuttosto utili. In particolare MNA (1,8-diidrossiantrachinone) e MNX (1,8-diidrossixantenone) sono interessanti perché, pur inibendo in maniera confrontabile CK2 tetrameric (IC₅₀ = 0.30 μ M), hanno un'efficacia diversa nei confronti di CK2 α (Salvi et al., 2006): infatti l'MNA è debolmente attivo su CK2 α (IC₅₀ = 2.50 μ M), mentre l'MNX ha su di essa lo stesso effetto che ha sull'oloenzima.

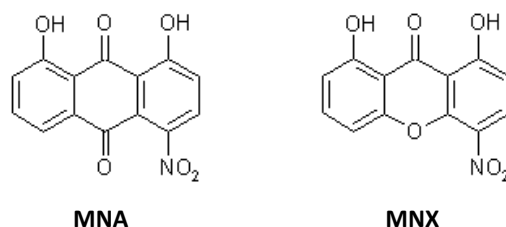


Figura 5: Struttura di MNA (1,8-diidrossiantrachinone) e MNX (1,8-diidrossixantenone).

Va infine ricordato il Q1 (composto ancora coperto da segreto), un composto che - pur non presentando analogie strutturali con tutti i composti finora nominati - inibisce in modo assai efficace CK2 e soprattutto è la molecola più selettiva, finora individuata.

3.3 Ruolo fisiologico di CK2.

CK2 è un enzima altamente conservato e implicato in processi fondamentali della vita di una cellula, che comprendono la regolazione del metabolismo, la traduzione del segnale, la proliferazione, il differenziamento e l'apoptosi. Studi genetici fatti in lievito hanno dimostrato che CK2 è essenziale per la sopravvivenza: infatti l'inattivazione dei geni codificanti le due subunità catalitiche, CK2A1 (α) e CK2A2 (α'), è letale (Padmanabha et al., 1990). Durante questi studi si è anche dimostrata per la prima volta una specializzazione funzionale per CK2 α ed α' : in *Saccharomyces cerevisiae* la perdita di CK2 α si traduce in un'alterazione della polarità cellulare (Retinaswamy et al., 1998), mentre la perdita di CK2 α' porta ad un blocco del ciclo cellulare (Hanna et al., 1995). Anche in cellule di mammifero CK2 è importante per la progressione del ciclo

cellulare ed in particolare per le transizioni $G0 \rightarrow G1$, $G1 \rightarrow S$ e $G2 \rightarrow M$ (Lorenz et al., 1993; Pepperkok et al., 1994; Glover, 1998; Ford et al., 2000). Essa è stata vista associare al fuso mitotico, ai centrosomi, nonché a proteine implicate nella regolazione del ciclo cellulare, come $p34^{cdc2}$ (Russo et al., 1992), $cdc34$ (Block et al., 2001) e la topoisomerasi II (Cardenas et al., 1992). Esperimenti condotti sui topi hanno mostrato che, come nel lievito, l'inattivazione del gene per la subunità α di CK2 o di entrambe le subunità (α e α') risulta essere letale: infatti i topi muoiono già allo stadio embrionale. Invece l'inattivazione della sola CK2 α' , che è l'unica subunità ad essere espressa durante gli ultimi stadi della spermatogenesi, provoca infertilità nei topi maschi, a causa di un'alterazione nella maturazione degli spermatidi simile alla globozoospermia umana (Xu et al., 1999). Questi studi hanno messo in evidenza una delle poche differenze funzionali finora note tra α e α' .

Per quanto riguarda la subunità β , indagini sulle sue funzioni cellulari sono state condotte sempre in lievito e hanno dimostrato che l'inattivazione dei geni CK2B1 e CK2B2 in *Saccharomyces cerevisiae* non sembra essere altrettanto drammatica quanto quella della subunità catalitica; infatti non si osservano effetti sui lieviti cresciuti in mezzo di coltura normale, mentre si ha una marcata sensibilità in presenza di cationi Na^+ e Li^+ , suggerendo un possibile coinvolgimento di CK2 nel controllo dell'omeostasi del lievito (Bidwai et al. 1995). Anche se nei lieviti l'assenza di CK2 β sembra non essere letale, vari esperimenti sui topi hanno messo in evidenza che l'invalidazione dell'unico gene codificante per questa subunità è letale già ad uno stadio precoce dello sviluppo embrionale (Buchou et al., 2003). Questi studi, quindi, mostrano come nei mammiferi anche la subunità β sia fondamentale per la vita della cellula.

3.3.1 CK2: una proteinchinasi di sopravvivenza "a tutti i costi".

Come accennato in precedenza, CK2 entra in gioco a diversi livelli nella vita delle cellule, con lo scopo di preservarne la vitalità in condizioni ottimali. Tuttavia essa si può rivelare un'arma a doppio taglio, poiché un piccolo sbilanciamento nei suoi livelli di espressione può portare a condizioni patologiche estremamente gravi: essendo CK2 costitutivamente attiva, il risultato è una perpetuazione incontrollata di segnali di sopravvivenza. Ad esempio elevati livelli di CK2 sono stati documentati in numerosi tipi di cancro e la sua sovraespressione in modelli murini induce tumorigenesi nei linfociti (Seldin et Leder, 1995) e nella ghiandola mammaria (Landesman et al., 2001).

D'altro canto, ci sono evidenze che hanno indicato la funzione anti-apoptotica di CK2. Innanzitutto la diminuzione del livello di espressione di CK2, tramite oligonucleotidi anti-senso, induce apoptosi in varie linee cellulari tumorali (Wang et al., 2001). Inoltre si è osservato che il trattamento di cellule Jurkat con inibitori specifici per CK2 induce apoptosi (Ruzzene et al., 2002); mentre l'apoptosi indotta chimicamente (ad esempio tramite etoposide) risulta attenuata in seguito alla sovraespressione anche della sola subunità catalitica di CK2 (Guo et al., 2001).

I meccanismi attraverso i quali questa proteinchinasi di sopravvivenza esplica le sue funzioni sono molteplici e solo in parte chiariti. Qui di seguito verrà presentata una panoramica delle vie di sopravvivenza a cui CK2 prende parte.

3.3.2 Ruolo anti-apoptotico di CK2.

Recentemente si va delineando con sempre maggior chiarezza una funzione anti-apoptotica di CK2. Essa è stata messa in relazione diretta sia con l'apoptosi recettoriale (Izeradjene et al., 2004) sia con l'apoptosi indotta da danni al DNA (Yamane e Kinsella, 2005).

Innanzitutto CK2 è in grado di proteggere dall'azione delle caspasi alcune proteine coinvolte nella regolazione dell'apoptosi. Le caspasi sono delle proteasi cisteiniche, che tagliano i loro substrati al fianco C-terminale di residui di aspartato; esse svolgono un ruolo importante sia nell'induzione che nell'esecuzione dell'apoptosi. CK2 fosforila alcuni substrati caspatici in prossimità del sito di taglio delle caspasi stesse e in questo modo protegge le cellule dall'entrata in apoptosi. E' interessante sottolineare che c'è una grande somiglianza fra la sequenza di riconoscimento per il taglio delle caspasi e la sequenza consenso per la fosforilazione da parte di CK2: ciò potrebbe indicare un coinvolgimento di CK2 nella protezione di numerosissimi bersagli caspatici. Fra quelli noti ci sono BID (Desagher et al., 2001), Max (Krippner-Heidenreich et al., 2001), la connexina 45.6 (Yin et al., 2001), PTEN (Torres et al., 2003) e HS1 (Ruzzene et al., 2002). Ad esempio BID appartiene alla famiglia delle proteine Bcl-2 e svolge un ruolo cruciale nell'induzione dell'apoptosi recettoriale indotta tramite il recettore Fas. In seguito allo stimolo apoptotico, BID viene tagliata dalla caspasi-8 e si forma così un frammento in grado di traslocare al mitocondrio, favorendo in questo modo la liberazione del citocromo C dallo spazio intermembranale e l'attivazione in sequenza di varie caspasi (Li et al., 1998). La fosforilazione di Bid da parte di CK2 rende la proteina resistente alla proteolisi indotta dalla caspasi-8 (Desagher et al., 2001). Max è un'altra proteina coinvolta nell'apoptosi, nonché nella proliferazione e nel differenziamento ed è il principale componente del gruppo di fattori di trascrizione Myc/Max/Mad. Max viene tagliato dalle caspasi-5 e 7 sempre in

seguito alla risposta indotta dal recettore Fas. La proteolisi di Max è in grado di promuoverne l'attività trascrizionale, stimolando così l'espressione di geni proapoptotici. Anche in questo caso, la fosforilazione da parte di CK2 rende questo fattore resistente al taglio da parte delle caspasi (Krippner-Heidenreich et al., 2001). Un altro esempio interessante è quello del soppressore tumorale PTEN, una fosfatasi coinvolta nella defosforilazione specifica del gruppo fosfato D3 del fosfatidilinositolo 3,4,5-trifosfato (PIP3). Tramite questa defosforilazione, PTEN è in grado di bloccare le vie di trasduzione stimulate dalla fosfatidilinositolo-3-chinasi (PI3K) (Chang et al., 1997), in particolare la via di Akt, che svolge nella cellula un'importante funzione di promozione della sopravvivenza (Datta et al., 1999; Vivanco e Sawyers, 1999). Durante l'apoptosi PTEN viene tagliata al C-terminale dalla caspasi-3; la fosforilazione da parte di CK2 previene questo taglio (Torres et al., 2003). Inoltre questa fosforilazione inattiva PTEN, favorendo di conseguenza la funzione anti-apoptotica della proteinchinasi Akt. Ma di questo argomento si parlerà in dettaglio più avanti.

CK2 è poi in grado di agire anche sull'attività delle caspasi. Essa è in grado di fosforilare un inibitore della caspasi-8, la proteina ARC (*Apoptosis Repressor with Caspase recruitment domain*), permettendone così la colocalizzazione con la caspasi stessa a livello del mitocondrio (Li et al., 2002). Inoltre CK2 fosforila la procaspasi-2 e ne impedisce la dimerizzazione e quindi l'attivazione. Quindi CK2, oltre a proteggere le singole proteine dalla degradazione caspasi-dipendente, agisce direttamente sulle caspasi, modulandone l'attività.

Un'ulteriore regolazione dell'attività caspasica si ha in cellule tumorali in risposta a TRAIL (*TNF-Related Apoptosis Inducing Ligand*): CK2 è in grado di bloccare indirettamente la formazione del DISC (*TRAIL-induced Death Inducing Signaling Complex*), un complesso fondamentale per la trasmissione del segnale apoptotico, in particolare per l'attivazione della caspasi-8 (Izseradjene et al., 2005).

3.3.3 La via di segnale NF- κ B.

NF- κ B è un fattore di trascrizione coinvolto nella risposta infiammatoria, nella proliferazione e nell'apoptosi. Una disfunzione nella sua regolazione può portare allo sviluppo di tumori, a causa della perdita di controllo del ciclo cellulare e della resistenza all'apoptosi. Normalmente rimane inattivo nel citosol, associato alla proteina inibitoria I κ B. L'attivazione di NF- κ B avviene, in seguito a stimolo, per fosforilazione di I κ B, che viene di conseguenza degradato per mezzo del proteasoma. NF- κ B è così libero di andare al nucleo, dove si lega al DNA e svolge la sua funzione di promotore trascrizionale, portando all'espressione di fattori pro-sopravvivenza. CK2 fosforila I κ B (Barroga et

al., 1995) e promuove così la sua degradazione, agevolando indirettamente l'attività di NF- κ B. CK2 fosforila anche direttamente NF- κ B e ne stimola ulteriormente la funzione (Wang et al., 2000). Inoltre il promotore del gene di CK2 α è regolato da NF- κ B stesso, e ciò permette di ipotizzare l'esistenza di un *loop* di retrocontrollo positivo, che conduce a una sovraespressione coordinata tra CK2 α e NF- κ B (Krehan et al., 2000).

3.3.4 La via di segnale Wnt.

La via di segnale dipendente dal ligando Wnt svolge un ruolo molto importante durante l'embriogenesi. In seguito, qualora venga attivata, porta allo sviluppo di tumori, per aumento della sopravvivenza cellulare e blocco dell'apoptosi (Chen et al., 2001). Elevati livelli del fattore di trascrizione β -catenina, attivato lungo la via di segnale Wnt, portano all'espressione di fattori di sopravvivenza. In assenza del ligando Wnt, la β -catenina viene degradata tramite il proteasoma, mentre in presenza di Wnt CK2 è in grado di fosforilare la β -catenina e di preservarla dalla degradazione (Song et al., 2003); in seguito a questa fosforilazione la β -catenina può andare al nucleo e portare alla trascrizione di segnali pro-sopravvivenza.

CK2 fosforila anche altri componenti di questa via di segnale, come le proteine Dishevelled (Dvl), che controllano indirettamente la degradazione via proteasoma della β -catenina. La fosforilazione da parte di CK2 inibisce l'attività di Dvl, porta ad un aumento della β -catenina e quindi promuove la vitalità cellulare (Willert et al., 1997). Questo porta, fra le altre cose, ad un aumento della *survivin*, un inibitore della funzione caspasi e quindi un fattore anti-apoptotico: un aumento della *survivin* è stato recentemente associato ad un aumento dell'espressione di CK2 nella tumorigenesi (Tapia et al., 2006).

3.3.5 La via di segnale PI3K/Akt.

Un'altra importante via di segnale di sopravvivenza è quella della PI3K, che porta all'attivazione della proteinchinasi Akt e si esplica attraverso varie vie, tra cui quella di NF- κ B, la regolazione dell'attività delle caspasi e l'inattivazione della proteina anti-apoptotica BAD. CK2 fosforila direttamente Akt sul residuo Ser129 e ne determina una iper-attivazione (Di Maira et al., 2005). Inoltre già si è visto come CK2 fosforili e inattivi la fosfatasi PTEN (Torres et al., 2003), che altrimenti svolge un ruolo inibitorio indiretto nei confronti di Akt. Di questo argomento si parlerà in dettaglio in seguito.

3.3.6 Risposte cellulari a condizioni di stress.

Ulteriori prove per un potenziale ruolo di CK2 nella modulazione di eventi che controllano decisioni relative alla morte o alla sopravvivenza della cellula sono state fornite da vari studi che hanno dimostrato un legame tra CK2 e la risposta cellulare ai vari segnali di stress (Ahmed et al., 2002). Studi genetici in *Saccharomyces pombe* e *Saccharomyces cerevisiae* indicano, ad esempio, che CK2 è coinvolta nella risposta al danno del DNA (Toczyski et al., 1997, Ghavidel e Schultz, 2001). E' stato osservato, inoltre, che la sovraespressione di CK2 β in fibroblasti rende queste cellule meno sensibili all'irraggiamento con raggi ultravioletti (Teitz et al., 1990); al contrario l'inibizione di CK2 incrementa la sensibilità delle cellule a vari agenti genotossici (Fritz e Kaina, 1999; Yamane e Kinsella, 2005).

Oltre a queste evidenze sperimentali, è noto che il soppressore tumorale p53, un importante fattore di trascrizione in grado di bloccare la crescita cellulare e indurre apoptosi in seguito a danno del DNA (Oren, 2003), viene fosforilato da CK2 a livello della Ser³⁹² sia *in vitro* che *in vivo* in risposta ad irraggiamento con raggi ultravioletti, anche se il significato biologico di questa fosforilazione resta tuttora da chiarire (Keller et al., 2001, Kapoor e Lozano, 1998). Inoltre CK2 è in grado di fosforilare l'oncoproteina Mdm2, l'antagonista fisiologico di p53, che la inattiva sia tramite blocco della sua attività trascrizionale, che promuovendo la sua ubiquitinazione e conseguente degradazione mediata dal proteasoma (Allende-Vega et al., 2005). Pertanto CK2 potrebbe controllare la funzione di p53 sia direttamente, tramite fosforilazione, che indirettamente, via Mdm2.

Il fattore di trascrizione CHOP come p53 è in grado invece di promuovere l'apoptosi e l'arresto del ciclo cellulare in risposta a vari stress (Barone et al., 1994; Zinzner et al., 1998; Maytin et al., 2001). In questo caso l'associazione di CK2 con CHOP, e la sua fosforilazione a livello del dominio di legame con il DNA, portano ad un netto calo dell'attività trascrizionale (Ubeda e Habener, 2003).

E' da ricordare inoltre che in cellule di mammifero è stata osservata una rilocalizzazione di entrambe le subunità di CK2 in specifiche zone del nucleo in seguito a shock termico (Gerber et al., 2000). In particolare in cellule di carcinoma prostatico esposte ad una temperatura di 45°C, CK2 risulta localizzata nella matrice nucleare (Davis et al., 2000).

Tutte queste evidenze sperimentali indicano un forte coinvolgimento di CK2 nella promozione della sopravvivenza cellulare in risposta a vari tipi di stress.

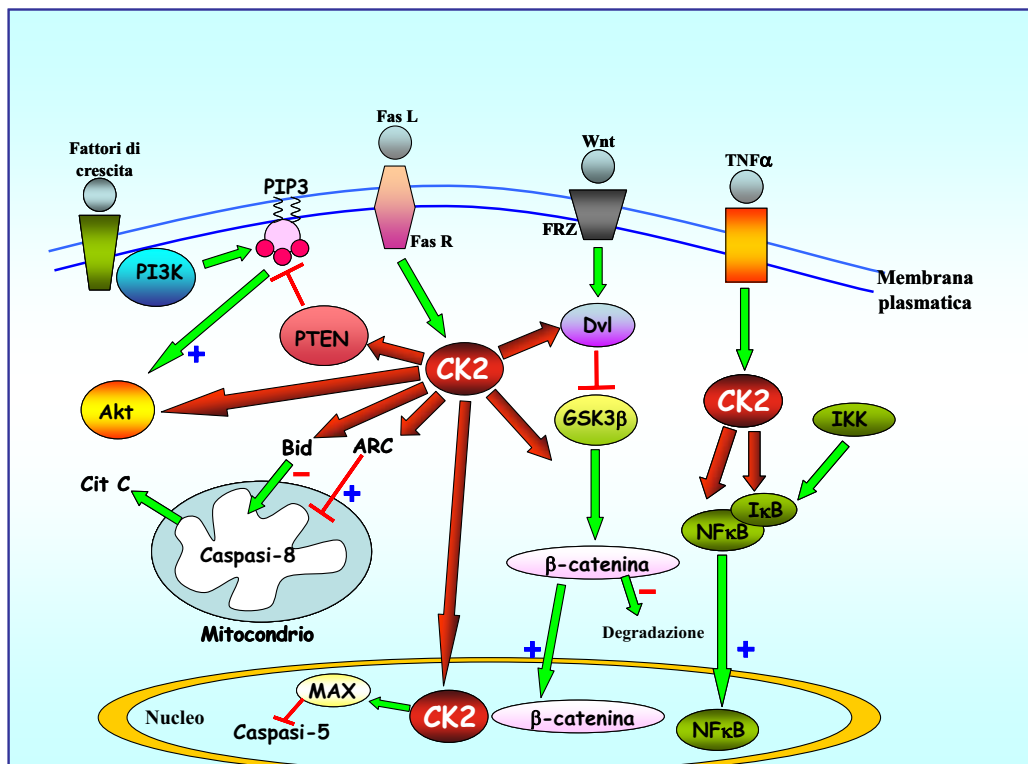


Fig 6: Rappresentazione schematica di alcuni processi cellulari attraverso cui CK2 svolge il suo ruolo antiapoptotico.

3.3.7 Ruolo di CK2 nell'infezione virale.

Tra i numerosi substrati di CK2 sono note anche molte proteine virali. Nella maggior parte dei casi le proteine bersaglio di CK2 risultano avere un importante ruolo nella replicazione del virus, regolando in particolare l'attività trascrizionale (Belenguer et al., 1989; Voit et al., 1995; Hockman e Schultz, 1996; Winter et al., 1997; Dal Pero, Di Maira et al., 2007). In generale CK2 sembra svolgere un importante ruolo nel ciclo vitale di molti virus, favorendo da un lato la sopravvivenza cellulare grazie alla sua azione anti-apoptotica, dall'altro intervenendo direttamente nei meccanismi alla base della replicazione virale.

4. LA PROTEINCHINASI Akt.

Akt, anche detta PKB, è una proteinchinasi serin/treoninica, appartenente al gruppo delle chinasi AGC. Il nome Akt deriva dal fatto che inizialmente furono identificati due geni, omologhi al già noto oncogene virale v-Akt e per questo chiamati Akt1 e Akt2. In seguito, tre studi indipendenti dimostrarono che questi geni codificano per una proteina di 57 kDa, che presenta numerose analogie sia con la proteinchinasi A, sia con la proteinchinasi C, da cui il nome di PKB. Anche l'altro nome, meno usato, con cui questa proteinchinasi viene indicata, richiama la suddetta analogia: RAC (*Related to A and C*) (Jones et al., 1991). In seguito indicherò sempre l'enzima con il nome di Akt.

Una deregolazione delle sue funzioni è stata associata a numerose patologie, fra cui il diabete e varie forme di cancro. Infatti Akt è molto importante nel regolare vie di segnale, in risposta a stimoli extracellulari e a vari fattori di crescita, che presiedono a funzioni chiave per la vitalità di una cellula, come il metabolismo, la proliferazione, la sopravvivenza, la resistenza all'apoptosi.

4.1 Struttura di Akt.

Nei mammiferi esistono tre isoforme di Akt: Akt1 (PKB α), Akt2 (PKB β) e Akt3 (PKB γ) (Hill e Hemmings, 2002). Le tre isoforme vengono codificate da geni distinti, ma presentano un'elevata omologia di sequenza. Akt1 e Akt2 sono espresse quasi ubiquitariamente, mentre Akt3 è presente soprattutto a livello cerebrale.

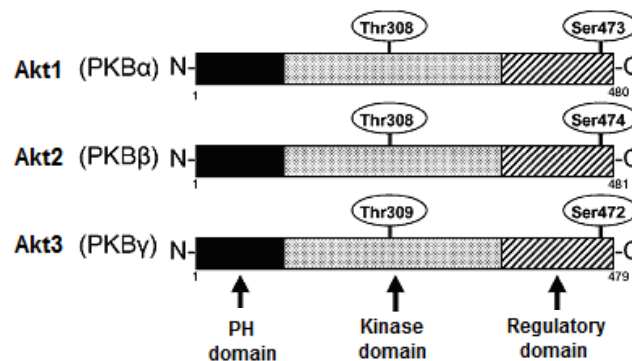


Figura 1: Struttura dei domini delle isoforme di Akt/PKB. Ogni isoforma possiede 3 domini funzionali: un dominio PH, N-terminale, responsabile del legame con i fosfolipidi, un dominio catalitico centrale che contiene la Thr308 (Thr309 in Akt3), e un dominio regolatorio, C-terminale, che contiene la Ser473 in Akt1 (Ser474 in Akt2, Ser472 in Akt3) (Immagine tratta da Osaki et al., 2004).

Strutturalmente, ciascuna delle isoforme di Akt è composta di tre domini conservati: un dominio PH (*Pleckstrin Homology*) all’N-terminale, un dominio catalitico centrale ed un dominio C-terminale. Sebbene non sia ancora disponibile la struttura cristallografica completa dell’enzima, tuttavia la struttura di tali domini è stata definita (Kumar et al., 2005). Il dominio PH, composto di circa cento aminoacidi, è identico per l’80% nelle tre isoforme ed ha la funzione di legare con alta affinità i fosfolipidi fosfatidilinositolo 3,4,5-trifosfato e fosfatidilinositolo 3,4-difosfato, presenti a livello di membrana plasmatica. Esso è collegato con il dominio catalitico tramite una sequenza di circa quaranta aminoacidi, di natura prevalentemente acida (*acidic linker*). Questa regione sembra svolgere un importante ruolo nel determinare la conformazione attiva o inattiva di Akt. Il dominio catalitico centrale è costituito da 250 aminoacidi e presenta molte somiglianze con gli altri membri della famiglia delle AGC proteinchinasi, in particolare con PKA e PKC. Esso contiene un residuo di treonina altamente conservato, la cui fosforilazione è importante per l’attivazione dell’enzima: questo residuo è la Thr308 (numerazione riferita ad Akt1). Il dominio C-terminale, lungo circa quaranta aminoacidi, è identico per circa il 70% nelle diverse isoforme di Akt. Contiene un motivo idrofobico (HM, *hydrophobic motif*), caratteristico del gruppo delle AGC proteinchinasi: F-X-X-F/Y-S/T-Y/F, dove X indica un aminoacido qualunque (Peterson e Schreiber, 1999). Un residuo di serina o di treonina conservato, presente in questo dominio, deve essere fosforilato per ottenere la piena attivazione di Akt; in Akt1 questo residuo è la Ser473.

4.2 Attivazione di Akt.

In assenza di stimoli, Akt si trova nella sua forma inattiva. In risposta a fattori di crescita o a insulina si ha un reclutamento della PI3K (*phosphatidylinositol-3 kinase*) a livello della membrana plasmatica, dove essa genera i secondi messaggeri fosfatidilinositolo 3,4,5-trifosfato e fosfatidilinositolo 3,4-difosfato. Akt trasloca a sua volta in prossimità della membrana, attratta proprio dall’aumento locale di tali fosfolipidi, con i quali interagisce tramite il suo dominio PH (Bottomley et al., 1998). Come conseguenza di questa interazione, Akt subisce un cambiamento conformazionale che facilita la fosforilazione dei suoi residui chiave, Thr308 e Ser473, da parte delle proteinchinasi responsabili, che sono rispettivamente PDK1 (*phosphoinositide-dependent kinase 1*) (Vanhaesebroeck e Waterfield, 1999) e il complesso mTORC2 (*mammalian target of rapamycin complex 2*) (Sarbasov et al. 2005; Hresko e Mueckler, 2005). PDK1 è una proteinchinasi serin-treoninica di circa 63 kDa, che contiene un dominio PH al C-terminale, tramite il quale colocalizza insieme ad Akt in prossimità della membrana plasmatica. Qui i due enzimi possono

interagire e PDK1 fosforila Akt sulla Thr308 nel *loop* di attivazione, rendendo così accessibile il sito catalitico (Alessi et al., 1996). Questa fosforilazione è già in parte sufficiente per attivare Akt, anche se per avere la piena attivazione è necessaria la fosforilazione del secondo residuo chiave: la Ser473 nel dominio C-terminale. Questa fosforilazione è in grado di stabilizzare il sito attivo nella sua conformazione attiva, favorendo l'interazione del motivo idrofobico con il sito di legame per l'ATP (Frodin et al., 2002; Yang et al., 2002), e facilita inoltre la fosforilazione della Thr308 da parte di PDK1 (Sarbasov et al., 2005). Benché si sia dibattuto a lungo sull'enzima responsabile della fosforilazione della Ser473, ora si sa che essa va attribuita al complesso mTORC2 (anche detto mTOR-RICTOR). mTOR è un membro della famiglia di proteinchinasi correlate alla PI3K, molto importante in quanto in grado di regolare la crescita e la proliferazione cellulare in risposta a vari fattori di crescita (Fingar e Blenis, 2004). Esso può formare due diversi complessi: il primo, mTORC1 (anche detto mTOR-RAPTOR), è responsabile della fosforilazione della p70S6 chinasi (Kuo et al., 1992) ed è sensibile al trattamento con rapamicina; il secondo, mTORC2, è insensibile alla rapamicina ed è responsabile della fosforilazione della S473 di Akt, benché con un meccanismo non ancora del tutto chiarito.

Va detto poi che alcuni lavori (Chen et al., 2001; Conus et al., 2002) hanno dimostrato un possibile ruolo della fosforilazione di residui di tirosina nell'attivazione di Akt. In particolare tre residui sembrano essere importanti: Tyr315 e Tyr326 nel dominio catalitico e Tyr474 nel dominio C-terminale. La fosforilazione di tali siti, ad opera delle chinasi Src, è importante per la piena attivazione di Akt.

Infine, il nostro gruppo di lavoro ha recentemente dimostrato che il residuo Ser129 di Akt, qualora fosforilato da CK2, contribuisce a conferire all'enzima uno stato di piena attivazione (Di Maira et al., 2005).

Una volta attivata, Akt si stacca dalla membrana plasmatica ed è pronta per fosforilare i suoi substrati nel citosol e nel nucleo. Per quanto riguarda lo stato di attivazione di Akt, esso dipende - come nella maggior parte delle vie di traduzione del segnale - dal bilancio tra segnali attivatori e segnali che portano alla disattivazione di Akt, dipendenti dall'azione delle fosfatasi. Ad esempio i livelli di fosfatidilinositolo fosfati, che abbiamo visto essere importanti per reclutare Akt presso la membrana plasmatica, sono altamente regolati principalmente grazie all'azione di varie lipidofosfatasi. In particolare la fosfatasi PTEN (*phosphatase and tensin homologue*) è in grado di defosforilare la posizione 3-OH (Stambolic et al., 1998) del fosfatidilinositolo 3,4,5-trifosfato e del fosfatidilinositolo 3,4-difosfato: in assenza di tale sito fosforilato Akt non è più in grado di

associare con i fosfatidilinositoli. Oltre che dal livello di fosfatidilinositolo fosfati, la regolazione dell'attività di Akt dipende anche dal mantenimento del suo stato fosforilato e in questo contesto svolgono un ruolo importante due proteinfosfatasi: la PP2A (*protein phosphatase 2A*), responsabile della defosforilazione della Thr308 (Andjelkovic et al., 1996), e la PHLPP (*PH domain leucine-rich repeat protein phosphatase*) per la Ser473 (Gao et al., 2005). Di quest'ultima sono attualmente note due isoforme, che defosforilano selettivamente la Ser473 di diverse isoforme di Akt: rispettivamente PHLPP1 gioca un ruolo nel metabolismo del glucosio, in cui agisce prevalentemente Akt2, mentre PHLPP2 agisce nelle vie di segnale di sopravvivenza cellulare, in cui Akt1 ha un ruolo centrale (Brognard et al., 2007).

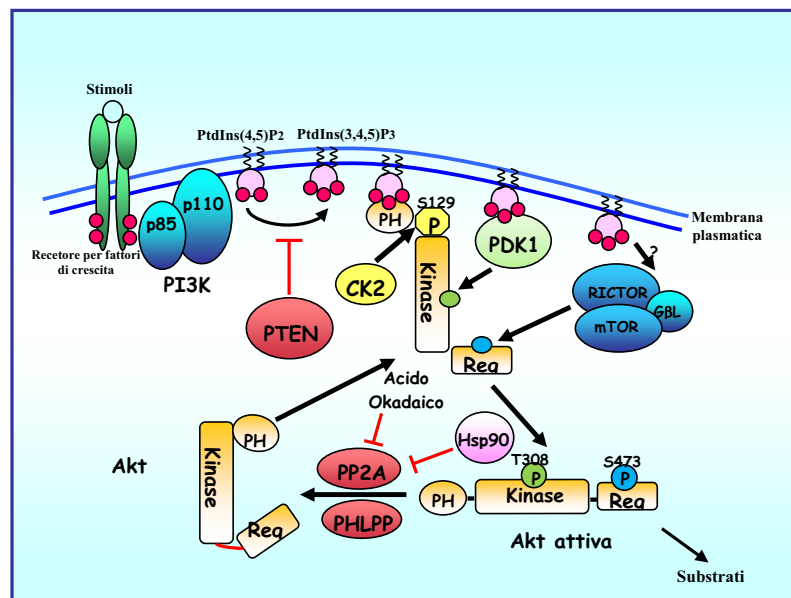


Figura 2: Regolazione di attivazione e inattivazione di Akt da parte proteinchinasi e fosfatasi.

Lo stato di fosforilazione della Ser473 viene controllato anche dall'associazione di Akt con alcune proteine, come CMTP (*carboxyl-terminal modulator protein*) e TRB3 (omologo della proteina *Tribble* di *Drosophila*). La prima si lega al C-terminale di Akt, riducendo la fosforilazione della Ser473 e prevenendo l'attivazione dell'enzima in condizioni anomale (Maira et al., 2001). TRB3 si lega invece al dominio catalitico (Du et al., 2003), svolgendo una funzione analoga a quella di CMTP.

Infine va ricordata l'importante funzione del complesso di Akt con la *chaperonina* Hsp90 e la co-chaperonina cdc37: la formazione di questo complesso ha una funzione protettiva per Akt, in quanto serve ad ostacolare l'accesso alla Thr308 fosforilata, da parte della fosfatasi PP2A (Sato et al, 2000), mantenendo così Akt in uno stato attivato. Vista l'importanza di Hsp90 nella trattazione dei risultati di questa tesi, verrà qui di seguito dedicato ad essa un paragrafo.

4.2.1 La chaperonina Hsp90.

Hsp90 è una *chaperonina* altamente conservata dai procarioti agli eucarioti. E' abbondantemente espressa nelle cellule, soprattutto in risposta a condizioni di stress, e gioca un ruolo essenziale per la vitalità: infatti essa controlla la maturazione e/o l'attivazione di un gran numero di proteine regolatorie. Hsp90 svolge la sua funzione in forma di omodimero, in cui due monomeri associano tramite il dominio C-terminale, e la sua attività è ATP-dipendente.

Fra i bersagli preferenziali di Hsp90 ci sono proteinchinasi e recettori ormonali, con cui essa associa sia in modo transitorio sia in modo stabile, formando dei complessi con effetto stabilizzante sulle proteine bersaglio. Nella maggior parte dei casi questi complessi contengono ulteriori componenti, come la *co-chaperonina* Cdc37 (Basso et al., 2002). Quest'ultima possiede attività di *chaperone* molecolare di per se stessa, ma può anche fungere da "ponte di ancoraggio" fra la proteina bersaglio e Hsp90. Hsp90 e Cdc37 sembrano associare preferenzialmente con proteinchinasi coinvolte in importanti sistemi di trasduzione del segnale, fra le quali si contano anche CK2 (Miyata e Yahara, 1992) ed Akt (Sato et al., 2000).

E' stato dimostrato infatti che CK2 fosforila *in vitro* e *in vivo* sia Hsp90 (Miyata e Yahara, 1992) sia Cdc37 (Miyata e Nishida, 2004) e che questa fosforilazione è indispensabile per la funzione delle due proteine; inoltre CK2 associa fisicamente con esse e gode a sua volta dell'effetto stabilizzante, garantito dal complesso Hsp90-Cdc37.

Per quanto riguarda Akt, è noto che essa associa con Hsp90 e Cdc37 e che questo complesso è importante sia per la stabilità dell'enzima, sia per il mantenimento della sua attività catalitica. Infatti quando la formazione del complesso viene impedita, Akt risulta essere più esposta all'azione della fosfatasi PP2A, che - come detto in precedenza - è responsabile della defosforilazione del residuo Thr308 nel dominio catalitico di Akt. Come conseguenza di ciò, Akt è meno attiva e le cellule sono maggiormente sensibili a stimoli apoptotici di varia natura (Sato et al., 2000; Fujiwara et al., 2004). Hsp90 agisce anche ad un altro livello nella regolazione dello stato di fosforilazione della Thr308 di Akt, poiché associa con la proteinchinasi PDK1, responsabile della

sua fosforilazione. Questa associazione stabilizza la chinasi (Fujita et al., 2002) e promuove indirettamente l'attivazione di Akt.

4.3 Regolazione della sopravvivenza cellulare da parte di Akt.

La via di segnale di Akt è considerata come una delle più importanti nella regolazione della sopravvivenza cellulare: la sua attivazione in risposta a stimoli extracellulari porta ad effetti significativi sul metabolismo, sulla crescita cellulare, sul ciclo cellulare e sull'apoptosi. Anomalie nello stato di attivazione di Akt o la sua sovraespressione sono spesso associate a gravi patologie. Per questo la conoscenza dei meccanismi di regolazione di questa proteinchinasi e dei suoi substrati fisiologici è cruciale.

Akt è in grado di agire su un grande numero di substrati, andando a fosforilare residui di serina e treonina, posti in un intorno basico; infatti la sua sequenza minima consenso è R-X-R-X- X-**S/T**-Hyd (dove X è un qualunque aminoacido mentre Hyd è un aminoacido idrofobico) (Alessi et al., 1996, Obata et al., 2000). Qui di seguito approfondirò in particolare gli aspetti relativi alla promozione della sopravvivenza da parte di Akt, in quanto importanti ai fini di questa tesi.

4.3.1 Regolazione diretta dell'apoptosi.

La sovraespressione di Akt in diversi tipi di cellule rende queste ultime resistenti all'apoptosi (Yao e Cooper, 1995), variamente indotta. Ciò si spiega con il fatto che numerosi substrati di Akt sono proteine note per regolare l'apoptosi, come Bad, la caspasi-9, i fattori di trascrizione *forkhead*, solo per fare degli esempi.

Bad è un membro della famiglia Bcl-2, un'importante classe di proteine coinvolte nella regolazione dell'apoptosi. Bad forma un eterodimero con le proteine anti-apoptotiche Bcl-2 e Bcl-xL, antagonizzando così la loro funzione (Manning e Cantley, 2007). Akt fosforila Bad sul residuo Ser136 e impedisce in questo modo la formazione del complesso, ripristinando la funzione antiapoptotica di Bcl-2 e Bcl-xL. Infatti, in seguito alla fosforilazione da parte di Akt, BAD viene sequestrata a livello citosolico da parte delle proteine 14-3-3 (proteine in grado di legarsi a specifiche sequenze nella molecola bersaglio contenenti serine o treonine fosforilate) e in questo modo non può più svolgere il suo ruolo pro-apoptotico (del Peso et al., 1997, Datta et al., 1997).

Anche la caspasi-9, un importante iniziatore ed effettore dell'apoptosi, risulta inattivata da Akt. Infatti è stato dimostrato che la procaspasi-9, il precursore inattivo della caspasi-9, è un substrato

di Akt, che la fosforila sulla Ser196. Questa fosforilazione blocca l'attività proteasica della caspasi (Cardone et al., 1998).

Le SAPK (*stress activated protein kinases*) come JNK o p38 MAPK sono proteinchinasi coinvolte nell'induzione di apoptosi in seguito a esposizione delle cellule a vari tipi di stress, come radiazioni ionizzanti, shock termico o stress osmotico (Davis, 2000). E' stato messo in evidenza che Akt è in grado di interferire con la via di segnale delle SAPK inibendo in questo modo l'apoptosi. In particolare è in grado di fosforilare e inattivare ASK1 (*apoptosis signal-regulating kinase1*), una MAP chinasi-chinasi-chinasi in grado di trasmettere i segnali di stress a JNK e alla chinasi p38 MAP chinasi, bloccando in questo modo il segnale apoptotico (Kim et al., 2001).

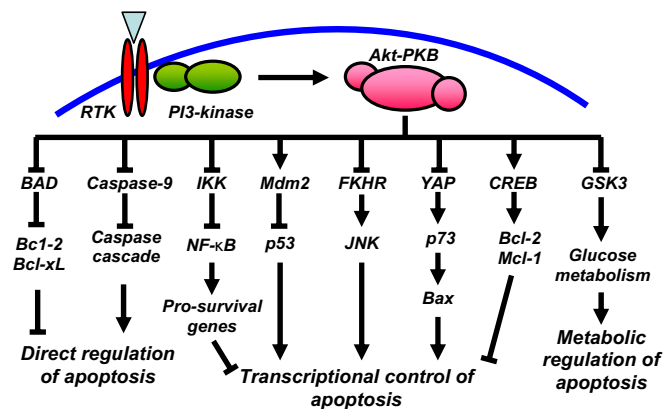


Figura 3: Vari meccanismi di promozione della sopravvivenza regolati da Akt (Immagine adattata da Song et al, 2005).

4.3.2 Controllo trascrizionale dell'apoptosi.

Akt regola inoltre l'apoptosi fosforilando direttamente alcuni fattori di trascrizione in essa coinvolti. In particolare è in grado di regolare negativamente i fattori di trascrizione che promuovono l'espressione di geni pro-apoptotici e favorire al contrario l'attività di fattori di trascrizione con funzione antiapoptotica. Fra i primi c'è la famiglia dei fattori di trascrizione *forkhead*: FOXO1 (FKHR), FOXO2, FOXO3a (FKHRL1) e FOXO4 (AFX) (Biggs III et al., 1999, Brunet et al., 1999, Rena et al., 1999; Guo et al., 1999; Zheng et al., 2000). In determinate condizioni cellulari, essi risultano essere localizzati nel nucleo dove possono promuovere la trascrizione di geni pro-apoptotici (Dijkers et al., 2000, Modur et al., 2002). In seguito a fosforilazione da parte di Akt, queste proteine vengono espulse dal nucleo perché reclutate dalle proteine 14-3-3 citosoliche, portando come conseguenza a una riduzione dell'attività trascrizionale, richiesta per

promuovere l'apoptosi. Anche il fattore di trascrizione pro-apoptotico YAP (*Yes-associated protein*) viene fosforilato da Akt e ciò causa il suo sequestro nel citosol e l'inibizione della sua funzione (Basu et al., 2003). Akt può poi fosforilare fattori di trascrizione con funzione antiapoptotica, come CREB (*cyclic AMP-response element binding protein*): la fosforilazione aumenta la sua attività trascrizionale e promuove in questo caso l'espressione di importanti geni a funzione antiapoptotica, come Bcl-2 e Mcl-1 (Wang et al., 1999).

Inoltre Akt è in grado di favorire l'attività biologica di molecole anti-apoptotiche. Un esempio di questo tipo è la sua azione sul segnale di NF- κ B (*nuclear factor- κ B*), un fattore di trascrizione coinvolto nella regolazione di importanti processi cellulari tra cui l'apoptosi, tramite l'espressione di geni a funzione antiapoptotica. Normalmente, in cellule a riposo, NF- κ B si trova nel citosol a causa dell'interazione con I κ B. In seguito a determinati stimoli o stress extracellulari, avvengono delle fosforilazioni specifiche su I κ B, ad opera di varie proteinchinasi, tra cui IKK (*I κ B Kinase*), che promuovono la degradazione dell'inibitore proteico e la conseguente traslocazione nel nucleo di NF- κ B, dove esso può svolgere la propria funzione di promozione della sopravvivenza. E' stato messo in evidenza che Akt è in grado di interagire con le IKK e di attivarle, promuovendo così la degradazione I κ B e la conseguente espressione di geni pro-sopravvivenza (Romashkova e Makarov, 1999).

Akt agisce anche sulla funzione del soppressore tumorale p53, regolatore della morte cellulare in condizioni di stress (Oren et al., 2003): questa regolazione è di tipo indiretto e viene ottenuta per fosforilazione da parte di Akt dell'inibitore di p53 Mdm2 (*murine double minute 2*) (Mayo e Donner, 2001; Gottlieb et al., 2002), che può così traslocare al nucleo o promuovere l'ubiquitinazione di p53. Come conseguenza si ha una destabilizzazione di p53, che porta a una maggiore sopravvivenza cellulare.

4.3.3 Controllo metabolico dell'apoptosi.

Akt è anche in grado di proteggere le cellule attraverso la regolazione del loro metabolismo, in particolare controllando le risposte all'insulina. L'insulina promuove la sintesi del glicogeno e questo effetto è mediato dall'attivazione di Akt, che fosforila GSK3 (*glycogen synthase kinase 3*), inibendola. L'effetto di questa inibizione è appunto la promozione della conversione del glucosio in glicogeno (Cross et al., 2000). Akt sembra anche coinvolta nell'importo di glucosio nella cellula, tramite l'aumento di trasportatori per il glucosio a livello della membrana plasmatica. E' stato osservato che la capacità di Akt di promuovere l'importo di glucosio all'interno della cellula può

prevenire l'attivazione di Bax, un membro pro-apototico della famiglia Bcl-2, impedendo la conseguente morte cellulare indotta da vari stimoli apoptotici (Rathmell et al., 2003).

Infine Akt gioca un ruolo chiave nell'angiogenesi: infatti è in grado di attivare la eNOS (*endothelial nitric oxide synthase*) in risposta al fattore di crescita dell'endotelio vasale (Manning e Cantley, 2007). Questa attivazione porta all'aumento di ossido nitrico, che stimola la vasodilatazione, il rimodellamento dei vasi sanguigni e l'angiogenesi. Anche questo evento, insieme a tutti quelli elencati in precedenza, contribuisce a promuovere un aumento della vitalità cellulare.

5. LA PROTEINCHINASI PRPK.

PRPK (*p53-related protein kinase*) appartiene al gruppo di proteinchinasi denominate p1D261, una famiglia evolutivamente conservata, che comprende enzimi con caratteristiche atipiche e riguardo ai quali si sa ancora pochissimo. Il membro meglio caratterizzato è la proteinchinasi di lievito Bud32. Nei lieviti questo enzima è molto importante per la sopravvivenza, in quanto la delezione del gene per esso codificante ha come conseguenza gravi difetti nella crescita del lievito stesso: infatti la sua assenza provoca pesanti alterazioni in processi di importanza fondamentale per la cellula, quali la proliferazione, il differenziamento e la morfogenesi (Sartori et al., 2000). PRPK, che condivide con Bud32 il 32% di identità e l'89% di omologia aminoacidica, è considerato l'omologo umano non solo strutturale ma anche funzionale di Bud32.

5.1 Struttura e regolazione di PRPK.

PRPK, assieme ad altre 47 proteinchinasi delle 518 codificate dal genoma umano, è classificata come pseudochinasi (Manning et al., 2002). Le pseudochinasi sono così definite perché mancano di uno o più aminoacidi conservati nel dominio catalitico e necessari per l'attività enzimatica. Questa caratteristica farebbe prevedere la mancanza di attività fosfotransferasica di questa sottofamiglia di proteinchinasi; in realtà, per lo meno nel caso di Bud32 e di PRPK, si osserva una seppur modesta attività chinasica basale.

PRPK e gli altri membri del gruppo p1D261 mostrano una bassa similarità strutturale con le Ser/Thr proteinchinasi e in particolare con il dominio catalitico di tali enzimi. Infatti, pur conservando la struttura complessiva del dominio catalitico, tuttavia presentano alcune caratteristiche peculiari, a causa della presenza di ampie delezioni in punti interni della sequenza. Infatti va detto che PRPK, con i suoi 253 aminoacidi, risulta essere una delle più piccole proteinchinasi finora individuate. In

PRPK sono presenti tutti i residui invarianti che caratterizzano le proteinchinasi, benché inseriti in un contesto aminoacidico alterato. Si può notare ad esempio che essa possiede un *loop* di attivazione marcatamente ridotto, che contiene due residui serinici potenzialmente fosforilabili, suggerendo una possibile regolazione mediante fosforilazione. Riguardo al meccanismo di attivazione di PRPK si sa molto poco, anche perché l'enzima ricombinante è cataliticamente inattivo e ciò ha complicato molto gli studi in proposito. Tuttavia si è visto che, incubando PRPK ricombinante con lisati cellulari, questa viene attivata (Abe Y. *et al.*, 2001), ad indicare che l'ambiente cellulare contiene i componenti necessari all'attivazione della chinasi.

Va detto infine che la regione C-terminale di PRPK ha molte somiglianze con quella degli altri membri della famiglia pID261 e contiene un sito con la sequenza consenso minima per la fosforilazione da parte di Akt (si veda il capitolo relativo); in PRPK questo sito è rappresentato dal residuo Ser250 (Figura 1). Riguardo al significato di questa fosforilazione, si parlerà in seguito, nella parte relativa ai risultati di questa tesi.

H. sapiens	231	KARPVLKKLDEVRLRGRKR SM VG	253
<i>R. norvegicus</i>	221	KSDPVLKKLDEVRLRGRKR SM VG	244
<i>G. gallus</i>	298	KSGPVIKRLDEVRLRGRKR SM IG	321
<i>X. laevis</i>	214	KSGPVIKKLDEVRLRGRKR SM VG	237
<i>D. rerio</i>	208	KSSAVIKKDDEVRLRGRKR SM VG	231
<i>D. melanogaster</i>	201	DEQAVLTKFEEVRARGRKR TM IG	224
<i>A. thaliana</i>	203	QWSATFNKLAQVRQRGRKR TM IG	226
<i>S. cerevisiae</i>	238	KLKEVTKRFEEVRLRGRKR SM LG	261
<i>S. pombe</i>	215	QSKATLRRFEEVRMRGRKR TM IG	238
<i>A. gambie</i>	209	HCKETIAKYEEVRARGRKR TM VG	232
<i>T. cruzi</i>	233	KGSVTMARLEAVRARGRKR SM IG	256

Figura 1: Allineamento del segmento C-terminale di PRPK con quello dei suoi omologhi di altri organismi. Sono evidenziati i residui aminoacidici conservati. In grassetto è indicato il sito con il consenso per la fosforilazione da parte di Akt.

5.2 Funzioni di PRPK.

PRPK è un enzima ancora molto enigmatico e il suo studio è reso ancor più difficile dall'assenza di attività catalitica *in vitro* dell'enzima ricombinante, espresso in *Escherichia coli*. Tuttavia la sua omologia con la proteinchinasi di lievito Bud32 fa pensare che rappresenti una chinasi essenziale per la sopravvivenza cellulare.

Inizialmente PRPK è stata identificata come una proteina principalmente espressa nei linfociti T attivati da interleuchina2 e, per tale motivo, le si attribuì un ruolo nella risposta immunitaria.

Inoltre si è osservato che PRPK è una proteina fortemente espressa nei tessuti in attiva proliferazione, come il testicolo e molte linee cellulari tumorali di origine epiteliale. L'unica sua funzione nota è l'interazione con la proteina p53, che fosforila a livello del residuo Ser15. La fosforilazione in questo residuo catalizzata anche da altre chinasi (DNA-PK (Lees-Miller et al., 1992), ATM (Banin et al., 1998; Canman et al., 1998), ATR (Tibbetts et al., 1999)) è nota per stabilizzare l'oncosoppressore p53, aumentando la sua attività trascrizionale in risposta a danni genotossici. È stato quindi suggerito che PRPK possa svolgere nella cellula un ruolo regolatorio in processi quali il ciclo cellulare e/o l'apoptosi (Abe et al., 2001). A conferma del coinvolgimento di PRPK nella regolazione del ciclo cellulare, è stato osservato che la sua espressione è aumentata nella fase G1 (Abe et al., 2006).

PRPK possiede un segnale di localizzazione nucleare (NLS), posto al centro della sua sequenza aminoacidica, che consente il suo trasporto al nucleo. Si è dimostrato come la distribuzione intracellulare di PRPK vari al variare delle condizioni di espressione: in particolare, se in condizioni normali di crescita essa si localizza a livello citosolico, quando sovraespressa, o in condizioni di stress ossidativo, la sua localizzazione diventa prevalentemente nucleare (Abe et al., 2006). Questa mobilità è dovuta ad una piccola *Ras-like GTPase*, Rab1c, denominata anche Ray, capace di legarsi a PRPK e modulare la sua localizzazione cellulare. Quando sovraespressa, infatti, Ray è capace di trasportare la proteinchinasi al citosol. Un altro partner di PRPK, la cui interazione è stata individuata con il sistema del doppio ibrido e confermata mediante co-immunoprecipitazione, è CGI121, una proteina di 20 kDa evolutivamente conservata. Si è osservato che essa si comporta come un inibitore di PRPK, capace di impedire il suo legame a p53 (Miyoshi et al., 2003). Benchè si sappia ancora molto poco riguardo al significato di questa interazione, tuttavia è stato dimostrato che anche in lievito l'omologo di PRPK, Bud32, interagisce con l'omologo di CGI121. A questa interazione prendono parte anche altri componenti: Kae1 (un'ipotetica metalloproteasi) e Gon7 (una proteina di piccole dimensioni ancora non caratterizzata e conservata evolutivamente solo nei funghi) (Downey et al., 2006; Bianchi e Shore, 2006), per formare un complesso multi-proteico detto KEOPS (*Kinase, putative Endopeptidase and Other Protein of Small Size*) (Downey et al., 2006; Krogan et al., 2006), coinvolto nel mantenimento/formazione dei telomeri e nella regolazione dell'espressione genica. Inoltre Bud32 è in grado di interagire con le glutaredoxine Grx3 e Grx4; quest'ultima è stata anche indicata come un possibile substrato fisiologico di Bud32 (Lopreiato et al., 2004). Come detto in precedenza, PRPK è un omologo funzionale, oltre che strutturale, della proteina di lievito Bud32: essa infatti è in grado di complementare in parte il

fenotipo di crescita rallentata risultante dalla delezione del gene BUD32; inoltre è stato osservato che una forma ricombinante di Bud32 è in grado di interagire con la proteina umana p53 *in vitro*, fosforilandola in Ser15. Le due proteine, Bud32 e PRPK, appartenenti a due organismi così filogeneticamente lontani, mostrano pertanto proprietà biochimiche, ed in parte anche funzionali, conservate (Facchin et al., 2003). Quindi, presumibilmente, la proteina umana potrebbe svolgere funzioni assimilabili in parte a quelle dell'omologo di lievito e può per questo essere ritenuta una proteinchinasi essenziale per la vitalità cellulare, al pari di Bud32.

CAPITOLO 2: *Materiali e metodi*

1. MATERIALI

Anticorpi

Gli anticorpi anti fosfo-Akt (Ser473), Akt1/2/3 totale e Hsp90 sono forniti dalla Santa Cruz Biotechnology. L'anticorpo anti fosfo-Akt (Thr308) è fornito dalla Cell Signaling Technology. L'anticorpo monoclonale anti β -actina e quello anti HA sono della SIGMA. Il siero contro l'estremità C-terminale di CK2 α umana, che riconosce una regione compresa tra i residui aminoacidici [376-391], è stato prodotto in coniglio per immunizzazione con corrispondente sequenza della proteina (Sarno et al., 1996). L'anticorpo anti fosfo-Akt (Ser129) e quello per la Ser129 non fosforilata sono stati prodotti sempre per immunizzazione in coniglio con un peptide con una sequenza corrispondente alla regione di Akt compresa tra gli aminoacidi [121-140], dove la Ser129 è fosforilata o meno.

Substrati delle protein chinasi

Il peptide R₃AD₂SD₅, substrato di CK2, è prodotto mediante sintesi dal Dr. O. Marin (Padova) (Marin et al., 1994). Il peptide specifico per Akt è prodotto dalla Calbiochem.

Inibitori

TBB è stato sintetizzato come descritto in Szyska et al. (1995); IQA è stato fornito dalla Novartis; LY294002 è prodotto dalla Cell Signaling Technology; il peptide inibitore di PKA è prodotto dalla SIGMA; K25, K27 e K64 sono stati forniti dal Dr. Z. Kazimierczuk (Varsavia, Polonia).

Plasmidi

Il vettore di espressione per HA-myrAkt1 (pCMV6-HA-myrAkt1), una forma di Akt costitutivamente attiva contenente una sequenza consenso di miristilazione, e il vettore codificante Akt priva di tale sequenza (pCMV6-HA-Akt1) sono stati gentilmente forniti dalla Dr. S. Marmiroli (Modena). I corrispettivi mutanti Ser129Ala di Akt sono stati ottenuti con il kit *QuickChange-Site Directed Mutagenesis* (Stratagene), usando come stampo rispettivamente il plasmide pCMV6-HA-myrAkt1 o il plasmide pCMV6-HA-Akt1 e due primers 5'-CCCAGTGACA ACGCAGGGGCTGAAGAGATGG-3 e 5'-CCATCTCTTCATCCCCTGCGTTGTCACTGGG-3, ognuno complementare all'opposto filamento del template. La mutazione è stata poi confermata tramite sequenziamento.

Proteine.

Hsp90 β è stata fornita dal Dr. Csaba Soti (Budapest, Ungheria); PDK-1 è stata fornita da Sir. P. Cohen (Dundee, Scozia); Akt1 attiva (fosforilata in Ser473 e in Thr308) e inattiva (defosforilata) sono state fornite dal Dr. H. McLauchlan e dal Dr. J. Hastie (Dundee, Scozia); Akt Δ PH Ser473Asp è stata fornita dal Dr. B. A. Hemmings (Basilea, Svizzera); CK2 α , CK2 α' , CK2 $\alpha_2\beta_2$, CK2 α Δ C336-391 e CK2 α Δ N2-6 ricombinanti sono state espresse, purificate e messe a disposizione dalla Dr. S. Sarno (Padova).

2. METODI

Coltura cellulare.

Le cellule HEK 293-T (epitelio renale di embrione) e Jurkat (linfociti T leucemici) sono coltivate nel medium appropriato: DMEM (*Dulbecco's modified Eagle's medium*, Sigma) per le HEK 293-T e RPMI 1640 (*Dutch modification*, Sigma) per le Jurkat, entrambi arricchiti con siero fetale bovino (FBS) al 10%, penicillina 100U/ml, streptomycin 100 μ g/ml, L-glutamina 2 mM, a 37°C, in un atmosfera contenente 5% di CO₂.

Trattamento cellulare

Le cellule vengono prelevate dalle fiasche in quantità adeguata, travasate in appositi tubi e centrifugate per 5 minuti a 100 g. Eliminato il surnatante, le cellule vengono risospese, di solito, ad una densità di circa 10⁶ cellule/ml in medium contenente 1% di FBS e distribuite nei pozzetti di un'apposita piastra. Sono trattate quindi secondo il protocollo sperimentale e poste nell'incubatore a 37° C, per tempi variabili. Al termine del trattamento le cellule vengono centrifugate per 5 minuti a 100 g, lavate con PBS (*phosphate buffer solution*, soluzione tampone fosfato) per allontanare tracce di siero e quindi lisate.

Preparazione del lisato proteico totale

Dopo il trattamento e il lavaggio, si elimina il supernatante e si aggiunge al *pellet* di cellule, un tampone di lisi, precedentemente preparato e mantenuto in ghiaccio, così composto: Tris-HCl 20 mM pH 7.5, NaCl 150 mM, EDTA 2mM, EGTA 2 mM, Triton X-100 0.5 % (v/v), DTT 2 mM, un cocktail di inibitori delle proteasi (Roche), NaF 10 mM, acido okadaico 1 μ M e vanadato di sodio 1 mM. Dopo aver risospeso le cellule, si lasciano i campioni in ghiaccio per almeno 20 minuti, quindi

si centrifugano a 16000 g per 15 minuti a 4°C e si preleva il supernatante che corrisponde al lisato totale e può venir conservato a -20°C.

Negli esperimenti di coimmunoprecipitazione di Hsp90 con Akt è stato utilizzato un tampone diversamente composto: Tris-HCl 20 mM pH 7.5, NaCl 137 mM, EDTA 1 mM, MgCl₂ 1.5 mM, Nonidet P40 0.2 % (v/v), DTT 2 mM, un cocktail di inibitori delle proteasi (Roche), NaF 10 mM, acido okadaico 1 µM e vanadato di sodio 1 mM.

Determinazione della concentrazione proteica.

La determinazione quantitativa delle proteine contenuta nei lisati cellulari viene effettuata con il metodo di Bradford (Bradford,1976) che permette di dosare, con buona sensibilità, quantità di proteine comprese tra 1 µg e 5 µg. Mediante l'aggiunta di acqua, ogni campione viene portato ad un volume di 100 µl a cui si aggiungono 900 µl di reagente Bradford, così composto: Coomassie Blue G-250 0.003% (p/v), H₃PO₄ 5%, etanolo 10% (p/v). Si procede alla lettura allo spettrofotometro alla lunghezza d'onda di 595 nm. Si costruisce poi una retta di taratura, basandosi sui dati relativi all'assorbanza di standards preparati con quantità note (solitamente da 1 a 10 µg) di BSA, e si risale quindi ai valori di concentrazione dei campioni in esame, mediante estrapolazione.

SDS/PAGE e Western Blot.

Un'uguale quantità proteica dei lisati, viene separata mediante SDS/PAGE (elettroforesi su gel di poliacrilamide in SDS). Il tampone per il carico su SDS/PAGE, aggiunto ad ogni campione per denaturare le proteine, è così composto: Tris-HCl 0.6 M pH 7.8, SDS 2 % (p/v), glicerolo 20 % (v/v) e 2-mercaptoetanololo 5 mM. In questa tesi sono stati utilizzati gel delle dimensioni di 8 x 10 cm, dello spessore di 0,75 cm e con percentuali di poliacrilamide dal 7,5 all'11 % (p/v), a seconda dei casi, contenenti glicerolo 16 % (v/v), che permette una migliore risoluzione di bande proteiche ravvicinate. I gel si costruiscono in apposite macchinette e sono formati da una parte superiore (*stacking gel*) a pH 6.8, che serve per compattare le proteine del campione ad uno stesso livello, e una parte inferiore (*running gel*) a pH 8.8, in cui avviene la vera e propria separazione delle bande proteiche, in base al peso molecolare. La corsa elettroforetica avviene nell'apposito apparecchio a 25 mA/gel per un tempo variabile, che è solitamente di un'ora circa. Le proteine vengono poi trasferite dal gel su membrana di polivinilidenfluoruro o PVDF (Immobilon-P, Millipore), precedentemente bagnata in metanolo 100 %, passata per un paio di minuti in acqua milliQ e infine immersa nell'opportuno tampone di blotting. Nel mio lavoro ho usato in particolare due tipi di

tampone: uno composto di Tris-HCl 25 mM, glicina 192 mM, metanolo 20 % (v/v) e SDS 0.1 %; un altro (specifico per il trasferimento di proteine con peso molecolare maggiore di 60 kDa) composto di CAPS 10 mM, DTT 3 mM e metanolo 1 % (v/v). Il trasferimento avviene nell'apposito apparecchio a 350 mA e in tempi variabili dai 40 minuti ad 1 ora e 40 minuti, a seconda dello spessore del gel e delle dimensioni della proteina che si vuole trasferire. La membrana viene poi immersa in metanolo 100% per alcuni secondi e lasciata asciugare, per almeno 15 minuti, a temperatura ambiente. Quindi si procede come segue:

- la membrana viene lavata per alcuni minuti con un tampone così composto: Tris-HCl 50 mM pH 7.5 e NaCl 50 mM (TBS), con l'aggiunta di BSA 1 % (p/v); gli anticorpi sono diluiti nello stesso tampone;
- incubazione con l'anticorpo primario per almeno un'ora (a temperatura ambiente) oppure per tutta la notte (a 4°C);
- due lavaggi veloci con TBS;
- incubazione con l'opportuno anticorpo secondario biotinilato (anti-rabbit biotinilato, Amersham; anti-mouse biotinilato, Calbiochem; anti-goat biotinilato, Sigma) per almeno 30 minuti, diluito nel tampone detto sopra;
- due lavaggi veloci con TBS;
- incubazione per 15 minuti con perossidasi coniugata a streptavidina (Amersham), diluita nel solito tampone;
- due lavaggi rapidi con TBS;

Il sistema di rivelazione prevede l'utilizzo di una soluzione contenente luminolo e H_2O_2 che, per azione della perossidasi, dà luogo ad una reazione di chemiluminescenza, in corrispondenza del punto in cui si è formato il complesso antigene-anticorpo; tale reazione è evidenziata ponendo sopra la membrana, per un tempo variabile (da pochi secondi a qualche minuto), una lastra fotografica, che viene impressionata dalla luce. In alternativa si può ottenere l'acquisizione del segnale luminoso mediante lo strumento *Kodak Image Station 440 CF* (Kodak Digital Science).

Trasfezione cellulare.

Le cellule HEK293-T, vengono piastrate in pozzetti del diametro di 60 mm ad una confluenza di circa l'80 % e quindi trasfettate con 1 μ g di cDNA, seguendo il protocollo standard per la trasfezione con il calcio fosfato. Esso prevede i seguenti passaggi:

- preparazione della soluzione A: in una eppendorf sterile aggiungo dapprima il cDNA, poi una soluzione di CaCl_2 2 M ed infine una soluzione tampone, composta di Tris-HCl 1 mM pH 8.0 ed EDTA 0.1 mM;
- preparazione di una seconda eppendorf con una soluzione, detta soluzione B, così composta: NaCl 0.28 M, HEPES 0.05 M, Na_2HPO_4 1.5 mM;
- aggiunta, goccia a goccia, della soluzione A nella soluzione B: la miscela (soluzione trasfettante) così ottenuta viene lasciata ad incubare a temperatura ambiente, fino alla comparsa di una lieve torbidità (circa 20 minuti);
- aggiunta, goccia a goccia, della soluzione trasfettante alle cellule.

La miscela di trasfezione viene rimossa dopo sedici ore e le cellule sono lisate direttamente, o sottoposte ad eventuali trattamenti, dopo ventiquattro ore.

Nel caso dello stimolo con IGF-1, al termine delle 24 ore di trasfezione le cellule vengono lasciate in semplice mezzo di coltura, privo di siero, per altre 24 ore, al termine delle quali si aggiunge IGF-1 alla concentrazione finale di 100 ng/ml.

Fosforilazione di Akt da parte di CK2 α , CK2 α' e dei deleti CK2 α $\Delta\text{C}_{336-391}$ e CK2 α ΔN_{2-6} .

0.15 μg di Akt1 (attiva o inattiva) vengono incubati, a seconda dei casi, con 0,1 μg di CK2 α , 0,06 μg di CK2 α' , 0.024 μg di CK2 α $\Delta\text{C}_{336-391}$ e 0.5 μg di CK2 α ΔN_{2-6} (le quantità di ciascun enzima sono tali da assicurare una uguale attività su un generico substrato controllo, quale la caseina), in presenza di Tris-HCl 50 mM (pH 7.5), MgCl_2 12 mM, $[\gamma\text{-}^{33}\text{P}]\text{ATP}$ 10 μM (circa 1500 cpm/pmol), in un volume complessivo di 20 μl , per 20 minuti a 30°C. Dove indicato, 0,2 μg di β -caseina vengono utilizzati come substrato controllo per l'attività delle diverse forme di CK2. I campioni così preparati sono separati tramite SDS/PAGE e le bande radioattive vengono rivelate e quantificate tramite autoradiografia elettronica, con il sistema *Cyclone storage phosphor system* (Packard).

Immunoprecipitazione.

Una quantità variabile di proteine da lisato cellulare viene incubata per un tempo che va da 2 ore a tutta la notte, in agitazione a 4° C, con un anticorpo specifico, per permettere la formazione dell'immunocomplesso. Questo viene poi fatto precipitare il giorno dopo grazie all'aggiunta di di Proteina A-Sepharose (sospensione 1/1, v/v) (Sigma), lasciando ad agitare a 4°C per circa 40 minuti e centrifugando successivamente per 30 secondi a 16000 g a temperatura ambiente. Si elimina il surnatante e sugli immunoprecipitati si effettuano due lavaggi. Il tampone usato per i lavaggi è

così composto: Tris-HCl 50 mM (pH 8.0), EDTA 5mM, Nonidet P-40 0.05% (v/v), NaCl 150 mM, NaN₃ 0.02 % (p/v), BSA 0.2%. Segue poi un lavaggio con Tris-HCl 50 mM (pH 7.5).

Fosforilazione da parte di PDK1 di Akt immunoprecipitata da lisati.

Per l'immunoprecipitazione vengono usati 100 µg di proteine da lisato di cellule HEK 293T, trasfettate con Akt wt o con Akt Ser129Ala. Si mette ad incubare il lisato tutta la notte in agitazione a 4° C, con un anticorpo specifico per Akt, per permettere la formazione dell'immunocomplesso. Questo viene poi fatto precipitare il giorno dopo grazie all'aggiunta di 30 µl di Proteina A-Sepharose (sospensione 1/1, v/v) (Sigma), come descritto nel paragrafo precedente. Dopo i lavaggi si elimina bene il supernatante e i *pellet* vengono fatti fosforilare o meno da 0.08 µg di PDK1 ricombinante, in presenza di una miscela di fosforilazione contenente Tris-HCl 50 mM (pH 7.5), MgCl₂ 12 mM, [γ -³³P]ATP 10 µM (circa 1500 cpm/pmol), EGTA 0.1 mM, DTT 1 mM, in un volume complessivo di 20 µl, per 20 minuti a 30° C. I campioni vengono analizzati tramite SDS/PAGE e Western blot con gli opportuni anticorpi.

Fosforilazione di Akt da parte di PDK1, in seguito a fosforilazione da parte di CK2.

0.24 µg di Akt Δ PH Ser473Asp vengono dapprima fatti fosforilare o meno da CK2 α (due aggiunte successive a intervalli di 20 minuti di 0.1 µg di CK2 α) in presenza di una miscela non radioattiva, contenente Tris-HCl 50 mM (pH 7.5), MgCl₂ 12 mM, ATP 50 µM, EGTA 0.1 mM, DTT 1 mM, in un volume complessivo di 10 µl, per 40 minuti a 30° C. Successivamente, alle prove vengono aggiunti o meno 0.02 µg di PDK1, in presenza di una miscela di reazione così composta: Tris-HCl 50 mM (pH 7.5), MgCl₂ 12 mM, ATP 10 µM (circa 1500 cpm/pmol), EGTA 0.1 mM, DTT 1 mM, in un volume finale di 20 µl, per 10 minuti a 30° C. I campioni così preparati sono separati tramite SDS/PAGE, trasferiti su membrana tramite Western blot e le bande radioattive vengono rivelate e quantificate tramite autoradiografia elettronica, con il sistema *Cyclone storage phosphor system* (Packard). Successivamente la membrana viene incubata con gli opportuni anticorpi.

Autofosforilazione di lisati.

Un'opportuna quantità di lisato cellulare (di solito si utilizzano 5-10 µg di proteine) viene incubata in presenza di Tris-HCl 50 mM pH 7.5, MgCl₂ 12 mM, [γ -³³P]ATP 10 µM (attività specifica di circa 3000 cpm/pmole), NaCl 0.1 M, in un volume totale di 20 µl. L'incubazione è fatta a 30°C per 20 minuti e il blocco della reazione avviene per aggiunta di 7 µl. di tampone per il carico su SDS/PAGE.

I campioni vengono quindi separati tramite SDS/PAGE e le fosfo-proteine vengono rivelate mediante autoradiografia.

Crosslinking con formaldeide in cellule trasfettate con Akt wt e Ser129Ala.

Cellule HEK 293T vengono trasfettate con HA-Akt wt e Ser129Ala. Alla fine della trasfezione vengono lavate e risospese con PBS. Sono poi sottoposte a trattamento con formaldeide (concentrazione finale 1% p/v) per 30 min a temperatura ambiente, in modo da far avvenire la reazione di *crosslinking* (formazione di ponti metilenici fra residui di lisina delle proteine), per stabilizzare i complessi proteici presenti nella cellula. La reazione viene bloccata per aggiunta di glicina 125 mM, i campioni vengono centrifugati 1 minuto a 16000 g, i *pellet* lavati due volte con PBS freddo e lisati in presenza di Nonidet P40 1% v/v. Akt è stata immunoprecipitata dal lisato, usando un anticorpo contro il *tag* HA. Dopo SDS/PAGE e western blot, la quantità di Akt immunoprecipitata e la presenza di Hsp90 co-immunoprecipitata sono state messe in evidenza per incubazione con i rispettivi anticorpi.

Associazione di Hsp90 ricombinante ad Akt wt e Ser129A immobilizzate su resina.

100 µg di proteine, da lisati di cellule HEK 293-T trasfettate o meno con HA-Akt wt e Ser129Ala, vengono diluiti (diluizione 1/5 v/v) in un tampone (*Equilibration Buffer*) così composto: Tris-HCl 20 mM pH 7.5, NaCl 0.1 M, EDTA 0.1 mM. Contemporaneamente 15 µl di resina *Anti-HA Affinity Matrix* (Roche) vengono equilibrati con lo stesso tampone per 10 minuti in agitazione a 4° C. Successivamente i lisati diluiti vengono aggiunti alla resina-HA e lasciati incubare a 4° C in agitazione per 15 minuti. I *pellet* vengono poi lavati per due volte con e risospesi in *Equilibration Buffer*. Infine ai campioni viene aggiunta o meno Hsp90 ricombinante e si lascia ad incubare tutta la notte a 4° C in agitazione. Il *pellet* viene infine sottoposto a lavaggi con, e analizzato mediante SDS/PAGE, western blot e rivelazione con gli anticorpi opportuni.

Far Western.

0.45 e 0.9 µg di Akt1 vengono sottoposti a SDS/PAGE e successivamente trasferiti su membrana di nitrocellulosa, mediante Western blot. La membrana viene quindi saturata con una soluzione di BSA al 3 % (v/v) e successivamente messa ad incubare (3 incubazioni di 10 minuti ciascuna) con un tampone rinaturante, così composto: TRIS 20 mM pH 7.5, KCl 300 mM, Tween20 0.1 % (v/v). Akt immobilizzata sulla membrana viene così rinaturata. Segue un'incubazione di 2 ore a 4° C con 45 µg

di CK2 α , diluita nello stesso campione. Come controllo negativo, una membrana identica viene incubata con solo tampone rinaturante, per lo stesso tempo. Le membrane vengono infine sottoposte ad altri 3 lavaggi di 10 minuti ciascuno con tampone rinaturante e infine messe ad incubare con un anticorpo anti CK2 α e rivelate come descritto in precedenza, per verificare se la proteina si sia legata o meno ad Akt immobilizzata su membrana.

Saggio di vitalità cellulare MTT.

Per effettuare i saggi di vitalità cellulare si utilizza il composto 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5 difeniltetrazolo bromuro (MTT) (Sigma), un sale tetrazolico che una volta metabolizzato dalle deidrogenasi mitocondriali produce un precipitato viola in cellule vive. Si utilizza una soluzione di MTT, 5 mg/ml in TBS sterile (Tris-HCl 50 mM pH 7.5, NaCl 150 mM). Si aggiunge la soluzione di MTT in ciascun campione di cellule, posto in una piastra da 96 pozzetti, in quantità pari a 1/10 del volume del campione stesso. Si lascia incubare per 1 ora a 37°C e si aggiunge quindi una soluzione di lisi (1/5 sul volume del campione) composta da SDS 20% (p/v), dimetilformamide 50% (v/v), acido acetico 2% (v/v) e HCl 25 mM e avente pH 4.7. In questo modo si ottiene la lisi delle cellule e la solubilizzazione del precipitato viola formato per metabolizzazione dell'MTT nelle cellule vive. I campioni mostrano pertanto una colorazione violacea, tanto più intensa quanto maggiore è il numero delle cellule vive. Si procede con la lettura della densità ottica dei campioni a 590 nm, contro un bianco costituito da solo medium, trattato allo stesso modo dei campioni.

**CAPITOLO 3: *CK2 modula indirettamente
lo stato di fosforilazione
della Thr308 di Akt.***

INTRODUZIONE

Correlazioni fra le proteinchinasi CK2 ed Akt.

Già si è visto in precedenza (Capitolo 1, § 3.3.5) come CK2 intervenga a diversi livelli nelle vie di segnale che regolano lo stato di attivazione di Akt. Ad esempio, è noto già da tempo che CK2 fosforila la fosfatasi PTEN (Miller et al., 2002; Torres et al., 2003), un importante soppressore tumorale, che antagonizza la funzione della PI3K (Chang et al., 1997), bloccando le vie di trasduzione da essa stimulate ed in particolare la via di Akt. In seguito alla fosforilazione da parte di CK2, PTEN viene inibita e viene favorita di conseguenza l'attivazione di Akt.

Inoltre, nel nostro gruppo di lavoro, è stata messa in evidenza, per la prima volta, una connessione diretta fra le due proteinchinasi CK2 ed Akt (Di Maira et al., 2005): infatti è stato dimostrato che, sia *in vitro* sia *in vivo*, CK2 fosforila Akt sul residuo di Ser129, che si trova nella regione di collegamento tra il dominio PH e il dominio catalitico della chinasi. La fosforilazione della Ser129 ha un effetto regolatorio sull'attività di Akt: infatti si è osservato che, qualora essa non sia attuabile, per inibizione dell'attività catalitica di CK2 (tramite l'uso di inibitori selettivi o "silenziando" l'espressione della subunità catalitica α con il metodo del *siRNA*) o per mutazione del sito bersaglio di CK2 in Akt (Ser129Ala), si osserva un concomitante calo dell'attività di Akt.

Un risultato inatteso ottenuto durante questo studio è che Akt è anche meno fosforilata a livello della Thr308. Nonostante la riduzione di fosfo-Thr308 non sia di un livello tale da giustificare di per

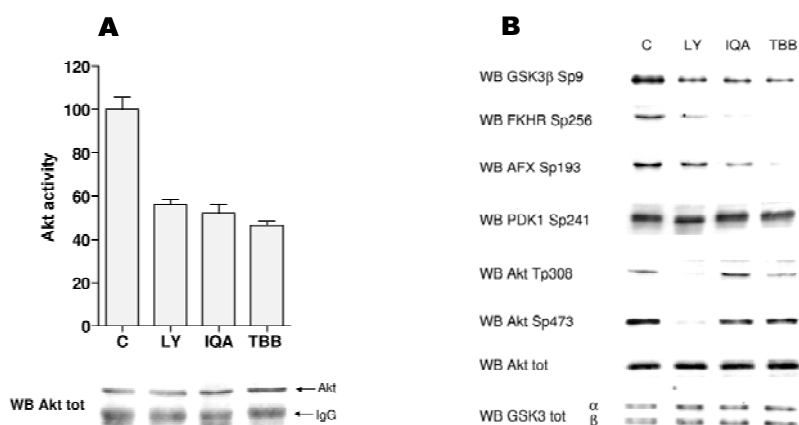


Figura 1: **A.** In seguito a trattamento di cellule Jurkat con inibitori di CK2 (IQA e TBB), si ha un evidente calo dell'attività di Akt endogena, immunoprecipitata e saggiata verso peptide controllo. **B.** Analisi tramite western blot di lisati di cellule Jurkat trattate con inibitori di CK2: si riconferma il calo di attività di Akt (calo di fosforilazione di alcuni substrati noti di Akt). Inoltre si osserva un calo nella fosforilazione della Thr308. LY è un inibitore della PI3K: blocca a monte la via che porta all'attivazione di Akt e viene perciò utilizzato come controllo negativo. (Immagine tratta da Di Maira et al., 2005.)

sé la ridotta attività di Akt (a questo proposito si confrontino in Figura 1 l'effetto di LY e di TBB sull'attività e sulla fosforilazione della Thr308), considerando l'importante ruolo attivatorio della fosforilazione della Thr308 su Akt, possiamo desumere che questo è uno dei meccanismi mediante il quale CK2 controlla la via di Akt. E' stato anche riportato (Guerra, 2006) che CK2 ed Akt associano fisicamente, sia *in vivo* che *in vitro*, e che l'interazione avviene interessando sia la subunità α sia la subunità β , ma non l'enzima nella sua oloforma tetrameric $\alpha_2\beta_2$. Ciò comporterebbe, quindi, la possibilità di formare complessi CK2/Akt solamente in quelle situazioni in cui CK2 è presente in forme alternative al canonico tetramero. Tutto ciò è però ancora da chiarire. Del resto molti sono gli aspetti da definire riguardo alla correlazione funzionale tra CK2 ed Akt. Ad esempio non è ancora noto a quale livello della cascata di attivazione di Akt CK2 intervenga, e cioè se prima o dopo l'attivazione canonica operata dalla fosforilazione dei residui Thr308 e Ser473. In questa tesi, mi sono dedicata in particolare alla comprensione del meccanismo con cui CK2 controlla lo stato di fosforilazione della Thr308, che non è suo bersaglio diretto.

OBIETTIVI DELLA RICERCA

Come descritto nel capitolo relativo (Capitolo 1, § 4.2), lo stato di fosforilazione della Thr308 di Akt viene regolato dall'azione di una chinasi e di una fosfatasi entrambe note: PDK1 e PP2A rispettivamente (Alessi et al., 1996; Andjelkovic et al., 1996). CK2 non è in grado di fosforilare direttamente questo sito. Era perciò interessante chiarire in che maniera lo stato di fosforilazione del sito di CK2, Ser129, influisca su quello di un sito bersaglio di altri enzimi. Questo evento potrebbe essere mediato dal già citato complesso di *chaperonine* Hsp90/Cdc37, la cui funzione biologica è - fra l'altro - strettamente dipendente dalla fosforilazione da parte di CK2 (Miyata e Nishida, 2004) e che è già noto per preservare lo stato di fosforilazione della Thr308 (Sato et al., 2000; Basso et al., 2000). Ma potrebbe coinvolgere anche altri fattori, più o meno noti. Su questo spunto è nato il lavoro presentato in questa tesi, con il preciso scopo di analizzare il meccanismo mediante il quale CK2 regola la fosforilazione della Thr308 di Akt. In particolare si è vagliata la veridicità di due possibili ipotesi, e cioè che la mancata fosforilazione della Ser129 da parte di CK2 induca: a) un più difficile riconoscimento della Thr308 da parte di PDK1; b) un più facile attacco della Thr308 da parte della fosfatasi PP2A.

Lo studio è stato svolto sia mediante un approccio *in vitro* che *in vivo*, utilizzando i plasmidi codificanti Akt nelle forme *wild type* (wt) e mutata in Ser129 (Ser129Ala), per poi seguire lo stato

di fosforilazione di Akt, mediante l'uso di anticorpi fosfospecifici, e la formazione di complessi sopramolecolari, in particolare con la *chaperonina* Hsp90.

Una parte del lavoro ha infine avuto come scopo un'analisi più dettagliata del meccanismo con cui avviene la fosforilazione di Akt da parte di CK2 *in vitro*, con un'attenzione particolare alle possibili differenze tra le due isoforme della subunità catalitica di CK2, α ed α' .

RISULTATI

1. Stato di fosforilazione della Thr308 di Akt in relazione all'attività di CK2.

Come già descritto nell'introduzione di questo capitolo, il trattamento di cellule con inibitori di CK2 induce una riduzione del grado di fosforilazione di Akt a livello della Thr308, che non è bersaglio diretto di CK2. Ciò poteva essere spiegato con un'azione degli inibitori sulle vie di controllo dello stato di fosforilazione di questo sito. Un'azione aspecifica dei diversi inibitori di CK2 è altamente improbabile (data la loro estrema selettività (Sarno et al., 2005)), ma era altresì possibile che CK2, una volta inibita, agisse in maniera alterata su vari elementi, noti per regolare la fosfo-Thr308, quali chinasi (PDK-1), fosfatasi (PP2A), o *chaperonine* (Hsp90 e Cdc37) (Alessi et al., 1996; Andjelkovic et al., 1996; Sato et al., 2000). Ad esempio, è noto che l'inibizione di CK2 altera la funzionalità di Hsp90/Cdc37, come è stato riportato (Miyata e Yahara, 1992; Miyata e Nishida, 2004), e poiché tale sistema controlla lo stato di fosforilazione della Thr308 (Sato et al., 2000; Basso et al., 2002), ciò poteva spiegare il dato ottenuto con gli inibitori di CK2. In realtà, come mostrato in Figura 2, la riduzione di fosfo-Thr308 di Akt si osserva, in maniera paragonabile all'inibizione chimica di CK2 (Figura 2 A), anche con la mutazione della Ser129 di Akt (Figura 2 B), sito bersaglio di CK2 (Di Maira et al., 2005).

In entrambi i casi (inibizione di CK2 o mutazione del suo sito bersaglio in Akt) lo stato di fosforilazione della Ser473 di Akt è invece pressoché inalterato.

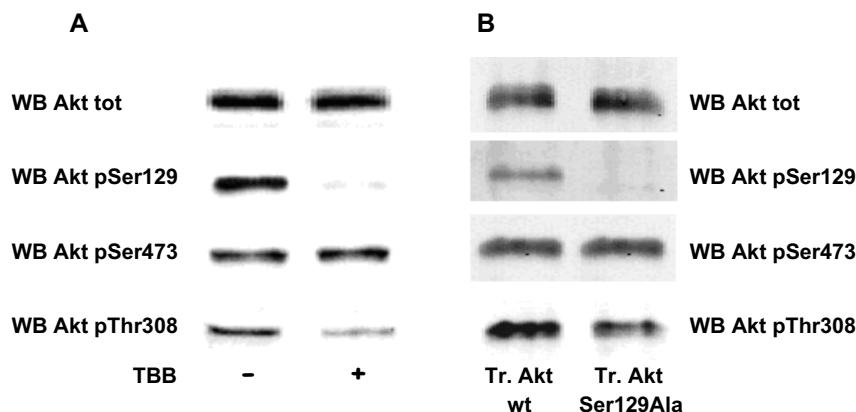


Figura 2: Stato di fosforilazione di Akt in cellule trattate con inibitori di CK2 o in cellule trasfettate con Akt wt o con il mutante Akt Ser129Ala. A. Cellule Jurkat, trattate (+) o meno (-) con inibitori di CK2 (TBB, 25 μ M), sono state lisate e 10 μ g (nel caso di Akt tot e di pSer473) o 20 μ g (nel caso di pSer129 e di pThr308) di proteine da lisato sono state analizzate tramite Western blot, con gli anticorpi indicati. B. La stessa analisi anticorpale è stata effettuata su lisati di cellule HEK 293T, trasfettate con Akt wt o con il mutante Akt Ser129Ala.

Il risultato ottenuto con il mutante della Ser129 fa pensare che CK2 controlli la fosfo-Thr308 di Akt non solo agendo sui sistemi regolatori a monte, ma anche direttamente, mediante la fosforilazione della Ser129, la quale sarebbe in grado di indurre una conformazione di Akt a cui corrisponde un maggior livello di fosforilazione della Thr308.

Gli esperimenti descritti di seguito hanno cercato di chiarire se ciò sia dovuto ad una maggiore accessibilità della Thr308-chinasi (PDK1), o ad una minore efficacia della fosfo-Thr308-fosfatasi (PP2A).

2. Fosforilazione di Akt da PDK1, dopo fosforilazione da parte di CK2.

Il primo approccio per comprendere se la fosforilazione di CK2 sulla Ser129 di Akt agevola il riconoscimento della Thr308 da parte della PDK1, è consistito nell'effettuare esperimenti di fosforilazione *in vitro*, utilizzando proteine ricombinanti. La Figura 3 A presenta l'autoradiografia dell'esperimento, in cui si vede il quadro radioattivo delle fosforilazioni avvenute. Innanzitutto Akt è stata previamente fosforilata da CK2 α in presenza di ATP non radioattivo (corse 2, 3, 4).

(Per valutare il grado di fosforilazione raggiunto in queste condizioni, un'analogia reazione è stata condotta con [γ - 33 P]ATP (corsa 6); si è valutato che la stechiometria di fosforilazione raggiunta è del 13 % circa.) Successivamente Akt è stata sottoposta alla fosforilazione da parte di PDK1, in

presenza di $[\gamma\text{-}^{33}\text{P}]\text{ATP}$ nella miscela di reazione, per confrontare il risultato ottenuto con Akt previamente fosforilata da CK2 (corse 2 e 3) o meno (corsa 1).

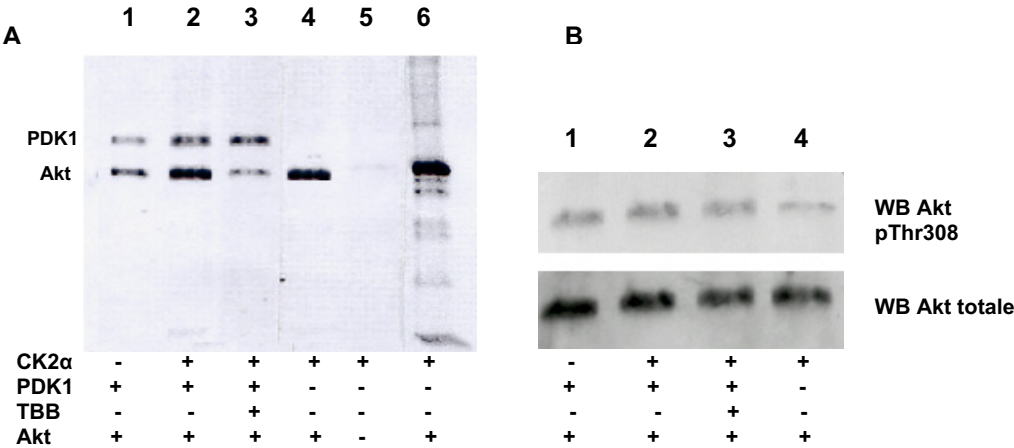


Figura 3: Fosforilazione di Akt da parte di PDK1, in seguito a fosforilazione da parte di CK2. **A.** Akt ΔPH Ser473Asp (240 ng) è stata previamente fosforilata (corse 2, 3, 4) o meno (corsa 1) da CK2α (due aggiunte successive di 200 ng) in presenza di ATP freddo a 30°C per 40 minuti. Successivamente Akt è stata sottoposta alla fosforilazione da parte di 20 ng di PDK1 (corsa 1, 2, 3), in presenza di $[\gamma\text{-}^{33}\text{P}]\text{ATP}$ nella miscela di reazione, per 10 a 30°C. TBB, dove presente è alla concentrazione di 10 μM . I campioni sono stati successivamente risolti tramite SDS/PAGE e poi sottoposti a western blot. La radioattività incorporata viene mostrata come autoradiografia. **B.** Analisi tramite western blot delle prime quattro corse del medesimo esperimento, mediante gli anticorpi contro Akt tot e Akt pThr308, come indicato.

Come si può notare (si confrontino le corse 2 ed 1), in presenza di CK2α e di PDK1 vi è un notevole aumento della fosforilazione di Akt, rispetto al controllo in cui CK2α è assente. Questo aumento però viene a mancare se, contemporaneamente a PDK1, si aggiunge TBB (corsa 3): poiché questo composto inibisce CK2, ma non PDK1 (Sarno et al., 2001), la maggior fosforilazione è imputabile all'attività residua di CK2α, nel momento in cui si aggiunge alla miscela di reazione $[\gamma\text{-}^{33}\text{P}]\text{ATP}$, e non ad un aumento dell'attività di PDK1. Infatti, in assenza di PDK1, CK2α mostra una elevata capacità residua di fosforilare Akt (corsa 4, evento che non si è riusciti ad impedire nonostante prolungate preincubazioni di Akt con CK2α). Poiché quindi l'interpretazione del quadro radioattivo è complicata dalla difficoltà di distinguere il contributo fosforilativo delle due diverse chinasi in gioco, si è ricorsi all'analisi in Western blot degli stessi campioni, utilizzando l'anticorpo fosfospecifico per la forma fosforilata della Thr308 di Akt. Come si vede in figura 3 B, la fosforilazione della Thr308 da PDK1 *in vitro* non subisce significative variazioni, quando Akt è stata preventivamente fosforilata da CK2, rispetto a quando tale fosforilazione non ha avuto luogo (si confrontino le corse 1 e 2 della figura 3 B). Quindi PDK1 sembra non discriminare fra Akt previamente fosforilata o meno da CK2 sulla Ser129. Poiché il dato mostrato in Figura 3 è stato

ottenuto con una forma di Akt deleta del dominio PH (l'unica di cui si disponesse in quantità sufficienti), si è voluto escludere che il risultato ottenuto fosse da associare ad una conformazione non opportuna di Akt. Si è quindi proceduto con un diverso approccio, immunoprecipitando Akt da lisati di cellule HEK 293T, trasfettate con i vettori codificanti Akt wt e un mutante non fosforilabile da CK2 (Ser129Ala). L'immunoprecipitato è stato poi sottoposto a fosforilazione *in vitro* con PDK1 ricombinante e lo stato di fosforilazione della Thr308 di Akt è stato analizzato tramite Western blot, mediante l'opportuno anticorpo.

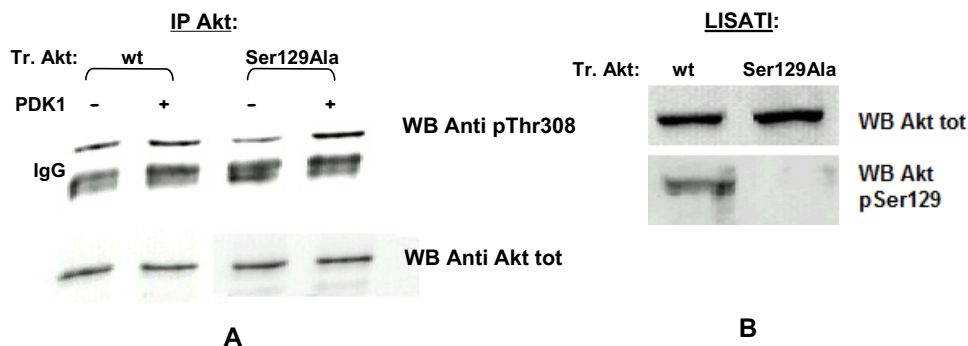


Figura 4: Fosforilazione da parte di PDK1 di Akt, immunoprecipitata da lisati sovraesprimenti le sue varianti *wild type* (wt) e Ser129Ala (non fosforilabile da CK2). **A.** Cellule HEK 293T sono state trasfettate per 24 ore con i plasmidi codificanti Akt nelle varianti wt e Ser129Ala. Successivamente le cellule sono state sottoposte a lisi totale. Akt, immunoprecipitata dai lisati con un anticorpo specifico è stata poi sottoposta a fosforilazione per 20 minuti a 30° C, in presenza (+) o meno (-) di 80 ng di PDK1 ricombinante. Le proteine sono state quindi separate tramite SDS/PAGE, trasferite tramite western blot ed analizzate con gli anticorpi indicati (a sinistra). **B.** 10 µg di proteine dello stesso lisato sono state sottoposte a Western blot ed analisi anticorpale, come controllo della quantità di Akt e del suo livello di fosforilazione sulla Ser129 ad opera di CK2.

Come si può vedere in Figura 4, a parità di Akt immunoprecipitata, il livello di fosforilazione della Thr308 ad opera di PDK1 non mostra differenze nei due casi, in cui Akt è fosforilabile (wt) o meno (Ser129Ala) da CK2. Poiché si considera che in cellule HEK 293T, dove CK2 è altamente espressa, la forma wt di Akt, ma non il mutante, sia stata fosforilata in Ser129 (come dimostrato dall'analisi con l'opportuno anticorpo fosfospecifico, Figura 4 B), PDK1 riconosce e fosforila ugualmente bene la Thr308 anche quando Akt non è fosforilata da CK2 sulla Ser129.

3. Effetto della mutazione della Ser129 sulla risposta di Akt pThr308 all'aggiunta di fattori di crescita.

Un ulteriore approccio è stato quello di utilizzare cellule, trasfettate con Akt wt o con il mutante Ser129Ala, e di privarle di fattori di crescita, noti per stimolare l'attività di Akt (e quindi il suo stato di fosforilazione); si è aggiunto poi un nuovo stimolo, per seguire come varia lo stato di fosforilazione della Thr308 nelle due forme di Akt, corrispondenti a condizioni in cui CK2 può agire o meno sulla Ser129. I risultati sono mostrati in Figura 5. Si è osservato che, in seguito a privazione di siero le cellule che sovraesprimono Akt wt hanno una quantità di fosfo-Thr308 modesta, ma nettamente maggiore rispetto a quella che si trova nelle cellule in cui Akt è mutata.

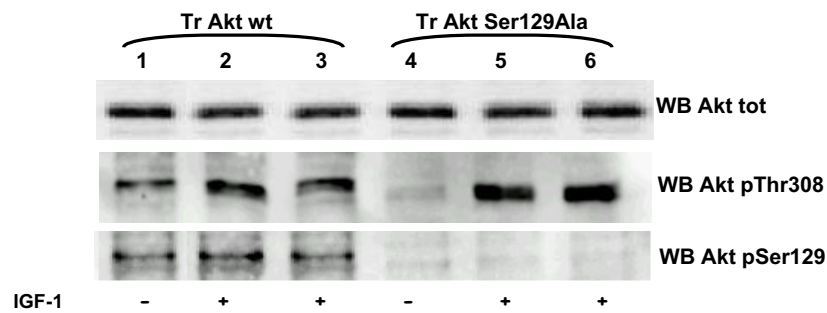


Figura 5: Trattamento con IGF-1 di cellule sovraesprimenti Akt wt e Ser129Ala, in seguito a privazione di siero. Cellule HEK 293T, trasfettate con Akt wt e Ser129Ala per 24 ore, sono state private di siero per 12 ore e successivamente stimulate con 100 ng/ml di IGF-1, dove indicato (+). I tempi dello stimolo sono 10 minuti (corse 2 e 5) o 30 minuti (corse 3 e 6). 10 µg di proteine di lisato sono stati analizzati in Western blot con gli anticorpi indicati.

Se le cellule vengono poi sottoposte ad uno stimolo proliferativo, come IGF-1, la Thr308 viene rifosforilata in maniera marcata, che raggiunge rapidamente un grado molto simile nelle cellule trasfettate con Akt wt e con Akt S129A. Tutto ciò consolida l'ipotesi che l'azione di PDK1 sulla Thr308 non risenta della presenza o meno della pSer129, ma che invece Akt sia maggiormente protetta dalla defosforilazione, quando è fosforilata da CK2.

4. Effetti del trattamento con acido okadaico su Akt, in cellule trasfettate con Akt wt e Ser129Ala.

Quanto detto finora porta a pensare che la fosforilazione di Akt da parte di CK2 sia importante più nel controllo del processo defosforilativo che non in quello fosforilativo della Thr308. Perciò abbiamo trattato le cellule con acido okadaico (OA), inibitore della fosfatasi PP2A (Bialojan e Takai, 1988): in tal modo la fosfatasi non può agire e gli effetti sullo stato di fosforilazione della Thr308 dipendono solo dall'azione della chinasi PDK1. Come si può osservare in Figura 6, in seguito al

trattamento con acido okadaico (corse 2 e 4), i livelli di Thr308 fosforilata sono paragonabili nelle cellule in cui Akt è wt e in quelle in cui è mutata in Ser129. Ciò indica che la differenza osservata invece nelle cellule controllo (corse 1 e 3) è possibile solamente quando la fosfatasi PP2A è libera di agire sulla Thr308, dove induce defosforilazione con minore efficacia se Akt è fosforilabile da CK2.

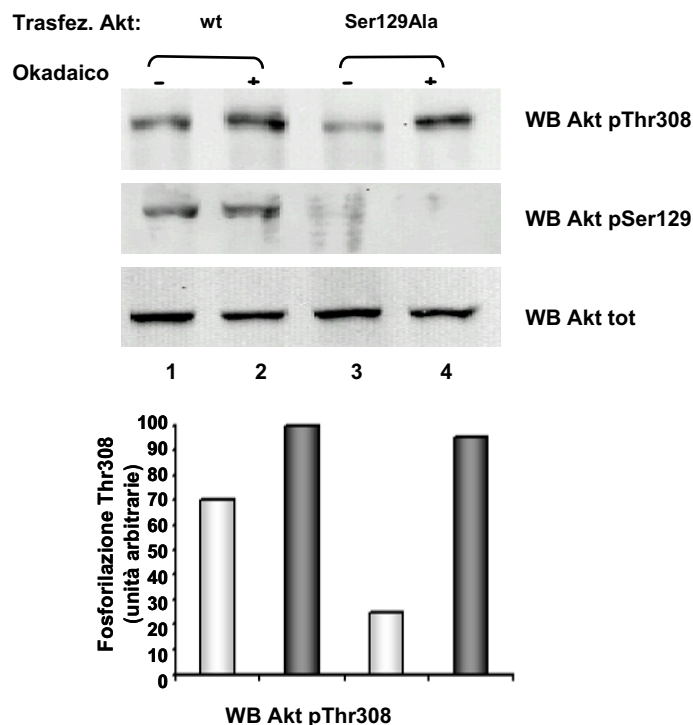


Figura 6: Trattamento con acido okadaico di cellule HEK 293T, sovraesprimenti Akt wt e Ser129Ala. Cellule HEK 293T sono state trasfettate per 24 ore con i plasmidi codificanti Akt wt e Ser129Ala, tramite il metodo del calcio fosfato. 1 ora prima della lisi, dove indicato (+), è stato aggiunto alle cellule acido okadaico (inibitore della PP2A), alla concentrazione finale di 0.5 μ M. 10 μ g di proteine di lisato sono stati risolti tramite SDS/PAGE; infine sono stati sottoposti a western blot e ad analisi anticorpale, con gli anticorpi indicati. Il grafico a barre, nella parte bassa della figura, mostra la quantificazione della risposta anticorpale della pThr308, ottenuta tramite lo strumento *Kodak Image Station 440 CF* (Kodak Digital Science).

5. Co-immunoprecipitazione di Hsp90 con Akt wt e con Akt mutante Ser129Ala.

A questo punto era necessario capire con quale meccanismo la fosforilazione di CK2 sulla Ser129 di Akt svolge un ruolo protettivo, nei confronti della defosforilazione della Thr308, da parte della fosfatasi PP2A. Abbiamo concentrato la nostra attenzione sulla funzione del complesso della già citata *chaperonina* Hsp90, perché è noto il suo effetto protettivo nei confronti della Thr308

fosforilata (Sato et al., 2000). Inizialmente Akt è stata immunoprecipitata da lisati di cellule Jurkat, trattate o meno con un inibitore di CK2 (K25). Si è quindi analizzata, tramite Western blot, la quantità di Hsp90 presente come co-immunoprecipitato, associato ad Akt. Come appare in Figura 7, nonostante la quantità di Hsp90 nel lisato totale non presenti marcate differenze nel controllo

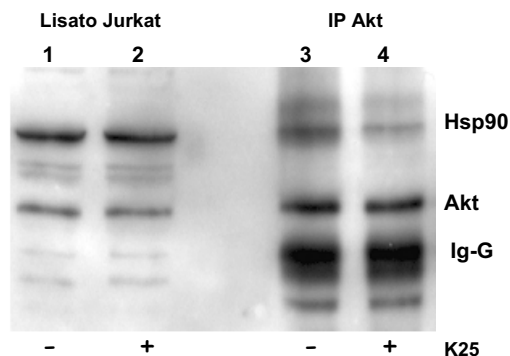


Figura 7: L'inibizione chimica di CK2 riduce l'associazione fra Akt e Hsp90. Le cellule sono state trattate per 4 ore con K25 alla concentrazione di 5 μ M, o con il solo solvente (-). Akt è stata immunoprecipitata dai lisati cellulari e i precipitati (IP Akt, corse 3 e 4) sono stati analizzati tramite western blot con anticorpi contro Hsp90 e contro Akt totale. Nelle corse 1 e 2 si vede il controllo, per valutare la quantità proteica di Hsp90 e di Akt nei lisati non sottoposti ad immunoprecipitazione. A questo scopo sono stati caricati direttamente, nelle posizioni 1 e 2, 20 μ g di proteine dal lisato.

rispetto al trattato (corse 1 e 2), nell'immunoprecipitato la differenza è evidente: a parità di Akt immunoprecipitata infatti, Hsp90 co-immunoprecipita è sensibilmente meno quando CK2 è inibita. Già si è detto in precedenza che CK2 fosforila un numero altissimo di substrati cellulari e che fra questi c'è anche Hsp90, la cui funzione è strettamente dipendente da tale fosforilazione (Miyata e Nishida, 2005).

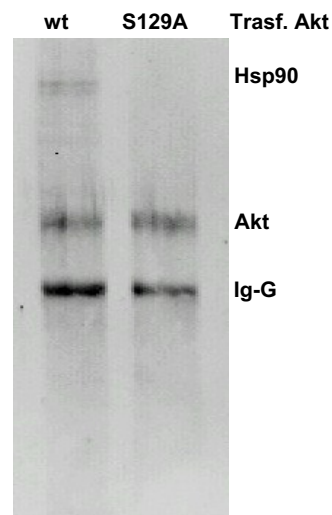


Figura 8: Hsp90 associa meglio ad Akt, quando questa è fosforilabile da CK2 in Ser129. Cellule HEK 293T sono state trasfettate o meno (NT=non trasfettate) con HA-Akt wt e Ser129Ala per 24 ore, con il metodo del calcio fosfato. Dopo la lisi, Akt è stata immunoprecipitata tramite un anticorpo contro il tag HA. Si è poi andati a valutare in western blot la presenza di Hsp90 co-immunoprecipitata, utilizzando un anticorpo anti Hsp90. Come controllo, per verificare che la quantità di Akt immunoprecipitata fosse confrontabile, si è fatta anche un'analisi anticorpale dell'immunoprecipitato con anticorpo anti Akt totale. Nella parte destra della figura si vede l'analisi anticorpale della quantità di Hsp90 presente nei lisati di partenza.

L'uso di inibitori di CK2 può avere quindi la controindicazione di andare ad interferire, con uno spettro d'azione troppo vasto, su molti dei processi regolati da CK2. Quindi, per essere certi che l'effetto osservato sulla co-immunoprecipitazione di Hsp90 fosse davvero legato alla minor fosforilazione della Ser129 di Akt e non ad altri fenomeni collaterali, si è ripetuta l'immunoprecipitazione di Akt da lisati di cellule HEK 293T, trasfettate con Akt wt e mutata (Ser129Ala). Per immunoprecipitare è stato usato un anticorpo anti HA, poiché Akt sovraespressa in seguito alla trasfezione presenta un *tag* HA; in questo modo si è evitato di considerare l'Akt endogena, priva della mutazione voluta. Si è andati poi a valutare la presenza di Hsp90 co-immunoprecipitata: come si vede in Figura 8, la banda corrispondente ad Hsp90 è più intensa nel precipitato di Akt wt, rispetto ad Akt Ser129Ala. Quindi essa associa meglio ad Akt, quando questa è fosforilata da CK2.

Un risultato analogo si è ottenuto usando il metodo del *crosslinking* con formaldeide in cellule, trasfettate allo stesso modo e poi sottoposte a lisi e successiva immunoprecipitazione di Akt. Il *crosslinking* è un metodo utilizzato per creare nelle cellule dei ponti metilenici fra residui di lisina di proteine che si trovino associate; il metodo permette quindi, da una parte di stabilizzare complessi multiproteici, facilitandone così l'individuazione, dall'altra di indicare che l'associazione tra le proteine analizzate avviene *in vivo*, e non è un artefatto indotto dalla lisi cellulare. Nel nostro caso, come si vede in Figura 9, Hsp90 è rilevabile solo in associazione ad Akt wt, fosforilabile da CK2, e non nel caso di Akt mutata Ser129Ala.

Figura 9: Crosslinking con formaldeide in cellule trasfettate con Akt wt e Ser129Ala. Cellule HEK 293T trasfettate con Akt wt e Ser129Ala, sono poi state trattate con formaldeide (1% v/v) per 30 min a temperatura ambiente. La reazione è stata bloccata, per aggiunta di glicina 125 mM, e le cellule sono state lisate e Akt è stata immunoprecipitata da 80 µg di proteine. Dopo SDS/PAGE e western blot, la quantità di Akt immunoprecipitata e la presenza di Hsp90 co-immunoprecipitata sono state messe in evidenza per incubazione con i rispettivi anticorpi.



Infine si è provato anche un ulteriore approccio: Akt, proveniente da lisati di cellule trasfettate con la forma wt o Ser129Ala, è stata immobilizzata su una resina supporto, coniugata ad anticorpo anti HA, sfruttando il *tag* HA presente su entrambe le forme di Akt sovraespressa. E' stata quindi messa ad incubare con Hsp90 ricombinante in quantità crescenti. Dopo gli opportuni lavaggi, Akt è stata staccata dalla resina, usando il tampone denaturante per il carico su SDS/PAGE, e si è effettuata un'analisi anticorpale per Hsp90: anche con questo metodo essa è stata trovata associata alla sola Akt wt (Figura 10).

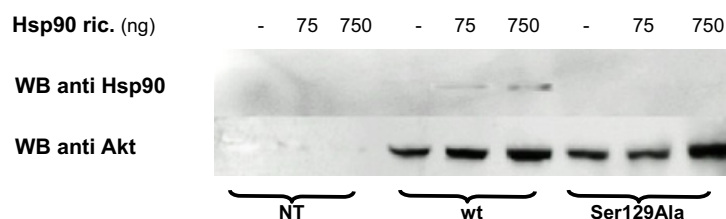


Figura 10: Associazione di Hsp90 ricombinante ad Akt wt e Ser129A immobilizzate su resina. Cellule HEK 293T sono state trasfettate o meno (NT=non trasfettate) con HA-Akt wt e Ser129Ala. Dopo la lisi, Akt è stata immobilizzata su resina supporto, coniugata ad un anticorpo contro il *tag* HA. E' seguita un'incubazione con Hsp90 ricombinante in quantità crescenti (0, 75, 750 ng) per 15 ore. La resina è stata poi lavata con Tris-HCl 20 mM pH 7.5, NaCl 0.1 M, EDTA 0.1 mM, Tween20 0.05 % (v/v) e poi con Tris-HCl 50 mM (pH 8.0), EDTA 5mM, Nonidet P-40 0.05% (v/v), NaCl 150 mM, NaN3 0.02% (p/v), BSA 0.2% (p/v). Infine Akt è stata staccata con tampone denaturante per carico su SDS/PAGE. La presenza delle proteine Akt ed Hsp90 è stata evidenziata mediante Western blot.

6. Fosforilazione *in vitro* di Akt da parte di CK2: un confronto fra le subunità catalitiche α e α' .

Come si è detto nell'introduzione, molti sono ancora i punti da chiarire sulla complessa connessione tra CK2 ed Akt. In particolare non è noto se la fosforilazione da parte di CK2 sulla Ser129 richieda la previa introduzione di fosfato a livello di Thr308 e Ser473 ad opera delle rispettive chinasi. Per approfondire questo aspetto si è utilizzato un approccio *in vitro*, fornendo - come substrato di CK2 - Akt nella sua forma attiva (Ser473 e Thr308 fosforilate), o inattiva, non fosforilata nei due classici siti attivatori. Come si vede in Figura 11, nonostante CK2 fosforili entrambe le forme di Akt, l'introduzione di fosfato ad opera di CK2 è nettamente maggiore (corsa 1) nel caso di Akt nella forma attiva (previamente fosforilata in Thr308 e Ser473), rispetto ad Akt inattiva (corse 2 e 4). Tale differenza non è più apprezzabile, però, qualora si utilizzi l'isoforma catalitica α' , la cui attività è piuttosto bassa e confrontabile su entrambe le forme di Akt (corse 3 e

4) (pur a parità di attività sul substrato controllo caseina, corse 5 e 6). Risultati molto simili si osservano anche in presenza della subunità regolatoria β , in aggiunta ad α e α' , inoltre, il comportamento della forma di Akt inattiva è riprodotto da Akt denaturata termicamente (dati non mostrati).

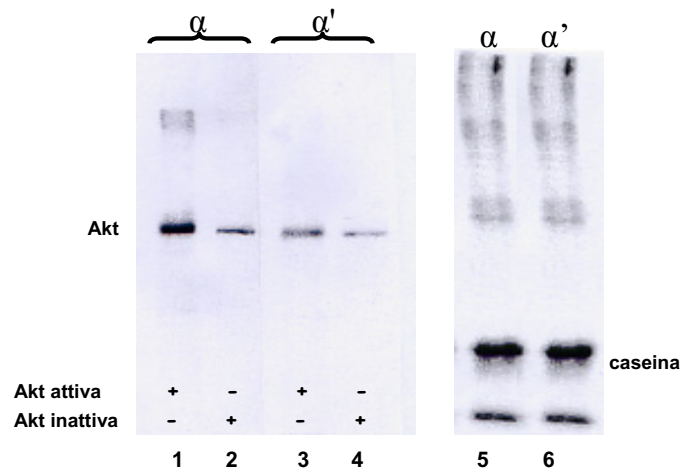


Figura 11: Fosforilazione di Akt attiva ed inattiva da parte di CK2 α ed α' . In tutte le prove Akt è stata incubata per 20 minuti in presenza di una miscela contenente ATP radioattivo, con le differenti forme di CK2, come indicato: 0.1 μ g di CK α e 0.06 μ g di CK2 α' , ugualmente attive rispetto ad un substrato controllo di caseina. Le proteine sono state separate tramite SDS/PAGE e le fosfoproteine rivelate tramite autoradiografia. Akt attiva è una forma di Akt previamente fosforilata in Ser473 e Thr308. Akt inattiva è invece un'Akt in condizioni basali.

Ciò fa pensare che, fra Akt e CK2, ma solo nel caso dell'isoforma α , ci siano anche elementi di riconoscimento enzima/substrato non strettamente connessi alla specificità di sito e che potrebbero interessare aspetti della struttura superiore di Akt, evidentemente diversa nel caso dell'enzima attivo o inattivo. Il fatto che il quadro di Western blot anti pSer129 (non mostrato) sia molto simile a quello radioattivo suggerisce che il maggior sito fosforilato da CK2 è comunque lo stesso (Ser129) in entrambe le forme di Akt, attiva ed inattiva. Sembra essere diversa, quindi, l'efficacia fosforilativa, e non la specificità di sito. Abbiamo pensato a questo punto di analizzare l'associazione fisica fra CK2 α ed Akt. In Figura 12 si vedono in particolare due tipi di approccio: esperimenti di "far western" e di co-immunoprecipitazione delle due proteinchinasi. Nel caso del "far western", Akt ricombinante attiva è stata sottoposta a SDS/PAGE e western blot. La membrana è stata quindi trattata con un tampone rinaturante e poi messa ad incubare (OL, *overlay*) con CK2 α . E' stata infine eseguita l'analisi anticorpale con un anticorpo contro quest'ultima, per vedere se in corrispondenza del peso molecolare di Akt comparisse un segnale, ad indicare che CK2 α interagisce con la proteina rinaturata, immobilizzata sulla membrana; il

risultato è stato positivo, come si vede nella parte destra della Figura 12 A. Per quanto riguarda la co-immunoprecipitazione di CK2 α con Akt, in figura 12 B si può notare che, dove Akt viene immunoprecipitata c'è anche una banda evidente, che risponde ad un anticorpo anti CK2 α ed indica l'associazione fra i due enzimi. Una debole banda corrispondente ad Akt è anche appena visibile nel caso dell'approccio opposto (immunoprecipitazione di CK2 α).

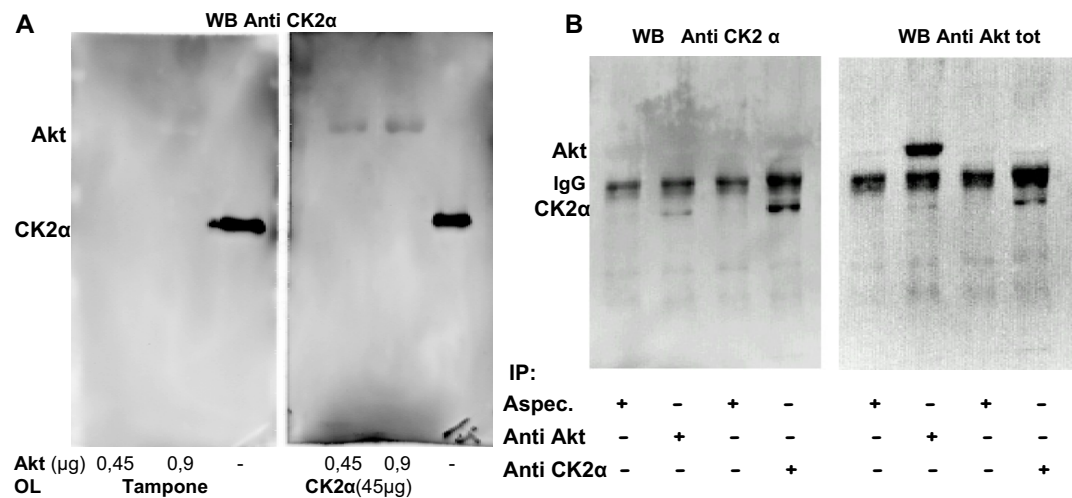


Figura 12: Evidenze di associazione fisica fra CK2 α ed Akt. A. Far western: due diverse quantità di Akt1 ricombinante (0.45 e 0.9 μ g) sono stati sottoposti ad SDS/PAGE e western blot. La membrana è stata quindi messa a rinaturare in un opportuno tampone e successivamente incubata (OL, *overlay*) o con semplice tampone rinaturante o con 45 μ g di CK2 α diluita nel medesimo tampone. Infine è stata eseguita un'analisi anticorpale, con un anticorpo contro la regione C-terminale di CK2 α . **B.** Co-immunoprecipitazione: 100 μ g di proteine da lisati proteici totali di cellule Jurkat sono stati usati per immunoprecipitare Akt e CK2, con un anticorpo specifico (Anti Akt e Anti CK2 α) o con un anticorpo aspecifico (Aspec.). Gli immunoprecipitati così ottenuti sono stati quindi analizzati tramite western blot (WB) con gli anticorpi indicati in figura.

Non è invece mai stato possibile evidenziare una associazione fra Akt e CK2 α' , e la nostra ipotesi è che tale interazione non sia possibile, anche se purtroppo la minore espressione in cellule di α' rispetto ad α , e la diversa efficacia degli anticorpi a nostra disposizione contro α e contro α' non ci permettono di trarre delle conclusioni inequivocabili.

Poiché il dato mostrato in Figura 11, indica che CK2 α' fosforila Akt peggio di quanto non faccia CK2 α , abbiamo preso in considerazione le differenze tra α ed α' (il confronto fra le loro sequenze è mostrato qui a sinistra), per ipotizzare quale possa essere la regione di α coinvolta nel riconoscimento, in maniera differenziale rispetto ad α' . Un primo indizio viene da esperimenti di

fosforilazione *in vitro* di Akt con CK2 α wt e con le sue varianti delete della regione C-terminale (Δ C336-391) o di quella N-terminale (Δ N2-6). Benché la parte C-terminale sia la regione che presenta

CK2 α	1	MSGPVP-SRARVYTDVNTHRPREYWDYESHVVEWGNQDDYQLVRKLGKGYSEVF EAINI	59
CK2 α'	1	MGPAAAGSRARVYAEVNSLSREYWDYEAHVPSWGNQDDYQLVRKLGKGYSEVF EAINI	60
CK2 α	60	TNNEKVVVKILKPVKKKKIKREIKILENLRGGPNITLADIVKDPVSRTPALVFEHVNNT	119
CK2 α'	61	TNNERVVVKILKPVKKKKIKREV KILENLRGGTNI IKLIDTVKDPVSKTPALVFEYINNT	120
CK2 α	120	DFKQLYQTLTDYDIRFYMYEILKALDYCHSMGIMHRDVKPHNVMIDHEHRKRLRIDWG LA	179
CK2 α'	121	DFKQLYQILTDYDIRFYMYELLKALDYCHSKGIMHRDVKPHNVMIDHQQKRLRIDWG LA	180
CK2 α	180	EFYHPGQEYNVRVASRYFKGPELLVDYQMYDYSLDMWSLGCMLASMIFRKEPFFHGH DNY	239
CK2 α'	181	EFYHPAQEYNVRVASRYFKGPELLVDYQMYDYSLDMWSLGCMLASMIFRKEPFFHGH DNY	240
CK2 α	240	DQLVRIAKVLGTELDYIDYIDKYNIELDPRFNDILGRHSRKRWERFVHSENQHLVSPEALD	299
CK2 α'	241	DQLVRIAKVLGTELYGYLKKYHIDLDPHFNDILGQHSRKRWFNFHSENRLHVSPEALD	300
CK2 α	300	FLDKLLRYDHQSRLTAREAMEHPYFYTVVKDQARMGSSSMPGGSTPVSSANMSGISSVP	359
CK2 α'	301	LLDKLLRYDHQRLTAKEAMEHPYFYPVVKESQESQPCAEENTVLSSGLTAAR-----	354
CK2 α	360	PLGPLAGSPVIAAANPLGMPVPAAGAAQQ	391
CK2 α'	354	-----	354

Figura 13: Confronto fra le sequenze di CK2 α e CK2 α' umane. Nell'interlinea fra le due sequenze sono rappresentati in rosso i residui aminoacidici identici fra α ed α' ; con il simbolo "+" sono rappresentate le sostituzioni semiconservative (sequenza tratta da: www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/bl2seq/wblast2.cgi).

le massime differenze fra CK2 α ed α' (infatti in α' è più corta di 41 aminoacidi rispetto ad α , come si vede in Figura 13), tuttavia si è visto che il delete CK2 α Δ C336-391 è in grado di fosforilare Akt quanto CK2 α wt (Figura 14). Invece il delete CK2 α Δ N2-6 ha una attività molto più bassa di CK2 α wt nei confronti di Akt, a parità di attività sul substrato controllo caseina.

Nonostante i dati siano ancora preliminari, essi permettono di indicare la regione N-terminale di CK2 α come probabilmente importante per il riconoscimento della struttura superiore di Akt. Questa regione ha delle differenze, modeste ma significative, in CK2 α rispetto ad α' , ed è quindi probabile che sia alla base del diverso comportamento di CK2 α e di CK2 α' nei confronti di Akt nella sua forma attiva.

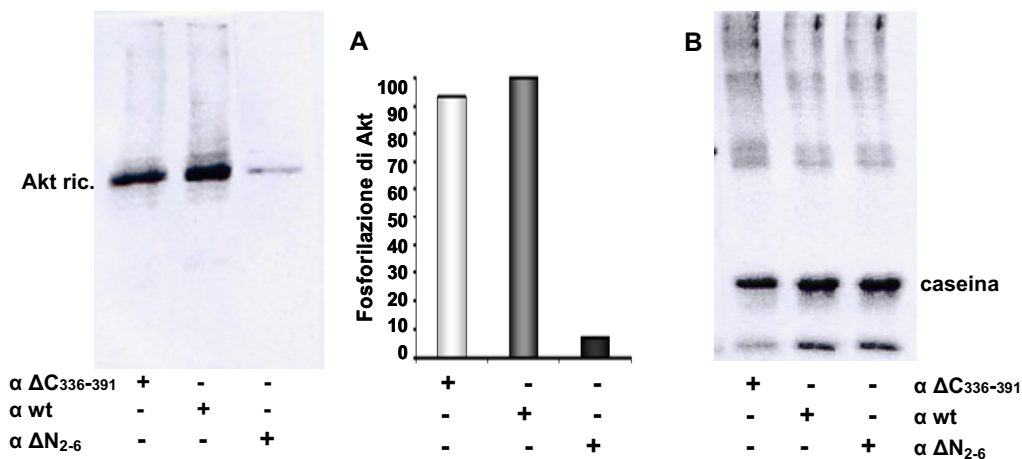


Figura 14: Fosforilazione di Akt da parte di CK2α e dei suoi deleti al C-terminale e all’N-terminale. A. In tutti i casi 0.15 µg di Akt sono stati incubati per 20 minuti in presenza di una miscela contenente ATP radioattivo, con le differenti forme di CK2, come indicato: 0.1 µg di CKα, 0.024 µg di CK2α ΔC₃₃₆₋₃₉₁ e 0.5 µg di CK2α ΔN₂₋₆. Nell’istogramma è rappresentata la quantificazione (percentuale rispetto alla fosforilazione di α wt) della fosforilazione di Akt da parte delle varie forme di CK2α, B. ugualmente attive rispetto ad un substrato controllo di caseina. Le proteine sono state separate tramite SDS/PAGE e le fosfoproteine rivelate tramite autoradiografia.

DISCUSSIONE

In questo capitolo si è voluto analizzare il meccanismo con cui la fosforilazione di CK2 sulla Ser129 di Akt regola lo stato di fosforilazione della Thr308, uno dei due residui chiave per l’attivazione dell’enzima. Poiché questo sito è bersaglio di una chinasi (PDK1) e di una fosfatasi (PP2A) entrambe note, e poiché non possiede il consenso per la fosforilazione da parte di CK2, il ruolo di CK2 nel controllo della sua fosforilazione doveva essere di tipo indiretto. D’altra parte l’effetto osservato, non solo mediante trattamento delle cellule con inibitori di CK2, ma anche in seguito a mutazione del sito di CK2 su Akt, indicava che la fosforilazione su questo sito regola direttamente la conformazione di Akt, aumentando la probabilità di una sua fosforilazione in Thr308. In particolare si potevano formulare due ipotesi riguardo al ruolo della Ser129 di Akt e cioè che essa agevoli il processo fosforilativo della Thr308, oppure che renda la Thr308 meno accessibile alla fosfatasi.

Si sono dapprima effettuati esperimenti *in vitro*, dove Akt ricombinante è stata fatta previamente fosforilare o meno da CK2 ed è poi stata sottoposta all’azione di PDK1. Parallelamente Akt è stata

immunoprecipitata da cellule, trasfettate con Akt wt o con il mutante Ser129Ala (quindi non fosforilabile da CK2), ed è poi stata fatta fosforilare o meno da PDK1. In entrambi i casi PDK1 non è in grado di discriminare fra le due forme di Akt, fosforilata o meno da CK2, e le fosforila in modo confrontabile in Thr308. Inoltre, un importante risultato è venuto dall'uso dell'acido okadaico, inibitore della fosfatasi PP2A, in cellule trasfettate con Akt wt o con il mutante Ser129Ala: in presenza dell'inibitore, la fosfatasi non può più agire e gli effetti sullo stato di fosforilazione della Thr308 dipendono solo dall'azione della chinasi PDK1. In questa situazione i livelli di fosfo-Thr308 sono paragonabili nelle cellule in cui Akt è wt e in quelle in cui è mutata in Ser129, ad indicare che la capacità della PDK1 di riconoscere e fosforilare la Thr308 non viene alterata, nel momento in cui Akt non è più fosforilabile da CK2, in quanto mutata in Ser129. Quindi i risultati degli esperimenti fatti *in vitro*, usando enzimi ricombinanti, sommati alle osservazioni fatte in cellule trasfettate con Akt wt o mutata nel sito di fosforilazione di CK2 (Ser129Ala), hanno portato ad escludere la prima ipotesi, secondo cui la fosforilazione di CK2 sulla Ser129 di Akt potrebbe essere importante per favorire il processo fosforilativo della Thr308.

Allo stesso tempo si è notato come cellule deprivate di siero mostrino una grande differenza nel livello di fosforilazione della Thr308 e, in particolare, cellule trasfettate con il mutante Ser129Ala di Akt sono più sensibili alla defosforilazione in tale sito, rispetto alle cellule controllo, trasfettate con Akt wt.

Tutto ciò ha portato a concludere che la fosforilazione di Akt da parte di CK2 sia importante più nel controllo del processo defosforilativo che non in quello fosforilativo della Thr308; si è voluto, dunque, capire il meccanismo di questo sistema protettivo. Una delle ipotesi formulabili era che esso si espliciti, almeno in parte, attraverso il complesso della *chaperonina* Hsp90. Per questo si è voluta saggiare la stabilità del complesso di Akt con Hsp90 nei due casi, in cui Akt è fosforilabile o meno (Ser129Ala) da CK2. Si sono seguiti diversi approcci, nella maggior parte dei casi esperimenti di immunoprecipitazione di Akt da lisati di cellule trasfettate con Akt wt o mutata (Ser129Ala); si è andata poi a valutare la presenza di Hsp90 co-immunoprecipitata e si è visto che essa associa meglio ad Akt, quando questa è fosforilabile da CK2. Un risultato analogo si è ottenuto usando il metodo del *crosslinking* con formaldeide, in cellule trasfettate allo stesso modo e poi sottoposte a lisi e successiva immunoprecipitazione di Akt dai lisati; si è così confermato che la maggiore stabilità del complesso Hsp90/Akt wt, rispetto ad Akt Ser129Ala, è un evento che avviene *in vivo* e non dovuto alla lisi cellulare. Infine si sono anche immobilizzate Akt wt e il mutante Ser129Ala su

resina, coniugata all'opportuno anticorpo, e si sono messe ad incubare con quantità crescenti di Hsp90 ricombinante: anche in questo caso Hsp90 è individuabile associata alla sola Akt wt.

Da quanto detto si può quindi concludere che la regolazione operata da CK2 sullo stato di fosforilazione della Thr308 va imputata non tanto al controllo dell'attività della chinasi PDK1, quanto piuttosto alla protezione contro l'azione della fosfatasi PP2A. Infatti il complesso con la *chaperonina* Hsp90 risulta meno stabile quando CK2 non può fosforilare Akt sulla Ser129. Ampliando la panoramica ad altri meccanismi cellulari correlati, a questo effetto protettivo, direttamente imputabile alla fosforilazione di CK2 su Akt, si possono sommare altri fattori, come la stretta dipendenza della funzionalità di Hsp90 stessa dall'attività di CK2 (Miyata e Yahara, 2005). E' inoltre noto che Hsp90 è coadiuvata nel suo ruolo di *chaperone* molecolare anche da altri cofattori, fra i quali è molto importante Cdc37, il quale è anch'esso un substrato di CK2: è stato dimostrato che la sua fosforilazione sulla Ser13 da parte di CK2 è fondamentale per la funzione di Cdc37 (Miyata e Nishida, 2004). Sarebbe quindi molteplice il meccanismo mediante il quale CK2 contribuisce ad uno stato iperattivato di Akt: oltre ad avere un effetto diretto sull'attività catalitica di Akt, in seguito alla fosforilazione della Ser129 (Di Maira et al., 2005), essa controlla anche lo stato di fosforilazione di un importante sito regolatorio di Akt, la Thr308; lo fa sia mediante l'effetto della stessa Ser129 sulla conformazione di Akt, sia – molto probabilmente – agendo anche mediante sistemi di protezione quali il complesso Hsp90/Cdc37. C'è da dire che è stato anche riportato (Fujita et al., 2002) che questo complesso controlla la stabilità anche di PDK1, e ciò, quindi, introduce un ulteriore elemento di controllo dovuto a CK2 sulla Thr308.

Infine alcuni nostri risultati indicano che CK2 può interagire fisicamente con Akt, come era già stato suggerito (Guerra, 2006). Da esperimenti di co-immunoprecipitazione e di "far western" si è visto infatti che CK2 α associa stabilmente con Akt, ma ciò sembra richiedere la conformazione che Akt assume solo nella forma fosforilata a livello di Thr308 e Ser473. Infatti, l'azione catalitica di CK2 su Akt sembra essere favorita da questo stato, rispetto a quello defosforilato, ad indicare che elementi di struttura superiore si aggiungono ai determinanti di sequenza presenti attorno alla Ser129. Il dato interessante, però, è che questa differenza di attività su Akt attiva o inattiva si osserva solo con CK2 nella sua isoforma catalitica α , mentre l'altra isoforma, α' , pur in grado di fosforilare la Ser129 di Akt, lo fa in misura minore e paragonabile nelle due condizioni, attiva o inattiva di Akt. Tutto ciò fa pensare che CK2 α' non abbia i determinanti strutturali per associare con Akt attiva; CK2 α , invece, in seguito a questa associazione, sarebbe in grado di fosforilare più efficacemente la Ser129. A conferma di questa ipotesi, c'è da dire che, a differenza che per α , non

siamo mai riusciti ad osservare associazione stabile tra Akt ed α' (anche se tale risultato, proprio perché negativo, richiede ulteriori conferme). Ci sarebbero quindi delle differenze tra α e α' che renderebbero ragione della possibilità o meno di associare, in opportune condizioni, con Akt. Benché le differenze più macroscopiche fra CK2 α ed α' si trovino al C-terminale, i primi dati in nostro possesso suggeriscono che, per il riconoscimento di Akt da parte di CK2, potrebbe essere importante la regione N-terminale della subunità α , che presenta piccole ma significative differenze rispetto alla regione N-terminale di α' . Si è visto infatti che un delecto di CK2 α privo degli aminoacidi [2-6] all'N-terminale fosforila molto meno Akt, di quanto non facciano l'enzima *wild type*; un delecto C-terminale [336-391] si comporta invece come il wt. Akt sembra quindi rappresentare un esempio di come CK2, chinasi pleiotropica e dalle funzioni estremamente complesse, regoli la propria selettività nei confronti di determinati substrati, anche mediante un'espressione differenziale delle sue isoforme catalitiche.

**CAPITOLO 4: *Farmacoresistenza e
proteinchinasi di
sopravvivenza.***

INTRODUZIONE

1. La farmacoresistenza.

Sebbene il termine di farmacoresistenza indichi, in generale, la mancata risposta ad un farmaco, nell'ambito di questa tesi, per farmacoresistenza si intende un adattamento multifattoriale che si sviluppa in alcune cellule tumorali in risposta all'uso massiccio di un determinato farmaco, in seguito al quale le cellule diventano resistenti all'apoptosi indotta normalmente dal trattamento. Il fenomeno della farmacoresistenza è una delle cause principali del fallimento dei trattamenti chemioterapici. Molto spesso essa si manifesta come resistenza crociata a più composti chemioterapici. Infatti, dopo un certo periodo di trattamento, i farmaci utilizzati possono spesso risultare inefficaci, in quanto le cellule tumorali sono in grado di mettere in atto dei meccanismi protettivi, che le rendono insensibili sia ai farmaci specifici utilizzati nel trattamento chemioterapico, sia ad altri farmaci ad essi non correlati per natura chimica e per meccanismo d'azione; da questo aspetto il fenomeno prende anche il nome di MDR (*MultiDrug Resistance*).

La maggior parte dei farmaci chemioterapici ha un effetto antiproliferativo, volto soprattutto a bloccare la sintesi del DNA o altre funzioni del ciclo cellulare. Nella tabella sottostante sono indicati i principali gruppi di farmaci antitumorali, utilizzati in terapia.

COMPOSTI	FARMACI RAPPRESENTATIVI	MECCANISMO D'AZIONE
Agenti alchilanti	Mostarde azotate Derivati dell'etanolamina Altri agenti alchilanti	Alchilazione di un gruppo azotato della guanina.
Antimetaboliti	Derivati dell'acido folico, delle purine e delle pirimidine	Inibizione competitiva di reazioni metaboliche.
Antibiotici citostatici	Antracicline (Doxorubicina)	Inibizione dell'attività catalitica della topoisomerasi II
Alcaloidi	Vincristina, Vinblastina	Inibizione della divisione cellulare durante la metafase (legame con la tubulina)
Derivati podofilinici	Etoposide	Inibizione dell'attività catalitica della topoisomerasi II (fase G2 del ciclo cellulare).
Complessi del Platino	Cis-Diamminodichloroplatino	Platinazione di un gruppo azotato della guanina.

Tabella 1: Classificazione dei farmaci antitumorali.

La farmacoresistenza è un adattamento multifattoriale, che dipende da diversi meccanismi. Uno dei più conosciuti consiste nel ridurre le concentrazioni intracellulari di farmaco, tramite

meccanismi di trasporto attivo, che consentono in tal modo di arginare gli effetti tossici del farmaco stesso. Ciò è reso possibile grazie alla sovraespressione di particolari pompe di membrana, che trasportano il farmaco fuori della cellula, con un meccanismo ATP-dipendente. Le più studiate e caratterizzate fra queste proteine di membrana sono la P-gp (*P-glycoprotein*) (Juliano e Ling, 1996) e le MRP (*Multidrug Resistance-associated Proteins*) (Cole et al., 1992; Borst et al., 2000), appartenenti alla famiglia delle *ABC transporters*, una superfamiglia di proteine di membrana in grado di trasportare una grande varietà di substrati attraverso la membrana plasmatica e le membrane intracellulari. La P-gp presenta due isoforme ed è principalmente localizzata nella membrana plasmatica. E' espressa normalmente nelle cellule epiteliali di apparato gastrointestinale, fegato, rene, ghiandole surrenali e nell'endotelio dei capillari di cervello, ovaio e testicolo. La sua principale funzione fisiologica consiste nel proteggere i tessuti normali dalle tossine esogene ed endogene impedendone l'assorbimento intestinale e favorendone quindi l'eliminazione sistemica (Bradshaw et al., 1998). Inoltre può essere espressa anche nei linfociti, dove la sua funzione è ancora in gran parte sconosciuta (Klimecki et al., 1994). Non si conosce ancora come le P-gp riconoscano il farmaco-substrato, così come non è stato del tutto chiarito il loro esatto meccanismo d'azione.

Per quanto riguarda le MRP, ne esistono sei isoforme e anche in questo caso la loro principale funzione fisiologica consiste nel proteggere le cellule da composti tossici e da stress ossidativi (Twentyman e Bagnij, 1998). Queste proteine sembrano agire sia trasportando attivamente il farmaco al di fuori della cellula, come la P-gp, sia sequestrandolo in vescicole citoplasmatiche.

	FARMACI SUBSTRATO
P-gp	Doxorubicina, Daunorubicina, Epirubicina, Etoposide, Paclitaxel, Docetaxel, Vincristina, Vinblastina, Chinidina, Aldosterone, Rodamina-123, Clorochina
MRP1	Vincristina, Daunorubicina, Etoposide, Doxorubicina
MRP2	Metotressato, Etoposide, Cisplatino, Alcaloidi Della Vinca
MRP3	Etoposide, Tenoposide, Estrogeni Derivati, Metotressato, Alcaloidi della Vinca
MRP4	Analoghi delle Purine, Estrogeni Derivati
MRP5	Tiopurine, Nucleotidi Ciclici

Tabella 2: Alcuni farmaci antitumorali substrati di P-gp e MRP (Sawicka et al., 2004).

A sostegno di questa ipotesi è stato osservato che in alcune cellule le MRP sono localizzate non solo a livello della membrana plasmatica, ma anche a livello dell'apparato di Golgi e di altre strutture intracellulari (Meister, 1983). Benché presentino molte analogie con le P-gp, tuttavia lo

spettro dei farmaci-substrato non è completamente sovrapponibile , come si può osservare dalla Tabella 2.

Va detto che le MRP, a differenza delle P-gp la cui sovraespressione è indotta da alte concentrazioni di farmaco, risultano essere sovraesprese già a basse concentrazioni di chemioterapici (Cole et al., 1992; Burger et al., 1994).

Un altro meccanismo di farmacoresistenza è associato a cambiamenti nell'attività o nell'espressione di specifici enzimi in grado di ridurre l'effetto citotossico del farmaco. A questo proposito diverse linee cellulari MDR mostrano un'aumentata attività dei sistemi di detossificazione; in particolare in molti casi si osserva un'aumentata attività della Glutathione S-transferasi e della Glutathione S-reduttasi, dovuta ad una sovraespressione degli enzimi stessi (Cole et al., 1989; Chao et al., 1991). In altri casi la farmacoresistenza è associata alla ridotta attività o espressione degli enzimi bersaglio dei chemioterapici. Ad esempio in cellule resistenti agli inibitori della topoisomerasi II, come la doxorubicina e l'etoposide, si osserva, almeno nelle fasi iniziali di sviluppo della resistenza, una ridotta attività della stessa topoisomerasi II; ciò può essere dovuto ad una ridotta espressione dell'enzima o a mutazioni dell'enzima stesso (Lang et al., 1998; Snapka et al., 2001). In alcuni casi si osserva una sovraespressione della Topoisomerasi I come meccanismo compensatorio (Tan et al., 1989). Infine, anche cambiamenti nell'espressione o nella localizzazione di proteine coinvolte nell'apoptosi possono contribuire a ridurre la sensibilità nei confronti di farmaci citotossici. Una sovraespressione della proteina antiapoptotica Bcl-2 conferisce resistenza a diversi chemioterapici, tra cui ad esempio la doxorubicina, l'etoposide, il cisplatino e la camptotecina (Reed, 1995). Inoltre è stato dimostrato che linee cellulari prive della proteina p53 mostrano un'aumentata resistenza all'apoptosi indotta da farmaci (Lowe et al., 1993). In generale è probabile che molte proteine cambino il loro grado di espressione nei vari casi di sviluppo della farmacoresistenza, e che il risultato finale sia dovuto all'insieme di tutti questi adattamenti, che la cellula sviluppa per garantirsi la sopravvivenza.

2. Proteinchinasi di sopravvivenza e farmacoresistenza.

E' ovvio immaginare che importanti proteinchinasi di sopravvivenza, quali CK2 ed Akt, siano coinvolte nel fenomeno della farmacoresistenza. Infatti le cellule tumorali divenute resistenti dimostrano un'esasperata vitalità e una mancata risposta apoptotica, in seguito a trattamento. Quindi, visto il loro ruolo antiapoptotico, un'aumentata espressione e attività di CK2 e/o Akt potrebbero in effetti contribuire all'instaurarsi del fenotipo MDR. E' noto, ad esempio, che, fra i

numerosi substrati di CK2, è presente proprio la P-gp, anche se ancora non si conosce il significato di questa fosforilazione sull'attività biologica della proteina (Glavy et al., 1997). È stato inoltre riportato che in cellule tumorali MDR ottenute per selezione con etoposide, un noto inibitore della topoisomerasi II, oltre ad altre proteine implicate nella farmacoresistenza (come la P-gp o le MRP), anche CK2 risulta essere sovraespressa (Matsumoto et., 1999). Infine, in un recente studio a cui ho preso parte, si è dimostrato che CK2 è correlata con la farmacoresistenza in cellule linfoblastoidi di tipo T (CEM): in particolare si è visto che la sola subunità catalitica α di CK2 è sovraespressa nella variante MDR di queste cellule, che sovraesprimono la pompa di membrana P-gp. Inoltre l'abbattimento selettivo dell'attività catalitica di CK2, ottenuta in modo farmacologico o mediante la tecnica dell' RNA-*interference*, porta alla reversione del fenomeno (Di Maira et al., 2007).

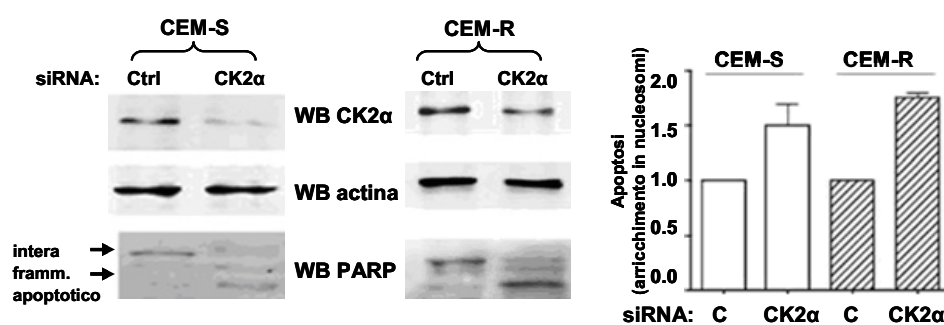


Figura 1: Cellule CEM sensibili (S) e resistenti (R) al trattamento farmacologico muoiono a livelli confrontabili, in seguito al silenziamento della subunità α di CK2, mediante la tecnica dell'RNA-*interference*. La morte è dovuta in buona parte ad apoptosi, come si può osservare nel grafico a barre (parte destra della figura), che rappresenta schematicamente la quantificazione della formazione di nucleosomi nelle cellule sottoposte a RNA-*interference*, rispetto a cellule controllo. L'apoptosi viene confermata anche dall'analisi della frammentazione della PARP ad opera delle caspasi, mostrata tramite Western blot nella parte bassa della figura (da Di Maira et al., 2007).

Lo studio non ha però chiarito se la sovraespressione di CK2 sia un carattere generale della condizione MDR, né se sempre solo la subunità α sia sovraespressa.

Per quanto riguarda Akt, essa si trova più volte citata in letteratura per il suo ruolo antiapoptotico e la sua possibile correlazione con la farmacoresistenza. Infatti, in diversi casi si è visto come la via PI3K/Akt sia iperattivata in cellule farmacoresistenti. Ad esempio, la selezione con doxorubicina di cellule CEM porta allo sviluppo del fenotipo MDR, ottenuto dalle cellule per sovraespressione della P-gp e per attivazione di vie di segnale di sopravvivenza, fra cui la via PI3K/Akt; in seguito al trattamento delle cellule MDR con un anticorpo monoclonale, contro una particolare oncoproteina, si ha un calo dell'espressione della pompa, una riduzione dello stato di

fosforilazione di Akt e un aumento delle vie di segnale apoptotiche, con il risultato di una maggiore vulnerabilità delle cellule (Hu et al., 2007). Un altro esempio viene da una linea cellulare leucemica murina MDR, in cui il grado di resistenza al trattamento con l'antitumorale vincristina viene ridotto in seguito all'uso di LY294,002, inibitore della via di segnale PI3K/Akt (Barancik, 2006).

OBIETTIVI

Si è visto come le proteinchinasi CK2 ed Akt, note entrambe per il loro importante ruolo antiapoptotico, sono state correlate ad alcuni casi di farmacoresistenza. Potenzialmente esse sono in grado di intervenire a diversi livelli nei meccanismi di sopravvivenza, ma la loro precisa funzione nella farmacoresistenza non è ancora stata definita. Sicuramente è stato dimostrato che l'inibizione di CK2 e la deregolazione della via di segnale PI3K/Akt possono portare ad una reversione del fenomeno. In particolare, nel nostro laboratorio, gran parte dello studio è stato svolto su due varianti, sensibili e MDR, di cellule linfoblastoidi di tipo T (CEM). Con il lavoro presentato in questa tesi ho voluto ulteriormente caratterizzare l'espressione e il ruolo di CK2 ed Akt in queste cellule. Inoltre, si è già detto in precedenza (Capitolo 3) della relazione funzionale fra Akt e CK2 e di come la mancata fosforilazione di Akt da parte di CK2 si traduca in una minor attività di Akt e in un minor grado di fosforilazione del suo residuo Thr308. Per questo motivo, particolare interesse è stato rivolto alle possibili correlazioni tra queste due proteinchinasi in cellule MDR, di cui fossero disponibili entrambe le varianti, sensibile e resistente al trattamento farmacologico. Ho voluto estendere lo studio ad altri modelli cellulari, per comprendere quanto generalizzabili fossero le osservazioni ottenute dalle cellule CEM. Infatti, se la sovraespressione delle due proteinchinasi può contribuire in generale a conferire un elevato grado di resistenza, la conoscenza delle loro correlazioni funzionali sta alla base degli espedienti operati per la loro inibizione, quale metodo utile per "sensibilizzare" le cellule e renderle più vulnerabili all'apoptosi chimica.

RISULTATI

1. Espressione di CK2 ed Akt in cellule CEM-S e CEM-R.

Recentemente nel nostro gruppo di lavoro è stato dimostrato che, in una linea di cellule linfoblastoidi di tipo T (CEM), le varianti sensibile (CEM-S) e resistente (CEM-R) al trattamento con farmaci antitumorali esprimono livelli diversi di CK2. In particolare (si veda la Figura 2 A) le CEM-R esprimono una maggior quantità della subunità catalitica CK2 α rispetto alle CEM-S, e questo è stato confermato sia utilizzando sia un anticorpo diretto verso il C-terminale della proteina, sia uno per l'N-terminale, sia con altri anticorpi non mostrati in figura. Le due varianti cellulari presentano invece un livello confrontabile di CK2 β (Figura 2 A; Di Maira et al., 2007). Anche l'attività endogena di CK2 nelle CEM-R è maggiore che nelle CEM-S.

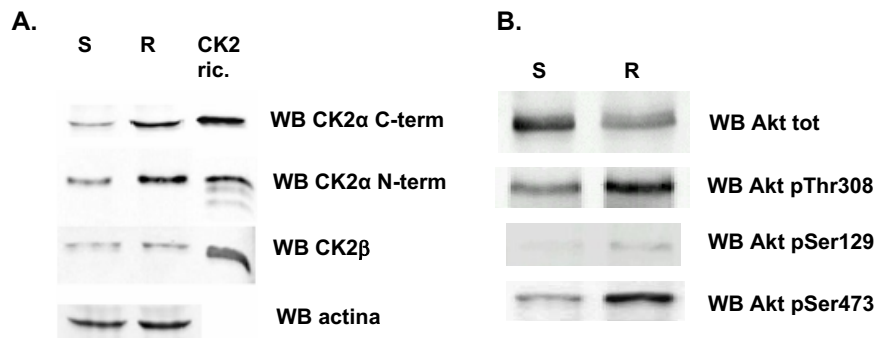


Figura 2: Analisi dell'espressione di Akt e CK2 in lisati di cellule CEM-S e CEM-R. 10 μ g (nel caso di Akt tot, CK2 α e actina) o 20 μ g (nel caso di Akt pThr308, Akt pSer129 e CK2 β) di proteine da lisato cellulare di CEM S e CEM R sono stati analizzati tramite western blot (WB), utilizzando gli anticorpi indicati nella figura. Dove indicato (CK2 ric.), è stato caricato anche l'enzima nella sua forma ricombinante (0,05 μ g di $\alpha_2\beta_2$ ric.), quale controllo positivo e marcatore di migrazione delle subunità α e β .

Per quanto riguarda invece l'espressione di Akt, sorprendentemente, come mostrato in Figura 1 B, essa è maggiore nelle cellule CEM-S che nelle CEM-R. Nonostante ciò, il grado di attivazione di Akt è decisamente maggiore nella condizione MDR: ciò può essere dedotto dal grado di fosforilazione dei residui Ser473 e Thr308, canonici siti di attivazione dell'enzima, ma anche dal sito fosfo-Ser129 che, come descritto nel Capitolo 1 § 4.2, è il sito attivatorio bersaglio di CK2. La maggiore fosforilazione della Ser129 di Akt in CEM-R correla con la maggiore espressione di CK2 α ed è una conferma della maggiore attività endogena di CK2 in CEM-R. Del resto, nonostante non siano da escludere altri eventi regolatori su Akt che ne determinino in CEM-R il maggior livello di fosforilazione sulla Thr308, quest'ultimo può essere almeno in parte ricondotto alla funzione protettiva che CK2 ha nei confronti di Akt, come descritto nel Capitolo 3.

2. L' eccesso di CK2 α protegge le cellule CEM-R dall'apoptosi chimica.

Il trattamento di numerosi tipi di cellule in coltura con inibitori specifici di CK2 causa morte per apoptosi (Ruzzene et al., 2002; Sarno et al., 2005). Si è voluto perciò saggiare l'effetto di questi sulla vitalità di cellule CEM-S ed R, usando il metodo dell'MTT. Come atteso (Figura 3), le CEM-R resistono al trattamento con diversi farmaci antitumorali, in seguito al quale invece le CEM-S muoiono. Tuttavia le CEM-R sono sensibili in maniera paragonabile alle CEM-S al trattamento con inibitori di CK2, che inducono in queste cellule morte per apoptosi (Figura 3).

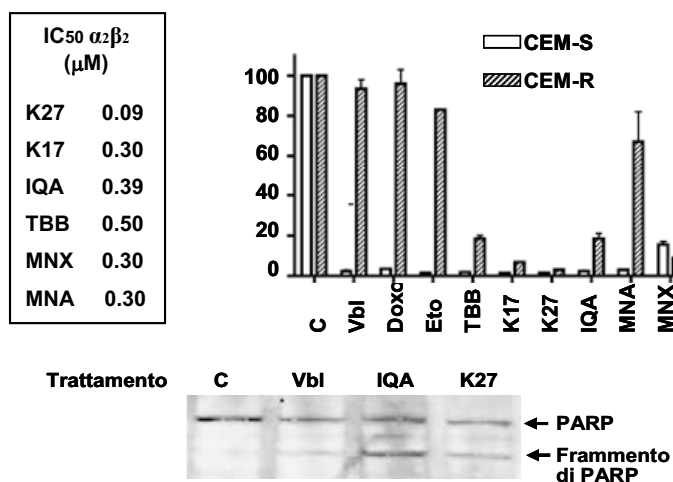


Figura 3: Effetto degli inibitori di CK2 sulla vitalità di cellule CEM-S ed R. Le cellule sono state trattate o meno (Contr) per 40 ore con 0.2 μ g/ml di vinblastina (Vbl), 50 μ M di etoposide (Eto), 25 μ M di doxorubicina (Doxo) o con gli inibitori di CK2 alla concentrazione di 20 μ M (TBB, K17, K27, IQA, MNA, MNX). La vitalità cellulare è stata valutata con il metodo dell'MTT. A sinistra si vedono i valori di IC₅₀ per CK2, determinati *in vitro* (da Sarno et al., 2003; Pagano et al., 2004; Salvi et al., 2006). Nella parte bassa della figura: cellule CEM-R trattate per 24 ore con il solo solvente (C) o con 0.1 μ g/ml di vinblastina (Vbl), 40 μ M di IQA, 20 μ M di K27, sono state lisate e 10 μ g di proteine da lisato sono state analizzate tramite Western blot con un anticorpo anti PARP. Le frecce indicano PARP nella sua forma intera e il suo frammento a più basso peso molecolare, prodotto di taglio delle caspasi e quindi indice di apoptosi.

Quando utilizzati alla concentrazione fissa di 20 μ M, l'effetto degli inibitori sulla vitalità cellulare è proporzionale ai valori di IC₅₀ (concentrazione necessaria per avere il 50% di inibizione), osservabili *in vitro* per CK2. Un'apparente eccezione è rappresentata dall'MNA, che mostra un effetto molto debole sulla vitalità delle CEM-R, pur essendo efficace sulle CEM-S. In realtà questo inibitore è attivo *in vitro* su CK2 in forma tetrameric, mentre inibisce molto meno la subunità catalitica α isolata (riquadro in Figura 4; Salvi et al., 2006) e poiché, come si è detto, le CEM-R esprimono una maggior quantità della sola CK2 α , il risultato sulla vitalità è quindi spiegabile. In

Figura 4 si mostra un confronto diretto fra l'effetto, in termini di vitalità cellulare sulle CEM-R, dell'MNA e di un suo analogo strutturale, l'MNX.

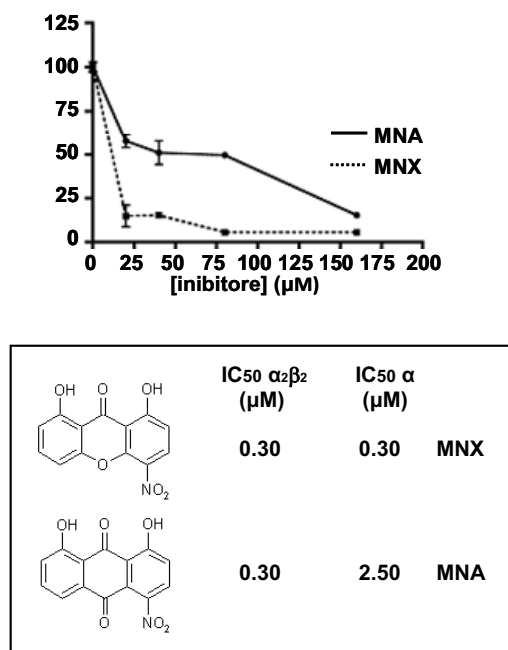


Figura 4: Confronto sull'efficacia di MNA ed MNX in CEM-R. Le cellule sono state trattate per 40 ore con concentrazioni crescenti di MNA o MNX e la loro vitalità è poi stata valutata con il metodo dell'MTT. Nel riquadro sono mostrate le IC₅₀ per CK2 α₂β₂ e α dei due composti (da Salvi et al., 2006).

Come si vede, quest'ultimo ha un'efficacia paragonabile sia su CK2α₂β₂ sia su CK2α (si vedano i valori di IC₅₀ nel riquadro in Figura 3) e dunque, come atteso, induce morte nelle CEM-R a concentrazioni molto inferiori rispetto all'analogo MNA.

Tutto ciò da un lato conferma l'esistenza della subunità CK2α in CEM-R, quale forma non complessa nel canonico oloenzima tetramerico di CK2, dall'altro porta a pensare che l'eccesso di CK2α non associata a β, sia in grado di per sé di proteggere queste cellule dall'apoptosi indotta chimicamente. Per confermare questo concetto, sarebbe stato ovvio analizzare l'effetto della trasfezione della sola CK2α in CEM-S, andando a determinare in che misura ciò comporta un'aumentata resistenza all'apoptosi chimica; purtroppo queste cellule sono molto difficili da trasfettare e gli esperimenti non hanno ancora dato risultati. Tuttavia, risultati incoraggianti si sono ottenuti in altri modelli cellulari, come descritto più avanti.

3. Espressione di CK2 ed Akt in altri modelli cellulari, caratterizzati da farmacoresistenza.

Si è voluta estendere l'analisi dei livelli di espressione di CK2 ed Akt in altri sistemi cellulari, di cui fossero disponibili la variante sensibile e quella resistente al trattamento con agenti chemioterapici, per capire se la sovraespressione di CK2 e l'iperattivazione di vie di segnale di sopravvivenza ad essa correlate (come appunto la via di Akt) possano essere associate in modo univoco alla farmacoresistenza. In Figura 5 A è mostrata l'analisi in Western blot di lisati di cellule di osteosarcoma, U2OS, sensibili (S) e resistenti (R). In questo caso non si notano differenze nel livello di espressione di CK2 fra la variante normale e quella MDR. Tuttavia si è osservato che la sovraespressione di CK2 α nelle U2OS-S le rende più refrattarie all'apoptosi indotta da trattamento farmacologico (Figura 5 B).

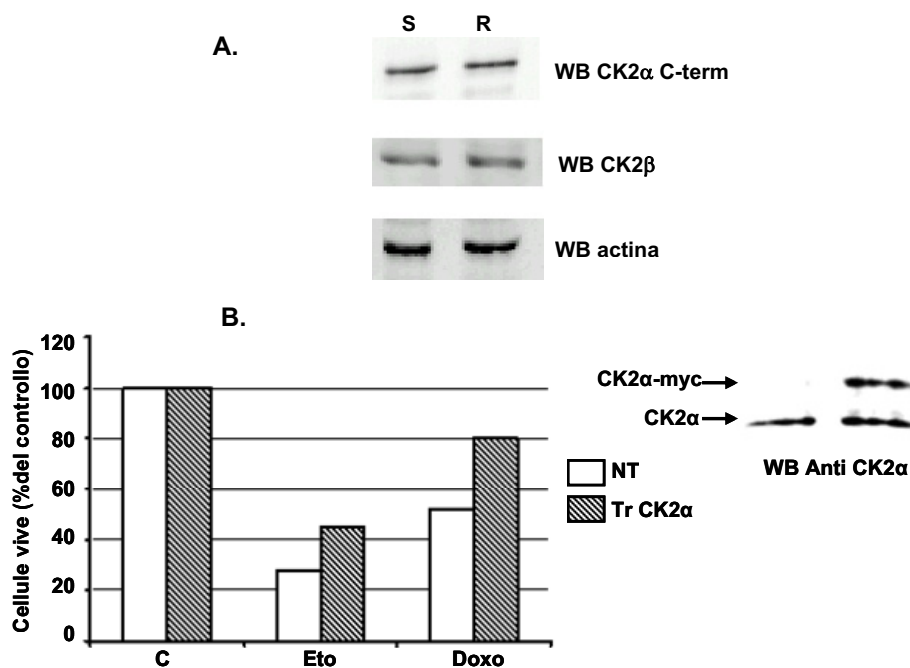


Figura 5: Effetto della trasfezione di CK2 α sulla vitalità di cellule U2OS. Cellule U2OS, non trasfettate (NT) o trasfettate con myc-CK2 α per 24 ore, sono state sottoposte a trattamento per 24 ore con il solo solvente (C), con etoposide 50 μ M (Eto) o con doxorubicina 25 μ M (Doxo). La vitalità è stata poi determinata con il metodo dell'MTT. In alto (A) si vede l'analisi in Western blot dell'espressione di CK2 α in 10 μ g di proteine di lisato U2OS, in seguito alla trasfezione.

Inoltre le cellule U2OS-R risultano sensibili all'apoptosi indotta da inibitori di CK2, addirittura più di quanto non lo siano le U2OS-S (Figura 6), facendo pensare che la loro sopravvivenza sia comunque strettamente correlata all'attività di CK2.

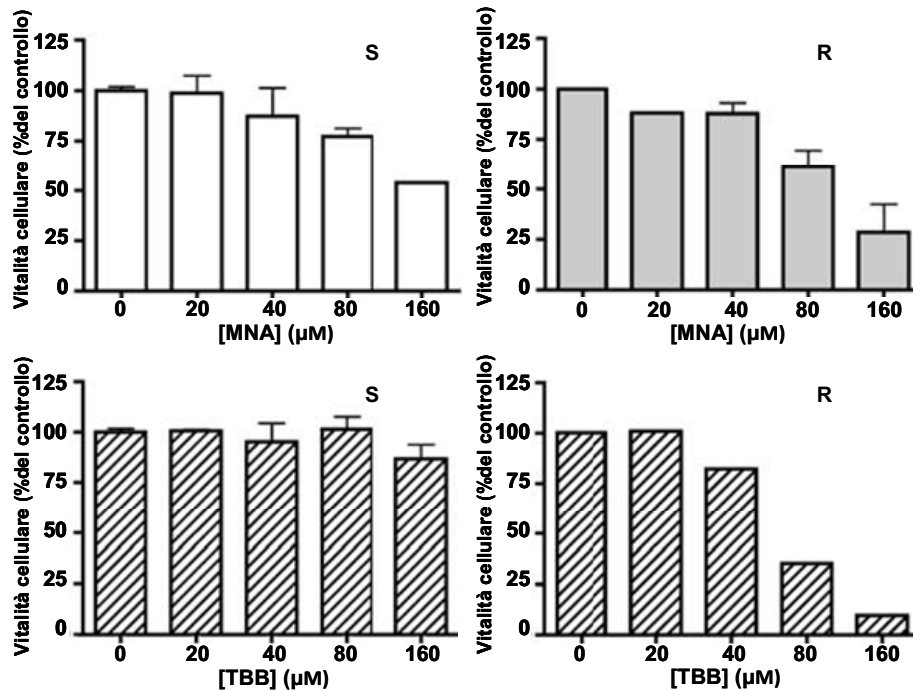


Figura 6: Effetto degli inibitori di CK2 sulla vitalità di cellule U2OS-S e U2OS-R. Cellule U2OS-S e U2OS-R sono state trattate per 40 ore con il solo solvente (0) o con concentrazioni crescenti degli inibitori di CK2 indicati (MNA o TBB). La vitalità cellulare è stata valutata tramite il metodo dell'MTT.

Per quanto riguarda l'espressione e lo stato di fosforilazione di Akt, non si osservano differenze significative fra le U2OS-S e le U2OS-R (Figura 7).



Figura 7: Analisi dei livelli di espressione di CK2 ed Akt in lisati di cellule U2OS-S e R. 10 μg (per CK2α, actina e Akt tot) e 20 μg (per CK2β e Akt pThr308) di proteine da lisato di cellule U2OS-S e R sono stati analizzati tramite Western blot, utilizzando gli anticorpi indicati.

Si sono prese in esame anche delle cellule di carcinoma ovarico (2008-S) e la loro variante farmaco-resistente (2008-R), ottenuta per selezione con cisplatino. In questo caso (Figura 8) la variante resistente esprime una maggior quantità sia di CK2 α sia di β , rispetto alla sensibile.

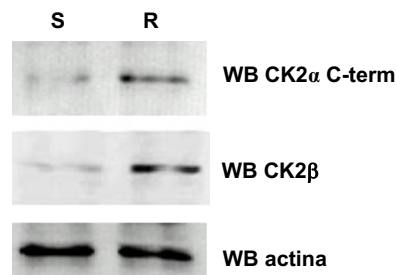


Figura 8: Espressione di CK2 in cellule di carcinoma ovarico, sensibili e resistenti al cisplatino. 10 μ g (per CK2 α e actina) e 20 μ g (per CK2 β) di proteine da lisato di cellule 2008-S e della loro variante farmaco-resistente 2008-R sono stati analizzati tramite western blot con gli anticorpi indicati.

Inoltre le 2008-R, che come atteso resistono al trattamento con cisplatino, in seguito al quale invece le 2008-S muoiono, sono però sensibili quanto le 2008-S al trattamento con inibitori di CK2. In Figura 9 si può vedere la vitalità cellulare a confronto delle 2008-S e delle 2008-R, valutata mediante il saggio dell'MTT. Benché queste osservazioni siano ancora preliminari e non sia nota la funzione di CK2 nelle cellule resistenti al cisplatino, tuttavia la sua inibizione selettiva sembra essere utile per indurre queste cellule a morte. Probabilmente, anche in questo caso, i meccanismi che entrano in gioco sono molteplici, alcuni di essi già noti. Fra questi potrebbe assumere una cer-

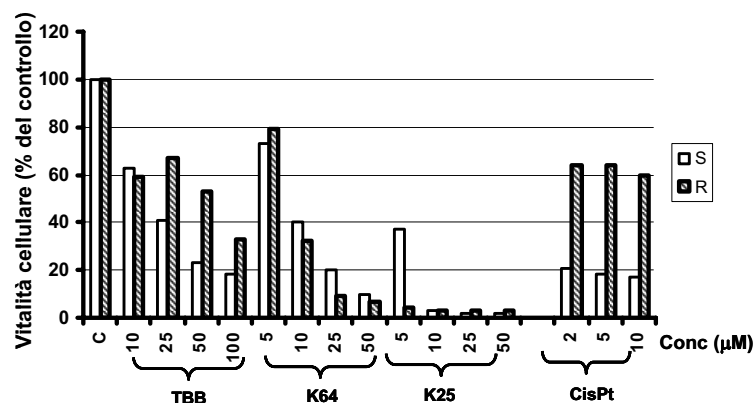


Figura 9: Vitalità di cellule 2008-S e 2008-R in seguito a trattamento con inibitori di CK2. Cellule 2008-S e 2008-R sono state trattate con inibitori di CK2 (TBB, K64 e K25) o con cisplatino, alle concentrazioni indicate per 24 ore. Come controllo positivo è stato usato il solo solvente (C). La vitalità è stata testata con il metodo dell'MTT.

ta importanza anche un'aumentata attività di CK2, magari a carico di particolari substrati, determinanti nell'instaurarsi della farmacoresistenza. A tale proposito, in Figura 10 è presentato il quadro di fosforilazione endogena di proteine derivanti da lisati di cellule 2008-S e 2008-R, in presenza di diversi inibitori di CK2.

Quello che si nota è innanzitutto che i controlli non trattati mostrano un quadro di fosforilazione proteica piuttosto dissimile nei due casi (corse 1 e 6). Inoltre è evidente che molte bande spariscono o vengono notevolmente attenuate, in seguito a trattamento con inibitori di CK2, ad indicare che molte delle fosforilazioni sono CK2-dipendenti.

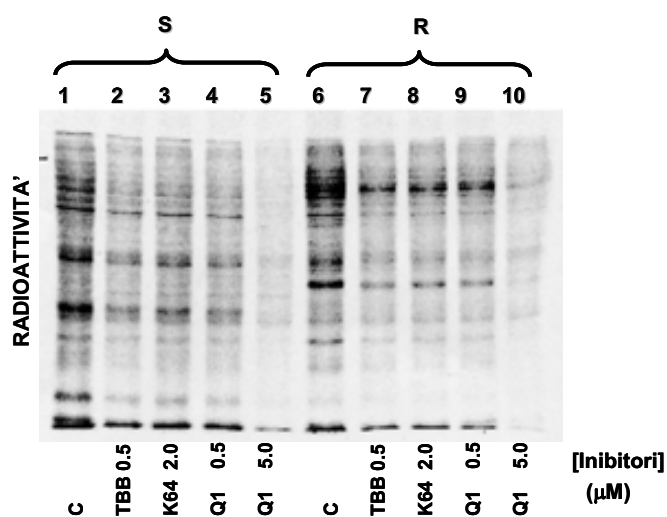


Figura 10: Fosforilazione delle proteine endogene in lisati di cellule 2008-S e 2008-R in presenza di inibitori di CK2. 5 μ g di lisati di cellule 2008-S e 2008-R sono stati incubati con una miscela di fosforilazione contenente $[\gamma\text{-}^{33}\text{P}]\text{ATP}$ per 20 minuti a 30°C. Alla reazione sono stati aggiunti anche gli inibitori di CK2 indicati o il solo solvente, come controllo (C). I campioni sono poi stati caricati su SDS/PAGE e la radioattività è stata rivelata per autoradiografia.

DISCUSSIONE

In questo lavoro si è voluto analizzare il possibile coinvolgimento di proteinchinasi di sopravvivenza, come CK2 ed Akt, in alcuni modelli cellulari, coinvolti dal fenomeno della farmacoresistenza. Si è determinato che in cellule CEM con fenotipo MDR (CEM-R) la sovraespressione della sola subunità catalitica α di CK2 è sufficiente per assicurare a queste cellule un alto grado di resistenza all'apoptosi, a giudicare dallo scarso effetto osservato in seguito al

trattamento con il composto MNA, in grado di inibire con efficacia CK2 tetrameric, ma non CK2 α . In CEM-R si è inoltre osservato uno stato iperattivato di Akt, nonostante la minore espressione proteica di questo enzima rispetto alle cellule sensibili (CEM-S). Si è anche visto che nelle CEM-R la maggiore attività catalitica di CK2 porta ad una maggiore fosforilazione della Ser129 di Akt. Poiché – come descritto nel Capitolo 3 - la fosforilazione di CK2 su Akt influisce positivamente, non solo direttamente sull'attività di Akt, ma anche sullo stato di fosforilazione della Thr308, residuo chiave per l'attivazione dell'enzima, è ipotizzabile che in queste cellule uno dei meccanismi che portano alla resistenza sia giocato proprio dall'interconnessione tra CK2 e la via di segnale di Akt.

In questo lavoro si sono presi in esame anche altri tipi di cellule, nelle varianti sensibili e resistenti, ed in particolare cellule di osteosarcoma (U2OS-S e U2OS-R) e cellule di carcinoma ovarico (2008-S e 2008-R). Mentre le U2OS-S e le U2OS-R non mostrano differenze nei livelli di espressione di CK2, le cellule 2008-S hanno invece livelli più bassi sia di CK2 α sia di CK2 β , rispetto alla loro controparte 2008-R, resistente al trattamento con cisplatino. Inoltre, le cellule C13 mostrano un quadro di fosforilazione di substrati endogeni diverso rispetto a quello delle 2008, a suggerire che nelle due varianti cellulari l'attività di CK2 verso particolari substrati potrebbe differire e rivelarsi significativa nell'instaurarsi della resistenza. Sarà quindi interessante poter identificare i vari substrati, per poter risalire al ruolo che CK2 ricopre in questo sistema cellulare e, più in generale, per ampliare la conoscenza della funzione di CK2 nel fenomeno della farmacoresistenza. La sua sovraespressione può contribuire in generale a conferire un elevato grado di resistenza all'apoptosi, svolge sicuramente un ruolo protettivo in queste cellule e porta alla perpetuazione di segnali di sopravvivenza.

Nel complesso, i dati qui presentati indicano che, fra i numerosi adattamenti che le cellule tumorali sviluppano per resistere al trattamento farmacologico, la sovraespressione di CK2 può essere un meccanismo aggiuntivo, che rende le cellule meno vulnerabili all'apoptosi chimica. Benché non possa essere considerata un requisito essenziale per l'insorgenza del fenotipo MDR (si veda il caso delle cellule U2OS-R), un'aumentata espressione di CK2 – qualora presente – può contribuire a conferire un elevato grado di resistenza alle cellule.

Una dimostrazione si ha dal fatto che, trasfettando CK2 α in cellule U2OS-S, queste assumono una maggior resistenza al trattamento con diversi agenti chemioterapici. A questo proposito, recentemente è stato anche dimostrato che la trasfezione di cellule HEK 293-T (Tapia et al., 2006) e di cellule di carcinoma prostatico (Ahmad et al., 2007) con CK2 α protegge dagli effetti tossici, derivanti dall'uso di farmaci. Qualunque sia il grado di espressione, comunque un importante

risultato viene dall'uso di inibitori di CK2: in tutte le cellule analizzate, l'inibizione selettiva dell'attività catalitica di CK2 induce morte per apoptosi, sia nelle cellule controllo (S) sia in quelle farmacoresistenti.

Concludendo, i risultati ottenuti portano a pensare che CK2 può contribuire alla farmacoresistenza, non solamente attraverso la sua funzione antiapoptotica, ma probabilmente anche in maniera più diretta, fosforilando alcuni substrati strettamente coinvolti nell'insorgenza del fenomeno (si veda, ad esempio, la P-gp). Tra l'altro, è stato dimostrato (Di Maira et al., 2007) che in cellule CEM-R l'inibizione farmacologica di CK2 si accompagna ad una minore funzionalità della pompa P-gp, e quindi ad un maggior accumulo dell'agente chemioterapico all'interno della cellula MDR. Ciò comporta anche che il trattamento con dosi sub-letali di inibitori di CK2 è in grado di indurre effetto sinergico con un farmaco, somministrato contemporaneamente, sensibilizzando cioè le cellule all'effetto pro-apoptotico del chemioterapico, altrimenti inefficace in queste cellule (Di Maira et al., 2007). Pertanto, si può immaginare che, in generale, l'utilizzo di inibitori specifici di CK2, associato magari ad altri composti, che vadano ad inattivare altri elementi implicati nella farmacoresistenza, potrà rivelarsi una strategia efficace nel tentativo di superare questo grave problema clinico.

CAPITOLO 5: *Regolazione di PRPK da parte di Akt.*

INTRODUZIONE

Regolazione di PRPK da parte di Akt.

A differenza del suo omologo di lievito, Bud32, la cui forma ricombinante espressa in batteri mostra una significativa, seppur modesta, attività catalitica (individuabile sia in termini di fosforilazione endogena sia usando substrati esogeni come la caseina e p53) (Stocchetto et al., 1997; Facchin et al., 2002), l'omologo umano, PRPK, è cataliticamente inattivo nelle medesime condizioni, a meno che la proteina ricombinante, fusa con GST e legata a glutatione-Sepharose, non venga preventivamente incubata con lisati cellulari; in particolare in letteratura è riportato il caso di lisati di cellule COS-7 (Abe et al., 2001). Un effetto analogo è stato dimostrato anche molto recentemente, utilizzando per l'incubazione lisati di cellule Jurkat (Facchin et al., 2007; Figura 1) ed andando a saggiare il livello di fosforilazione della Ser15 di p53 e di autofosforilazione di PRPK,

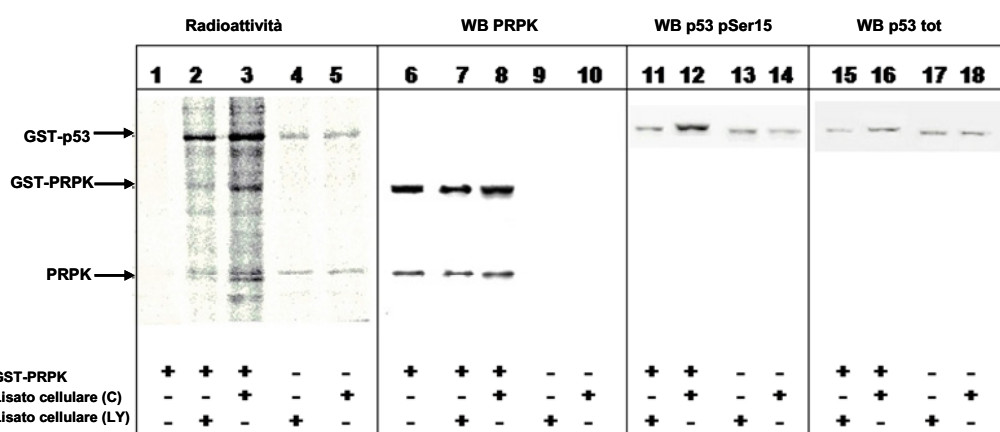


Figura 1: Attivazione di PRPK ricombinante in seguito ad incubazione con lisati di cellule Jurkat. PRPK ricombinante, immobilizzata su resina, è stata incubata con solo tampone (-) o con lisati di cellule Jurkat (+) in presenza di una miscela di fosforilazione contenente [γ - 33 P]ATP. Dove indicato è presente (+) o meno (-) l'inibitore di Akt, LY294002. In seguito i campioni sono stati analizzati tramite SDS/PAGE e Western blot. Viene mostrata l'autoradiografia del quadro di fosforilazioni e l'analisi anticorpale con gli anticorpi indicati. Nell'autoradiografia si osserva che, in seguito ad incubazione con lisato cellulare, vi è una fosforilazione di PRPK, che viene abbattuta dall'uso di LY294002. Questa fosforilazione porta all'attivazione di PRPK, come si nota dall'aumento di fosforilazione della Ser15 di p53.

sia tramite saggi di fosforilazione in presenza di [γ - 33 P]ATP sia tramite analisi anticorpale in western blot. Considerando che nelle cellule Jurkat Akt è costitutivamente attiva (poiché esse sono prive della fosfatasi PTEN) e che nel segmento C-terminale di PRPK vi è - come detto in precedenza - un sito conservato, avente il consenso minimo per la fosforilazione da parte di Akt (Ser250), si è supposto che Akt possa avere una certa importanza nel fosforilare ed attivare PRPK. Questa ipotesi è stata confermata dai risultati di esperimenti di fosforilazione *in vitro* di GST-PRPK, in

presenza o meno di Akt ricombinante, in seguito ad incubazione con $[\gamma\text{-}^{33}\text{P}]\text{ATP}$ (Figura 1). Il medesimo esperimento è stato ripetuto in presenza di ATP non radioattivo, andando a saggiare lo stato di fosforilazione della Ser250 mediante un anticorpo fosfospecifico (Figura 1 B). Si è quindi concluso che Akt fosforila PRPK *in vitro* e la fosforilazione è, come atteso, a carico della Ser250 (Facchin et al. 2007).

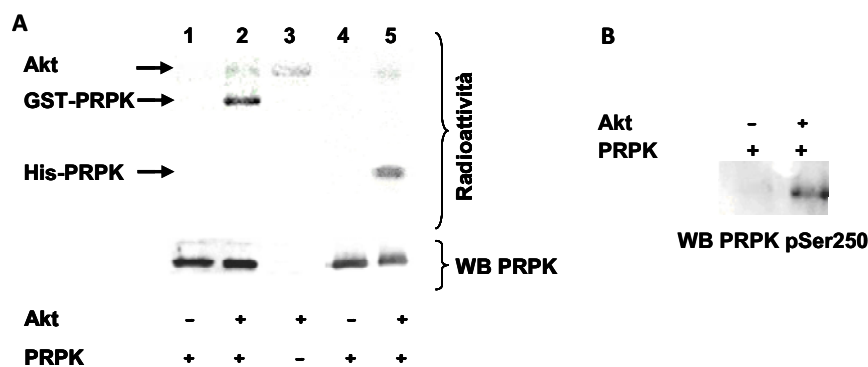


Figura 2: Fosforilazione *in vitro* di PRPK da parte di Akt. A. PRPK viene fosforilata da Akt, come si può vedere nell'esperimento di fosforilazione in presenza di $[\gamma\text{-}^{33}\text{P}]\text{ATP}$. B. La fosforilazione di PRPK da parte di Akt avviene a carico della Ser250, come si può osservare mediante analisi anticorpale su Western blot (Da: Facchin et al., 2007).

Per quanto riguarda l'attivazione di PRPK, la fosforilazione da parte di Akt è sicuramente importante. Tuttavia la bassa stechiometria di fosforilazione (intorno al 3-5 %) che si ottiene *in vitro* non è sufficiente ad indurre un aumento di attività di PRPK. Poiché invece, in seguito ad incubazione con lisati cellulari, l'aumento di fosforilazione di Ser15 di p53 dovuto a PRPK attivata da Akt sembra essere significativo, è da supporre che *in vivo* siano presenti dei cofattori, che permettono di ottimizzare la reazione.

OBIETTIVI

Questo studio è stato svolto per chiarire se Akt è in grado di fosforilare PRPK anche *in vivo*, e se ciò costituisca un elemento di regolazione positiva sull'attività di PRPK.

RISULTATI

1. Fosforilazione di PRPK sulla Ser250 in cellule HEK 293T.

Per capire se la fosforilazione sulla Ser250 di PRPK, vista *in vitro*, abbia luogo anche *in vivo*, si sono dapprima trasfettate cellule HEK 293T con PRPK, sia da sola sia combinata ad una forma di Akt costitutivamente attiva. Si è quindi saggiata la fosforilazione della Ser250 tramite Western blot, usando un anticorpo specifico contro la forma fosforilata di tale sito (pSer250). Come si vede in Figura 3, in seguito a co-trasfezione di Akt compare un evidente segnale in risposta all'anticorpo.

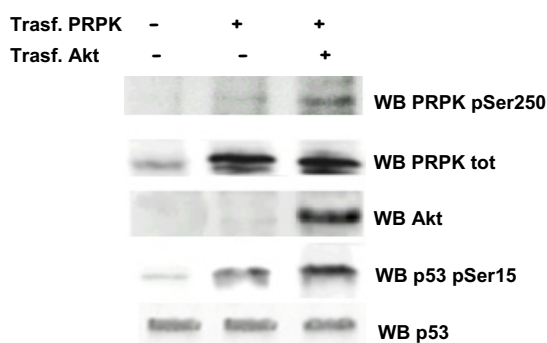


Figura 3: *In vivo* Akt promuove la fosforilazione di PRPK sulla Ser250 e la sua attivazione. Cellule HEK 293T, trasfettate con PRPK da sola o contemporaneamente ad Akt, sono state lisate e 20 µg di lisato proteico sono stati caricati su SDS/PAGE e analizzati tramite Western blot, con gli anticorpi indicati.

Quindi si può dire che anche in cellule PRPK viene fosforilata da Akt e che questa fosforilazione è prevalentemente, se non esclusivamente, a carico della Ser250. A questo punto era interessante capire se questa fosforilazione è importante per l'attivazione dell'enzima. A questo scopo si è dapprima andati ad esaminare lo stato di fosforilazione della Ser15 di p53, unico substrato fisiologico noto di PRPK, nei campioni dell'esperimento precedentemente descritto. In Figura 1 si può notare che l'aumento di fosforilazione della Ser250 di PRPK, in seguito a co-trasfezione di Akt, è accompagnato da un aumento della fosforilazione della Ser15 di p53.

Per indagare in che misura Akt fosse responsabile dell'attivazione di PRPK si sono trasfettate cellule HEK 293T con Akt e, contemporaneamente, o con PRPK *wild type* (wt) o con PRPK mutante Ser250Ala, quindi non fosforilabile da Akt. L'esperimento, inoltre, è stato condotto anche trattando le cellule con l'inibitore LY294002, un composto che blocca la via di segnale che porta all'attivazione di Akt (Vlahos et al., 1994) ed è quindi un inibitore indiretto dell'attività di Akt. Si è

quindi andati ad analizzare nei lisati cellulari la Ser15 di p53, tramite un anticorpo fosfo-specifico. Il risultato è visibile in Figura 4 e mostra che, in presenza di Akt (trasfettata in tutti i casi), la trasfezione di PRPK wt causa un notevole aumento nella fosforilazione della Ser15 di p53 (corsa 3), ma che questo effetto è molto meno evidente se si trasfetta il mutante di PRPK non fosforilabile da Akt (Ser250Ala). Inoltre, il trattamento con LY294002 riduce drasticamente l'effetto positivo di PRPK wt sulla fosforilazione della Ser15 di p53 (corsa 4), mentre non induce variazioni in presenza del mutante di PRPK Ser250Ala (corsa 6), ad indicare che la Ser250 è essenziale per mediare l'effetto stimolatorio di Akt su PRPK. Tra l'altro, c'è da dire che LY294002 inibisce la fosforilazione della Ser15 di p53 anche in cellule non trasfettate (si confrontino le corse 1 e 2), suggerendo che Akt ha un effetto attivatorio anche su PRPK endogena.

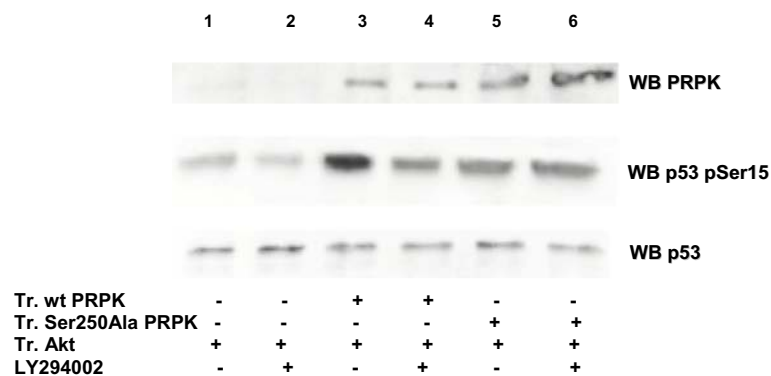
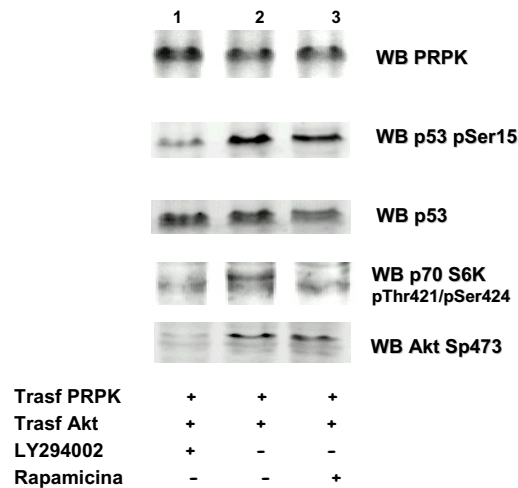


Figura 4: Attivazione di PRPK in seguito a fosforilazione della Ser250 da parte di Akt. Cellule HEK 293T non trasfettate (-) o trasfettate con PRPK wt o con il mutante Ser250Ala, sono state trattate dove indicato (+) con LY294002 25 μ M, per 2 ore. 20 μ g di proteine da lisato cellulare sono stati caricati su SDS/PAGE e analizzati in Western blot con gli anticorpi indicati. In tutti i punti è presente Akt trasfettata.

Poiché, come si è detto, LY294002 non inibisce direttamente Akt, ma blocca la PI3K (senza la quale Akt non viene attivata), si voleva a questo punto escludere che fossero altri enzimi, diversi da Akt ma comunque a valle della PI3K, ad attivare PRPK. Si è pensato pertanto di utilizzare il composto rapamicina, che blocca la chinasi mTOR (Tsang et al., 2007). E' questo un enzima attivato dalla via della PI3K, e che a sua volta induce la fosforilazione e l'attivazione della p70 S6 chinasi.

Figura 5: Fosforilazione della Ser15 di p53 in seguito a trattamento con LY294002 e rapamicina. Cellule HEK 293T, trasfettate con Akt e PRPK, sono state trattate con LY294002 25 μ M o con rapamicina 0.25 μ M per 2 ore, prima della lisi. 20 μ g di proteine da lisato sono stati caricati su SDS/PAGE e analizzati tramite Western blot, con gli anticorpi indicati. Anti p70 S6K pThr421/pSer424 ed anti Akt pSer473 sono stati usati come controllo dell'efficacia del trattamento con rapamicina ed LY294002, rispettivamente.



Come si vede in Figura 5, la rapamicina, come atteso, induce una netta riduzione dello stato di fosforilazione della p70 S6 chinasi, senza aver effetto sulla fosforilazione di Akt; il risultato interessante è che non riduce significativamente la fosforilazione della Ser15 di p53. Questo dato va confrontato con i dati ottenuti con LY294002 che, riducendo vistosamente sia la fosforilazione di Akt che della Ser250 di PRPK (Figura 4), abbatte decisamente la fosforilazione della Ser15 di p53 (Figure 4 e 5). Nel loro insieme, dunque, questi risultati sommati a quelli degli esperimenti *in vitro*, rafforzano l'idea che la fosforilazione di Akt su PRPK sia un evento diretto ed essenziale per l'attivazione della proteinchinasi.

DISCUSSIONE

Molto poco si sa riguardo alla regolazione e alle funzioni fisiologiche della proteinchinasi PRPK. Gran parte delle considerazioni a riguardo deriva dallo studio del suo omologo strutturale e funzionale di lievito, Bud32, il cui ruolo è fondamentale per la vitalità del lievito stesso. PRPK presenta una caratteristica, che ha molto complicato gli studi su di essa: la proteina ricombinante è infatti inattiva e solo in seguito ad incubazione con lisati cellulari viene attivata (Abe et al., 2001), come si può capire dall'aumento della fosforilazione della Ser15 di p53, unico suo substrato fisiologico finora noto e da cui PRPK deriva il proprio nome (*p53-related protein kinase*).

Era quindi interessante capire quale fosse il meccanismo alla base di questa attivazione. La nostra attenzione è stata attirata dal fatto che al C-terminale di PRPK è presente un residuo di serina estremamente conservato e avente il consenso per la fosforilazione da parte di Akt. Per questo è stato ipotizzato che Akt possa essere implicata nella regolazione di PRPK. Nel nostro gruppo di lavoro già era stato dimostrato che Akt fosforila *in vitro* PRPK sulla Ser250. Inoltre si era visto che l'incubazione con lisati di cellule Jurkat, in cui Akt è costitutivamente attiva perché è assente la fosfatasi PTEN, attiva PRPK; mentre il trattamento delle stesse cellule con LY294002, che inibisce a monte l'attivazione di Akt, contrasta vistosamente l'effetto attivante del lisato su PRPK.

Su questo punto si è inserito il lavoro descritto in questa tesi, allo scopo di comprendere se la fosforilazione della Ser250 di PRPK da parte di Akt abbia luogo anche *in vivo* e se sia importante per l'attivazione dell'enzima. Per questo si sono trasfettate cellule HEK 293T con PRPK da sola o in concomitanza con Akt e si è visto che, in quest'ultimo caso, PRPK risulta essere marcatamente fosforilata e che questo aumento di fosforilazione viene a mancare se la Ser250 di PRPK è mutata in alanina. L'uso di un anticorpo fosfo-specifico contro la forma fosforilata della Ser250 ha confermato ulteriormente che Akt fosforila PRPK anche in cellule e che questa fosforilazione è proprio a livello della Ser250.

Inoltre questa fosforilazione da parte di Akt è accompagnata dall'attivazione di PRPK, a giudicare dall'aumento di fosforilazione della Ser15 di p53. L'effetto attivante viene a mancare o è molto ridotto, sia che si trasfettino le cellule con il mutante di PRPK non fosforilabile da Akt (Ser250Ala) sia che si trattino le cellule con LY294002, che previene l'attivazione di Akt. Il trattamento delle cellule con un inibitore della chinasi mTOR, la rapamicina, esclude infine la possibilità che la fosforilazione della Ser250 di PRPK - e quella conseguente della Ser15 di p53 - possano dipendere da altre proteinchinasi, diverse da Akt, comunque a valle di PI3K.

I dati qui presentati fanno pensare inoltre che, a differenza dell'enzima ricombinante, cataliticamente inattivo, PRPK endogena abbia una certa attività basale, la quale viene comunque notevolmente aumentata in seguito alla sovraespressione nelle cellule di Akt. Quindi si può concludere che l'attivazione di PRPK, che può sicuramente richiedere l'intervento di altri fattori cellulari, viene promossa da un meccanismo alla cui base c'è la fosforilazione del sito Akt-dipendente Ser250.

Assumendo che PRPK giochi nella cellula un ruolo simile a quello del suo omologo di lievito Bud32, e quindi molto importante per la sopravvivenza, questa osservazione è un primo passo nella

conoscenza delle interconnessioni funzionali fra questa proteinchinasi ed altre importanti vie di segnale cellulari di sopravvivenza, quali quella di Akt.

Riguardo al ruolo della fosforilazione di p53 a livello della Ser15 da parte di PRPK, ancora non è possibile trarre alcuna conclusione significativa. Altri studi dovranno essere svolti per chiarire se essa possa costituire un sistema alternativo a quello dovuto ad altre chinasi, quali ATM ed ATR, attivate in condizioni di stress, e che garantisca a questo sito un livello di fosforilazione basale, anche in condizioni normali. E' alternativamente possibile che la fosforilazione dello stesso sito (Ser15) ad opera di chinasi diverse, avvenendo in concomitanza ad eventi diversi (sulla stessa p53 o su altri sistemi cellulari connessi) possa avere significati funzionali diversi, o perfino opposti.

CONCLUSIONE GENERALE

La fosforilazione proteica è un sistema molto semplice ed efficace, che si inserisce in un complesso quadro di connessioni regolatorie, che rendono possibile il controllo e la trasmissione di molteplici segnali all'interno di una cellula. Questo quadro è così finemente regolato, che una piccola alterazione può portare a conseguenze anche estremamente drammatiche. Non a caso alcune proteinchinasi, note per il loro ruolo essenziale per la sopravvivenza cellulare, essendo coinvolte ampiamente in processi che vanno, ad esempio, dal metabolismo alla trasduzione del segnale, dalla proliferazione all'apoptosi, sono spesso direttamente correlate a patologie anche gravi.

CK2 ed Akt sono esemplificative di questa azione di "arma a doppio taglio": entrambe hanno un ruolo protettivo per la cellula, favorendone la sopravvivenza e permettendo di sfuggire ad eventuali segnali apoptotici. Inoltre CK2 ha un effetto potenziante su Akt poiché, come si è visto in questa tesi, è in grado di intervenire a diversi livelli nella via di segnale di Akt ed ha inoltre un effetto diretto sull'attivazione della chinasi e sulla preservazione del suo stato attivato. Di conseguenza è comprensibile che, qualora l'espressione di CK2 ed Akt risulti esageratamente elevata, si giunga a conseguenze aberranti. Tanto più se si tiene presente che CK2 è di per sé costitutivamente attiva e la sua sovraespressione può portare alla perpetuazione di segnali di sopravvivenza. Ad esempio, in determinati contesti, CK2 potrebbe rappresentare un meccanismo per l'attivazione costitutiva di Akt, anche in assenza di ulteriori eventi regolatori. Akt può trasmettere segnali di sopravvivenza, attivando a sua volta ulteriori fattori. Ad esempio si è visto come essa vada ad influire sull'attività della proteinchinasi PRPK, la cui funzione è ancora piuttosto enigmatica, ma che – per analogia con il suo omologo di lievito Bud32 – potrebbe essere molto importante per la sopravvivenza cellulare.

Benché molti aspetti vadano ulteriormente approfonditi, tuttavia si può ammettere che, in contesti e situazioni cellulari diversi, la stessa proteinchinasi può giocare ruoli estremamente vari, non solo a seconda del suo grado di espressione, ma anche del quadro di substrati endogeni su cui si trova ad agire. Una dimostrazione viene dallo studio delle proteinchinasi di sopravvivenza nel fenomeno della farmacoresistenza, in cui un'esasperata vitalità e una mancata risposta apoptotica delle cellule si traducono in un grave problema clinico. E' difficile correlare in modo univoco l'espressione e l'attività di una determinata proteinchinasi con l'insorgenza del fenomeno; tuttavia le cellule farmacoresistenti mostrano generalmente un quadro di fosforilazione di substrati endogeni piuttosto dissimile rispetto alle cellule controllo, a suggerire che la presenza e la

disponibilità di determinati substrati, in concomitanza con la sovraespressione o l'iperattivazione di determinate chinasi, può avere conseguenze determinanti nell'insorgenza del fenotipo resistente.

Complessivamente, i risultati riportati in questa tesi forniscono degli esempi di come le proteinchinasi di sopravvivenza (nel caso particolare Akt, CK2 e PRPK) e le vie di segnale da esse controllate siano strettamente interconnesse e cooperino ad un unico scopo: preservare la vitalità cellulare. Talvolta questa preservazione diviene esasperata, al punto da sfociare in condizioni patologiche. Per questo la conoscenza approfondita di tale rete di correlazioni funzionali è l'unica via per poterne comprendere a fondo il significato biologico, per valutare la gravità di eventuali disfunzioni, e per poter intervenire in modo mirato ed opportuno, al fine di correggerle.

BIBLIOGRAFIA

- Abe Y., Matsumoto S., Wei S., Nezu K., Miyoshi A., Kito K., Ueda N., Shigemoto K., Hitsumoto Y., Nikawa J., Enomoto Y. (2001).** Cloning and characterization of a p53-related protein kinase expressed in interleukin-2-activated cytotoxic T-cells, epithelial tumor cell lines and the testes. *J. Biol. Chem.* **276**, 44003-44011.
- Abe Y., Takeuchi T., Imai Y., Murase R., Kamei Y., Fujibuchi T., Matsumoto S., Ueda N., Ogasawara M., Shigemoto K., Kito K. A. (2006).** Small Ras-like protein Ray/Rab1c modulates the p53-regulating activity of PRPK. *Biochem Biophys Res Commun.* **344**: 377-385.
- Abe, Y., Matsumoto, S., Wei, S., Nezu, K., Myoshi, A., Kito, K., Ueda, N., Shigemoto, K., Hitsumoto, Y., Nikawa, J. and Enomoto, Y. (2001).** Cloning and characterization of a p53-
- Ahmed, K., Gerber, D.A. and Cochet, C. (2002).** Joining the cell survival squad: an emerging role for protein kinase CK2. *Trends Cell Biol.* **12**, 226-230.
- Ahmad, K.A., Harris, N.H., Johnson, A.D., Lindvall, H.C., Wang, G., Ahmed, K. (2007).** Protein kinase CK2 modulates apoptosis induced by resveratrol and epigallocatechin-3-gallate in prostate cancer cells. *Mol Cancer Ther.*; **6**: 1006-12.
- Alessi, D.R., Andjelkovic, M., Caudwell, B., Cron, P., Morrice, N., Cohen, P., and Hemmings, B.A. (1996a).** Mechanism of activation of protein kinase B by insulin and IGF-1. *EMBO J.*; **15**: 6541–6551.
- Alessi, D.R., Caudwell, F.B., Andjelkovic, M., Hemmings, B.A. and Cohen, P. (1996b).** Molecular basis for the substrate specificity of protein kinase B; comparison with MAPKAP kinase-1 and p70 S6 kinase. *FEBS Lett.*; **399**: 333–338.
- Allende-Vega, N., Dias, S., Milne, D. and Meek, D.(2005).** Phosphorylation of the acidic domain of Mdm2 by protein kinase CK2 *Mol. Cell. Biochem.* **274**, 85–90.
- Andjelkovic, M., Jakubowicz, T., Cron, P., Ming, X.F., Han, J.W. and Hemmings, B.A. (1996).** Activation and phosphorylation of a pleckstrin homology domain containing protein kinase (RAC-PK/PKB) promoted by serum and protein phosphatase inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*; **93**: 5699–5704.
- Banin, S. et al. (1998).** Enhanced phosphorylation of p53 by ATM in response to DNA damage. *Science*, **281**: 1674–1677.
- Barancík M, Boháčová V, Sedlák J, Sulová Z, Breier A. (2006).** LY294,002, a specific inhibitor of PI3K/Akt kinase pathway, antagonizes P-glycoprotein-mediated multidrug resistance. *Eur J Pharm Sci*; **29**: 426-34.
- Barone, M. V., Crozat, A., Tabaei, A., Philipson, L., and Ron, D. (1994).** CHOP (GADD153) and its oncogenic variant, TLS-CHOP, have opposing effects on the induction of G1/S arrest. *Genes Dev.*; **8**: 453–464.
- Barroga, C.F., Stevenson, J.K., Schwarz, E.M., Verma, I.M. (1995).** Constitutive phosphorylation of I kappa B alpha by casein kinase II. *Proc Natl Acad Sci U S A.*; **92**: 7637-41.
- Basso, A.D., Solit, D.B., Chiosis, G., Giri, B., Tschlis, P., Rosen, N. (2002).** Akt forms an intracellular complex with heat shock protein 90 (Hsp90) and Cdc37 and is destabilized by inhibitors of Hsp90 function. *J Biol Chem.*; **277**: 39858-66.
- Basu, S., Totty, N.F., Irwin, M.S., Sudol, M., Downward, J. (2003).** Akt phosphorylates the Yes-associated protein, YAP, to induce interaction with 14-3-3 and attenuation of p73-mediated apoptosis. *Mol Cell.*; **11**: 11-23.
- Belenguer, P., Baldin, V., Mathieu, C., Prats, H., Bensaid, M., Bouche, G. and Amalric, F., (1989).** Protein kinase NII and the regulation of rDNA transcription in mammalian cells. *Nucleic Acids Res.*; **17**: 6625-6636.
- Bialojan, C., Takai, A. (1988).** Inhibitory effect of a marine-sponge toxin, okadaic acid, on protein phosphatases. Specificity and kinetics. *Biochem J.*; **256**: 283-90.
- Bianchi, A. and Shore, D. (2006).** the keoPs complex: A Rosetta stone for telomere Regulation? *Cell* **124**: 1125-1128.

- Bidwai, A.P., Reed, J.C. and Glover, C.V. (1995).** Cloning and disruption of CKB1, the gene encoding the 38-kDa β -subunit of *Saccharomyces cerevisiae* casein kinase II (CKII). Deletion of CKII regulatory subunits elicits a saltsensitive phenotype. *J Biol Chem*; **270**: 10395-10404.
- Biggs III, W.H., Meisenhelder, J., Hunter, T., Cavenee, W.K., Arden, K.C. (1999).** Protein kinase B/Akt-mediated phosphorylation promotes nuclear exclusion of the winged helix transcription factor FKHR1. *Proc Natl Acad Sci U S A.*; **96**: 7421-6.
- Blaydes, J.P. and Hupp, T.R. (1998).** DNA damage triggers DRB-resistant phosphorylation of human p53 at the CK2 site. *Oncogene*; **17**: 1045–1052.
- Block, K., Boyer, T. G. and Yew, P. R. (2001).** Phosphorylation of the human ubiquitin-conjugating enzyme, CDC34, by casein kinase 2. *J. Biol. Chem.*; **276**: 41049-41058.
- Bodenbach, L., Fauss, J., Robitzki, A., Krehan, A., Lorenz, P., Lozeman, F.J. and Pyerin, W. (1994).** Recombinant human casein kinase II. A study with the complete set of subunits (α , α' and β), site-directed autophosphorylation mutants and a bicistronically expressed holoenzyme. *Eur. J. Biochem.*; **220**: 263-273.
- Boldyreff, B., James, P., Staudenmann, W. and Issinger, O.G. (1993).** Ser2 is the autophosphorylation site in the β subunit from bicistronically expressed human casein kinase-2 and from native rat liver casein kinase-2 β . *Eur. J. Biochem.*; **218**: 515-521.
- Borst, P., Evers, R., Kool, M. and Wijnholds, J. (2000)** A family of drug transporters: the multidrug resistance-associated proteins. *J Natl Cancer Inst.* **92**: 1295-1302.
- Bottomley, M.J., Salim, K., Panayotou, G., (1998).** Phospholipid-binding protein domains. *Biochem. Biophys. Acta*, **1436**: 165-183.
- Bradshaw, D.M. and Arceri, R.J. (1998)** Clinical relevance of transmembrane drug efflux as a mechanism of multidrug resistance. *J Clin Oncol.* **16**: 3674-3690.
- Bren, G.D., Pennington, K.N., Paya, C.V. (2000).** PKC-zeta-associated CK2 participates in the turnover of free I κ B α . *J Mol Biol.*; **297**: 1245-58.
- Brogna, J., Sierecki, E., Gao, T., Newton, A.C. (2007).** PHLPP and a second isoform, PHLPP2, differentially attenuate the amplitude of Akt signaling by regulating distinct Akt isoforms. *Mol Cell.*; **25**: 917-31.
- Brunet, A., Bonni, A., Zigmond, M.J., Lin, M.Z., Juo, P., Hu, L.S., Anderson, M.J., Arden, K.C., Blenis, J. and Greenberg, M.E.. (1999)** Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell*; **96**: 857–868.
- Buchou, T. and Cochet, C. (2003).** La protéine kinase CK2, une enzyme qui cultive la différence *MEDECINE/SCIENCES*; **19**: 709-716.
- Burger, H., Nooter, K., Zaman, G.J., Sonneveld, P., van Wingerden, K.E., Oostrum, R.G. and Stoter, G. (1994)** Expression of the multidrug resistance-associated protein (MRP) in acute and chronic leukemias. *Leukemia*. **8**: 990-997.
- Canman, C.E., Lim, D.S., Cimprich, K.A., Taya, Y., Tamai, K., Sakaguchi, K., Appella, E., Kastan, M.B. and Siliciano, J.D. (1998)** Activation of the ATM kinase by ionising radiation and phosphorylation of p53. *Science*, **281**: 1677–1679.
- Cardenas, M.E., Dang, Q., Glover, C.V., Gasser, S.M. (1992).** Casein kinase II phosphorylates the eukaryote-specific C-terminal domain of topoisomerase II in vivo. *EMBO J.* ; **11**: 1785-96.
- Cardone, M.H., Roy, N., Stennicke, H.R., Salvesen, G.S., Franke, T.F., Stanbridge, E., Frisch, S. and Reed J.C. (1998).** Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation. *Science*; **282**: 1318– 1321.

- Chang, H.W., Aoki, M., Fruman, D., Auger, K.R., Bellacosa, A., Tsichlis, P.N., Cantley, L.C., Roberts, T.M. and Vogt, P.K. (1997).** Transformation of chicken cells by the gene encoding the catalytic subunit of PI 3-kinase. *Science*; **276**: 1848-1850.
- 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**: 2930-2940.
- Chao, C.C., Hung, Y.T., Ma, C.M. Chou, W.Y. and Chao, S.L. (1991)** Overexpression of glutathione S-transferase and elevation of thiol pools in a multidrug resistant human colon cancer cell line. *M. Pharmacol.* **41**, 69.
- Chen, S., Guttridge, D.C., You, Z., Zhang, Z., Fribley, A., Mayo, M.W., Kitajewski, J., Wang, C.Y. (2001).** Wnt-1 signaling inhibits apoptosis by activating beta-catenin/T cell factor-mediated transcription. *J Cell Biol.*; **152**: 87-96.
- Chen, R., Kim, O., Yang, J., Sato, K., Eisenmann, K.M., McCarthy, J., Chen, H., Qiu, Y. (2001).** Regulation of Akt/PKB activation by tyrosine phosphorylation. *J Biol Chem.*; **276**: 31858-62.
- Cole, S.P., Bhardwaj, G., Gerlach, J.H., Mackie, J.E., Grant, C.E., Almquist, K.C., Stewart, A.J., Kurz, E.U., Duncan, A.M. and Deeley, R.G. (1992)** Overexpression of a transporter gene in a multidrug-resistant human lung cancer cell line *Science*; **258**: 1650-1654.
- Cole, S.P., Downes, H.F. and Slovak, M.L. (1989)** Effect of calcium antagonists on the chemosensitivity of two multidrug-resistant human tumour cell lines which do not overexpress P-glycoprotein. *Br. J. Cancer.* **59**: 42-46.
- Conus, N.M., Hannan, K.M., Cristiano, B.E., Hemmings, B.A., Pearson, R.B. (2002).** Direct identification of tyrosine 474 as a regulatory phosphorylation site for the Akt protein kinase. *J Biol Chem.*; **277**: 38021-8.
- Cross, D.A., Alessi, D.R., Cohen, P., Andjelkovich, M. and Hemmings, B.A. (1995).** Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature* **378**: 785–789.
- Dal Pero, F., Di Maira, G., Marin, O., Bortoletto, G., Pinna, L.A., Alberti, A., Ruzzene, M., Gerotto, M. (2007).** Heterogeneity of CK2 phosphorylation sites in the NS5A protein of different hepatitis C virus genotypes. *J Hepatol.*; **47**: 768-76.
- Datta, S.R., Brunet, A. and Greenberg, M.E. (1999).** Cellular survival: A play in three Akts. *Genes Dev*; **13**: 2905–2927.
- Datta, S.R., Dudek, H., Tao, X., Masters, S., Fu, H., Gotoh, Y. and Greenberg, M.E. (1997).** Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell*; **91**: 231– 241.
- Davis, R.J. (2000).** Signal transduction by the JNK group of MAP kinases. *Cell*; **103**: 239–252.
- Davis, R.J. (2000).** Signal transduction by the JNK group of MAP kinases. *Cell*; **103**: 239–252.
- del Peso, L., Gonzalez, G.-M., Page, C., Herrera, R. and Nunez, G. (1997).** Interleukin-3-induced phosphorylation of BAD through the protein kinase Akt. *Science*; **278**: 687– 689.
- Delcommenne, M., Tan, C., Gray, V., Rue, L., Woodgett, J. and Dedhar, S., (1998).** Phosphoinositide-3-OH kinase-dependent regulation of glycogen synthase kinase 3 and Akt/PKB by the integrin-linked kinase, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*; **95**: 11211-11216.
- Desagher, S., Osen-Sand, A., Montessuit, S., Magnenat, E., Vilbois, F., Hochmann, A., Journot, L., Antonsson, B. and Martinou, J.C. (2001).** Phosphorylation of Bid by casein kinases I and II regulates its cleavage by caspase 8. *Mol Cell* ; **8**: 601-11.
- Di Maira, G., Brustolon, F., Bertacchini, J., Tosoni, K., Marmioli, S., Pinna, L.A., Ruzzene, M. (2007).** Pharmacological inhibition of protein kinase CK2 reverts the multidrug resistance phenotype of a CEM cell line characterized by high CK2 level. *Oncogene*; **26**: 6915–6926

- 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**: 668-677.
- Dijkers, P.F., Medema, R.H., Lammers, J.W., Koenderman, L. and Coffey, P.J.(2000).** Expression of the pro-apoptotic Bcl-2 family member Bim is regulated by the forkhead transcription factor FKHR-L1. *Curr Biol*, **10**: 1201–1204.
- Dobrowolska, G., Meggio, F., Szczegielniak, J., Muszynska, G., Pinna, L.A. (1992).** Purification and characterization of maize seedling casein kinase IIB, a monomeric enzyme immunologically related to the alpha subunit of animal casein kinase-2. *Eur J Biochem.*; **204**: 299-303.
- Downey, M., Houlsworth, Maringele, L., Rollie, A., Brehme, M., Galicia, S., Guillard, S., Partington, M., Zubko, M.K., Krogan, N.J., Emili, A., Greenblatt, J.F., Harrington, L., Lydall, D., Durocher, D. (2006).** A Genome-Wide Screen Identifies the Evolutionary Conserved KEOPS Complex as a Telomere Regulator. *Cell* **124**: 1155-1168.
- Du, K. and Montminy, M. (1998).** CREB is a regulatory target for the protein kinase Akt/PKB *J Biol Chem* ; **273**: 32377–32379.
- Du, K., Herzig, S., Kulkarni, R.N., Montminy, M. (2003).** TRB3: a tribbles homolog that inhibits Akt/PKB activation by insulin in liver. *Science*; **300**: 1574-7.
- Enari, M., Sakahira, H., Yokoyama, H., Okawa, K., Iwamatsu, A., Nagata, S. (1998).** A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis and its inhibitors ICAD. *Nature*; **391**: 43-50.
- Escalier, D., Silvius, D., Xu, X. (2003).** Spermatogenesis of mice lacking CK2alpha': failure of germ cell survival and characteristic modifications of the spermatid nucleus. *Mol Reprod Dev.*; **66**: 190-201.
- Facchin, S., Lopreiato, R., Ruzzene, M., Marin, O., Sartori, G., Götz, C., Montenarh, M., Carignani, G., Pinna, L. A. (2003).** Functional homology between yeast piD261/Bud32 and human PRPK: both phosphorylates p53 and PRPK partially complements piD261/Bud32 deficiency. *FEBS Letters* **549**: 63-66.
- Facchin, S., Ruzzene, M., Peggion, C., Sartori, G., Carignani, G., Marin, O., Brustolon, F., Lopreiato, R. and Pinna L.A. (2007).** Phosphorylation and activation of the atypical kinase p53-related protein kinase (PRPK) by Akt/PKB. *Cell. Mol. Life Sci.*; **64**: 2680-2689.
- Facchin, S., Sarno, S., Marin, O., Lopreiato, R., Sartori, G. and Pinna, L. A. (2002).** Acidophilic character of yeast PID261/BUD32, a putative ancestor of eukaryotic protein kinases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*; **296**: 133-171.
- Fingar, D.C., Blenis, J. (2004).** Target of rapamycin (TOR): an integrator of nutrient and growth factor signals and coordinator of cell growth and cell cycle progression. *Oncogene*; **23**: 3151-71.
- Ford, K.G., Darling, D., Souberbielle, B., Farzaneh, F. (2000).** Protein transduction: a new tool for the study of cellular ageing and senescence. *Mech Ageing Dev.*; **121**: 113-21.
- Fritz, G. and Kaina, B. (1999).** Phosphorylation of the DNA repair protein APE/REF-1 by CKII affects redox regulation of AP-1. *Oncogene* **18**, 1033–1040.
- Frodin, M., Antal, T.L., Dummler, B.A., Jensen, C.J., Deak, M., Gammeltoft, S. and Biondi, R.M. (2002)** A phosphoserine/threonine-binding pocket in AGC kinases and PDK1 mediates activation by hydrophobic motif phosphorylation. *EMBO J.*; **21**: 5396-5407.
- Fujita, N., Sato, S., Ishida, A., Tsuruo, T. (2002).** Involvement of Hsp90 in signaling and stability of 3-phosphoinositide-dependent kinase-1. *J Biol Chem.*; **277**: 10346-53.
- Fujiwara, H., Yamakuni, T., Ueno, M., Ishizuka, M., Shinkawa, T., Isobe, T., Ohizumi, Y. (2004).** IC101 induces apoptosis by Akt dephosphorylation via an inhibition of heat shock protein 90-ATP binding activity accompanied by preventing the interaction with Akt in L1210 cells. *J Pharmacol Exp Ther.*; **310**: 1288-95.

- Gao, T, Furnari, F, and Newton, A.C. (2005)** PHLPP: a phosphatase that directly dephosphorylates Akt, promotes apoptosis, and suppresses tumor growth. *Mol Cell.*; **18**: 13-24.
- Gerber, D.A., Souquere-Besse, S., Puvion, F., Dubois, M.F., Bensaude, O. and Cochet, C. (2000).** Heat-induced relocalization of protein kinase CK2. Implication of CK2 in the context of cellular stress. *J. Biol. Chem.*; **275**: 23919–23926.
- Ghavidel, A. and Schultz, M.C. (2001).** TATA binding protein-associated CK2 transduces DNA damage signals to the RNA polymerase III transcriptional machinery. *Cell* **106**, 575-584.
- Glavy JS, Horwitz SB, Orr GA. (1997)** Identification of the *in vivo* phosphorylation sites for acidic-directed kinases in murine mdrlb P-glycoprotein. *J Biol Chem.* **272**: 5909-5914.
- Glover III, C.V. (1998).** On the physiological role of casein kinase II in *Saccharomyces cerevisiae*. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol.*; **59**: 95-133.
- Gottlieb, T.M., Leal, J.F., Seger, R., Taya, Y. and Oren, M. (2002).** Cross-talk between Akt, p53 and Mdm2: possible implications for the regulation of apoptosis, *Oncogene*, **21**: 1299- 1303.
- Guerra, B., Issinger, O.G. (1999).** Protein kinase CK2 and its role in cellular proliferation, development and pathology. *Electrophoresis*; **20**: 391-408.
- Guerra, B., Issinger, O.G., Wang, J.Y. (2003).** Modulation of human checkpoint kinase Chk1 by the regulatory beta-subunit of protein kinase CK2. *Oncogene.*; **22**: 4933-42.
- Guerra, B. (2006).** Protein kinase CK2 subunits are positive regulators of AKT kinase. *Int J Oncol.*; **28**: 685-93.
- Guo, C., Yu, S, Davis, A.T. and Ahmed, K. (1999).** Nuclear matrix targeting of the protein kinase CK2 signal as a common downstream response to androgen or growth factor stimulation of prostate cancer cells. *Cancer Res.* **59**: 1146–1151.
- Guo, C., Yu, S., Davis, A.T. and Ahmed, K. (1999).** Nuclear matrix targeting of the protein kinase CK2 signal as a common downstream response to androgen or growth factor stimulation of prostate cancer cells. *Cancer Res.*; **59**: 1146–1151.
- Guo, C., Yu, S., Davis, A.T., Wang, H., Green, J.E. and Ahmed K. (2001).** A potential role of nuclear matrix-associated protein kinase CK2 in protection against drug-induced apoptosis in cancer cells. *J Biol Chem.*; **276**:5992-5999.
- Guo, S., Rena, G., Cichy, S., He, X., Cohen, P. and Unterman, T. (1999).** Phosphorylation of serine 256 by protein kinase B disrupts transactivation by FKHR and mediates effects of insulin on insulin-like growth factor-binding protein-1 promoter activity through a conserved insulin response sequence. *J Biol Chem*; **274**: 17184–17192.
- Hanks, S.K, Quinn, A.M. (1991).** Protein kinase catalytic domain sequence database: identification of conserved features of primary structure and classification of family members. *Methods Enzymol.*; **200**: 38-62.
- Hanks, S.K. and Hunter, T. (1995).** Protein kinases 6. The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification. *FASEB J.*; **9**: 576–596.
- Hanna, D.E., Rethinaswamy, A., Glover, C.V. (1995).** Casein kinase II is required for cell cycle progression during G1 and G2/M in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*; **270**: 25905-25914.
- Hengartner, M. O., 2000.** The biochemistry of apoptosis. *Nature*; **407**, insight review article.
- Hill, M.M. and Hemmings, B.A. (2002).** Inhibition of protein kinase B/Akt. Implications for cancer therapy. *Pharmacol Ther.*; **93**: 243-251.
- Hockman, D.J. and Schultz, M.C., (1996).** Casein kinase II is required for efficient transcription by RNA polymerase III. *Mol. Cell. Biol.*; **16**: 892-898.

- Hresko, R.C., Mueckler, M. (2005). mTOR.RICTOR is the Ser473 kinase for Akt/protein kinase B in 3T3-L1 adipocytes. *J Biol Chem.*; **280**: 40406-16.
- Hu, X.F., Li, J., Yang, E., Vandervalk, S., Xing, P.X. (2007). Anti-Cripto Mab inhibit tumour growth and overcome MDR in a human leukaemia MDR cell line by inhibition of Akt and activation of JNK/SAPK and bad death pathways. *Br J Cancer*; **96**(6): 918-27.
- Issinger, O.G. (1993). Casein kinases: pleiotropic mediators of cellular regulation. *Pharmacol Ther*, **59**: 1–30.
- Izeradjene, K., Douglas, L., Delaney, A. and Houghton, J.A. (2005). Casein kinase II (CK2) enhances death-inducing signaling complex (DISC) activity in TRAIL-induced apoptosis in human colon carcinoma cell lines *Oncogene*; **24**: 2050–2058.
- Jones, P.F., Jakubowicz, T., Pitossi, F.J., Maurer, F., Hemmings, B.A. (1991). Molecular cloning and identification of a serine/threonine protein kinase of the second-messenger subfamily *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*; **88**: 4171-4175.
- Juliano, R.L. and Ling V. (1996) A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cells mutants. *Biochim. Biophys. Acta*. **455**: 152-162.
- Kapoor, M. and Lozano, G. (1998). Functional activation of p53 via phosphorylation following DNA damage by UV but not gamma radiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95**, 2834-2837.
- Keller, D.M., Zeng, X., Wang, Y., Zhang, Q.H., Kapoor, M., Shu, H., Goodman, R., Lozano, G., Zhao, Y. and Lu, H. (2001). A DNA damage-induced p53 serine 392 kinase complex contains CK2, hSpt16, and SSRP1. *Mol. Cell* **7**, 283-292.
- Kim, A.H., Khursigara G., Sun, X., Franke, T.F. and Chao M.V.(2001). Akt phosphorylates and negatively regulates apoptosis signal-regulating kinase 1. *Mol Cell Biol*; **21**: 893– 901.
- Klimecki, W.T., Futscher, B.W., Grogan, T.M. and Dalton, W.S. (1994) Pglycoprotein expression and function in circulating blood cells from normal volunteers. *Blood*. **83**: 2451-2458.
- Kothakota, S., Kothakota S, Azuma T, Reinhard C, Klippel A, Tang J, Chu K, McGarry TJ, Kirschner MW, Koths K, Kwiatkowski DJ, Williams L.T. (1997). Caspase-3-generated fragment of gelsolin: effector of morphological change in apoptosis. *Science*; **278**: 294-298.
- Krehan, A., Ansuini, H., Bocher, O., Grein, S., Wirkner, U., Pyerin, W. (2000). Transcription factors ets1, NF- κ B, and Sp1 are major determinants of the promoter activity of the human protein kinase CK2 α gene. *J Biol Chem* **275**, 18327-18336.
- Krippner-Heidenreich, A., Talanian, R.V., Sekul, R., Kraft, R., Thole, H., Ottleben, H. and Luscher, B. (2001). Targeting of the transcription factor Max during apoptosis: phosphorylation-regulated cleavage by caspase-5 at an unusual glutamic acid residue in position P1. *Biochem J*; **358**: 705-715.
- Krogan, N.J., Cagney, G., Yu, H., Zhong, G., Guo, X., Ignatchenko, A., Li, J., Pu, S., Datta, N., Tikuisis, A.P., Punna, T., Peregrin-Alvarez, J.M., Shales, M., Zhang, X., Davey, M., Robinson, M.D., Paccanaro, A., Bray, J.E., Sheung, A., Beattie, B., Richards, D.P., Canadien, V., Lalev, A., Mena, F., Wong, P., Starostine, A., Canete, M.M., Vlasblom, J., Wu, S., Orsi, C., Collins, S.R., Chandran, S., Haw, R., Rilstone, J.J., Gandi, K., Thompson, N.J., Musso, G., St Onge, P., Ghanny, S., Lam, M.H., Butland, G., Altaf-Ul, A.M., Kanaya, S., Shilatifard, A., O'Shea, E, Weissman, J.S., Ingles, C.J., Hughes, T.R., Parkinson, J., Gerstein, M., Wodak, S.J., Emili, A., Greenblatt, J.F. (2006). Global landscape of protein complexes in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* **440**: 637-43.
- Kumar, C.C., Madison, V. (2005). AKT crystal structure and AKT-specific inhibitors. *Oncogene*. **24**: 7493-7501.
- Kuo, C.J., Chung, J., Fiorentino, D.F., Flanagan, W.M., Blenis, J., Crabtree, G.R.(1992). Rapamycin selectively inhibits interleukin-2 activation of p70 S6 kinase. *Nature*; **358**: 70-3.

- Lang, A.J., Mirski, S.E., Cummings, H.J., Yu, Q., Gerlach, J.H. and Cole S.P. (1998)** Structural organization of the human TOP2A and TOP2B genes. *Gene*. **221**: 255-266.
- Lees-Miller, S., Sakaguchi, K., Ullrich, S.J., Appella, E. and Anderson, C.W. (1992).** Human DNA-activated protein kinase phosphorylates serines 15 and 37 in the amino-terminal transactivation domain of human p53. *Mol. Cell. Biol.*, **12**: 5041–5049.
- Li, H., Zhu, H., Xu, C.J. and Yuan J. (1998).** Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell*; **94**: 491-501.
- Li, P., Li, J., Muller, E., Otto, A., Dietz, R. and von Harsdorf, R. (2002).** Phosphorylation by protein kinase CK2. A signaling switch for the caspase-inhibiting protein ARC. *Mol. Cell*; **10**: 247-258.
- Litchfield, D.W. (2003).** Protein kinase CK2: structure, regulation and role in cellular decisions of life and death. *Biochem J.*; **369**: 1-15
- Lopreiato, R., Facchin, S., Sartori, G., Arrighi, G., Casonato, S., Ruzzene, M., Pinna, L. A., Carignani, G. (2004).** Analysis of the interaction between p1D261/Bud32, an evolutionarily conserved protein kinase of *Saccharomyces cerevisiae*, and the Grx4 glutaredoxin. *Biochem. J.* **377**: 395-405.
- Lorenz, P., Pepperkok, R., Ansorge, W., Pyerin, W. (1993).** Cell biological studies with monoclonal and polyclonal antibodies against human casein kinase II subunit β demonstrate participation of the kinase in mitogenic signaling. *J Biol Chem*; **268**: 2733-2739.
- Lowe, S.W., Schmitt, E.M., Smith, S.W., Osborne, B.A. and Jacks, T.(1993)** p53 is required for radiation-induced apoptosis in mouse thymocytes. *Nature* **362**: 847-849.
- Maira, S.M., Galetic, I., Brazil, D.P., Kaech, S., Ingley, E., Thelen, M., Hemmings, B.A. (2001).** Carboxyl-terminal modulator protein (CTMP), a negative regulator of PKB/Akt and v-Akt at the plasma membrane. *Science*; **294**: 374-80.
- Manning G., Plowman G.D., Hunter T., Sudarsanam S. (2002).** Evolution of protein kinase signaling from yeast to man. *Trends Biochem. Sci.* **27**: 514–520.
- Manning, B.D., Cantley, L.C. (2007).** AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell.*; **129**: 1261-74.
- Marin, O., Meggio, F. and Pinna, L. A. (1999).** Structural features underlying the unusual mode of calmodulin phosphorylation by protein kinase CK2: a study with synthetic calmodulin fragments. *Biochem. Biophys. Res Commun.*; **256**: 442-446.
- Marin, O., Sarno, S., Boschetti, M., Pagano, M.A., Meggio, F., Ciminale, V., D'Agostino, D.M. and Pinna, L.A. (2000).** Unique features of HIV-1 Rev protein phosphorylation by protein kinase CK2 ('casein kinase-2'). *FEBS Lett.*; **481**: 63-67.
- Martel, V., Filhol, O., Nueda, A., Cochet, C. (2002).** Dynamic localization/association of protein kinase CK2 subunits in living cells: a role in its cellular regulation? *Ann N Y Acad Sci.*; **973**: 272-7.
- Matsumoto Y, Kunishio K and Nagao S. (1999)** Increased phosphorylation of DNA topoisomerase II in etoposide resistant mutants of human glioma cell line. *J Neurooncol.* **45**: 37-46.
- Mayo, L.D. and Donner, D.B. (2001).** A phosphatidylinositol 3- kinase/Akt pathway promotes translocation of Mdm2 from the cytoplasm to the nucleus, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **98**: 11598-11603.
- Maytin, E. V., Ubeda, M., Lin, J. C., and Habener, J. F. (2001).** Stress-inducible transcription factor CHOP/gadd153 induces apoptosis in mammalian cells via p38 kinase-dependent and independent mechanisms. *Exp. Cell Res.*; **267**, 193–204.
- Meggio, F., Marin, O. and Pinna, L.A. (1994).** Substrate specificity of protein kinase CK2. *Cell. Mol. Biol. Res.*; **40**: 401–409.

Meggio, F., Pagano, M.A., Moro, S., Zagotto, G., Ruzzene, M., Sarno, S., Cozza, G., Bain, J., Elliott, M., Donella-Deana, A., Brunati, A.M., Pinna, L.A. (2004). Inhibition of protein kinase CK2 by condensed polyphenolic derivatives. An *in vitro* and *in vivo* study. *Biochemistry*; **43**: 12931–12936.

Meggio, F., Pinna, L.A. (2003). One-thousand-and-one substrates of protein kinase CK2? *FASEB J.*; **17**: 349-68.

Meister, A. (1983) Selective modification of glutathione metabolism. *Science*. **220**:472-477.

Miller, S.J., Lou, D.Y., Seldin, D.C., Lane, W.S., Neel, B.G. (2002). Direct identification of PTEN phosphorylation sites. *FEBS Lett.*; **528**: 145-53.

Miyata Y, Yahara I. (1992). The 90-kDa heat shock protein, HSP90, binds and protects casein kinase II from self-aggregation and enhances its kinase activity. *J Biol Chem.*; **267**:7042-7.

Miyata, Y. and Nishida, E. (2004): CK2 controls multiple protein kinases by phosphorylating a kinase-targeting molecular chaperone Cdc37. *Mol Cell Biol*; **24**: 4065–4074.

Miyata, Y. and Nishida, E. (2005). CK2 binds, phosphorylates, and regulates its pivotal substrate Cdc37, an Hsp90-cochaperone *Molecular and Cellular Biochemistry* **274**: 171–179.

Miyoshi, A., Kito, K., Aramoto, T., Abe, Y., Kobayashi, N., Ueda, N. (2003). Identification of CGI-121, a novel PRPK (p53-related protein kinase)-binding protein. *Biochem Biophys Res Commun.* **303**(2): 399-405.

Modur, V., Nagarajan, R., Evers, B.M. and Milbrandt, J. (2002). FOXO proteins regulate tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand expression. Implications for PTEN mutation in prostate cancer. *J. Biol. Chem.* **277**: 47928–47937.

Nagata, S., 2000. Apoptotic DNA fragmentation. *Exp. Cell Res.*; **256**: 12-18.

Niefind, K., Guerra, B., Ermakowa, I., Issinger, O.G. (2001). Crystal structure of human protein kinase CK2: insights into basic properties of the CK2 holoenzyme. *EMBO J.*; **20**: 5320-31.

Niefind, K., Guerra, B., Pinna, L.A., Issinger, O.G., Schomburg, D. (1998). Crystal structure of the catalytic subunit of protein kinase CK2 from *Zea mays* at 2.1 Å resolution. *EMBO J.*; **17**: 2451-62.

Niefind, K., Pütter, M., Guerra, B., Issinger, O.G. and Schomburg, D. (1999). GTP plus water mimics ATP in the active site of protein kinase CK2. *Nature Struct. Biol.*; **6**: 1100–1103.

Obata, T., Yaffe, M.B., Lepar, G.G., Piro, E.T., Maegawa, H., Kashiwagi, A., Kikkawa, R. and Cantley L.C. (2000). Peptide and protein library screening defines optimal substrate motifs for AKT/PKB. *J. Biol Chem*; **275**: 36108– 36115.

Olsten, M.E., Litchfield, D.W. (2004). Order or chaos? An evaluation of the regulation of protein kinase CK2. *Biochem Cell Biol.*; **82**: 681-93.

Oren, M. (2003). Decision making by p53: life, death and cancer. *Cell Death and Differentiation* **10**, 431–442.

Osaki, M. and Oshimura, H. (2004). Ito PI3K-Akt pathway: Its functions and alterations in human cancer *Apoptosis*; **9**: 667–676.

Ospina, B., Núñez, A., Fernández-Renart, M. (1992). Purification of a soluble casein kinase II from *Dictyostelium discoideum* lacking the beta subunit: regulation during proliferation and differentiation. *Mol Cell Biochem.*; **118**: 49-60.

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**, 4089-4099.

Pagano, M.A., Andrzejewska, M., Ruzzene, M., Sarno, S., Cesaro, L., Bain, J., Elliott, M., Meggio, F., Kazimierczuk, Z. and Pinna, L.A. (2004). Optimization of protein kinase CK2 inhibitors derived from 4,5,6,7-tetrabromobenzimidazole. *J Med Chem*; **47**: 6239–6247.

- Pepperkok, R., Lorenz, P., Ansorge, W. and Pyerin, W. (1994).** Casein kinase II is required for transition of G0/G1, early G1, and G1/S phases of the cell cycle. *J Biol Chem* ; **269**: 6986-6991.
- Peterson, R.T., Schreiber, S.L. (1999).** Kinase phosphorylation: keeping it all in the family, *Curr. Biol.*, **9**: 521-524.
- Pinna, L.A. (1990).** Casein kinase 2: an 'eminence grise' in cellular regulation? *Biochim Biophys Acta.*; **1054**: 267-284.
- Pinna, L.A. (2002).** Protein kinase CK2: a challenge to canons. *J Cell Sci.*; **115**: 3873-8.
- Pinna, LA, Meggio, F. (1997).** Protein kinase CK2 ("casein kinase-2") and its implication in cell division and proliferation. *Prog Cell Cycle Res.*; **3**: 77-97.
- Rao, L., Perez, D., White, E., 1996.** Lamin proteolysis facilitates nuclear events during apoptosis. *J. Cell. Biol.*; **135**: 1441-1455.
- Rathmell, J.C., Fox, C.J., Plas, D.R., Hammerman, P.S., Cinalli, R.M., Thompson, C.B. (2003).** Akt-directed glucose metabolism can prevent Bax conformation change and promote growth factor-independent survival, *Mol. Cell Biol.*, **23**: 7315-7328.
- Reed, J. C., 1997.** Double identity for proteins of the Bcl-2 family. *Nature*, 387: 773-776.
- Reed, J.C. (1995)** Bcl-2 family proteins: regulators of chemoresistance in cancer. *Toxicol Lett.* **82-83**: 155-158.
related protein kinase expressed in interleukin-2-activated cytotoxic T-cells, epithelial tumor cell lines, and the testes. *J. Biol. Chem.*; **276**: 44003-44011.
- Rena, G., Guo, S., Cichy, S.C., Unterman, T.G., Cohen, P. (1999).** Phosphorylation of the transcription factor forkhead family member FKHR by protein kinase B. *J Biol Chem.*; **274**: 17179-83.
- Rethinaswamy, A., Birnbaum, M.J., Glover, C.V. (1998).** Temperature-sensitive mutations of the CKA1 gene reveal a role for casein kinase II in maintenance of cell polarity in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem.*; **273**: 5869-77.
- Romashkova, J.A. and Makarov, S.S. (1999).** NF-kappaB is a target of AKT in antiapoptotic PDGF signalling. *Nature* **401**: 86– 90.
- Russo, G.L., Vandenberg, M.T., Yu, I.J., Bae, Y.S., Franza, Jr, B.R. and Marshak, D.R. (1992).** Casein kinase II phosphorylates p34cdc2 kinase in G1 phase of the HeLa cell division cycle. *J. Biol. Chem.* **267**, 20317-20325.
- Ruzzene, M., Brunati, A.M., Sarno, S., Marin, O., Donella-Deana, A. and Pinna, L.A., (2000).** Ser/Thr phosphorylation of hematopoietic specific protein 1 (HS1): implication of protein kinase CK2. *Eur. J. Biochem.*; **267**: 3065-3072.
- Ruzzene, M., Penzo, D. and Pinna, L.A. (2002).** Protein kinase CK2 inhibitor 4,5,6,7- tetrabromobenzotriazole (TBB) induces apoptosis and caspase dependent degradation of haematopoietic lineage cell specific protein 1 (HS1) in Jurkat cells. *Biochem. J.*; **364**: 41-47.
- Salvi, M., Sarno, S., Marin, O., Meggio, F., Itarte, E., Pinna, L.A. (2006).** Discrimination between the activity of protein kinase CK2 holoenzyme and its catalytic subunits. *FEBS Lett* **580**: 3948–3952.
- Sarbassov, D.D., Guertin, D.A., Ali, S.M., Sabatini, D.M. (2005).** Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science*; **307**: 1098-1101.
- Sarno, S., Vaglio, P., Meggio, F., Issinger, O. G. and Pinna, L. A. (1996).** Protein kinase CK2 mutants defective in substrate recognition. Purification and kinetic analysis. *J. Biol. Chem.*; **271**: 10595-10601.
- Sarno, S., Marin, O., Boschetti, M., Pagano, M.A., Meggio, F., Pinna, L.A. (2000).** Cooperative modulation of protein kinase CK2 by separate domains of its regulatory beta-subunit. *Biochemistry*; **39**: 12324-12329.

- Sarno, S., Ghisellini, P., Cesaro L., Roberto Battistutta, R. and Pinna, L.A. (2001).** Generation of mutants of CK2 α which are dependent on the β -subunit for catalytic activity *Mol. Cell. Biochem.*; **227**: 13–19.
- Sarno, S., Reddy, H., Meggio, F., Ruzzene, M., Davies, S.P., Donella-Deana, A., Shugar, D., Pinna, L.A. (2001).** Selectivity of 4,5,6,7-tetrabromobenzotriazole, an ATP site-directed inhibitor of protein kinase CK2 ('casein kinase-2'). *FEBS Lett.*; **496**: 44-48.
- Sarno, S., Ghisellini, P., Pinna, L.A. (2002).** Unique activation mechanism of protein kinase CK2. The N-terminal segment is essential for constitutive activity of the catalytic subunit but not of the holoenzyme. *J Biol Chem.*; **277**: 22509-14.
- Sarno, S., Moro, S., Meggio, F., Zagotto, G., Dal Ben, D., Ghisellini, P., Battistutta, R., Zanotti, G., Pinna, L.A. (2002).** Toward the rational design of protein kinase casein kinase-2 inhibitors. *Pharmacol Ther.*; **93**: 159-168.
- Sarno, S., de Moliner, E., Ruzzene, M., Pagano, M.A., Battistutta, R., Bain, J., Fabbro, D., Schoepfer, J., Elliott, M., Furet, P., Meggio, F., Zanotti, G. and Pinna, L.A. (2003).** Biochemical and three-dimensional-structural study of the specific inhibition of protein kinase CK2 by [5-oxo-5,6-dihydroindolo-(1,2-a)quinazolin-7-yl]acetic acid (IQA). *Biochem J.*; **374**: 639-646.
- Sarno, S., Ruzzene, M., Frascella, P., Pagano, M.A., Meggio, F., Zambon, A. Mazzorana, M., Di Maira, G., Lucchini, V., Pinna, L.A. (2005).** Development and exploitation of CK2 inhibitors. *Mol Cell Biochem* **274**: 69–76.
- Sartori, G., Mazzotta, G., Stocchetto, S., Pavanello, A. and Carignani, G., (2000).** Inactivation of six genes from chromosomes VII of *Saccharomyces cerevisiae* and basic phenotypic analysis of the mutant strains. *Yeast* **16**: 255-265.
- Sato, S., Fujita, N. and Tsuruo, T. (2000).** Modulation of Akt kinase activity by binding to Hsp90. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**: 10832–10837.
- Seldin, D.C., Leder, P. (1995).** Casein kinase II alpha transgene-induced murine lymphoma: relation to theileriosis in cattle. *Science*; **267**: 894-7.
- Shimizu, S., Narita, M., Tsujimoto, Y., 1999.** Bcl-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome c by the mitochondrial channel VDAC. *Nature*; **399**: 483-487.
- Snapka, R.M., Gao, H., Grabowski, D.R., Brill, D., Chan, K.K., Li, L., Li, G.C. and Ganapathi, R. (2001)** Cytotoxic mechanism of XK469: resistance of topoisomerase II β knockout cells and inhibition of topoisomerase I. *Biochem Biophys Res Commun.* **280**: 1155-1160.
- Song, D.H., Dominguez, I., Mizuno, J., Kaut, M., Mohr, S.C., Seldin, D.C. (2003).** CK2 phosphorylation of the armadillo repeat region of beta-catenin potentiates Wnt signaling. *J Biol Chem.*; **278**: 24018-25.
- Song, G., Ouyang, G., Bao, S. (2005).** The activation of Akt/PKB signaling pathway and cell survival. *J Cell Mol Med.*; **9**: 59-71.
- Stambolic, V., Suzuki, A., de la Pompa, J.L., Brothers, G.M., Mirtsos, C., Sasaki, T., Ruland, J., Penninger, J.M., Siderovski, D.P. and Mak, T.W. (1998)** Negative regulation of PKB/Akt-dependent cell survival by the tumor suppressor PTEN. *Cell.*; **95**: 29-39.
- Stocchetto, S., Marin, O., Carignani, G. and Pinna, L. A. (1997).** Biochemical evidence that *Saccharomyces cerevisiae* YGR262c gene, required for normal growth, encodes a novel Ser/Thr-specific protein kinase. *FEBS Lett.*; **414**: 171-175.
- Tan, K.B., Mattern, M.R., Eng, W.K., McCabe, F.L. and Johnson, R.K. (1989)** Nonproductive rearrangement of DNA topoisomerase I and II genes: correlation with resistance to topoisomerase inhibitors. *J Natl Cancer Inst.* **81**: 1732-1735.
- Tapia, J.C., Torres, V.A., Rodriguez, D.A., Leyton, L., Quest, A.F. (2006).** Casein kinase 2 (CK2) increases survivin expression via enhanced beta-catenin-T cell factor/lymphoid enhancer binding factor-dependent transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A*; **103**: 15079-84.

Teitz T., Eli D., Penner M., Bakhanashvili, M., Naiman, T., Timme, T.L., Wood, C.M., Moses, R.E. and Canaani, D. (1990). Expression of the cDNA for the beta subunit of human casein kinase II confers partial UV resistance on xeroderma pigmentosum cells. *Mutat. Res.* **236**, 85–97.

Theis-Febvre, N., Filhol, O., Froment, C., Cazales, M., Cochet, C., Monsarrat, B., Ducommun, B. and Baldin, V. (2003). Protein kinase CK2 regulates CDC25B phosphatase activity. *Oncogene*. **22**, 220-232.

Thornberry, N.A., Rano, T.A., Peterson, E. P., Rasper, D.M., Timkey, T., Garcia-Calvo, M., Houtzager, V.M., Nordstrom, P.A., Roy, S., Vaillancourt, J.P., Chapman, K.T., Nicholson, D.W. (1997). A combinatorial approach defines specificities of members of the caspase family and granzyme B. Functional relationships established for key mediators of apoptosis. *J. Biol. Chem.*; **272**: 17907-17911.

Tibbetts, R.S., Brumbaugh, K.M., Williams, J.M., Sarkaria, J.N., Cliby, W.A., Shieh, S.Y., Taya, Y., Prives, C. and Abraham, R.T., (1999). A role for ATR in the DNA damage induced phosphorylation of p53. *Genes Dev.* **13**: 152–157.

Toczyski, D.P., Galgoczy, D.J. and Hartwell, L.H. (1997). CDC5 and CKII control adaptation to the yeast DNA damage checkpoint. *Cell* **90**, 1097-1106.

Torres, J., Rodriguez, J., Myers, M.P., Valiente, M., Graves, J.D., Tonks, N.K. and Pulido, R.. (2003). Phosphorylation-regulated cleavage of the tumor suppressor PTEN by caspase-3: implications for the control of protein stability and PTEN-protein interactions. *J Biol Chem*; **278**: 30652-30660.

Twentyman, P. and Bagnij, T. (1998) The influence of glutathione metabolism on multidrug resistance in MRP-overexpressing cells. *Drug. Res. Update.* **1**: 121-127.

Ubeda, M. and Habener, J.F.(2003). CHOP Transcription Factor Phosphorylation by Casein Kinase 2 Inhibits Transcriptional Activation *J Biol Chem*; **278**: 40514–40520.

Vanhaesebroeck, B. and Waterfield, M. D., (1999). Signaling by distinct classes of phosphoinositide 3-kinase. *Exp. Cell. Res.*; **253**: 239-254.

Venter JC, Adams MD, Myers EW, Li PW, Mural RJ, Sutton GG, Smith HO, Yandell M, Evans CA, Holt RA, Gocayne JD, Amanatides P, Ballew RM, Huson DH, Wortman JR, Zhang Q, Kodira CD, Zheng XH, Chen L, Skupski M, Subramanian G, Thomas PD, Zhang J, Gabor Miklos GL, Nelson C, Broder S, Clark AG, Nadeau J, McKusick VA, Zinder N, Levine AJ, Roberts RJ, Simon M, Slayman C, Hunkapiller M, Bolanos R, Delcher A, Dew I, Fasulo D, Flanigan M, Florea L, Halpern A, Hannenhalli S, Kravitz S, Levy S, Mobarry C, Reinert K, Remington K, Abu-Threideh J, Beasley E, Biddick K, Bonazzi V, Brandon R, Cargill M, Chandramouliswaran I, Charlab R, Chaturvedi K, Deng Z, Di Francesco V, Dunn P, Eilbeck K, Evangelista C, Gabrielian AE, Gan W, Ge W, Gong F, Gu Z, Guan P, Heiman TJ, Higgins ME, Ji RR, Ke Z, Ketchum KA, Lai Z, Lei Y, Li Z, Li J, Liang Y, Lin X, Lu F, Merkulov GV, Milshina N, Moore HM, Naik AK, Narayan VA, Neelam B, Nusskern D, Rusch DB, Salzberg S, Shao W, Shue B, Sun J, Wang Z, Wang A, Wang X, Wang J, Wei M, Wides R, Xiao C, Yan C, Yao A, Ye J, Zhan M, Zhang W, Zhang H, Zhao Q, Zheng L, Zhong F, Zhong W, Zhu S, Zhao S, Gilbert D, Baumhueter S, Spier G, Carter C, Cravchik A, Woodage T, Ali F, An H, Awe A, Baldwin D, Baden H, Barnstead M, Barrow I, Beeson K, Busam D, Carver A, Center A, Cheng ML, Curry L, Danaher S, Davenport L, Desilets R, Dietz S, Dodson K, Doup L, Ferriera S, Garg N, Gluecksmann A, Hart B, Haynes J, Haynes C, Heiner C, Hladun S, Hostin D, Houck J, Howland T, Ibegwam C, Johnson J, Kalush F, Kline L, Koduru S, Love A, Mann F, May D, McCawley S, McIntosh T, McMullen I, Moy M, Moy L, Murphy B, Nelson K, Pfannkoch C, Pratts E, Puri V, Qureshi H, Reardon M, Rodriguez R, Rogers YH, Romblad D, Ruhfel B, Scott R, Sitter C, Smallwood M, Stewart E, Strong R, Suh E, Thomas R, Tint NN, Tse S, Vech C, Wang G, Wetter J, Williams S, Williams M, Windsor S, Winn-Deen E, Wolfe K, Zaveri J, Zaveri K, Abril JF, Guigó R, Campbell MJ, Sjolander KV, Karlak B, Kejariwal A, Mi H, Lazareva B, Hatton T, Narechania A, Diemer K, Muruganujan A, Guo N, Sato S, Bafna V, Istrail S, Lippert R, Schwartz R, Walenz B, Yooseph S, Allen D, Basu A, Baxendale J, Blick L, Caminha M, Carnes-Stine J, Caulk P, Chiang YH, Coyne M, Dahlke C, Mays A, Dombroski M, Donnelly M, Ely D, Esparham S, Fosler C, Gire H, Glanowski S, Glasser K, Glodek A, Gorokhov M, Graham K, Gropman B, Harris M, Heil J, Henderson S, Hoover J, Jennings D, Jordan C, Jordan J, Kasha J, Kagan L, Kraft C, Levitsky A, Lewis M, Liu X, Lopez J, Ma D, Majoros W, McDaniel J, Murphy S, Newman M, Nguyen T, Nguyen N, Nodell M, Pan S, Peck J, Peterson M, Rowe W, Sanders R, Scott J, Simpson M, Smith T, Sprague A, Stockwell T, Turner R, Venter E, Wang M, Wen M, Wu D, Wu M, Xia A, Zandieh A, Zhu X. The sequence of the human genome. *Science*; **291**: 1304-51.

- Vivanco, I. and Sawyers, C.L. (1999).** The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer. *Nat Rev Cancer* **2**: 489–501.
- Voit, R., Kuhn, A., Sander, E. E., Grummt, I., (1995).** Activation of mammalian ribosomal gene transcription requires phosphorylation of the nucleolar transcription factor UBF. *Nucleic Acids Res.*; **23**: 2593-2598.
- Wang, D., Westerheide, S.D., Hanson, J.L. and Baldwin, A.S. (2000).** Tumor necrosis factor alpha-induced phosphorylation of RelA/p65 on Ser259 is controlled by casein kinase II. *J. Biol. Chem.* **275**, 32592-32597.
- Wang, H., Davis, A., Yu, S. and Ahmed, K. (2001).** Response of cancer cells to molecular interruption of the CK2 signal. *Mol Cell Biochem*; **227**: 167-174.
- Wang, J.M., Chao, J.R., Chen, W., Kuo, M.L., Yen, J.J., Yang-Yen, H.F. (1999).** The antiapoptotic gene mcl-1 is up-regulated by the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway through a transcription factor complex containing CREB. *Mol Cell Biol.*; **19**: 6195-206.
- Willert, K., Brink, M., Wodarz, A., Varmus, H., Nusse, R. (1997).** Casein kinase 2 associates with and phosphorylates dishevelled. *EMBO J.*; **16**: 3089-96.
- Winter, B., Kautzner, I., Issinger, O.G., Arnold, H.G., (1997).** Two putative protein kinase CK2 phosphorylation sites are important for Myf-5 activity. *Biol. Chem.*; **378**: 1445-1456.
- Xu, X., Toselli, P.A., Russell, L.D., Seldin, D.C. (1999).** Globozoospermia in mice lacking the casein kinase II α' catalytic subunit. *Nat Genet* ; **23**: 118-121.
- Yamane, K. and Kinsella, T.J. (2005).** Casein kinase 2 regulates both apoptosis and the cell cycle following DNA damage induced by 6-thioguanine. *Clin Cancer Res.*; **11**: 2355-2363.
- Yan, T.F., Tao, M. (1982).** Studies on an endogenous substrate of wheat germ protein kinase. *J Biol Chem.*; **257**: 7044-9.
- Yang, J., Cron, P., Thompson, V., Good, V.M., Hess, D., Hemmings, B.A., Barford, D. (2002).** Molecular mechanism for the regulation of protein kinase B/Akt by hydrophobic motif phosphorylation. *Mol. Cell.*; **9**: 1227-1240.
- Yao, R. and Cooper, G.M., (1995).** Requirement for phosphatidylinositol-3 kinase in the prevention of apoptosis by nerve growth factor, *Science*; **267**: 2003-2006.
- Yin, X., Gu, S. and Jiang, J.X. (2001).** Regulation of lens connexin 45.6 by apoptotic protease, caspase-3. *Cell Adhesion Commun.*; **8**: 373-376.
- Zhang, C., Vilks, G., Canton, D. A. and Litchfield, D. W. (2002).** Phosphorylation regulates the stability of the regulatory CK2beta subunit. *Oncogene* **21**; 3754-3764
- Zheng, W.H., Kar, S., Quirion, R. (2000).** Insulin-like growth factor-1-induced phosphorylation of the forkhead family transcription factor FKHRL1 is mediated by Akt kinase in PC12 cells. *J Biol Chem.*; **275**: 39152-8.
- Zinszner, H., Kuroda, M., Wang, X., Batchvarova, N., Lightfoot, R. T., Remotti, H., Stevens, J. L., and Ron, D. (1998).** CHOP is implicated in programmed cell death in response to impaired function of the endoplasmic reticulum. *Genes Dev.*; **12**: 982–995.

PUBBLICAZIONI

Protein kinase CK2 phosphorylates and upregulates Akt/PKB

G Di Maira^{1,2}, M Salvi^{1,2}, G Arrigoni^{1,2}, O Marin^{1,2}, S Sarno^{1,2},
 F Brustolon^{1,2}, LA Pinna^{1,2} and M Ruzzene^{*,1,2}

¹ Venetian Institute of Molecular Medicine (VIMM), University of Padova,
 Padova, Italy;

² Department of Biological Chemistry, University of Padova, Padova, Italy

* Corresponding author: M Ruzzene, Department of Biological Chemistry,
 University of Padova, V.le G. Colombo, 3 – 35121 Padova, Italy.

Tel: + 39-049-8276112; Fax: + 39-049-8073310;

E-mail: maria.ruzzene@unipd.it

Received 22.7.04; revised 21.12.04; accepted 28.1.05; published online 01.4.05
 Edited by JA Trapani

Abstract

Treatment of Jurkat cells with specific inhibitors of protein kinase CK2 induces apoptosis. Here we provide evidence that the antiapoptotic effect of CK2 can be at least partially mediated by upregulation of the Akt/PKB pathway. Such a conclusion is based on the following observations: (1) inhibition of CK2 by cell treatment with two structurally unrelated CK2 inhibitors induces downregulation of Akt/PKB, as judged from decreased phosphorylation of its physiological targets, and immunoprecipitate kinase assay; (2) similar results are observed upon reduction of CK2 catalytic subunit by the RNA-interference technique; (3) Akt/PKB Ser129 is phosphorylated by CK2 *in vitro* and *in vivo*; (4) such a phosphorylation of activated Akt/PKB correlates with a further increase in catalytic activity. These data disclose an unanticipated mechanism by which constitutive phosphorylation by CK2 may be required for maximal activation of Akt/PKB. *Cell Death and Differentiation* (2005) 12, 668–677.

doi:10.1038/sj.cdd.4401604

Published online 1 April 2005

Keywords: CK2; casein kinase 2; CKII; inhibitors; Akt; protein kinase B

Abbreviations: CK2, casein kinase 2; GSK3, glycogen synthase kinase 3; IQA, 5-oxo-5,6-dihydroindolo-(1,2-a)quinazolin-7-yl]acetic acid; MALDI, matrix-assisted laser desorption and ionization; MS/MS, tandem mass spectrometry; PDK1, 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1; PH, pleckstrin homology; PI3-kinase, phosphatidylinositol 3-kinase; PKB, protein kinase B (Akt); PTEN, phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten; RNAi, RNA interference; SGK, serum- and glucocorticoid-induced kinase; siRNA, short interfering RNA; TBB, 4,5,6,7-tetrabromobenzotriazole; WB, Western blot; w.t., wild type

Introduction

CK2, an acronym derived from the misnomer ‘casein kinase 2’, denotes a ubiquitous, essential and constitutively active

protein kinase affecting phosphoacceptor sites that are specified by numerous acidic residues (either Glu/Asp or phosphorylated aminoacids), among which the one at position n + 3 plays the most crucial role.¹

The high basal activity of the catalytic subunits (α and/or α') of CK2, either alone or in combination with a dimeric regulatory β -subunit to give an heterotetrameric holoenzyme, may reflect the striking pleiotropy of this kinase, whose present repertoire of substrates includes >300 proteins.¹ These are implicated in a wide variety of cellular functions, including global processes as well as signaling pathways, a circumstance that could account for the requirement of active CK2 both in quiescent and in stimulated cells.

CK2 is invariably elevated in tumors as compared to normal tissues (reviewed in Guerra and Issinger² and Tawfic *et al.*³) and unscheduled expression of its catalytic subunits is causative of transformation, especially under conditions that also alter the expression of oncogenes and tumor suppressor genes.^{4–6} Evidence has recently been accumulating that CK2 plays a prominent role in ensuring cell survival^{7,8} (and reviewed in Litchfield⁹) by counteracting apoptosis,^{10,11} a behavior which may account, at least in part, for its oncogenic potential. The mechanism(s), however, by which CK2 exerts its antiapoptotic role remain largely unexplored.

Evidence for the antiapoptotic role of CK2 has been obtained in LNCaP prostate cancer cells¹⁰ and in leukemia Jurkat T cells,¹¹ both lacking the phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten (PTEN) protein^{12,13} which removes phosphate from the D3 position of inositol phospholipids, and which is also one of the numerous substrates of CK2.¹⁴ Lack of PTEN maintains the phosphatidylinositol 3-kinase (PI3-kinase) pathway in a constitutively active state. Therefore, in both LNCaP and Jurkat cell lines, as in many leukemias and lymphomas where PTEN is also absent, protein kinase Akt (also known as PKB), whose activation is promoted by the 3'-phosphoinositide-dependent kinase-1 (PDK1), is constitutively upregulated (for reviews on Akt/PKB see Hanada *et al.*,¹⁵ Scheid and Woodgett,¹⁶ and Nicholson and Anderson¹⁷). Akt exerts important antiapoptotic features, a property which is supposed to contribute to the tumor phenotype of PTEN-null cell lines.¹⁸

Interestingly, apoptosis of Jurkat cells can be promoted by two structurally unrelated specific inhibitors of CK2, which are inactive on either Akt or PDK1.^{19,20} This means that either CK2 operates through a pathway which is independent of Akt, or it can induce a hyperactivation of Akt beyond the level of constitutive activity displayed by this kinase in Jurkat and other PTEN-null cells.

To discriminate between these possibilities and to gain information about the apoptotic signaling pathways that might be affected by CK2, we have investigated the consequences of attenuating CK2 activity on the activity of Akt.

Here we provide evidence that *in vitro* and *in vivo* Akt is phosphorylated by CK2 at Ser129, with a concomitant increase in catalytic activity, thus disclosing the possibility

that constitutive phosphorylation by CK2 is required for full activation of Akt.

Results

CK2 inhibitors induce downregulation of Akt

In order to gain information about the mechanism by which CK2 exerts its antiapoptotic potential, we checked whether treatment of Jurkat cells with two selective inhibitors of CK2, 4,5,6,7-tetrabromobenzotriazole (TBB) and 5-oxo-5,6-dihydroindolo-(1,2-a)quinazolin-7-yl]acetic acid (IQA), had any effect on endogenous Akt activity. For this purpose, the phosphorylation level of Akt-specific targets was determined using phospho-specific antibodies. As a positive control for Akt inhibition, we treated cells with LY294002, a well-known inhibitor of PI3-kinase. Under our conditions, while LY294002 was totally ineffective on CK2 endogenous activity, both TBB and IQA markedly inhibited CK2 (^{11,20} and Figure 1a), and, as expected,^{11,20} induced cell death by apoptosis, as monitored by MTT viability assay (not shown) and by the cleavage of the caspase substrate PARP (Figure 1b). As far as the Akt signaling pathway is concerned, treatment of Jurkat cells with both CK2 inhibitors resulted in a marked drop in the phosphorylation level of GSK3 β Ser9, FKHR Ser256, and AFX Ser193 (Figure 1c). Note that phosphorylation of PDK1, the upstream kinase responsible for canonical Akt regulation, is not altered by either TBB or IQA. Consequently, also phosphorylation of Akt Thr308, which is specifically targeted by PDK1, is only marginally reduced. A weak inhibition of Ser473 phosphorylation is also observed; this is negligible as compared to that promoted by the PI3-kinase inhibitor LY294002, and therefore not sufficient to justify the reduction of Akt activity monitored by the drop in substrate phosphorylation. Figure 1c also shows that the total amount of Akt and glycogen synthase kinase 3 (GSK3) proteins was not affected by the treatments.

We also measured directly the activity of Akt towards a synthetic peptide in an immunoprecipitate kinase assay, after cell incubation with the CK2 inhibitors. As shown in Figure 2, the catalytic activity of Akt was significantly reduced by treatments with both inhibitors, IQA and TBB, under conditions where comparable amounts of enzyme were present in the immunoprecipitates.

Decreased levels of CK2 catalytic subunit correlate with inactivation of Akt

In order to make sure that the detrimental effect of CK2 inhibitors on the activity of Akt was really mediated by blockage of CK2, rather than of other kinases, advantage has been taken of the RNA interference (RNAi) technique to achieve a nonpharmacological and strictly selective decrease in endogenous CK2 catalytic activity. LNCaP cells were used for these experiments (given the availability of simpler protocols to trigger RNA interference in adherent than in suspension cells). Similar to Jurkat, LNCaP cells are PTEN-null and therefore Akt is constitutively activated. As shown in Figure 3a, the approach proved successful for diminishing the level of expression of CK2 α catalytic subunit to about 39%.

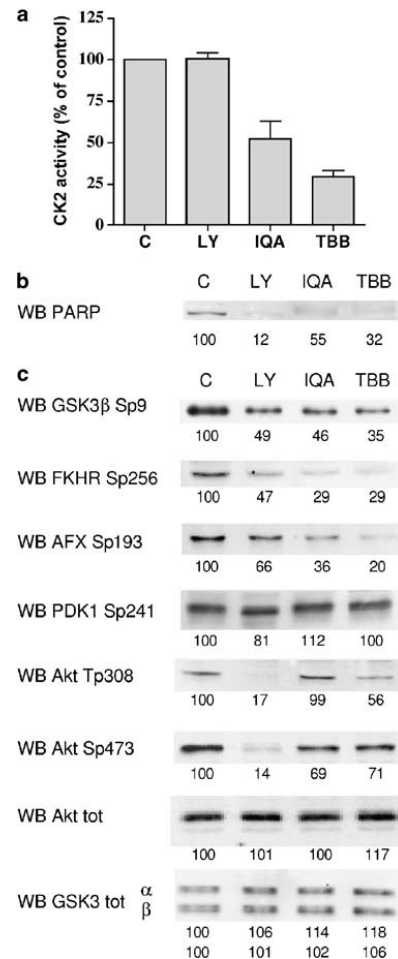


Figure 1 Downregulation of Akt pathway by CK2 inhibitors in Jurkat cells. Jurkat cells were treated for 4 h with CK2 inhibitors, as indicated. IQA was 40 μ M, TBB was 25 μ M. Where shown (LY), the PI3-kinase inhibitor LY294002 (25 μ M) was used as a control for Akt downregulation. (a) Activity of CK2 in cell lysates was measured towards the CK2-specific peptide substrate (bar graphs, mean values ($\pm$ S.D.) of three determinations). In all, 100% CK2 activity was assigned to lysate from control cells (C, 0.15 pmol/min/ μ g protein). (c and b) 5 μ g (in the case of anti-Akt Sp473) or 20 μ g (for all the other antibodies) of total lysate proteins were analyzed by Western blot (WB) with the indicated antibodies. Band quantitation was obtained on a Kodak Image Station 440CF by analysis with the Kodak 1D Image software, and the values are reported below each band, assigning the value of 100 to the control cells (C)

This reduction results, as expected, in a substantial drop in CK2 catalytic activity (of about 36%). As shown in Figure 3b, the knock down of the CK2 catalytic subunit is accompanied by a substantial reduction of Akt activity, as judged by immunoprecipitate kinase assay, or by the dephosphorylation degree of the endogenous targets GSK3 β Ser9 and FKHR Ser256. Under these conditions, the GSK3 and Akt protein amounts were not affected, nor the Akt phosphorylation state

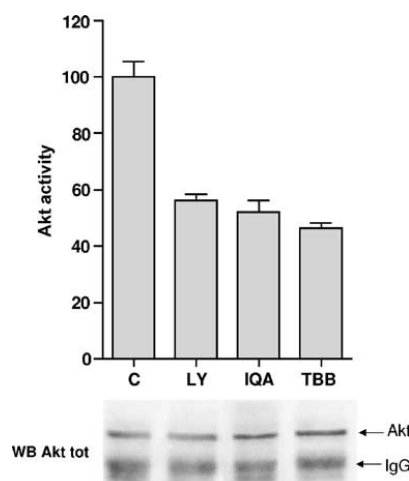


Figure 2 Akt immunoprecipitate kinase assay from Jurkat cells treated with CK2 inhibitors. Jurkat cells were treated for 4 h with CK2 inhibitors, as indicated. IQA was 40 μ M, TBB was 25 μ M. Where shown (LY), the PI3-kinase inhibitor LY294002 (25 μ M) was used as a control for Akt downregulation. Akt was immunoprecipitated from the cell lysate, and its activity was measured towards a peptide substrate, by incubation for 30 min in the presence of a radioactive phosphorylation mixture, as described in Materials and Methods; the radioactivity incorporated is reported as arbitrary units, assigning an activity of 100 to Akt immunoprecipitated from control cells (C). Mean values ($\pm$ S.D.) from two separate experiments are shown. The amount of total Akt in each immunoprecipitate was monitored by Western blot, as shown in the bottom part of the figure

was significantly altered (not shown). This indicates that Akt activity is effectively downregulated in cells treated with short interfering RNA (siRNA) against CK2 catalytic subunit.

CK2 phosphorylates and activates Akt *in vitro*

The residues whose phosphorylation is known to be most responsible for Akt activation are Thr308 (in the activation loop) and Ser473 (in the hydrophobic domain outside the catalytic domain). The former is phosphorylated by PDK1,²¹ while Ser473 phosphorylation is still a matter of debate, one possibility being that this may occur autocatalytically. In any event, neither Ser473 nor Thr308 display the consensus required for CK2 phosphorylation, not to say that in PTEN-null cells both these residues are expected to be constitutively phosphorylated, irrespective of CK2. Akt includes, on the other hand, a few residues that display the consensus sequence for CK2-mediated phosphorylation, and we wanted to see if the *in vivo* activation of Akt by CK2 activity might be due, at least in part, to direct phosphorylation of Akt by CK2. To check this possibility, a number of *in vitro* experiments were performed where variably phosphorylated forms of Akt were subjected to phosphorylation by CK2. The results are shown in Figure 4. It can be seen that both an active form of Akt, previously phosphorylated at both Ser473 and Thr308, and an inactive unphosphorylated form are readily phosphorylated by the CK2 holoenzyme, and, even more, by CK2 α (compare lanes 2 and 5 with lanes 3 and 6, respectively).

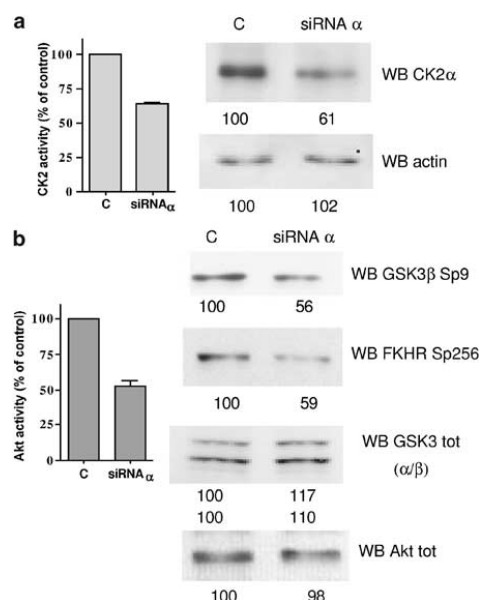


Figure 3 Knock down of CK2 by the RNA interference technique and effect on Akt signaling. LNCaP cells were treated for 72 h with siRNA sequences targeting CK2 α . When Western blot experiments are shown, band quantitation is reported below each band, assigning the value of 100 to control cells (C), treated with non silencing siRNA. (a) The bar graph shows the activity of CK2 in cell lysates, measured towards the CK2-specific peptide substrate (mean values ($\pm$ S.D.) of two determinations). 100% CK2 activity was assigned to lysate from control cells. The right part of the figure shows the Western blot (10 μ g of total proteins) with anti-CK2 α specific antibodies or antiactin, for normalization. (b) The bar graph shows the activity of Akt, measured towards a peptide substrate, after immunoprecipitation from cell lysates (mean values ($\pm$ S.D.) of two determinations). In all, 100% Akt activity was assigned to the Akt immunoprecipitated from control cells. The right part of the figure shows the Western blot (10 μ g of total proteins) with the indicated antibodies

Interestingly, three related kinases with remarkable similarity to Akt, but lacking consensus sequences for CK2, serum- and glucocorticoid-induced kinase (SGK)-1, 2 and 3, are not phosphorylated by CK2 to any appreciable extent (not shown).

We wondered whether phosphorylation by CK2 might have any effect on Akt activity. We therefore performed experiments in which the activity of Akt, incubated or not with CK2 and Mg/ATP, was determined using either a peptide (Figure 5a) or a protein (Figure 5b) substrate, containing the consensus for Akt (R/K-x-R/K-x-x-S/T) but not for CK2. The results demonstrate that CK2 promotes a ~2-fold hyperactivation of active Akt and that this effect is mediated by phosphorylation, as it is suppressed by the CK2-specific inhibitor TBB.

In the absence of previous phosphorylation at Thr308 and Ser473, Akt activity was undetectable with the peptide/protein substrates used, either before or after phosphorylation by CK2 (not shown); however, a weak signal was detected using the anti-phospho-Ser473 antibodies, and this was significantly

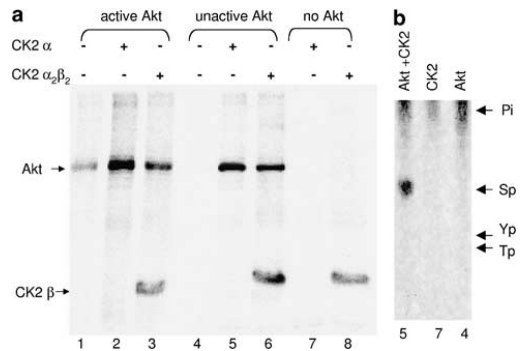


Figure 4 *In vitro* phosphorylation of Akt by CK2. Incubations were performed for 20 min in the presence of radioactive phosphorylation mixture (see Materials and Methods), with the indicated protein kinases. In all, 0.2 μ g of active or inactive Akt1 was used. Under the conditions used, the CK2 α (0.1 μ g) or CK2 $\alpha_2\beta_2$ (0.02 μ g) amounts were equally active towards casein substrate (not shown). (a) An autoradiography is shown of phospho-proteins resolved on SDS/PAGE. Autophosphorylation of CK2 β subunit is also visible. Stoichiometry of Akt1 phosphorylation was about 0.2 mol phosphate/mol protein. (b) Autoradiography of the high-voltage paper electrophoresis for the identification of the phospho-amino acid. Samples from lanes 4, 5, and 7 of panel a were hydrolyzed in 6 N HCl, and subjected to high-voltage paper electrophoresis, as described in Material and Methods, for the identification of the phospho-amino acid. An autoradiography of the paper is shown. The position of orthophosphate (Pi) and phospho-amino acids (Sp, Yp, and Tp), determined by cold standard migration, is indicated by the arrows

increased by CK2 (Figure 5c). Since the Ser473 site is not affected by CK2 (see below), this finding must reflect a CK2-induced stimulation of Akt autophosphorylation activity.

Ser129 is the major target for CK2 in Akt

Akt1 contains six residues that fulfill the consensus sequence for CK2 (S/T-x-x-E/D), namely Thr92, Ser129, Thr146, Thr165, Ser259, and Ser431. All of these, with the exception of Ser129, are 'poor' phosphoacceptor sites, for having no additional acidic residues in the proximity of the target amino acids, a part from the one at position $n+3$.¹ Conversely, Ser129 can be classified as a good CK2 target for having acidic residues at positions $n+3$, $+4$, $+6$, and -2 . Moreover, once phosphorylated it could prime the phosphorylation of Ser126.

Phosphorylation of threonyl residues was ruled out by phosphoaminoacid analysis showing that only phosphoserine could be isolated from Akt1 phosphoradiolabeled by CK2 (Figure 4b).

In order to identify the seryl residue(s) phosphorylated by CK2, recombinant Akt1 previously phosphorylated *in vitro* by CK2 was subjected to SDS/PAGE and its band was digested with trypsin in gel and analyzed by matrix-assisted laser desorption and ionization (MALDI) mass spectrometry. As shown in Figure 6a, a peptide with a molecular weight compatible with the tryptic fragment [122–142] (2119.83 Da) was detected together with its possible monophosphorylated form (2199.83 Da). To prove that the peptide with the higher molecular mass was actually due to a phosphorylation of the

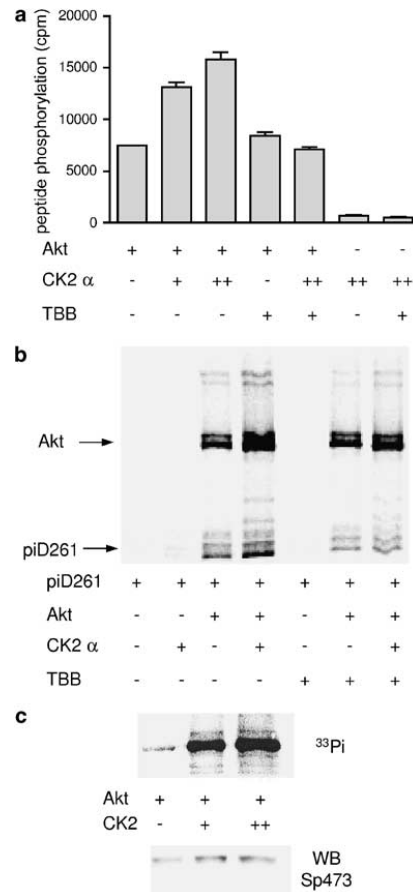


Figure 5 Effect of CK2 on the activity of Akt *in vitro*. (a) Active Akt (0.2 μ g) was incubated for 20 min with radioactive phosphorylation mixture in the absence (–) or in the presence of 0.05 μ g (+) or 0.1 μ g (++) CK2 α . Where indicated, TBB was present at 1 μ M concentration. Akt activity measured towards a peptide substrate is shown as cpm incorporated (mean values $\pm$ S.D.) from three separate experiments. (b) Active Akt (0.2 μ g) was incubated as described for panel a, but its activity was evaluated towards the protein substrate piD261 (0.1 μ g); an autoradiography is shown of phospho-proteins resolved on SDS/PAGE. (c) Inactive Akt (0.2 μ g) was incubated for 20 min with radioactive phosphorylation mixture in the absence (–) or in the presence of 0.05 μ g (+) or 0.1 μ g (++) CK2 α ; the incorporated radioactivity is shown in the upper part, while the degree of Ser473 phosphorylation detected by Western blot with the phospho-specific antibody is shown in the bottom part

peptide [122–142], the sample was chemically dephosphorylated and analyzed again by MALDI mass spectrometry. As shown in Figure 6b, the peak underwent the 98 Da shift expected for β -elimination of phosphate from seryl/threonyl residue. The [122–142] sequence includes the best potential CK2 site (Ser129) together with other four seryl residues. In order to determine the exact phosphorylation site, a tandem mass spectrometry (MS/MS) spectrum of the phosphopeptide

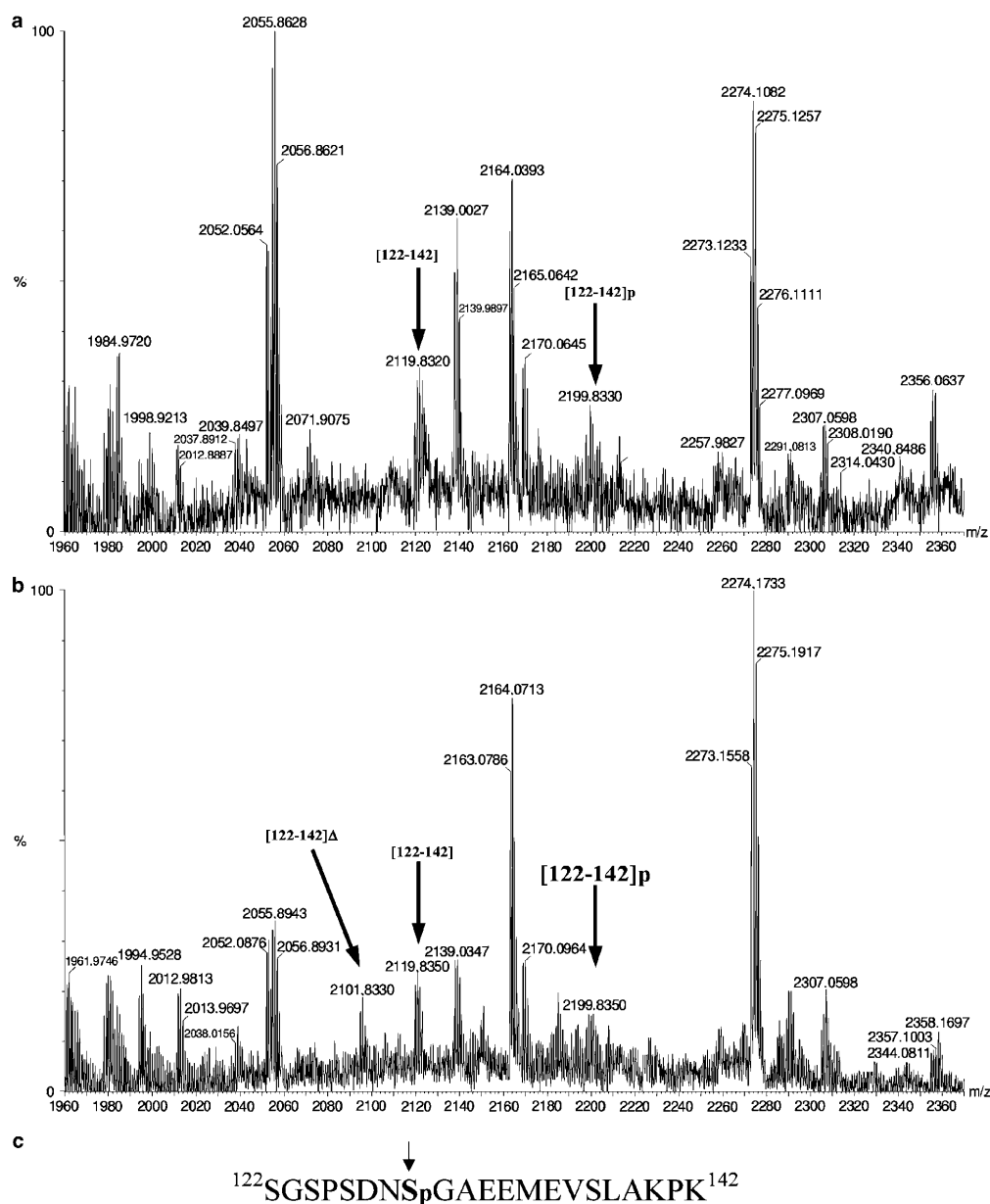


Figure 6 Identification of the CK2 phosphorylation site on Akt. **(a)** Portion of the MALDI spectrum of Akt1 phosphorylated by CK2 and digested with trypsin as described in Materials and Methods. The peaks corresponding to the tryptic peptide [122–142] (2119.83 Da) and its phosphorylated form [122–142]p (2199.8 Da) are indicated. **(b)** The same portion of the spectrum of panel (a), after treating the sample with Ba(OH)₂. A new peak, indicated as [122–142]Δ (2101.83 Da), is now evident: it corresponds to the chemically dephosphorylated [122–142] peptide, having a mass shift of 98 Da with respect to the phosphorylated product, due to the β-elimination of the phosphate group. **(c)** Sequence of human Akt1 [122–142]. Ser129, target of CK2, is indicated

[122–142] was acquired (not shown). The manual interpretation of the spectrum allowed us to identify Ser129 as the phosphorylated residue.

To confirm the identification of Ser129 as the major target for CK2 in Akt1, we mutated this serine to alanine, and overexpressed both the mutant S129A Akt and the wild-type

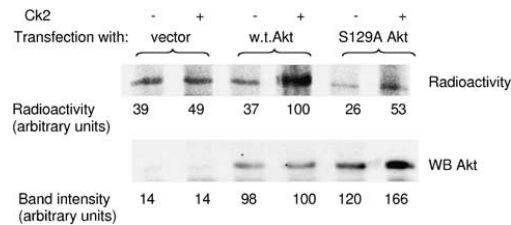


Figure 7 Impaired phosphorylation of the Ser129 Akt mutant by CK2. HEK 293T cells were transfected with vector alone, w.t. Akt, or S129A Akt mutant, as indicated. Akt was immunoprecipitated from cell lysates, then incubated in the presence of radioactive phosphorylation mixture, with the addition of 0.1 μ g of CK2 α , where indicated (+). Samples were then loaded on SDS/PAGE followed by blotting, and analyzed by autoradiography (a) or Western blot with anti-Akt antibodies (b). The values reported below each band represent the radioactivity (a), or the intensity of the ECL-developed band (b), and are expressed in arbitrary units

(w.t.) Akt in the highly transfectable HEK 293T cell line, reaching a very similar overexpression level in both cases (not shown). We performed experiments where equal amounts of w.t. Akt and S129A Akt were immunoprecipitated and used as substrates for recombinant CK2 in an *in vitro* phosphorylation assay. As shown in Figure 7, while w.t. Akt, as expected, was readily phosphorylated by CK2, the phosphorylation of the S129A mutant was severely impaired.

Ser129 is phosphorylated *in vivo*

To assess if Ser129 of Akt is phosphorylated in cells, we developed phospho-specific antibodies towards a synthetic phospho-peptide corresponding to amino-acid residues [121–140] of human Akt1 sequence, and containing phospho-Ser129. The antibodies were first checked in Western blot experiments with the recombinant Akt, phosphorylated or not by CK2 *in vitro*. The results, shown in Figure 8a, highlight the specificity of the antibodies towards the phosphorylated form, thus confirming the identification of Ser129 as the target site for CK2 *in vitro*. When Jurkat cell lysates were analyzed with these antibodies, a weak signal was detected, which became lower in cells treated with TBB (Figure 8b). The response evoked in Western blot by the phospho-Ser129 antibodies was obviously stronger in HEK 293 T cells transfected with w.t. Akt (Figure 8b); also in this case the signal was significantly decreased by TBB treatment of the cells, while it was absent in cells where the S129A Akt mutant was transfected. In contrast, the signal evoked by an antibody raised against the same region but with nonphosphorylated Ser129 was unchanged.

Parallel experiments were performed by mass spectrometry analysis of the Akt band immunoprecipitated from cells transfected with w.t. Akt: the gel band was treated as described in the Material and Methods section for the in-gel tryptic digestion and analyzed by mass spectrometry. The presence of a phosphorylated form of the peptide [122–142] was confirmed acquiring MALDI MS spectra of the tryptic digest. Again, the acquisition of MS/MS spectra allowed us to confirm the presence of Ser129 as a phosphorylated residue (data not shown).

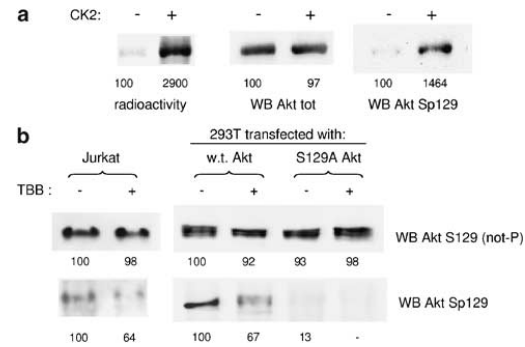


Figure 8 Evidence for Akt Ser129 phosphorylation *in vivo*. (a) Active Akt (0.05 μ g) was incubated for 20 min with radioactive phosphorylation mixture in the absence (–) or in the presence (+) of 0.02 μ g CK2 α . The radioactivity detected by autoradiography, or the signal obtained by Western blot with specific antibodies, are shown, as indicated. (b) Lysates from Jurkat cells or from HEK 293T cells (transfected with w.t. Akt, or S129A Akt mutant) were analyzed by Western blot with the indicated antibodies. In all, 40 or 10 μ g of total proteins was loaded, in the case of Jurkat or HEK 293T cells, respectively. Where indicated, TBB (50 μ M) cell treatment was performed during the last 3 h before cell lysis. Quantitation of the bands is reported below each band, expressed in arbitrary units, assigning 100 to not treated Jurkat cells, and to not treated 293T cells transfected with w.t. Akt

Since HEK 293T cells do express significant amounts of CK2 (not shown), and considering the decrease of Ser129 phosphorylation observed upon inhibition of CK2 (Figure 8b), we conclude that the w.t. Akt overexpressed from 293 T-cell lysate is phosphorylated at Ser129 *in vivo* by CK2, although, probably, not stoichiometrically, since it can be further phosphorylated by CK2 *in vitro* at the same site (see above, Figure 7).

The *in vivo* activity of the S129A Akt mutant is impaired

Next we wanted to test if the activity of Akt overexpressed in HEK 293 T cells was impaired by the mutation of Ser129 to Ala. To this purpose, we immunoprecipitated w.t. and S129A Akt and tested their activity towards the Akt peptide substrate. We found that the activity of S129A Akt mutant is markedly reduced, compared to the w.t. enzyme (Figure 9). We also analyzed by Western blot the *in vivo* phosphorylation state of the Akt substrate GSK3 β , and of Thr308 and Ser473 of Akt itself, in cells transfected with either w.t. or S129A Akt. We observed a significant reduction of GSK3 phosphorylation in cells transfected with the mutant (Figure 9b). The mutation of Ser129 to Ala also promoted a slight decrease of Ser473 and Thr308 phosphorylation, not sufficient *per se* to justify the drop in Akt activity.

Discussion

The data presented disclose a novel functional connection between CK2 and Akt, by showing that, in living cells, downregulation of CK2 catalytic activity or mutation of the

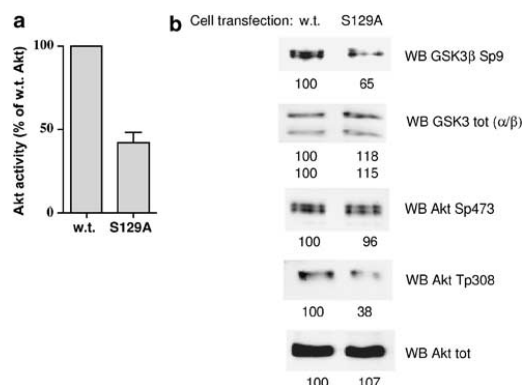


Figure 9 Akt activity in cells transfected with w.t. Akt or Ser129 Akt mutant. HEK 293T cells were transfected with w.t. Akt or S129A Akt mutant, as indicated. (a) Akt was immunoprecipitated from cell lysates, and its activity was measured towards a peptide substrate, by incubation for 30 min in the presence of a radioactive phosphorylation mixture. The peptide phosphorylation is reported as arbitrary units, assigning an activity of 100 to Akt immunoprecipitated from cells transfected with w.t. Akt. Mean values ($\pm$ S.D.) from two separate experiments are shown. (b) In all, 5 μ g (in the case of anti-Akt Sp473) or 20 μ g (for all the other antibodies) of total lysate proteins was analysed by Western blot (WB) with the indicated antibodies. Band quantitation (arbitrary units, assigning 100 to the signal from cells transfected with w.t. Akt) is reported below each band

CK2-dependent site in Akt correlates with decreased Akt activity, as judged from reduced *in vivo* phosphorylation of typical Akt targets, and from immunoprecipitate kinase assay.

These data are remarkable inasmuch as they were obtained with PTEN-null cells (either Jurkat or LNCaP) where Akt is already constitutively active and where the possibility is ruled out that CK2 might operate through PTEN, whose *in vitro* and *in vivo* phosphorylation by CK2 has been reported previously.¹⁴ Also note, in this respect, that the CK2 inhibitors used in this study are ineffective on all isoforms of PI3-kinase²⁰ (and unpublished), and they do not affect the activation state of PDK1, supporting the view that CK2 does not impinge on upstream events leading to Akt activation. A direct effect of CK2 on Akt is actually supported by *in vitro* experiments showing that Akt can be phosphorylated by CK2 with an increase in catalytic activity. Such a stimulation of activity by CK2 could be even more pronounced than it appears from our experiments (Figure 5), considering that *in vitro* phosphorylation is understoichiometric (see legend of Figure 4).

As expected, CK2 does not phosphorylate Akt at the residues previously reported to trigger Akt activation, notably Thr308 and Ser473, neither of which displays the consensus for CK2. In contrast, CK2 phosphorylates Ser129, a residue located in the linker region between the pleckstrin homology (PH) and the catalytic domains. Ser129 displays the features of a primary target for CK2 (for having an acidic residue at position n+3), and its actual phosphorylation has been documented by MS/MS analysis. Ser129 has also been confirmed as the major CK2 target in Akt by its mutation to alanine, which generates a form almost completely unaffected by CK2. Once phosphorylated, Ser129 may trigger the subsequent phosphorylation of Ser126, with a hierarchical mechanism found in several CK2 sites.¹ Consequently,

mutation of Ser129 would also abrogate Ser126 phosphorylation. It can be concluded, therefore, that phosphorylation of Akt at Ser129 (and possibly Ser126) is responsible for hyperactivation of Akt by CK2. Note that Ser129 is conserved in both Akt1 and Akt2. It is not conserved, however, in the related protein kinases SGK, which are not phosphorylated *in vitro* by CK2.

An *in vivo* role of CK2-mediated phosphorylation of Akt is strongly supported by data obtained with cells transfected with w.t. or S129A mutant Akt, where the Ser129 phosphorylation is shown to occur in living cells and to correlate with increased activity of Akt.

Pertinent to this may be also the finding that Akt overexpressed in 293 cells contained phosphate constitutively present in the peptide [122–140];²² interestingly, this peptide eluted as a doublet from C18 chromatography, suggesting the presence of multiple phosphorylated forms; indeed, besides the major phospho-aminoacid, identified as Ser124, a weak signal at Ser129 was also reported. While CK2 phosphorylates equally well *in vitro* either inactive or activated Akt1, its favorable effect on activity is evident only with active Akt1, whereas the activity of inactive Akt remains negligible also after phosphorylation by CK2. It may be worth to note, however, that the weak autophosphorylation of inactive Akt1 at Ser473 is significantly enhanced by previous phosphorylation with CK2, supporting the view that this latter event induces anyway conformational changes rendering Akt more prone to activation. Collectively taken, our data suggest that constitutive phosphorylation of Akt by CK2 gives rise to a pool of kinase, which is susceptible to become hyperactive upon phosphorylation of Thr308 by PDK1. Our *in vivo* experimentation with S129A Akt mutant was performed in a system where Akt is expressed as constitutively active; we therefore cannot discriminate at which level CK2 exerts its role, either before or after canonical activation of Akt triggered by Thr308/Ser473 phosphorylation.

Another point which will deserve additional attention is the weak dephosphorylation of Akt Ser473 and Thr308 observed in cells where CK2 is downregulated. At present, our data do not provide an explanation for this observation; however, it is worth to consider the connection to the Hsp90/cdc37 chaperone system: this complex, known to protect Akt from dephosphorylation,²³ has been recently demonstrated to be fully competent for its action only if phosphorylated by CK2.²⁴ Therefore, this could be a different level of crosstalk between CK2 and Akt. Further studies will be necessary to clarify this issue.

Does stimulation of Akt activity account for the antiapoptotic role of CK2? A definite answer to this question is still premature. On the one hand, there is no doubt that an increment of Akt activity would represent a means to counteract apoptosis, given the central role of this kinase to ensure cell survival. Consistent with this, a Jurkat cell line in which Akt is overexpressed is significantly more resistant to apoptosis induced by CK2 inhibitors than are control Jurkat cells (unpublished), supporting the view that the antiapoptotic effect of CK2 is mediated, at least in part, by Akt.

On the other hand, there is no evidence that stimulation of Akt activity represents the only mechanism by which CK2 promotes cell survival. It should be emphasized that, given its

extreme pleiotropy, CK2 can impinge on numerous pathways, eventually cooperating with Akt signaling to counteract apoptosis. For example, phosphorylation by CK2 of I κ B in its PEST region accelerates I κ B degradation by calpain,^{25–27} thus promoting the nuclear translocation of NF- κ B and increased expression of antiapoptotic genes. An even more general mechanism by which CK2 can display its antiapoptotic potential would be to render caspase substrates refractory to cleavage: numerous examples are already known of proteins (e.g. Max, Bid, HS1, connexin 45.6, and PTEN) whose phosphorylation by CK2 hinders their cleavage by caspases²⁸ (and reviewed in Litchfield⁹ and Pinna²⁹). But the connection between CK2 and caspases could be even tighter. Besides counteracting the effects of caspases downstream, at substrate level, an upstream device by which CK2 turns off caspase activity has recently been reported,³⁰ consisting of the phosphorylation of the caspase-inhibiting protein ARC. Such a phosphorylation is required to target ARC to mitochondria, where it can bind (and inhibit) caspase 8. Another mechanism by which CK2 may prevent cell death has recently been reported;³¹ the authors show that the proapoptotic function of CHOP transcription factor is inhibited by CK2-mediated phosphorylation.

In the emerging scenario, the newly detected connection with Akt would be a part of a multifaceted strategy by which CK2 coordinates a network of signaling pathways leading to cell survival. Note that some of these, notably caspase inhibition and I κ B degradation, could be promoted independently by both CK2 and Akt.

Materials and Methods

Materials

Antibodies

Phospho-GSK3 β (S9), phospho-FKHR (S256), which also recognized phospho-AFX (S193), phospho-Akt (T308), and phospho-PDK1 (S241) antibodies were from Cell Signaling Technology, phospho-Akt (S473), total Akt1/2/3, total GSK3 β and actin antibodies were from Santa Cruz Biotechnology, CK2 α -subunit rabbit antiserum was raised against [376–391] region of human protein, corresponding to the specific C-terminal sequence. Phospho-Akt (S129) and its not-phosphorylated counterpart (Akt (S129)) were raised in New Zealand rabbits against two synthetic peptides corresponding to amino acids [121–140] of the Akt protein, phosphorylated in Ser129 or not, respectively; the antisera were purified using an immobilized peptide affinity resin (Sulfo Link Coupling Gel, Pierce, UK) according to the manufacturer's instructions

Kinase substrates

CK2-specific peptide substrate was synthesized as described elsewhere.³² Akt-specific peptide substrate was from Calbiochem, Akt protein substrate piD261 was expressed, purified³³ and kindly provided by Dr. S Facchin (Padova).

Inhibitors

TBB was synthesized as in Szyska *et al.*,³⁴ IQA, formerly termed CGP029482,²⁰ was provided by Novartis; LY294002 was from Cell Signaling Technology, PKA inhibitor peptide was from Sigma.

cDNA constructs

The expression vector for the murine HA-tagged myrAkt1 (pCMV6-HA-myrAkt1), a constitutively active Akt containing a consensus myristoylation site, was kindly supplied by Dr. Sandra Marmioli (Modena). S129A Akt mutant was obtained with the 'QuickChange-Site Directed Mutagenesis' Kit (Stratagene) using pCMV6-HA-myrAkt1 as template and two synthetic oligonucleotides primers, 5'-CCCAGTGACAACGCAGGGGCTGAAGA GATGG-3' and 5'-CCATCTCTTCATCCCTGCGTTGTCAGTGGG-3' each complementary to opposite strands of template. The mutation was confirmed by sequencing analysis.

Enzymes

Active full-length Akt1 (phosphorylated at Thr308 and Ser473) and inactive full-length Akt1 (dephosphorylated) were provided by Dr. H McLauchlan and Dr. J Hastie (Dundee), recombinant CK2 α and $\alpha_2\beta_2$ were expressed and purified as in Samo *et al.*¹⁹

Cell culturing and treatment

The human leukemia Jurkat T-cell line, the human prostate cancer LNCaP cell line, and the human embryonic kidney epithelial HEK 293T cells were maintained in the appropriate medium (RPMI 1640 (Dutch modification, Sigma) for Jurkat and LNCaP, Dulbecco's modified Eagle's medium (Sigma) for HEK 293T, supplemented with 10% fetal calf serum, 2 mM L-glutamine, 100 U/ml penicillin and 100 μ g/ml streptomycin, in an atmosphere containing 5% CO₂).

Cell treatments were performed as elsewhere described.¹¹

Cell lysis and Western blot analysis

After treatment, cells were centrifuged, washed, and lysed by the addition of ice-cold buffer consisting of 20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 2 mM EGTA, 0.5% (v/v) Triton X-100, 2 mM dithiothreitol, protease inhibitor cocktail Complete (Roche), 10 mM NaF, 1 μ M okadaic acid, 1 mM Na vanadate. After 20 min incubation on ice, the lysates were centrifuged at 10 000 $\times g$ for 10 min, at 4°C. The supernatants contained the cell-soluble fraction, whose protein concentration was determined by the Bradford method. Equal amounts of protein were loaded on 11% SDS/PAGE, blotted on Immobilon-P membranes (Millipore), and processed in Western blot with the indicated antibody, detected by ECL (enhanced chemiluminescence, Amersham Biosciences). Quantitation of the signal was obtained by chemiluminescence detection on a Kodak Image Station 440CF and analysis with the Kodak 1D Image software.

siRNA method

The siRNA sequence targeting specifically human CK2 α containing 21-nt with (2'-deoxy)-thymidine 3' overhangs and corresponding to nucleotides 803–823 (Accession Number AY112721) was synthesized and annealed by Qiagen-Xeragon Inc. The day before the transfection, cells were diluted with fresh medium without antibiotics and transferred to six-well plates. LNCaP cell transient transfection of siRNA was carried out according to Elbashir *et al.*,³⁵ using Oligofectamine (Invitrogen). In all, 12 μ l culture medium and 3 μ l Oligofectamine per well were preincubated 5 min at room temperature. During the time of this incubation, 175 μ l medium were mixed with 10 μ l siRNA. The two mixtures were combined and incubated for 20 min at room temperature for complex formation. The entire mixture (200 μ l) was added to the cells in one well resulting in a final concentration

of 100 nM for the siRNA. Control cells were treated with 100 nM control nonsilencing siRNA (Qiagen).

Cell transfection

HEK-293T cells, plated onto 60-mm-diameter dishes at about 80% confluency, were transiently transfected with 4 μ g of cDNA by standard calcium-phosphate procedure. The transfection mixture was removed after 16 h, and cells were lysed after 48 h after transfection.

CK2 activity assay in cell lysates

In all, 1–2 μ g of lysate proteins were incubated for 10 min at 30°C with 1 mM CK2-specific peptide RRRADDSDDDDD, in the presence of phosphorylation reaction mixture.¹¹

In vitro phosphorylation of Akt by CK2

Purified recombinant Akt (0.2–0.5 μ g) was incubated with recombinant CK2 (α or $\alpha_2\beta_2$, 10–20 units, where 1 unit is the amount of enzyme transferring 1 pmol of Pi to the peptide substrate per min) in the presence of 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 12 mM MgCl₂, 10 μ M [γ -³²P]ATP (~1500 cpm/pmol), 0.1 M NaCl, in a total volume of 20 μ l, for 10 min at 30°C.

In the case of overexpressed Akt, Akt was immunoprecipitated from 40 μ g of lysate proteins with total Akt antibody, following the protocol described elsewhere;¹⁹ the immunoprecipitates were then incubated with CK2, as described for purified Akt.

Samples were run on 11% SDS/PAGE, and radioactive bands were detected and quantified by autoradiography (Cyclone storage phosphor system, Packard).

For the identification of the amino acids phosphorylated by CK2 in Akt, after phosphorylation samples were hydrolyzed by incubation for 4 h at 110°C in 6 N HCl, then subjected to high-voltage paper electrophoresis at pH 1.9 for 2.5 h, in the presence of nonradioactive phospho-amino acids, as migration reference.³⁶

Akt activity assay

For Akt immunoprecipitation, 250 or 40 μ g of total lysate proteins, in the case of Jurkat/LNCaP or HEK 293T cells, respectively, were incubated with total Akt antibody, following the protocol described elsewhere.¹⁹ Akt immunoprecipitate kinase assay was performed as described in Cross *et al.*,³⁷ towards 0.1 mM substrate peptide (RPRAATF), in the presence of 1 μ M PKA inhibitor peptide. To verify the specificity of the kinase reaction, the activity was also measured in the immunoprecipitates with equal amount of an aspecific antibody, where no Akt was revealed by Western blot analysis.

The activity of purified Akt (specific activity of 1.2 pmol Pi/min/ μ g, under basal conditions) was measured towards either the substrate peptide, or the recombinant yeast protein kinase pID261/Bud32,³³ which contains in its C-terminal tail a site conforming to the consensus sequence of Akt and which is not affected by CK2. Neither the peptide nor pID261 are phosphorylated by CK2 to any appreciable extent. Akt was incubated for 20 min at 30°C, with or without CK2, under the conditions described above, for Akt phosphorylation, with the addition of the substrate (0.1 mM peptide, or 0.1 μ g pID261 protein). The substrate phosphorylation degree was detected by means of SDS/PAGE and autoradiography in the case of the protein substrate pID261, or by binding to phospho-cellulose paper and scintillation counting¹¹ in the case of the peptide substrate.

Identification of CK2 phosphorylation site in Akt1

For the determination of the *in vitro* phosphorylation site, Akt1 was phosphorylated by CK2 and purified by SDS/PAGE. In the case of *in vivo* phosphorylation, w.t. Akt was overexpressed in 293T cells; before lysis, cells were treated for 2 h with 1 μ M okadaic acid, in order to increase the phosphorylation degree; Akt was purified by immunoprecipitation and SDS/PAGE. In both cases, the gel band corresponding to the protein was excised and the protein digestion was performed in gel according to Gharahdaghi.³⁸ The digested protein was then analyzed by MALDI mass spectrometry using a MALDI-TOF (Micromass) and α -cyano-4-hydroxycinnamic acid as matrix (Sigma). The protein fingerprinting was analyzed with Mascot search engine (Matrix Science, UK) to highlight possible phosphorylated peptides, using Ser/Thr phosphorylation as variable modification. A peptide corresponding to the sequence [122–142] of Akt1 was identified as possibly phosphorylated. The actual phosphorylation was proved chemically dephosphorylating the peptide.^{39,40} The sample was treated with 10 μ l of Ba(OH)₂ for 30 min at room temperature. The reaction was quenched by adding 2 μ l of formic acid and the sample was desalted using ZipTip (Millipore). The digested protein was then analyzed again by MALDI mass spectrometry and the phosphorylation of the peptide [122–142] was proved by a 98 Da shift of the peak, corresponding to the β -elimination of phosphate from Ser or Thr residue. The identification of the exact phosphorylated site was made by acquiring an MS/MS spectrum of the phosphopeptide [122–142] using an Ultima Q-TOF (Micromass). The spectrum was manually interpreted according to Hunt *et al.*⁴¹ and the position of the phosphorylated site was determined.

Acknowledgements

We thank Sir Philip Cohen (University of Dundee, Scotland) for critical reading of the manuscript, Joseph Schoepfer (Novartis, Basel, Switzerland) for providing IQA, the protein production team of the Division of Signal Transduction Therapy at the University of Dundee, Scotland (coordinated by Hilary McLauchlan and James Hastie) for providing the active and inactive full-length Akt, Peter James for the availability of the Proteomic Facility at Wallenberg Laboratory II, Lund University (Sweden), Sonia Facchin (University of Padova, Italy) for providing pID261, Sandra Marmioli (University of Modena e Reggio Emilia, Italy) for providing the cDNA for HA-tagged myrAkt1. This work was supported by grants from the Italian MIUR (PRIN 2003), AIRC, and European Commission (PRO-KINASERESEARCH 503467).

References

- Meggio F and Pinna LA (2003) One-thousand-and-one substrates of protein kinase CK2? FASEB J. 17: 349–368
- Guerra B and Issinger O-G (1999) Protein kinase CK2 and its role in cellular proliferation, development and pathology. Electrophoresis 20: 20391–20408
- Tawfic S, Yu S, Wang H, Faust R, Davis A and Ahmed K (2001) Protein kinase CK2 signal in neoplasia. Histo. Histopathol. 16: 573–582
- Seldin DC and Leder P (1995) Casein kinase II α transgene-induced murine lymphoma: relation to theileriosis in cattle. Science 267: 894–897
- Kelliher MA, Seldin DC and Leder P (1996) Tal-1 induces T cell acute lymphoblastic leukemia accelerated by casein kinase II α . EMBO J. 15: 5160–5166
- Landesman-Bollag E, Channavajhala PL, Cardiff RD and Seldin DC (1998) p53 deficiency and misexpression of protein kinase CK2 α collaborate in the development of thymic lymphomas in mice. Oncogene 16: 2965–2974
- Faust RA, Tawfic S, Davis AT, Bubash LA and Ahmed K (2000) Antisense oligonucleotides against protein kinase CK2- α inhibit growth of squamous cell carcinoma of the head and neck *in vitro*. Head Neck 22: 341–346

8. Romieu-Mourez R, Landesman-Bollag E, Seldin DC and Sonenshein GE (2002) Protein kinase CK2 promotes aberrant activation of nuclear factor- κ B, transformed phenotype, and survival of breast cancer cells. *Cancer Res.* 62: 6770–6778
9. Litchfield DW (2003) Protein kinase CK2: structure, regulation and role in cellular decisions of life and death. *Biochem. J.* 369: 1–15
10. Guo C, Yu S, Wang H, Davis AT, Green JE and Ahmed K (2001) A potential role of nuclear matrix-associated protein kinase CK2 in protection against drug-induced apoptosis in cancer cells. *J. Biol. Chem.* 276: 5992–5999
11. Ruzzene M, Penzo D and Pinna LA (2002) Protein kinase CK2 inhibitor 4,5,6,7-tetrabromobenzotriazole (TBB) induces apoptosis and caspase-dependent degradation of haematopoietic lineage cell-specific protein 1 (HS1) in Jurkat cells. *Biochem. J.* 364: 41–47
12. Vlietstra RJ, van Alewijk DC, Hermans KG, van Steenbrugge GJ and Trapman J (1998) Frequent inactivation of PTEN in prostate cancer cell lines and xenografts. *Cancer Res.* 58: 2720–2723
13. Shan X, Czar MJ, Bunnell SC, Liu P, Liu Y, Schwartzberg PL and Wange RL (2000) Deficiency of PTEN in Jurkat T cells causes constitutive localization of Itk to the plasma membrane and hyperresponsiveness to CD3 stimulation. *Mol. Cell. Biol.* 20: 6945–6957
14. Miller SJ, Lou DY, Seldin DC, Lane WS and Neel BG (2002) Direct identification of PTEN phosphorylation sites. *FEBS Lett.* 528: 145–153
15. Hanada M, Feng J and Hemmings BA (2004) Structure, regulation and function of PKB/AKT – a major therapeutic target. *Biochim. Biophys. Acta.* 1697: 3–16
16. Scheid MP and Woodgett JR (2003) Unravelling the activation mechanisms of protein kinase B/Akt. *FEBS Lett.* 546: 108–112
17. Nicholson KM and Anderson NG (2002) The protein kinase B/Akt signalling pathway in human malignancy. *Cell. Signal.* 14: 381–395
18. Besson A, Robbins SM and Yong VW (1999) PTEN/MMAC1/TEP1 in signal transduction and tumorigenesis. *Eur. J. Biochem.* 263: 605–611
19. Sarno S, Reddy H, Meggio F, Ruzzene M, Davies SP, Donella-Deana A, Shugar D and Pinna LA (2001) Selectivity of 4,5,6,7-tetrabromobenzotriazole, an ATP site-directed inhibitor of protein kinase CK2 ('casein kinase-2'). *FEBS Lett.* 496: 44–48
20. Sarno S, de Moliner E, Ruzzene M, Pagano MA, Battistutta R, Bain J, Fabbro D, Schoepfer J, Elliott M, Furet P, Meggio F, Zanotti G and Pinna LA (2003) Biochemical and three-dimensional-structural study of the specific inhibition of protein kinase CK2 by [5-oxo-5,6-dihydroindolo-(1,2-a)quinazolin-7-yl]acetic acid (IQA). *Biochem. J.* 374: 639–646
21. Vanhaesebroeck B and Alessi DR (2000) The PI3K-PDK1 connection: more than just a road to PKB. *Biochem. J.* 346: 561–576
22. Alessi DR, Andjelkovic M, Caudwell B, Cron P, Morrice N, Cohen P and Hemmings BA. (1996) Mechanism of activation of protein kinase B by insulin and IGF-1. *EMBO J.* 15: 6541–6551
23. Sato S, Fujita N and Tsuruo T (2000) Modulation of Akt kinase activity by binding to Hsp90. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 10832–10837
24. Miyata Y and Nishida E (2004) CK2 controls multiple protein kinases by phosphorylating a kinase-targeting molecular chaperone, Cdc37. *Mol. Cell. Biol.* 24: 4065–4074
25. Lin R, Beauparlant P, Makris C, Meloche S and Hiscott J (1996) Phosphorylation of I κ B α in the C-terminal PEST domain by casein kinase II affects intrinsic protein stability. *Mol. Cell. Biol.* 16: 1401–1409
26. Shen J, Channavajhala P, Seldin DC and Sonenshein GE (2001) Phosphorylation by the protein kinase CK2 promotes calpain-mediated degradation of I κ B α . *J. Immunology* 167: 4919–4925
27. Kato Jr T, Delhase M, Hoffmann A and Karin M (2003) CK2 is a C-Terminal I κ B Kinase responsible for NF- κ B activation during the UV response. *Mol. Cell.* 12: 829–839
28. Torres J, Rodriguez J, Myers MP, Valiente M, Graves JD, Tonks NK and Pulido R (2003) Phosphorylation-regulated cleavage of the tumor suppressor PTEN by caspase-3: implications for the control of protein stability and PTEN–protein interactions. *J. Biol. Chem.* 278: 30652–30660
29. Pinna LA (2002) Protein kinase CK2: a challenge to canons. *J. Cell Sci.* 115: 3873–3878
30. Li PF, Li J, Muller EC, Otto A, Dietz R and von Harsdorf R (2002) Phosphorylation by protein kinase CK2: a signaling switch for the caspase-inhibiting protein ARC. *Mol. Cell.* 10: 247–258
31. Ubeda M and Habener JF (2003) CHOP transcription factor phosphorylation by casein kinase 2 inhibits transcriptional activation. *J. Biol. Chem.* 278: 40514–40520
32. Marin O, Meggio F and Pinna LA (1994) Design and synthesis of two new peptide substrates for the specific and sensitive monitoring of casein-kinase-1 and -2. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 198: 898–905
33. Facchin S, Lopreiato R, Stocchetto S, Arrigoni G, Cesaro L, Marin O, Carignani G and Pinna LA (2002) Structure–function analysis of yeast p1261/Bud32, an atypical protein kinase essential for normal cell life. *Biochem. J.* 364: 457–463
34. Szyska R, Grankowski N, Felczak K and Shugar D (1995) Halogenated benzimidazoles and benzotriazoles as selective inhibitors of protein kinases CK I and CK II from *Saccharomyces cerevisiae* and other sources. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 208: 418–424
35. Elbashir SM, Harborth J, Weber K and Tuschl T (2002) Analysis of gene function in somatic mammalian cells using small interfering RNAs. *Methods* 26: 199–213
36. Perich JW, Meggio F, Reynolds EC, Marin O and Pinna LA (1992) Role of phosphorylated aminoacyl residues in generating atypical consensus sequences which are recognized by casein kinase-2 but not by casein kinase-1. *Biochemistry* 31: 5893–5897
37. Cross DA, Alessi DR, Cohen P, Andjelkovich M and Hemmings BA (1995) Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature* 378: 785–789
38. Gharahdaghi F, Weinberg CR, Meagher DA, Imai BS and Mische SM (1999) Mass spectrometric identification of proteins from silver-stained polyacrylamide gel: a method for the removal of silver ions to enhance sensitivity. *Electrophoresis* 20: 601–605
39. Meyer HE, Swiderek K, Hoffmann-Posorske E, Korte H and Heilmeyer Jr LM (1987) Quantitative determination of phosphoserine by high-performance liquid chromatography as the phenylthiocarbonyl-S-ethylcysteine. Application to picomolar amounts of peptides and proteins. *J. Chromatogr.* 397: 113–121
40. Resing KA, Johnson RS and Walsh KA (1995) Mass spectrometric analysis of 21 phosphorylation sites in the internal repeat of rat profilaggrin, precursor of an intermediate filament associated protein. *Biochemistry* 34: 9477–9487
41. Hunt DF, Yates III JR, Shabanowitz J, Winston S and Hauer CR (1986) Protein sequencing by tandem mass spectrometry. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 6233–6237

ORIGINAL ARTICLE

Pharmacological inhibition of protein kinase CK2 reverts the multidrug resistance phenotype of a CEM cell line characterized by high CK2 level

G Di Maira^{1,2}, F Brustolon^{1,2}, J Bertacchini³, K Tosoni^{1,2}, S Marmioli³, LA Pinna^{1,2} and M Ruzzene^{1,2}

¹Department of Biological Chemistry and CNR Neuroscience Institute, University of Padova, Padova, Italy; ²VIMM (Venetian Institute of Molecular Medicine), Padova, Italy and ³Department of Anatomy and Histology, University of Modena and Reggio Emilia, Modena, Italy

Protein kinase CK2 is an ubiquitous and constitutively active kinase, which phosphorylates many cellular proteins and is implicated in the regulation of cell survival, proliferation and transformation. We investigated its possible involvement in the multidrug resistance phenotype (MDR) by analysing its level in two variants of CEM cells, namely S-CEM and R-CEM, normally sensitive or resistant to chemical apoptosis, respectively. We found that, while the CK2 regulatory subunit β was equally expressed in the two cell variants, CK2 α catalytic subunit was higher in R-CEM and this was accompanied by a higher phosphorylation of endogenous protein substrates. Pharmacological downregulation of CK2 activity by a panel of specific inhibitors, or knockdown of CK2 α expression by RNA interference, were able to induce cell death in R-CEM. CK2 inhibitors could promote an increased uptake of chemotherapeutic drugs inside the cells and sensitize them to drug-induced apoptosis in a co-operative manner. CK2 blockade was also effective in inducing cell death of a different MDR line (U2OS). We therefore conclude that inhibition of CK2 can be considered as a promising tool to revert the MDR phenotype.

Oncogene (2007) 26, 6915–6926; doi:10.1038/sj.onc.1210495; published online 7 May 2007

Keywords: CK2; MDR; CEM cells; inhibitors; casein kinase 2; CKII

Introduction

CK2 is an ubiquitous, highly conserved and pleiotropic Ser/Thr kinase, endowed with constitutive activity, independent of any known second messenger or phosphorylation events (Pinna, 2002). CK2 has a heterotetrameric structure, composed of two catalytic (α and/or α') and two regulatory (β) subunits. *In vitro*,

the recombinant catalytic subunits are active either alone or combined with the β subunits, whose presence however alters the protein substrate specificity and confers susceptibility to polybasic effectors, notably polyamines and histones (Pinna, 1990). However, at present no evidence of a dynamic regulation operated by the β -subunit *in vivo* has been provided, where CK2 is usually found in its holoenzymatic $\alpha_2\beta_2$ form, whose spontaneous dissociation under physiological conditions remains a matter of conjecture (Filhol *et al.*, 2004). CK2 phosphorylates a huge number of protein substrates, involved in many fundamental cell processes (Meggio and Pinna, 2003), and is essential for cell life. It is frequently upregulated in human cancers (Guerra and Issinger, 1999), and transgenic expression of CK2 α in lymphocytes is oncogenic (Seldin and Leder, 1995) and accelerates leukemia development induced by other oncogenes (Kelliher *et al.*, 1996). Recently, a global anti-apoptotic role of CK2 has been disclosed (reviewed by Ahmed *et al.*, 2002; Litchfield, 2003), whose mechanism is seemingly multifactorial and only partly understood.

Considering such an intimate implication of CK2 in cell survival, we wondered if it could be possibly involved in the multidrug resistance phenotype (MDR) as well. MDR denotes the resistance to drug-induced apoptosis frequently developed by cancer cells; it is a phenomenon of paramount medical relevance, being mainly responsible for the failure of cancer therapy. Although apoptosis resistance is the result of cell selection upon treatment with a particular drug, the same cells frequently develop a cross-resistance toward other compounds, even not structurally related. The mechanisms underlying MDR are undoubtedly multiple, and many hypotheses have been proposed, including alteration in genetic features, DNA repair, drug target molecules, metabolic and growth pathways (Sawicka *et al.*, 2004). A prominent role is attributed to the membrane transport system consisting of the so called MDR proteins (Borst, 1997). These are ATP-dependent and highly promiscuous transporters, which extrude cytotoxic molecules from the cell; among others, this group of proteins includes the P-glycoprotein (P-gp), encoded by the MDR1 gene, which is the drug pump most frequently found in MDR cells (Ling, 1997).

Correspondence: Dr M Ruzzene, Department of Biological Chemistry, University of Padova, Viale G. Colombo, 3 – 35121 Padova, Italy.
E-mail: maria.ruzzene@unipd.it

Received 7 August 2006; revised 27 March 2007; accepted 29 March 2007; published online 7 May 2007

The involvement of CK2 in the MDR phenomenon has never been specifically investigated. However, besides the general anti-apoptotic role of this kinase, additional observations suggest its possible relevance in this context. First, the P-gp is a known substrate of CK2 (Glavy *et al.*, 1997), whose phosphorylation sites have also been mapped, though the effect of CK2-dependent phosphorylation on the P-gp functionality has never been elucidated. Secondly, overexpression of CK2 in a MDR glioma cell line has been reported and considered responsible for the high *in vivo* phosphorylation of its substrate DNA topoisomerase II (Matsumoto *et al.*, 2001). Given these premises, we decided to perform a comparative analysis of CK2 in two variants of human T lymphoblastoid CEM cell line, one normally sensitive to drug-induced apoptosis, referred to as S-CEM, while the other, referred to as R-CEM, derived from the parental one by selection with vinblastin treatment, and displaying a cross-resistance to many other chemotherapeutic drugs (Dupuis *et al.*, 2003, and Figure 5). In these two cell variants, we thoroughly examined the expression of CK2 subunits and its endogenous catalytic activity, and we analysed the possibility of using CK2-specific inhibitors to overcome the MDR phenotype.

Results

Expression of CK2 catalytic and regulatory subunits in R-CEM and S-CEM

We first examined the expression of CK2 by performing western blot analysis of total lysates of S-CEM and R-CEM, with antibodies toward the CK2 catalytic (α/α') and regulatory (β) subunits. As shown in Figure 1a, while CK2 β was expressed at similar levels, we found a significantly higher amount of CK2 α in R-CEM than in S-CEM; the same result was obtained by using either a C- or a N-terminal α -antibody (ruling out the hypothesis of a different proteolytic cleavage in the two types of cells), and with other polyclonal and monoclonal antibodies (see Materials and methods). On the contrary, α' was almost undetectable both in S-CEM and R-CEM (not shown). The comparison was performed also after immunoprecipitation of CK2 α , instead of loading total lysates, and the results were similar: despite equivalent amount of β , a higher amount of α was reproducibly present in the immunoprecipitate from R-CEM (Figure 1b).

When we analysed the CK2 α mRNA expression by means of semiquantitative PCR, we found comparable amounts in S-CEM and R-CEM (Figure 1c), suggesting that the different level of α in the two variants was due to altered regulation at the protein level rather than at transcriptional level. To highlight a possible different turnover of CK2 α protein, we treated cells with cycloheximide, to block protein synthesis, and we followed the decrease of α by western blot: the results, shown in Figure 2, disclose a markedly slower protein disappearance in R-CEM as compared to S-CEM.

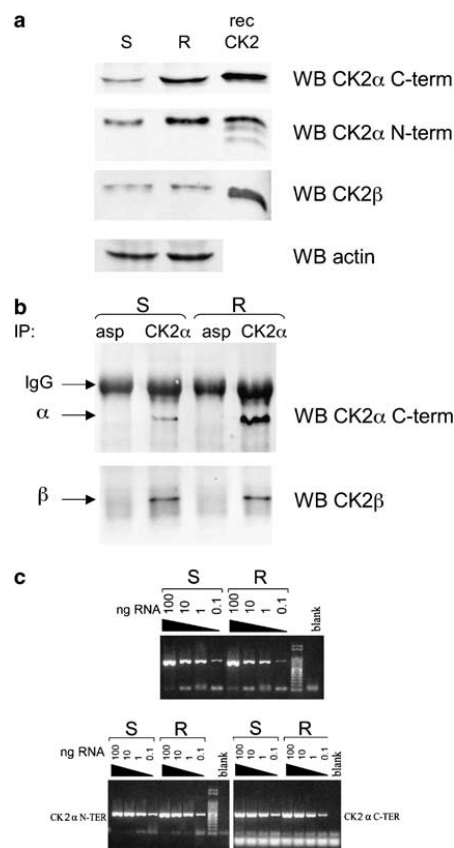


Figure 1 Expression of CK2 subunits in S-CEM and R-CEM cells. (a) About 10 μ g of proteins from total cell lysate was analysed by western blot with the indicated antibodies. Anti-actin western blot is shown as a loading control. Where indicated, recombinant (rec) CK2 was loaded as positive control and position marker. (b) CK2 was immuno-precipitated with anti-CK2 α C-terminal antibodies or aspecific antibodies, as indicated, from S-CEM or R-CEM lysates. Precipitated proteins were detected by western blot with anti-CK2 α C-terminal and anti-CK2 β antibodies. (c) Semi-quantitative RT-PCR analysis of CK2 α expression. 10^{-1} – 10^{-5} dilutions of total cDNA obtained from reverse-transcribed total RNA from S-CEM and R-CEM were PCR-amplified with primer pairs specific for the N-terminal and C-terminal domains of CK2 α , as indicated (bottom panel), or for actin (upper panel). Actin was used as an internal control.

We next analysed the distribution of CK2 α in different subcellular compartments: it turned out that its overall higher level is predominantly accounted for by the cytosolic and nuclear fractions, whereas in mitochondria and microsomes S-CEM and R-CEM display similar level of CK2 α (Figure 3a). A relative quantification of CK2 α - and β -subunits in the cytosol and nuclei of the two cell variants was performed by comparative analysis with recombinant CK2 holoenzyme ($\alpha_2\beta_2$), containing equimolar amounts of the two

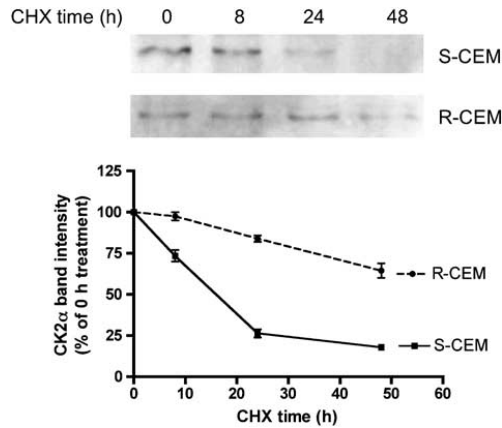


Figure 2 Turnover of CK2 α in S-CEM and R-CEM. Cells were treated with 20 μ g/ml cycloheximide (CHX) for the indicated times. To obtain a similar signal for CK2 α at time 0, different amounts of total proteins from cell lysates (12 μ g for S-CEM and 4 μ g for R-CEM) were loaded for the analysis by western blot with anti-CK2 α C-terminal antibodies (upper part). The quantification of the bands is plotted in the lower part.

subunits. The ratio of α/β in S-CEM was very similar to that calculated for the recombinant holoenzyme, while in R-CEM α exceeded β by about four to fivefold both in the cytosol and in the nucleus (Figure 3b).

CK2 activity in R-CEM and S-CEM

To assess if higher level of CK2 catalytic subunit in R-CEM cells also reflects in increased phosphorylation of endogenous substrates, R-CEM and S-CEM were incubated with 32 P_i either in the absence or presence of specific CK2 inhibitors, and 32 P-incorporation into cellular proteins was evaluated by SDS/PAGE followed by blotting and autoradiography. As shown in Figure 4, we found that protein phosphorylation is more pronounced in R-CEM than in S-CEM cells; to be sure that the observed differences were not due to a higher rate of 32 P_i loading in R-CEM, we performed the experiment at different times (partially shown in Figure 4a), finding that at 4 h the cellular ATP pool is already at isotopic equilibrium and that the ratio between R-CEM and S-CEM global phosphorylation is constant. Figure 4a provides the clear cut demonstration that CK2 activity substantially contributes to protein phosphorylation in R-CEM, as judged from the adverse effect of the CK2 inhibitor TBB on the radiolabeling of several bands. Note in particular, the presence of several TBB-sensitive bands in the R-CEM lanes, which are almost undetectable in the S-CEM lanes. Similar results were obtained treating cells with other CK2 inhibitors, either structurally related or not to TBB (not shown). Figure 4 also shows that the phosphorylation degree of two CK2 target sites (Ser129 of Akt, Di Maira *et al.*, 2005 and Thr 117 of BAD, Klumpp *et al.*, 2004), detected by

phospho-specific antibodies, is higher in R-CEM than in S-CEM. From all these data, it can be concluded that CK2-catalysed protein phosphorylation is much more pronounced in R-CEM cells, consistent with their higher content in CK2 α .

Surprisingly, such a higher CK2 activity disclosed in intact R-CEM as compared to S-CEM cells could not be detected in cell lysates, where CK2 activity, monitored with a specific peptide substrate, was comparable in S-CEM and R-CEM (not shown). The results were similar whether the activity was measured in crude cell lysates, subcellular fractions, or after immunoprecipitation of CK2 α , either towards peptide or protein substrates, such as casein or calmodulin. This is probably the consequence of *in vitro* artifact(s) arising from cell lysis and association of CK2 with inhibitory molecules. In fact, no linear increase could be observed of CK2 activity from the R-CEM by increasing the aliquot of lysate tested (not shown).

Treatment of CEM cells with CK2-specific inhibitors and siRNA

Since many CK2-specific inhibitors have been shown to induce apoptosis in several cell types (reviewed by Sarno *et al.*, 2005a), we tested their effect on CEM cell viability. As expected, R-CEM cells were refractory to treatment with a number of chemotherapeutic drugs, which eradicate S-CEM cells. In contrast, responsiveness to a panel of CK2 inhibitors was similar with either S-CEM or R-CEM cells (Figure 5a): when used at a fixed concentration (20 μ M), the effect of CK2 inhibitors was roughly proportional to their IC₅₀ values for CK2 (with the remarkable exception of MNA, see below). Although these inhibitors are highly selective for CK2, we performed RNA interference experiments to exclude completely the possibility of an aspecific effect. In this set of experiments, we knocked down the expression of CK2 α and then evaluated the apoptosis by detecting the caspase-dependent PARP degradation and the apoptotic nucleosome formation. The results, shown in Figure 5b, demonstrated that both S-CEM and R-CEM cells undergo apoptosis whenever CK2 α amount is reduced. Of particular interest for this work is the case of R-CEM, where, despite an only partial CK2 α reduction, a higher degree of apoptosis was observed in cells treated with the CK2 α -specific siRNA, compared to aspecific siRNA.

As shown in Figure 5a, the CK2 inhibitor MNA was almost ineffective in R-CEM, despite its remarkable efficacy in S-CEM; interestingly, this inhibitor, although endowed with a fairly good inhibitory efficiency towards CK2 holoenzyme (IC₅₀ = 0.30 μ M), is much less effective towards its isolated catalytic subunit (IC₅₀ = 2.5 μ M) (Salvi *et al.*, 2006). Figure 5c shows a direct comparison of the dose-dependent effect on R-CEM viability of MNA and its related analog, MNX, whose IC₅₀ values are instead similar with either CK2 holoenzyme or CK2 α . These data support the view that R-CEM cell survival is ensured by the 'free' catalytic subunit of CK2 (CK2 α , not assembled with β). Consistently, cells from a

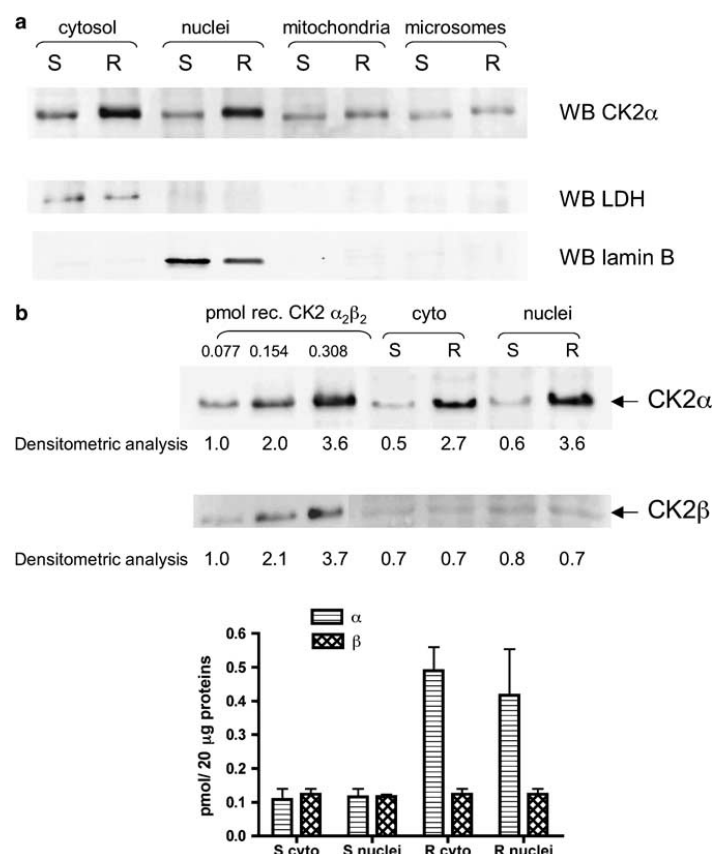


Figure 3 Subcellular distribution of CK2 subunits in S-CEM and R-CEM. (a) Ten microgram of proteins from the indicated fraction were analysed by western blot with anti-CK2 α C-terminal antibodies. The quality of cytosolic and nuclear fractions was checked by western blot for specific marker proteins, namely lactate dehydrogenase (LDH) and lamin B, respectively, as indicated. (b) Twenty microgram of cytosolic and nuclear proteins from S-CEM and R-CEM were analysed by western blot with anti-CK2 α N-terminal or anti-CK2 β antibodies, along with the indicated amounts of recombinant CK2 $\alpha_2\beta_2$ (upper panel). The CK2 subunit amounts present in cell fractions (lower panel) were calculated by densitometric analysis and extrapolation from the calibration curve built on the recombinant CK2 signal; the experiment was performed twice, with two different cell lysate preparations; the reported bars are the mean values $\pm$ s.e.m.

different MDR line, R-U2OS, not showing an excess of CK2 α as compared to β (see Discussion), were susceptible to apoptosis induced by either MNA or other CK2 inhibitors (Figure 6a). Interestingly, the comparison between the S-U2OS (wild-type line) and R-U2OS (MDR variant) revealed a higher sensitivity to the inhibition of CK2 of the resistant cells, which also die in response to siRNA knocking down of CK2 expression (Figure 6b).

FACS analysis indicated that the CK2 inhibitors induced R-CEM cell death by an apoptotic mechanism: for example, after a 16 h treatment with the inhibitor TBI, the apoptotic cell fraction, representing about $2.9 \pm 1.2\%$ of not-treated R-CEM, increased to about $33 \pm 3.5\%$ (not shown).

The proapoptotic efficacy of CK2 inhibitors in R-CEM rules out that they are readily extruded from the cell by P-gp, also consistent with the capability of TBB to alter the *in vivo* phosphorylation pattern. This could simply mean that CK2 inhibitors are not good substrates for the R-CEM machinery responsible for the extrusion of chemotherapeutic drugs. It was also possible, however, that CK2 inhibition impairs the functionality of MDR protein(s), thus ultimately overcoming the MDR phenotype of R-CEM cells. To assess this possibility, we exploited the fluorescence of doxorubicin, and evaluated its accumulation after 30 min cell preincubation in the presence or in the absence of CK2 inhibitors. As expected, not pretreated R-CEM cells accumulated much lower amounts of doxorubicin as

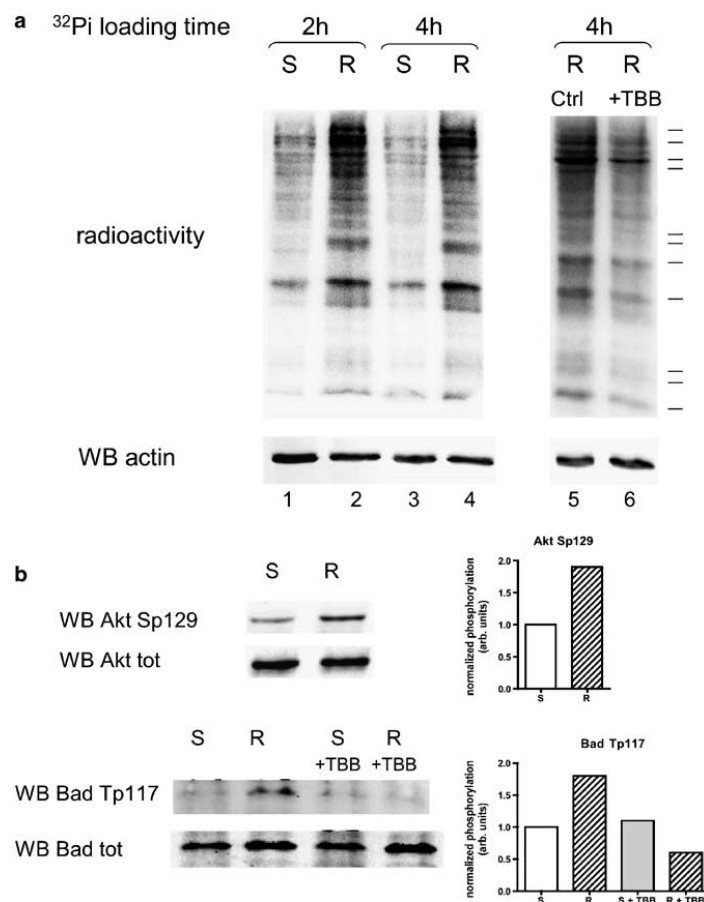


Figure 4 CK2 activity in S-CEM and R-CEM. (a) Cells were loaded with $^{32}\text{P}_i$ for the indicated times; where indicated, 20 μM TBB was added during $^{32}\text{P}_i$ loading. 20 μg of total proteins were analysed by SDS/PAGE and blotting, followed by autoradiography (radioactivity) and western blot with anti-actin, as a loading control. Lanes 1–4 and 5–6 correspond to two separate experiments. For lanes 5 and 6, a quantitative analysis of radioactivity incorporated into the bands was performed by means of the OptiQuant Image Analysis software (Canberra-Packard, Schwadorf, Austria); bands whose intensity decrease by 50% or more in TBB-treated cells are pinpointed. (b) Upper part: equal amounts of Akt were immuno-precipitated from S-CEM and R-CEM lysates, and analysed by western blot with the CK2 target site Ser129 phospho-specific antibodies (Di Maira *et al.*, 2005) and Akt total antibody, as indicated. Lower part: Ten microgram of total lysate from S-CEM and R-CEM were analysed by western blot with the CK2 target site BAD Thr117 phospho-specific antibodies (Klump *et al.*, 2004) or BAD total antibody, as indicated. Where present (+ TBB), 20 μM TBB was administrated to the cells for 3 h before lysis. On the right part of both panels, quantification of phospho-Ser129 Akt and phospho-Thr117 BAD is shown, obtained by normalization to the total amount of Akt and BAD, respectively.

compared to S-CEM; CK2 inhibitors induced a modest increase in the uptake of drug in S-CEM, while in R-CEM such an increase was significantly higher (Figure 7a). Figure 7b shows that the dose-dependent effect of TBB on doxorubicin uptake by R-CEM was paralleled by CK2 inhibition, consistent with the notion that CK2 inhibition is responsible for the favorable effect of TBB on doxorubicin accumulation. Given these premises, we hypothesized that CK2 inhibitors could reduce the threshold of R-CEM sensitivity to chemotherapeutic drugs, such as vinblastine. To validate

this hypothesis, we treated cells with increasing concentrations of vinblastine, in the absence or in the presence of a constant concentration of the CK2 inhibitor. At sub-lethal concentrations the inhibitors had no effect even in the presence of the drugs, the efficacy at higher concentrations however, was dramatically increased by the simultaneous administration of vinblastine (not shown). The cell death induced by the combined treatment was due, at least in part, to apoptosis, as judged by the increased cleavage of the caspase substrate PARP protein (Figure 8a). Similar

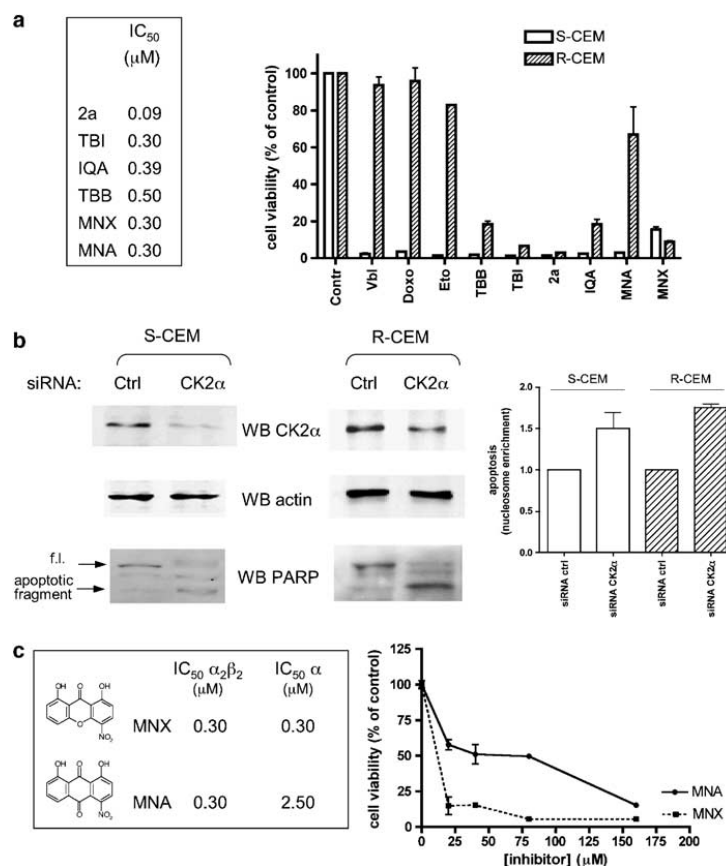


Figure 5 Effect of CK2 inhibitors and siRNA on CEM cell viability. (a) Cells were treated for 40 h with the vehicle (0.5% (v/v) dimethylsulfoxide (DMSO), control), or 0.2 μ g/ml vinblastin (Vbl), 50 μ M etoposide (Eto), 25 μ M doxorubicin (doxo), or CK2 inhibitors (TBB, TBI, 2a, IQA, MNA, all used at 20 μ M). Cell viability was evaluated with the method of MTT. The *in vitro* IC₅₀ values for CK2 of the used inhibitors are shown in the inset (from Sarno *et al.*, 2003; Pagano *et al.*, 2004; Salvi *et al.*, 2006). (b) S-CEM and R-CEM cells were transfected with 1 μ M aspecific siRNA (Ctrl) or 1 μ M CK2 α -specific siRNA. After 76 h, cells were lysed and 10 μ g of total proteins were analysed by western blot with the indicated antibodies. f.l. refers to full-length PARP protein. At the end of transfection, part of the cells was used for the direct detection of apoptosis by measuring nucleosome formation with the cell death detection ELISA kit (Roche); the results are shown by the bar graph. Nucleosome enrichment was calculated from the ratio between the signal in CK2 α -siRNA treated cells and aspecific-siRNA-treated cells. (c) Cells were treated for 40 h with increasing concentrations of MNX or MNA, and then viability was evaluated with the method of MTT. The *in vitro* IC₅₀ values for CK2 of the used inhibitors are shown in the inset (Meggio *et al.*, 2004; Salvi *et al.*, 2006).

results were obtained with different combinations of CK2 inhibitors (for example, TBI, TBB,) and chemotherapeutic drugs (for example, etoposide). To check if the effect of the combined treatment was additive or synergistic, we calculated the combination index by simultaneously increasing the concentrations of both compounds (see Materials and methods); the results, shown in Figure 8b, confirmed a synergism between vinblastine and TBB.

To further prove that the existence of 'free' α is sufficient to ensure a higher degree of cell survival, we finally tried to overexpress CK2 α in S-CEM, to evaluate its contribution to the resistant phenotype. Unfortunately,

despite intensive efforts, CEM cells turned out to be fully refractory to the transfection, and all our attempts to induce ectopic overexpression of CK2 α in these cells were unsuccessful. Nevertheless, we were able to show in different cell models, such as HEK 293T (not shown) or U2OS (Figure 9), that the overexpression of CK2 α promoted a higher resistance to drug-induced apoptosis.

Discussion

In the present study, we investigated the level of protein kinase CK2 in two variants of CEM cells, and we found

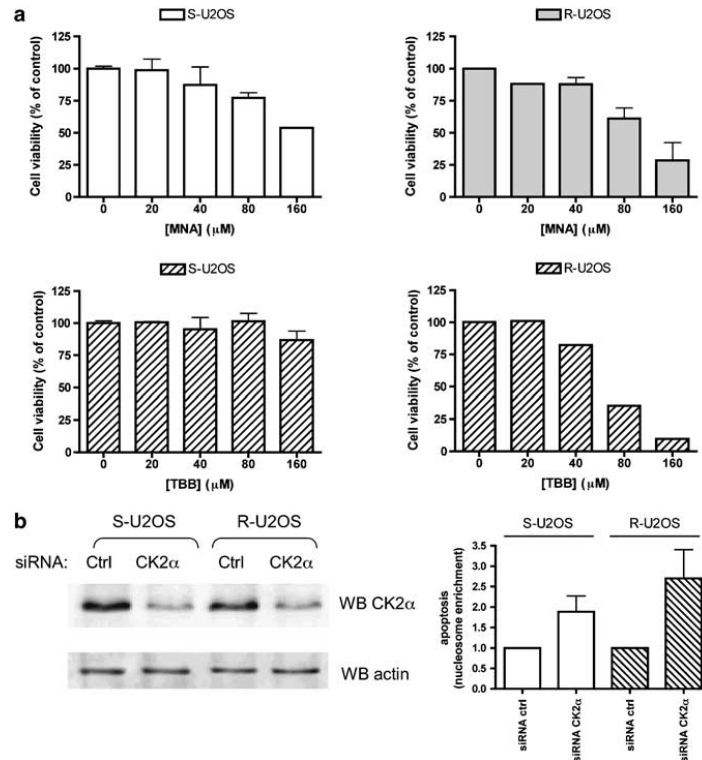


Figure 6 Effect of CK2 inhibitors on U2OS cell viability, (a) S-U2OS and R-U2OS cells were treated for 40 h with the vehicle (0.5% (v/v) DMSO), or increasing concentrations of the indicated CK2 inhibitors. Viability was evaluated with the method of MTT. (b) S-U2OS and R-U2OS cells were transfected with 120 nM aspecific siRNA (Ctrl) or 120 nM CK2 α -specific siRNA. After 76 h, 10 μ g of proteins from total cell lysate were analysed in western blot with the indicated antibodies, while the apoptosis degree was evaluated by measuring nucleosome formation with the Cell Death Detection ELISA kit (Roche), and the results are shown by the bar graph. Nucleosome enrichment was calculated from the ratio between the signal in CK2 α -siRNA treated cells and aspecific-siRNA-treated cells.

a higher expression of CK2 α catalytic subunit in the MDR variant (R-CEM), as compared to wild-type cells (S-CEM), accompanied by a higher cellular CK2 catalytic activity, as judged from the phosphorylation of endogenous proteins sensitive to CK2 inhibitors. The reason for the higher amount of CK2 α appears to reside in a slower turnover in R-CEM, since the mRNA levels are very similar to S-CEM, while the half-life of CK2 α protein is more than doubled. It will be interesting to check whether this is due to an increased translation (for example, as a consequence of μ RNA deregulation) or to a blockage in protein degradation, or, eventually, to both mechanisms.

Our data indicate that, among the many adaptations already described which may contribute to the MDR phenotype, CK2 overexpression should be also considered as an additional mechanism that can be selected to ensure cell survival. Indeed, higher levels of CK2 had been already reported in a glioma MDR cell line (Matsumoto *et al.*, 2001), and, considering the

pro-survival function of CK2, it is conceivable that CK2 overexpression frequently occurs whenever apoptosis resistance is observed. However, we cannot consider it as an absolute requirement for the MDR phenotype, since, for example, we did not find any significantly different CK2 expression when we analysed a wild type and a MDR variant of an osteosarcoma cell line (U2OS) (unpublished data and Figure 6). Our present view, therefore, is that CK2 overexpression, whenever occurring, contributes to confer high level of resistance, which is achieved when more than one mechanism co-operate to the final phenotype. The relevant contribution of CK2 to the R-CEM resistance is highlighted by the usage of CK2 inhibitors, showing that MDR cells undergo apoptosis when CK2 activity is blocked, thus escaping the problem of drug extrusion by P-gp. The wide panel of different CK2 inhibitors used, their generally narrow specificity (Sarno *et al.*, 2005a) and the good correlation between the induced effect and their efficacy in inhibiting CK2, along with the results

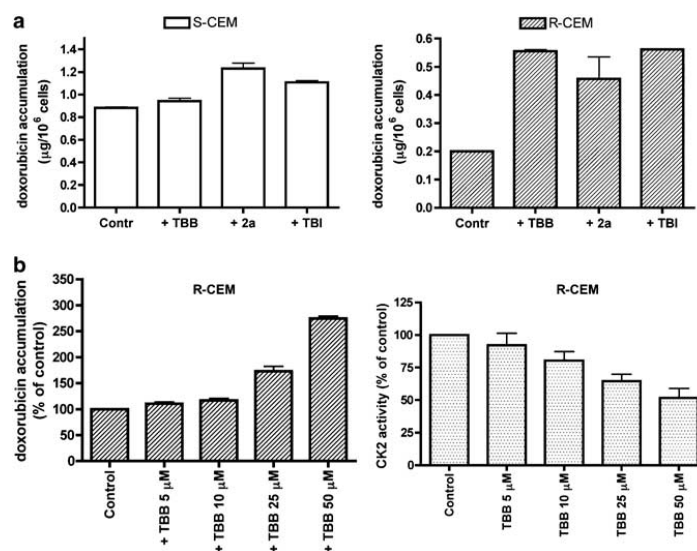
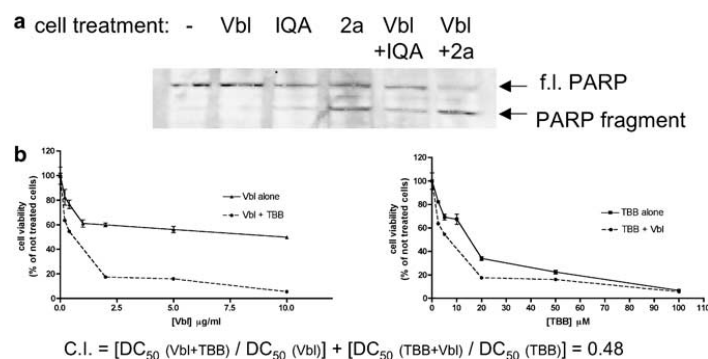


Figure 7 Effect of CK2 inhibitors on doxorubicin accumulation in CEM cells. **(a)** S-CEM and R-CEM cells were pretreated for 30 min with vehicle (Contr) or the indicated CK2 inhibitor (TBB was 50 μM , 2a 40 μM , TBI 50 μM), then further incubated for 30 min with 25 μM doxorubicin, whose amount was detected fluorimetrically. **(b)** Doxorubicin accumulation in R-CEM was evaluated after a pretreatment with increasing concentrations of TBB; the doxorubicin fluorescence is expressed as % of not pretreated R-CEM cells. In parallel, endogenous CK2 activity towards synthetic peptide substrate was measured in 1–2 μg of total proteins from R-CEM cell lysates. The results are shown on the right part of the figure, assigning 100% activity to not pretreated cells.



$$\text{C.I.} = [\text{DC}_{50}(\text{Vbl} + \text{TBB}) / \text{DC}_{50}(\text{Vbl})] + [\text{DC}_{50}(\text{TBB} + \text{Vbl}) / \text{DC}_{50}(\text{TBB})] = 0.48$$

Figure 8 Effect of combined administration of CK2 inhibitors and chemotherapeutic drugs. **(a)** R-CEM were treated for 24 h with vehicle (—), or 0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ vinblastine (Vbl), 40 μM IQA, 5 μM TBI, or combined compounds, as indicated. 10 μg of cell lysate were analysed by western blot with anti-PARP antibodies. The migration of the full-length PARP protein and its caspase-cleaved product are indicated by the arrows. **(b)** R-CEM viability was assessed by the MTT method after 40 h treatment with increasing concentrations of both vinblastine and TBB, administered alone or in combination. Viability was plotted as function of Vbl concentrations (left panel), or TBB concentrations (right panel). Combination index (CI) was calculated as described by Giovannetti *et al.* (2004), where a value <1 indicates synergism.

obtained by knocking down CK2 α expression with siRNA, make us confident that the observed cell death is actually due to CK2 blockade. It is worth noting that CK2 inhibitors, as well as CK2 α -specific siRNA, are able to induce cell death also in the MDR variant of U2OS cells, and that their effect is even higher than in the wild type variant of the same line (Figure 6).

Although we do not have a clear explanation for the lower responsiveness of the S-U2OS cells to CK2 downregulation, it should be borne in mind that this line has been reported to be rather refractory to apoptosis (Cenni *et al.*, 2004). Alternatively, we can speculate that the MDR line variant, R-U2OS, although not expressing higher level of CK2, more strictly relies

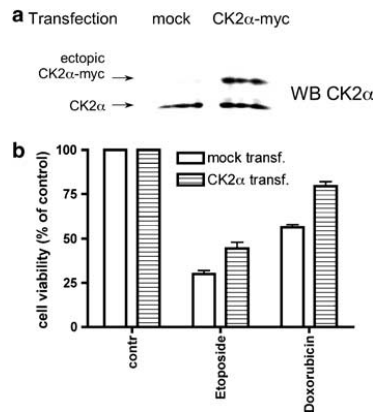


Figure 9 Effect of CK2 α transfection on the response of U2OS cells to pro-apoptotic drugs. U2OS cells were transiently transfected with empty vector (mock) or myc-tagged CK2 α (a) 24 h after transfection, cells were lysed and 10 μ g of total proteins were analysed by western blot with anti-CK2 α C-terminal antibodies. Migrations of the endogenous or ectopically expressed CK2 α are shown. (b) At 24 h after transfection, cells were incubated for additional 24 h with the vehicle (0.5% (v/v) DMSO, control), or 50 μ M etoposide, or 25 μ M doxorubicin; cell viability was then evaluated with the method of MTT. Uncited Reference[32]

on CK2 activity for their survival as compared to normal cells. In any case, our results suggest that CK2 inhibition could be considered as a general tool to counteract the MDR phenotype.

Interestingly, CK2 inhibitors are also able to sensitize cells to chemotherapeutic drugs, an effect which seems to be mediated, at least in part, by the downregulation of P-gp activity itself. Although the phosphorylation of P-gp by CK2 has been known for several years (Glavy *et al.*, 1997), here we show for the first time that the drug accumulation in P-gp expressing cells is increased in a manner proportional to the degree of CK2 inhibition, thus providing a strong indication for a functional link between P-gp and CK2.

A remarkable outcome of our study on R-CEM cells was the observation that only the catalytic α -subunit of CK2 was overexpressed in R-CEM, while the level of the β regulatory subunit was very similar to that found in S-CEM. Also the amount of the catalytic isoform α' (hardly detectable, being its level much lower than α , in both cell variants) was similar. The data therefore are indicative of an unbalanced expression of CK2 catalytic and regulatory subunits, implying the existence in R-CEM of α not combined with β in the canonical tetrameric structure. The possibility that CK2 subunits are present in the cells as independent entities has often been proposed (Allende and Allende, 1998; Filhol *et al.*, 2004); here we provide a clear cut example of its occurrence, also indicative of a role for CK2 α in ensuring a higher degree of cell survival. This is further supported by the results of Figure 9, where S-U2OS cells overexpressing a roughly double amount of CK2 α survive significantly more than control cells to

drug-induced apoptosis. In this respect, our data are consistent with already published works; very recently, Tapia *et al.* (2006) and Ahmad *et al.* (2007), for example reported on the protective effect from cytotoxic drugs of CK2 α ectopically expressed in HEK-293T and prostatic cancer cells, respectively. Interestingly, Guo *et al.* (2001) showed that the overexpression of α alone protects cells from chemical apoptosis similarly or even better than the expression of α and β together. On the other hand, it is generally acknowledged that the oncogenic potential of CK2 is related to the overexpression of the catalytic subunit, since it displayed its transforming effects in the absence of β (Seldin and Leder, 1995; Kelliher *et al.*, 1996; Landesman-Bollag *et al.*, 1998; Orlandini *et al.*, 1998).

A part from these considerations, a robust argument supporting the role of CK2 α in R-CEM cell survival is provided by our experiments of Figure 5, showing that a particular inhibitor, MNA, much more effective *in vitro* towards CK2 $\alpha_2\beta_2$ than towards CK2 α (Salvi *et al.*, 2006), was poorly effective on R-CEM viability, as compared to other inhibitors displaying similar efficacy towards CK2 α and holoenzyme. This shows that in these cells the excess of α , not combined with β , is sufficient to counteract cell death. At present, we do not know if this catalytic form of CK2 is actually present as a monomer, or rather combined in other molecular complexes; it will be also important to search for protein substrates eventually phosphorylated in R-CEM by CK2 α , but not by $\alpha_2\beta_2$. What we can say is that CK2, recently proposed as an oncogenic target (Ahmad *et al.*, 2005; Seeber *et al.*, 2005), should be taken into special consideration whenever the tumor displays drug resistance, given the ability of CK2 inhibitors to revert the MDR phenotype.

Materials and methods

Materials

Antibodies. CK2 α -subunit antisera were raised in rabbit against the sequence of the human protein at C terminus (376–391), N terminus (2–15), or central region (188–202), CK2 α -subunit monoclonal antibodies were from Calbiochem (Darmstadt, Germany) (1AD9), CK2 β -subunit antibodies were raised in rabbit against the whole human protein, and also purchased from BD Transduction Laboratories (Erembodegen, Belgium), CK2 α' -subunit, total Akt, actin, lactate dehydrogenase, and lamin B antibodies were from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA), PARP antibodies were from Roche (Basel, Switzerland), Akt Sp129 phospho-specific antibodies were raised in rabbit as described elsewhere (Di Maira *et al.*, 2005), BAD antibodies were from Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA), BAD Tp117 phospho-specific antibodies were kindly provided by Dr Klumpp (Munster, Germany).

Inhibitors. TBB was synthesized as in Szyszka *et al.* (1995), IQA as in Sarno *et al.* (2005), TBI and 2a as in Pagano *et al.* (2004); and MNA and MNX as in De Moliner *et al.* (2003).

Vinblastine, doxorubicin, etoposide were from Sigma-Aldrich (Milano, Italy).

Recombinant CK2 α and $\alpha_2\beta_2$ were kindly provided by Dr Sarno (Padova, Italy).

Cell culturing and treatment

Human T lymphoblastoid CEM cell line (normal sensitive, S-CEM and its MDR variant, R-CEM, selection with 0.1 μ g/ml vinblastine) were maintained in RPMI 1640 (Sigma-Aldrich), supplemented with 10% fetal calf serum (FCS), 2 mM L-glutamine, 100 U/ml penicillin and 100 μ g/ml streptomycin, in an atmosphere containing 5% CO₂. To the R-CEM medium, 0.1 μ g/ml vinblastine was routinely added. Human osteosarcoma U2OS cell line (normal sensitive, S-U2OS and its MDR variant, R-U2OS (Cenni *et al.*, 2004)) were cultured in D-MEM (Sigma-Aldrich) supplemented with 10% FCS, 2 mM L-glutamine, 100 U/ml penicillin and 100 μ g/ml streptomycin, in an atmosphere containing 5% CO₂. Cell treatments with CK2-specific inhibitors were performed in the culture medium, but with 1% FCS. At the end of the incubations, cells were centrifuged, washed and lysed as indicated below.

Cell viability and apoptosis assay

Cell viability was detected by means of MTT reagent, as described elsewhere (Ruzzene *et al.*, 2002). Drug interaction was assessed by treating cells with increasing concentrations of both vinblastine and TBB, at a 1:10 concentration ratio (Vbl:TBB), using the combination index (CI) (Giovannetti *et al.*, 2004), where CI < 1, CI = 1, and CI > 1 indicate synergistic, additive and antagonistic effects, respectively.

Apoptosis was evaluated by means of the cell detection Elisa kit (Roche), based on the quantification of nucleosomes present in the cytosol of the apoptotic cells, by measuring the absorbance at λ_{405} – λ_{490} , following the manufacturer's instructions. About 10 000 cells were used for each determination.

RNA interference experiments

R-CEM and S-CEM cells were transfected with a nucleofection device (Amaza, Inc., Cologne, Germany), using kit C and program X-001, according to the manufacturer instructions. A total of 2.5×10^6 cells were transfected with 1 μ M CK2 α -specific siRNA pool (siGENOME SMART pool, Dharmacon, Lafayette, CO, USA) or aspecific siRNA (siCONTROL risc-free#1, Dharmacon).

S-U2OS and R-U2OS cells were transfected with 120 nM CK2 α -specific siRNA pool or aspecific siRNA, as specified above, using Oligofectamine and following the manufacturer protocols (Invitrogen, S Giuliano, Milanese, Italy). 76 h after nucleofection, cells were collected and partly analysed for apoptosis, partly lysed for western blot to assess the level of CK2 α expression and PARP degradation.

U2OS cell transfection

U2OS cells, plated onto 60-mm-diameter dishes at about 70% confluency, were transiently transfected with 2 μ g of cDNA (pcDNA3.1/myc-His(–) vector expressing CK2 α or pcDNA3.1/myc-His(–) empty vector) using 3 μ l of FuGENE6 reagent (Roche). At 24 h after transfection, cells were partly lysed for detection of CK2 α overexpression, partly used for the analysis of viability upon drug treatment.

Cell lysis and western blot analysis

For total lysate preparation, cells were lysed as described by Di Maira *et al.* (2005). For soluble fraction and nuclear extract preparation, cells were lysed by the addition of hypertonic buffer, followed by extraction of nuclear proteins with a hypertonic buffer, as described by Ruzzene *et al.* (2002). For subcellular fractionation, cell lysis was performed by sonication in an isotonic buffer (20 mM Tris–HCl, pH 7.5, 0.25 M

saccharose, 2 mM EDTA, 2 mM EGTA, 2 mM dithiothreitol, protease inhibitor cocktail complete (Roche), 10 mM NaF, 1 μ M okadaic acid, 1 mM Na vanadate, followed by sequential centrifugation at $800 \times g$, 10 min (for nuclei precipitation), $8000 \times g$, 10 min (mitochondria-enriched fraction) and $140\,000 \times g$, 60 min (microsomes-enriched fraction and cytosol).

Protein concentration was determined by the Bradford method. Equal amounts of protein were loaded on 11% SDS–PAGE, blotted on Immobilon-P membranes (Millipore, Milano, Italy), and processed in western blot with the indicated antibody, detected by ECL (enhanced chemiluminescence, Amersham Biosciences, Milano, Italy). Quantitation of the signal was obtained by chemiluminescence detection on a Kodak Image Station 440CF and analysis with the Kodak 1D Image software (Rochester, NY, USA).

RT–PCR analysis

One microgram of total RNA, extracted from plated cells using SV Total RNA isolation system kit (Promega, Milano, Italy), were reverse transcribed in a MJ PT200 thermal cycler with Superscript II (Invitrogen), following manufacturer instructions. Progressive dilutions of the resulting cDNA were subjected to PCR amplification to detect β -actin (with specific primers from Promega) and CK2 α . (N terminus: 5'-GA CTACCAGCTGGTTTCGAAA-3' sense; 5'-CCCAGTCTATT AGTCGTA GC-3' antisense; C terminus: CGAGTTGC TTCCCGATACTT-5' sense; CGTGACTGGTGGTCATAT CG-3' antisense).

Immunoprecipitation experiments

About 50–100 μ g of cell proteins were used for CK2 or Akt immunoprecipitation, performed with 1–2 μ l of anti-CK2 α C-terminal antiserum (or pre-immune serum, as a control), or anti-Akt antibody, respectively, followed by addition of protein A-sepharose, as described by Sarno *et al.* (2001).

[³²P]orthophosphate cell labeling

Cells were incubated for the indicated times with culturing medium in the presence of 0.7 mCi/ml. [³²P]orthophosphate (GE Healthcare Life Science, Buckinghamshire, UK, PBS11). When present, CK2 inhibitors were added simultaneously to radioactive phosphate. The radioactivity incorporated into cell proteins was detected by SDS–PAGE and blotting, followed by analysis of the membrane with the instrument Cyclone (Packard).

CK2 activity assay

About 0.1–5 μ g. of lysate proteins were incubated for 10 min at 30°C with 0.1 mM CK2-specific peptide RRRADSDDDDD, in the presence of phosphorylation reaction mixture (Ruzzene *et al.*, 2002).

Doxorubicin accumulation measurement

Cells were seeded in 96-well plates and treated at 37°C with 25 μ M doxorubicin for 30 min, after 30 min preincubation in the absence or in the presence of CK2 inhibitors. After washing with phosphate-buffered saline, cells were lysed in the same buffer, supplemented with 1% (w/v) SDS. Doxorubicin content was determined fluorimetrically (λ_{exc} = 485 nm, λ_{em} = 590 nm), by comparison to standard curves obtained with known amount of the drug in the same lysis buffer.

Abbreviations

2a, 2-amino-4,5,6,7-tetrabromo-1*H*-benzimidazole; CK2, casein kinase 2; IQA, 5-oxo-5,6-dihydroindolo-(1,2-*a*)-quinazolin-7-yl]acetic acid; MDR, multidrug resistance; MNA, 1,8-dihydroxy-4-nitro-anthracene-9,10-dione; MNX, 1,8-dihydroxy-4-nitro-xanthen-9-one; MTT, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-3,5-diphenyltriazolium bromide; P-gp, P-glycoprotein; R-CEM, multidrug resistant CEM; S-CEM, wild type CEM; siRNA, short interference RNA; TBB, 4,5,6,

7-tetrabromobenzotriazole; TBI, 4,5,6,7-tetrabromobenzimidazole; Vbl, vinblastine.

Acknowledgements

We thank Dr S Sarno (Padova) for providing recombinant CK2, and Dr S Klumpp (Munster) for providing anti Tp117-BAD. The work was supported by grants from University of Padova (Progetto Ateneo 2005) to MR and from AIRC and EC (PRO-KINASERESEARCH 503467) to LAP.

References

- Ahmad KA, Harris NH, Johnson AD, Lindvall HC, Wang G, Ahmed K. (2007). Protein kinase CK2 modulates apoptosis induced by resveratrol and epigallocatechin-3-gallate in prostate cancer cells. *Mol Cancer Ther* **6**: 1006–1012.
- Ahmad KA, Wang G, Slaton J, Unger G, Ahmed K. (2005). Targeting CK2 for cancer therapy. *Anticancer Drugs* **16**: 1037–1043.
- Ahmed K, Gerber DA, Cochet C. (2002). Joining the cell survival squad: an emerging role for protein kinase CK2. *Trends Cell Biol* **12**: 226–230.
- Allende CC, Allende JE. (1998). Promiscuous subunit interactions: a possible mechanism for the regulation of protein kinase CK2. *J Cell Biochem Suppl* **30-31**: 129–136.
- Borst P. (1997). Multidrug resistant proteins. *Semin Cancer Biol* **8**: 131–134.
- Cenni V, Maraldi NM, Ruggeri A, Secchiero P, Del Coco R, De Pol A et al. (2004). Sensitization of multidrug resistant human osteosarcoma cells to Apo2 Ligand/TRAIL-induced apoptosis by inhibition of the Akt/PKB kinase. *Int J Oncol* **25**: 1599–1608.
- De Moliner E, Moro S, Sarno S, Zagotto G, Zanotti G, Pinna LA et al. (2003). Inhibition of protein kinase CK2 by anthraquinone-related compounds. A structural insight. *J Biol Chem* **278**: 1831–1836.
- Di Maira G, Salvi M, Arrigoni G, Marin O, Sarno S, Brustolon F et al. (2005). Protein kinase CK2 phosphorylates and upregulates Akt/PKB. *Cell Death Differ* **12**: 668–677.
- Dupuis ML, Tombesi M, Sabatini M, Cianfriglia M. (2003). Differential effect of HIV-1 protease inhibitors on P-glycoprotein function in multidrug-resistant variants of the human CD4⁺ T lymphoblastoid CEM cell line. *Chemotherapy* **49**: 8–16.
- Filhol O, Martiel JL, Cochet C. (2004). Protein kinase CK2: a new view of an old molecular complex. *EMBO Rep* **5**: 351–355.
- Giovannetti E, Mey V, Danesi R, Mosca I, Del Tacca M. (2004). Synergistic cytotoxicity and pharmacogenetics of gemcitabine and pemetrexed combination in pancreatic cancer cell lines. *Clin Cancer Res* **10**: 2936–2943.
- Glavy JS, Horwitz SB, Orr GA. (1997). Identification of the *in vivo* phosphorylation sites for acidic-directed kinases in murine mdr1b P-glycoprotein. *J Biol Chem* **272**: 5909–5914.
- Guerra B, Issinger OG. (1999). Protein kinase CK2 and its role in cellular proliferation, development and pathology. *Electrophoresis* **20**: 391–408.
- Guo C, Yu S, Davis AT, Wang H, Green JE, Ahmed K. (2001). A potential role of nuclear matrix-associated protein kinase CK2 in protection against drug-induced apoptosis in cancer cells. *J Biol Chem* **276**: 5992–5999.
- Kelliher MA, Seldin DC, Leder P. (1996). Tal-1 induces T cell acute lymphoblastic leukemia accelerated by casein kinase IIalpha. *EMBO J* **15**: 5160–5166.
- Klumpp S, Maurer A, Zhu Y, Aichele D, Pinna LA, Kriegstein J. (2004). Protein kinase CK2 phosphorylates BAD at threonine-117. *Neurochem Int* **45**: 747–752.
- Landesman-Bollag E, Channavajhala PL, Cardiff RD, Seldin DC. (1998). p53 deficiency and misexpression of protein kinase CK2alpha collaborate in the development of thymic lymphomas in mice. *Oncogene* **16**: 2965–2974.
- Ling V. (1997). Multidrug resistance: molecular mechanisms and clinical relevance. *Cancer Chemother Pharmacol* **40**: S3–S8.
- Litchfield DW. (2003). Protein kinase CK2: structure, regulation and role in cellular decisions of life and death. *Biochem J* **369**: 1–15.
- Matsumoto Y, Takano H, Kunishio K, Nagao S, Fojo T. (2001). Expression of drug resistance genes in VP-16 and mAMSA-selected human carcinoma cells. *Jpn J Cancer Res* **92**: 778–784.
- Meggio F, Pinna LA. (2003). One-thousand-and-one substrates of protein kinase CK2? *FASEB J* **17**: 349–368.
- Meggio F, Pagano MA, Moro S, Zagotto G, Ruzzene M, Sarno S et al. (2004). Inhibition of protein kinase CK2 by condensed polyphenolic derivatives. An *in vitro* and *in vivo* study. *Biochemistry* **43**: 12931–12936.
- Orlandini M, Semplici F, Ferruzzi R, Meggio F, Pinna LA, Oliviero S. (1998). Protein kinase CK2alpha' is induced by serum as a delayed early gene and cooperates with Ha-ras in fibroblast transformation. *J Biol Chem* **273**: 21291–21297.
- Pagano MA, Andrzejewska M, Ruzzene M, Sarno S, Cesaro L, Bain J et al. (2004). Optimization of protein kinase CK2 inhibitors derived from 4,5,6,7-tetrabromobenzimidazole. *J Med Chem* **47**: 6239–6247.
- Pinna LA. (1990). Casein kinase 2: an 'eminence grise' in cellular regulation? *Biochim Biophys Acta* **1054**: 267–284.
- Pinna LA. (2002). Protein kinase CK2: a challenge to canons. *J Cell Sci* **115**: 3873–3878.
- Ruzzene M, Penzo D, Pinna LA. (2002). Protein kinase CK2 inhibitor 4,5,6,7-tetrabromobenzotriazole (TBB) induces apoptosis and caspase-dependent degradation of haematopoietic lineage cell-specific protein 1 (HS1) in Jurkat cells. *Biochem J* **364**: 41–47.
- Salvi M, Sarno S, Marin O, Meggio F, Itarte E, Pinna LA. (2006). Discrimination between the activity of protein kinase CK2 holoenzyme and its catalytic subunits. *FEBS Lett* **580**: 3948–3952.
- Sarno S, de Moliner E, Ruzzene M, Pagano MA, Battistutta R, Bain J et al. (2003). Biochemical and three-dimensional-structural study of the specific inhibition of protein kinase CK2 by [5-oxo-5,6-dihydroindolo-(1,2-*a*)-quinazolin-7-yl]-acetic acid (IQA). *Biochem J* **374**: 639–646.
- Sarno S, Reddy H, Meggio F, Ruzzene M, Davies SP, Donella-Deana A et al. (2001). Selectivity of 4,5,6,7-tetrabromobenzotriazole, an ATP site-directed inhibitor of protein kinase CK2 ('casein kinase-2'). *FEBS Lett* **496**: 44–48.

- Sarno S, Ruzzene M, Frascella P, Pagano MA, Meggio F, Zambon A et al. (2005). Development and exploitation of CK2 inhibitors. *Mol Cell Biochem* **274**: 69–76.
- Sarno S, Salvi M, Battistutta R, Zanotti G, Pinna LA. (2005a). Features and potentials of ATP-site directed CK2 inhibitors. *Biochim Biophys Acta* **1754**: 263–270.
- Sawicka M, Kalinowska M, Skierski J, Lewandowski W. (2004). A review of selected anti-tumour therapeutic agents and reasons for multidrug resistance occurrence. *J Pharm Pharmacol* **56**: 1067–1081.
- Seeber S, Issinger OG, Holm T, Kristensen LP, Guerra B. (2005). Validation of protein kinase CK2 as oncological target. *Apoptosis* **10**: 875–885.
- Seldin DC, Leder P. (1995). Casein kinase II alpha transgene-induced murine lymphoma: relation to theileriosis in cattle. *Science* **267**: 894–897.
- Szyszk R, Grankowski N, Felczak K, Shugar D. (1995). Halogenated benzimidazoles and benzotriazoles as selective inhibitors of protein kinases CK I and CK II from *Saccharomyces cerevisiae* and other sources. *Biochem Biophys Res Commun* **208**: 418–424.
- Tapia JC, Torres VA, Rodriguez DA, Leyton L, Quest AF. (2006). Casein kinase 2 (CK2) increases survivin expression via enhanced beta-catenin-T cell factor/lymphoid enhancer binding factor-dependent transcription. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**: 15079–15084.

Research Article

Phosphorylation and activation of the atypical kinase p53-related protein kinase (PRPK) by Akt/PKB

S. Facchin^{a,†}, M. Ruzzene^{a,b,†}, C. Peggion^a, G. Sartori^a, G. Carignani^a, O. Marin^{a,b}, F. Brustolon^{a,b}, R. Lopreiato^a and L. A. Pinna^{a,b,*}

^a Department of Biological Chemistry and CNR Institute of Neurosciences, University of Padova, Viale G. Colombo 3, 35121 Padova (Italy), Fax: +39 049 8073310, e-mail: lorenzo.pinna@unipd.it

^b Venetian Institute for Molecular Medicine Padova (VIMM), Padova (Italy)

Received 12 April 2007; received after revision 30 July 2007; accepted 7 August 2007
Online First 23 August 2007

Abstract. p53-related protein kinase (PRPK), the human homologue of yeast Bud32, belonging to a small subfamily of atypical protein kinases, is inactive unless it is previously incubated with cell lysates. Here we show that such an activation of PRPK is mediated by another kinase, Akt/PKB, which phosphorylates PRPK at Ser250. We show that recombinant PRPK is phosphorylated *in vitro* by Akt and its phospho-form is recognized by a Ser250-phospho-specific antibody; that cell co-transfection with Akt along with wild-type

PRPK, but not with its Ser250Ala mutant, results in increased PRPK phosphorylation; and that the phosphorylation of p53 at Ser15, the only known substrate of PRPK, is markedly increased by co-transfection of Akt with wild-type PRPK, but not PRPK dead mutant, and is abrogated by cell treatment with the Akt pathway inhibitor LY294002. Our data disclose an unanticipated mechanism by which PRPK can be activated and provide a functional link between this enigmatic kinase and the Akt signaling pathway.

Keywords. PRPK, Bud32, piD261, PKB/Akt, protein kinases.

Introduction

The term piD261, initially applied to a putative protein kinase composed of only 261 residues encoded by the yeast *YGR262c* gene [1] denotes a family of protein kinases with atypical features whose members are present throughout the evolutionary scale from Archaea to human, but not in eubacteria, suggesting that they make up a primordial branch of the eukaryotic protein kinases superfamily [2]. The best-characterized member of the whole family is the yeast kinase, renamed Bud32, in the *Saccharomyces* genome database, which can be expressed in

bacteria in a catalytically active form, as judged from its ability to autophosphorylate and to phosphorylate, albeit with low efficiency, casein and other proteins and peptides *in vitro* [3, 4]. This has made possible a thorough structure-function analysis of Bud32, outlining a number of unusual biochemical features, notably the misplacement of the essential lysine in subdomain II and the replacement of the homolog of highly conserved PKA Lys168 by a threonine [5]. It was also possible to show that Bud32 catalytic activity is required *in vivo* to fully rescue the severe slow-growth phenotype due to disruption of its gene [5, 6], although catalytically inactive mutants can also partially restore the hormonal phenotype [6]. Functional information has been provided by the identification of yeast protein complexes including Bud32 [7] and by a

[†] These two authors contributed equally to this work.

* Corresponding author.

two-hybrid approach [6]. The panel of interacting proteins disclosed by both approaches include, among others, a putative glycoprotease (Kae1) and glutaredoxin 4. This latter is also readily phosphorylated *in vitro* by Bud32, suggesting that it represents one of its physiological targets. On the other hand Kae1 and Bud32 participate with other small proteins in an evolutionary conserved complex named EKC (endopeptidase kinase complex) [8] or KEOPS (kinase, putative endopeptidase and other proteins of small size) [9]. Two independent studies have demonstrated a role for this complex both in transcription regulation [8] and telomere maintenance/homeostasis [9].

The functional homology between Bud32 and its human counterpart, p53-related protein kinase (PRPK), is supported on one hand by the ability of PRPK to partially complement the Bud32-deficiency phenotype in yeast, on the other by the ability of Bud32 *in vitro* to phosphorylate human p53 at Ser15 [10], reported to be a target of PRPK [11]. At variance with Bud32, however, recombinant PRPK is entirely devoid of catalytic activity, and consequently classified among “pseudokinases” [12], a circumstance that has until now hampered any kind of biochemical characterization. Detectable catalytic activity is conferred to immobilized GST-PRPK (bound to glutathione-Sepharose) by treatment with COS-7 cells lysates [11], suggesting that the cellular environment contains component(s) capable to activate PRPK.

This prompted us to start an investigation aimed at disclosing the mechanism(s) by which PRPK is up-regulated in living cells. Here we report on experiments showing that PRPK is phosphorylated both *in vitro* and *in vivo* by Akt/PKB at a highly conserved C-terminal residue (Ser250) and we present evidence that such a phosphorylation correlates with increased PRPK catalytic activity

Materials and methods

Reagents and plasmids

GST-PRPK [wild-type (wt) and mutagenized forms], GFP-PRPK, p53-GST and PRPK-His₆ were purified as described below, or as described by Facchin et al. [10]. Akt1/PKB α was either purchased from Upstate (NY), or kindly provided by Dr., H. McLauchlan and Dr., J. Hastie (Dundee). In this latter case, Akt was expressed in bacteria and activated by exhaustive phosphorylation at Thr308 and Ser473; inactive (non-phosphorylated) Akt was used as a negative control. LY294002 inhibitor, phospho-(Ser/Thr) Akt substrate antibody, total p53, phospho-p53 Ser15, phospho-GSK3 β Ser9, phospho-Akt Thr308 antibodies were purchased from Cell Signaling Technology.

Anti-c-myc was purchased from Sigma. Phospho-Akt Ser473, total Akt1 and phospho p70 S6 kinase antibodies were from Santa Cruz Biotechnology.

Anti-PRPK and anti-phospho Ser250 PRPK antibodies were generated using the peptide CEVRLRGRKRSMGLG or the phosphopeptide CRGRKRpSMGLG, respectively. Peptides were synthesized using an automated peptide synthesizer (Model 432 Applied Biosystems, CA) and 9-fluorenylmethoxycarbonyl (Fmoc) chemistry [13]. Phosphoserine was coupled as Fmoc-Ser[PO(OBzl)OH]-OH (Novabiochem, Switzerland).

The antibodies, conjugated to keyhole limpet hemocyanin, were raised in New Zealand rabbits, against the two synthetic peptides. The antisera were purified using an immobilized peptide affinity resin (Sulfo Link Coupling Gel, Pierce, UK) according to manufacture's instructions. The plasmid pCMV6-HA-Myr-AKT1 was kindly supplied by Dr Sandra Marmiroli (Modena).

Cloning of PRPK coding sequence

The PRPK coding sequence was amplified by PCR from the, I.M.A.G.E. clone ID 3899629 using the PRPK-S (5'-CGGATCCTCATGGCGGCGGCCA-GAGC) and the PRPK-AS (5'-GCTCGAGCTTC-TACCCAACCATGGACC) primers, which introduce the restriction sites *Bam*HI and *Xho*I (underlined), respectively, at the 5' and 3' end of the PRPK cDNA. The PCR product was directly cloned in the pCR-Blunt II TOPO vector using the Zero Blunt TOPO PCR Cloning Kit (Invitrogen). This recombinant plasmid, TOPO-PRPK, was used in all subsequent cloning steps.

Overexpression of PRPK and PRPK Ser250Ala

The PRPK cDNA sequence, isolated from TOPO-PRPK plasmid by digestion with the *Bam*HI and *Xho*I enzymes, was ligated into the pcDNA 3.0 plasmid (Invitrogen) digested with the same enzymes. The resulting recombinant plasmid (pcDNA-PRPK) was used as DNA template to obtain the S250A PRPK and D163A PRPK mutants by the QuikChangeTM Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene cat. no. 200518). The mutagenic primers were designed according to the instruction manual. The constructs obtained were verified by DNA sequencing and used to overexpress the wt and mutagenized forms of PRPK in mammalian cells.

Expression and purification of PRPK from bacterial cells

Purification of 6His-PRPK. The same *Bgl*II-*Sal*I fragment containing the PRPK coding sequence and

previously used to obtain the pGFP-PRPK plasmid (see above) was ligated into the pQE 81L plasmid (Qiagen) digested with the same enzymes. The resulting pQE-PRPK recombinant plasmid was used to induce the overexpression of a 6His N-terminal tagged form of the PRPK protein in bacterial cells. The, *E. coli* strain BL21(DE3), transformed with pQE-PRPK plasmid, was grown in LB medium at 16°C until OD₆₀₀ reached 0.7, when transcription of PRPK cDNA coding sequence was induced with 0.15 mM isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG). After 12–16 h of further incubation, bacteria were harvested and resuspended in 25 ml purification buffer (20 mM Tris-HCl pH 7.6, 0.3 M NaCl, 10% glycerol, 10 mM imidazole, 0.02 mM PMSF) per liter of culture. Purification was performed according to the protocol of manufacturer using an affinity column containing Ni-NTA-agarose (Qiagen). PRPK-His₆ was eluted with 200 mM imidazole.

Purification of GST-PRPK. The PRPK cDNA sequence, isolated from TOPO-PRPK plasmid by digestion with *Bam*HI and *Xho*I enzymes, was ligated into the pGEX plasmid (GE Healthcare) digested with the same enzymes. The resulting recombinant plasmid, pGEX-PRPK allows the inducible overexpression in bacterial cells of the PRPK protein fused, at the N-terminal end, to the glutathione S-transferase (GST) protein. The, *E. coli* strain BL21(DE3), transformed with pGEX-PRPK plasmid, was grown in LB medium at 16°C until OD₆₀₀ reached 0.7, when transcription of the PRPK cDNA coding sequence was induced with 0.15 mM IPTG. After 12–16 h of further incubation, bacteria were harvested and resuspended in 30 ml PBS and 1% Triton X-100 per 4 g pellet. Purification was performed according to the protocol of the manufacturer using an affinity column containing glutathione-Sepharose 4B (GE Healthcare). GST-PRPK was eluted with 20–30 mM reduced glutathione in 50 mM Tris-HCl, pH 8.0 and finally dialyzed and concentrated in 20 mM Tris-HCl pH 7.5 and 50% glycerol.

Protein concentration was determined by the method of Bradford, using bovine serum albumin as a standard.

Cell culture and transfection

The human leukemia Jurkat T cell and human embryonic kidney epithelial HEK 293T cells were maintained in the appropriate medium, RPMI 1640 (Sigma) for Jurkat, Dulbecco's modified Eagle's medium (Sigma) for HEK 293T, supplemented with 10% fetal calf serum, 2 mM L-glutamine, 100 U/ml penicillin and 100 μM streptomycin, in an atmosphere containing 5% CO₂. HEK 293T cells, plated onto 60-

mm-diameter dishes at about 80% confluency, were transiently transfected with 1–3 μg cDNA by standard calcium phosphate procedure. The transfection mixture was removed after 8–16 h, and cells were lysed 24–48 h after transfection.

Cell lysis and Western blot analysis

For lysate preparation, cells were lysed as described by Di Maira et al. [14]. For nuclear extract preparation, cells were lysed by the addition of hypotonic buffer, followed by extraction of nuclear proteins with a hypertonic buffer, as described by Ruzzene et al. [15]. Equal amount of protein were loaded on 11% SDS-PAGE, blotted on Immobilon-P membranes (Millipore), and processed by Western blot with the indicated antibody, detected by ECL (enhanced chemiluminescence, Amersham Biosciences). Quantitation of the signal was obtained by chemiluminescence detection on Kodak Image Station 440cf and analysis with the Kodak 1D image software.

PRPK-myc construct and immunoprecipitation experiments

The PRPK cDNA sequence was amplified by PCR from the TOPO-PRPK plasmid (see above) using the PRPKMyc-S (5'-CTCGAGATGGCGGCGGCCA-GAGCTAC) and PRPKMyc-AS (5'-AAGCTTCC-CAACCATGGACCTC) primers that introduce the *Xho*I and *Hind*III restriction sites (underlined), respectively, at the 5' and 3' end of the PRPK cDNA. The PCR product was cloned again in a PCR-Blunt II TOPO vector, isolated from the latter recombinant plasmid by digestion with the *Xho*I and *Hind*III enzymes and then ligated into the pcDNA 3.1 plasmid (Invitrogen) digested with the same enzymes. The resulting construct, pcDNA-PRPK-cMyc/His was verified by DNA sequencing and used to overexpress a cMyc/6His C-terminal tagged form of the PRPK protein in mammalian cells.

Immunoprecipitations were performed by incubation of 80–100 μg cell lysate with the indicated antibody at 4°C overnight followed by addition of protein A-Sepharose beads (Sigma) as described by Sarno et al. [16].

In vitro phosphorylation of GST-PRPK and His-PRPK by Akt

Purified recombinant GST-PRPK (0.5 μg) or purified His-PRPK (0.5 μg) were incubated with recombinant Akt (0.06 μg) in the presence of 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 12 mM MgCl₂, 62 μM [γ-³²P]ATP (~5000 cpm/pmol), in a total volume of 20 μl, for 15 min at 30°C. Proteins were resolved by SDS-PAGE and analyzed by autoradiography.

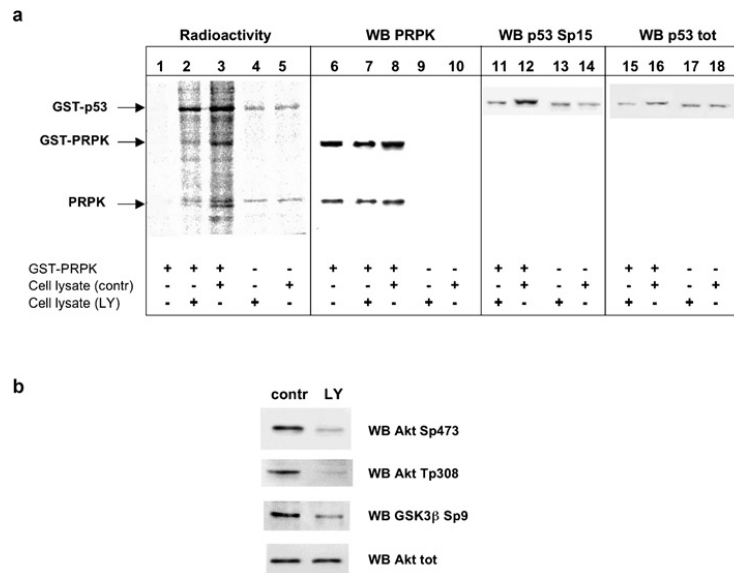


Figure 1. Adverse effect of cell treatment with the Akt pathway inhibitor LY294002 on the ability of cell lysates to evoke catalytic activity of PRPK. (a) Recombinant GST-PRPK, bound to glutathione-Sepharose beads, was incubated for 30 min with cell lysis buffer (lanes 1 and 6) or lysates from Jurkat cells (80 µg proteins, lanes 2–5 and 7–18) either treated or not with LY294002, as indicated. Beads were washed and incubated with GST-p53 and radioactive phosphorylation mixture. Proteins were separated by SDS-PAGE followed by blotting, and analyzed by autoradiography (lanes 1–5), Western Blot (WB) for PRPK (lanes 6–10), Western Blot for p53, either pSer15 (lanes 11–14) or total protein (lanes 15–18). Protein migrations, as detected by Western blots, are indicated on the left side of the figure. Apparently partial cleavage of GST-PRPK occurs during incubation, giving rise to free PRPK whose position is also indicated. (b) Lysates (10 µg proteins) from Jurkat cells, treated (LY) or not (contr) with LY294002, as in (a), were analyzed by Western blot with the indicated antibodies.

Treatment of GST-PRPK with Jurkat cell lysates

Recombinant GST-PRPK (1.5 µg), bound to glutathione-Sepharose beads, was incubated with cell lysis buffer or 80 µg of total proteins from lysate of Jurkat cells, previously treated or not for 6 h with 25 µM LY294002 inhibitor. Beads were then washed two times with 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.25 M saccharose, 5 mM EDTA, 1 µM PMSF and one time with 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, and incubated for 20 min at 30°C in presence of 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 10 mM MnCl₂, 50 µM [γ -³²P]ATP and 0.6 µg GST-p53. Proteins were separated by SDS-PAGE followed by blotting, and analyzed by autoradiography.

Statistical analysis

Each experiment was performed at least four times. Data were evaluated for their statistical significance with the paired Student's *t*-test. *p* values <0.05 were considered statistically significant.

Results

Activation of recombinant PRPK by cell lysates is abrogated by down-regulation of endogenous Akt

At variance with its yeast homologue, Bud32, whose recombinant form expressed in bacteria displays a significant, albeit modest, catalytic activity, detectable both in terms of autophosphorylation and using exogenous substrates like casein and p53 [3, 4], its human homologue, PRPK, under the same conditions is catalytically inactive, unless its recombinant GST fusion protein, bound to glutathione-Sepharose, is previously incubated with COS-7 cell lysates [11]. As also shown in Figure 1a, such a treatment is absolutely required to evoke the phosphoradiolabeling of p53, as well as of additional bands, two of which are accounted for by GST-PRPK and free PRPK, as judged from the corresponding Western blots. These radioactive bands seemingly reflect autophosphorylation of GST-PRPK and PRPK, which is partially cleaved under our experimental conditions. Phosphorylation of p53 was also monitored with a phospho-specific antibody that recognizes pSer15 (Fig. 1a, lanes 11–14), confirming that Ser15 is the phosphorylated p53 residue.

Considering that in Jurkat cells Akt is constitutively active, owing to lack of PTEN expression, and that the C-terminal segment of PRPK, highly conserved throughout the members of the piD261/Bud32 family of atypical protein kinases (see Fig. 2), includes a serine residue (Ser250) in the context of an Akt consensus (R-x-R-x-S/T-Hyd), we wanted to check if inactivation of endogenous Akt could influence the activation of GST-PRPK by Jurkat cell lysates. Jurkat cells were, therefore, treated with LY294002, an inhibitor of the Akt pathway [17]. As shown in Figure 1b, this treatment actually resulted in a drastic drop in Akt activity, as judged from decreased phosphorylation of both Akt residues responsible for its activation (Thr308 and Ser473) and of the S9 of GSK 3 β , a typical endogenous Akt substrate. Interestingly, the same treatment resulted in a significant drop in the ability of the cell lysate to promote PRPK activation, as judged from reduced phosphorylation of p53 and PRPK autophosphorylation (Fig. 1a, lanes 2, 3 and 11, 12). The residual phosphorylation of p53 is likely contributed by protein kinases different from PRPK, present in the cell lysate.

<i>H. sapiens</i>	231	KARFVLKKLDEVRLRGRKRSMVG	253
<i>R. norvegicus</i>	221	KSDPVLKKLDEVRLRGRKRSMVG	244
<i>G. gallus</i>	298	KSGPVIKKLDEVRLRGRKRSMIG	321
<i>X. laevis</i>	214	KSGPVIKKLDEVRLRGRKRSMVG	237
<i>D. rerio</i>	208	KSSAVIKKLDDEVRLRGRKRSMVG	231
<i>D. melanogaster</i>	201	DEQAVLTKEFEVVRARGRKRTMIG	224
<i>A. thaliana</i>	203	QWSATFNKLAQVRORGRKRRTMIG	226
<i>S. cerevisiae</i>	238	KLKEVTIRRFEEVRLRGRKRSMIG	261
<i>S. pombe</i>	215	QSKATIRRFEEVVRMRGRKRRTMIG	238
<i>A. gambie</i>	209	HCKETIAKYEEVVRARGRKRTMVG	232
<i>T. cruzi</i>	233	KGSVTMARLEAVRARGRKRSMIG	256

Figure 2. Alignment of the C-terminal segment of human PRPK with those of its homologues from other organism reveals the conservation of an Akt consensus site (underlined). Amino acid sequence of human PRPK, *H. sapiens* (GenBank accession No. AB017505) is aligned with: *R. norvegicus* (GenBank accession no. XM 342580); *G. gallus* (GenBank accession no. XM 425703); *X. laevis* (EMBL accession no. AAH97750.1); *D. rerio* (EMBL accession no. AAH95119.1); *D. melanogaster* (EMBL accession no. CG10673-PA); *A. thaliana* (GenBank accession no. NM 122512.2); *S. cerevisiae* (EMBL accession no. P53323); *S. pombe* (EMBL accession no. SPAP27G11.07); *A. gambie* (GenBank accession no. XM 308396); *T. cruzi* (GenBank accession no. XM 816481.1). The putative phosphoacceptors site is denoted in bold, gray boxes denote identity.

In vitro phosphorylation of PRPK by Akt at Ser250

The above results supported the working hypothesis that activation of PRPK is promoted by Akt, possibly through the phosphorylation of Ser250, sitting in a typical Akt consensus sequence (see Fig. 2). To corroborate this hypothesis, *in vitro* phosphorylation experiments were performed, taking advantage of recombinant protein kinases and either a radioactive assay or a phospho-specific antibody that recognizes

phospho-Ser250. Firstly, we were able to show that indeed both GST-PRPK and His-tagged PRPK were phospho-radiolabeled upon incubation with [γ - 32 P]ATP, provided active Akt was also present (Fig. 3a). Next, the same experiment was run with cold ATP, and the phosphorylation of Ser250 was revealed using a phospho-specific antibody, which reacts with PRPK phosphorylated at Ser250 but not with its unphosphorylated form (Fig. 3b). A signal was evident that was entirely dependent on the presence of Akt, demonstrating that Akt phosphorylates PRPK at Ser250. As previously reported [11] and mentioned above, recombinant PRPK is catalytically inactive. In an attempt to correlate *in vitro* phosphorylation of recombinant PRPK with induction of its phosphotransferase activity, time course experiments were performed to increase the phosphorylation stoichiometry of PRPK by recombinant Akt. However, even on prolonging incubation for up to 2 h with repeated additions of Akt, only very low phosphorylation stoichiometries (ranging between 3 % and 5 %) were achieved (not shown), not sufficient to justify hardly reproducible appearance of PRPK activity, monitored on p53. It has to be assumed, therefore, that Akt-dependent PRPK activation observed using cell lysate, as described in the previous paragraph, is optimized by co-factors, which are lacking in the *in vitro* experiments run with just the two recombinant proteins.

Phosphorylation of PRPK at Ser250 in HEK 293T cells

Having determined that PRPK can be phosphorylated *in vitro* by Akt at its C-terminal highly conserved Ser250, we wanted to check if this phosphorylation also takes place in cells and might be related to the observed activation of PRPK upon incubation with cell lysates (see Fig. 1).

We, therefore, initially transfected HEK 293T with myc-tagged PRPK, either alone or in combination with Akt, in its form that is susceptible to myristoylation and thus constitutively activated. Immunoprecipitated myc-PRPK was then probed for Ser250 phosphorylation by Western blot with anti-pSer250 antibodies. As shown in Figure 4a, a weak immunoreaction was revealed also in the absence of transfected Akt, the intensity of which, however, was significantly increased in cells co-transfected with Myr-Akt. In this respect, in our experiments, endogenous Akt was already activated as cells were not deprived of serum.

In a parallel approach, advantage was taken of a PRPK mutant in which Ser250 was replaced by a non-phosphorylatable residue (S250A). In this case, phosphorylation of PRPK was detected using a commer-

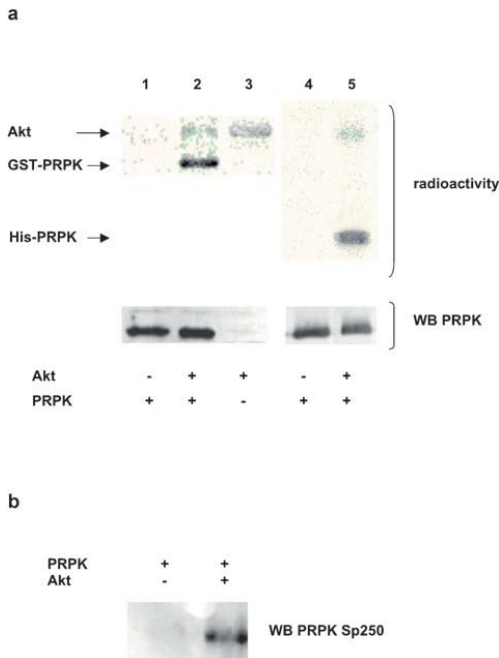


Figure 3. *In vitro* phosphorylation of PRPK by Akt. (a) GST-PRPK (lanes 1, 2) or PRPK-His-tagged (lanes 4, 5) were incubated with recombinant active Akt (from Upstate, NY) and a radioactive phosphorylation mixture, as described under Materials and methods. Lane 3: Control with Akt alone. Proteins were resolved by SDS-PAGE and analyzed by autoradiography or Western blot for PRPK, as indicated. Similar results were obtained using recombinant Akt, expressed in bacteria and activated by phosphorylation (see Materials and methods). No PRPK phosphorylation was observed using inactive Akt. (b) Blot corresponding to lanes 1 and 2 of (a) was analyzed by Western blot with PRPK phospho-specific pSer250 antibodies.

cially available antibody, which recognizes phosphorylated Akt substrates in general. As shown in Figure 4b, upon co-transfection with Akt, wt PRPK was recognized by the Akt phospho-substrate antibody, while the S250A mutant was not.

The role of Akt in the phosphorylation of PRPK at Ser250 in cells was demonstrated on one hand by the negative effect of the upstream inhibitor LY294002 (Fig. 4c); on the other hand, rapamycin, a specific blocker of mTOR [18], failed to reduce the phosphorylation of PRPK Ser250, ruling out the possibility that other kinases downstream of PI3K were involved.

Akt is directly responsible for PRPK activation in cells through phosphorylation of Ser250

Collectively taken, the above results show that, in HEK 293T cells, PRPK is phosphorylated by Akt, and that this phosphorylation mainly, if not exclusively,

occurs at Ser250. They do not answer the question, however, as to whether such a phosphorylation is related to the activation of PRPK.

To gain information about this point, we designed experiments aimed at linking the phosphorylation state of endogenous p53 Ser15 (the only known physiological target of PRPK) [11, 19] to conditions known to alter the level of PRPK Ser250 phosphorylation by Akt. In a first set of experiments, cells were transfected with PRPK, either wt or S250A mutant, in the absence or presence of the Akt pathway inhibitor LY294002. The phosphorylation of p53 Ser15 was then analyzed, using the phospho-specific antibody, in the nuclear extract of transfected cells, given the nuclear localization of ectopically expressed PRPK [19]. The results, displayed in Figure 5, show that transfection with wt PRPK significantly increases the phosphorylation of p53 at its Ser15 residue. This effect is much less pronounced when cells are transfected with the S250A PRPK mutant, instead of wt PRPK. Importantly, moreover, LY294002 drastically reduces the stimulatory effect of wt PRPK on p53 Ser15 phosphorylation, while displaying no effect on the residual p53 Ser15 phosphorylation occurring in cells transfected with the PRPK S250A mutant, consistent with the concept that Ser250 is essential to mediate the stimulatory effect of Akt. In this respect, LY294002 also inhibits the phosphorylation of p53 Ser15 in non-transfected cells, suggesting that the stimulatory effect of Akt is also exerted on the endogenous PRPK. On the other hand, the finding that transfection with PRPK S250A increases the phosphorylation of p53 Ser15 in the presence of LY294002, (compare lanes 1, 2 and 5, 6) suggests that, in a cellular environment, PRPK is endowed with a low, yet significant, basal activity regardless of its phosphorylation at Ser250. In a parallel set of experiments, the mTOR inhibitor rapamycin and the upstream Akt pathway inhibitor LY290042 were compared for their efficacy on p53 Ser15 phosphorylation (the phosphorylation state of Thr421/Ser424 p70 S6kinase and Ser473 Akt were analyzed as controls for the efficacy of cell treatment with rapamycin and LY290042, respectively). As shown in Figure 5, lanes 7–9, rapamycin, already shown to be ineffective on PRPK Ser250 phosphorylation (see Fig. 4c), also had no effect on p53 Ser15 phosphorylation, while suppressing, as expected, the phosphorylation of p70 S6 kinase. These data, in conjunction with drastic inhibition of both PRPK Ser250 (Fig. 4) and p53 Ser15 (Fig. 5) phosphorylation by LY290042 and *in vitro* experiments, strongly support the view that phosphorylation and up-regulation of PRPK by Akt is a direct event, not mediated by other kinase(s).

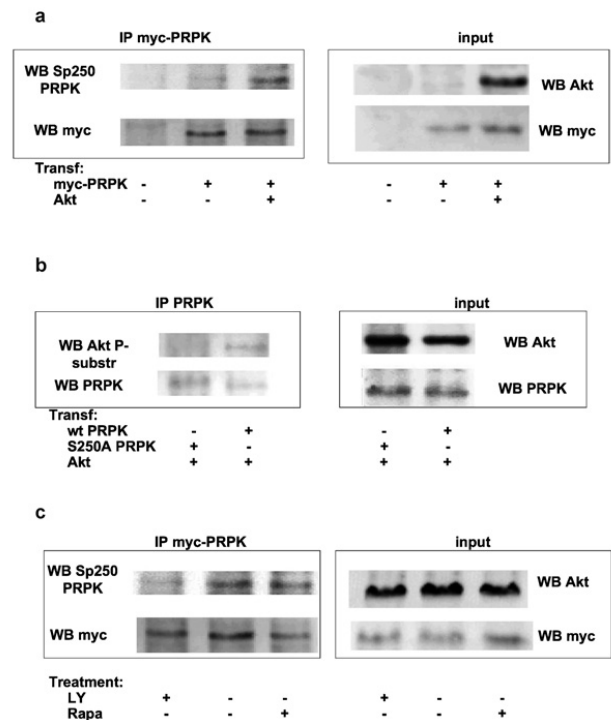


Figure 4. Akt promotes the phosphorylation of PRPK at Ser250 in HEK 293T cells. (a) HEK 293T were transfected with empty vector (-), myc-PRPK or myc-PRPK plus Akt, as indicated. PRPK was immunoprecipitated from cell lysate by an anti-myc antibody, and pellets were probed by Western blot with anti-Sp250 PRPK followed by anti-myc. (b) HEK 293T cells were transfected with Akt plus wt PRPK, or Ser250Ala PRPK mutant, as indicated. PRPK was immunoprecipitated from cell lysate (by an anti-PRPK antibody), and pellets were analyzed by Western blot with a phospho-(Ser/Thr) Akt substrate antibody followed by anti-PRPK antibodies. (c) HEK 293T cells were transfected with Akt plus wt PRPK, and treated, where indicated (+) with 25 μ M LY294002 or 0.25 μ M rapamycin during transfection, 2 h before lysis. PRPK was immunoprecipitated from cell lysate by an anti-myc antibody, and pellets were probed by Western blot with anti-Sp250 PRPK followed by anti-myc. To assess transfection, 20 μ g total cell lysates were analyzed by Western blot with the indicated antibodies, as shown in the right part of each panel (input).

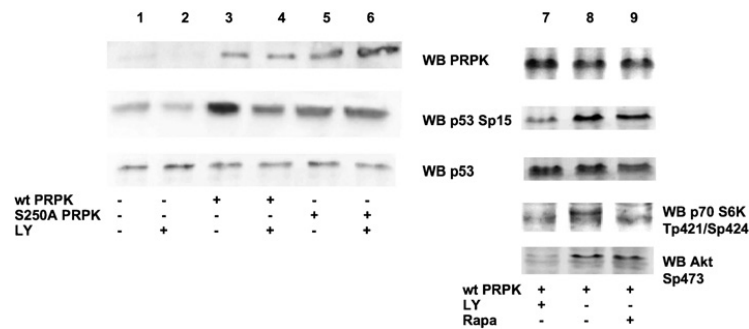


Figure 5. PRPK-dependent phosphorylation of p53 Ser15 in HEK 293T cells. HEK 293T cells were transfected with empty vector (-), wt PRPK, or Ser250Ala PRPK mutant, as indicated. Where present (+) 25 μ M LY294002 or 0.25 μ M rapamycin were added to the cells during transfection, 2 h before lysis. Aliquots corresponding to 20 μ g of nuclear extracts were loaded on SDS-PAGE and analyzed by Western blot with the indicated antibodies. Anti-phospho-p70 S6 kinase and anti-phospho-Akt were used as a control for the treatment with rapamycin and LY294002, respectively. Results shown in lanes 1–6 and lanes 7–9 derives from two different set of experiments.

Further support for the concept that endogenous p53 Ser15 phosphorylation by PRPK is enhanced by Akt, *via* phosphorylation of PRPK Ser250, was provided by experiments in which HEK 293T cells were co-transfected with Myr-Akt. We chose this cell line because it expresses large amounts of stabilized p53 protein [20]. Akt was transfected in its form susceptible to myristoylation, and is thus constitutively active; the endogenous Akt present in HEK 293T cells was also active since we did not deprive cells from serum. This accounts for the stimulation of p53 Ser15 phosphorylation upon transfection of PRPK alone (Fig. 6, compare lanes 1 and 2). Interestingly, transfection with Akt potentiates the beneficial effect exerted by wt PRPK alone on p53 Ser15 phosphorylation, while having no effect on the modest stimulation promoted by the PRPK S250A mutant. The beneficial effect observed upon transfection of Akt alone (lane 6 as compared to lane 1), on the other hand, is likely due to the phosphorylation of endogenous PRPK Ser250, as it is abrogated by co-transfection with the PRPK S250A mutant (compare lanes 5 and 4, see also the bar graph for values normalized to the p53 total protein amount), possibly acting as a dominant negative in this respect.

To corroborate the concept that PRPK catalytic activity was responsible for the phosphorylation of p53 Ser15, a PRPK dead mutant was generated by replacing Asp163 (homologue to essential Bud32 Asp166 acting as the catalytic base [5]) with Ala. As shown in Figure 7, at variance with wt PRPK, transfection of which correlates with increased p53 Ser15 phosphorylation, transfection with the PRPK D163A dead mutant fails to promote any similar effect. Indeed, the weakness of the p53 pSer15 signal observed upon PRPK D163A mutant transfection suggests that even endogenous phosphorylation is reduced, consistent with a behavior of the dead mutant as a dominant negative.

In Figure 7 it is also evident that the kinase dead mutant of PRPK is not only unable to induce the p53 Ser15 phosphorylation, but also totally unresponsive to the cotransfection of Akt

Discussion

While a considerable amount of information is already available concerning the biochemical properties of yeast Bud32 and the nature of several proteins interacting with it [4–9], our knowledge about the mechanistic features and biological role(s) of its human homologue, PRPK, are very limited, owing to the difficulty to obtain this putative kinase in a catalytically active form. PRPK was firstly cloned

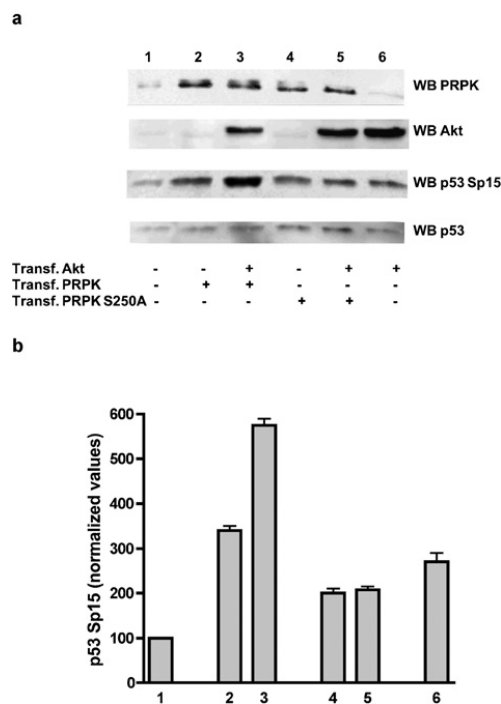


Figure 6. Akt potentiation of p53 Ser15 phosphorylation by wt PRPK but not by PRPK Ser250Ala mutant. (a) HEK 293T cells were transfected with empty vector (-), wt PRPK, or PRPK Ser250Ala mutant, alone or in combination with Akt, as indicated. Aliquots corresponding to 20 µg nuclear extracts were loaded on SDS-PAGE and analyzed by Western blot with the indicated antibodies. (b) Bars show the quantification of pSer15 p53 signal from lanes as in (a), obtained by Kodak Image Station 440CF. Values have been normalized to the p53 total protein amount, and are shown in arbitrary units, assigning 100 to the p53 pSer15 of non-treated, non-transfected cells (lane 1) (means values ± SEM from four experiments).

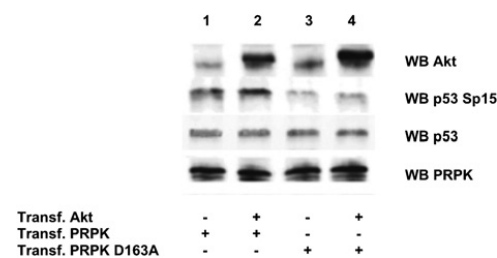


Figure 7. PRPK catalytic activity is required for p53 Ser15 phosphorylation. HEK 293T cells were transfected with empty vector (-), wt PRPK, or PRPK Asp163Ala mutant, alone or in combination with Akt, as indicated. Aliquots corresponding to 20 µg nuclear extracts were loaded on SDS-PAGE and analyzed by Western blot with the indicated antibodies.

from an interleukin-2-activated cytotoxic T cell subtraction library and shown to up-regulate transcriptional activity of p53 once transfected in COS-7 cells [11], from which its acronym derives, "p53-related protein kinase". Recombinant GST-PRPK was also shown to interact with p53 and, although devoid *per se* of catalytic activity, it proved able to phosphorylate p53 at Ser15 once immobilized to glutathione-Sepharose and incubated with COS-7 cell lysates [11].

The aim of this work was to gain information about the mechanism(s) responsible for such an activation of PRPK by cell lysates, which is presumably also responsible for up-regulation of PRPK in living cells. Our attention was attracted by the unique structural features of the PRPK C-terminal segment. Although this is outside the *bona fide* kinase domain, it is almost 100% conserved between PRPK and its yeast homologue Bud32 (as well as the other members of the pD261 family) (Fig. 2), while the overall identity between the kinase domains is about 30%. Interestingly, this highly conserved stretch includes a serine (Ser250 in PRPK) displaying the consensus of typical Akt phosphoacceptor sites (R-x-R-x-S-Hyd). This prompted us to elaborate on the working hypothesis that Akt might be implicated in the activation of PRPK. A preliminary observation supporting the consistency of this hypothesis was provided by a set of experiments run by analogy to those of Abe et al. [11], in which the lysates used to activate the immobilized GST-PRPK were obtained from Jurkat cells treated with LY294002, a compound expected to prevent the activation of endogenous Akt [17]. At variance with lysates from control cells, these proved unable to promote PRPK-dependent phosphorylation of p53 (see Fig. 1). In Jurkat cells the Akt pathway is constitutively on, due to the lack of PTEN, the lipid phosphatase committed to the dephosphorylation of PIP3, which triggers the first step of Akt activation by recruiting the kinase to the membrane; an effective way to turn off this pathway is to block PIP3 synthesis by the PI3K-specific inhibitor LY294002. Therefore, the adverse effect of LY294002 treatment on the ability of cell lysates to activate PRPK was a strong indication for the implication of the Akt pathway in such an activation.

The direct implication of Akt itself, on the other hand, is consistent with *in vitro* experiments showing that Akt is indeed able to phosphorylate PRPK at the expected phosphoacceptor site, as judged from detection with phospho-specific anti pSer250 antibodies. The ability of Akt to promote the phosphorylation of PRPK at Ser250 has been confirmed in HEK 293T cells transfected with either PRPK or its Ser250Ala mutant, alone or in conjunction with Akt. All data obtained are consistent with a scenario whereby the

conserved C-terminal segment of PRPK is also phosphorylated by Akt in living cells, since phosphorylation is enhanced by co-transfection with Akt and is abrogated by mutating PRPK Ser250 to alanine. This latter outcome (see Fig. 4b) supports the view that Ser250 is the main, if not the only, target for Akt in PRPK.

In addition, we were able to show that phosphorylation by Akt leads to an up-regulation of PRPK catalytic activity, as judged from p53 phosphorylation at its Ser15 residue. This latter reached its maximal level under conditions where wt PRPK, but not its S250A mutant, is expressed in the absence of LY294002, which otherwise would prevent Akt activation. The level of Ser15 p53 phosphorylation, moreover, could be further increased by co-transfecting cells with Akt and wt PRPK, but not with its Ser250Ala mutant (Fig. 6, compare lanes 2/3 and 4/5). The finding that LY294002 also reduces p53 Ser15 phosphorylation in the absence of ectopically expressed PRPK (Fig. 5, lanes 1 and 2) may be held as an indication that endogenous PRPK is responsible for such a residual phosphorylation of p53 Ser15. On the other hand, cell treatment with rapamycin, a specific inhibitor of mTOR [18], fails to prevent the phosphorylation of either PRPK Ser250 or p53 Ser15, consistent with the view that PRPK is directly targeted by Akt in the cells.

This would be also consistent with the beneficial effect of transfecting cells with Akt alone (Fig. 6, lane 6), which would saturate with phosphate Ser250 of endogenous PRPK. Although it is possible that another kinase activated through the Akt pathway is also implicated, the crucial importance of PRPK catalytic activity is highlighted by the negligible p53 Ser15 phosphorylation observed upon transfection of the PRPK dead mutant D163A (see Fig. 7). Our data provide the first incontrovertible evidence that PRPK operates as a *bona fide* protein kinase, since the replacement of the aspartate (D163) homologue to the catalytic base of the other protein kinases [5] suppresses its phosphotransferase activity.

Our data are consistent with a model in which PRPK is also endowed with a basal activity in the cellular environment independently of Akt. In fact, the overexpression of the S250A PRPK mutant induces a significant increase of p53 Ser15 phosphorylation, which in some experiments is not much lower than that induced by overexpression of wt PRPK (see for example results shown in Fig. 6), in particular whenever Akt is inactivated (see lanes with LY294002 treatment in Fig. 5). However, the significant difference between the activity of wt PRPK and S250A PRPK mutant, observed in case of Akt co-expression, strongly indicates that a further marked activation of

PRPK is promoted by an Akt-dependent mechanism, strictly requiring the presence of the Ser250 target site. In summary, our data definitely correlate PRPK functionality to the Akt pathway and show that direct phosphorylation of p53 on Ser15 also occurs *in vivo*, thus providing evidence for a novel link between Akt and p53, independent of MDM2 [21], as well as of FOXO3a *via* MnSOD, as recently proposed [22]. Assuming that PRPK plays a role similar to its yeast homologue Bud32 in forming complexes such as the telomere regulator KEOPS [9], it would be tempting to include PRPK, under the supervision of the Akt pathway, in the list of kinases, such as ATM/ATR [23] and Akt itself [24, 25], related to telomere disfunctions. It will be also interesting to check whether Bud32, whose C-terminal Akt consensus site is highly conserved, is also susceptible to phosphorylation and up-regulation by the yeast Akt homologue, Sch9, as suggested by recent results in our laboratory (Peggon et al., manuscript in preparation).

Acknowledgments. This work was supported by grants from: Associazione Italiana per la Ricerca sul Cancro (AIRC), European Commission (EC) PRO-KINASE-RESEARCH 503467 and University of Padova, Progetto di Ateneo 2005.

- Clemente, M. L., Sartori, G., Cardazzo, B. and Carignani, G. (1997) Analysis of an 11.6 kb region from the right arm of chromosome VII of *Saccharomyces cerevisiae* between the RAD2 and the MES1 genes reveals the presence of three new genes. *Yeast* 13, 287 – 290.
- Leonard, C. J., Aravind, L. and Koonin, E. V. (1998) Novel families of putative protein kinases in bacteria and archaea: evolution of the “eukaryotic” protein kinase superfamily. *Genome Res.* 10, 1038 – 1047.
- Stocchetto, S., Marin, O., Carignani, G. and Pinna, L. A. (1997) Biochemical evidence that *Saccharomyces cerevisiae* YGR262c gene, required for normal growth, encodes a novel Ser/Thr-specific protein kinase. *FEBS Lett.* 414, 171 – 175.
- Facchin, S., Sarno, S., Marin, O., Lopreiato, R., Sartori, G. and Pinna, L. A. (2002) Acidophilic character of yeast PID261/BUD32, a putative ancestor of eukaryotic protein kinases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 296, 133 – 171.
- Facchin, S., Lopreiato, R., Stocchetto, S., Arrigoni, G., Cesaro, L., Marin, O., Carignani, G. and Pinna, L. A. (2002) Structure-function analysis of yeast piD261/Bud32, an atypical protein kinase essential for normal cell life. *Biochem. J.* 364, 457 – 463.
- Lopreiato, R., Facchin, S., Sartori, G., Arrigoni, G., Casonato, S., Ruzzene, M., Pinna, L. A. and Carignani, G. (2004) Analysis of the interaction between piD261/Bud32, an evolutionarily conserved protein kinase of *Saccharomyces cerevisiae*, and the Grx4 glutaredoxin. *Biochem. J.* 377, 395 – 405.
- Ho, Y., Gruhler, A., Heilbut, A., Bader, G., Moore, L., Adams, S. L., Millar, A., Taylor, P., Bennett, K., Boutilier, K., Yang, L., Wolting, C. et al. (2002) Systematic identification of protein complexes in *Saccharomyces cerevisiae* by mass spectrometry. *Nature* 415, 180 – 183.
- Kisseleva-Romanova, E., Lopreiato, R., Baudin-Baillieu, A., Ilan, L., Rousselle J.-C., Namane, A., Mann, C. and Libri, D. (2006) Yeast homolog of a cancer-testis antigen defines a new transcription complex. *EMBO J.* 25, 3576 – 3585.
- Downey, M., Houlswort, R., Maringe, L., Rollic, A., Brehme, M., Galicia, S., Guillard, S., Partington, M., Zubko, M. K., Krogan, N. J., Emili, A., Greenblatt, J. F. et al. (2006), A genome wide screen identifies the evolutionarily conserved KEOPS complex as a telomere regulator. *Cell* 124, 1155 – 1168.
- Facchin, S., Lopreiato, R., Ruzzene, M., Marin, O., Sartori, G., Götz, C., Montenarh, M., Carignani, G. and Pinna, L. A. (2003) Functional homology between yeast piD261/Bud32 and human PRPK: both phosphorylate p53 and PRPK partially complements piD261/Bud32 deficiency. *FEBS Lett.* 549, 63 – 66.
- Abe, Y., Matsumoto, S., Wei, S., Nezu, K., Myoshi, A., Kito, K., Ueda, N., Shigemoto, K., Hitsumoto, Y., Nikawa, J. and Enomoto, Y. (2001) Cloning and characterization of a p53-related protein kinase expressed in interleukin-2-activated cytotoxic T-cells, epithelial tumor cell lines, and the testes. *J. Biol. Chem.* 276, 44003 – 44011.
- Boudeau, J., Miranda-Saavedra, D., Barton, G. J. and Alessi, D. R. (2006) Emerging roles of pseudokinases. *Trends Cell Biol.* 16, 443 – 452.
- Fields, G. B. and Noble, R. L. (1990) Solid phase peptide synthesis utilizing 9-fluorenylmethoxycarbonyl amino acids. *Int. J. Pept. Protein Res.* 35, 161 – 214.
- 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.* 6, 667 – 677.
- Ruzzene, M., Penzo, D. and Pinna, L. A. (2002) Protein kinase CK2 inhibitor 4,5,6,7-tetrabromobenzotriazole (TBB) induces apoptosis and caspase-dependent degradation of haematopoietic lineage cell-specific protein 1 (HS1) in Jurkat cells. *Biochem. J.* 364, 41 – 47.
- Sarno, S., Reddy, H., Meggio, F., Ruzzene, M., Davies, S. P., Donella-Deana, A., Shugar, D., Pinna, L. A. (2001) Selectivity of 4,5,6,7-tetrabromobenzotriazole, an ATP site-directed inhibitor of protein kinase CK2 (‘casein kinase-2’). *FEBS Lett.* 496, 44 – 48.
- Vlahos, C. J., Matter, W. F., Hui, K. Y. and Brown, R. F. (1994) A specific inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase, 2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one (LY294002). *J. Biol. Chem.* 269, 5241 – 5248.
- Tsang, C. K., Qi, H., Liu, L. F. and Zheng, X. F. (2007) Targeting mammalian target of rapamycin (mTOR) for health and diseases. *Drug Discov Today* 12, 112 – 124.
- Abe, Y., Takeuchi, T., Imai, Y., Murase, R., Kamei, T., Fujibuchi, T., Matsumoto, S., Ueda, N., Ogasawara, M., Shigemoto, K. and Kito, K. (2006) A small Ras-like protein Ray/Rabl1c modulates the p53-regulating activity of PRPK. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 344, 377 – 385.
- Cejka, P., Stojic, L., Mojas, N., Russel, A. M., Heinemann, K., Cannavò, E., di Piero, M., Marra, G. and Jiricny, J. (2002) Methylation-induced G(2)/M arrest requires a full complement of the mismatch repair protein hMLH1. *EMBO J.* 22, 2245 – 2254.
- Shieh, S. Y., Ikeda, M., Taya, Y. and Prives, C. (1997) DNA damage-induced phosphorylation of p53 alleviates inhibition by MDM2. *Cell* 91, 325 – 334.
- Miyauchi, H., Minamino, T., Tateno, K., Kunieda, T., Tako, H. and Komuro, I. (2004) Akt negatively regulates the *in vitro* lifespan of human endothelial cells *via* a p53/p21-dependent pathway. *EMBO J.* 23, 212 – 220.
- D’Adda di Fagnana, F., Teo, S. H. and Jackson, S. P. (2004) Functional links between telomeres and proteins of the DNA-damage response. *Genes Dev.* 18, 1781 – 1799.
- Li, H. and Liu J.-P. (2002) Signaling on telomerase: a master switch in cell aging and immortalization. *Biogerontology* 3, 107 – 116.
- Haendeler, J., Hoffmann, J., Rahman, S., Zeiher, A. M. and Dimmeler, S. (2003) Regulation of telomerase activity and anti-apoptotic function by protein-kinase interaction and phosphorylation. *FEBS Lett.* 536, 180 – 186.