

INDICE

Abstract	I
Riassunto	IV
Abbreviazioni degli amminoacidi	VII
Introduzione	
1. Leucemia mielide cronica	1
1.1 Caratteristiche cliniche	1
1.2 Caratteristiche citogenetiche	2
1.3 Caratteristiche molecolari	4
1.4 Terapia di trattamento della malattia	7
1.5 Resistenza al trattamento con imatinib	9
1.6 Meccanismi di resistenza all'imatinib	
Bcr/Abl-dipendenti	10
1.6.1 Mutazioni del dominio chinasi di Bcr/Abl	10
1.6.2 Amplificazione del gene <i>BCR/ABL1</i>	11
1.7 Meccanismi di resistenza all'imatinib	
Bcr/Abl-indipendenti	12
1.7.1 Uptake intracellulare dell'imatinib	12
1.7.2 Sovraespressione delle Src-chinasi	13
2. La proteinchinasi CK2	15
2.1 Struttura e proprietà enzimatiche	15
2.2 Il ruolo della proteinchinasi CK2 nel ciclo cellulare	19
2.3 La proteinchinasi CK2 nell'apoptosi cellulare	20
2.4 Ruolo chiave della proteinchinasi CK2 nel cancro	23
3. Il fattore eucariotico d'inizio della traduzione 3 (eIF3)	29
3.1 La fase d'inizio della traduzione negli eucarioti	29
3.2 eIF3 e il suo ruolo nell'inizio della traduzione	30
3.2.1 Ruolo di eIF3 nella generazione delle subunità ribosomiali dai ribosomi 80S	31
3.2.2 Ruolo di eIF3 nella formazione del complesso	

di pre-inizio 43S	32
3.2.3 Ruolo di eIF3 nella formazione del complesso di pre-inizio 48S	33
3.3 eIF3 e i tumori	33

Materiale e metodi

Anticorpi	37
Substrati di CK2	37
Inibitori	37
Colture cellulari	38
Trattamento delle cellule	38
Preparazione del lisato cellulare	38
Determinazione della concentrazione proteica	39
<i>SDS/PAGE e western blot</i>	39
Immunoprecipitazione	41
Saggio di attività di CK2 □ tramite saggio in-gel (<i>in-gel kinase assay</i>)	41
Attività di CK2 nei lisati cellulari	42
Saggio di Vitalità cellulare MTT	43

Risultati

Selezione delle cellule LAMA84 resistenti ad 1,5 μM di imatinib	44
Caratterizzazione delle cellule LAMA84-S e LAMA84-R	47
Attività della proteinchinasi CK2 in cellule LAMA84-S e LAMA84-R	51
Co-immunoprecipitazione fra CK2 e Bcr/Abl	54
Stato di fosforilazione in tirosina di CK2α	58
Tirosin-fosforilazione endogena di CK2α da parte di Bcr/Abl	61
L'attività catalitica di CK2 è essenziale per l'interazione con Bcr/Abl	63
L'inibitore CX-4945 riduce la vitalità delle cellule LAMA84-S/R	67
L'inibizione di CK2 influenza la risposta all'imatinib delle cellule LAMA84-R	69
Identificazione di eIF3j come nuovo substrato di CK2	71

Identificazione del sito di fosforilazione di CK2 in eIF3j	74
La subunità b del fattore d'inizio della traduzione eucariotico 3 è substrato di CK2	76
Discussione	81
Conclusioni	93
Bibliografia	97

ABSTRACT

Chronic myeloid leukemia (CML) is a clonal myeloproliferative disorder of hematopoietic stem cells, characterized by clonal expansion of a primitive pluripotent stem cell with the consequence of the increasing number of granulocytes in the blood. A hallmark of CML is the Philadelphia chromosome (Ph⁺), originated from a reciprocal chromosomal translocation t(9;22)(q34;q11), that leads to the formation of the *BCR/ABL1* fusion gene, which encodes for the constitutively active Bcr/Abl tyrosine kinase oncoprotein.

Imatinib (STI-571) selectively targets the Bcr/Abl oncoprotein and represents now the standard therapy in this disease. Despite its great efficacy, imatinib-resistance has emerged as a significant clinical issue. The cell line LAMA84 is a model of CML. In this thesis, we used two variants of LAMA84 cells: one is unable to survive and grow in presence of imatinib (LAMA84-S), while the other can grow in presence of 1.5 μ M imatinib (LAMA84-R).

The aim of this work was the analysis of the protein kinase CK2 in the LAMA84-S/R cell lines. Protein kinase CK2 is a ubiquitously and constitutively active Ser/Thr kinase, which phosphorylates several substrates implicated in key processes of cell life. CK2 is mostly present as a heterotetrameric structure composed of two catalytic α (44 kDa) and/or α' (38 kDa) and two regulatory subunits β (25 kDa).

The analysis by western blotting of the Bcr/Abl protein-level in various cellular lysates of LAMA84-S and LAMA84-R cells shows that the imatinib-resistance in these cells is associated with an amplification of *BCR/ABL1* gene and an overexpression of Bcr/Abl. Moreover, the analysis of the CK2 cellular protein-level points up, unexpectedly, a kinase expression about two-fold higher in imatinib-resistant than in imatinib-sensitive cells. Both CK2 α and CK2 β subunits, but not CK2 α' , are upregulated.

The activity of the CK2 holoenzyme was then tested on the β -casein substrate or on the specific synthetic peptide R₃AD₂SD₅, while that of the monomeric CK2 α was detected by an in-gel kinase assay. Consistent with the CK2 protein-level, the activity of both holoenzyme and monomeric CK2 α is higher in LAMA84-R cells as compared to LAMA84-S cells.

The immunoprecipitation of Bcr/Abl from cellular lysates of LAMA84-S/R cells shows that CK2 co-immunoprecipitates with Bcr/Abl only in imatinib-resistant cells. This outcome is also supported by the presence of Bcr/Abl in the CK2 α -immunoprecipitates obtained from the same cellular lysates, and analyzed by western blotting and mass spectrometry.

Since the relationship between CK2 α and Bcr/Abl suggests a potential phosphorylation of CK2 by this tyrosine kinase, an immunoprecipitation with anti-phospho-tyrosine (p-Tyr) antibody was performed from cellular lysates of LAMA84-S/R cells and the western-blotting analysis of the immunoprecipitates reveals the presence of CK2 only in LAMA84-R samples. CK2 α Tyr-phosphorylation increases if the cells are treated with the protein tyrosine phosphatase, pervanadate.

To prove if CK2 Tyr-phosphorylation is mediated by CK2 α autophosphorylation, as elsewhere described, or by Bcr/Abl catalyzed phosphorylation, LAMA84-R cells were treated for 24h with inhibitors specific for CK2 or Bcr/Abl. CK2 α was immunoprecipitated from treated cells and analyzed for its p-Tyr immunostaining. While CX-4945, a selective inhibitor of CK2, currently in phase I of clinical trial in patients with solid tumors, does not affect p-Tyr-CK2 α -phosphorylation, the Abl-inhibitor imatinib reduces the Tyr-phosphorylation of CK2 α , suggesting that Bcr/Abl is most likely involved in CK2 α tyrosine-phosphorylation in LAMA84-R cells.

To examine the potential effect of CK2 or Bcr/Abl activities on the two kinase interaction, LAMA84-R cells were treated with CX-4945, imatinib,

the Abl allosteric inhibitor GNF-2, and the potent non-specific kinase inhibitor staurosporine. Only the treatment with the CK2 inhibitor CX-4945 strongly reduces the interaction between the two kinases.

To highlight the role of CK2 during cell proliferation, LAMA84-S/R cells were treated for 48 h with different concentrations of CX-4945 and their viability was measured using the MTT assay. The data suggest that the viability of both LAMA84-R and LAMA84-S cells decreases at increasing concentration of CX-4945, being the inhibitor more effective on the imatinib-resistant than the imatinib-sensitive cells. Experiments performed using combined CX-4945 and imatinib, demonstrated that while the viability of LAMA84-S cells treated with imatinib alone or in combination with CX-4945 is reduced in the same manner, the inhibition of CK2 activity by CX-4945 sensitizes resistant LAMA84 cells to low imatinib concentrations.

Finally, the occurrence of possible interactions between CK2 and other proteins was analyzed in imatinib-resistant cells. To this purpose, CK2 α was immunoprecipitated from LAMA84-R cellular lysates and the co-immunoprecipitation of CK2 in the immunocomplexes was tested by *in vitro* kinase assays in the presence of [$\gamma^{33}\text{P}$]ATP. The SDS-PAGE analysis of the radioactive samples evidenced a band, of about 35-38 KDa, incorporating ^{33}P -radioactivity comparable to that corresponding to CK2 β subunit. The mass spectrometry analysis demonstrated that the band corresponds to the subunit j of the eukaryotic translation initiation factor 3 (eIF3j) and the phosphorylated site was identified as the Ser127 (Q-E-E-S-D-L-E).

The mass spectrometry analysis of CK2 α -immunoprecipitates highlighted the presence of other eIF3 subunits, such as b, f, l, g, h, k. The IF3b-immunoprecipitates obtained from LAMA84-R lysates contained both CK2 α and CK2 β subunits and the *in vitro* phosphorylation of eIF3b-immunoprecipitates in the presence [$\gamma^{33}\text{P}$]ATP demonstrated that also eIF3b is a substrate of CK2.

RIASSUNTO

La leucemia mieloide cronica (CML) è una malattia mieloproliferativa delle cellule ematopoietiche staminali, caratterizzata da un'espansione clonale di cellule staminali pluripotenti progenitrici con il conseguente incremento dei granulociti nel sangue. Un marcatore della CML è il cromosoma Philadelphia (Ph+), originato dalla traslocazione reciproca t(9;22)(q34;q11), che dà origine al gene di fusione *BCR/ABL1*, codificante per l'oncoproteina Bcr/Abl, una tirosin-chinasi costitutivamente attiva.

L'imatinib (STI-571) colpisce selettivamente l'oncoproteina Bcr/Abl e rappresenta la terapia standard d'inizio per questa patologia. Nonostante la sua grande efficacia, la resistenza all'imatinib è emersa come un significativo problema clinico. La linea cellulare LAMA84 è un modello della CML. In questa tesi, abbiamo usato due varianti di cellule LAMA84: una è incapace di sopravvivere e crescere in presenza di imatinib (LAMA84-S), mentre l'altra può crescere in presenza di 1,5 μ M imatinib (LAMA84-R).

Lo scopo di questo lavoro è stato l'analisi della proteinchinasi CK2 nelle cellule LAMA84-S/R. La proteinchinasi CK2 è un Ser/Thr-chinasi ubiquitaria e costitutivamente attiva, che fosforila svariati substrati implicati in processi chiave della vita cellulare. CK2 presenta generalmente una struttura eterotetramericata composta da due subunità catalitiche α (44 kDa) e/o $\alpha\beta$ (38 kDa) e due subunità regolatrici β (25 kDa).

L'analisi mediante *western blot* dei livelli proteici di Bcr/Abl in diversi lisati cellulari di cellule LAMA84-S e LAMA84-R mostra che la resistenza all'imatinib in queste cellule è associata all'amplificazione del gene *BCR/ABL1* e alla sovraespressione di Bcr/Abl. Inoltre, l'analisi dei livelli proteici intracellulari di CK2 evidenzia, inaspettatamente, un'espressione della chinasi di circa due volte maggiore nelle cellule resistenti all'imatinib rispetto a quelle sensibili. Entrambe le subunità CK2 α e CK2 β , ma non CK2 α' , sono sovraesprese.

L'attività dell'oloenzima CK2 è stata saggiata sul substrato β -caseina o sul peptide specifico sintetico R₃AD₂SD₅, mentre quella di CK2 α monomerica è stata rilevata mediante un *in-gel kinase assay*. Coerentemente con il livello proteico di CK2, l'attività sia dell'oloenzima che di CK2 α monomerica è maggiore nelle cellule LAMA84-R rispetto alle cellule LAMA84-S.

L'immunoprecipitazione di Bcr/Abl da lisati cellulari di cellule LAMA84-S/R mostra che CK2 immunoprecipita con Bcr/abl solo nelle cellule resistenti all'imatinib. Questo dato è supportato anche dalla presenza di Bcr/Abl negli immunoprecipitati di CK2 α ottenuti dai medesimi lisati e analizzati mediante *western blot* e spettrometria di massa.

Dato che la relazione fra CK2 α e Bcr/Abl suggerisce una potenziale fosforilazione di CK2 da parte della tirosin-chinasi, si è realizzata un'immunoprecipitazione con l'anticorpo anti-fosfo-tirosina (p-Tyr) da lisati di cellule LAMA84-S/R e l'analisi tramite *western blot* degli immunoprecipitati rileva la presenza di CK2 solo nei campioni delle LAMA84-R. La Tyr-fosforilazione di CK2 α aumenta se le cellule sono trattate con l'inibitore delle tirosin-fosfatasi, pervanadato.

Per provare se la Tyr-fosforilazione di CK2 è mediata dall'autofosforilazione di CK2 α , come descritto altrove, o è catalizzata da Bcr/Abl, le cellule LAMA84-R sono state trattate per 24 h con inibitori specifici per CK2 o Bcr/Abl. CK2 α è stata immunoprecipitata dalle cellule trattate ed è stata analizzato il suo stato di Tyr-fosforilazione mediante *western blot*. Mentre il CX-4945, un inibitore selettivo per CK2, ora in fase I degli studi clinici su pazienti con tumori solidi, non ha effetto sulla p-Tyr-CK2 α , l'imatinib riduce la Tyr-fosforilazione di CK2 α , suggerendo che Bcr/Abl è maggiormente coinvolto nella fosforilazione tirosinica di CK2 α nelle cellule LAMA84-R.

Per esaminare il potenziale effetto di CK2 e Bcr/Abl nell'interazione delle due chinasi, le cellule LAMA84-R sono state trattate con il CX-4945, l'imatinib, l'inibitore allosterico di Abl GNF-2, e il potente inibitore chinasicco

non-specifico staurosporina. Solo il trattamento con l'inibitore di CK2, CX-4945, riduce l'interazione fra le due chinasi.

Per sottolineare il ruolo di CK2 durante la proliferazione cellulare, le cellule LAMA84-S/R sono state trattate per 48 h con differenti concentrazioni di CX-4945 e la vitalità cellulare di entrambe le cellule LAMA84-S e LAMA84-R è stata misurata mediante il saggio MTT. I dati suggeriscono che la viabilità di entrambe le linee cellulari decresce all'aumentare della concentrazione del CX-4945, con un maggior effetto dell'inibitore nelle cellule LAMA84-R. Esperimenti effettuati mediante la combinazione di CX-4945 e imatinib, dimostrano che mentre la vitalità delle cellule LAMA84-S trattate con l'imatinib da solo o in combinazione con il CX-4945 è ridotta in modo simile, l'inibizione dell'attività di CK2 da parte del CX-4945 sensibilizza le cellule LAMA84-R a basse concentrazioni di imatinib.

Infine, la possibile interazione fra CK2 e altre proteine è stata analizzata nelle cellule resistenti all'imatinib. A questo proposito, CK2 α è stata immunoprecipitata da lisati di cellule LAMA84-R e la sua attività CK2 negli immunocomplessi è stata valutata mediante un saggio chinamico in presenza di [$\gamma^{33}\text{P}$]ATP. L'analisi mediante *SDS/PAGE* dei campioni reattivi evidenzia una banda, di circa 35-38 kDa, ^{33}P -fosforilata in modo comparabile alla banda corrispondente alla subunità CK2 β , autofosforilata. L'analisi di spettrometria di massa ha dimostrato che la banda corrisponde alla subunità j del fattore eucariotico 3 d'inizio della traduzione (eIF3j) e il sito di fosforilazione è stato identificato nella Ser127 (Q-E-E-S-D-L-E).

L'analisi di spettrometria di massa degli immunoprecipitati di CK2 α ha messo in evidenza la presenza di altre subunità di eIF3: b, f, l, g, h, k. Gli immunoprecipitati di eIF3b ottenuti da lisati di cellule LAMA84-R contengono sia CK2 α che CK2 β e la fosforilazione *in vitro* degli immunoprecipitati di eIF3b in presenza di [$\gamma^{33}\text{P}$]ATP ha dimostrato che anche eIF3b è un substrato di CK2.

ABBREVIAZIONI PER GLI AMMINOACIDI

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

INTRODUZIONE

1. Leucemia mieloide cronica (CML)

1.1 Caratteristiche cliniche

La leucemia mieloide cronica (CML, *chronic myeloid leukemia*) è una malattia mieloproliferativa del sangue, caratterizzata dall'espansione clonale di cellule staminali ematopoietiche neoplastiche, che induce un elevato accumulo di cellule mieloidi, monociti, megacariociti e della linea eritroide (Fialkow P.J. *et al.*, 1977). Inoltre, anche alterazioni della linea delle cellule B e, occasionalmente, dei linfociti T possono essere coinvolte in questa patologia (Martin P.J. *et al.*, 1980; Raanani P. *et al.*, 2005).

A livello mondiale, la CML è considerata una malattia rara e rappresenta circa il 14-15% dei casi di leucemia. L'incidenza annuale è di 0,6-2 casi ogni 100.000 abitanti, con un'età d'insorgenza media di 50-60 anni nel mondo occidentale (Rohrbacher M. *et al.*, 2009). Inoltre, essa si manifesta con una frequenza leggermente maggiore (1,4:1) gli uomini rispetto alle donne (Berger U. *et al.*, 2005). Tale patologia è diagnosticabile raramente anche nei bambini, in circa un caso su un milione l'anno (Milot F. *et al.*, 2005).

Il decorso della CML è generalmente suddiviso in tre fasi: la prima viene definita fase cronica (CP), a cui seguono degli stadi più aggressivi, conosciuti come fase accelerata (AP) e crisi blastica (BP). Per circa il 90 % dei pazienti la patologia viene diagnosticata quando si trova in fase cronica e il 50 % dei malati risulta essere asintomatico in tale stadio (Faderl S. *et al.*, 1999).

In assenza di terapia, i pazienti in CP progrediscono approssimativamente dopo cinque anni agli stadi avanzati della malattia, mediante meccanismi cellulari ed evoluzioni citogenetiche a oggi poco chiari. I malati in BP hanno una sopravvivenza media di sei mesi e, talvolta, la fase blastica non è

preceduta da quell'accelerata, che ha una durata di pochi mesi (Hochhaus A. *et al.*, 2009; Hehlmann R. *et al.*, 2007).

La definizione precisa delle tre fasi della malattia è stata spesso oggetto di dibattito negli ultimi anni e, recentemente, sono stati definiti dei criteri da parte della *World Health Organization* (WHO) per discernere fra pazienti in fase accelerata e crisi blastica. In CP, si ha un'espansione massiva di cellule mieloidi immature, capaci di differenziarsi, e di granulociti maturi, con funzioni fisiologiche simili alle cellule normali, nel midollo osseo e nel sangue periferico. Le fasi avanzate della malattia sono caratterizzate dalla refrattarietà alla terapia da parte dei pazienti e dall'incremento dell'arresto della maturazione da parte delle cellule progenitrici sia mieloidi e sia linfoidi. In particolare, nell'AP si ha un aumento dei globuli bianchi del sangue e una percentuale del 10-19% di blasti nel midollo osseo o nel sangue periferico; quando la percentuale dei blasti supera il 20%, il paziente si considera in BP. (Pasternak G. *et al.*, 1998; Vardiman J.W. *et al.*, 2002).

1.2 Caratteristiche citogenetiche

La CML è il primo caso di tumore umano associato specificamente a un'aberrazione cromosomica, a seguito della scoperta del cromosoma *Philadelphia* (Ph) nel 1960 (Nowell P.C. *et al.*, 1960). L'origine di tale cromosoma è rimasta sconosciuta fino al 1973, quando fu stabilito che era generato da una traslocazione reciproca fra le braccia lunghe dei cromosomi 9 e 22 [t(9;22)(q34;q11)] (Rowley J.D., 1973). Solo una decina di anni più tardi è stato dimostrato che la traslocazione coinvolgeva il proto-oncogene *ABL* (Bartram C.L. *et al.*, 1983), ora denominato *ABL1* (*c-abl oncogene 1*), localizzato nel cromosoma 9 e il gene *BCR* (*breakpoint cluster region*) del cromosoma 22 (Groffen J. *Et al.*, 1984). In seguito, si è scoperto che quest'alterazione cromosomica portava alla formazione di un gene di fusione *BCR/ABL* (Shtivelman E. *et al.*, 1985), ora ufficialmente noto come

BCR/ABL1, codificante per la proteina di fusione Bcr/Abl, il cui potere trasformante nelle cellule è legato alla propria attività tirosin-chinasica non regolata (Lugo T.G. *et al.*, 1990). Infine, la realizzazione del primo modello animale di CML, in cui l'introduzione in un topo di cellule staminali ematopoietiche con il gene *BCR/ABL1* causava alterazioni mieloproliferative, ha stabilito un ruolo centrale di Bcr/Abl nell'evoluzione della CML (Daley G.Q. *et al.*, 1990).

Il cromosoma Ph è considerato il principale marcatore della leucemia mieloide cronica e, infatti, esso è rilevabile nel 95% dei pazienti tramite analisi citogenetica dei campioni di midollo osseo. Nel 5-10% dei malati di CML che presentano il cromosoma Ph (Ph+), esso è originato dal risultato di traslocazioni varianti semplici o complesse, in cui sono coinvolti altri cromosomi oltre al 9 e al 22 (Huret J.L. *et al.*, 1990). In circa il 5% dei casi, si osservano pazienti che hanno un quadro clinico tipico della CML, ma il cromosoma Ph non è rilevabile citogeneticamente. In questi casi, le aberrazioni cromosomiche sono submicroscopiche e mediante gli studi citogenetici convenzionali tali pazienti sembrano essere cromosoma Ph-negativi (Ph-), ma a livello molecolare è presente il gene di fusione *BCR/ABL1*. Questi pazienti Ph-, *BCR/ABL1*-positivi in sostanza non differiscono dai pazienti Ph+, se non nel meccanismo cromosomico della formazione del gene di fusione (Bartram C.R. *et al.*, 1985; Fugazza G. *et al.*, 2005).

Quando i malati di CML progrediscono verso la fase avanzata della patologia, nella maggior parte dei casi (circa il 75-80% dei pazienti in crisi blastica) si manifesta un'evoluzione citogenetica clonale, con sviluppo di nuove aberrazioni cromosomiche che riflettono l'instabilità genomica delle cellule leucemiche (Cortes J. *et al.*, 2004).

1.3 Caratteristiche molecolari

A livello molecolare, i geni principalmente coinvolti nella CML sono *ABL1* e *BCR*. La traslocazione cromosomica che dà origine al cromosoma Ph, porta alla formazione del gene di fusione *BCR/ABL1* e l'acquisizione di tale oncogene da parte delle cellule ematopoietiche staminali (HSC) è considerata generalmente l'evento iniziale nella genesi della patologia, sebbene in alcuni casi siano evidenti alterazioni dell'ematopoiesi precedenti alla formazione del cromosoma Ph (Cross N.C. *et al.*, 2008). Le cellule HSC, che presentano l'oncogene *BCR/ABL1*, sono in grado di produrre la tirosin-chinasi costitutivamente attiva Bcr/Abl, che conferisce loro un vantaggio nella proliferazione a discapito delle cellule normali (Bruns I. *et al.*, 2009).

Il gene *ABL1*, localizzato nella regione cromosomica 9q34.1, può dare origine a due diversi mRNA, a seguito di uno *splicing* alternativo del primo esone (1a o 1b), che codificano per le isoforme Ia e Ib di 145 kDa della tirosin-chinasi Abl (Witte O.N. *et al.*, 1980). L'isoforma Ib è maggiormente espressa, viene miristilata e presenta 19 aminoacidi in più all'estremità N-terminale rispetto all'isoforma non-miristilata Ia (Hanstchel O. *et al.*, 2003).

La chinasi Abl è espressa ubiquitariamente e localizzata sia nel nucleo che nel citoplasma, con la capacità di muoversi fra i due compartimenti (Taagepera S. *et al.*, 1998). Abl svolge un ruolo importante in svariati processi cellulari ed è in grado sia di promuovere che inibire la crescita delle cellule. La sua attività è finemente regolata durante il ciclo cellulare, tant'è che si ritrova inibita in cellule quiescenti mentre viene attivata durante la fase S del ciclo (Van Etten R.A. *et al.*, 1999). La chinasi presenta un dominio SH2 (*Src-homology-2 domain*) interposto fra un dominio SH3 (*Src-homology-3 domain*), che è vicino all'estremità N-terminale, e il dominio catalitico. La regolazione dell'enzima, in entrambe le isoforme, avviene tramite un'autoinibizione mediata dalla struttura "cap" che si forma tramite

un legame intramolecolare degli amminoacidi all'N-terminale con il dominio SH3 e quello catalitico della chinasi (Pluk H. *et al.*, 2002).

Mentre le funzioni di Abl sono abbastanza conosciute, meno si conosce della Ser/Thr proteinchinasi Bcr, anch'essa espressa ubiquitariamente e localizzata sia a livello citoplasmatico che nucleare (Laurent E. *et al.*, 2000). Bcr è codificata dal gene BCR, localizzato nella regione q11.2 del cromosoma 22, e di tale proteina ne esistono due diverse isoforme, una di 130 kDa e una di 160 kDa, generate da uno *splicing* alternativo durante la trascrizione del gene (Dhut S. *et al.*, 1988).

Bcr ha funzioni in diversi processi della vita cellulare, come l'organizzazione citoscheletrica, la proliferazione, il *signaling* intracellulare, la mobilità dei fattori di crescita (Diekmann D. *et al.*, 1991; Olabisi O.O. *et al.*, 2006).

Nella maggior parte dei pazienti di CML, il punto di rottura per la formazione del gene di fusione *BCR/ABL1* si ritrova in una zona denominata *major breakpoint cluster region* (M-bcr) (Groffen J. *et al.*, 1989). La rottura avviene generalmente negli introni fra gli esoni 13 e 14 o 14 e 15 e tali frammenti si legano all'esone 2 del gene *ABL1* per formare due possibili forme del gene di fusione *BCR/ABL1*, in grado di trascrivere per la proteina chimerica p210 Bcr/Abl di 210 kDa (Deininger M.W. *et al.*, 2000).

Sono note, altresì, altri due possibili regioni di rottura del gene *BCR*: m-bcr (*minor breakpoint cluster region*) e μ -bcr (*micro breakpoint cluster region*). I frammenti genici ottenuti da questa rottura possono legarsi al gene *ABL1* e dare origine a due diversi geni di fusione in grado di codificare rispettivamente per due oncoproteine Bcr/Abl di 190 kDa (p190) o 230 kDa (p230) presenti anche in alcuni malati di CML, ma marcatrici rispettivamente della leucemia limfoblastica acuta (Ph⁺-ALL) o della leucemia neutrofilica cronica (CNL) (Hermans A. *et al.*, 1987; van Rhee F. *et al.*, 1996; Pane F. *et al.*, 1996).

La trasformazione neoplastica cui vanno incontro le HSC che presentano il gene *BCR/ABL1* è indotta da Bcr/Abl mediante l'azione principalmente diretta ai meccanismi che inducono nelle cellule leucemiche l'alterazione dell'adesione alle cellule stromatiche e alla matrice extracellulare, la resistenza agli stimoli apoptotici e l'attivazione costitutiva del *signaling* mitogenetico.

Durante la normale ematopoiesi, il *signaling* delle citochine svolge un ruolo fondamentale nella regolazione di tale processo, in cui è essenziale l'adesione delle cellule progenitrici alle cellule stromali e alla matrice extracellulare del midollo osseo. L'espressione di Bcr/Abl altera tale adesione, facendo quindi mancare nelle cellule staminali ematopoietiche leucemiche (LSC) il controllo della loro normale differenziazione (Gordon M.Y. *et al.*, 1987). La proteina CrkL è uno dei principali substrati cellulari di Bcr/Abl ed ha una funzione fondamentale nella mobilità e adesione cellulare, mediando l'interazione con importanti proteine di adesione (Uemura N. *et al.*, 1999).

L'attività di Bcr/Abl è modulata dallo stato di fosforilazione dei residui Tyr245 e Tyr412 del dominio di Abl, che possono essere autofosforilati (Brasher B.B. *et al.*, 2000) o andar incontro a fosforilazione da parte delle tirosin-chinasi Src (Plattner R. *et al.*, 1999; Dorey K. *et al.*, 2001). Inoltre, l'autofosforilazione (Puil L. *et al.*, 1994) o la fosforilazione da parte delle Src-chinasi (Warmuth M. *et al.*, 1997; Meyn M.A. *et al.*, 2006) del residuo Tyr177 del dominio Bcr di Bcr/Abl, permette l'interazione dell'oncochinasi con Grb2 (*Growth factor receptor-bound protein 2*), che a sua volta stabilizza Ras nella forma attiva (Pendergast *et al.*, 1993). L'attivazione di Ras induce un segnale a cascata che attraverso il *pathway* della MAPK (*mitogen-activated protein kinase*) porta all'espressione della proteina antiapoptotica Bcl-2 (Sanchez-Garcia I. *et al.*, 1995).

Comunque, Bcr/Abl è in grado regolare diversi *pathways* con concorrono a sostenere i segnali antiapoptotici e favorire la proliferazione delle cellule

leucemiche, come ad esempio la via di segnale di Stat5 (*signal transduce and activator of transcription 5*) e della fosfatidilinositolo 3-chinasi (PI3K)/Akt che porta all'espressione della proteina antiapoptotica Bcl-xL (Horita M. *et al.*, 2000; Skorski T. *et al.*, 1997).

1.4 Terapia di trattamento della malattia

Il fatto che l'espressione di Bcr/Abl fosse condizione necessaria e sufficiente per l'inizio e la progressione della leucemia mieloide cronica, ha reso la chinasi un ottimo target per le terapie a base molecolare (Druker D.J. *et al.*, 1996).

La modalità di trattamento della CML ha subito diverse modifiche nel corso degli anni. Ad oggi, la terapia standard iniziale raccomandata per i pazienti in fase cronica si basa sull'uso dell'imatinib (Glivec®, Gleevec™, precedentemente STI571 or CGP57148B, denominato anche imatinib mesilato) (Baccarani M. *et al.*, 2006). Alla fine degli anni novanta venne scoperta la capacità dell'imatinib di inibire l'attività di Bcr/Abl (Druker B.J. *et al.*, 1996) e di contrastare le caratteristiche cliniche ed ematologiche della CML, eliminando quasi totalmente le colonie di cellule che presentavano Bcr/Abl senza alterare la vitalità delle cellule normali (Druker B.J. *et al.*, 2001; Kantarjian H. *et al.*, 2002; O'Brien S.G. *et al.*, 2003).

L'imatinib è una 2-fenilamminopiridina in grado di legare il dominio di legame con l'ATP di alcune tirosin-chinasi causandone l'inibizione dell'attività catalitica. In saggi cellulari, esso è capace di inibire del 50% l'attività di Bcr/Abl a una concentrazione (IC_{50}) compresa fra 0.1 e 0.5 μ M (Druker D.J. *et al.*, 1996; Gambacorti-Passerini C. *et al.*, 1997).

Oltre a inibire Bcr/Abl e Abl (Druker D.J. *et al.*, 1996), l'imatinib è in grado di bloccare l'attività principalmente delle tirosin-chinasi recettoriali PDGFR α , PDGFR β (recettori per il fattore di crescita piastrinico) e c-kit

(Buchdunger E. *et al.*, 2000; Heinrich M.C. *et al.*, 2000). La potenzialità di inibire efficacemente anche queste chinasi, ha permesso l'utilizzo dell'imatinib nella terapia di altre patologie oltre che per la CML e la Ph+ ALL (Druker B.J. *et al.*, 2001), come ad esempio i tumori stromali gastrointestinali collegati a mutazioni del gene *C-KIT* (Joensuu H. *et al.*, 2001), la leucemia eosinofila cronica associata al gene di fusione *FIP1L1-PDGFR α* (Cools J. *et al.*, 2003) o alterazioni mieloproliferative croniche correlate a riarrangiamenti del gene *PDGFR β* (Apperley J.F. *et al.*, 2002).

L'imatinib deve la sua elevata specificità per le tirosin-chinasi appena descritte alla capacità di legarsi alla molecola enzimatica quando è presente nella sua conformazione inattiva, che è generalmente molto diversa fra le proteinchinasi. In tale conformazione, definita anche chiusa, il *loop* di attivazione della chinasi risulta ripiegato centralmente in uno stato non fosforilato e, dunque, inattivo. In seguito ad autofosforilazione (Tyr412 del dominio Abl), il *loop* di attivazione è in grado di estendersi, facendo assumere alla chinasi una conformazione attiva (o aperta) che le permette di legare il substrato specifico per la conseguente fosforilazione (Schindler T. *et al.*, 2000, Dorey K. *et al.*, 2001).

Nel caso specifico di Bcr/Abl, l'inibitore compete con l'ATP per inserirsi nel sito di legame per l'ATP localizzato nel dominio chinamico dell'enzima. Quando l'imatinib occupa la tasca per l'ATP, stabilizza la forma inattiva di Bcr/Abl prevenendone l'autofosforilazione, l'attivazione e la conseguente capacità di fosforilare i suoi substrati. Questo meccanismo provoca il blocco dei segnali a cascata a valle di Bcr/Abl, inibendo così la proliferazione cellulare e favorendo l'attivazione delle vie apoptotiche nelle cellule leucemiche (Deininger M.W. *et al.*, 1997; Gambacorti-Passerini C. *et al.*, 1997).

1.5 Resistenza al trattamento con imatinib

Nella fase III del *trial* clinico IRIS (*International Randomized Study of Interferon and STI571*), l'efficacia dell'imatinib è stata paragonata a quella del trattamento combinato di IFN- α (*interferon- α*) e basse concentrazioni di citorabina, la cura standard in quel momento, in pazienti cui era stata diagnosticata la CML in fase cronica (O'Brien S.G. *et al.*, 2003). Dati aggiornati di tale studio mettono in luce che dopo sei anni di trattamento con imatinib, l'83% dei malati ha una risposta citogenetica completa, con la scomparsa totale di cellule del midollo osseo che presentano il cromosoma Ph. Inoltre, l'incidenza di progressione alla fase accelerata o blastica della patologia è diminuita costantemente dal secondo anno di trattamento, risultando praticamente lo 0% dopo sei anni di terapia (Hochhaus A. *et al.*, 2007).

Nonostante la grande efficacia dell'imatinib, nella maggior parte dei pazienti risulta ancora rilevabile il trascritto del gene *BCR/ABL1*. Inoltre, una minoranza significativa dei pazienti sono refrattari alla terapia mostrando quella che viene definita resistenza primaria. Altri pazienti, invece, rispondono inizialmente molto bene al trattamento con imatinib, ma poi perdono la loro capacità di risposta, acquisendo ciò che è classificata come resistenza secondaria (Druker B.J. *et al.*, 2006).

Per il trattamento di pazienti che mostrano intolleranza o resistenza all'imatinib sono stati sviluppati degli inibitori delle tirosin-chinasi (TKIs) di seconda generazione. Questi inibitori sono più potenti nell'inibizione di Bcr/Abl rispetto all'imatinib e alcuni risultano più flessibili nel legare conformazioni differenti dell'oncoproteina. Certi inibitori hanno anche uno spettro di target su cui agiscono più ampio e possono, dunque, avere dei vantaggi aggiuntivi nell'inibire la crescita cellulare mediante diverse vie del segnale rispetto a quelle controllate da Bcr/Abl (Weisberg E. *et al.*, 2007). Di

questi TKIs di seconda generazione, quelli attualmente utilizzati sono il Dasatinib (Sprycel®) e il Nilotinib (Tasigna®), verso i quali sono comunque già stati rilevati casi di refrattarietà fra i pazienti (Cortes J. *et al.*, 2007; Hochhaus A. *et al.*, 2007; le Coutre, P. *et al.*, 2008; Hughes T. *et al.*, 2007).

I meccanismi di resistenza all'imatinib sono comunemente suddivisi in dipendenti o indipendenti da Bcr/Abl, rispettivamente in base alla presenza o meno di alterazioni del gene *BCR/ABL1* e/o della proteina Bcr/Abl (Apperley J.F. *et al.*, 2007).

1.6 Meccanismi di resistenza all'imatinib Bcr/Abl-dipendenti

1.6.1 Mutazioni del dominio chinasi di Bcr/Abl

Il meccanismo di resistenza all'imatinib più frequente è dovuto a mutazioni puntiformi nella regione genica codificante per il dominio tirosin-chinasi di Bcr/Abl (Hochhaus A. *et al.*, 2002). La resistenza primaria può essere associata alle mutazioni, sebbene con una frequenza molto bassa (Ernst T. *et al.*, 2008). Comunque, circa il 35-40% dei pazienti resistenti all'imatinib presentano delle mutazioni. I malati che si trovano negli stadi più avanzati della patologia hanno un numero di mutazioni più elevato e la maggior parte di loro (57%-89%) acquisisce la resistenza all'imatinib (Jabbour E. *et al.*, 2006; Branford S. *et al.*, 2003).

Le mutazioni possono influenzare in modo diverso il legame dell'imatinib con Bcr/Abl. Alcune mutazioni interferiscono direttamente con l'imatinib riducendone l'affinità, mentre altre alterano la struttura tridimensionale di Bcr/Abl e ne destabilizzano la conformazione inattiva, indispensabile per il legame con l'inibitore (Shah N.P. *et al.*, 2002).

La prima mutazione rilevata in pazienti resistenti al trattamento con imatinib è stata una sostituzione di un singolo nucleotide C→T nella posizione 944 del gene *ABL1*, risultante nella sostituzione di una treonina

con una leucina AL RESIDUO 315 (T315I) del dominio chinamico di Bcr/Abl. Tale sostituzione amminoacidica elimina una molecola di ossigeno critica per la formazione di un ponte idrogeno fra l'imatinib e la chinasi Abl, oltre a creare un ingombro sterico per il legame dell'inibitore (Gorre M.E. *et al.*, 2001).

Comunque, più di 50 ulteriori mutazioni puntiformi del dominio chinamico sono state descritte, rilevabili con frequenze molto diverse fra loro (Apperley J.F. *et al.*, 2007). Le mutazioni riscontrate più frequentemente nei campioni clinici sono quelle che mappano nella regione del *P-loop* del dominio chinamico di Abl fra i residui 244 e 255 (Carter T.A. *et al.*, 2005), ma esistono risultati contrastanti sull'effettiva correlazione fra la loro comparsa e la mancata risposta dei pazienti all'imatinib (Soverini S. *et al.*, 2005; Jabbour E. *et al.*, 2006).

Altre mutazioni sono state caratterizzate in ulteriori regioni della chinasi Abl, come il *loop* di attivazione, il dominio SH2, il sito di legame del substrato e l'estremità C-terminale della proteina (Roche-Lestienne C. *et al.*, 2002). Comunque, le mutazioni con frequenza bassa non sempre riescono a spiegare la resistenza clinica all'imatinib (Khorashad J.S. *et al.*, 2006), e benché il numero di mutazioni sia in continuo aumento, esse hanno una significatività clinica molto variabile nei singoli pazienti (Hughes T. *et al.*, 2006).

1.6.2 Amplificazione del gene *BCR/ABL1*

Studi su linee cellulari di CML resistenti all'imatinib hanno messo in evidenza la possibilità di un'amplificazione del gene *BCR/ABL1* con conseguente sovraespressione della chinasi Bcr/Abl in assenza di mutazioni nel dominio chinamico dell'enzima (Le Coutre P. *et al.*, 2000; Mahon F.X. *et al.*, 2000).

In una prima analisi su 11 pazienti di CML in crisi blastica o Ph⁺-ALL che avevano acquisito la resistenza all'imatinib, solo 3 mostravano l'amplificazione del gene *BCR/ABL1* (Gorre M.E. *et al.*, 2001). Un successivo studio, esteso a 66 pazienti di CML in diversi stadi con resistenza all'imatinib, ha evidenziato solo 2 individui in cui era presente l'amplificazione genica, suggerendo che la presenza di mutazioni puntiformi sia la causa più comune di resistenza all'imatinib (Hochhaus A. *et al.*, 2002). La ragione per cui l'amplificazione di *BCR/ABL1* sia più facilmente rilevabile in linee cellulari rispetto ai campioni clinici di pazienti non è nota, ma una possibile spiegazione può essere legata alla potenziale tossicità della sovraespressione di Bcr/Abl per le cellule (Tipping A.J. *et al.*, 2001).

1.7 Meccanismi di resistenza all'imatinib Bcr/Abl-indipendenti

1.7.1 Uptake intracellulare dell'imatinib

La concentrazione intracellulare dell'imatinib è molto importante per la sua efficacia, poiché una bassa quantità del farmaco all'interno della cellula può essere causa di un'inadeguata o mancata risposta alla terapia. Chiaramente, la concentrazione intracellulare dell'imatinib è in funzione diretta del bilanciamento fra la quantità d'inibitore in entrata (influsso) e uscita (efflusso) dalla cellula.

La superfamiglia dei trasportatori ABC (*ATP-binding cassette*) è costituita da un gruppo di proteine transmembrana coinvolte nei processi metabolici con la capacità di trasportare differenti substrati all'interno e all'esterno della cellula. Il gene *ABCB1* codifica per una proteina di tale famiglia denominata P-gp (*permeability glycoprotein*), nota per mediare la resistenza MDR (*multidrug resistance*) in molteplici tipi di neoplasie, regolando l'efflusso di diversi agenti chemioterapici (Leonard G.D. *et al.*, 2003). L'imatinib è stato dimostrato essere un substrato per la P-gp (Dai H. *et al.*,

2003). Inoltre, alcuni gruppi di ricerca hanno rilevato che la sovraespressione di P-gp da parte delle cellule può conferire la resistenza all'imatinib (Mahon F.X. *et al.*, 2003), tuttavia risultati contrastanti ottenuti da altri ricercatori hanno suggerito un contributo non significativo dell'espressione della P-gp nella risposta all'imatinib (Ferraio P.T. *et al.*, 2003; Zong Y. *Et al.*, 2005).

Un altro meccanismo proposto per la regolazione della concentrazione intracellulare dell'imatinib è l'inibizione del suo ingresso tramite il trasportatore hOCT-1 (*human organic cation transporter 1*) (Crossman L.C. *et al.*, 2005). Studi recenti hanno dimostrato un elevato polimorfismo ed una variabilità di espressione del gene *hOCT-1* fra i pazienti che rispondevano o meno alla terapia con imatinib. In generale, è stata vista una maggior efficienza di risposta all'inibitore con l'aumentare dell'attività della proteina hOCT-1, dando quindi la possibilità di identificare quei pazienti che, esprimendo un minor livello del trasportatore, richiedono dosi d'imatinib più elevate (White D.L. *et al.*, 2007).

1.7.2 Sovraespressione delle Src-chinasi

La mancanza del *signaling* di Bcr/Abl causata dalla sua inibizione, può essere compensata dalla cellula mediante l'attivazione di vie del segnale di altre chinasi come ulteriore meccanismo di resistenza all'imatinib. L'attivazione di queste tirosin-chinasi secondarie può rendere le cellule indipendenti dall'azione di Bcr/Abl (Daub H. *et al.*, 2004).

La famiglia delle Src-chinasi (SFKs) comprende nove tirosin-chinasi non-recettoriali (Fyn, Yes, Lck, Fgr, Src, Yrk, Hck, Blk e Lyn), alcune delle quali sono espresse ubiquitariamente mentre altre sono tessuto-specifiche (Abram C.L. *et al.*, 2000). Alcuni esperimenti condotti in cellule esprimenti Bcr/Abl, hanno dimostrato che le SFKs sono in grado di indurre la proliferazione

cellulare e che Bcr/Abl è capace di attivare Lyn, Hck e Fgr (Stanglmaier M. *et al.*, 2003; Danhauser-Riedl S. *et al.*, 1996).

La sovraespressione e/o l'attivazione di Hck e Lyn sono evidenti in cellule e in campioni di pazienti con resistenza all'imatinib (Donato N.J. *et al.*, 2003; Donato N.J. *et al.*, 2004; Hofmann W.K. *et al.*, 2002). Inoltre, è stato dimostrato che Lyn è in grado di regolare la sensibilità all'imatinib nella CML ed è stata rilevata una sua attivazione persistente nei pazienti in cui è fallita la terapia con l'imatinib e che non presentavano alcuna mutazione nel gene *BCR/ABL1* (Wu J. *et al.*, 2008). Infine, è stato dimostrato che l'inibizione della sovraespressione di Lyn tramite siRNA (*short interfering RNA*) ripristina parzialmente la sensibilità cellulare all'imatinib e permette di indurre l'apoptosi nelle cellule leucemiche (Ptasznik A. *et al.*, 2004).

2. La proteinchinasi CK2

2.1 Struttura e proprietà enzimatiche

Le proteinchinasi costituiscono una delle più estese famiglie di proteine; oltre cinquecento di esse vengono codificate dal genoma umano. Tali proteine sono enzimi in grado di catalizzare le reazioni di fosforilazione, in cui avviene il trasferimento di un gruppo di γ -fosfato da una molecola donatore, che può essere ATP o GTP, verso i residui di serina, treonina o tirosina di un substrato (Venter *et al.*, 2001).

Le proteinchinasi sono caratterizzate da un dominio catalitico, altamente conservato, formato da circa 250-300 residui (Hanks S.K. *et al.*, 1991). L'allineamento di un vasto numero di sequenze di tali chinasi ha permesso di realizzare degli alberi filogenetici per la classificazione in gruppi dei diversi membri di questa famiglia (Hanks S.K. *et al.*, 1995).

Il gruppo delle CMGC comprende la famiglia della proteinchinasi CK2. Questo enzima fu scoperto nel 1954 e deve l'acronimo del suo nome alla prima denominazione di “*caseinkinase2*” che le venne assegnata, a seguito della sua capacità di fosforilare la caseina *in vitro* (Burnett G. *et al.* 1954). Curiosamente, tale chinasi non partecipa alla fosforilazione *in vivo* della caseina e i suoi primi substrati endogeni sono stati identificati solo una trentina d'anni dopo la sua scoperta (Pinna L.A. *et al.*, 1994). Attualmente è noto che la CK2 è un serin/treonin-chinasi altamente pleiotropica, in grado di fosforilare più di 300 substrati *in vivo* e/o *in vitro*, molti dei quali sono coinvolti in meccanismi fondamentali della vita cellulare come la differenziazione, la traduzione del segnale, la proliferazione e l'apoptosi (Meggio F. *et al.*, 2003).

La CK2 è distribuita ubiquitariamente negli organismi eucariotici, è espressa in tutti i tessuti ed è presente sia nel nucleo che nel citoplasma.

Nel meccanismo di fosforilazione proteica, essa è in grado di utilizzare indifferentemente l'ATP o il GTP come donatore di fosfato (Issinger O.G., 1993). L'attività della chinasi è indipendente da secondi messaggeri o eventi fosforilativi e, quindi, la CK2 è costitutivamente attiva, benché esista un vasto dibattito su eventuali meccanismi che ne regolino l'attività nelle cellule (Olsten M.E. *et al.*, 2004).

Nella maggior parte degli organismi, CK2 si ritrova in forma tetrameric. Nell'uomo sono state identificate due subunità catalitiche, α (44 kDa) e α' (38 kDa), codificate da due geni distinti, rispettivamente *CSNK2A1* localizzato nel cromosoma 20 e *CSNK2A2* situato nel cromosoma 6. La subunità regolatoria umana β (25 kDa) è univoca ed è codificata dal gene *CSNK2B* del cromosoma 6 (Yang-Fen T.L. *et al.*, 1991)

Le subunità catalitiche mostrano un'elevata identità di sequenza e differiscono essenzialmente nella porzione C-terminale, in cui CK2 α' manca di 41 amminoacidi rispetto a CK2 α (Lozeman F.J. *et al.*, 1990). Queste due subunità mostrano proprietà enzimatiche simili *in vitro*, ma ci sono varie evidenze su una loro diversa funzione nella cellula (Bodenbach L. *et al.*, 1994; Escalier D. *et al.*, 2003). Inoltre, nei mammiferi è stata vista la fosforilazione da parte di p34^{cdc2}, in funzione del ciclo cellulare, di quattro siti specifici (Thr344, Thr360, Ser362, Ser370) situati nella regione C-terminale di CK2 α , e quindi mancanti in CK2 α' , che suggerisce la possibilità che le due isoforme siano regolate differentemente durante il ciclo, sebbene tale fosforilazione non sembra avere effetti sull'attività della chinasi (Litchfield D.W. *et al.*, 1994; Bosc D.G. *et al.*, 1995).

L'analisi cristallografica della proteinchinasi ha permesso di dimostrare che la subunità regolatrice CK2 β , mediante una regione *zinc finger*, è in grado di formare un dimero che costituisce il *core* del tetramero chinasi al quale si legano due subunità catalitiche che possono essere identiche o differenti,

dando origine a diversi complessi: $\alpha_2\beta_2$, $\alpha\alpha'\beta_2$, $\alpha'_2\beta_2$ (Chantalat *et al.* 1999; Graham K.C. *et al.*, 2000).

All'estremità C-terminale di CK2 β è stata descritta sia una regione fondamentale per la stabilizzazione del tetramero e il potenziamento dell'attività catalitica di CK2 (Sarno S. *et al.*, 2000), sia un sito corrispondente alla serina 209 (Ser209) che viene fosforilato da p34^{cdc2} *in vitro* e in cellule di mammifero, in relazione al ciclo cellulare (Litchfield D.W. *et al.* 1991; Litchfield D.W. *et al.*, 1993).

L'estremità N-terminale della subunità regolatoria di CK2 presenta dei siti di autofosforilazione identificati in Ser2, Ser3 e, probabilmente, Ser4 ((Litchfield D.W. *et al.*, 1991; Boldyreff *et al.*, 1993). La funzione precisa di quest'autofosforilazione rimane ancora sconosciuta, anche se alcuni studi recenti suggeriscono che la fosforilazione di questi siti permette una maggior stabilità di CK2 β (Zhang C. *et al.*, 2002). In prossimità del N-terminale è stata identificata una regione (Arg47-Asp55) la cui sequenza presenta tre residui altamente conservati corrispondenti a quelli del motivo consenso dei *destruction box*, R-X-X-L-X-X-X-N/D, che giocano un ruolo chiave nella regolazione della degradazione delle cicline (Allende J.E. *et al.*, 1995; King R.W. *et al.*, 1996). Accanto al *destruction box*, si trova una sequenza ricca di amminoacidi acidi (Asp55-Asp64) che forma un *loop* per l'interazione della subunità CK2 β con le poliamine, suggerendo per tale regione un possibile ruolo di regolazione dell'attività di CK2 data la capacità delle poliamine di stimolare l'attività della chinasi *in vitro* (Leroy D. *et al.*, 1997; Meggio F. *et al.*, 1994).

Le strutture cristallografiche delle subunità catalitiche (Niefind K. *et al.*, 1998), della subunità β (Chantalat *et al.* 1999) e dell'oloenzima di CK2 (Niefind K. *et al.*, 2001) sono state risolte e mostrano una forma "a farfalla" della chinasi in cui le due subunità catalitiche, α e/o α' , non interagiscono fra loro ed entrambe si legano al dimero β - β .

Le superfici di contatto fra la subunità catalitica e regolatoria di CK2 che sono state rilevate sono notevolmente più piccole rispetto a quelle comunemente osservate in complessi proteici stabili, indicando la possibilità di una facile associazione e dissociazione delle subunità (Niefind K. *et al.*, 2002). A supporto di tale ipotesi, recenti studi di localizzazione intracellulare delle subunità di CK2 hanno messo in evidenza movimenti indipendenti di CK2 α e CK2 β all'interno della cellula (Martel V. *et al.*, 2002). Ulteriormente, è stata rilevata sia nelle piante (Yan T.F. *et al.*, 1982) sia in alcune cellule (Di Maira G. *et al.*, 2007) la presenza di CK2 α monomerica ed è nota anche la capacità di CK2 β di interagire autonomamente con alcune proteinchinasi per regolarle (Guerra B. *et al.*, 1999; Guerra B. *et al.*, 2003). La CK2 è un enzima costitutivamente attivo sia nella sua conformazione tetramericata sia come subunità catalitica monomerica ed entrambe sono in grado di fosforilare *in vitro* per la maggior parte gli stessi substrati, benché per alcuni di questi la presenza di CK2 β risulta indispensabile (Theis-Febvre N. *et al.*, 2003) e altri, come la calmodulina, sono fosforilati solo dalla CK2 α e/o CK2 α' monomeriche (Marin O. *et al.*, 1999). La subunità regolatrice β risulta importante per regolare la specificità di substrato dell'oloenzima e per mantenere attivo il *loop* di attivazione della chinasi, che controlla l'accesso dei substrati al sito catalitico. L'attività costitutiva della subunità catalitica monomerica è garantita dall'interazione fra la sua estremità N-terminale e il *loop* di attivazione (Litchfield D.W. *et al.*, 2003; Niefind K. *et al.*, 1998; Sarno S. *et al.*, 2002).

La CK2 fosforila i propri *target* in siti, principalmente serinici e treonici, circondati da molteplici residui amminoacidici acidi. Il determinante specifico più rilevante è un residuo acido in posizione n+3, che determina la sequenza consenso minima: S/T-X-X-D/E/Yp/Sp (X = amminoacido generico, S = serina, T = Treonina, E = acido glutammico, D = acido aspartico, Sp = Serina fosforilata, Yp = tirosina fosforilata). Determinanti negativi sono i

residui prolinici in n+1 e i residui basici in posizione fra n-1 e n+4 (Meggio F. *et al.*, 1994). Inoltre, dati recenti hanno messo in evidenza sia che CK2 α è in grado di autofosforilarsi in Tyr122 *in vitro* (Donella-Deana A. *et al.*, 2001) sia che CK2 può catalizzare la fosforilazione di residui tirosinici in cellule di mammifero (Vilk G. *et al.*, 2008).

2.2 Il ruolo della proteinchinasi CK2 nel ciclo cellulare

CK2 è stata associata ad ogni stadio della progressione del ciclo cellulare e catalizza la fosforilazione di un numero consistente di proteine cruciali per la generazione delle cellule figlie. In lievito, studi genetici hanno messo in evidenza che il *knockout* dei geni codificanti le subunità catalitiche di CK2 induce un fenotipo letale (Padmanabha R. *et al.*, 1990), mentre la realizzazione di mutanti temperatura-sensibili per CK2 α o CK2 α' ha permesso di distinguere per la prima volta una specializzazione funzionale delle due subunità catalitiche, in quanto la mancanza di CK2 α causa un difetto della polarità cellulare e l'assenza di CK2 α' genera l'arresto del ciclo cellulare (Retinaswamy A. *et al.*, 1998; Hanna D.E. *et al.*, 1995). Ulteriori studi hanno confermato l'indispensabilità di CK2 per la progressione attraverso le fasi di transizione G1/S e G2/M del ciclo cellulare del lievito (Glover C.V. *et al.*, 1998).

In cellule di mammifero è stato visto che l'uso di oligonucleotidi antisenso per le subunità α o β di CK2, la microiniezione di anticorpi contro CK2 e l'uso d'inibitori di CK2 sono capaci di inibire la progressione del ciclo cellulare, mettendo in evidenza che in queste cellule la proteinchinasi risulta necessaria per le transizioni G0/G1, G1/S e G2/M del ciclo (Lorenz P. *et al.*, 1993; Pepperkok R. *et al.*, 1994; Ford H.L. *et al.*, 2000). In aggiunta, altre evidenze mostrano che CK2 è implicata nella transizione G2/M

mediante l'associazione al fuso mitotico e ai centrosomi (Yu I. *et al.*, 1991; Krek W. *et al.*, 1992).

A ulteriore conferma dell'importanza di CK2 nel controllo del ciclo cellulare sono state identificate come substrato fisiologico della chinasi molte proteine regolatrici di tale processo, come ad esempio p34^{cdc2}, cdc34 e la topoisomerasi II (Russo G.L. *et al.*, 1992; Block K. *et al.*, 2001; Cardenas M.E. *et al.*, 1992). Inoltre, l'avanzamento del ciclo cellulare è mediato in gran parte dalla regolazione delle chinasi ciclina-dipendenti (Cdks) (Nasmyth K., 1996). Tali chinasi sono attivate, in precisi momenti, in parte dall'attività della chinasi CAK (*Cdk-activating kinase*), un enzima costituito da un complesso fra Cdk7, ciclina H e MAT1 (*mènage à trois 1*) (Lolli G. *et al.*, 2005). La CAK è a sua volta regolata da CK2 (Schneider E. *et al.* 2002). Infatti, CK2 α interagisce con la ciclina H fosforilandola nella Ser315 e tale fosforilazione, sebbene non abbia effetti nella formazione del complesso CAK, è cruciale per la completa attività di tale chinasi (Faust M. *et al.*, 2002).

Infine, la dimostrazione che CK2 α e CK2 β sono fosforilate in cellule mitotiche e che la CK2 fosforilata in mitosi interagisce con Pin1, un regolatore essenziale della divisione cellulare, aggiunge nuove indicazioni sull'importanza del ruolo di CK2 in questo stadio della vita cellulare (Litchfield D.W. *et al.*, 1992; Messenger M.M. *et al.*, 2002).

2.3 La proteinchinasi CK2 nell'apoptosi cellulare

La capacità di CK2 di fosforilare una vasta quantità di proteine coinvolte in processi vitali della cellula, fa sì che la chinasi giochi un ruolo importante nella sopravvivenza cellulare. Oltre all'effetto sulla sopravvivenza cellulare causato dal blocco dell'espressione o dall'inibizione di CK2 in cellule di lievito e in quelle di mammifero descritto in precedenza, sono noti anche effetti sulla vitalità di modelli animali in relazione ad un'alterata

espressione della chinasi. Il *knockout* del gene codificante CK2 β risulta in un fenotipo letale sia a livello embrionale nel topo che a livello delle singole cellule (Buchou T. *et al.*, 2003). Curiosamente, mentre i topi *knockout* per il gene di CK2 α vanno incontro a morte allo stato embrionale (Lou D.Y. *et al.*, 2008), i topi in cui manca CK2 α' sono vitali, ma i maschi di tale progenie risultano sterili e con difetti nella spermatogenesi, legati alla predisposizione all'apoptosi da parte delle cellule germinali, (Xu X. *et al.*, 1999). Questo denota la capacità di CK2 α di compensare solo parzialmente la mancanza di CK2 α' . Inoltre, è stato descritto che la sovraespressione di una forma inattiva di CK2 α' in cellule di osteosarcoma umano U2-OS compromette la proliferazione e la sopravvivenza cellulare, mentre l'espressione indotta nelle medesime cellule di CK2 α cataliticamente inattiva non manifesta nessun effetto nella vitalità delle cellule, suggerendo delle funzioni specifiche di CK2 α' per quanto concerne la proliferazione cellulare (Faust M. *et al.*, 1999).

La conoscenza dei meccanismi con cui CK2 favorisce la vitalità delle cellule rimane ancora distante dall'essere esauriente, ma ci sono differenti evidenze recenti che associano alla chinasi un ruolo anti-apoptotico nella cellula. Ad esempio, in linee di cellule tumorali la sovraespressione di CK2 è protettiva contro l'apoptosi indotta chimicamente (Guo C. *et al.*, 2001) e cellule resistenti all'apoptosi stimolata da alcuni inibitori spesso sovraesprimono CK2 (Di Maira G. *et al.*, 2007). Inoltre, l'inibizione chimica di CK2 può sensibilizzare le cellule tumorali all'apoptosi (Ruzzene M. *et al.*, 2002; Izeradjene K. *et al.*, 2004) e, *in vivo*, stimolare l'abilità delle cellule *natural killer* (NK) nel sopprimere le cellule cancerose (Kim H. *et al.*, 2008).

La CK2 è considerata in grado di regolare direttamente sia l'apoptosi recettoriale (Izeradjene K. *et al.*, 2004) che quella intracellulare indotta da danni al DNA (Yamane K. *et al.*, 2005).

CK2 è stata descritta regolare varie proteine coinvolte nei segnali apoptotici tramite fosforilazione e/o induzione della loro sovraespressione. Ad esempio, l'espressione della survivina, un inibitore delle proteine apoptotiche, è aumentata dalla sovraespressione di CK2 (Tapia J.C. *et al.*, 2006).

Uno dei meccanismi proposti per il ruolo anti-apoptotico di CK2 si basa sulla similarità fra la sequenza consenso per la fosforilazione di CK2 e quella per il taglio delle proteine da parte delle caspasi, che è centrata su un residuo di acido aspartico. In particolare, la fosforilazione da parte di CK2 di residui vicini a, o contenuti in, siti di taglio delle caspasi proteggerebbe le proteine dal taglio caspatico, evitando l'apoptosi cellulare (Litchfield D.W. *et al.*, 2003). Ad esempio la proteina pro-apoptotica Bid, che fa parte della famiglia delle proteine Bcl-2, è in grado di interagire con CK2 α , che a sua volta la fosforila (Olsen B.B. *et al.*, 2006) e la rende poco suscettibile al taglio da parte della caspasi 8, causando così l'inibizione del meccanismo di apoptosi mitocondriale mediato da Bid (Desagher S. *et al.*, 2001). La fosforilazione del soppressore tumorale PTEN da parte di CK2 in corrispondenza del sito di taglio della caspasi 3 protegge la proteina dalla proteolisi e ne aumenta la stabilità, potenziando la via del segnale di Akt per la sopravvivenza cellulare (Torres J. *et al.*, 2003). La proteina Max è il principale componente del gruppo di fattori di trascrizione Myc/Max/Mad e viene tagliata dalle caspasi 5 e 7 in seguito alla risposta indotta dal recettore Fas. La fosforilazione di Max da parte di CK2 ne blocca la proteolisi e, quindi, la conseguente capacità di stimolare l'espressione di geni pro-apoptotici (Krippner-Heinrich A. *et al.*, 2001). Altri substrati caspatici regolati secondo questo meccanismo da CK2 sono HS1 (Ruzzene M. *et al.*, 2002), presenilina-2 (Walter J. *et al.*, 1999) e connessina 45.6 (Yin X. *et al.*, 2001).

La regolazione dell'attività caspatica da parte di CK2 avviene anche agendo direttamente sulle caspasi. La fosforilazione della procaspasi-2 da parte di CK2 previene l'attivazione di tale caspasi prevenendone la dimerizzazione

(Shin S. *et al.*, 2005). Inoltre è stato visto che nel topo, la fosforilazione della caspasi 9, catalizzata da CK2, protegge la caspasi dal taglio proteolitico da parte della caspasi 8, bloccando l'apoptosi (McDonnell M.A. *et al.*, 2008). Anche la proteina inibitrice delle caspasi ARC (*apoptosis repressor with caspase recruitment domain*) necessita della fosforilazione da parte di CK2 per bloccare effettivamente l'attivazione della caspasi 8 (Li P.F. *et al.*, 2002).

2.4 Ruolo chiave della proteinchinasi CK2 nel cancro

L'implicazione della proteinchinasi CK2 in diversi eventi fondamentali della vita cellulare e la sua proprietà di essere costitutivamente attiva fanno sì che un livello variabile di espressione di CK2 nelle cellule possa comportare gravi conseguenze come una deregolata sopravvivenza e proliferazione cellulare, fenomeni che sono alla base dell'origine dei tumori.

La potenziale implicazione di CK2 nell'oncogenesi è basata sull'osservazione che in tutti i tumori, in cui è stata analizzata la sua quantità proteica cellulare, CK2 è risultata sovraespressa. Vari studi di dosaggio dell'attività enzimatica, immunostochimica o *immunoblot* hanno rilevato che l'aumento di CK2 non si manifesta come un incremento a livello di mRNA, ma solo a livello di espressione proteica (Guerra B.B. *et al.*, 2008; Tawfic S. *et al.*, 2001).

Sono state descritte varie caratteristiche della proteinchinasi dagli studi delle cellule cancerose. Innanzitutto, le cellule tumorali mostrano una concentrazione nucleare di CK2 più alta rispetto alle cellule normali, in cui generalmente è diffusa simultaneamente nei vari compartimenti subcellulari (Faust R.A. *et al.*, 1999). Poi, la deregolazione dell'espressione di CK2 può essere in relazione con l'aggressività della patologia e certe volte fungere da indicatore prognostico (Laramas M. *et al.*, 2007; O-Charoenrat P. *et al.*, 2004). Infine, la capacità di CK2, descritta precedentemente, di essere un forte soppressore dell'apoptosi conferma il suo ruolo nella sopravvivenza

cellulare e collega fortemente la sovraespressione e le funzioni di CK2 al fenotipo delle cellule cancerose (Guo C. *et al.*, 1999).

Il ruolo specifico di CK2 nel fenotipo delle cellule tumorale è poco chiaro e, talvolta, la sua sovraespressione è stata considerata una conseguenza dell'elevato stato proliferativo delle cellule cancerose (Guerra B.B. *et al.*, 1999). Vari studi, però, hanno messo in evidenza che l'aumento dell'espressione di CK2 nelle cellule tumorali riflette non solo l'elevata proliferazione di tali cellule, ma anche il loro stato di displasia (Faust R.A. *et al.*, 1999). Inoltre, esperimenti condotti su animali hanno contribuito a sottolineare il potenziale oncogenico dell'espressione deregolata di CK2. In modelli murini, la sovraespressione di CK2 induce tumorigenesi nei linfociti (Seldin D.C. *et al.*, 1995) e nella ghiandola mammaria (Landesman-Bollag E. *et al.*, 2001), mentre la sovraespressione di CK2 α in combinazione con l'espressione transgenica di *c-myc* o *Tal-1* aumenta significativamente l'incidenza di leucemie e linfomi nei topi (Kelliher M.A. *et al.*, 1996; Channavajhala P. *et al.*, 2002).

La potenzialità di CK2 di promuovere la tumorigenesi ha una delle sue basi nella capacità della proteinchinasi di regolare alcuni soppressori tumorali. Infatti, fosforilando i soppressori tumorali, CK2 ne influenza l'attività, aumentando o diminuendone l'affinità per il substrato (Kelle D.M. *et al.*, 2002), e/o la stabilità, proteggendo o promuovendo la loro degradazione mediante la via del proteasoma (Torres J. *et al.*, 2001; Scaglioni P.P. *et al.*, 2006).

Il fattore di trascrizione p53 è un soppressore tumorale fondamentale, in grado di bloccare la crescita cellulare e indurre l'apoptosi in seguito a danno del DNA (Oren M., 2003). La chinasi CK2 è in grado di fosforilare l'oncoproteina Mdm2, favorendo la sua attività a livello nucleare in cui blocca l'attività trascrizionale di p53 e ne favorisce la degradazione mediante la via del proteasoma (Allende-Vega N. *et al.*, 2005).

PML è un altro soppressore tumorale, il cui meccanismo di regolazione da parte di CK2 è basato sul controllo della sua stabilità. PML controlla diversi processi cellulari, come la soppressione della crescita, l'apoptosi e la senescenza (Lallemand-Breienbach V. *et al.*, 2010). La mancata attività di PML è presente in un vasto numero di tumori e correla con la suscettibilità e la progressione tumorale. CK2 fosforila PML a livello della Ser517, promuovendo la degradazione della proteina mediante la via del proteasoma e proteggendo così le cellule dall'apoptosi. Chiaramente, l'elevata attività di CK2 nelle cellule tumorali porta ad una maggiore fosforilazione e, successiva, degradazione di PML rispetto alle cellule normali, inducendo la tumorigenesi. (Scaglioni P.P. *et al.*, 2006).

CK2 è in grado di promuovere la sopravvivenza delle cellule tumorali agendo anche tramite la regolazione degli oncogeni, proteine chiave che stimolano la crescita incontrollata delle cellule. Vari prodotti proto-oncogenici sono stati descritti come target diretti di CK2, in cui la fosforilazione causa un'alterazione della loro attività: c-Myc (Channavajhala P.L. *et al.*, 2002), c-Myb (Oelgeschlager M. *et al.*, 1995); , c-Jun (Lin A. *et al.*, 1992), il fattore di trascrizione NF- κ B (Eddy S.F. *et al.*, 2005), β -catenina (Seldin D.C. *et al.*, 2005) e Max (Bousset K. *et al.*, 1994).

I meccanismi molecolari mediante i quali CK2 può influenzare molteplici *pathway* cellulari e indurre la promozione della sopravvivenza cellulare non sono completamente conosciuti. Alcuni di questi tuttavia sono stati studiati approfonditamente e quelli in cui CK2 è maggiormente implicata nello sviluppo della tumorigenesi sembrano essere le vie di segnale NF- κ B, Wnt e PI3K/Akt.

NF- κ B è un fattore di trascrizione della risposta infiammatoria, coinvolto nei meccanismi della proliferazione e dell'apoptosi cellulare. Un'alterata regolazione di questo fattore è stata associata allo sviluppo di patologie tumorali, in quanto nelle cellule si sviluppa la resistenza all'apoptosi e il

mancato controllo del ciclo cellulare (Chen F. *et al.* 2001). NF- κ B è normalmente inattivo e localizzato nel citosol, associato alla proteina inibitoria I κ B. La fosforilazione di I κ B da parte di CK2 ne causa la degradazione mediante il proteasoma, con la conseguente attivazione e traslocazione di NF- κ B nel nucleo, dove legandosi al DNA induce la trascrizione dei suoi geni target, che codificano per fattori di sopravvivenza cellulare (Barroga C.F. *et al.*, 1995). A sua volta, NF- κ B è fosforilato direttamente da CK2, che in tal modo ne potenzia la capacità di legare il DNA e ne facilita la funzione (Wang D. *et al.*, 2000). Inoltre, è stato osservato che il gene codificante per CK2 α è un potenziale target di NF- κ B, suggerendo la possibile esistenza di un meccanismo a *feedback* positivo in cui CK2 riesce a modulare la sua propria espressione (Krehan A. *et al.*, 2000).

La via di segnale Wnt è generalmente attivata durante l'embriogenesi, in cui svolge un ruolo fondamentale. La sua attivazione in tessuti adulti è stata correlata alla tumorigenesi in quanto porta all'aumento della proliferazione cellulare e al blocco dell'apoptosi (Chen F. *et al.* 2001). CK2 è stata spesso descritta essere implicata nell'attivazione della via di segnale Wnt nel tumore sporadico del colon. Alti livelli del fattore β -catenina, attivato mediante questo *pathway*, induce la trascrizione di geni codificanti proteine correlate con la sopravvivenza cellulare come c-Myc, c-Jun e la ciclina D1. La fosforilazione della β -catenina da parte di CK2 pare svolgere un ruolo chiave nella stabilizzazione della proteina a livello nucleare, proteggendola dalla degradazione del proteasoma. Una prolungata attivazione della β -catenina porta ad un perpetuarsi di segnali per la sopravvivenza cellulare, con conseguente sviluppo tumorigenico (Song D.H. *et al.*, 2003). L'aumento della stabilità della β -catenina è mediato da CK2 anche fosforilando le proteine *Dishevelled* (Dvl), che fanno anch'esse parte della via del segnale Wnt e che controllano indirettamente la degradazione della β -catenina.

L'evento fosforilativo condotto da CK2 inibisce le Dlv e porta così all'aumento di β -catenina nel nucleo, con conseguente stimolazione della vitalità cellulare. (Willert K. *et al.*, 1997).

Il *pathway* PI3K/Akt controlla la vitalità della cellula mediante un vasto numero di vie di segnale convergenti. La fosforilazione di Akt promuove lo sviluppo di segnali della sopravvivenza cellulare mediante la via di segnale di NF- κ B, regolando direttamente l'attivazione delle caspasi e inattivando la proteina pro-apoptotica BAD. CK2 è capace di fosforilare Akt1 nella Ser 129 *in vivo* e di generare conseguentemente una forma costitutivamente attiva di Akt. In questa situazione, viene continuamente stimolata la sopravvivenza cellulare con lo sviluppo della tumorigenesi (Di Maira G. *et al.*, 2005). In questa direzione, è stata descritta anche la capacità di CK2 di fosforilare e, così, stabilizzare la forma inattiva della fosfatasi PTEN, che normalmente inibisce in modo indiretto Akt (Torres J. *et al.*, 2003).

L'insieme dei meccanismi fin qui descritti e quelli, illustrati in precedenza, in cui CK2 è in grado di interferire con varie vie che portano all'apoptosi cellulare, attribuiscono a questa chinasi un ruolo importante nelle patologie cancerose. L'importanza di CK2 come possibile target per le terapie tumorali è sostenuto da diverse considerazioni. Innanzitutto, a differenza di molte altre proteinchinasi, CK2 appare essere marcatamente responsabile della modulazione di segnali mitogenici in cellule prostatiche (Wang G. *et al.*, 2006). Poi, l'aumento incontrollato dell'espressione di CK2 nelle cellule tumorali riflette lo stato patogenico del tumore (Faust R.R. *et al.*, 1999; Lamas M. *et al.*, 2007; O-Charoenrat P. *et al.*, 2004). Inoltre, l'inibizione di CK2 non interferisce solo con la crescita e la proliferazione cellulare, ma anche con l'attività apoptotica delle cellule tumorali, suggerendo la possibilità di indurre la morte programmata sopprimendo l'attività di CK2 (Ahmad K.A. *et al.*, 2008). Infine, CK2 risulta indispensabile per la sopravvivenza cellulare e non sembrano esistere dei *pathway* ridondanti che

possono sopperire alla mancanza dell'attività di tale chinasi (Padmanabha R. *et al.*, 1990; Buchou T. *et al.*, 2003).

Sebbene i motivi appena illustrati siano convincenti per considerare CK2 un buon target terapeutico, è d'obbligo considerare che CK2 è un enzima ubiquitario e, quindi, si devono creare delle strategie che permettano di distinguere le cellule normali da quelle tumorali, inibendo la proteinchinasi CK2 solo in quest'ultime.

3. Il fattore eucariotico d'inizio della traduzione 3 (eIF3)

3.1 La fase d'inizio della traduzione negli eucarioti

La sintesi proteica è una fase importante dell'espressione genica, ovvero quella nella quale l'informazione codificata dai geni, dopo essere stata trascritta nell'RNA messaggero maturo (mRNA), viene tradotta per dare origine alle proteine. La sintesi proteica, dunque, gioca un ruolo cruciale nello stabilire i livelli intracellulari di espressione delle proteine e, di conseguenza, la deregolazione di questo processo può causare alterazioni gravi alla normale vitalità cellulare. La traduzione dell'mRNA viene suddivisa in tre fasi: l'inizio, l'elongazione e la terminazione del polipeptide (Fraser S.C. *et al.*, 2009).

Negli eucarioti, la traduzione dell'mRNA è regolata nella sua fase d'inizio, che viene considerata il passaggio limitante della traduzione. L'inizio della traduzione degli mRNA eucariotici coinvolge molti fattori di inizio (eIFs), di cui ne sono stati identificati almeno 12, alcuni dei quali sono complessi costituiti da varie subunità (Sonenberg N. *et al.*, 2009).

La traduzione inizia con la dissociazione del ribosoma 80S nelle subunità 40S e 60S, a cui segue la formazione del complesso di pre-inizio 43S, costituito dalla subunità ribosomiale 40S, dai fattori eIF1, eIF1A, eIF3, eIF5 e al complesso ternario costituito dal fattore eIF2, Met-tRNA^{Met} e GTP. Successivamente, i fattori eIF4F e eIF4B si associano al *cap* dell'estremità 5' del mRNA, permettendone il legame con il complesso di pre-inizio, che scorre lungo il messaggero fino a raggiungere il codone d'inizio della traduzione (più frequentemente AUG) e formare, così, il complesso di pre-inizio 48S. Infine, il rilascio dei fattori eIF¹⁻⁵ permette alla subunità

ribosomiale 60S di associarsi al complesso 48S, per costituire il complesso di inizio 80S necessario per la fase di elongazione (Jackson R.J. *et al.*, 2010).

Questo tipo di meccanismo è quello principale, anche se è stata descritta una possibile via alternativa, utilizzata per la traduzione degli RNA virali, che risulta indipendente dal legame del complesso ribosomiale al *cap* nell'estremità 5' dell'mRNA, ma prevede il legame del ribosoma in una regione interna del mRNA denominata IRES (*internal ribosome entry site*). Le varie problematiche riscontrate nello studio dell'inizio della traduzione mediato da IRES, hanno tuttavia messo in discussione perfino la reale esistenza di questo meccanismo che non verrà, quindi, descritto in questa introduzione (Kozak M. *et al.*, 2005; Komar A.A. *et al.*, 2005).

3.2 eIF3 e il suo ruolo nell' inizio della traduzione

Il fattore eIF3 gioca un ruolo centrale in tutti le fasi dell'inizio della traduzione. Esso è il più complesso fra i fattori eucariotici di inizio della traduzione, ha un peso molecolare di circa 700 kDa nelle cellule di mammifero ed è costituito da 13 subunità putative, da eIF3a a eIF3m (Browning K.S. *et al.*, 2001). Data la sua complessità, molti studi sul ruolo di eIF3 sono stati eseguiti su modelli di lievito, in cui il fattore è composto solo da 5 subunità (ortologhe delle subunità di mammifero eIF3a, eIF3b, eIF3c, eIF3g ed eIF3i) che formano un *core* al quale si associano molte subunità libere, espresse in modo diverso fra i vari tipi di lievito, che permettono l'interazione del complesso eIF3 con altri eIFs e con il ribosoma 40S (Zhou C. *et al.*, 2005; Nielsen K. *et al.*, 2006).

Lo studio delle interazioni fra le subunità del complesso eIF3 di mammifero sono poco conosciute data la sua complessità, ma alcune informazioni si sono ottenute mediante l'uso di proteine ricombinanti contenenti mutazioni o delezioni e l'analisi di doppio ibrido in lievito. Questi esperimenti hanno evidenziato, in *S. cerevisiae*, che eIF3b è cruciale nell'organizzazione

strutturale del complesso eIF3. Infatti, eIF3b è noto interagire con eIF3e, poi con eIF3g ed eIF3i tramite la sua porzione C-terminale, mentre mediante il motivo di riconoscimento dell'RNA (RRM), situato all'N-terminale, è in grado di legare simultaneamente eIF3a ed eIF3j (Shalev A. *et al.*, 2001; Asano K. *et al.*, 1998; Valasek L. *et al.*, 2001). Inoltre, il dominio RRM di eIF3b è cruciale per la stabilità del complesso ed è importante per il legame con la subunità ribosomiale 40S, tant'è che la sua rimozione causa sia la dissociazione di eIF3a, eIF3c ed eIF3j dal complesso sia la rottura dell'interazione di eIF3 con la subunità ribosomiale 40S (Valasek L. *et al.*, 2001). In lievito è stato dimostrato che eIF3c interagisce indirettamente ad eIF3b, legandosi direttamente all'estremità N-terminale di eIF3a (Valasek L. *et al.*, 2002), e che eIF3g ed eIF3i non si legano direttamente ad eIF3j (Fraser C.S. *et al.*, 2004).

L'analisi dell'interazione delle subunità di eIF3 dei mammiferi hanno dato risultati in linea con quelli ottenuti in lievito, come la conferma del legame di eIF3a al dominio RRM di eIF3b (Methot N. *et al.*, 1997), nonché aggiunto nuove informazioni, come ad esempio l'interazione di eIF3g con eIF3a (Block K.L. *et al.*, 1998).

3.2.1 Ruolo di eIF3 nella generazione delle subunità ribosomiali dai ribosomi 80S

Al termine della traduzione, il ribosoma 80S si separa prima dal mRNA e poi viene dissociato nelle subunità 40S e 60S, che devono mantenersi separate fino all'inizio di un nuovo ciclo della traduzione (Henshaw E.C. *et al.*, 1973).

eIF3 è in grado di legare la subunità 40S del ribosoma sia *in vivo* che *in vitro* per formare un complesso stabile che mantiene la subunità 40S dissociata (Majudmar R. *et al.*, 2003). Il meccanismo di questo legame non è completamente chiaro, ma la subunità eIF3j è stata proposta come artefice

di questo processo. Infatti, *in vitro* è stato dimostrato che *i)* la subunità eIF3j umana si associa e dissocia facilmente dal complesso eIF3, *ii)* eIF3j isolata è in grado di legare la subunità 40S, *iii)* complessi di eIF3 privi di eIF3j risultano meno stabili e legano inefficientemente la subunità 40S (Fraser C.S. *et al.*, 2004). Inoltre, studi recenti condotti su linfociti umani T hanno messo in evidenza che molti complessi eIF3 non presentano eIF3j e si trovano dissociati dalla subunità 40S, quando queste cellule sono inattivate. A seguito dell'attivazione dei linfociti T da parte dei mitogeni, la subunità eIF3j si lega al complesso eIF3, rendendolo capace di legare la subunità ribosomiale 40S (Miyamoto S. *et al.*, 2005).

3.2.2 Ruolo di eIF3 nella formazione del complesso di pre-inizio 43S

Fin dai primi studi di legame effettuati *in vitro* è emersa la necessità del fattore eIF3 nello stabilizzare il legame del complesso ternario GTP/eIF2/Met-tRNA^{iMet} (TC) alla subunità ribosomiale 40S (Traschel H. *et al.*, 1979; Peterson D.T. *et al.*, 1979).

In lievito è stato dimostrato che la formazione del complesso di pre-inizio 43S (43S PIC) avviene mediante il legame alla subunità 40S di un complesso di fattori multipli (MFC), costituito da eIF3, eIF1, eIF5 e il TC. All'interno del MFC, eIF5 è in grado di mediare l'interazione fra eIF2 ed eIF3. In particolare, all'estremità C-terminale di eIF5 è presente un dominio per il legame con la subunità β di eIF2 e uno per l'interazione con la porzione N-terminale di eIF3c. La rimozione della porzione N-terminale di eIF3c causa dissociazione sia di eIF5 che di eIF1 da eIF3, suggerendo l'importanza di questo dominio per l'interazione di eIF1 con l'MFC (Asano K. *et al.*, 2000).

In cellule di mammifero, l'interazione fra eIF1 e il complesso eIF3 avviene sempre tramite la subunità eIF3c come in lievito (Fletcher C.M. *et al.*, 1999).

Inoltre, in tali cellule è stato dimostrato che il fattore eIF1A è necessario e sufficiente per mediare il legame fra il TC e la subunità ribosomiale 40S, ma tale complesso risulta instabile. Curiosamente, l'aggiunta di eIF3 purificata stabilizza il complesso, suggerendo la capacità di eIF3 di stabilizzare il 43S PIC (Majumdar R. *et al.*, 2003).

3.2.3 Ruolo di eIF3 nella formazione del complesso di pre-inizio 48S

Nell'inizio della traduzione *cap*-dipendente è necessaria la formazione del complesso di pre-inizio 48S (48S PIC), tramite il legame del 43S PIC all'mRNA, seguito dalla scansione del ribosoma per collocarsi al codone d'inizio della traduzione (Jackson R.J. *et al.*, 2010).

Il complesso eIF3 è in grado di stimolare il legame dell'mRNA al 43S PIC (Traschel H. *et al.*, 1977) e, studi sulla base di questo meccanismo, hanno suggerito che eIF3 interagisce con il fattore eIF4F, che si trova legato al *cap* in 5' del mRNA. In particolare, esperimenti di purificazione hanno messo in evidenza che il complesso eIF3 interagisce con la subunità eIF4G di eIF4F (Phan L. *et al.*, 1998).

In aggiunta, nelle cellule di mammifero è stato dimostrato che il complesso eIF3 è in grado di legare, tramite la subunità eIF3a, un dominio nell'estremità C-terminale del fattore eIF4B, che si trova anch'esso associato in prossimità del *cap* in 5' dell'mRNA (Methot N. *et al.*, 1996).

3.3 eIF3 e i tumori

Da molti anni è stato riconosciuto un ruolo importante dei fattori di traduzione nell'oncogenesi. In particolare l'espressione deregolata di queste proteine può causare cambiamenti nell'efficienza della traduzione di specifici mRNA, favorendo la traduzione di mRNA che sono tradotti normalmente con bassa efficienza e che codificano per proteine coinvolte

nella proliferazione cellulare, nell'angiogenesi e nella sopravvivenza cellulare, come ad esempio la ciclina D1, c-Myc e le metalloproteasi di matrice (Lazaris-Karatzas A. *et al.*, 1990; Donze O. *et al.*, 1995; Benedetti A. *et al.*, 1999; De Benedetti A. *et al.*, 2004).

Il complesso eIF3 è stato associato all'oncogenesi e al mantenimento del fenotipo tumorale in diversi tipi di cancro. L'analisi dei trascrittomi di diverse linee di cellule tumorali ha messo in luce un numero elevato di mRNA che codificano per subunità di eIF3. Ad esempio l'mRNA di eIF3a risulta sovraespresso in tumori mammari, cervicali, esofagei, gastrici e polmonari. Il trascritto di eIF3b è sovraespresso nel carcinoma mammario, quello di eIF3c nei seminomi testicolari e quello di eIF3h nel carcinoma mammario, prostatico ed epatocellulare (Zhang L. *et al.*, 2007). Curiosamente, eIF3e risulta sottoespresso nel carcinoma mammario e polmonare (Miyazaki S. *et al.*, 1997). Inoltre, è stato dimostrato che la traduzione di specifici mRNA codificanti proteine coinvolte nella proliferazione cellulare, come il regolatore del ciclo cellulare p27, è dipendente dai livelli di eIF3a (Dong Z. *et al.*, 2004).

Per studiare il contributo della sovraespressione delle singole subunità del complesso eIF3 nello sviluppo della tumorigenesi, sono state generate 12 linee di fibroblasti murini NIH-3T3 stabilmente trasfettati con costrutti diversi, in modo da sovraesprimere in ognuna una diversa subunità del complesso eIF3, esclusa la subunità eIF3m. Le linee cellulari sovraesprimenti eIF3a, eIF3b, eIF3c, eIF3h ed eIF3i sono state le uniche in cui si è avuto un modesto aumento della sintesi proteica, della crescita cellulare, della resistenza all'apoptosi e di altri fenotipi maligni. In particolare, è stato visto come l'aumento dell'espressione di eIF3a, eIF3b o eIF3c causi, mediante un meccanismo sconosciuto, l'aumento dei livelli intracellulari del complesso eIF3, mentre non è chiaro come la sovraespressione di eIF3h ed eIF3i, che non alterano la quantità di eIF3, siano capaci di stimolare la proliferazione cellulare (Zhang L. *et al.*, 2007).

In un'altra linea cellulare, in cui l'induzione dell'espressione di eIF3h è in grado di stimolare la trasformazione tumorale delle cellule, è stato visto che la sovraespressione della medesima subunità con una sostituzione amminoacidica della Ser183 in Ala, che evita la fosforilazione in tale sito, non induce il fenotipo canceroso, suggerendo che l'evento fosforilativo è necessario per l'induzione dell'oncogenesi (Zhang L. *et al.*, 2008).

Mentre in generale la sovraespressione delle subunità di eIF3 sembra essere fondamentale per lo sviluppo di tumori, al contrario, in tumori pancreatici, ovarici e mammari sono stati visti livelli di espressione di eIF3f più bassi di quelli fisiologici. (Shi J. *et al.* 2006). In accordo, la sovraespressione di eIF3f in cellule tumorali è in grado di inibire la sintesi proteica e stimolarne l'apoptosi. L'attività di questa subunità del complesso eIF3 è stata associata alla sua fosforilazione da parte della chinasi pro-apoptotica CDK11p46 nei siti Ser46 e Thr117, che se vengono mutati bloccano l'azione di eIF3f nella sintesi proteica (Shi J. *et al.*, 2003).

In conclusione, ci sono vari dati che suggeriscono un evidente ruolo del complesso eIF3 nel generare e mantenere un fenotipo canceroso, che va a supporto delle evidenze sull'importanza della regolazione della sintesi proteica nel controllo della proliferazione cellulare.

MATERIALI E METODI

Anticorpi

Gli anticorpi anti c-Abl, Akt1/2/3 totale, Hsp90, Cdc37, Syk, Shp-1, Shp-2, CK2 α ', eIF3j, eIF3b e CK2 α (contro la regione N-terminale) sono forniti dalla Santa Cruz Biotechnology. L'anticorpo anti α -tubulina è fornito dalla Sigma-Aldrich. L'anticorpo anti p-Tyr proviene da Millipore. Gli anticorpi anti CK2 β , CrkL totale, p-CrkL (Tyr207) sono forniti da Epitomics. Il siero contro l'estremità C-terminale di CK2 α umana, che riconosce una regione compresa tra i residui amminoacidici 376-391, è stato prodotto in coniglio per immunizzazione con corrispondente sequenza della proteina (Sarno S. *et al.*, 1996).

Gli anticorpi secondari utilizzati sono forniti da Pelkin-Elmer (*Anti-rabbit and anti-mouse HRP-labeled*), Sigma-Aldrich (*anti-goat IgG biotinylated*) e Amersham Biosciences (*Streptavidin-Horseradish Peroxidase Conjugate*).

Substrati di CK2

Il peptide R₃AD₂SD₅, substrato specifico di CK2, è prodotto mediante sintesi dal Dr. O. Marin (Marin O. *et al.*, 1994). La β -caseina è fornita da Sigma-Aldrich. La proteina purificata Crk proviene da Upstate.

Inibitori

L'imatinib è stato fornito da Dr. J. Herzig della Novartis Pharma; il CX-4945 è stato gentilmente fornito dalla Dr.ssa K. Anderes della Cyline Pharmaceuticals; il GNF-2 e la staurosporina provengono da Sigma-Aldrich.

Culture cellulari

La linea cellulare di eritromegacariociti LAMA84, derivante da sangue periferico di una paziente in CML in crisi blastica (Seigneurin D. *et al.*, 1987), è stata coltivata in terreno di coltura RPMI 1640 (Sigma-Aldrich), supplementato con 10% di siero fetale bovino FBS (Gibco), 2 mM L-glutamina (Sigma-Aldrich), 100 U/ml penicillina (Sigma-Aldrich) e 100 µg/ml streptomina (Sigma-Aldrich), in un'atmosfera contenente 5% CO₂ a 37 °C. Le cellule LAMA84-R sono state mantenute nelle stesse condizioni di coltura, ma nel terreno è stato aggiunto 1,5 µM di imatinib ad ogni passaggio cellulare.

Trattamento delle cellule

Le cellule vengono prelevate dalle fiasche in quantità adeguata e travasate in appositi tubi per una centrifugazione di 5 minuti a 100 g a temperatura ambiente (RT). Eliminato il surnatante, le cellule vengono risospese, generalmente, ad una densità di circa 1-1,5 x 10⁶ cellule/ml in un terreno contenente 10% FBS e distribuite nei pozzetti in un'apposita piastra (circa 3-5 ml/pozzetto). Sono state trattate, quindi, secondo il protocollo sperimentale con DMSO (Sigma-Aldrich), per i campioni di controllo, o diverse concentrazioni di inibitori e poste nell'incubatore a 37 °C, per tempi variabili. Al termine del trattamento le cellule vengono centrifugate per 5 minuti a 100 g a RT, lavate con PBS (soluzione di tampone fosfato) per allontanare le tracce di terreno e successivamente lisate.

Preparazione del lisato cellulare

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: 20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 2mM EGTA, 0.5% (v/v) Triton X-100, cocktail di inibitori proteasici (Roche), cocktail di inibitori fosfatasi 2 e 3 (Sigma-Aldrich) e 1 mM vanadato di sodio. Dopo aver risospeso le cellule, si lasciano i campioni in rotazione per un'ora a 4 °C e poi si centrifugano a 16000 g per 20 minuti a 4 °C e si preleva il supernatante che corrisponde al lisato totale, che può essere conservato a -20 °C.

Determinazione della concentrazione proteica

La determinazione quantitativa delle proteine contenute nei lisati cellulari viene effettuata con il metodo di Bradford che permette di dosare, con buona sensibilità, quantità di proteine comprese tra 1-5 mg/ml. Mediante l'aggiunta di acqua, ogni campione da saggiare viene portato ad un volume di 100 µl, a cui si aggiungono 900 µl di reagente di Bradford: 0,003 % (p/v) coomassie blu G250 (Sigma-Aldrich), 5% H₃PO₄, 10% (p/v) etanolo. 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 standard preparati con concentrazioni crescenti di sieroalbumina (BSA) ed interpolando i valori di assorbanza dei campioni saggiati per ricavare la concentrazione delle proteine in essi presente.

SDS/PAGE e western blot

Un'identica quantità di proteine dei campioni da analizzare, viene separata tramite *SDS/PAGE* (elettroforesi su gel di poliacrilamide in sodio-dodecil-solfato). Ad ogni campione viene aggiunto il tampone di Laemmli per la

corsa su *SDS/PAGE*, che permette la denaturazione e la riduzione delle proteine, composto da: 0,6 M Tris-HCl pH 7.8, 2% (p/v) SDS, 20% (v/v) glicerolo e 5 mM 2-mercaptoetanolo. I gel utilizzati in questo lavoro per la corsa elettroforetica presentano una dimensione di 8 x 10 cm, uno spessore di 1 cm e, a seconda delle necessità, percentuali di poliacrilamide fra il 9% e l'11% (p/v). I gel sono formati da una parte superiore (*stacking gel*) a pH 6.8, necessaria per compattare le proteine di ogni campione ad uno stesso livello prima che vengano separate, in base al peso molecolare, mediante la corsa attraverso la parte inferiore del gel (*running gel*) a pH 8.8. La corsa viene effettuata mediante una tensione di corrente di 25-30 mA/gel per un tempo variabile, generalmente di circa un'ora.

Le proteine vengono poi trasferite dal gel su una membrana di polivinilidenefluoruro o PVDF (Immobilon-P, Millipore), seguendo il protocollo suggerito dalla casa produttrice e utilizzando come unità di trasferimento la *TE 22 Mini Tank transfer unit* (GE Healthcare), in cui viene impostato un voltaggio di 60 V per una durata di 90-120 min. Il tampone per il trasferimento delle proteine è composto da 10 mM CAPS-NaOH (acido 3-Cicloesilamino-1-propanosulfonico) pH 10, 3 mM DTT e 1% (v/v) metanolo.

A trasferimento completato, la membrana viene prima seccata completamente per la saturazione, poi lavata con il tampone TBS (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 50 mM NaCl) e, infine, incubata *overnight* con l'anticorpo primario diluito nel tampone TBS, a cui viene aggiunto l'1% (p/v) di BSA (Sigma-Aldrich). Per lo sviluppo del segnale anticorpale, viene rimosso l'anticorpo primario e lavata la membrana con TBS, la quale è poi incubata con l'anticorpo secondario (diluito nel tampone TBS con 1% BSA) per almeno 30 minuti. Dopo aver rimosso l'anticorpo secondario, si lava nuovamente la membrana con TBS e il segnale anticorpale viene rilevato mediante l'uso del reagente per la chemiluminescenza ECL (*enhanced chemiluminescence*, Amersham Biosciences). La quantificazione del segnale

chemioluminescente viene fatta tramite l'uso della stazione di rilevazione Kodak 4000MM Pro e con il software *Carestream Health Molecular Imaging*.

Immunoprecipitazione

L'immunoprecipitazione viene eseguita incubando in rotazione *overnight* a 4°C 200-800 µg di proteine del lisato cellulare con 0,5-2 µg dell'anticorpo specifico per la proteina che si vuole immunoprecipitare, permettendo così la formazione dell'immunocomplesso proteina-anticorpo. Il giorno seguente viene aggiunta la proteina A-Sefarosio (sospensione 1/1, v/v) (Sigma-Aldrich) e si lascia ruotare il campione a 4°C per 40 minuti, in modo che l'immunocomplesso si leghi alla proteina A-Sefarosio. Successivamente, si separa l'immunocomplesso, legato alla proteina A-sefarosio, dal resto del lisato eseguendo 3 centrifugazioni a 4°C di 3 min a 3,5 g, ciascuna intervallata da un lavaggio con 50 mM Tris-HCl pH 7.5. Alla fine l'immunoprecipitato può essere usato sia direttamente per l'analisi con *SDS/PAGE*, risospendendolo in un tampone per la corsa, oppure per i saggi di fosforilazione, aggiungendo la miscela di fosforilazione.

Saggio di attività di CK2α tramite saggio in-gel (*in-gel kinase assay*)

In questo saggio di fosforilazione, 500 µg/ml della proteina substrato β-caseina vengono aggiunti alla soluzione sopra descritta per creare il gel della *SDS/PAGE*. In tale corsa elettroforetica, vengono separate quantità (5-20 µg) uguali di proteine dei lisati cellulari da saggiare. Al termine della corsa, l'SDS viene rimosso dal gel mediante due lavaggi in agitazione di 30 minuti a temperatura ambiente (RT) con un tampone composto da 50 mM Tris-HCl pH 8.0 e 20 % (v/v) 2-propanolo. Successivamente, dopo un lavaggio rapido con 50 mM Tris-HCl pH 8.0, il gel è incubato per un'ora a

RT in un tampone A, costituito da 50 mM Tris-HCl, pH 8.0, e 5 mM 2-mercaptoetanol, a cui segue un'altra incubazione a RT di un'ora con tampone A implementato di 6 M guanidina.

Per la rinaturazione delle proteine presenti nel gel, esso viene incubato per 16 ore a 4°C nel tampone A, a cui viene aggiunto 0,04% (v/v) Tween-20. Infine, una volta rimosso quest'ultimo tampone, il gel viene messo ad agitare delicatamente per un'ora a RT nella miscela di fosforilazione per il saggio chinasi. Tale miscela contiene 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 100 mM MgCl₂, 20 μM ATP, [γ³³P]ATP (radioattività specifica di ~1000-3000 cpm/pmol). Dopo questa incubazione, si eseguono 5-6 lavaggi di 20 minuti in agitazione a RT con il tampone contenente TCA-pirofosfato.

La fosforilazione proteica è, infine, analizzata mediante analisi delle proteine ³³P-fosforilate tramite *PerkinElmer's Cyclone Plus Storage Phosphor System*, in cui le bande evidenziate che corrispondono alla fosforilazione della β-caseina da parte di CK2α sono localizzate nel gel alla posizione in cui è migrata CK2α durante l'*SDS/PAGE*.

L'unità di misura arbitraria utilizzata per esprimere la radioattività incorporata dai substrati analizzati è il DLU.

Attività di CK2 nei lisati cellulari

L'attività di CK2 endogena presente nei lisati cellulari è stata studiata sia con l'uso di β-caseina o del peptide sintetico R₃AD₂SD₅, aggiunti come substrati esogeni, sia analizzando l'autofosforilazione d'immunoprecipitati in cui era presente CK2, in cui si messa in evidenza la fosforilazione di proteine endogene co-immunoprecipitate con la chinasi.

Per i saggi chinasi con substrato esogeno, vengono utilizzati 0,25-1 μg di lisato cellulare a cui si aggiunge una miscela di fosforilazione così composta: 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 10 mM MgCl₂, 10 μM [γ³³P]ATP (radioattività

specifica di ~1000-3000 cpm/pmol), 0.1 M NaCl e 0.4 mM peptide R₃AD₂SD₅ o 2 µg β-caseina, in un volume totale di 30 µl. Si incuba il campione per 10-12 minuti a 30 °C. Per il saggio autofosforilazione degli immunoprecipitati, si mantengono le stesse condizioni, ma nella miscela di reazione viene omesso il substrato esogeno.

Nel saggio con β-caseina la reazione di fosforilazione viene stoppada con l'aggiunta del tampone di Laemmli, utilizzato per preparare in campioni per la corsa elettroforetica. La β-caseina ³³P-fosforilata dei diversi campioni viene analizzata mediante *SDS/PAGE*, colorazione con *coomassie blue* o *western blot* e infine tramite *PerkinElmer's Cyclone Plus Storage Phosphor System*.

Nel saggio con il peptide substrato, la reazione di fosforilazione viene stoppada dall'assorbimento del campione in cartine di fosfo-cellulosa p81 (Whatmann). Le cartine vengono sottoposte a tre lavaggi di 10 minuti a RT con 75 mM acido fosforico, asciugate e la ³³P-fosforilazione del peptide è rilevata tramite *PerkinElmer's Cyclone Plus Storage Phosphor System*.

L'unità di misura arbitraria utilizzata per esprimere la radioattività incorporata dai substrati analizzati è il DLU.

Saggio di vitalità cellulare MTT

Per effettuare i saggi di vitalità cellulare si utilizza il composto 3-[4,5-dimetildiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolo bromuro (MTT) (Sigma-Aldrich), un sale tetrazolico che, quando viene metabolizzato dalle deidrogenasi mitocondriali, produce un precipitato violaceo nelle cellule vive. Si usa una soluzione sterile in TBS di 5mg/ml MTT.

Le cellule per il saggio vengono preparate in una piastra da 96 pozzetti. In ciascun pozzetto si trasferiscono 100 µl di terreno di coltura cellulare con una concentrazione cellulare di 15 x 10⁴ cellule/ml. A ciascun pozzetto viene

poi aggiunta la concentrazione di inibitore desiderata e nei campioni di controllo viene aggiunto DMSO, tenendo presente che il volume di inibitore e DMSO non sia superiore all'1% del volume del terreno cellulare nel pozzetto. Si lascia incubare a 37 °C per 24 e/o 48 ore e, a questo punto, si aggiungono ad ogni pozzetto 10 µl di soluzione di MTT. Si incuba nuovamente la piastra a 37 °C per circa un'ora e, poi, si stoppa la reazione con l'aggiunta di 20 µl/pozzetto di un tampone di lisi cellulare con pH 4.7 composto da 20% (p/v) SDS, 50 % (v/v) dimetilformamide, 2% (v/v) acido acetico e 25 mM HCl. In questo modo si ottiene la lisi delle cellule e la solubilizzazione del precipitato viola formato dalla metabolizzazione dell'MTT nelle cellule vive. I campioni mostrano pertanto una colorazione violacea, la cui intensità aumenta in relazione all'incremento delle cellule vive. Si effettua la lettura della densità ottica dei campioni a 590 nm, sottraendo un valore di controllo costituito dall'assorbanza del terreno senza cellule, a cui viene aggiunta la soluzione di MTT.

RISULTATI

Selezione delle cellule LAMA84 resistenti ad 1,5 μ M di imatinib

La linea cellulare LAMA84, nella variante sensibile (LAMA84-S) e resistente (LAMA84-R) al trattamento con l'inibitore imatinib, con cui si è iniziato questo studio sono state gentilmente fornite dal Prof. C. Gambacorti-Passerini (Dipartimento di Medicina Clinica, Università di Milano-Bicocca), il cui gruppo di ricerca ha analizzato il possibile meccanismo di resistenza. Nell'analisi svolta, i ricercatori sono stati in grado di rilevare un'amplificazione del gene di fusione *BCR/ABL1* nelle cellule LAMA84-R, con la presenza di 13-14 copie del gene. Quest'alterazione genica ha indotto in tali cellule la sovraespressione della proteina oncogenica Bcr/Abl, la quale non presenta alcun tipo di mutazione amminoacidica a livello del dominio di legame per l'ATP, responsabile di un mancato legame dell'inibitore all'oncochinasi (le Coutre P. *et al.*, 2000).

Utilizzando le cellule LAMA84-R, in grado di sopravvivere in presenza di 0,6 μ M imatinib nel terreno, si è voluto ottenere delle cellule resistenti ad una concentrazione maggiore dell'inibitore, per poi analizzare la possibile variazione dei livelli di espressione di alcune proteine. Infatti, la sovraespressione di proteine diverse da Bcr/Abl è stata messa in evidenza in linee cellulari di CML resistenti a concentrazioni d'imatinib maggiori di 0,6 μ M, (Donato N.J. *et al.*, 2003; Yun D. *et al.*, 2004). A questo scopo, ogni settimana si è incrementata di 0,1 μ M la concentrazione dell'inibitore nel mezzo di coltura delle cellule LAMA84-R. Dopo circa nove settimane si sono selezionate delle cellule in grado di sopravvivere alla presenza di una concentrazione di 1,5 μ M d'imatinib.

A questo punto, si è comparata la quantità proteica Bcr/Abl espressa in questa nuova linea resistente con quella della linea originale di partenza.

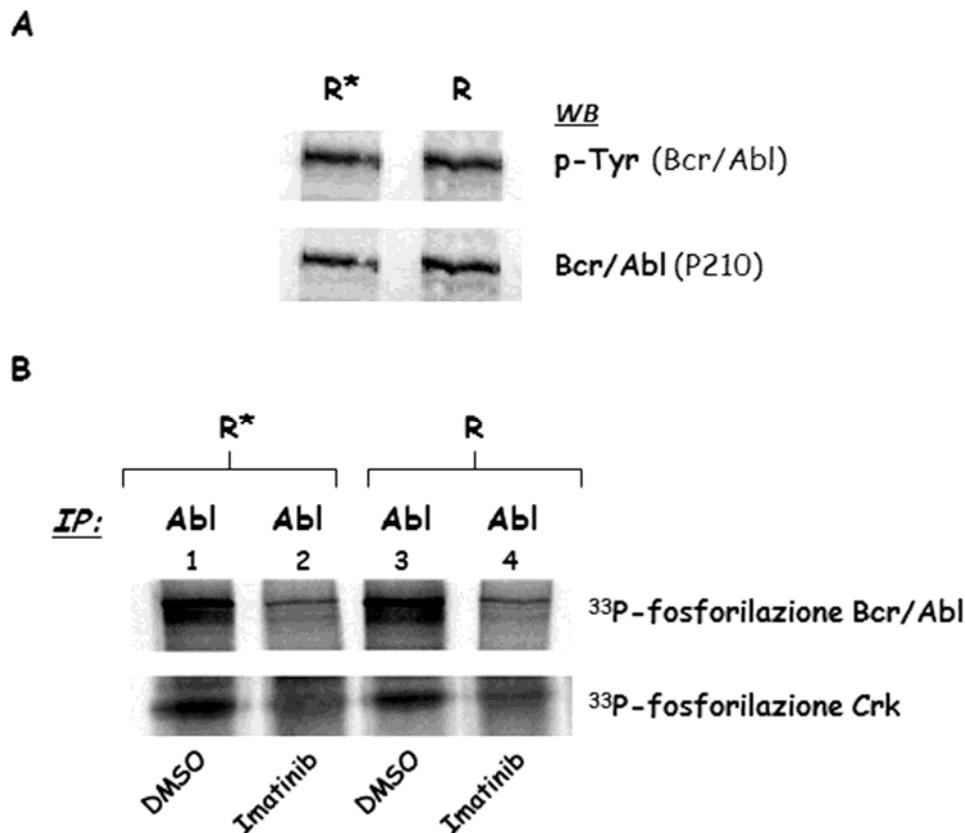


Fig. 1. Confronto di espressione e attività di Bcr/Abl di due varianti di cellule resistenti all'imatinib. (A) 20 μ g di proteine dei lisati di cellule LAMA84 resistenti a 0,6 μ M (R*) o 1,5 μ M (R) imatinib erano analizzati tramite *SDS/PAGE* e *western blot* con anticorpi anti-p-Tyr e anti-Abl. (B) Immunoprecipitazione con anticorpo anti-Abl da 400 μ g di lisato di cellule LAMA84 resistenti a 0,6 μ M (R*) o 1,5 μ M (R). Saggio di fosforilazione, come descritto in "Materiali e metodi", di 2 μ g di proteina Crk da parte di Bcr/Abl immunoprecipitato, in presenza (corse 1 e 3) o assenza (corse 2 e 4) di 1 μ M imatinib. Le immagini sono indicative di tre esperimenti separati.

Osservando la Fig. 1-A possiamo vedere che i livelli proteici di Bcr/Abl sono simili. Anche lo stato di attivazione dell'oncochinasi è comparabile, come dimostrato dall'entità di autofosforilazione tirosinica di Bcr/Abl.

Inoltre, per escludere la possibilità di comparsa di mutazioni nel dominio d'interazione dell'oncoproteina con l'ATP, capaci di rendere meno efficace il legame con l'imatinib, si è saggiata la capacità dell'inibitore di bloccare l'attività *in vitro* di Bcr/Abl. Si sono, dunque, effettuate delle immunoprecipitazioni di Bcr/Abl dai lisati cellulari delle linee LAMA84

resistenti a 0,6 μM o a 1,5 μM di imatinib. Tali immunoprecipitati si sono utilizzati per un saggio *in vitro* di attività chinasica condotto, come descritto nei “Materiali e metodi”, in una miscela di fosforilazione contenente [$\gamma^{33}\text{P}$]ATP e la proteina ricombinante Crk, substrato specifico di Bcr/Abl. L’analisi, dopo *SDS/PAGE*, del ^{33}P -fosfato trasferito da Abl nella banda corrispondente a Crk mostra che la fosforilazione della proteina nei controlli (corse 1 e 3, Fig. 1-B) è massivamente inibita dall’inibitore imatinib (corse 2 e 4, Fig. 1-B), indicando che il composto è efficace in egual misura contro l’attività di Bcr/Abl nelle due linee cellulari LAMA84, resistenti a concentrazioni diverse di imatinib in coltura.

In relazione a questi dati, tutti gli esperimenti eseguiti successivamente sono stati condotti usando la linea LAMA84-R in grado di sopravvivere in presenza d’imatinib 1,5 μM nel terreno di coltura.

Caratterizzazione delle cellule LAMA84-S e LAMA84-R

La prima parte di questo lavoro si è basata sulla caratterizzazione delle due varianti cellulari sensibili e resistenti all’inibitore imatinib, basandosi sull’analisi dell’espressione di alcune proteine, la cui espressione e/o attività deregolate sono state descritte correlare con proliferazione cellulare e/o difetti dell’apoptosi.

I lisati cellulari delle LAMA84-S/R si sono ottenuti come descritto nella sezione specifica riguardante i “Materiali e metodi” e si sono analizzati tramite corsa elettroforetica e successivo *western blot*.

Lo studio dell’espressione delle proteine HS1 (*hematopoietic lineage cell-specific protein-1*), Hsp90 (*heat shock protein 90*), Cdc37 (*cell division cycle 37*), Syk (*spleen tyrosine kinase*), Akt (*RAC-alpha serine/threonine-protein kinase*), SHP-1 (*Src homology region 2 domain-containing phosphatase-1*), SHP-2 (*Src homology region 2 domain-containing phosphatase-2*) non ha

evidenziato alcuna differenza fra la variante sensibile e resistente delle cellule LAMA84 (dati non mostrati).

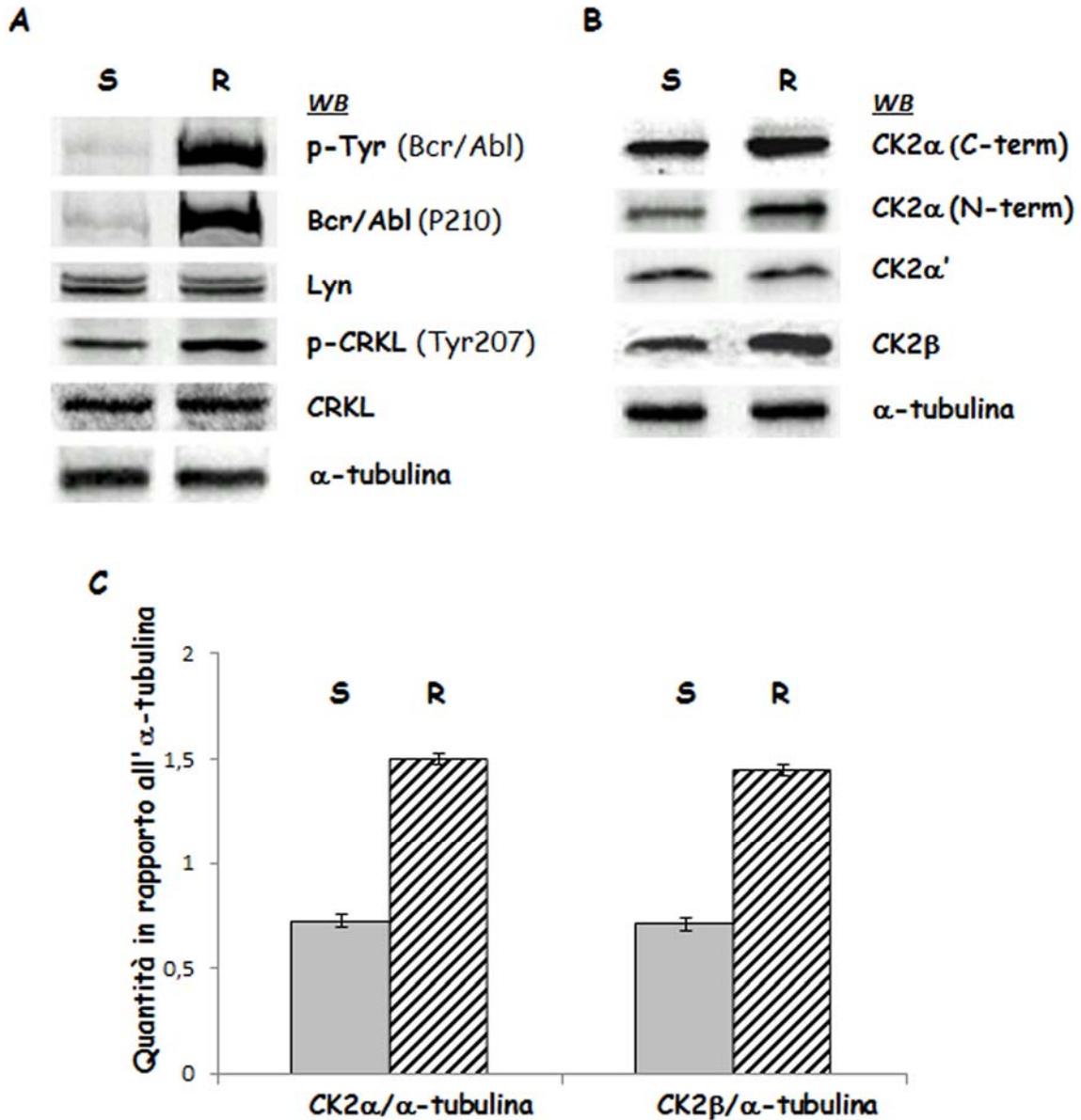


Fig. 2. Espressione di Bcr/Abl, Lyn, CK2 in cellule LAMA84-S e LAMA84-R. (A, B) Le cellule LAMA84-S (S) LAMA84-R (R) erano lisate e 20 μ g di proteine erano analizzate tramite *SDS/PAGE* e *western blot* con gli anticorpi indicati. Immagine rappresentativa di sei esperimenti separati (C) Rapporto dell'analisi densitometrica relativa all'espressione di CK2 α o CK2 β vs la proteina di riferimento α -tubulina. Le barre di errore rappresentano la deviazione standard dal valore medio ottenuto in sei esperimenti separati.

Osservando la Fig. 2-A, è possibile notare che le cellule resistenti all'imatinib, come atteso, mostrano un'espressione di Bcr/Abl che, utilizzando un software che permette l'analisi densitometrica delle bande proteiche, si è visto essere circa quattro volte maggiore rispetto a quella delle cellule sensibili. La sovraespressione dell'oncochinasi è unita ad un suo elevato stato di autofosforilazione tirosinica, che correla con lo stato attivato dell'enzima (Hantschel O. *et al.*, 2004).

Inoltre, si è analizzato il livello dell'espressione della proteina CrkL (*Crk-like protein*), uno dei principali substrati di Bcr/Abl (Senechal K. *et al.*, 1996). Sebbene fra le due linee cellulari il livello di espressione della proteina CrkL sia identico, la maggior attività dell'oncochinasi nelle cellule LAMA84-R fa sì che sia rilevabile una maggiore fosforilazione di CrkL in Tyr207, che è il maggior sito di fosforilazione *in vivo* per Bcr/Abl (De Jong R. *et al.*, 1997).

Si è voluto, altresì, studiare l'espressione proteica di Lyn, chinasi della famiglia Src, già nota in bibliografia come una delle tirosin-chinasi che può essere sovraespressa in alcuni modelli cellulari di CML resistenti al trattamento con imatinib (Donato N.J. *et al.*, 2003; Day Y. *et al.*, 2004). Dai dati mostrati nella Fig. 2-A si evince come non vi sia alcuna differenza nei livelli proteici di Lyn fra le cellule LAMA84-S e LAMA84-R.

L'analisi dell'espressione della proteinchinasi CK2, inaspettatamente, è risultata invece alterata fra le due varianti cellulari. In particolare, le cellule resistenti al trattamento con imatinib, mostrano una maggior quantità della subunità catalitica CK2 α rispetto alle cellule sensibili. La sovraespressione di CK2 α da parte delle cellule LAMA84-R è stata inoltre messa in evidenza sia con l'utilizzo di un anticorpo specifico per la regione C-terminale sia con uno specifico per la regione N-terminale della proteina, com'è possibile notare nella Fig. 2-B. Parallelamente all'aumento della subunità catalitica, anche la subunità regolatoria CK2 β è sovraespressa nelle cellule resistenti; mentre, sorprendentemente, non si è rilevata

nessuna alterazione, fra le due varianti cellulari, dei livelli dell'altra subunità catalitica di CK2 nota come α' .

La quantificazione densitometrica del segnale anticorpale corrispondente alle subunità CK2 α e CK2 β . La media dei risultati ottenuti dall'analisi dei vari lisati di cellule LAMA84-S/R ci permette di dire che la sovraespressione di CK2 α e CK2 β associata alla resistenza al farmaco è di circa due volte (Fig. 2-C).

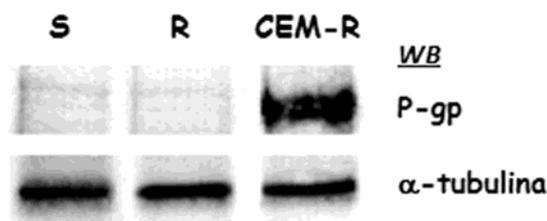


Fig. 3. Espressione della pompa di membrana P-gp in cellule LAMA84-S, LAMA84-R e CEM-R. Le cellule LAMA84-S (S) LAMA84-R (R) e CEM-R erano lisate e 20 μ g di proteine erano analizzate tramite *SDS/PAGE* e *western blot* con gli anticorpi indicati. L'immagine è indicativa di tre esperimenti separati

Nel nostro gruppo di ricerca è stata recentemente messa in evidenza una correlazione tra CK2 e la farmacoresistenza, in quanto in una linea linfoblastoide di tipo T (CEM-R) in cui è stata rilevata una maggiore quantità di CK2 α nelle cellule sovraesprimenti la pompa di membrana P-gp (Di Maira G. *et al.*, 2007). Si è però voluta esaminare la possibilità di un'alterazione nei livelli d'espressione della proteina P-gp anche nelle cellule LAMA84-S/R. L'analisi effettuata ha mostrato come, con l'anticorpo che rileva la presenza di una quantità cospicua di P-gp in cellule CEM-R, non sia, invece, rilevabile l'espressione della proteina nelle cellule LAMA84 rispetto alle cellule CEM-R (Fig. 3).

Attività della proteinchinasi CK2 in cellule LAMA84-S e LAMA84-R

La sovraespressione di CK2 da parte delle cellule LAMA84-R induce a pensare che in tali cellule l'attività della chinasi sia maggiore rispetto alle cellule sensibili. La conferma di tale ipotesi si è voluta ottenere eseguendo dei saggi di fosforilazione *in vitro* con $[\gamma^{33}\text{P}]\text{ATP}$ per saggiare l'attività di CK2 nei lisati cellulari delle LAMA84-S/R. Ovviamente, per rendere possibile il confronto fra le due varianti cellulari, si sono usate identiche quantità proteiche di lisato.

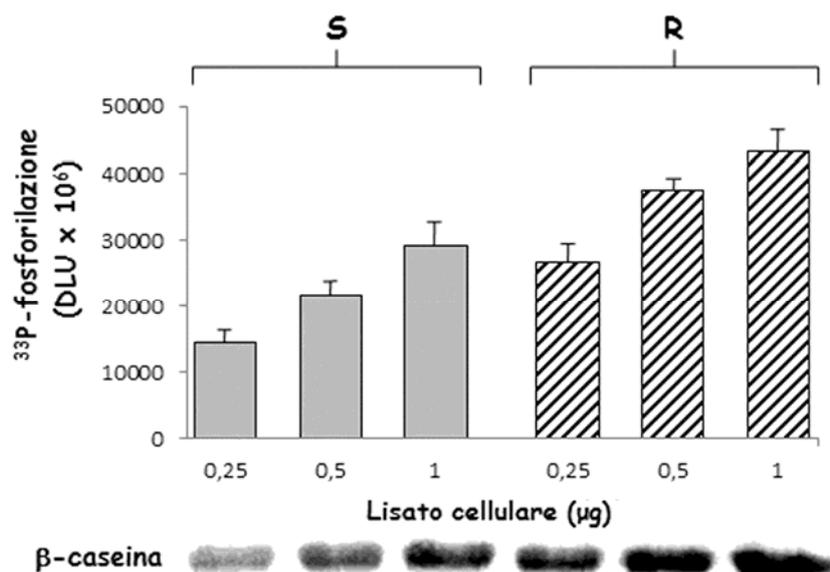


Fig. 4. Attività su β -caseina di CK2 in cellule LAMA84-S e LAMA84-R. L'attività di CK2 contenuta nei μg indicati dei lisati di cellule LAMA84-S e LAMA84-R era saggiata sul substrato β -caseina come descritto nella sezione "Materiali e metodi". La radioattività incorporata dalla β -caseina ^{33}P -fosforilata, dopo *SDS/PAGE*, era analizzata tramite il *PerkinElmer's Cyclone Plus Storage Phosphor System* (vedi parte bassa della Figura) ed espressa in DLU. Gli istogrammi nella parte alta della Figura rappresentano la media dei valori di radioattività ottenuti da cinque esperimenti condotti separatamente. Le barre di errore rappresentano la deviazione standard dal valore medio di questi esperimenti.

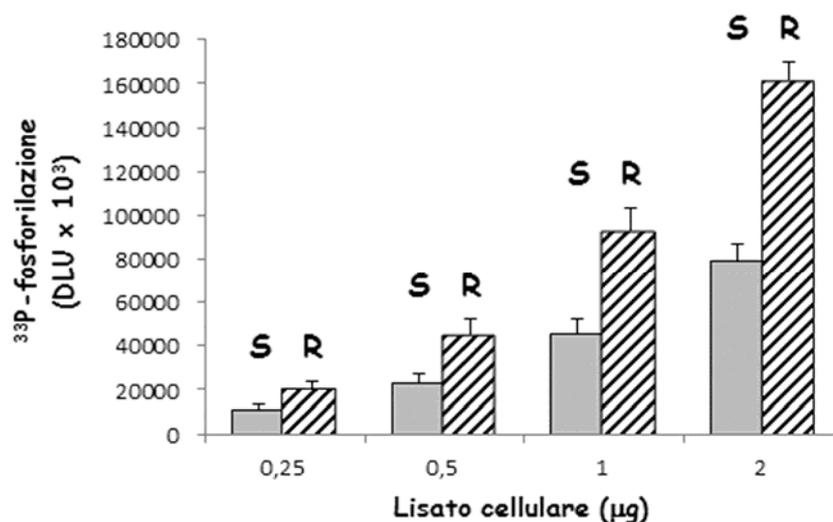


Fig. 5. Attività su peptide sintetico $R_3AD_2SD_5$ di CK2 in cellule LAMA84-S e LAMA84-R. L'attività di CK2 contenuta nei μg indicati dei lisati di cellule LAMA84-S e LAMA84-R era saggiata sul peptide sintetico $R_3AD_2SD_5$ come descritto nella sezione "Materiali e metodi". La radioattività incorporata dal peptide ^{33}P -fosforilato, dopo SDS/PAGE, era analizzata tramite il *PerkinElmer's Cyclone Plus Storage Phosphor System* ed espressa in DLU. Gli istogrammi rappresentano la media dei valori di radioattività ottenuti da sette esperimenti condotti separatamente. Le barre di errore rappresentano la deviazione standard dal valore medio di questi esperimenti.

Innanzitutto, si è analizzato l'attività della CK2 presente nei lisati cellulari come oloenzima $\alpha_2\beta_2$ mediante aggiunta di $[\gamma^{33}P]ATP$ e di substrati specifici per la chinasi come la proteina β -caseina o il peptide sintetico $R_3AD_2SD_5$, come descritto in "Materiali e metodi". L'eliminazione della possibile attività aspecifica residua, causata da altre chinasi presenti nel lisato cellulare si è ottenuta con l'aggiunta nella miscela di fosforilazione di staurosporina, un composto capace di inibire la maggior parte delle proteinchinasi, ma inattivo su CK2 alla concentrazione usata ($5 \mu M$).

Nella Fig.4 è possibile osservare l'analisi dell'esperimento in cui il substrato è la β -caseina, mentre nella Fig. 5 è visibile il grafico a barre che riporta i valori in DLU relativi alla radioattività incorporata dal peptide $R_3AD_2SD_5$ nei saggi di fosforilazione. La ^{33}P -fosforilazione della proteina e del peptide è maggiore nei campioni in cui vengono utilizzati i lisati delle cellule resistenti e, in accordo con le diverse quantità proteiche di CK2 presenti in

LAMA84-S e LAMA84-R, anche l'attività della chinasi sembra essere il doppio.

È stato dimostrato che la subunità catalitiche di CK2 α presenta una specificità di substrato diversa da quella dell'oloenzima $\alpha_2\beta_2$ (Marin O. *et al.*, 1999).

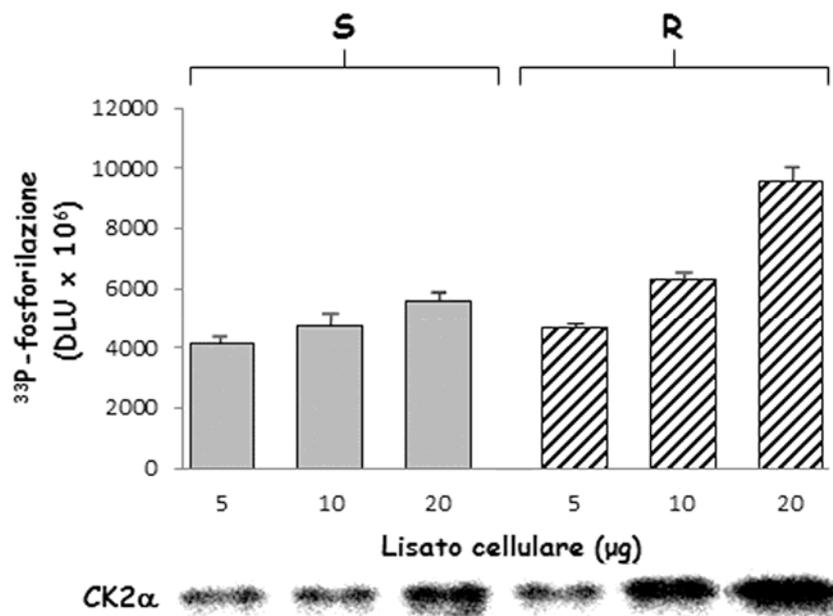


Fig. 6. Attività su β -caseina di CK2 α monomerica in cellule LAMA84-S e LAMA84-R. L'attività di CK2 α contenuta nei μg indicati dei lisati di cellule LAMA84-S e LAMA84-R era saggiata su CK2 α β -caseina tramite *in-gel kinase assay* come descritto nella sezione "Materiali e metodi". La radioattività incorporata dalla β -caseina ^{33}P -fosforilata era analizzata (vedi parte bassa della Figura) tramite il *PerkinElmer's Cyclone Plus Storage Phosphor System* ed espressa in DLU. Gli istogrammi nella parte alta della Figura rappresentano la media dei valori di radioattività ottenuti da cinque esperimenti condotti separatamente. Le barre di errore rappresentano la deviazione standard dal valore medio di questi esperimenti.

Allo scopo di avere informazioni sulla conformazione di CK2 coinvolta nei meccanismi di resistenza all'imatinib, si è voluto esaminare se l'attività di CK2 α monomerica fosse più elevata ed in quale entità nelle cellule resistenti. A tale fine, si è eseguito in presenza $[\gamma^{33}]\text{ATP}$ un *in gel kinase assay*, secondo cui le subunità catalitica e regolatoria della chinasi sono prima separate

tramite *SDS/PAGE* e poi rinaturate allo scopo di saggiare l'attività della CK2 α direttamente sul gel, fra le cui maglie di poliacrilammide è presente la caseina come substrato chinasi (vedi "Materiali e metodi").

La Fig. 6 mostra l'analisi dell'esperimento, in cui la banda in evidenza corrisponde al segnale di radioattività incorporata da quelle molecole del substrato caseina, che sono localizzate nel gel alla medesima mobilità elettroforetica della subunità catalitica di CK2. Il risultato di questo esperimento, rende evidente che, in parallelo a ciò che si è osservato per l'oloforma di CK2, anche l'attività della CK2 α monomerica è circa il doppio nelle cellule LAMA84-R rispetto alle cellule LAMA84-S, in accordo con il diverso livello di espressione della chinasi nelle due linee cellulari.

Co-immunoprecipitazione fra CK2 e Bcr/Abl

Alla luce di alcune evidenze scientifiche condotte da altri gruppi, in cui è stata evidenziata la capacità di associazione fra CK2 α e Bcr/Abl a livello cellulare (Hériché J.K. *et al.*, 1998; Mishra S. *et al.*, 2003), si è voluta analizzare una possibile interazione tra queste due chinasi nelle cellule LAMA84-S e LAMA84-R. A questo scopo si sono eseguiti degli esperimenti d'immunoprecipitazione a partire da medesime quantità proteiche dei lisati provenienti dalle due varianti cellulari in esame.

Inizialmente Bcr/Abl è stata immunoprecipitata e la quantità di CK2 presente nell'immunocomplesso è stata analizzata, tramite *western blot*.

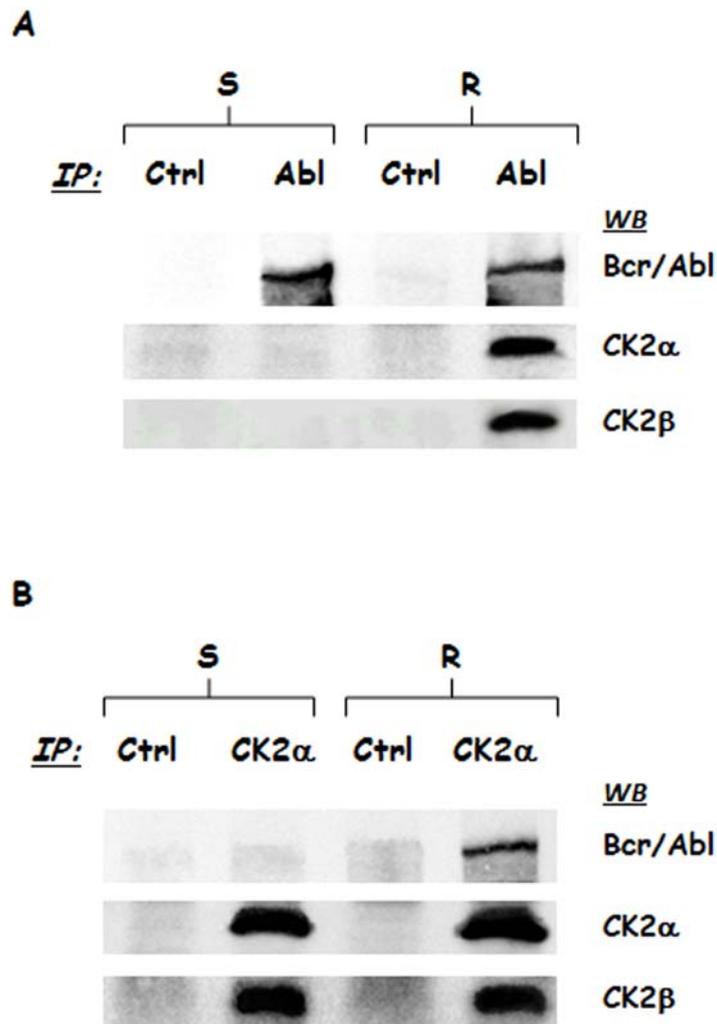


Fig. 7. Analisi della co-immunoprecipitazione fra Bcr/Abl e CK2 in cellule LAMA84-S e LAMA84-R. (A) Immunoprecipitazione con 1,5 µg di anticorpo anti-Abl (Abl) o di anticorpo dello stesso genere, per controllo (Ctrl), a partire da 600 µg di proteine di lisato delle cellule LAMA84-S e LAMA84-R. Gli immunoprecipitati erano analizzati tramite *SDS/PAGE* e *western blot* con gli anticorpi indicati. Immagine rappresentativa di quattro esperimenti separati (B) Immunoprecipitazione con 1 µg di siero anti-CK2α (CK2α) o di siero di coniglio precedente all'immunizzazione, per controllo (Ctrl), a partire da 800 µg di proteine di lisato delle cellule LAMA84-S e LAMA84-R. Gli immunoprecipitati erano analizzati tramite *SDS/PAGE* e *western blot* con gli anticorpi indicati. Immagine rappresentativa di quattro esperimenti separati rappresentativa di cinque esperimenti indipendenti.

Come appare in Fig. 7-A, pur avendo immunoprecipitato quantità simili di Bcr/Abl, solo nei campioni ottenuti da cellule LAMA84-R è possibile rilevare

un segnale corrispondente alle subunità CK2 α e CK2 β , che indica come solo in queste cellule ci sia una co-immunoprecipitazione fra CK2 e Bcr/Abl.

La conferma di questo dato si è voluta ottenere ripetendo l'esperimento immunoprecipitando CK2, tramite un anticorpo che riconosce la regione C-terminale della subunità α della chinasi, e analizzando la quantità di Bcr/Abl co-immunoprecipitata. Osservando la Fig.7-B, si può notare che a parità di CK2 immunoprecipitata dai campioni di entrambe le varianti cellulari la co-immunoprecipitazione di Bcr/Abl è evidente solo nelle cellule LAMA84-R.

In entrambe gli esperimenti descritti, è possibile escludere ogni tipo d'immunoprecipitazione aspecifica in quanto nei campioni di controllo (Ctrl) non è rilevabile alcuna traccia sia di Bcr/Abl che di CK2.

A maggior supporto di questo risultato, si è eseguita un'analisi di spettrometria di massa su immunoprecipitati di CK2 ottenuti da entrambe le varianti cellulari in collaborazione con il Dr. G. Arrigoni del nostro gruppo di ricerca. L'analisi ha evidenziato come solo nei campioni delle cellule resistenti fosse possibile rilevare la presenza della proteina Bcr/Abl (risultati non presentati).

A questo punto, era necessario capire se tale differenza d'interazione fosse associata alla necessità delle cellule LAMA84-R di sopravvivere alla presenza dell'imatinib nel terreno di coltura o semplicemente una conseguenza dell'aumento dell'espressione sia di Bcr/Abl che di CK2, messo in evidenza nelle cellule resistenti rispetto alle sensibili.

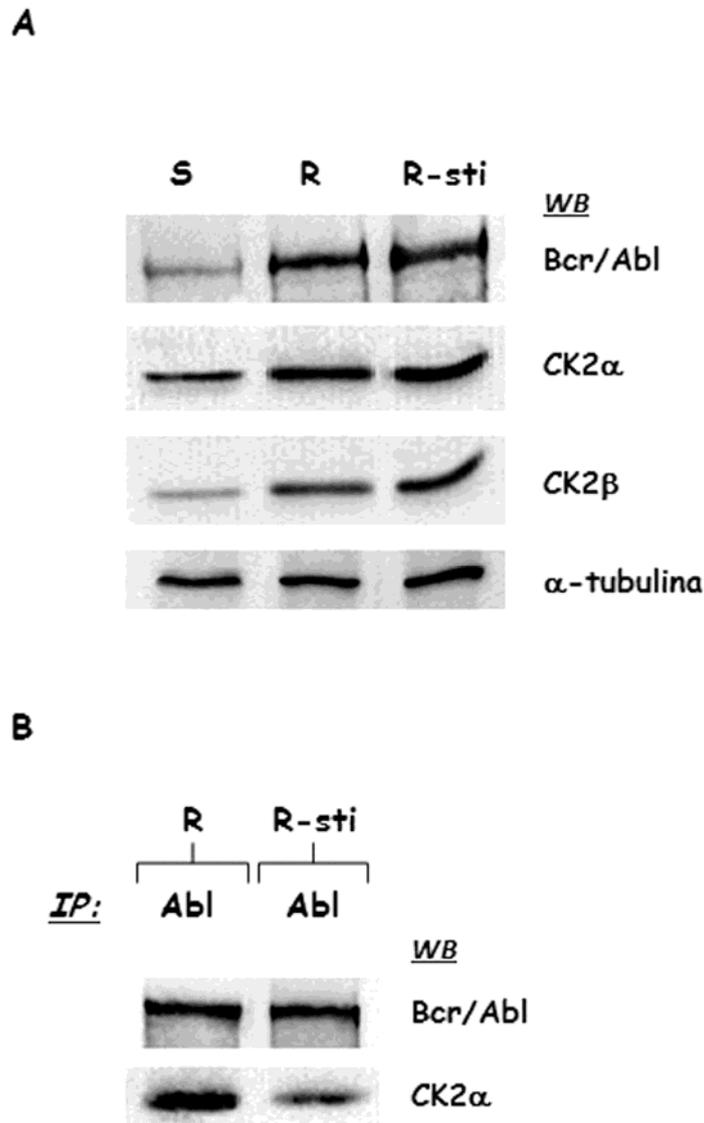


Fig. 8. Analisi dei livelli di Bcr/Abl, CK2 e della co-immunoprecipitazione fra Bcr/Abl e CK2 in cellule LAMA84-S, LAMA84-R e LAMA84-R-sti. (A) Le cellule LAMA84-S (S), LAMA84-R (R) e LAMA84-R-sti (R-sti) erano lisate e 20 µg di proteine erano analizzate tramite *SDS/PAGE* e *western blot* con gli anticorpi indicati. Immagine rappresentativa di tre esperimenti separati (B) Immunoprecipitazione con 1,5 µg di siero anti-Abl (Abl) a partire da 600 µg di proteine di lisato delle cellule LAMA84-R e LAMA84-R-sti. Gli immunoprecipitati erano analizzati tramite *SDS/PAGE* e *western blot* con gli anticorpi indicati. Immagine rappresentativa di quattro esperimenti separati rappresentativa di cinque esperimenti indipendenti.

Una via per escludere tale ipotesi, è quella di modificare tramite co-trasfezione l'espressione delle due proteine in esame nelle cellule sensibili, per portarle a un livello proteico simile a quello delle cellule resistenti. Purtroppo, gli esperimenti condotti a questo scopo non hanno ancora dato risultati chiari, anche perchè queste cellule sono molto difficili da trasfettare. Si è, quindi, utilizzata una strategia alternativa, che lascia inalterato i livelli endogeni di Bcr/Abl e CK2: si è scelto di prelevare una porzione di cellule LAMA84-R e coltivarle in parallelo per sei settimane in un terreno privo dell'inibitore imatinib. Dopo tale periodo, queste nuove cellule, denominato LAMA84-R-sti, sono state lisate e l'espressione di Bcr/Abl e CK2 è stata confrontata con quella delle altre due linee cellulari.

Osservando il risultato del *western blot* dei lisati cellulari in Fig. 8-A si nota come l'espressione di Bcr/Abl e CK2 sia simile nelle cellule LAMA84-R e LAMA84-R-sti. Successivamente, una eguale quantità di Bcr/Abl è stata immunoprecipitata dagli stessi lisati cellulari e si è analizzata la quantità di CK2 α co-immunoprecipitata. La Fig. 8-B rende evidente come nelle cellule LAMA84-R-sti il segnale anticorpale corrispondente a CK2 α sia più lieve rispetto a quello nel campione delle cellule LAMA84-R, indicando una diminuita co-immunoprecipitazione di CK2 con Bcr/Abl. Questo dato conferma che non è solo la maggior espressione cellulare di tali proteine la causa della loro interazione.

Stato di fosforilazione in tirosina di CK2 α

Le evidenze sulla presenza in alcune cellule di CK2 α fosforilata in tirosina e la capacità *in vitro* da parte della chinasi Abl di fosforilare CK2 α (Hériché J.K. *et al.*, 1998), insieme all'interazione fin qui dimostrata tra CK2 e Bcr/Abl nelle cellule LAMA84-R, suggeriscono la potenzialità di rilevare nelle cellule oggetto di studio livelli endogeni di CK2 α Tyr-fosforilata.

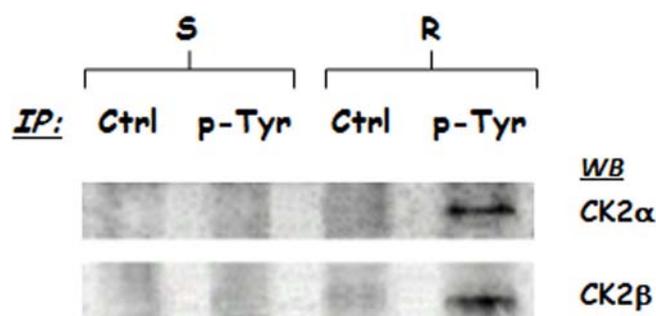


Fig. 9. Analisi della presenza di CK2 in immunoprecipitati con anticorpo anti-p-Tyr di cellule LAMA84-S e LAMA84-R. Immunoprecipitazione con 1 µg di anticorpo anti-p-Tyr (p-Tyr) o di anticorpo dello stesso genere, per controllo (Ctrl), a partire da 600 µg di proteine di lisato delle cellule LAMA84-S e LAMA84-R. Gli immunoprecipitati erano analizzati tramite *SDS/PAGE* e *western blot* con gli anticorpi indicati. Immagine rappresentativa di otto esperimenti separati.

A partire da lisati delle cellule LAMA84-S/R si è realizzata un'immunoprecipitazione con l'anticorpo anti-fosfotirosina (anti-p-Tyr), secondo il protocollo descritto nei "Materiali e metodi", e si è analizzata, tramite *western blot*, la presenza di CK2 negli immunoprecipitati.

La Fig. 9 mette in evidenza come sia stato possibile rilevare un segnale anticorpale corrispondente a CK2α e CK2β solo nei campioni delle cellule resistenti.

Allo scopo di incrementare la Tyr-fosforilazione cellulare basale, le cellule LAMA84-R sono state successivamente incubate per 30 minuti in presenza o assenza di pervanadato, un inibitore non specifico delle proteinfosfatasi tirosiniche (Huyer G. *et al.*, 1997).

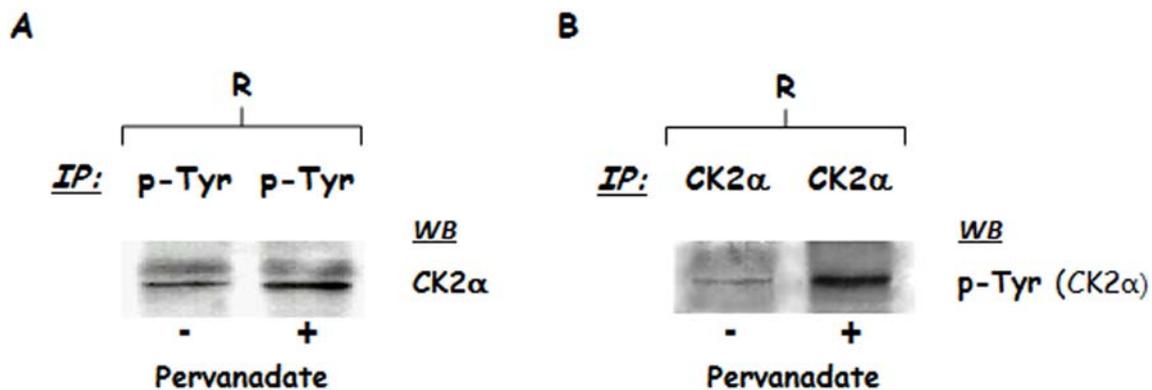


Fig. 10. Analisi della presenza della Tyr-fosforilazione di CK2 α in cellule LAMA84-R trattate con pervanadato. Le cellule LAMA84-R erano trattate con 250 μ M pervanadato per 30 minuti a 37 °C. Le cellule di controllo erano trattate con DMSO. (A) A partire da 600 μ g di proteine di lisato delle LAMA84-R controllo (-) o trattate (+), era fatta un'immunoprecipitazione con 1 μ g di anticorpo anti-p-Tyr (p-Tyr). Gli immunoprecipitati erano analizzati tramite *SDS/PAGE* e *western blot* con siero anti-CK2 α . Immagine rappresentativa di tre esperimenti separati. (B) A partire da 600 μ g di proteine di lisato delle LAMA84-R controllo (-) o trattate (+), era fatta un'immunoprecipitazione con 1 μ g di siero anti-CK2 α (CK2 α). Gli immunoprecipitati erano analizzati tramite *SDS/PAGE* e *western blot* con anticorpo anti-p-Tyr. Immagine rappresentativa di tre esperimenti separati.

Dopo il trattamento, si è eseguita un'immunoprecipitazione con l'anticorpo anti-fosfotirosina e, com'è possibile vedere in Fig. 10-A, la quantità di CK2 α immunoprecipitata aumenta con il trattamento a base di pervanadato, indicando che l'inibitore contrasta anche la proteinfosfatasi deputata alla defosforilazione di CK2 α .

In parallelo, l'immunoprecipitazione di CK2 α dai medesimi lisati di cellule trattate, analizzata tramite *western blot* con l'anticorpo anti-fosfotirosina, rivela che nelle cellule di controllo solo una bassa quantità di CK2 α è Tyr-fosforilata e che il trattamento con pervanadato induce un aumento della fosforilazione tirosinica della proteina (Fig. 10-B). L'analisi parallela relativa alla potenziale Tyr-fosforilazione della subunità CK2 β non ha messo in evidenza alcuna risposta all'anticorpo anti-p-Tyr (dati non presentati).

Tirosin-fosforilazione endogena di CK2 α da parte di Bcr/Abl

A questo punto era importante riuscire a capire quale fosse la chinasi coinvolta nel mediare la fosforilazione tirosinica di CK2 α .

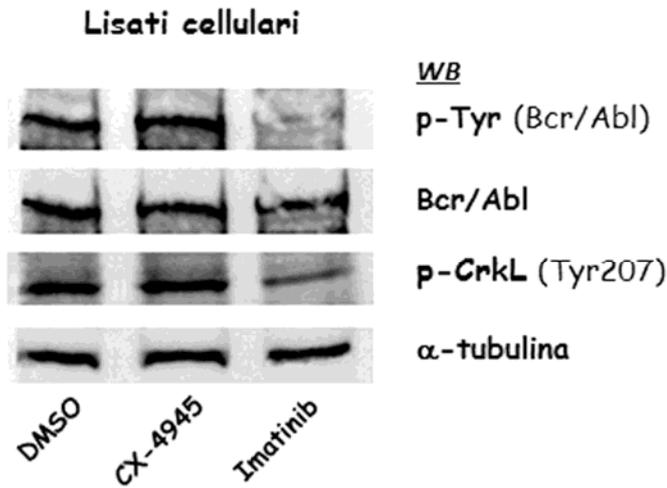
I dati in letteratura mettono in risalto da una parte la possibilità di CK2 α di autofosforilarsi in residui tirosinici sia *in vitro* (Donella-Deana A. *et al.*, 2001) che in cellule di mammifero (Vilk G. *et al.*, 2004), dall'altra la capacità di Abl di fosforilare CK2 α *in vitro* (Hériché J.K. *et al.*, 1998). L'obiettivo è stato, quindi, quello di capire se fosse CK2 α ad autofosforilarsi oppure se fosse Bcr/Abl a catalizzare questa fosforilazione.

A questo scopo, le cellule LAMA84-R sono state sottoposte a un trattamento di 24 ore con CX-4945 (Siddiqui-Jain A. *et al.*, 2010), un inibitore selettivo della proteinchinasi CK2 o, in parallelo, con l'inibitore di Abl imatinib, usato ad una concentrazione in grado di inibire Bcr/Abl nelle cellule resistenti.

L'analisi dei lisati cellulari mediante *western blot* permette di controllare l'efficacia degli inibitori utilizzati. In particolare, nella Fig.11-A è evidente come la presenza di CX-4945 nel terreno di coltura non influenza né l'espressione né l'attività di Bcr/Abl, mentre, come atteso, il pretrattamento con l'imatinib riduce lo stato di autofosforilazione dell'oncochinasi e inibisce la sua attività sul substrato endogeno CrkL.

L'efficacia dell'inibitore per CK2 è stata controllata, in parallelo, tramite un saggio di fosforilazione *in vitro* sul peptide-substrato R₃AD₂SD₅, usando aliquote degli stessi lisati ottenuti dalle cellule trattate. I dati, seppur non mostrati, confermano che solo con i campioni delle cellule incubate con CX-4945 la fosforilazione del peptide substrato è quasi completamente inibita.

A



B

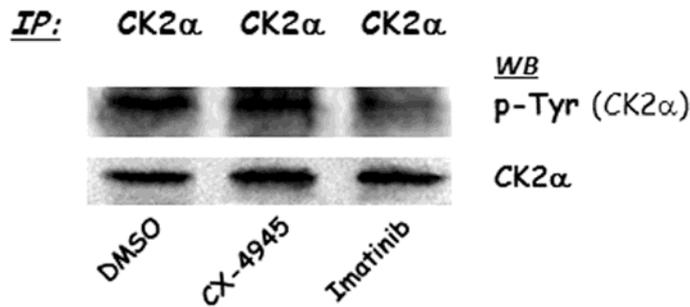


Fig. 11. L'inibizione di Bcr/Abl riduce la Tyr-fosforilazione di CK2 α in cellule LAMA84-R. Le cellule LAMA84-R erano trattate per 24 h a 37 °C con 10 μ M CX-4945 o 5 μ M imatinib. Le cellule di controllo erano trattate con DMSO. (A) Analisi tramite *SDS/PAGE* e *western blot* con gli anticorpi indicati di 20 μ g di proteine dei lisati delle cellule trattate. Immagine rappresentativa di cinque esperimenti separati (B) A partire da 600 μ g di proteine di lisato delle LAMA84-R trattate, era fatta un'immunoprecipitazione con 2 μ g di siero anti-CK2 α (CK2 α). Gli immunoprecipitati erano analizzati tramite *SDS/PAGE* e *western blot* con anticorpo gli anticorpi indicati. Immagine rappresentativa di otto esperimenti condotti separatamente.

Dai lisati delle cellule trattate, è stata poi immunoprecipitata CK2 α per analizzare il suo stato di fosforilazione tirosinica mediante *western blot* con l'anticorpo anti-fosfotirosina. La Fig. 11-B evidenzia come solo il trattamento delle cellule con imatinib sia in grado di ridurre efficacemente la Tyr-fosforilazione della subunità catalitica della chinasi. Tale risultato esclude che la resistenza all'imatinib sia associata all'autofosforilazione in tirosina di CK2 α , ma bensì suggerisce che Bcr/Abl sia l'enzima maggiormente coinvolto in tale fosforilazione.

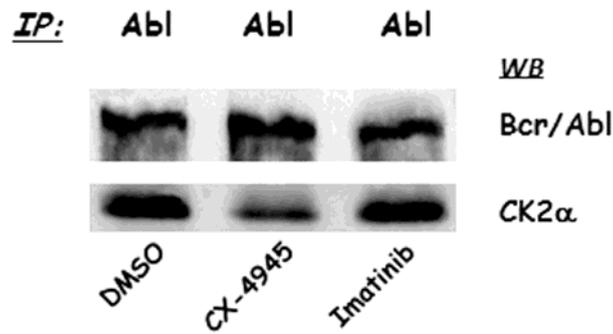
Infine, è da ricordare come si sia anche studiata la possibilità da parte di CK2 di fosforilare *in vitro* la proteina Bcr/Abl immunoprecipitata da lisati cellulari, ma i dati ottenuti non mostrano alcuna evidenza di fosforilazione in dell'oncochinasi catalizzata dall'oloforma ricombinante $\alpha_2\beta_2$ aggiunta agli immunoprecipitati di Bcr/Abl in presenza di [$\gamma^{33}\text{P}$]ATP.

L'attività catalitica di CK2 è essenziale per l'interazione con Bcr/Abl

L'evidenza nelle cellule LAMA84-R della presenza di CK2 fosforilata in tirosina da parte di Bcr/Abl e capace di co-immunoprecipitare con l'oncochinasi stessa, ha indotto ad analizzare che l'interazione fra le due chinasi all'interno della cellula potesse essere mediata dall'attività di Bcr/Abl.

A questo proposito, si sono trattate le cellule LAMA84-R per 24 ore in parallelo con gli inibitori CX-4945 o imatinib. Dopo il trattamento, i lisati cellulari ottenuti sono stati utilizzati per immunoprecipitare Bcr/Abl ed analizzare tramite *western blot* la quantità di CK2 α co-immunoprecipitata.

A



B

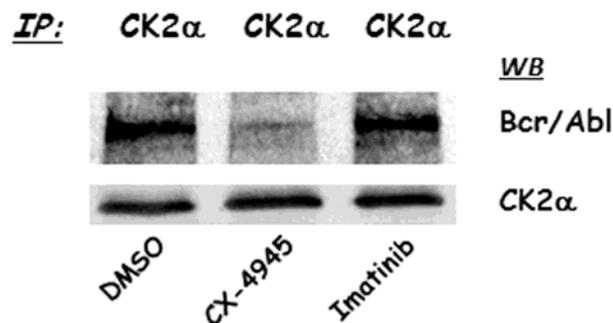


Fig. 12. L'inibizione di CK2 riduce la sua co-immunoprecipitazione con Bcr/Abl. Le cellule LAMA84-R erano trattate con 10 μ M CX-4945 o 5 μ M imatinib per 24 h a 37 °C. Le cellule di controllo erano trattate con DMSO. (A) A partire da 600 μ g di proteine di lisato delle LAMA84-R trattate, era fatta un'i immunoprecipitazione con 1,5 μ g di anticorpo anti-Abl (Abl) (B) A partire da 800 μ g di proteine di lisato delle LAMA84-R trattate, era fatta un'i immunoprecipitazione con 2 μ g di siero anti-CK2 α (CK2 α). Tutti gli immunoprecipitati erano analizzati tramite *SDS/PAGE* e *western blot* con gli anticorpi indicati. Entrambe le immagini sono rappresentativa di sei esperimenti separati.

La Fig. 12-A mostra il risultato dell'esperimento in cui è chiaro che, in contrasto con quanto si era ipotizzato inizialmente, l'inibizione dell'attività di Bcr/Abl non influenza in alcun modo la co-immunoprecipitazione con CK2, che invece risulta ridotta quando è CK2 stessa ad essere inibita.

Si è voluto confermare tale risultato immunoprecipitando CK2 α dai medesimi lisati delle cellule trattate. In accordo con quanto ottenuto in precedenza, nella Fig.12-B si può notare come solo nei campioni di cellule trattate con il CX-4945 sia evidente il calo della co-immunoprecipitazione della proteina Bcr/Abl con CK2.

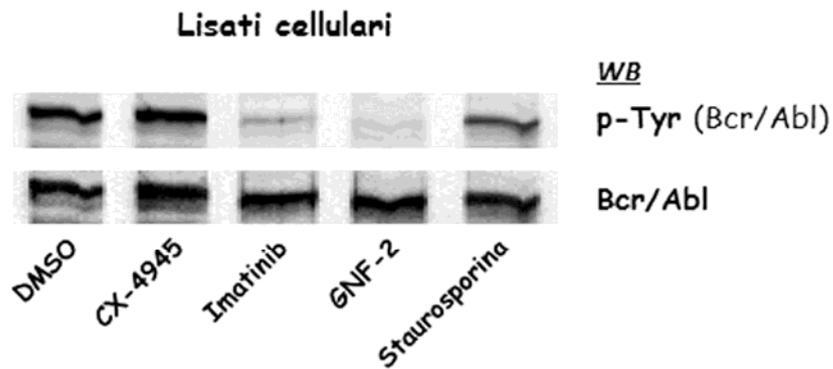
Al fine di rafforzare il dato appena illustrato e per escludere con maggior sicurezza l'implicazione dell'attività di Bcr/Abl o di altre chinasi nel modificare l'associazione fra CK2 e Bcr/Abl, si sono trattate le cellule LAMA84-R anche con altri due inibitori. In particolare, in parallelo al trattamento per 24 ore con CX-4945 e imatinib, le cellule resistenti sono state incubate anche con GNF-2 (Adrian F.J. *et al.*, 2006), un inibitore allosterico specifico di Bcr/Abl, e con staurosporina, un inibitore chinasi ad ampio spettro d'azione che non è in grado di inibire CK2, se non ad elevate concentrazioni (Meggio F. *et al.*, 1995).

A partire dai lisati delle cellule trattate, si è effettuata un'analisi dello stato di autofosforilazione/attivazione di Bcr/Abl, nonché della sua espressione, per controllare l'efficacia degli inibitori utilizzati. Com'è possibile osservare nella Fig. 13-A, l'inibitore GNF-2 è in grado di bloccare l'attività di Bcr/Abl in maniera simile all'imatinib, riducendone drasticamente l'autofosforilazione, mentre la staurosporina è un inibitore meno efficace della Tyr-fosforilazione dell'oncochinasi.

L'immunoprecipitazione di Bcr/Abl eseguita dai medesimi lisati e poi analizzata mediante *western blot* per verificare la quantità di CK2 α co-immunoprecipitata, ha confermato le evidenze ottenute in precedenza. In Fig. 13-B, si può infatti notare che, mentre il trattamento con CX-4945 riduce la presenza di CK2 α negli immunocomplessi di Bcr/Abl, imatinib, GNF-2 e staurosporina non causano alcuna variazione nella co-immunoprecipitazione di CK2 α con Bcr/Abl. Questo risultato esclude, di fatto, l'importanza dell'attività di Bcr/Abl e di una vasta serie di

proteinchinasi, inibite da staurosporina, nel modulare l'interazione fra CK2 e Bcr/Abl.

A



B

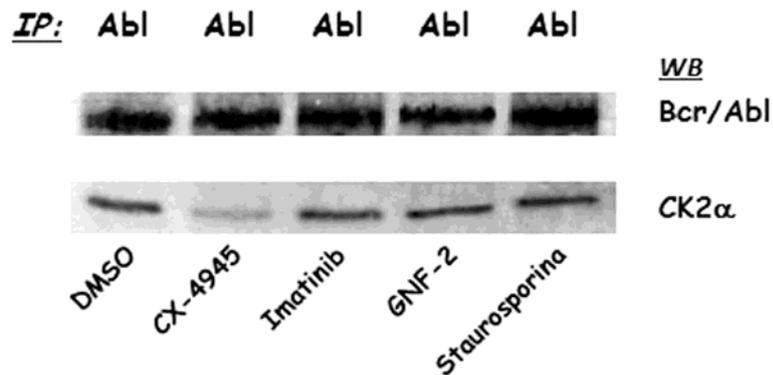


Fig. 13. Solo l'inibizione di CK2 riduce la sua co-immunoprecipitazione con Bcr/Abl. Le cellule LAMA84-R erano trattate con 10 μ M CX-4945, 5 μ M imatinib, 30 μ M GNF-2 e 1 μ M staurosporina per 24 h a 37 °C. Le cellule di controllo erano trattate con DMSO. (A) 20 μ g di proteine di lisato delle LAMA84-R trattate erano analizzate tramite *SDS/PAGE* e *western blot* con gli anticorpi indicati. Immagine rappresentativa di cinque esperimenti separati (B) A partire da 600 μ g di proteine di lisato delle LAMA84-R trattate era fatta un'immunoprecipitazione con 1,5 μ g di siero anti-Abl (Abl). Gli immunoprecipitati erano analizzati tramite *SDS/PAGE* e *western blot* con gli anticorpi indicati. Le immagini sono rappresentativa di sei esperimenti separati.

L'inibitore CX-4945 riduce la vitalità delle cellule LAMA84-S/R

Il trattamento di numerosi tipi di cellule in coltura con inibitori specifici di CK2 causa morte per apoptosi (Ruzzene M. *et al.*, 2002; Sarno S. *et al.*, 2005). Si è voluto perciò saggiare l'effetto del CX-4945, il primo inibitore selettivo di CK2 entrato in trial clinico per la cura di tumori solidi (Pierre F. *et al.*, 2010), sulla vitalità delle cellule LAMA84-S e LAMA84-R, usando il metodo MTT.

Al fine di poter fare un confronto fra l'effetto sulla vitalità cellulare dato dal trattamento con imatinib (pannello A) rispetto a quello causato dal CX-4945 (pannello B), si è effettuato un saggio di MTT in cellule LAMA84 sensibili e resistenti incubate per 48 ore in presenza di concentrazioni crescenti dell'inibitore per Bcr/Abl o per CK2. Il risultato degli esperimenti è riportato in Fig. 14, che mostra la percentuale di cellule vive rispetto al corrispondente campione di controllo ottenuta alle concentrazioni di inibitore indicate.

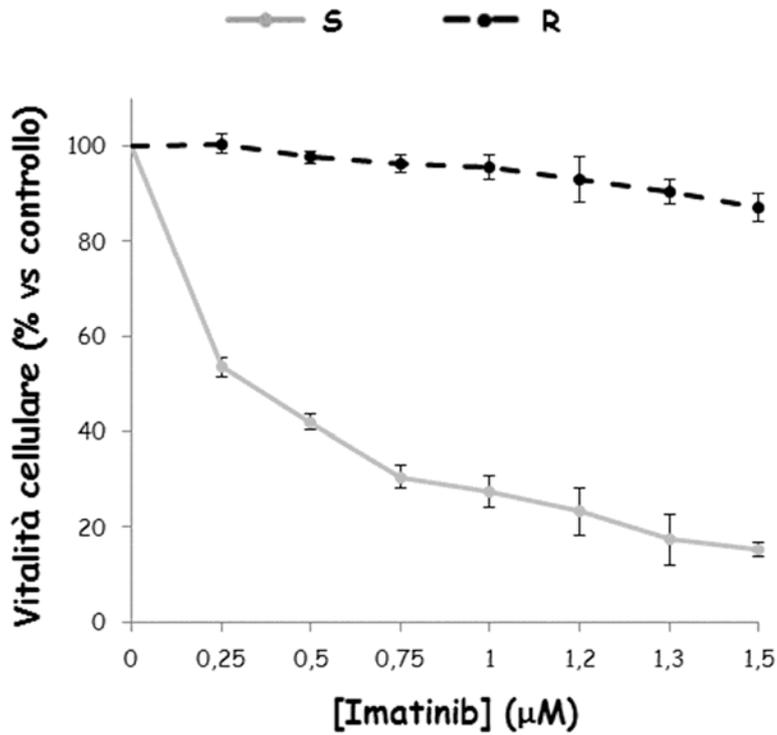
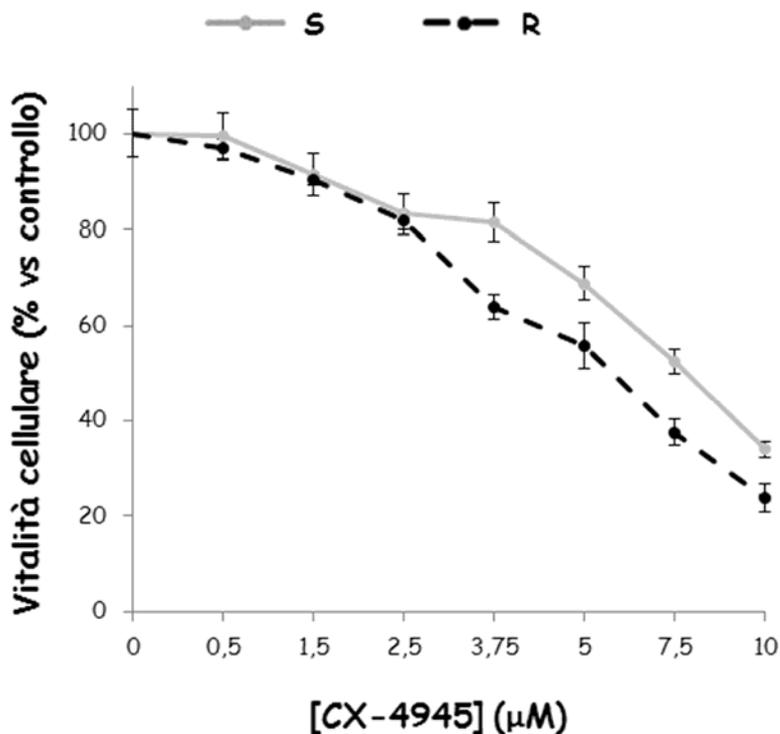
A**B**

Fig. 14. L'inibitore CX-4945 inibisce la vitalità delle cellule LAMA84-S e LAMA84-R. Analisi della vitalità cellulare, come percentuale di cellule vive rispetto al controllo, con saggio MTT di cellule LAMA84-S e LAMA84-R trattate per 48 h a 37 °C con concentrazioni crescenti (riportate nei valori delle ascisse dei grafici) di imatinib (A) o CX-4945 (B). In entrambi i grafici, i valori ottenuti sono la media di otto esperimenti indipendenti in triplicato e le barre di errore si riferiscono alla deviazione standard dal valore medio.

In Fig.14-A, come atteso, le cellule LAMA84-R non risentono della presenza dell'imatinib nel terreno di coltura alle concentrazioni utilizzate, mentre la vitalità delle cellule LAMA84-S viene ridotta già circa del 70% alla concentrazione di 0,25 μM di inibitore.

In Fig.14-B si nota come all'aumentare della concentrazione di CX-4945 ci sia una progressiva diminuzione della vitalità di entrambe le linee cellulari. In particolare, è da sottolineare che a partire dal punto in cui la concentrazione di CX-4945 è di 2,5 μM , la vitalità delle due varianti cellulari si riduce con un andamento leggermente diverso, mettendo in luce come l'inibitore abbia sorprendentemente un maggior effetto sulle cellule resistenti rispetto a quelle sensibili. Precisamente, l' IC_{50} d'inibizione di CX-4945 per la vitalità delle cellule LAMA84-R è 5,6 μM , mentre nel caso delle LAMA84-S esso è 8,2 μM .

L'inibizione di CK2 influenza la risposta all'imatinib delle cellule LAMA84-R

La capacità da parte dell'inibitore CX-4945 di inibire efficacemente la vitalità di entrambe le linee cellulari, con particolare rilevanza per la linea delle cellule resistenti all'imatinib, e di ridurre la co-immunoprecipitazione fra CK2 e Bcr/Abl nelle LAMA84-R, ci ha portato ad analizzare la vitalità delle cellule LAMA84 sottoposte a trattamento combinato di imatinib con CX-4945.

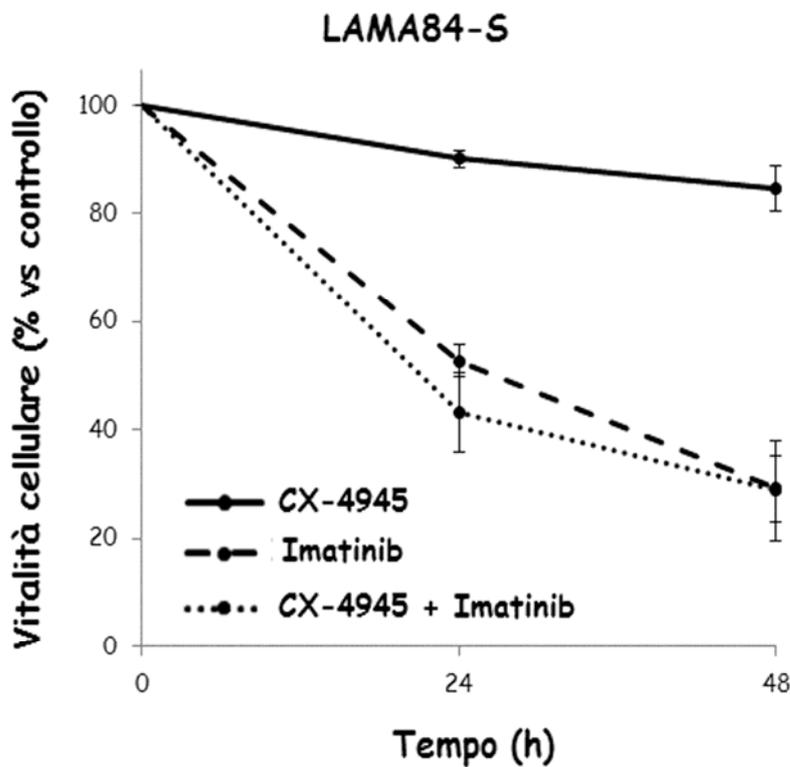
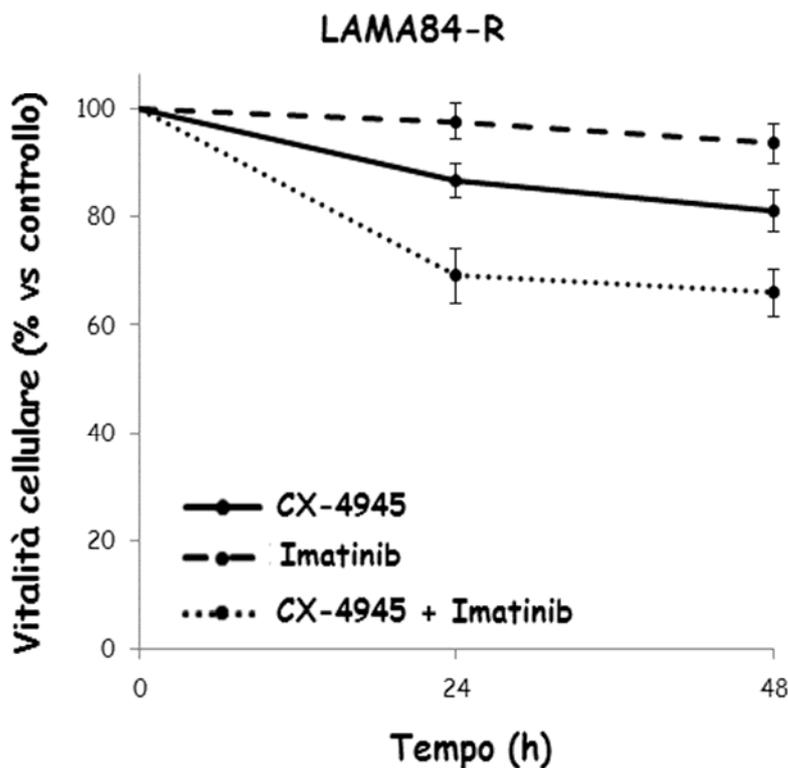
A**B**

Fig. 15. L'inibitore CX-4945 sensibilizza le cellule LAMA84-R all'imatinib.

Analisi della vitalità cellulare, come percentuale di cellule vive rispetto al controllo, con saggio MTT di cellule LAMA84-S (A) e LAMA84-R (B) trattate per 24 e 48 h con 0,25 μ M imatinib e/o 2,5 μ M CX-4945. In entrambi i grafici, i valori ottenuti sono la media di otto esperimenti indipendenti in triplicato e le barre di errore si riferiscono alla deviazione standard dal valore medio.

Le cellule LAMA84 sensibili e resistenti sono state sottoposte, dunque, ad un trattamento di 24 e 48 ore con aggiunta di imatinib e CX-4945 separatamente o in combinazione fra loro. Nel caso dell'imatinib è stata scelta la concentrazione di 0,25 μM , che è superiore all' IC_{50} di vitalità per le cellule LAMA84-S da noi ottenuta (Fig 14-A), mentre il CX-4945 aggiunto era 2,5 μM , la più alta concentrazione alla quale non si è notato differenze significative nella vitalità fra le due linee cellulari.

La Fig. 15 mostra i grafici per ciascuna linea cellulare dell'andamento della vitalità cellulare nel tempo, alle concentrazioni sopra indicate degli inibitori. Analizzando il risultato ottenuto per le cellule sensibili, è facile osservare come non ci sia alcuna variazione significativa di vitalità di queste cellule fra il trattamento con imatinib da solo e quello combinato con CX-4945, dimostrando come sia l'inibitore di Bcr/Abl la causa principale di mortalità. Nel caso delle cellule resistenti, invece, si può osservare come il trattamento combinato dei due inibitori crei una diminuzione della vitalità cellulare significativamente più consistente che non nel caso del trattamento con un singolo inibitore sia a 24 che a 48 ore. In particolare, la combinazione del CX-4945 con l'imatinib permette di ridurre la vitalità delle cellule LAMA84-R di un ulteriore 15-18% rispetto all'effetto dovuto all'inibitore di CK2 aggiunto da solo.

L'inibizione della proteinchinasi CK2, quindi, induce nelle cellule LAMA84-R una maggior sensibilità alla presenza di imatinib.

Identificazione di eIF3j come nuovo substrato di CK2

Un'analisi delle proteine-partner di CK2 in cellule LAMA84-R è stata successivamente condotta. Da questi esperimenti si è cercato di studiare se alcune delle proteine associate a CK2 potessero essere anche substrato dell'enzima. A questo scopo, si è eseguita un'immunoprecipitazione di CK2 α

dal lisato cellulare e la presenza di substrati endogenamente fosforilati dalla CK2 immunoprecipitata è stata esaminata sottoponendo gli immunocomplessi ad un saggio di fosforilazione *in vitro* in presenza di [$\gamma^{33}\text{P}$]ATP.

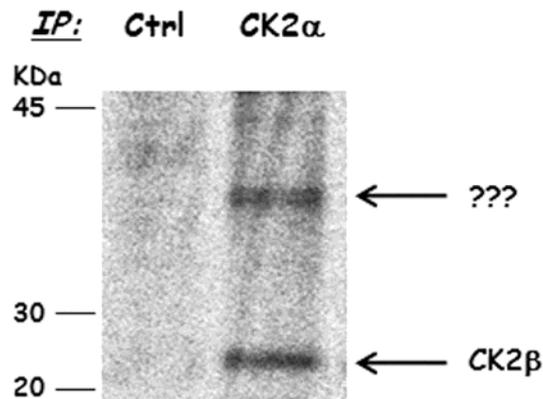


Fig. 16. Attività chinasi di CK2 in immunoprecipitato di CK2 α da cellule LAMA84-R. Immunoprecipitazione con 0,5 μg di siero anti-CK2 α (CK2 α) o di siero di coniglio precedente all'immunizzazione, per controllo (Ctrl), a partire da 300 μg di proteine di lisato delle cellule LAMA84-R. L'attività di CK2 degli immunoprecipitati era saggiata facendo un'autofosforilazione come descritto nella sezione "Materiali e metodi". La radioattività incorporata dalle proteine ^{33}P -fosforilate, dopo *SDS/PAGE*, era analizzata tramite il *PerkinElmer's Cyclone Plus Storage Phosphor System* (vedi parte bassa della Figura) ed espressa in DLU. L'immagine è indicativa di cinque esperimenti condotti separatamente.

L'analisi tramite *SDS/PAGE* delle proteine ^{33}P -fosforilate ha messo in evidenza, tra le altre, la presenza di una banda corrispondente ad un proteina di circa 35-38 kDa, che presenta un grado di fosforilazione elevato e paragonabile a quello della banda di 25 kDa relativa all'autofosforilazione attesa di CK2 α sulla sua subunità regolatoria CK2 β (Fig. 16).

La conferma che fosse CK2 la responsabile della fosforilazione della banda ignota si è voluta ottenere ripetendo l'esperimento con l'aggiunta nella miscela di fosforilazione di tre differenti inibitori: imatinib, CX-4945 e la staurosporina.

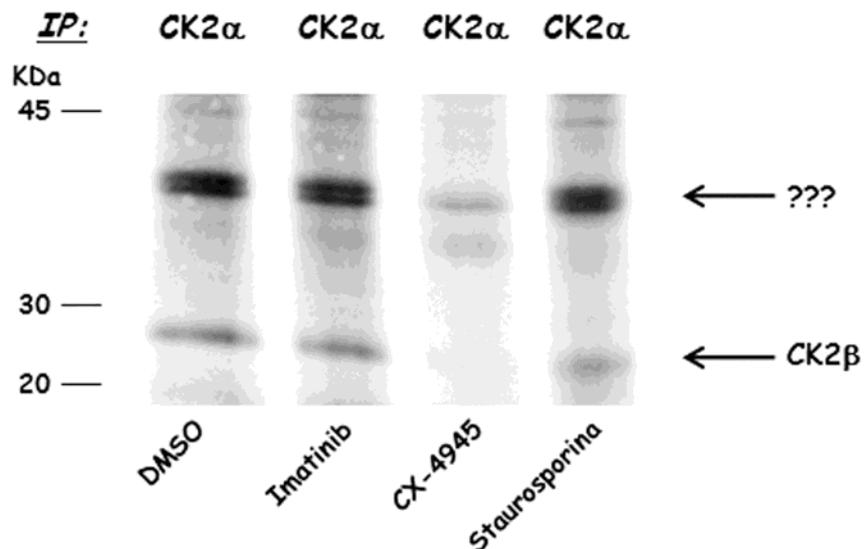


Fig. 17. Attività chinasicca di CK2 in immunoprecipitato di CK2 α da cellule LAMA84-R. Immunoprecipitazione con 0,5 μ g di siero anti-CK2 α (CK2 α) o di siero di coniglio precedente all'immunizzazione, per controllo (Ctrl), a partire da 300 μ g di proteine di lisato delle cellule LAMA84-R. L'attività di CK2 degli immunoprecipitati era saggiata facendo un'autofosforilazione come descritto nella sezione "Materiali e metodi". Erano aggiunti *in vitro* 500 nM Imatinib, 100 nM CX-4945, 5 μ M staurosporina e DMSO come controllo. La radioattività incorporata dalle proteine 33 P-fosforilate, dopo SDS/PAGE, era analizzata tramite il *PerkinElmer's Cyclone Plus Storage Phosphor System* (vedi parte bassa della Figura). L'immagine è indicativa di cinque esperimenti condotti separatamente.

Il risultato del saggio di fosforilazione è visibile in Fig. 17, in cui risulta chiaramente che la radioattività della banda di 35-38 kDa, in parallelo a quella corrispondente alla CK2 β , viene annullata solo in presenza dell'inibitore specifico per CK2 CX-4945. L'imatinib e la staurosporina non inducono alcuna variazione nello stato di fosforilazione della banda in esame, confermando di fatto che è CK2 la chinasi coinvolta nella catalisi di questa reazione.

Allo scopo di identificare la proteina-substrato di CK2, la banda fosforilata è stata tagliata dal gel e sottoposta ad analisi di spettrometria di massa con in collaborazione con il Dr. G. Arrigoni e la Dr.ssa C. Franchin del nostro gruppo di ricerca. La proteina è risultata corrispondere alla risultando subunità j del fattore eucariotico 3 d'inizio della traduzione (eIF3j, *eukaryotic translation initiation factor 3 subunit j*).

Questa proteina non rientra fra quelle già note come fosforilabili da CK2 (Meggio F. *et al.*, 2003; Dinkel H. *et al.*, 2011) e, di fatto, risulta essere un nuovo substrato per tale chinasi.

Identificazione del sito di fosforilazione di CK2 in eIF3j

L'identificazione di eIF3j tramite spettrometria di massa, ci ha permesso di scegliere un anticorpo specifico per tale proteina e poter così verificare l'effettiva co-immunoprecipitazione con CK2 anche tramite analisi *western blot*.

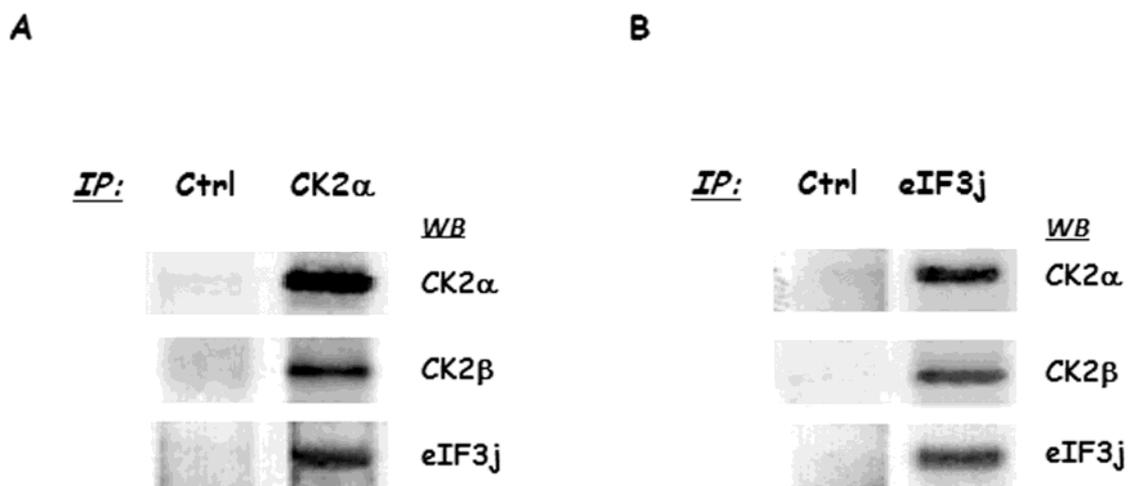


Fig. 18. Co-immunoprecipitazione di CK2 con eIF3j in cellule LAMA84-R. (A) Immunoprecipitazione con 0,5 µg di siero anti-CK2α (CK2α) o di siero di coniglio precedente all'immunizzazione, per controllo (Ctrl), a partire da 300 µg di proteine di lisato delle cellule LAMA84-R. (B) Immunoprecipitazione con 1 µg di anticorpo anti-eIF3j (eIF3j) o anticorpo dello stesso genere, per controllo (Ctrl), a partire da 400 µg di proteine di lisato delle cellule LAMA84-R. Tutti gli immunoprecipitati erano analizzati tramite *SDS/PAGE* e *western blot* con gli anticorpi indicati. Le immagini sono rappresentative di sei esperimenti separati.

A partire da lisati di cellule LAMA84-R si è realizzata una immunoprecipitazione in parallelo di CK2α o eIF3j. L'analisi degli

immunoprecipitati tramite *SDS/PAGE* e successivo *western blot* è mostrata in Fig. 18.

Com'è possibile vedere, negli immunoprecipitati di CK2 α , è possibile rilevare anche la presenza di eIF3j (Fig.18-A) e, viceversa, quando si immunoprecipita eIF3j si osserva che entrambe le subunità di CK2 sono presenti nell'immuno-complesso (Fig. 18-B). Lo stesso esperimento, seppur non presentato, è stato condotto anche su lisati di cellule LAMA84-S e ha dato i medesimi risultati, escludendo che l'interazione fra CK2 ed eIF3j fosse un fenomeno legato all'acquisizione della resistenza all'imatinib da parte delle cellule.

Allo scopo di ottenere ulteriore conferma che la banda fosforilata da CK2 fosse quella corrispondente ad eIF3j, si è immunoprecipitata la subunità j dai lisati delle cellule LAMA84-R e si è effettuato un saggio di fosforilazione *in vitro* con [$\gamma^{33}\text{P}$]ATP, in presenza o assenza dell'inibitore CX-4945.

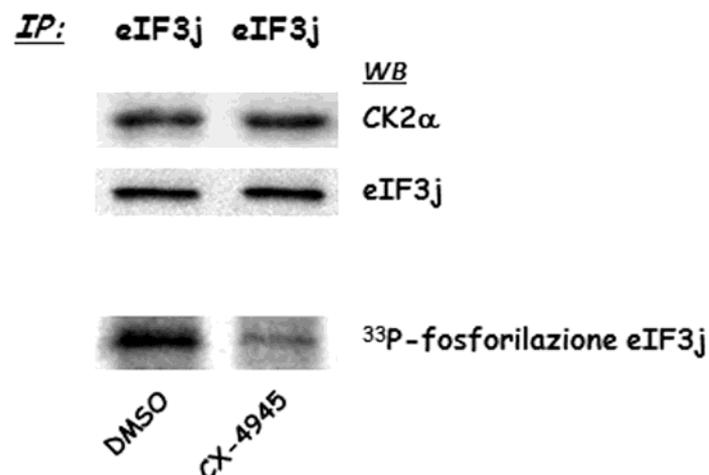


Fig. 19. Fosforilazione di eIF3j da parte di CK2 co-immunoprecipitata in cellule LAMA84-R. Immunoprecipitazione con 1 μg di anticorpo anti-eIF3j (eIF3j) o anticorpo dello stesso genere, per controllo (Ctrl), a partire da 400 μg di proteine di lisato delle cellule LAMA84-R. L'attività di CK2 su eIF3j negli immunoprecipitati era saggiata facendo una fosforilazione, in presenza o assenza di 100 nM CX-4945, come descritto nella sezione "Materiali e metodi". DMSO era aggiunto nel campione di controllo. La radioattività incorporata da eIF3j ^{33}P -fosforilata, dopo *SDS/PAGE*, era analizzata tramite il *PerkinElmer's Cyclone Plus Storage Phosphor System* (vedi parte bassa della Figura). L'immagine è indicativa di cinque esperimenti condotti separatamente.

La Fig. 19 evidenzia come a parità di subunità catalitica α di CK2 co-immunoprecipitata con la medesima quantità di substrato eIF3j, la fosforilazione mediata da CK2 su quest'ultimo cala nettamente in presenza dell'inibitore CX-4945 aggiunto alla miscela di fosforilazione.

Infine, si poneva di particolare interesse l'identificazione del sito di fosforilazione di CK2 nella subunità j di eIF3. A tal fine, si è immunoprecipitata la proteina eIF3j dai lisati delle cellule resistenti, si è eseguita una fosforilazione *in vitro* con [$\gamma^{33}\text{P}$]ATP e la banda del gel corrispondente a eIF3j è stata tagliata dal gel e sottoposta ad un'analisi di spettrometria di massa, dopo aver effettuato un arricchimento in fosfo-peptidi del campione, in collaborazione con il Dr. G. Arrigoni.

Il risultato di questo esperimento ha permesso di identificare nella Ser127 di eIF3j il sito specifico di fosforilazione da parte di CK2. A maggior supporto di tale dato, si ha che la sequenza amminoacidica in cui si ritrova la Ser127, E-E-D-S-D-L-E, è conforme alla sequenza consenso specificamente riconosciuta nelle proteine da parte di CK2, S-X-X-D/E/Yp/Sp (Meggio F. *et al.*, 1994).

La subunità b del fattore d'inizio della traduzione eucariotico 3 è substrato di CK2

eIF3j è una delle tredici subunità del fattore 3 eucariotico d'inizio della traduzione (eIF3) (Kolupaeva U. *et al.*, 2005) e questo ci ha indotto a pensare che co-immunoprecipitate con CK2 ci potessero essere anche altre proteine del medesimo complesso. Si è condotta, dunque, un'analisi mediante spettrometria di massa di un intero immunoprecipitato di CK2 α , ottenuto da lisati di cellule LAMA84-R.

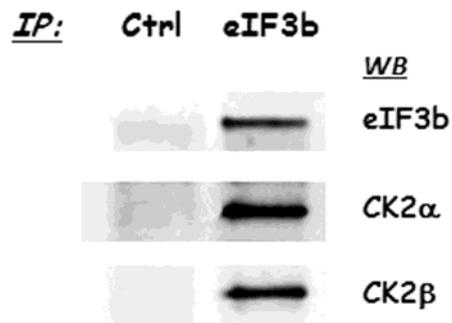
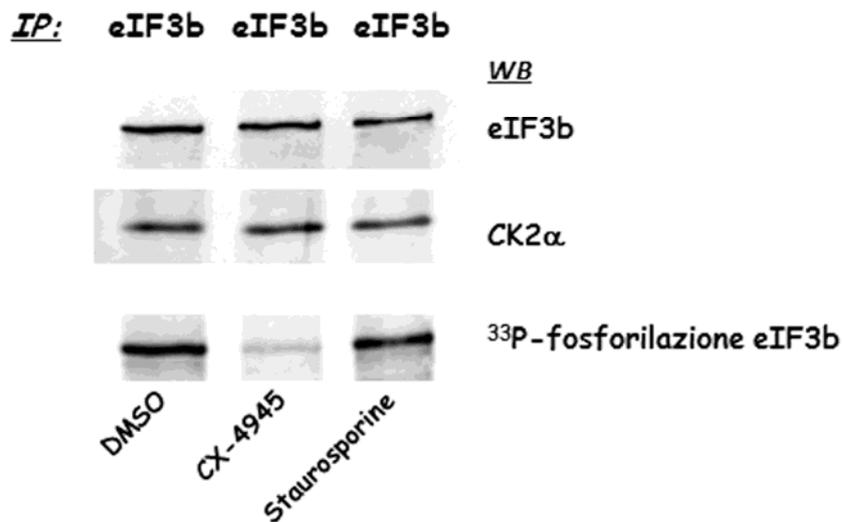
A**B**

Fig. 20. Co-immunoprecipitazione di CK2 con eIF3b e fosforilazione di eIF3b da parte di CK2 in cellule LAMA84-R. (A) Immunoprecipitazione con 0,5 µg di siero anti-CK2α (CK2α) o di siero di coniglio precedente all'immunizzazione, per controllo (Ctrl), da 300 µg di proteine di lisato delle cellule LAMA84-R. Gli immunoprecipitati erano analizzati tramite SDS/PAGE e western blot con gli anticorpi indicati. (B) Immunoprecipitazione con 1 µg di anticorpo anti-eIF3b (eIF3b) o anticorpo dello stesso genere, per controllo (Ctrl), da 400 µg proteici di lisato delle cellule LAMA84-R. L'attività di CK2 su eIF3b negli immunoprecipitati era saggiata facendo una fosforilazione come descritto nella sezione "Materiali e metodi". Erano aggiunti *in vitro* 100 nM CX-4945, 5 µM staurosporina o DMSO come controllo. La radioattività incorporata da eIF3b ³³P-fosforilata, dopo SDS/PAGE e western blot, era analizzata tramite il PerkinElmer's Cyclone Plus Storage Phosphor System (vedi parte bassa della Figura) e i campioni erano analizzati con gli anticorpi indicati. Le immagini sono indicative di sei esperimenti individuali.

L'elaborazione dei dati di questo esperimento compiuta in collaborazione con il Dr. G. Arrigoni e la Dr.ssa C. Franchin, utilizzando una forte stringenza per le proteine che potessero essere rilevate anche minimamente nel campione di controllo, ha messo in evidenza effettivamente la presenza, oltre a proteine attese come CK2 α' , CK2 β , Bcr/Abl, Pin1 (Litchfield D.W. *et al.*, 1992) e Hsp90 (Miyata Y. *et al.*, 1992), di altre componenti del complesso eIF3, in particolare le subunità b, f, g, h, k e l.

Dato che la subunità b nel complesso eIF3 (116 kDa) interagisce direttamente con la subunità j (Fraser C.S. *et al.*, 2004), si è pensato di confermare la co-immunoprecipitazione fra CK2 ed eIF3b, immunoprecipitando la subunità b dai lisati delle cellule LAMA84-R ed analizzando, tramite *western blot*, la presenza di CK2 negli immunocomplessi. Il risultato di questo esperimento è visibile in Fig.20-A, in cui è evidente la co-immunoprecipitazione delle subunità CK2 α e CK2 β con eIF3b.

Inoltre, poiché la sequenza di eIF3b contiene motivi consenso per la fosforilazione di CK2, si è voluta analizzare la possibilità da parte della chinasi di fosforilare anche eIF3b, che non fa parte dei substrati noti per tale enzima (Meggio F. *et al.*, 2003; Dinkel H. *et al.*, 2011).

A questo punto eIF3b è stato immunoprecipitato da lisati di cellule resistenti e sottoposto a saggi di fosforilazione *in vitro* con [$\gamma^{33}\text{P}$]ATP, in presenza o assenza dell'inibitore di CK2 CX-4945. Com'è possibile notare nell'autoradiografia in Fig. 20-B, è evidente una banda che ha incorporato radioattività ad un'altezza superiore ai 100 kDa, la cui fosforilazione cala evidentemente quando l'inibitore di CK2 è presente nella miscela di fosforilazione. Tramite l'analisi con *western blot*, si è confermato che tale banda corrisponde alla subunità eIF3b (Fig. 20-B)

Alla luce di questo risultato, si può concludere che come eIF3j, anche eIF3b appare essere un nuovo substrato della proteinchinasi CK2. L'analisi della

sequenza della subunità b, alla ricerca di siti serinici o treoninici localizzati in sequenze simili ai motivi consenso per la fosforilazione di CK2 mette in evidenza come migliore sito potenziale di fosforilazione la Ser164, localizzata nella sequenza D-D-V-S-E-E-E. Ulteriori esperimenti sono in corso per una conferma dell'identificazione del sito tramite analisi di spettrometria di massa.

DISCUSSIONE

La leucemia mieloide cronica è associata all'espressione della proteina di fusione Bcr/Abl, che è in grado di causare la trasformazione leucemica delle cellule staminali ematopoietiche e sostenere il fenotipo tumorale. Nelle cellule leucemiche, soprattutto nelle fasi avanzate della patologia in cui Bcr/Abl risulta sovraespressa, è nota l'alterazione dell'espressione e dell'attività di varie proteine implicate in differenti *pathway* cellulari, con il che cooperano nell'aumentare la proliferazione e la sopravvivenza di tali cellule (Perrotti D. *et al.*, 2010).

In questo lavoro si è voluto studiare il possibile coinvolgimento della proteinchinasi di sopravvivenza CK2 nel fenotipo di resistenza al trattamento con l'inibitore imatinib nella linea cellulare LAMA84, modello della leucemia mieloide cronica.

Si è dimostrato che in cellule LAMA84 in grado di sopravvivere in presenza di d'imatinib 1,5 μM nel terreno di coltura (LAMA84-R), selezionate da cellule resistenti a una concentrazione inferiore d'imatinib (0,6 μM) e caratterizzate da una sovraespressione di Bcr/Abl, è evidente una sovraespressione di circa il doppio della proteinchinasi CK2, in particolare solo delle subunità α e β , e non α' , rispetto alla linea parentale sensibile all'inibitore.

Tale dato suscita un interesse particolare se si considera che l'alterazione dei livelli di espressione di CK2, essendo una chinasi costitutivamente attiva e altamente pleiotropica, è stata descritta in svariati tipi di tumori, in alcuni dei quali è in relazione alla loro aggressività (come descritto nella sezione 2.4 dell'introduzione). A questo riguardo, è interessante ricordare che una consistente sovraespressione di CK2 è stata messa in evidenza in campioni di pazienti CML rispetto ai livelli riscontrati nei granulociti normali (Phan-Dinh-Tuy F. *et al.*, 1985). Inoltre, è da sottolineare anche che

non è stata riscontrata alcuna differenza fra le due linee cellulari LAMA84 nell'analisi dei livelli intracellulari di altre proteine (Lyn, HS1, Hsp90, Syk, Akt, SHP-1, SHP-2, Cdc37), la cui espressione e/o attività deregolata sono state associate alla proliferazione cellulare e/o al difetto d'apoptosi.

È già stato precedentemente messo in evidenza, in una linea linfoblastoide di tipo T (CEM-R), una relazione tra farmaco resistenza e sovraespressione della sola subunità catalitica α di CK2 (Di Maria *et al.*, 2007). Questo risultato ed i nostri dati che evidenziano sovraespressione delle subunità α e β , e non α' , sono in accordo con i dati che dimostrano come CK2 α rispetto a CK2 α' e le subunità catalitiche monomeriche rispetto alle forme tetrameriche di CK2 abbiano diversa specializzazione cellulare (Faust R.A. *et al.*, 1999) e possano essere potenziate in modo diverso a seconda delle esigenze della cellula.

Esperimenti sono in corso, mirati a chiarire se i diversi livelli di CK2 nelle due varianti possano essere dovuti a diversa espressione dell'mRNA di CK2 α e CK2 β . A questo riguardo è interessante ricordare che i risultati sono ad ora noti hanno dimostrato che la sovraespressione di CK2 presente nelle cellule tumorali è sempre dovuta ad alterazione dei livelli proteici, suggerendo che l'espressione anomala della chinasi è da ascrivere ad una deregolazione del *turnover* della proteina e non ad un'alterata trascrizione genica.

L'elevata espressione di CK2 nelle cellule LAMA84-R, in cui è anche sovraespressa la chinasi Bcr/Abl, ci ha suggerito una possibile correlazione fra queste due chinasi nei processi intracellulari delle cellule CML. Le conoscenze già note su una possibile interazione fra CK2 e Bcr/Abl sono molto limitate. In particolare, l'insieme dei dati ottenuti da due gruppi di ricerca (Heriché J.K. *et al.*, 1998; Mishra S. *et al.*, 2003) hanno messo in evidenza la capacità di CK2 α di interagire con Bcr/Abl, sia nel dominio Bcr (in una regione fra i residui 242 e 313) che in quello Abl. D'altro canto però, i

dati raccolti da questi due gruppi, relativi soprattutto al motivo funzionale dell'interazione fra le due chinasi, risultano contrastanti fra loro.

Il gruppo di Heriché J.K. (1998), trasfettando la subunità CK2 α di pollo in fibroblasti murini NIH 3T3, ha messo in evidenza una Tyr-fosforilazione di CK2 α in cellule quiescenti e, dopo aver dimostrato sia la capacità di Abl di fosforilare CK2 α *in vitro* che l'interazione di CK2 con Abl o Bcr/Abl in cellule, ha associato a Bcr/Abl la possibilità di Tyr-fosforilare CK2 α nelle cellule, riducendone l'attività. Al contrario, Mishra S. *et al.* (2003), pur confermando l'interazione fra CK2 α e Bcr/Abl in cellule, non hanno rilevato alcuna Tyr-fosforilazione di CK2 α endogena né in cellule umane in cui è indotta l'espressione di Bcr/Abl p210 né in cellule murine di linfoma linfoblastico esprimenti Bcr/Abl p190, collegando ciò principalmente alla diversa origine della CK2 α studiata. Infatti, la CK2 α di pollo utilizzata da Heriché J.K. *et al.* presenta un residuo di tirosina in posizione 323, all'interno di una sequenza consenso preferenziale per la fosforilazione da parte di Abl, Y-X-X-P (Songyang Z. *et al.*, 1994), mentre tale tirosina è localizzata in una sequenza Y-X-X-T nella CK2 α umana ed è assente nella CK2 α murina, subunità catalitiche usate da Mishra S. *et al.*. Quest'ultimo gruppo, inoltre, ha suggerito la capacità di Bcr/Abl di potenziare direttamente o indirettamente l'effetto di CK2, in quanto l'analisi dell'attività *in vitro* su un peptide specifico di CK2 proveniente da lisati di cellule trattate con imatinib è risultata significativamente minore di quella della CK2 dei lisati di cellule controllo.

L'analisi condotta in questo lavoro di tesi, in linea con i dati dei due gruppi di ricerca appena citati, ha messo in luce un'interazione consistente fra CK2 e Bcr/Abl, che avviene solo nelle cellule resistenti e non, è direttamente riconducibile alla sola sovraespressione delle due chinasi. Infatti, pur usando condizioni limitanti, in cui la quantità di Bcr/Abl o CK2 immunoprecipitata è simile nelle due varianti cellulari, non vi è alcuna

traccia di co-immunoprecipitazione delle due chinasi in LAMA84 sensibili all'imatinib. Inoltre, l'interazione fra CK2 e Bcr/Abl sembra essere modulata dalla presenza del farmaco nel terreno di coltura, in quanto l'eliminazione dell'imatinib per un lungo periodo di tempo riduce la co-immunoprecipitazione dei due enzimi, suggerendo la possibilità che tale associazione sia correlata ai meccanismi indotti nelle cellule dalla resistenza all'imatinib.

A differenza dei dati di Mishra S. *et al.* (2003) si è riusciti anche a rilevare la presenza di CK2 α endogena Tyr-fosforilata nelle cellule LAMA84-R. L'ammontare di questa forma fosforilata pare, però, costituire solo una piccola frazione della CK2 α cellulare totale.

Successivamente, trattando le cellule LAMA84-R con inibitori specifici per Bcr/Abl o CK2, si è messo in evidenza che la Tyr-fosforilazione di CK2 α cala solo nei campioni trattati con imatinib, permettendo così di designare Bcr/Abl come la chinasi maggiormente coinvolta nella Tyr-fosforilazione di CK2 α nelle cellule resistenti. Tale dato, quindi, è in accordo con l'ipotesi inizialmente proposta da Hériche J.K. *et al.*, secondo cui la Tyr-fosforilazione della CK2 α cellulare è legata all'attività di Bcr/Abl.

A riguardo del possibile ruolo della fosforilazione di CK2 α da parte di Bcr/Abl nella modulazione dell'attività di CK2, i saggi di fosforilazione *in vitro* condotti sui lisati delle cellule LAMA84-R non hanno dato risultati molto chiari, a causa degli artifici che sono stati usati, dovuti alla bassa entità di CK2 α Tyr-fosforilata presente nei lisati. Tuttavia, l'attività di CK2 α Tyr-fosforilata pare leggermente maggiore, comunque sicuramente non minore, rispetto alla CK2 α priva di Tyr-fosforilazione. Questo risultato va più a supporto dell'ipotesi di Hériche J.K. *et al.* e in contrasto con quella di Mishra S. *et al.*, ma la variabilità dei risultati è probabilmente imputabile alle diverse condizioni sperimentali utilizzate e quindi, in conclusione, non è

possibile affermare con certezza che Bcr/Abl possa in qualche modo modulare l'attività di CK2.

Nella porzione Abl di Bcr/Abl è presente un dominio SH2, che permette di legare residui tirosinici fosforilati in sequenze specifiche di altre proteine (Pawson T. *et al.* 2001); questo ci ha indotto ad ipotizzare l'importanza della Tyr-fosforilazione di CK2 α per l'interazione fra Bcr/Abl e CK2. I risultati ottenuti, però, hanno smentito quest'ipotesi, in quanto solo il trattamento delle cellule LAMA84-R con l'inibitore specifico per CK2, CX-4945, causa un'evidente riduzione della co-immunoprecipitazione di CK2 e Bcr/Abl. Inoltre, a rafforzare maggiormente il dato che è l'attività di CK2 stessa ad essere fondamentale per la sua interazione con Bcr/Abl, vi è la mancata alterazione dell'interazione fra CK2 e Bcr/Abl anche nei campioni di cellule trattate con staurosporina, che alla concentrazione utilizzata è in grado di inibire un largo spettro di proteinchinasi tranne CK2.

Data la necessaria attività di CK2 per la sua interazione con Bcr/Abl, è stato facile pensare che CK2 fosforilasse direttamente l'oncochinasi, ma i risultati ottenuti da saggi di fosforilazione *in vitro* non hanno dato nessun supporto a tale ipotesi. L'influenza dell'attività di CK2 nel suo meccanismo d'interazione con Bcr/Abl, quindi, rimane poco chiaro. È possibile ipotizzare che il processo d'interazione delle due chinasi possa coinvolgere altre proteine non note, che svolgono la propria azione sotto stretto controllo da parte di CK2.

L'insieme dei dati discussi fino a questo punto suggerisce che la Tyr-fosforilazione di CK2 α catalizzata da Bcr/Abl possa essere una conseguenza dell'interazione fra le due chinasi oppure un evento totalmente indipendente. Inoltre, volendo escludere la possibilità che Bcr/Abl riesca a modulare l'attività di CK2, si può ipotizzare che la funzione fisiologica della Tyr-fosforilazione di CK2 α possa essere da un lato quella di permettere delle interazioni non ancora note della chinasi o del complesso Bcr/Abl-CK2 con

alcune proteine, che presentino ad esempio un dominio SH2, dall'altro quella di modulare la localizzazione di CK2 nella cellula. In quest'ultimo caso, sono note molte evidenze secondo cui, in risposta a vari stimoli, esiste una modificazione nella localizzazione intracellulare di CK2, che causa una diversa accessibilità dei substrati alla chinasi, permettendole di agire su differenti *pathway* e potenziare la trasduzione del segnale a seconda delle esigenze della cellula (Faust M. *et al.*, 2000; Filhol O., 2009).

Il fatto che sia la Tyr-fosforilazione di CK2 α che l'interazione fra Bcr/Abl e CK2 siano rilevabili solo nelle cellule LAMA84 resistenti all'imatinib, e che l'associazione del complesso fra Bcr/Abl e CK2 possa venir meno quando si elimina per lunghi periodi l'inibitore dal terreno di coltura delle cellule LAMA84-R, fa presupporre la possibilità di un ruolo di CK2 nel meccanismo di resistenza all'imatinib sviluppato da queste cellule. Inoltre, esistono diverse evidenze in cui l'inibizione dell'attività e/o espressione di CK2 è in grado di indurre l'apoptosi e bloccare la proliferazione di svariati tipi di cellule tumorali (Wang H. *et al.*, 2001; Ruzzene M. *et al.*, 2002; Zhu D. *et al.*, 2009), in particolare anche di cellule esprimenti Bcr/Abl (Mishra S. *et al.*, 2003; Mishra S. *et al.*, 2007). L'insieme di queste considerazioni, ci ha portato a studiare l'effetto dell'inibizione di CK2 nella vitalità delle cellule LAMA84 sensibili e resistenti all'imatinib.

Nei saggi di vitalità delle cellule LAMA84-S e LAMA84-R è stato utilizzato l'inibitore CX-4945, che è particolarmente interessante poiché, a seguito della sua efficacia antitumorale sia in modelli cellulari che animali, è il primo inibitore specifico di CK2 a essere entrato nella fase I degli studi clinici sull'uomo, per la cura di tumori solidi (Siddiqui-Jain A. *et al.*, 2010). I dati ottenuti nei nostri esperimenti, mostrano che l'inibitore CX-4945 è molto efficace nel ridurre la vitalità sia delle cellule LAMA84-S che LAMA84-R. È interessante notare che le cellule resistenti, che esprimono livelli più alti di CK2, risultano essere, seppur moderatamente, più sensibili

a concentrazioni crescenti dell'inibitore CX-4945. In aggiunta, si è visto che, mentre il trattamento delle cellule resistenti con basse concentrazioni d'imatinib è inefficace, il trattamento combinato di imatinib e CX-4945 è in grado di provocare la morte delle cellule, con un'efficienza maggiore anche del solo trattamento con CX-4945. Sembra, dunque, che l'inibizione di CK2 nelle cellule LAMA84-R permetta in qualche modo di rendere tali cellule almeno parzialmente sensibili ad una concentrazione di imatinib, che singolarmente sembra inefficace.

Alla luce di questi risultati e di quelli discussi precedentemente, si può concludere che l'attività di CK2 risulta molto importante nelle cellule LAMA84 sia nella variante sensibile che in quella resistente. In queste ultime, però, CK2 pare avere un ruolo ancora più cruciale, marcato dal fatto che tali cellule non solo sovraesprimono la chinasi, ma risultano anche più sensibili al trattamento con l'inibitore CX-4945 rispetto alle cellule LAMA84-S. Inoltre, sebbene siano necessarie ulteriori analisi, si può pensare che la particolare azione di CX-4945 nelle cellule LAMA84-R, possa essere in qualche modo connessa con la capacità di tale inibitore di ridurre l'associazione di CK2 e Bcr/Abl e che l'attività di CK2 sia importante nel meccanismo di resistenza all'imatinib.

Se si analizzano le vie di segnale in cui è nota l'azione di Bcr/Abl nelle cellule leucemiche (Quintàs-Cardama A. *et al.*, 2009) e quelle in cui CK2 è coinvolto nelle cellule tumorali (Trembley G.H. *et al.*, 2009), si notano numerosi *pathways* in cui entrambe queste chinasi agiscono con il medesimo fine di inibire l'apoptosi e favorire l'aumento della proliferazione e sopravvivenza cellulare. Un esempio particolarmente interessante è rappresentato dalla via di segnale PI3K/Akt.

Nel *pathway* PI3K/Akt, Bcr/Abl si associa a Grb2, a cui poi si lega Gab2, che viene fosforilato da Bcr/Abl e lega la subunità regolatrice p85 di PI3K (Sattler M. *et al.*, 2002). In questo modo, Bcr/Abl attiva indirettamente PI3K, che a sua volta attiva Akt, scatenando una serie di segnali a cascata Akt-

dipendenti critici per la trasformazione tumorale indotta da Bcr/Abl (Skorski T. *et al.*, 1997) e che regolano la localizzazione cellulare e l'attività di diversi target come Mdm2 e la chinasi IKK (Vivanco I. *et al.*, 2002), che promuovono, rispettivamente, la degradazione del soppressore tumorale p53 (Zhou B.P. *et al.*, 2001) e la traslocazione al nucleo del fattore NF- κ B, inducendo la sintesi di proteine anti-apoptotiche (Ozes O.N. *et al.*, 1999). Il *pathway* di PI3K/Akt è anche una delle principali vie di segnale in cui CK2 è coinvolta esplicando il suo ruolo di chinasi che promuove la sopravvivenza cellulare. CK2, infatti, è in grado di aumentare l'attività di Akt sia fosforilando e destabilizzando la fosfatasi PTEN, che a sua volta inibisce la via di segnale di Akt (Torres J. *et al.*, 2003), sia fosforilando direttamente Akt in Ser129, inducendo un'iperattivazione della chinasi stessa (Di Maira G. *et al.*, 2005). Inoltre, CK2 è in grado di fosforilare direttamente Mdm2, causando la degradazione di p53 (Allende-Vega N. *et al.*, 2005). In aggiunta, CK2 può agire direttamente nella stabilizzazione di NF- κ B, aumentandone la sua attività trascrizionale, sia fosforilando direttamente la subunità p65 di NF- κ B (Chantome A. *et al.*, 2004) e sia regolando l'espressione della chinasi IKK (Eddy S.F. *et al.*, 2005).

La sovrapposizione di diversi *pathway* in cui è stata dimostrata l'azione sia di CK2 che di Bcr/Abl, indica che queste due chinasi possono cooperare nel favorire la proliferazione e la sopravvivenza delle cellule tumorali. Nel caso delle cellule LAMA84-R, la sovraespressione di Bcr/Abl induce probabilmente un incremento di segnali intracellulari nelle vie controllate dall'oncochinasi. Si può ipotizzare che il potenziamento di quei *pathway*, in cui CK2 è in sinergia con Bcr/Abl, necessiti anche un incremento dell'attività di CK2. La risposta delle cellule LAMA84-R a tale necessità potrebbe giustificare l'aumento dei livelli intracellulari di CK2 che si osserva in queste cellule.

L'attività di Bcr/Abl è legata anche alla sua stabilità, che è stato dimostrato essere dipendente dalla sua interazione con la proteina *chaperone* Hsp90 (*Heat shock protein 90*), la cui inibizione causa la degradazione di Bcr/Abl (An W.G. *et al.*, 2000). Inoltre, l'efficacia degli inibitori di Hsp90 nel bloccare la proliferazione di cellule esprimenti Bcr/Abl e nell'attenuare nei topi il fenotipo leucemico indotto da Bcr/Abl, sia nella forma *wild type* che in quella mutata, ha reso Hsp90 un nuovo target per la cura della CML, in particolare nei casi di resistenza all'imatinib legati alla mutazione T315I dell'oncochinasi (Lu Z. *et al.*, 2010; Wu L.X. *et al.*, 2008; Peng C. *et al.*, 2007; Chen Y. *et al.*, 2010). CK2 associa con Hsp90 (Miyata Y. *et al.*, 1992) ed è in grado di fosforilarla sia *in vitro* che *in vivo* e di controllarne l'attività (Lees-Miller S. P. *et al.*, 1989; Szyszka, R. *et al.*, 1989). In aggiunta, la capacità di Hsp90 di stabilizzare l'attività di varie proteinchinasi richiede l'associazione con la *co-chaperone* Cdc37 (MacLean M. *et al.*, 2003), la cui fosforilazione in Ser13 da parte di CK2 è indispensabile per indurre la formazione del complesso tra Hsp90 e le proteinchinasi da stabilizzare (Miyata Y. *et al.*, 2004). L'insieme di queste evidenze mette in luce come CK2 possa giocare un ruolo importante anche nella stabilizzazione dell'attività chinasi di Bcr/Abl nelle cellule LAMA84 e ciò spiegherebbe da una parte l'efficacia dell'inibitore CX-4945 sulla riduzione della vitalità cellulare e dall'altra la necessità di una maggiore quantità di CK2 per aumentare la fosforilazione e l'efficienza di Hsp90 nelle cellule LAMA84-R, che presentano una elevata espressione di Bcr/Abl.

Da alcuni anni è stato proposto il concetto di "*non-oncogene addiction*", che descrive il ruolo cruciale di alcune proteine di per sé non oncogeniche nel divenire un fattore limitante per la progressione del fenotipo tumorale di alcune cellule (Solimini N.L. *et al.*, 2007). Tale concetto è stato proposto anche per la proteinchinasi CK2, la cui sovraespressione in alcune cellule tumorali ne favorisce l'espansione rispetto ad altre cellule con il medesimo

fenotipo tumorale, ma con livelli di CK2 simili a quello delle cellule normali. (Ruzzene M. *et al.*, 2009).

Sebbene CK2 venga espressa sia in cellule normali che in quelle tumorali, il suo livello intracellulare e, probabilmente, i suoi substrati differiscono significativamente, suggerendo la possibilità che le cellule tumorali associno più strettamente le funzioni di CK2 ai loro *pathway* di sopravvivenza rispetto alle cellule normali, diventando così dipendenti dall'attività di CK2. A supporto di questo concetto, ci sono diverse evidenze che mostrano come il trattamento con inibitori di CK2 possa indurre una morte cellulare più elevata nelle cellule tumorali rispetto alle corrispondenti cellule normali, come ad esempio nel caso di mieloma multiplo (Piazza F.A. *et al.*, 2006), leucemia mieloide acuta (Kim J.S. *et al.*, 2007) e leucemia linfoblastica acuta di cellule T (Silve A. *et al.*, 2008). In questo quadro, è possibile inserire anche le cellule LAMA84 da noi utilizzate, in cui le cellule resistenti all'imatinib mostrano sia un'elevata espressione di CK2 che una maggior sensibilità all'inibitore CX-4945 rispetto alle cellule LAMA84-S. A ulteriore supporto della probabile dipendenza dall'attività di CK2 dei meccanismi di resistenza al farmaco in cellule LAMA84-R, si aggiunge la potenzialità di recuperare in tali cellule una certa risposta all'imatinib a seguito dell'inibizione di CK2.

L'analisi condotta sulle proteine-partner di CK2 nelle cellule LAMA84-R, tramite spettrometria di massa, ha permesso di individuare anche due nuovi substrati della chinasi che co-immunoprecipitano con essa: le subunità be j del fattore d'inizio della traduzione eIF3. Si è, inoltre, identificato il sito di eIF3j fosforilato da CK2: la Ser127, che, come atteso, è localizzata in una sequenza amminoacidica corrispondente al motivo consenso di fosforilazione per CK2.

In letteratura le uniche evidenze di fosforilazione di eIF3 di mammifero da parte di CK2 risalgono ad un limitato numero di dati pubblicati alla fine degli anni settanta. In questi esperimenti, condotti su proteine purificate da

estratti di reticolociti di coniglio, è stata messa in evidenza la capacità di CK2, allora definita casein-chinasi, di fosforilare *in vitro* alcuni polipeptidi del fattore di sintesi proteica IF-E3 (Issinger O.G. et al., 1976). Da quel momento, però, non si sono aggiunte evidenze che associno specificamente CK2 alla fosforilazione di determinate subunità del complesso eIF3, in particolare di quello umano, quindi possiamo considerare eIF3j ed eIF3b come nuovi substrati della chinasi.

Il significato funzionale della fosforilazione di eIF3j ed eIF3b da parte di CK2 non sono noti e necessitano, ovviamente, di ulteriori analisi. Sono svariate, però, le evidenze che dimostrano come la fosforilazione di diversi fattori d'inizio della traduzione (eIF2, eIF3, eIF4B, eIF4G, eIF5, eIF5B) catalizzata da diverse proteinchinasi permette di regolare la loro attività di sintesi delle proteine (Mahoney S.J. et al., 2009).

Recentemente, è stato dimostrato che nelle piante la fosforilazione degli eIF, in particolare di eIF5, da parte di CK2 stimola l'interazione *in vitro* dei componenti del complesso multifattoriare nella fase iniziale della traduzione (Dennis M.D. et al., 2009).

Esistono evidenze anche sulla funzione di CK2 nella regolazione di alcuni eIF di mammifero. Infatti, da tempo è nota la capacità del fattore eIF2 β umano di associare, tramite la sua porzione N-terminale, a CK2. L'estremità N-terminale di eIF2 β è fondamentale per la sua attività nell'inizio della traduzione ed è stato dimostrato che anche la fosforilazione in questa regione dei residui Ser2 e Ser67 da parte di CK2 è richiesta per la funzione di tale fattore (Llorens F. et al., 2003; Llorens F. et al., 2006). Inoltre, è stata dimostrata la capacità di CK2 di fosforilare sia *in vitro* che *in vivo* il fattore eucariotico d'inizio della traduzione 5 umano (eIF5), indicando tale proteina come un probabile substrato fisiologico della chinasi. In particolare, è stata descritta la capacità di CK2 di associare e fosforilare eIF5, per favorire la progressione del ciclo cellulare dalla fase S alla fase M. La chinasi fosforila

eIF5 in 4 residui (Ser389, Ser390, SThr207, Thr208) e tale fosforilazione è risultata fondamentale per la funzione di eIF5 nella formazione del complesso multifattoriale con gli altri eIF durante la fase d'inizio della traduzione (Homma M.K. *et al.*, 2009).

Le evidenze sulla regolazione di eIF2 β e di eIF5 da parte di CK2 indicano che la chinasi può avere un ruolo nel controllo della sintesi proteica, mediante il quale può eseguire il suo compito nella regolazione della progressione del ciclo cellulare (descritta nella sezione 2.2 dell'introduzione). Inoltre, la già nota interazione di eIF3 sia con eIF2 che con eIF5 nell'inizio della traduzione (descritta nella sezione 3.2.2 dell'introduzione) e la co-immunoprecipitazione da noi osservata di eIF3j e di eIF3b con CK2, porta a pensare che queste subunità possano essere dei substrati della chinasi anche *in vivo* e che la loro fosforilazione da parte di CK2, probabilmente nei siti da noi indicati, possa essere un'ulteriore via di controllo della traduzione da parte della chinasi. A supporto di questa ipotesi ci sono le analisi di fosfoproteomica condotte per lo studio in cellule umane dei siti di fosforilazione indotti in eIF3 ed altre proteine durante il ciclo cellulare. Questi studi dimostrano che molti residui delle subunità di eIF3 vengono fosforilati, fra cui anche la Ser127 di eIF3j da noi identificata, e che tali siti sono localizzati in sequenze amminoacidiche simili a quella consenso per la fosforilazione di CK2 (Olsen J.V. *et al.*, 2006; Damoc E. *et al.*, 2007; Dephoure N. *et al.*, 2008).

CONCLUSIONI

La leucemia mieloide cronica (CML) è una patologia la cui insorgenza e progressione sono strettamente legata alla proteina di fusione Bcr/Abl ed alla sua attività tirosinchinasica costitutivamente attiva. L'inibizione di tale chinasi mediante l'inibitore specifico imatinib è da anni la terapia standard per questa patologia. Nel tempo si sono manifestati sempre più casi di resistenza all'imatinib, che hanno spinto a caratterizzare i meccanismi di tale fenomeno alla ricerca di terapie alternative. Vari studi hanno messo in evidenza che l'azione di altre proteine cellulari, come ad esempio Hsp90 o le Src chinasi, ricopre un ruolo molto importante per il mantenimento del fenotipo tumorale delle cellule leucemiche, in particolare negli stadi avanzati della CML o nel caso di pazienti resistenti all'imatinib. Infatti, ci sono numerosi lavori in cui viene messa in evidenza la potenzialità di inibitori per proteine diverse da Bcr/Abl nell'arrestare la crescita delle cellule tumorali che presentano l'oncochinasi, indicando come tali proteine possono essere target per la cura della malattia. Inoltre, alcuni inibitori di ultima generazione che vengono usati (ad es. Dasatinib) o sono in fase di studio clinico (ad es. Bosutinib) per la terapia dei pazienti resistenti al trattamento con imatinib, che rappresenta la terapia primaria di questa patologia, sono in grado di inibire in modo duale sia Bcr/Abl che molte Src chinasi.

La proteinchinasi CK2 è un Ser/Thr chinasi costitutivamente attiva, che risulta sovraespressa in tutti i tumori sino ad ora esaminati, in cui svolge un forte ruolo anti-apoptico a livello cellulare. In questo lavoro di tesi si è studiato il possibile coinvolgimento di CK2 nella leucemia mieloide cronica, in particolare analizzando la linea cellulare LAMA84 nelle varianti sensibile e resistente all'imatinib.

I risultati ottenuti hanno messo in evidenza che nelle cellule resistenti all'imatinib (LAMA84-R), caratterizzate da una sovraespressione di Bcr/Abl, è presente una sovraespressione sia della subunità catalitica α che regolatoria β di CK2 rispetto alla linea parentale sensibile. Inoltre, tale chinasi risulta interagire con Bcr/Abl solo nelle LAMA84-R, cellule in cui è stata anche rilevata la presenza di CK2 α Tyr-fosforilata molto probabilmente tramite catalisi da parte di Bcr/Abl. Sebbene il ruolo della Tyr-fosforilazione di CK2 non sia chiaro, si è visto che certamente questo fenomeno non risulta implicato nel meccanismo di interazione fra CK2 e Bcr/Abl, che invece è condizionato dall'attività chinastica di CK2.

L'inibizione di CK2 mediante l'inibitore specifico CX-4945 provoca un calo consistente nella vitalità sia delle cellule sensibili che resistenti all'imatinib, anche se queste ultime risultano leggermente più sensibili all'inibitore. L'inibizione dell'attività di CK2 da parte di CX-4945 rende, inoltre, le cellule LAMA84-R sensibili a concentrazioni di imatinib a cui tali cellule sono normalmente insensibili.

Sebbene molti aspetti necessitano di ulteriori approfondimenti, dall'insieme di questi dati si può pensare che la proteinchinasi CK2 giochi, come in altre patologie tumorali, un ruolo importante nel fenotipo tumorale delle cellule LAMA84. In particolare, è possibile ipotizzare che da un lato CK2 sia in grado di cooperare con Bcr/Abl nel controllo di diverse vie del segnale che sostengono la proliferazione e sopravvivenza delle cellule leucemiche, da un altro la sovraespressione di CK2 e la sua associazione con Bcr/Abl nelle cellule LAMA84-R possano essere importanti nel sostenere alcuni *pathway* indotti dalla sovraespressione di Bcr/Abl e coinvolti nella resistenza all'imatinib.

Alla luce di queste considerazioni, è particolarmente interessante chiarire i meccanismi in cui CK2 è coinvolta in questa patologia, in modo tale da

capire se, come per alcuni tipi di tumori solidi, la chinasi possa essere un target aggiuntivo per lo studio di terapie combinate contro tale patologia.

Il lavoro di questa tesi ha messo in evidenza, inoltre, la capacità di CK2 di interagire con il complesso d'inizio della traduzione eIF3, importante nel controllo della sintesi proteica, e di fosforilare *in vitro* le due subunità b e j.

Le evidenze, già note, in cui si è visto che CK2 fosforila e, quindi, regola i fattori eIF2 β e eIF5, che si associano a eIF3 nella fase d'inizio della traduzione, suggeriscono che la fosforilazione di eIF3 da parte di CK2 possa costituire un ulteriore meccanismo tramite il quale la chinasi può agire sulla vitalità della cellula, controllandone la sintesi proteica.

BIBLIOGRAFIA

- Abram CL, Courtneidge SA. Src family tyrosine kinases and growth factor signaling. *Exp Cell Res.* 2000;254(1):1-13.
- Ahmad KA, Wang G, Unger G, Slaton J, Ahmed K. Protein kinase CK2--a key suppressor of apoptosis. *Adv. Enzyme Regul.* 2008;48:179-187.
- Allende JE, Allende CC. Protein kinases. 4. Protein kinase CK2: an enzyme with multiple substrates and a puzzling regulation. *FASEB J.* 1995;9(5):313-323.
- Allende-Vega N, Dias S, Milne D, Meek D. Phosphorylation of the acidic domain of Mdm2 by protein kinase CK2. *Mol. Cell. Biochem.* 2005;274(1-2):85-90.
- Apperley, JF, Gardembas, M, Melo, JV, Russell-Jones, R, Bain, BJ, Baxter, EJ, et al. Response to imatinib mesylate in patients with chronic myeloproliferative diseases with rearrangements of the platelet-derived growth factor receptor beta. *N. Engl. J. Med.* 2002; 347:481-487..
- Apperley, JF. Part II: Management of resistance to imatinib in chronic myeloid leukaemia. *Lancet Oncol.* 2007; 8:1116-1128.
- Baccarani, M, Saglio, G, Goldman, J, Hochhaus, A, Simonsson, B, Appelbaum, F, et al. Evolving concepts in the management of chronic myeloid leukemia: recommendations from an expert panel on behalf of the European LeukemiaNet. *Blood.* 2006; 108:1809-1820.
- Bartram CR, de Klein A, Hagemeijer A, et al. Translocation of c-ab1 oncogene correlates with the presence of a Philadelphia chromosome in chronic myelocytic leukaemia. *Nature.* 1983;306(5940):277-280.
- Bartram CR, Kleihauer E, de Klein A, et al. C-abl and bcr are rearranged in a Ph1-negative CML patient. *EMBO J.* 1985;4(3):683-686.
- Berger U, Maywald O, Pfirrmann M, et al. Gender aspects in chronic myeloid leukemia: long-term results from randomized studies. *Leukemia.* 2005;19(6):984-989.
- Block K, Boyer TG, Yew PR. Phosphorylation of the human ubiquitin-conjugating enzyme, CDC34, by casein kinase 2. *J. Biol. Chem.* 2001;276(44):41049-41058.
- Bodenbach L, Fauss J, Robitzki A, et al. Recombinant human casein kinase II. A study with the complete set of subunits (alpha, alpha' and beta), site-directed autophosphorylation mutants and a bicistronically expressed holoenzyme. *Eur. J. Biochem.* 1994;220(1):263-273.
- Boldyreff B., James P., Staudenmann, W. and Issinger, O.G. Ser2 is the autophosphorylation site in the beta subunit from bicistronically expressed human casein kinase 2 and from native rat liver casein kinase2beta. *Eur. J. Biochem.* 1993;218:515-521
- Bosc DG, Slominski E, Sichler C, Litchfield DW. Phosphorylation of casein kinase II by p34cdc2. Identification of phosphorylation sites using phosphorylation site mutants in vitro. *J. Biol. Chem.* 1995;270(43):25872-25878.
- Bousset K, Oelgeschläger MH, Henriksson M, et al. Regulation of transcription factors c-

Myc, Max, and c-Myb by casein kinase II. *Cell. Mol. Biol. Res.* 1994;40(5-6):501-511.

Branford S, Rudzki Z, Walsh S, Parkinson I, Grigg A, Szer J, et al. Detection of BCR-ABL mutations in patients with CML treated with imatinib is virtually always accompanied by clinical resistance, and mutations in the ATP phosphate-binding loop (P-loop) are associated with a poor prognosis. *Blood.* 2003 Jul 1;102(1):276-83

Brasher BB, Van Etten RA. c-Abl has high intrinsic tyrosine kinase activity that is stimulated by mutation of the Src homology 3 domain and by autophosphorylation at two distinct regulatory tyrosines. *J. Biol. Chem.* 2000;275(45):35631-35637.

Bruns I, Czibere A, Fischer JC, et al. The hematopoietic stem cell in chronic phase CML is characterized by a transcriptional profile resembling normal myeloid progenitor cells and reflecting loss of quiescence. *Leukemia.* 2009;23(5):892-899.

Buchou T, Vernet M, Blond O, et al. Disruption of the regulatory beta subunit of protein kinase CK2 in mice leads to a cell-autonomous defect and early embryonic lethality. *Mol. Cell. Biol.* 2003;23(3):908-915.

Buchdunger, E, Cioffi, CL, Law, N, Stover, D, Ohno-Jones, S, Druker, BJ, et al. Abl protein-tyrosine kinase inhibitor STI571 inhibits in vitro signal transduction mediated by c-kit and platelet-derived growth factor receptors. *J Pharmacol Exp Ther.* 2000; 295:139-145.

Burnett G, Kennedy EP. The enzymatic phosphorylation on protein. *J Biol Chem.* 1954;211(2):969-80

Cardenas ME, Dang Q, Glover CV, Gasser SM. Casein kinase II phosphorylates the eukaryote-specific C-terminal domain of topoisomerase II in vivo. *EMBO J.* 1992;11(5):1785-1796.

Carter TA, Wodicka LM, Shah NP, Velasco AM, Fabian MA, Treiber DK, et al. Inhibition of drug-resistant mutants of ABL, KIT, and EGF receptor kinases. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005 Aug 2;102(31):11011-6.

Channavajhala P, Seldin DC. Functional interaction of protein kinase CK2 and c-Myc in lymphomagenesis. *Oncogene.* 2002;21(34):5280-5288.

Chantalat L, Leroy D, Filhol O, et al. Crystallization and preliminary x-ray diffraction analysis of the regulatory subunit of human protein kinase CK2. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 1999;55(Pt 4):895-897.

Chen R., Kim O., Yang J., Sato K., Eisenmann K.M., McCarthy J., Chen, H., Qiu, Y. Regulation of Akt/PKB activation by tyrosine phosphorylation. *J Biol Chem.*;2001;276:31858-62.

Cools, J, DeAngelo, DJ, Gotlib, J, Stover, EH, Legare, RD, Cortes, J, et al. A tyrosine kinase created by fusion of the PDGFRA and FIP1L1 genes as a therapeutic target of imatinib in idiopathic hypereosinophilic syndrome. *N. Engl. J. Med.* 2003; 348:1201-1214.

Cortes J, O'Dwyer ME. Clonal evolution in chronic myelogenous leukemia. *Hematol Oncol Clin North Am.* 2004 Jun;18(3):671-84.

Cortes, J, Rousselot, P, Kim, D-W, Ritchie, E, Hamerschlak, N, Coutre, S, et al. Dasatinib induces complete hematologic and cytogenetic responses in patients with imatinib-resistant or -intolerant chronic myeloid leukemia in blast crisis. *Blood*. 2007; 109:3207-3213.

Cross NC, Daley GQ, Green AR, et al. BCR-ABL1-positive CML and BCR-ABL1-negative chronic myeloproliferative disorders: some common and contrasting features. *Leukemia*. 2008;22(11):1975-1989.

Crossman LC, Druker BJ, Deininger MW, et al. hOCT 1 and resistance to imatinib. *Blood*. 2005;106(3):1133-1134

Dai H, Marbach P, Lemaire M, Hayes M, Elmquist WF. Distribution of STI-571 to the brain is limited by P-glycoprotein-mediated efflux. *J Pharmacol Exp Ther*. 2003 Mar;304(3):1085-92.

Daley GQ, Van Etten RA, Baltimore D. Induction of chronic myelogenous leukemia in mice by the P210bcr/abl gene of the Philadelphia chromosome. *Science*. 1990;247(4944):824-830.

Daub, H, Specht, K, Ullrich, A. Strategies to overcome resistance to targeted protein kinase inhibitors. *Nat Rev Drug Discov*. 2004; 3:1001-1010.

Danhauser-Riedl S, Warmuth M, Druker BJ, et al. Activation of Src kinases p53/56lyn and p59hck by p210bcr/abl in myeloid cells. *Cancer Res*.1996;56(1):3589-3596.

Deininger, MW, Goldman, JM, Lydon, N, Melo, JV. The tyrosine kinase inhibitor CGP57148B selectively inhibits the growth of BCR-ABL-positive cells. *Blood*. 1997; 90:3691-3698.

Deininger MW, Goldman JM, Melo JV. The molecular biology of chronic myeloid leukemia. *Blood*. 2000;96(10):3343-3356.

Desagher S, Osen-Sand A, Montessuit S, et al. Phosphorylation of bid by casein kinases I and II regulates its cleavage by caspase 8. *Mol. Cell*. 2001;8(3):601-611.

Dhut S, Dorey EL, Horton MA, Ganesan TS, Young BD. Identification of two normal bcr gene products in the cytoplasm. *Oncogene*. 1988;3(5):561-566.

Diekmann D, Brill S, Garrett MD, et al. Bcr encodes a GTPase-activating protein for p21rac. *Nature*. 1991;351(6325):400-402.

Di Maira G, Salvi M, Arrigoni G, et al. Protein kinase CK2 phosphorylates and upregulates Akt/PKB. *Cell Death Differ*. 2005;12(6):668-677.

Di Maira G, Brustolon F, Bertacchini J, et al. Pharmacological inhibition of protein kinase CK2 reverts the multidrug resistance phenotype of a CEM cell line characterized by high CK2 level. *Oncogene*. 2007;26(48):6915-6926.

Dorey K, Engen JR, Kretzschmar J, et al. Phosphorylation and structure-based functional studies reveal a positive and a negative role for the activation loop of the c-Abl tyrosine kinase. *Oncogene*. 2001;20(56):8075-8084.

Donato NJ, Wu JY, Stapley J, et al. BCR-ABL independence and LYN kinase overexpression in chronic myelogenous leukemia cells selected for resistance to STI571. *Blood*. 2003;101(2):690-698.

Donato NJ, Wu JY, Stapley J, et al. Imatinib mesylate resistance through BCR-ABL independence in chronic myelogenous leukemia. *Cancer Res*. 2004;64(2):672-677.

Donella-Deana A, Cesaro L, Sarno S, et al. Autocatalytic tyrosine-phosphorylation of protein kinase CK2 alpha and alpha' subunits: implication of Tyr182. *Biochem. J*. 2001;357(Pt 2):563-567.

Druker BJ, Tamura S, Buchdunger E, Ohno S, Segal GM, Fanning S, Zimmermann J, Lydon NB: Effects of a selective inhibitor of the Abl tyrosine kinase on the growth of Bcr-Abl positive cells. *Nat. Med*. 1996;2:561-566.

Druker BJ, Talpaz M, Resta DJ, Peng B, Buchdunger E, Ford JM, Lydon NB, Kantarjian H, Capdeville R, Ohno-Jones S, Sawyers CL. Efficacy and safety of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in chronic myeloid leukemia. *N. Engl. J. Med* . 2001;344: 1031-1037.

Druker, BJ, Guilhot, F, O'Brien S, G, Gathmann, I, Kantarjian, H, Gattermann, N, et al. Five-Year Follow-up of Patients Receiving Imatinib for Chronic Myeloid Leukemia. *N. Engl. J. Med*. 2006; 55:2408-2417.

Eddy SF, Guo S, Demicco EG, et al. Inducible I kappa B kinase/I kappa B kinase epsilon expression is induced by CK2 and promotes aberrant nuclear factor-kappa B activation in breast cancer cells. *Cancer Res*. 2005;65(24):11375-11383

Ernst, T, Erben, P, Muller, MC, Paschka, P, Schenk, T, Hoffmann, J, et al. Dynamics of BCR-ABL mutated clones prior to hematologic or cytogenetic resistance to imatinib. *Haematologica*. 2008; 93:186-192.

Escalier D, Silvius D, Xu X. Spermatogenesis of mice lacking CK2alpha': failure of germ cell survival and characteristic modifications of the spermatid nucleus. *Mol. Reprod. Dev*. 2003;66(2):190-201.

Faderl S, Kantarjian HM, Talpaz M. Chronic myelogenous leukemia: update on biology and treatment. *Oncology (Williston Park, N.Y.)*. 1999;13(2):169-180; discussion 181, 184.

Faderl S, Kurzrock R, Estrov Z. Minimal residual disease in hematologic disorders. *Arch. Pathol. Lab. Med*. 1999;123(11):1030-1034.

Faust M, Schuster N, Montenarh M. Specific binding of protein kinase CK2 catalytic subunits to tubulin. *FEBS Lett*. 1999;462(1-2):51-56.

Faust M, Kartarius S, Schwindling SL, Montenarh M. Cyclin H is a new binding partner for protein kinase CK2. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 2002;296(1):13-19.

Ferrao PT, Frost MJ, Siah SP, et al. Overexpression of P-glycoprotein in K562 cells does not confer resistance to the growth inhibitory effects of imatinib (STI571) in vitro. *Blood*. 2003;102(13):4499-4503.

Fialkow PJ., Jacobson RJ., Papayannopoulou Chronic myelocytic leukemia: clonal origin in a stem cell common to the granulocyte, erythrocyte, platelet and monocyte/macrophage malignancies. *Am. J. Med.* 1977;63(1):125-30.

Ford HL, Landesman-Bollag E, Dacwag CS, et al. Cell cycle-regulated phosphorylation of the human SIX1 homeodomain protein. *J. Biol. Chem.* 2000;275(29):22245-22254.

Fugazza G, Garuti A, Marchelli S, et al. Masked Philadelphia chromosome due to atypical BCR/ABL localization on the 9q34 band and duplication of the der(9) in a case of chronic myelogenous leukemia. *Cancer Genet. Cytogenet.* 2005;163(2):173-175.

Gambacorti-Passerini, C, le Coutre, P, Mologni, L, Fanelli, M, Bertazzoli, C, Marchesi, E, et al. Inhibition of the ABL kinase activity blocks the proliferation of BCR/ABL+ leukemic cells and induces apoptosis. *Blood Cells Mol Dis.* 1997; 23:380-394.

Glover CV. On the physiological role of casein kinase II in *Saccharomyces cerevisiae*. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 1998;59:95-133.

Gordon MY, Dowding CR, Riley GP, Goldman JM, Greaves MF. Altered adhesive interactions with marrow stroma of haematopoietic progenitor cells in chronic myeloid leukaemia. *Nature.* 1987;328(6128):342-344.

Gorre, ME, Mohammed, M, Ellwood, K, Hsu, N, Paquette, R, Rao, PN, et al. Clinical resistance to STI-571 cancer therapy caused by BCR-ABL gene mutation or amplification. *Science.* 2001; 293:876-880.

Graham KC, Litchfield DW. The regulatory beta subunit of protein kinase CK2 mediates formation of tetrameric CK2 complexes. *J. Biol. Chem.* 2000;275(7):5003-5010.

Groffen J, Heisterkamp NC. Philadelphia chromosome translocation. *Crit Rev Oncog.* 1989;1(1):53-64.

Groffen J, Stephenson JR, Heisterkamp N, et al. Philadelphia chromosomal breakpoints are clustered within a limited region, bcr, on chromosome 22. *Cell.* 1984;36(1):93-99.

Guerra B, Issinger OG. Protein kinase CK2 and its role in cellular proliferation, development and pathology. *Electrophoresis.* 1999;20(2):391-408.

Guerra B, Issinger O, Wang JYJ. Modulation of human checkpoint kinase Chk1 by the regulatory beta-subunit of protein kinase CK2. *Oncogene.* 2003;22(32):4933-4942.

Guerra B, Issinger O. Protein kinase CK2 in human diseases. *Curr. Med. Chem.* 2008;15(19):1870-1886.

Guo F, Okamoto M, Crawford NM. Identification of a plant nitric oxide synthase gene involved in hormonal signaling. *Science.* 2003;302(5642):100-103.

Hanna DE, Rethinaswamy A, Glover CV. Casein kinase II is required for cell cycle progression during G1 and G2/M in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 1995;270(43):25905-25914.

Hanks SK, Quinn AM. Protein kinase catalytic domain sequence database: identification of conserved features of primary structure and classification of family members. *Meth.*

Enzymol. 1991;200:38-62.

Hanks SK, Hunter T. Protein kinases 6. The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification. *FASEB J.* 1995;9(8):576-596.

Hantschel O, Nagar B, Guettler S, et al. A myristoyl/phosphotyrosine switch regulates c-Abl. *Cell.* 2003;112(6):845-857.

Hehlmann R, Hochhaus A, Baccarani M. Chronic myeloid leukaemia. *Lancet.* 2007;370(9584):342-350.

Heinrich, MC, Griffith, DJ, Druker, BJ, Wait, CL, Ott, KA, Zigler, AJ. Inhibition of c-kit receptor tyrosine kinase activity by STI 571, a selective tyrosine kinase inhibitor. *Blood.* 2000;96:925-932.

Hermans A, Heisterkamp N, von Linden M, et al. Unique fusion of bcr and c-abl genes in Philadelphia chromosome positive acute lymphoblastic leukemia. *Cell.* 1987;51(1):33-40.

Hochhaus, A, Kreil, S, Corbin, AS, La Rosee, P, Muller, MC, Lahaye, T, et al. Molecular and chromosomal mechanisms of resistance to imatinib (STI571) therapy. *Leukemia.* 2002; 16:2190-2196.

Hochhaus, A, Druker, BJ, Larson, RA, O'Brien, SG, Gathmann, I, Guilhot, F. IRIS 6-Year Follow-Up: Sustained Survival and Declining Annual Rate of Transformation in Patients with Newly Diagnosed Chronic Myeloid Leukemia in Chronic Phase (CML-CP) Treated with Imatinib. Abstract. The American Society of Hematology 2007 Annual Meeting. Atlanta, Georgia, USA: *Blood* 2007; 110:25.

Hochhaus A, Schenk T, Erben P, et al. Cause and management of therapy resistance. *Best Pract Res Clin Haematol.* 2009;22(3):367-379.

Hofmann WK, de Vos S, Elashoff D, et al. Relation between resistance of Philadelphia-chromosome-positive acute lymphoblastic leukaemia to the tyrosine kinase inhibitor STI571 and gene-expression profiles: a gene-expression study. *Lancet.* 2002;359(9305):481-486.

Homma MK, Wada I, Suzuki T, et al. CK2 phosphorylation of eukaryotic translation initiation factor 5 potentiates cell cycle progression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2005;102(43):15688-15693.

Horita M, Andreu EJ, Benito A, et al. Blockade of the Bcr-Abl kinase activity induces apoptosis of chronic myelogenous leukemia cells by suppressing signal transducer and activator of transcription 5-dependent expression of Bcl-xL. *J. Exp. Med.* 2000;191(6):977-984.

Hughes T, Deininger M, Hochhaus A, et al. Monitoring CML patients responding to treatment with tyrosine kinase inhibitors: review and recommendations for harmonizing current methodology for detecting BCR-ABL transcripts and kinase domain mutations and for expressing results. *Blood.* 2006;108(1):28-37.

Hughes, T, Saglio, G, Martinelli, G, Kim, D-W, Soverini, S, Mueller, M, et al. Responses and Disease Progression in CML-CP Patients Treated with Nilotinib after Imatinib Failure Appear To Be Affected by the BCR-ABL Mutation Status and Types. Abstract. The

- American Society of Hematology 2007 Annual Meeting. Atlanta, Georgia, USA: *Blood* 2007; 110:320.
- Huret JL. Complex translocations, simple variant translocations and Ph-negative cases in chronic myelogenous leukaemia. *Hum. Genet.* 1990;85(6):565-568.
- Issinger OG. Casein kinases: pleiotropic mediators of cellular regulation. *Pharmacol. Ther.* 1993;59(1):1-30.
- Izeradjene K, Douglas L, Delaney A, Houghton JA. Influence of casein kinase II in tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis in human rhabdomyosarcoma cells. *Clin. Cancer Res.* 2004;10(19):6650-6660.
- Jabbour E, Kantarjian H, Jones D, et al. Frequency and clinical significance of BCR-ABL mutations in patients with chronic myeloid leukemia treated with imatinib mesylate. *Leukemia.* 2006;20(10):1767-1773.
- Jackson RJ, Hellen CUT, Pestova TV. The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2010;11(2):113-127.
- Joensuu H, Roberts PJ, Sarlomo-Rikala M, et al. Effect of the tyrosine kinase inhibitor STI571 in a patient with a metastatic gastrointestinal stromal tumor. *N. Engl. J. Med.* 2001;344(14):1052-1056.
- Kantarjian H, Sawyers C, Hochhaus A, Guilhot F, Schiffer C, Gambacorti-Passerini C, et al. Hematologic and cytogenetic responses to imatinib mesylate in chronic myelogenous leukemia. *N. Engl. J. Med.* 2002 Feb 28;346(9):645-52.
- Keller DM, Lu H. p53 serine 392 phosphorylation increases after UV through induction of the assembly of the CK2.hSPT16.SSRP1 complex. *J. Biol. Chem.* 2002;277(51):50206-50213.
- Kelliher MA, Seldin DC, Leder P. Tal-1 induces T cell acute lymphoblastic leukemia accelerated by casein kinase IIalpha. *EMBO J.* 1996;15(19):5160-5166.
- Khorashad JS, Anand M, Marin D, et al. The presence of a BCR-ABL mutant allele in CML does not always explain clinical resistance to imatinib. *Leukemia.* 2006;20(4):658-663.
- Kim JS, Eom JI, Cheong J, et al. Protein kinase CK2alpha as an unfavorable prognostic marker and novel therapeutic target in acute myeloid leukemia. *Clin. Cancer Res.* 2007;13(3):1019-1028.
- King RW, Deshaies RJ, Peters JM, Kirschner MW. How proteolysis drives the cell cycle. *Science.* 1996;274(5293):1652-1659.
- Komar AA, Hatzoglou M. Internal ribosome entry sites in cellular mRNAs: mystery of their existence. *J. Biol. Chem.* 2005;280(25):23425-23428.
- Kozak M. A second look at cellular mRNA sequences said to function as internal ribosome entry sites. *Nucleic Acids Res.* 2005;33(20):6593-6602.
- Krek W, Maridor G, Nigg EA. Casein kinase II is a predominantly nuclear enzyme. *J. Cell Biol.* 1992;116(1):43-55.

- Krippner-Heidenreich A, Talanian RV, Sekul R, et al. 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.* 2001;358(Pt 3):705-715.
- Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970;227(5259):680-685.
- Lallemand-Breitenbach V, de Thé H. PML nuclear bodies. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2010;2(5):a000661.
- Laramas M, Pasquier D, Filhol O, et al. Nuclear localization of protein kinase CK2 catalytic subunit (CK2alpha) is associated with poor prognostic factors in human prostate cancer. *Eur. J. Cancer.* 2007;43(5):928-934.
- Laurent E, Talpaz M, Wetzler M, Kurzrock R. Cytoplasmic and nuclear localization of the 130 and 160 kDa Bcr proteins. *Leukemia.* 2000;14(11):1892-1897.
- Lazaris-Karatzas A, Montine KS, Sonenberg N. Malignant transformation by a eukaryotic initiation factor subunit that binds to mRNA 5' cap. *Nature.* 1990;345(6275):544-547.
- le Coutre P, Tassi E, Varella-Garcia M, et al. Induction of resistance to the Abelson inhibitor STI571 in human leukemic cells through gene amplification. *Blood.* 2000;95(5):1758-1766.
- le Coutre, P, Ottmann, OG, Giles, F, Kim, DW, Cortes, J, Gattermann, N, et al. Nilotinib (formerly AMN107), a highly selective BCR-ABL tyrosine kinase inhibitor, is active in patients with imatinib-resistant or -intolerant accelerated-phase chronic myelogenous leukemia. *Blood.* 2008; 111:1834-1839.
- Leonard, GD, Fojo, T, Bates, SE. The Role of ABC Transporters in Clinical Practice. *Oncologist.* 2003; 8:411-424.
- Leroy D, Filhol O, Delcros JG, et al. Chemical features of the protein kinase CK2 polyamine binding site. *Biochemistry.* 1997;36(6):1242-1250.
- Li P, Li J, Müller E, et al. Phosphorylation by protein kinase CK2: a signaling switch for the caspase-inhibiting protein ARC. *Mol. Cell.* 2002;10(2):247-258.
- Lin A, Frost J, Deng T, et al. Casein kinase II is a negative regulator of c-Jun DNA binding and AP-1 activity. *Cell.* 1992;70(5):777-789.
- Litchfield DW, Lozeman FJ, Cicirelli MF, et al. Phosphorylation of the beta subunit of casein kinase II in human A431 cells. Identification of the autophosphorylation site and a site phosphorylated by p34cdc2. *J. Biol. Chem.* 1991;266(30):20380-20389.
- Litchfield DW, Lüscher B, Lozeman FJ, Eisenman RN, Krebs EG. Phosphorylation of casein kinase II by p34cdc2 in vitro and at mitosis. *J. Biol. Chem.* 1992;267(20):13943-13951.
- Litchfield DW, Lüscher B. Casein kinase II in signal transduction and cell cycle regulation. *Mol. Cell. Biochem.* 1993;127-128:187-199.
- Litchfield DW, Dobrowolska G, Krebs EG. Regulation of casein kinase II by growth factors:

a reevaluation. *Cell. Mol. Biol. Res.* 1994;40(5-6):373-381.

Llorens F, Roher N, Miró FA, et al. Eukaryotic translation-initiation factor eIF2beta binds to protein kinase CK2: effects on CK2alpha activity. *Biochem. J.* 2003;375(Pt 3):623-631.

Llorens F, Duarri A, Sarró E, et al. The N-terminal domain of the human eIF2beta subunit and the CK2 phosphorylation sites are required for its function. *Biochem. J.* 2006;394(Pt 1):227-236.

Lolli G, Johnson LN. CAK-Cyclin-dependent Activating Kinase: a key kinase in cell cycle control and a target for drugs? *Cell Cycle.* 2005;4(4):572-577.

Lorenz P, Pepperkok R, Ansorge W, Pyerin W. Cell biological studies with monoclonal and polyclonal antibodies against human casein kinase II subunit beta demonstrate participation of the kinase in mitogenic signaling. *J. Biol. Chem.* 1993;268(4):2733-2739.

Lou DY, Dominguez I, Toselli P, et al. The alpha catalytic subunit of protein kinase CK2 is required for mouse embryonic development. *Mol. Cell. Biol.* 2008;28(1):131-139.

Lozeman FJ, Litchfield DW, Piening C, et al. Isolation and characterization of human cDNA clones encoding the alpha and the alpha' subunits of casein kinase II. *Biochemistry.* 1990;29(36):8436-8447.

Lugo TG, Pendergast AM, Muller AJ, Witte ON. Tyrosine kinase activity and transformation potency of bcr-abl oncogene products. *Science.* 1990;247(4946):1079-1082.

MacLean M, Picard D. Cdc37 goes beyond Hsp90 and kinases. *Cell Stress Chaperones.* 2003;8(2):114-119.

Mahon FX, Deininger MW, Schultheis B, et al. Selection and characterization of BCR-ABL positive cell lines with differential sensitivity to the tyrosine kinase inhibitor STI571: diverse mechanisms of resistance. *Blood.* 2000;96(3):1070-1079.

Mahon F, Belloc F, Lagarde V, et al. MDR1 gene overexpression confers resistance to imatinib mesylate in leukemia cell line models. *Blood.* 2003;101(6):2368-2373.

Mahoney SJ, Dempsey JM, Blenis J. Chapter 2 cell signaling in protein synthesis ribosome biogenesis and translation initiation and elongation. *Prog Mol Biol Transl Sci.* 2009;90:53-107.

Marin O, Meggio F, Pinna LA. Design and synthesis of two new peptide substrates for the specific and sensitive monitoring of casein kinases-1 and -2. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1994;198(3):898-905.

Marin O, Meggio F, Sarno S, et al. Tyrosine versus serine/threonine phosphorylation by protein kinase casein kinase-2. A study with peptide substrates derived from immunophilin Fpr3. *J. Biol. Chem.* 1999;274(41):29260-29265.

Martel V, Filhol O, Nueda A, Cochet C. Dynamic localization/association of protein kinase CK2 subunits in living cells: a role in its cellular regulation? *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2002;973:272-277.

Martin PJ, Najfeld V, Hansen JA, et al. Involvement of the B-lymphoid system in chronic

myelogenous leukaemia. *Nature*. 1980;287(5777):49-50.

McDonnell MA, Abedin MJ, Melendez M, et al. Phosphorylation of murine caspase-9 by the protein kinase casein kinase 2 regulates its cleavage by caspase-8. *J. Biol. Chem.* 2008;283(29):20149-20158.

Meggio F, Boldyreff B, Issinger OG, Piñna LA. Casein kinase 2 down-regulation and activation by polybasic peptides are mediated by acidic residues in the 55-64 region of the beta-subunit. A study with calmodulin as phosphorylatable substrate. *Biochemistry*. 1994;33(14):4336-4342.

Meggio F and Pinna LA. One-thousand-and-one substrates of protein kinase CK2? *FASEB J.* 2003;17: 349–368

Messenger MM, Saulnier RB, Gilchrist AD, et al. Interactions between protein kinase CK2 and Pin1. Evidence for phosphorylation-dependent interactions. *J. Biol. Chem.* 2002;277(25):23054-23064

Méthot N, Song MS, Sonenberg N. A region rich in aspartic acid, arginine, tyrosine, and glycine (DRYG) mediates eukaryotic initiation factor 4B (eIF4B) self-association and interaction with eIF3. *Mol. Cell. Biol.* 1996;16(10):5328-5334.

Méthot N, Rom E, Olsen H, Sonenberg N. The human homologue of the yeast Prt1 protein is an integral part of the eukaryotic initiation factor 3 complex and interacts with p170. *J. Biol. Chem.* 1997;272(2):1110-1116.

Meyn MA, Wilson MB, Abdi FA, et al. Src family kinases phosphorylate the Bcr-Abl SH3-SH2 region and modulate Bcr-Abl transforming activity. *J. Biol. Chem.* 2006;281(41):30907-30916.

Millot F, Traore P, Guilhot J, et al. Clinical and biological features at diagnosis in 40 children with chronic myeloid leukemia. *Pediatrics*. 2005;116(1):140-143.

Mishra S, Reichert A, Cunnick J, et al. Protein kinase CKIIalpha interacts with the Bcr moiety of Bcr/Abl and mediates proliferation of Bcr/Abl-expressing cells. *Oncogene*. 2003;22(51):8255-8262.

Mishra S, Pertz V, Zhang B, et al. Treatment of P190 Bcr/Abl lymphoblastic leukemia cells with inhibitors of the serine/threonine kinase CK2. *Leukemia*. 2007;21(1):178-180.

Miyamoto S, Patel P, Hershey JWB. Changes in ribosomal binding activity of eIF3 correlate with increased translation rates during activation of T lymphocytes. *J. Biol. Chem.* 2005;280(31):28251-28264.

Miyata Y, Yahara I. The 90-kDa heat shock protein, HSP90, binds and protects casein kinase II from self-aggregation and enhances its kinase activity. *J. Biol. Chem.* 1992;267(10):7042-7047.

Miyata Y. Protein kinase CK2 in health and disease: CK2: the kinase controlling the Hsp90 chaperone machinery. *Cell. Mol. Life Sci.* 2009;66(11-12):1840-1849.

Nasmyth K. Viewpoint: putting the cell cycle in order. *Science*. 1996;274(5293):1643-1645

- Niefind K, Guerra B, Pinna LA, Issinger OG, Schomburg D. Crystal structure of the catalytic subunit of protein kinase CK2 from *Zea mays* at 2.1 Å resolution. *EMBO J.* 1998;17(9):2451-2462.
- Niefind K, Guerra B, Ermakowa I, Issinger OG. Crystal structure of human protein kinase CK2: insights into basic properties of the CK2 holoenzyme. *EMBO J.* 2001;20(19):5320-5331.
- Nowell PC, Hungerford DA. A minute chromosome in human chronic granulocytic leukemia. *Science* 1960; 132: 1497–501.
- O'Brien SG, Guilhot F, Larson RA, et al. Imatinib compared with interferon and low-dose cytarabine for newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia. *N. Engl. J. Med.* 2003;348(11):994-1004.
- O-charoenrat P, Rusch V, Talbot SG, et al. Casein kinase II alpha subunit and C1-inhibitor are independent predictors of outcome in patients with squamous cell carcinoma of the lung. *Clin. Cancer Res.* 2004;10(17):5792-5803.
- Oelgeschläger M, Krieg J, Lüscher-Firzlaff JM, Lüscher B. Casein kinase II phosphorylation site mutations in c-Myb affect DNA binding and transcriptional cooperativity with NF-M. *Mol. Cell. Biol.* 1995;15(11):5966-5974.
- Olabisi OO, Mahon GM, Kostenko EV, et al. Bcr interacts with components of the endosomal sorting complex required for transport-I and is required for epidermal growth factor receptor turnover. *Cancer Res.* 2006;66(12):6250-6257.
- Olsten MEK, Litchfield DW. Order or chaos? An evaluation of the regulation of protein kinase CK2. *Biochem. Cell Biol.* 2004;82(6):681-693.
- Olsen BB, Petersen J, Issinger O. BID, an interaction partner of protein kinase CK2alpha. *Biol. Chem.* 2006;387(4):441-449.
- Oren M. The p53 saga: the good, the bad, and the dead. *Harvey Lect.* 2001;97:57-82.
- Ozes ON, Mayo LD, Gustin JA, et al. NF-kappaB activation by tumour necrosis factor requires the Akt serine-threonine kinase. *Nature.* 1999;401(6748):82-85.
- Padmanabha R, Chen-Wu JL, Hanna DE, Glover CV. Isolation, sequencing, and disruption of the yeast CKA2 gene: casein kinase II is essential for viability in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 1990;10(8):4089-4099.
- Pane F, Frigeri F, Sindona M, et al. Neutrophilic-chronic myeloid leukemia: a distinct disease with a specific molecular marker (BCR/ABL with C3/A2 junction). *Blood.* 1996;88(7):2410-2414.
- Pasternak G, Hochhaus A, Schultheis B, Hehlmann R. Chronic myelogenous leukemia: molecular and cellular aspects. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 1998;124(12):643-660.
- Pawson T, Gish GD, Nash P. SH2 domains, interaction modules and cellular wiring. *Trends Cell Biol.* 2001;11(12):504-511.

- Pinna LA. A historical view of protein kinase CK2. *Cell. Mol. Biol. Res.* 1994;40(5-6):383-390
- Ptasznik, A, Nakata, Y, Kalota, A, Emerson, SG, Gewirtz, AM. Short interfering RNA (siRNA) targeting the Lyn kinase induces apoptosis in primary, and drug-resistant, BCR-ABL1(+) leukemia cells. *Nat Med.* 2004; 10:1187-1189.
- Pendergast AM, Quilliam LA, Cripe LD, Bassing CH, Dai Z, Li N, Batzer A, Rabun KM, Der CJ, Schlessinger J. BCR-ABL-induced oncogenesis is mediated by direct interaction with the SH2 domain of the GRB-2 adaptor protein. *Cell* 1993;75:175–185.
- Pepperkok R, Herr S, Lorenz P, Pyerin W, Ansorge W. System for quantitation of gene expression in single cells by computerized microimaging: application to c-fos expression after microinjection of anti-casein kinase II antibody. *Exp. Cell Res.* 1993;204(2):278-285.
- Perrotti D, Jamieson C, Goldman J, Skorski T. Chronic myeloid leukemia: mechanisms of blastic transformation. *J. Clin. Invest.* 2010;120(7):2254-2264.
- Phan L, Zhang X, Asano K, et al. Identification of a translation initiation factor 3 (eIF3) core complex, conserved in yeast and mammals, that interacts with eIF5. *Mol. Cell. Biol.* 1998;18(8):4935-4946.
- Phan-Dinh-Tuy F, Henry J, Boucheix C, et al. Protein kinases in human leukemic cells. *Am. J. Hematol.* 1985;19(3):209-218.
- Piazza FA, Ruzzene M, Gurrieri C, et al. Multiple myeloma cell survival relies on high activity of protein kinase CK2. *Blood.* 2006;108(5):1698-1707.
- Plattner R, Kadlec L, DeMali KA, Kazlauskas A, Pendergast AM. c-Abl is activated by growth factors and Src family kinases and has a role in the cellular response to PDGF. *Genes Dev.* 1999;13(18):2400-2411.
- Pluk H, Dorey K, Superti-Furga G. Autoinhibition of c-Abl. *Cell.* 2002;108(2):247-259.
- Puil L, Liu J, Gish G, et al. Bcr-Abl oncoproteins bind directly to activators of the Ras signalling pathway. *EMBO J.* 1994;13(4):764-773.
- Quintás-Cardama A, Kantarjian HM, Cortes JE. Mechanisms of primary and secondary resistance to imatinib in chronic myeloid leukemia. *Cancer Control.* 2009;16(2):122-131.
- Raanani P, Trakhtenbrot L, Rechavi G, et al. Philadelphia-chromosome-positive T-lymphoblastic leukemia: acute leukemia or chronic myelogenous leukemia blastic crisis. *Acta Haematol.* 2005;113(3):181-189.
- Rethinaswamy A, Birnbaum MJ, Glover CV. 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.* 1998;273(10):5869-5877.
- Roche-Lestienne C, Soenen-Cornu V, Grardel-Duflos N, et al. Several types of mutations of the Abl gene can be found in chronic myeloid leukemia patients resistant to STI571, and they can pre-exist to the onset of treatment. *Blood.* 2002;100(3):1014-1018.

- Rohrbacher M, Hasford J. Epidemiology of chronic myeloid leukaemia (CML). *Best Pract Res Clin Haematol.* 2009;22(3):295-302.
- Russo GL, Vandenberg MT, Yu IJ, et al. Casein kinase II phosphorylates p34cdc2 kinase in G1 phase of the HeLa cell division cycle. *J. Biol. Chem.* 1992;267(28):20317-20325.
- Ruzzene M, Penzo D, Pinna LA. 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.* 2002;364(Pt 1):41-47.
- Sánchez-García I, Grütz G. Tumorigenic activity of the BCR-ABL oncogenes is mediated by BCL2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1995;92(12):5287-5291.
- Sarno S, Ghisellini P, Pinna L.A. 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.* 2002;277:22509-14
- Sattler M, Mohi MG, Pride YB, et al. Critical role for Gab2 in transformation by BCR/ABL. *Cancer Cell.* 2002;1(5):479-492.
- Scaglioni PP, Yung TM, Cai LF, et al. A CK2-dependent mechanism for degradation of the PML tumor suppressor. *Cell.* 2006;126(2):269-283.
- Schindler T, Bornmann W, Pellicena P, et al. Structural mechanism for STI-571 inhibition of abelson tyrosine kinase. *Science.* 2000;289(5486):1938-1942.
- Schneider E, Kartarius S, Schuster N, Montenarh M. The cyclin H/cdk7/Mat1 kinase activity is regulated by CK2 phosphorylation of cyclin H. *Oncogene.* 2002;21(33):5031-5037.
- Seldin DC, Leder P. Casein kinase II alpha transgene-induced murine lymphoma: relation to theileriosis in cattle. *Science.* 1995;267(5199):894-897.
- Seldin DC, Landesman-Bollag E, Farago M, et al. CK2 as a positive regulator of Wnt signalling and tumourigenesis. *Mol. Cell. Biochem.* 2005;274(1-2):63-67.
- Shah NP, Nicoll JM, Nagar B, et al. Multiple BCR-ABL kinase domain mutations confer polyclonal resistance to the tyrosine kinase inhibitor imatinib (STI571) in chronic phase and blast crisis chronic myeloid leukemia. *Cancer Cell.* 2002;2(2):117-125.
- Shalev A, Valásek L, Pise-Masison CA, et al. *Saccharomyces cerevisiae* protein Pci8p and human protein eIF3e/Int-6 interact with the eIF3 core complex by binding to cognate eIF3b subunits. *J. Biol. Chem.* 2001;276(37):34948-34957.
- Shin S, Lee Y, Kim W, et al. Caspase-2 primes cancer cells for TRAIL-mediated apoptosis by processing procaspase-8. *EMBO J.* 2005;24(20):3532-3542.
- Shtivelman E, Lifshitz B, Gale RP, Canaani E. Fused transcript of abl and bcr genes in chronic myelogenous leukaemia. *Nature.* 1985;315(6020):550-554.
- Siddiqui-Jain A, Drygin D, Streiner N, et al. CX-4945, an orally bioavailable selective inhibitor of protein kinase CK2, inhibits prosurvival and angiogenic signaling and exhibits antitumor efficacy. *Cancer Res.* 2010;70(24):10288-10298.

- Skorski T, Bellacosa A, Nieborowska-Skorska M, et al. Transformation of hematopoietic cells by BCR/ABL requires activation of a PI-3k/Akt-dependent pathway. *EMBO J.* 1997;16(20):6151-6161.
- Song DH, Dominguez I, Mizuno J, et al. CK2 phosphorylation of the armadillo repeat region of beta-catenin potentiates Wnt signaling. *J. Biol. Chem.* 2003;278(26):24018-24025.
- Songyang Z, Shoelson SE, McGlade J, et al. Specific motifs recognized by the SH2 domains of Csk, 3BP2, fps/fes, GRB-2, HCP, SHC, Syk, and Vav. *Mol. Cell. Biol.* 1994;14(4):2777-2785.
- Solimini NL, Luo J, Elledge SJ. Non-oncogene addiction and the stress phenotype of cancer cells. *Cell.* 2007;130(6):986-988.
- Sonenberg N, Hinnebusch AG. Regulation of translation initiation in eukaryotes: mechanisms and biological targets. *Cell.* 2009;136(4):731-745.
- Soverini S, Martinelli G, Rosti G, et al. ABL mutations in late chronic phase chronic myeloid leukemia patients with up-front cytogenetic resistance to imatinib are associated with a greater likelihood of progression to blast crisis and shorter survival: a study by the GIMEMA Working Party on Chronic Myeloid Leukemia. *J. Clin. Oncol.* 2005;23(18):4100-4109.
- Stanglmaier M, Warmuth M, Kleinlein I, Reis S, Hallek M. The interaction of the Bcr-Abl tyrosine kinase with the Src kinase Hck is mediated by multiple binding domains. *Leukemia.* 2003;17(2):283-289.
- Taagepera S, McDonald D, Loeb JE, et al. Nuclear-cytoplasmic shuttling of C-ABL tyrosine kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1998;95(13):7457-7462.
- Tapia JC, Torres VA, Rodriguez DA, Leyton L, Quest AFG. 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.* 2006;103(41):15079-15084.
- Tawfic S, Yu S, Wang H, et al. Protein kinase CK2 signal in neoplasia. *Histol. Histopathol.* 2001;16(2):573-582.
- Theis-Febvre N, Filhol O, Froment C, et al. Protein kinase CK2 regulates CDC25B phosphatase activity. *Oncogene.* 2003;22(2):220-232.
- Tipping AJ, Mahon FX, Lagarde V, Goldman JM, Melo JV. Restoration of sensitivity to STI571 in STI571-resistant chronic myeloid leukemia cells. *Blood.* 2001;98(13):3864-3867.
- Torres J, Rodriguez J, Myers MP, et al. 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.* 2003;278(33):30652-30660.
- Torres J, Pulido R. The tumor suppressor PTEN is phosphorylated by the protein kinase CK2 at its C terminus. Implications for PTEN stability to proteasome-mediated degradation. *J. Biol. Chem.* 2001;276(2):993-998.
- Trembley JH, Wang G, Unger G, Slaton J, Ahmed K. Protein kinase CK2 in health and

- disease: CK2: a key player in cancer biology. *Cell. Mol. Life Sci.* 2009;66(11-12):1858-1867.
- Uemura N, Griffin JD. The adapter protein Crkl links Cbl to C3G after integrin ligation and enhances cell migration. *J. Biol. Chem.* 1999;274(53):37525-37532.
- Valásek L, Phan L, Schoenfeld LW, Valásková V, Hinnebusch AG. Related eIF3 subunits TIF32 and HCR1 interact with an RNA recognition motif in PRT1 required for eIF3 integrity and ribosome binding. *EMBO J.* 2001;20(4):891-904.
- Valásek L, Nielsen KH, Hinnebusch AG. Direct eIF2-eIF3 contact in the multifactor complex is important for translation initiation in vivo. *EMBO J.* 2002;21(21):5886-5898.
- Van Etten RA. Cycling, stressed-out and nervous: cellular functions of c-Abl. *Trends Cell Biol.* 1999;9(5):179-186.
- van Rhee F, Hochhaus A, Lin F, et al. p190 BCR-ABL mRNA is expressed at low levels in p210-positive chronic myeloid and acute lymphoblastic leukemias. *Blood.* 1996;87(12):5213-5217.
- Vardiman JW, Harris NL, Brunning RD. The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms. *Blood.* 2002;100(7):2292-2302.
- Vilk G, Weber JE, Turowec JP, et al. Protein kinase CK2 catalyzes tyrosine phosphorylation in mammalian cells. *Cell. Signal.* 2008;20(11):1942-1951.
- Vivanco I, Sawyers CL. The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer. *Nat. Rev. Cancer.* 2002;2(7):489-501.
- Walter J, Schindzielorz A, Grünberg J, Haass C. Phosphorylation of presenilin-2 regulates its cleavage by caspases and retards progression of apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1999;96(4):1391-1396.
- Wang D, Westerheide SD, Hanson JL, Baldwin AS. Tumor necrosis factor alpha-induced phosphorylation of RelA/p65 on Ser529 is controlled by casein kinase II. *J. Biol. Chem.* 2000;275(42):32592-32597.
- Wang S, Jones KA. CK2 controls the recruitment of Wnt regulators to target genes in vivo. *Curr. Biol.* 2006;16(22):2239-2244.
- Warmuth M, Bergmann M, Priess A, et al. The Src family kinase Hck interacts with Bcr-Abl by a kinase-independent mechanism and phosphorylates the Grb2-binding site of Bcr. *J. Biol. Chem.* 1997;272(52):33260-33270.
- Weisberg E, Manley PW, Cowan-Jacob SW, Hochhaus A, Griffin JD. Second generation inhibitors of BCR-ABL for the treatment of imatinib-resistant chronic myeloid leukaemia. *Nat. Rev. Cancer.* 2007;7(5):345-356.
- White DL, Saunders VA, Quinn SR, Manley PW, Hughes TP. Imatinib increases the intracellular concentration of nilotinib, which may explain the observed synergy
Witte ON, Rosenberg N, Baltimore D. Gene expression of Abelson murine leukemia virus. *Prog. Clin. Biol. Res.* 1980;41:757-764.
- Willert K, Brink M, Wodarz A, Varmus H, Nusse R. Casein kinase 2 associates with and

phosphorylates dishevelled. *EMBO J.* 1997;16(11):3089-3096.

Xu X, Toselli PA, Russell LD, Seldin DC. Globozoospermia in mice lacking the casein kinase II alpha' catalytic subunit. *Nat. Genet.* 1999;23(1):118-121.

Yamane K, Kinsella TJ. CK2 inhibits apoptosis and changes its cellular localization following ionizing radiation. *Cancer Res.* 2005;65(10):4362-4367.

Yan TF, Tao M. Purification and characterization of a wheat germ protein kinase. *J. Biol. Chem.* 1982;257(12):7037-7043.

Yang-Feng TL, Zheng K, Kopatz I, Naiman T, Canaani D. Mapping of the human casein kinase II catalytic subunit genes: two loci carrying the homologous sequences for the alpha subunit. *Nucleic Acids Res.* 1991;19(25):7125-9

Yin X, Gu S, Jiang JX. The development-associated cleavage of lens connexin 45.6 by caspase-3-like protease is regulated by casein kinase II-mediated phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 2001;276(37):34567-34572.

Yu IJ, Spector DL, Bae YS, Marshak DR. Immunocytochemical localization of casein kinase II during interphase and mitosis. *J. Cell Biol.* 1991;114(6):1217-1232.

Zhang C, Vilk G, Canton DA, Litchfield DW. Phosphorylation regulates the stability of the regulatory CK2beta subunit. *Oncogene.* 2002;21(23):3754-3764.

Zhu D, Hensel J, Hilgraf R, et al. Inhibition of protein kinase CK2 expression and activity blocks tumor cell growth. *Mol. Cell. Biochem.* 2010;333(1-2):159-167.

Zong Y, Zhou S, Sorrentino BP. Loss of P-glycoprotein expression in hematopoietic stem cells does not improve responses to imatinib in a murine model of chronic myelogenous leukemia. *Leukemia.* 2005;19(9):1590-1596.