



Stratégies pour inhiber une interaction protéine-protéine de haute affinité : l'exemple de la protéine kinase CK2

Béatrice Laudet

► To cite this version:

Béatrice Laudet. Stratégies pour inhiber une interaction protéine-protéine de haute affinité : l'exemple de la protéine kinase CK2. Biologie structurale [q-bio.BM]. UJF Grenoble-1, 2007. Français. NNT : . tel-01575407

HAL Id: tel-01575407

<https://hal.science/tel-01575407>

Submitted on 19 Aug 2017

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITE JOSEPH FOURIER DE GRENOBLE I

Ecole Doctorale de Chimie et Sciences du Vivant

THESE

Pour l'obtention du grade de

Docteur de l'Université Joseph Fourier – Grenoble I

Discipline : Biologie Structurale et Nanobiologie

Présentée et soutenue publiquement par

Béatrice LAUDET

Le 5 octobre 2007

**Stratégies pour inhiber
une interaction protéine-protéine de haute affinité :
l'exemple de la protéine kinase CK2.**

Directeur de thèse : Dr. Claude COCHET

Membres du jury :

Dr. Serge PEREZ

Président

Dr. Claude PRIGENT

Rapporteur

Dr. Michel VERON

Rapporteur

Dr. Yves AMBROISE

Examineur

Thèse réalisée au sein du Laboratoire Transduction du Signal INSERM U873

CEA Grenoble, IRTSV, dirigé par Dr. Jacques Baudier

REMERCIEMENTS

En premier lieu, je remercie le Dr. Serge Perez de présider ce jury. Je remercie également les Dr. Michel Véron, Claude Prigent et Yves Ambroise de me faire l'honneur d'être les rapporteurs et examinateur de cette thèse.

Je remercie le CEA de Grenoble pour avoir financé cette thèse pendant 3 ans et La Ligue contre le Cancer pour m'avoir attribué une bourse de 4^e année de thèse.

~~~~~

Je remercie le Dr. Jacques Baudier de m'avoir accueillie dans son laboratoire de Transduction du Signal.

Je remercie chaleureusement le Dr. Claude Cochet de m'avoir également accueillie au sein de la CK2 team et d'avoir dirigé ces travaux dans une ambiance conviviale. Merci de m'avoir formée à de nombreuses méthodes de biochimie, allant des purifications sur colonne en chambre froide aux dosages radioactifs, et en passant par la coloration des gels SDS-PAGE au micro-ondes. Merci pour avoir toujours répondu à mes questions. Et merci de m'avoir transmis régulièrement des offres de post-doc itinérant à deux roues !

Je remercie tout aussi chaleureusement Odile Filhol pour avoir répondu patiemment à toutes mes questions en matière de biologie cellulaire et moléculaire. Merci aussi pour sa gentillesse et la bonne ambiance dans le bureau.

Je remercie de même Thierry Buchou pour tous ses conseils de biologie moléculaire (« si la ligation marche quand je lève le pied en arrière au moment où je pipette, alors à chaque fois que je ferai une ligation je lèverai le pied en arrière ! »). Merci pour ces discussions animées à la cantine aussi bien scientifiques que non-scientifiques. Bridget te souhaite une bonne continuation dans tes travaux !

Je remercie aussi Olivier, ou le Mac Gyver du laboratoire, toujours présent pour le moindre problème technique. Merci pour ta sympathie.

Je remercie Renaud, pour tous ses conseils chimiques et plus encore.

Je remercie les post-docs du laboratoire, Virginie, Alexandra, Nathalie, Véronique, qui m'ont toujours expliqué en détail les protocoles nouveaux pour moi. Merci Virginie pour l'ultime coup de main. Merci Alex pour nos discussions engagées. Merci Nathalie pour m'avoir expliqué patiemment la culture cellulaire à mes débuts.

Je remercie les thésards Léa et Alexandre. Léa, merci pour ton écoute. Alex, je garde un souvenir ému des croissants à 6h un matin de rédaction de thèse.

Je remercie Peggy pour la bonne ambiance dans le laboratoire avec sa bonne humeur quotidienne. Merci aussi à Yuca, le pourchasseur de canards.

Merci aussi aux autres stagiaires, Jonathan (Monsieur PBS 10x), Violaine, Gabriel, Constanza, Mathieu, et les autres, pour les bons moments passés au labo.

Je remercie également tous ceux de l'équipe des « Baudiers »: Christian, Christelle, Laurent, Arnaud, Toff, Benoît, Nicole, Nathalie, ... pour leurs conseils BM. Et les « droso » : Elodie, Jackie, ... pour les discussions vélo/monitorat/Globule.

## SOMMAIRE

|                                                                                                                                                                                                          |           |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>INTRODUCTION</b>                                                                                                                                                                                      |           |
| <b>1° partie : La superfamille des protéines kinases</b>                                                                                                                                                 | <b>1</b>  |
| I- Les protéines kinases gouvernent la plupart des aspects de la vie cellulaire                                                                                                                          | 1         |
| II- 518 protéines kinases répertoriées chez l'homme                                                                                                                                                      | 1         |
| III- Fonction des protéines kinases                                                                                                                                                                      | 3         |
| IV- Structure des protéines kinases                                                                                                                                                                      | 4         |
| V- Les protéines kinases, des cibles thérapeutiques attractives                                                                                                                                          | 5         |
| <b>2° partie : La protéine kinase CK2</b>                                                                                                                                                                | <b>8</b>  |
| I- Importance fonctionnelle de la CK2                                                                                                                                                                    | 8         |
| 1- CK2 et les décisions cellulaires de vie et de mort                                                                                                                                                    | 11        |
| a- Rôle de CK2 dans la régulation du cycle de la division cellulaire                                                                                                                                     | 11        |
| b- Rôle de CK2 dans la survie et l'apoptose                                                                                                                                                              | 11        |
| 2- CK2 et cancer                                                                                                                                                                                         | 14        |
| a- CK2 est un oncogène                                                                                                                                                                                   | 14        |
| o Surexpression de CK2 dans les tumeurs mammaires                                                                                                                                                        | 14        |
| o Stabilisation d'oncogènes et/ou déstabilisation de suppresseurs de tumeur                                                                                                                              | 15        |
| b- CK2 est un marqueur de mauvais pronostic                                                                                                                                                              | 16        |
| o Carcinome du poumon à cellules squameuses                                                                                                                                                              | 16        |
| o Leucémie myéloïde aiguë                                                                                                                                                                                | 17        |
| o Adénocarcinomes de prostate                                                                                                                                                                            | 17        |
| c- CK2 est une cible thérapeutique potentielle                                                                                                                                                           | 18        |
| 3- Inhibiteurs connus de CK2                                                                                                                                                                             | 21        |
| II- Structure de la CK2                                                                                                                                                                                  | 24        |
| 1- Sous-unité catalytique CK2 $\alpha$                                                                                                                                                                   | 24        |
| 2- Sous-unité régulatrice CK2 $\beta$                                                                                                                                                                    | 25        |
| a- Structure de CK2 $\beta$                                                                                                                                                                              | 26        |
| b- Partenaires de CK2 $\beta$                                                                                                                                                                            | 27        |
| 3- Organisation en tétramère et apports de la cristallographie                                                                                                                                           | 29        |
| a- Un complexe de haute affinité                                                                                                                                                                         | 29        |
| b- Une faible surface d'interaction                                                                                                                                                                      | 30        |
| c- Modélisation mathématique                                                                                                                                                                             | 31        |
| III- Lien entre structure et fonction                                                                                                                                                                    | 32        |
| 1- Dynamisme de l'interaction dans la cellule                                                                                                                                                            | 32        |
| 2- Spécificité de substrat                                                                                                                                                                               | 33        |
| <b>3° partie : Les inhibiteurs d'interactions protéine -protéine : mythe ou réalité ?</b>                                                                                                                | <b>36</b> |
| I- Introduction                                                                                                                                                                                          | 36        |
| II- Article                                                                                                                                                                                              | 36        |
| <br><i>Laudet B, Prudent R, Filhol O, Cochet C.</i><br><i>Des agents thérapeutiques ciblant des interactions protéine-protéine : mythe ou réalité ?</i><br><i>Med Sci (Paris). 2007 Mar;23(3):273-8.</i> |           |
| OBJECTIF DU TRAVAIL DE THESE : trouver des outils capables de perturber l'interaction CK2 $\alpha$ – CK2 $\beta$                                                                                         | 37        |
| DEMARCHE                                                                                                                                                                                                 | 37        |

## RESULTATS

### 1° partie : Mise en évidence d'une mobilité différentielle des sous-unités de CK2 dans les compartiments cellulaires 39

|                 |    |
|-----------------|----|
| I- Introduction | 39 |
| II- Article     | 39 |

*Theis-Febvre N, Martel V, Laudet B, Souchier C, Grunwald D, Cochet C, Filhol O.*  
*Highlighting protein kinase CK2 movement in living cells.*  
*Mol Cell Biochem. 2005 Jun;274(1-2):15-22.*

|                                |    |
|--------------------------------|----|
| III- Résultats complémentaires | 40 |
|--------------------------------|----|

### 2° partie : Recherche de molécules inhibitrices de l'interaction CK2 $\alpha$ -CK2 $\beta$ par criblage à haut débit 42

|                                                                     |    |
|---------------------------------------------------------------------|----|
| I- Résultats du criblage de la Chimiothèque du NCI                  | 42 |
| II- Résultats du criblage de la Chimiothèque de peptidomimétiques   | 43 |
| 1- Résultats primaires et confirmation secondaire                   | 44 |
| 2- Déconvolution des touches                                        | 45 |
| a. Singletons : P1, P2, P5, P6                                      | 45 |
| b. Mélanges simples (M10) : P3, P4, P10 à P15                       | 46 |
| c. Touches P6, P7, P8, P9 : Positional scanning et delete synthesis | 46 |
| o Positional scanning et delete synthesis : principe                | 46 |
| o Résultats                                                         | 47 |
| 3- Epilogue                                                         | 49 |

### 3° partie : Identification des hot spots de l'interaction CK2 $\alpha$ -CK2 $\beta$ et conception d'un peptide cyclique mimétique antagoniste de l'interaction à partir des données structurales 50

|                 |    |
|-----------------|----|
| I- Introduction | 50 |
| II- Article     | 51 |

*Laudet B, Barette C, Dulery V, Renaudet O, Dumy P, Metz A, Prudent R, Deshiere A, Dideberg O, Filhol O, Cochet C.*  
*Structure-based design of small peptide inhibitors of protein-kinase CK2 subunit interaction.*  
*Biochem J. 2007 Aug 23.*

|                                                                                           |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| III- Commentaire des principaux résultats                                                 | 52 |
| 1- L'interaction entre les sous-unités de CK2 est dynamique <i>in vitro</i>               | 52 |
| 2- Analyse de la partie C-terminale de CK2 $\beta$                                        | 52 |
| 3- Identification des hot spots de l'interaction CK2 $\alpha$ -CK2 $\beta$                | 52 |
| 4- Conception d'un peptide cyclique inhibiteur de l'interaction CK2 $\alpha$ -CK2 $\beta$ | 53 |
| IV- Résultats annexes                                                                     | 54 |
| 1- Le test de complémentation de fluorescence bimoléculaire                               | 55 |
| a- Principe du BiFc                                                                       | 55 |
| b- Mise au point de la stratégie BiFc                                                     | 55 |
| o Contrôle de la taille des constructions YFP en Western blot                             | 55 |
| o Permutation fonctionnelle des constructions YFP                                         | 57 |
| c- Limites du test                                                                        | 57 |
| o L'étape de maturation achève la reconstitution de YFP de manière irréversible           | 57 |

|                                                                                                                                  |           |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| ○ Une immunofluorescence indirecte permet d'amplifier le signal de BiFc                                                          | 58        |
| ○ Choix de l'anticorps anti-GFP pour l'immunofluorescence                                                                        | 60        |
| <b>2- Résultats annexes relatifs à la validation des hot spots de l'interaction CK2<math>\alpha</math>-CK2<math>\beta</math></b> | <b>61</b> |
| a- Calcul des distances entre atomes de CK2 $\alpha$ et CK2 $\beta$                                                              | 61        |
| b- Alignements de séquences entre CK2 $\beta$ animales et végétales                                                              | 64        |
| c- Prédiction des hot spots par mutagenèse virtuelle                                                                             | 65        |
| <b>3- Résultats annexes relatifs à l'étude des peptides cycliques inhibiteurs</b>                                                | <b>66</b> |
| a- Effets du peptide cyclique sur la spécificité de substrat                                                                     | 66        |
| ○ Autophosphorylation de CK2 $\beta$ en présence du peptide cyclique                                                             | 66        |
| • Test sur des protéines recombinantes                                                                                           | 66        |
| • Test sur des protéines natives                                                                                                 | 67        |
| ○ Phosphorylation d'un substrat CK2 $\beta$ -indépendant                                                                         | 67        |
| b- Effets du peptide cyclique sur des cellules en culture                                                                        | 68        |
| ○ Ajout du peptide Pc sur des cellules en culture                                                                                | 68        |
| ○ Micro-injection du peptide Pc dans des cellules MCF10A                                                                         | 69        |
| <b>4<sup>o</sup> partie : Identification de molécules chimiques inhibitrices par criblage virtuel</b>                            | <b>71</b> |
| <b>I- Recherche d'analogues chimiques par docking à haut débit</b>                                                               | <b>71</b> |
| 1- Principe du docking                                                                                                           | 71        |
| 2- Criblage par docking                                                                                                          | 72        |
| 3- Résultats                                                                                                                     | 74        |
| <b>II- Recherche d'analogues chimiques par criblage virtuel en 2D</b>                                                            | <b>75</b> |
| 1- Principe et mise en œuvre du criblage virtuel en 2D                                                                           | 75        |
| 2- Résultats du criblage virtuel en 2D                                                                                           | 76        |
| 3- Caractérisation de V12                                                                                                        | 78        |
| a- Description du composé V12, « Bipâquerette »                                                                                  | 78        |
| b- Résultats des tests d'interaction                                                                                             | 80        |
| • Détermination de l'IC <sub>50</sub> dans le test d'interaction CK2 $\alpha$ -CK2 $\beta$                                       |           |
| • Evaluation de l'activité de V12 par immunoprécipitation d'un lysat cellulaire                                                  | 81        |
| c- Effets de V12 sur l'activité catalytique de CK2                                                                               | 82        |
| • Phosphorylation d'un substrat CK2 $\beta$ -dépendant (GST-Olig2) en présence de V12                                            | 82        |
| • Effets de V12 sur l'activité de CK2 dans un contexte de lysat cellulaire                                                       | 83        |
| 4- Analogues de V12                                                                                                              | 84        |
| a- Structure des analogues de V12 et résultats                                                                                   | 84        |
| b- Relations structure-activité                                                                                                  | 90        |
| c- Effet des composés actifs sur la viabilité cellulaire                                                                         | 93        |
| <b>III- Autres composés testés</b>                                                                                               | <b>87</b> |
| 1- Molécules de type éthers (O. Renaudet, DCM)                                                                                   | 96        |
| • Structures                                                                                                                     | 97        |
| • Efficacité de ces composés <i>in vitro</i>                                                                                     | 100       |
| • Relations structure-activité                                                                                                   | 101       |
| • Efficacité de ces composés au niveau cellulaire                                                                                | 102       |
| 2- Composés « hybrides » de type ellipticine/azatoxine/etoposide/podophyllotoxine (Y. Wong, DPM, Grenoble)                       | 103       |
| • Structure des composés                                                                                                         | 104       |
| • Résultats et analyse des données des tests <i>in vitro</i>                                                                     | 106       |

|                                                                                                                  |            |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| <b>DISCUSSION ET PERSPECTIVES</b>                                                                                | <b>109</b> |
| Discussion et perspectives                                                                                       | 109        |
| <b>MATERIELS ET METHODES</b>                                                                                     |            |
| <b>I- BIOLOGIE MOLECULAIRE</b>                                                                                   | <b>116</b> |
| Matériels et produits chimiques                                                                                  | 116        |
| Transformation de bactéries compétentes par choc thermique                                                       | 116        |
| Mini, midi, et maxi-preps de plasmides                                                                           | 116        |
| Mutagenèse dirigée                                                                                               | 116        |
| Sous-Clonage                                                                                                     | 117        |
| • Sous-clonage avec PCR de l'insert de pMALc2-MBP-CK2 $\beta$ 166-188-190 vers le vecteur pMSCVNeoHA-CK2 $\beta$ | 117        |
| • Sous-clonage de l'insert de pMALc2-MBP-CK2 $\beta$ 188-190 vers le vecteur pSG5-HA                             | 118        |
| Extraction d'ARN de cellules de mammifères, transcription reverse et détection par PCR de CK2 $\beta$ aviaire    | 118        |
| Séquences shRNA-CK2 $\beta$                                                                                      | 119        |
| <b>II- BIOCHIMIE</b>                                                                                             | <b>120</b> |
| Matériel et produits chimiques                                                                                   | 120        |
| • Peptides                                                                                                       | 120        |
| • Bactéries                                                                                                      | 120        |
| • Anticorps                                                                                                      | 120        |
| • Chimiothèques                                                                                                  | 121        |
| ○ Chimiothèque du NCI                                                                                            | 121        |
| ○ Chimiothèque de Peptidomimétiques                                                                              | 121        |
| ○ Chimiothèques virtuelles                                                                                       | 122        |
| Production de protéines recombinantes fusionnées à MBP, GST, GFP ou His                                          | 122        |
| • GFP-CK2 $\alpha$                                                                                               | 122        |
| • GST-CK2 $\alpha$ -HA et GST                                                                                    | 123        |
| • GST-CK2 $\alpha$ -1-335                                                                                        | 124        |
| • MBP-CK2 $\beta$ et mutants                                                                                     | 124        |
| Production de CK2 $\alpha$ <sup>35</sup> S en lysat de réticulocyte                                              | 126        |
| Dosage de protéines                                                                                              | 126        |
| Biotinylation de MBP-CK2 $\beta$                                                                                 | 126        |
| Gel SDS-PAGE, Western blot, déshybridation                                                                       | 126        |
| Coloration au Bleu de Coomassie et au Nitrate d'argent                                                           | 127        |
| Dosage d'activité kinase <sup>32</sup> P                                                                         | 127        |
| Variations du test kinase : avec protéine substrat ou, avec [ <sup>32</sup> P]-GTP                               | 127        |
| Test d'interaction CK2 $\alpha$ -CK2 $\beta$                                                                     | 128        |
| • Principe                                                                                                       | 128        |
| • Mise au point                                                                                                  | 129        |
| • Robotisation                                                                                                   | 131        |
| • Réalisation                                                                                                    | 133        |
| BIAcore                                                                                                          | 134        |
| Immunoprécipitation                                                                                              | 136        |
| Pull-down                                                                                                        | 136        |

|                                                    |            |
|----------------------------------------------------|------------|
| <b>III- BIOLOGIE CELLULAIRE</b>                    | <b>138</b> |
| Lignées cellulaires                                | 138        |
| • Cellules HeLa (ATCC # CCL-2)                     | 138        |
| • Cellules MCF10A (ATCC# CRL-10317)                | 139        |
| • Cellules MCF7 (ATCC# HTB-22)                     | 140        |
| • Cellules Sf9 (ATCC# CRL-1711)                    | 140        |
| • Cellules NIH-3T3-MEF (ATCC# CRL-1658)            | 140        |
| Test de mycoplasmes                                | 141        |
| Lyse des cellules                                  | 141        |
| Transfections transitoires                         | 141        |
| • Eugene 6                                         | 141        |
| • Lipofectamine 2000                               | 141        |
| • Electroporation (système AMAXA)                  | 142        |
| FRET                                               | 142        |
| Microinjection de peptide cyclique                 | 146        |
| Immunofluorescence indirecte                       | 146        |
| Microscopie                                        | 146        |
| Test de viabilité cellulaire                       | 147        |
| FACS                                               | 147        |
| BiFc                                               | 148        |
| Test de blessure                                   | 148        |
| <b>IV- BIOINFORMATIQUE</b>                         | <b>149</b> |
| Structures cristallographiques utilisées           | 149        |
| Visualisation moléculaire                          | 149        |
| • Chimera                                          | 149        |
| • SwissPdbViewer                                   | 150        |
| • Marvin (msketch)                                 | 150        |
| • MDL Isis/Draw 2.5                                | 151        |
| Prédiction des hot spots : logiciel ROBETTA        | 151        |
| Calcul de distances entre atomes : logiciel MOLMOL | 152        |
| Visualisation des résidus < 4 Å                    | 153        |
| • avec Molmol                                      | 153        |
| • avec SwissPdbViewer                              | 154        |
| Docking                                            | 156        |
| Criblage virtuel : Chemaxon                        | 156        |
| • Chimiothèques                                    | 156        |
| • Logiciel Chemaxon                                | 157        |
| • Recherche de sous-structures et de similarités   | 157        |
| • Filtres secondaires                              | 158        |
| • Obtention des composés                           | 159        |
| <b>BIBLIOGRAPHIE</b>                               | <b>160</b> |

## LISTE DES ABREVIATIONS

|          |                                                                          |
|----------|--------------------------------------------------------------------------|
| AC       | Anticorps                                                                |
| ADP      | Adénosine diphosphate                                                    |
| ATP      | Adénosine triphosphate                                                   |
| BiFc     | Bimolecular Fluorescence Complementation                                 |
| Cis-Pt   | Cisplatine                                                               |
| C-ter    | partie C-terminale de la protéine                                        |
| DCM      | Département de Chimie Moléculaire                                        |
| DO       | Densité optique                                                          |
| DMEM     | Dulbecco's Modified Eagle Medium                                         |
| DMSO     | diméthyl sulphoxyde                                                      |
| DPM      | Département de Pharmacologie Moléculaire                                 |
| DTNB     | 5,5'-Dithio-bis(2-nitrobenzoic acid)                                     |
| EDTA     | éthylène diamine tétra acétique                                          |
| GFP      | Green fluorescent protein                                                |
| GST      | glutathione-S-transferase                                                |
| HA       | Hémagglutinin A du virus influenza                                       |
| IF       | Immunofluorescence                                                       |
| IP       | Immunoprécipitation                                                      |
| IPTG     | isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside                                   |
| LB       | Luria broth                                                              |
| MBP      | maltose binding protein                                                  |
| N-ter    | partie N-terminale de la protéine                                        |
| pb       | paire(s) de bases                                                        |
| PBS      | Phosphate-Buffered Saline                                                |
| PCR      | Polymerase Chain Reaction                                                |
| RT       | room temperature, température ambiante                                   |
| P/S      | Penicilline/Streptavidine                                                |
| SDS      | Sodium Dodecyl Sulfate                                                   |
| siRNA    | Small interfering RNA                                                    |
| ShRNA    | small hairpin RNA                                                        |
| SVF      | Sérum de Veau Foetal                                                     |
| Tris     | Tris(hydroxymethyl)amino-methane 2 amino-2-hydroxymethyl-1,3-propanediol |
| Tween 20 | Polyoxoethylene-sorbitan monolaurate                                     |
| WB       | Western blot                                                             |
| WT       | Wild Type, sauvage                                                       |

# INTRODUCTION



## INTRODUCTION

Depuis de nombreuses années, le laboratoire étudie les mécanismes de transduction de signaux qui gouvernent des processus cellulaires essentiels tels que la prolifération, la différenciation et la survie cellulaire. Le groupe dirigé par Claude Cochet a développé un intérêt tout particulier pour l'étude des protéines kinases, enzymes clés dans l'organisation fonctionnelle de la plupart des voies de signalisation.

### 1° partie : La superfamille des protéines kinases

#### **I- Les protéines kinases gouvernent la plupart des aspects de la vie cellulaire**

Les protéines kinases sont des régulateurs-clés d'un grand nombre de fonctions cellulaires chez les eucaryotes. Elles modulent une large variété de processus biologiques, en particulier ceux qui transportent des signaux essentiels de la membrane cellulaire jusqu'aux cibles intracellulaires et coordonnent des fonctions biologiques complexes. Les protéines kinases ont pour vocation d'activer ou de désactiver d'autres protéines substrats devant être régulées, lorsqu'elles en reçoivent l'ordre, ou plus justement, "le signal". Ces substrats pourront alors, par exemple, atteindre le noyau de la cellule et y induire l'expression de gènes spécifiques (on parle de transcription de gènes). Cette expression induira la synthèse de nouvelles protéines, comme les facteurs de croissance, ou pourra entraîner la cellule dans une nouvelle voie métabolique, et ce, en réponse au signal initialement reçu par la cellule. Dans ce schéma, les protéines kinases amplifient et transmettent le signal à l'intérieur de la cellule.

Ainsi, ces enzymes exercent un contrôle sur la survie, la prolifération, le métabolisme, la transcription, la progression du cycle cellulaire, le réarrangement du cytosquelette et les mouvements des cellules, l'apoptose et la différenciation. Elles jouent aussi un rôle critique dans la communication intercellulaire lors du développement, dans les réponses physiologiques et l'homéostasie, et dans le fonctionnement des systèmes nerveux et immunitaire (Manning, 2002).

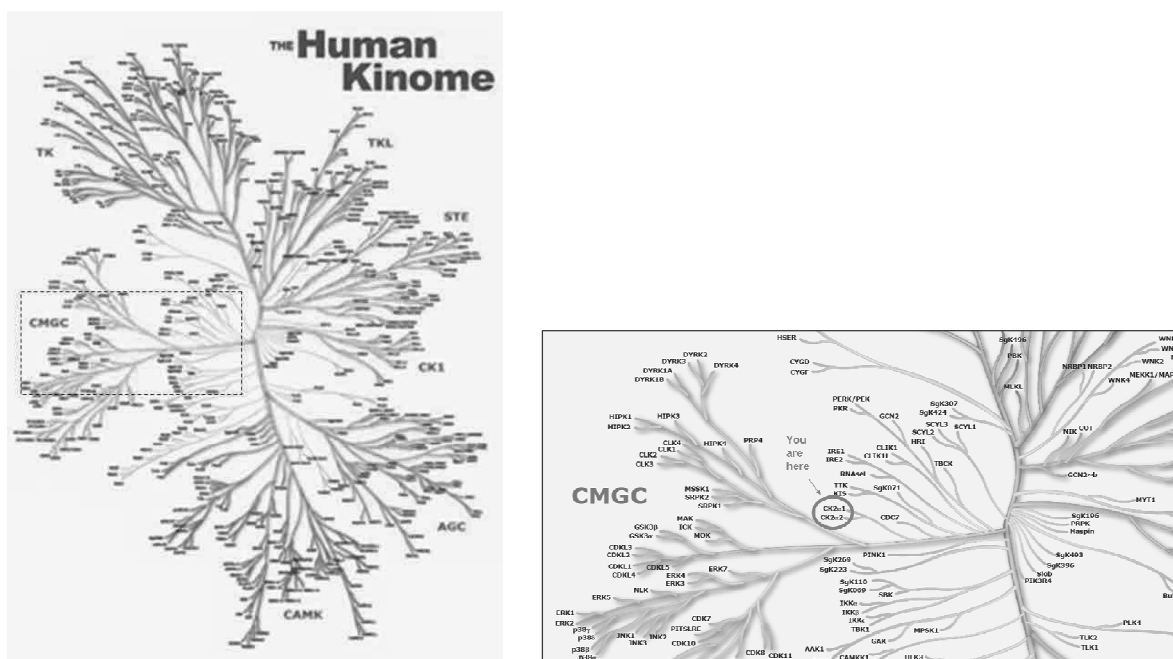
#### **II- 518 protéines kinases répertoriées chez l'homme**

Les protéines kinases constituent l'une des plus grandes familles de gènes humains (figures 1 et 2) : le séquençage du génome humain a ainsi permis de répertorier 518 protéines kinases, soit 1,7% des gènes humains (Manning, 2002).

| Network components                                 | Number           |
|----------------------------------------------------|------------------|
| Cells                                              | 10 <sup>14</sup> |
| Cell types                                         | 200              |
| Genes                                              | 25 000           |
| % of genes with splice variants                    | 40-60            |
| Average number of splice variants per gene         | 2,5              |
| Average number of post-translational modifications | 2,5              |
| Genes for transcription factors                    | 1 850            |
| <b>Genes for protein kinases</b>                   | <b>518</b>       |
| Genes for protein phosphatases                     | 150              |
| Genes for receptors                                | 543              |
| Genes for G-coupled receptors                      | 367              |

| Timescales in signaling networks       | Time (sec)   |
|----------------------------------------|--------------|
| <b>Kinase/phosphatases reactions</b>   | <b>0,001</b> |
| Protein conformational changes         | 0,001        |
| Cell-scale protein diffusion (passive) | 0,1-1        |
| Cell-scale protein diffusion (active)  | < 1          |
| Cell migration                         | 0,01-1       |
| Receptor internalization               | 0,01         |
| Transcription control                  | 0,01         |
| Cellular growth                        | 0,0001       |

**Figure 1** : Propriétés des réseaux de signalisation des cellules humaines (Manning, 2002).



**Figure 2** : Dendrogramme de la superfamille des protéines kinases humaines (Manning, 2002, et [www.kinase.com/human/kinome](http://www.kinase.com/human/kinome)). A gauche : Cet arbre phylogénétique illustre les relations entre les différents membres du kinome. Le degré de similarité (similarité de séquence du domaine catalytique) entre les différentes protéines kinases est inversement proportionnel à la distance entre leur position sur l'arbre. La majorité des protéines kinases peuvent être regroupées en 7 groupes principaux (en couleur : TK : tyrosines kinases, TKL : tyrosine-kinase-like, STE : homologues des Sterile kinases 7, 11 et 20 de levure, CK1 : casein kinase 1, AGC : contenant les familles PKA, PKG, PKC, CAMK : calcium/calmodulin-dépendant protein kinase, CMGC : contenant les familles CDK, MAPK, GSK3 et CLK). Pour les autres protéines kinases (représentées en gris au centre de

l'arbre), leur position peut permettre de prédire leurs substrats et leur fonction biologique. A droite : La CK2 se niche à proximité de la famille des CDK, MAPK, GSK3 et CLK kinases.

### III- Fonction des protéines kinases

Les protéines kinases sont des enzymes qui catalysent l'hydrolyse du phosphate en position  $\gamma$  de l'ATP et son addition covalente sur l'un des 3 acides aminés ayant un groupe hydroxyl libre de ces protéines substrats. La plupart des protéines kinases agissent à la fois sur la sérine et la thréonine (Sérine/Thréonine protéines kinases), d'autres sur la tyrosine (Tyrosine protéines kinases).

La phosphorylation des protéines représente un mécanisme de régulation de type « on/off » (figure 3) qui confère au substrat une nouvelle activité biologique : il se retrouve soit activé ou inactivé, sa localisation ou son association avec d'autres partenaires peut changer. Environ 30% des protéines cellulaires peuvent être modifiées par l'activité des protéines kinases. La réaction inverse est la déphosphorylation, qui est assurée par des protéines phosphatases (150 phosphatases humaines). Les phosphorylations/déphosphorylations sont des modifications rapides et réversibles, ce qui permet une régulation dynamique. Une perturbation de ce système entraîne une dérégulation des voies de signalisation cellulaires, pouvant conduire à diverses pathologies.

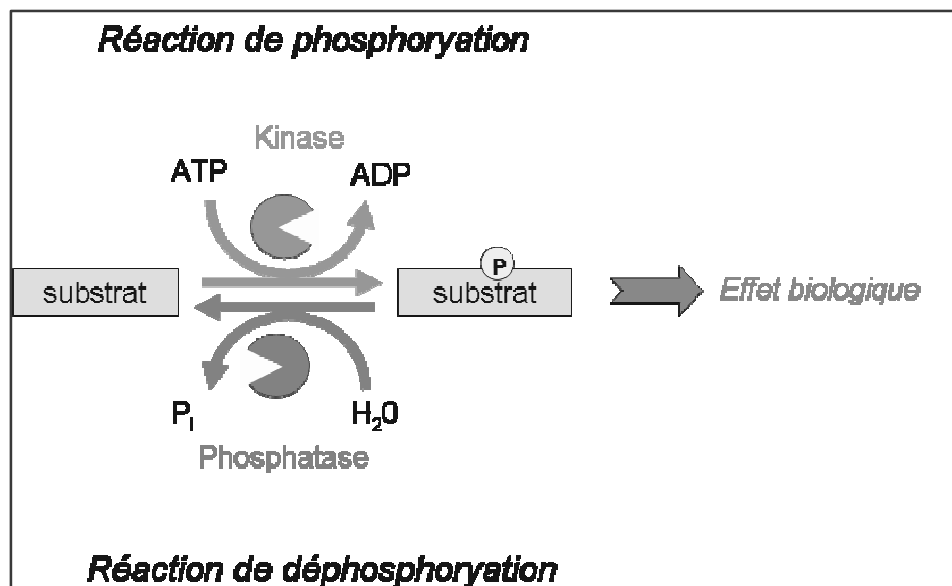


Figure 3 : Principe des réactions de phosphorylation et de déphosphorylation.

Chaque protéine kinase reconnaît un résidu phosphorylable (Ser, Thr ou Tyr selon la kinase) localisé dans un environnement en acides aminés qui lui est propre. On parle de site de phosphorylation consensus. Par exemple, la protéine kinase CK2 reconnaît la séquence

consensus acide suivante **S/T-X<sub>1</sub>-X<sub>2</sub>-D/E/pS** (figure 4) et fixe un groupe phosphate ( $\text{HPO}_4^{2-}$ ) sur la sérine ou la thréonine (Pagano, 2006).

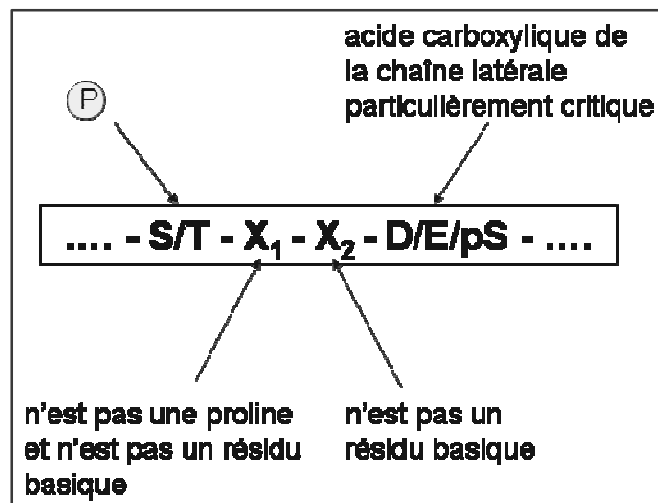
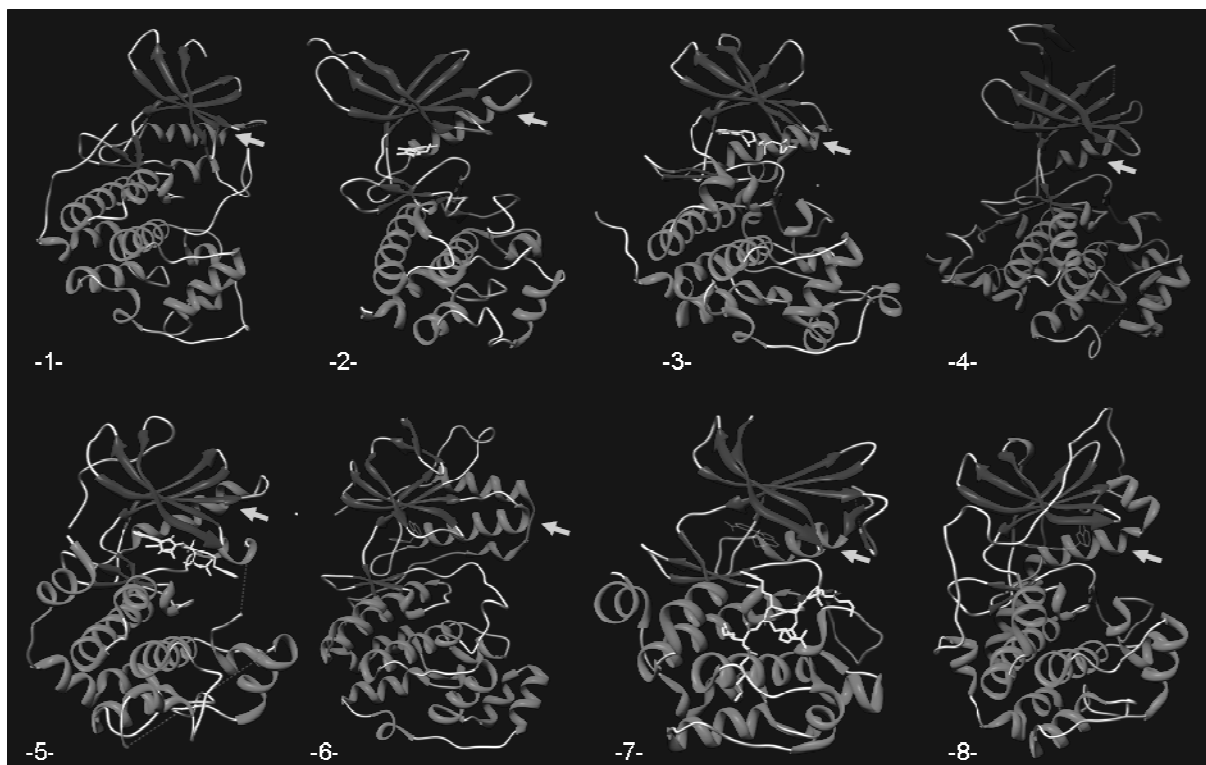


Figure 4 : Exemple de site consensus pour une protéine kinase (ici, site consensus de la CK2).

#### IV- Structure des protéines kinases

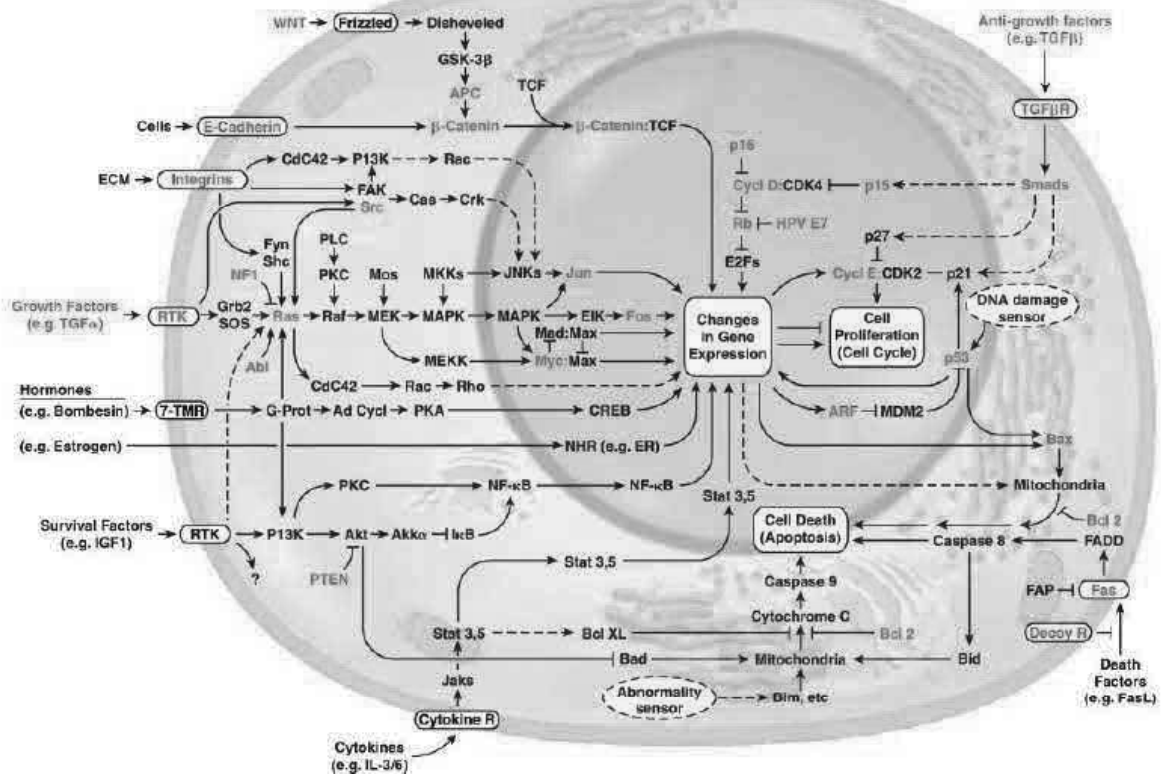
Les protéines kinases sont hautement conservées dans l'évolution du point de vue de leur structure. Une protéine kinase classique se présente sous la forme d'un monomère catalytique, organisé en deux lobes articulés autour d'une charnière. Le premier domaine est riche en hélices  $\alpha$ , le second en feuillets  $\beta$ . Le site catalytique qui se trouve au niveau de la jonction entre ces deux lobes comprend le site de fixation de l'ATP et le site de fixation du substrat (figure 5).



**Figure 5 : Exemples de structures tridimensionnelles de protéines kinases.** 1 : CDK2 (1PXI.pdb) ; 2 : CHK1 (2YWP.pdb) ; 3 : CK2 $\alpha$  (1PJK.pdb) ; 4 : GSK3 $\beta$  (1IO9.pdb) ; 5 : MEK1 (1S9I.pdb) ; 6 : p38-MAPK14 (1W84.pdb) ; 7 : Pim1 (2C3I.pdb) ; 8 : PKA sous-unité  $\alpha$  (2UZU.pdb). En bleu sont représentés les feuillets  $\beta$ , en rouge les hélices  $\alpha$ . Le lobe N-terminal (riche en feuillets  $\beta$ ) s'articule avec le lobe C-terminal (riche en hélices  $\alpha$ ) autour du site catalytique et du site de fixation de l'ATP. La boucle d'activation (hélice C, flèche verte), particulièrement flexible, est cruciale lors de la phosphorylation du substrat (adapté de Kannan, 2005, logiciel Chimera, et [www.rcsb.org/pdb/explore/](http://www.rcsb.org/pdb/explore/)). Certaines protéines kinases sont cocrystallisées avec l'ATP ou un inhibiteur.

## V- Les protéines kinases, des cibles thérapeutiques attractives

La cellule reçoit et intègre les informations provenant de son environnement en activant des réseaux complexes d'effecteurs moléculaires conduisant à une réponse cellulaire adaptée. A l'examen des principales voies de signalisation qui sont potentiellement dérégulées dans les diverses pathologies cancéreuses, on est frappé par l'implication fonctionnelle de nombreuses protéines kinases (figure 6).



**Figure 6 : Dissection des voies de signalisation cellulaire impliquées dans le cancer** (Hanahan, 2000). De nombreux composants clés sont des protéines kinases.

Les cartes chromosomiques révèlent ainsi que 244 gènes codant des protéines kinases correspondent à un locus associé à une maladie ou à des amplicons fréquemment retrouvés dans les tumeurs (Manning, 2002). De plus, la dérégulation par mutation ou surexpression des protéines kinases est une caractéristique des cellules cancéreuses (Hanahan, 2000). A ce titre, les protéines kinases constituent une fraction importante des oncogènes actuellement connus. Des efforts considérables ont donc été réalisés pour déterminer les fonctions physiologiques et pathologiques des voies de signalisation dans lesquelles sont impliquées des protéines kinases. Ces enzymes, dans la mesure où leur mutation ou leur dérégulation sont à l'origine de pathologies humaines, représentent donc des cibles thérapeutiques très pertinentes. L'accumulation des connaissances depuis plusieurs années sur ces enzymes offre la possibilité de développer des antagonistes efficaces dans des protocoles thérapeutiques (Cohen, 2002).

Les premiers succès thérapeutiques concernant des inhibiteurs de protéines kinases surexprimées ou mutées dans les cancers et appliqués en 2° ligne derrière les traitements classiques ont été enregistrés. Les exemples les plus célèbres sont le Gleevec et l'Iressa (figure 7) dont les résultats spectaculaires ont encouragé les recherches sur les molécules

ciblant des protéines kinases. Ils apportent une preuve du concept et une démonstration éclatante de thérapie anticancéreuse ciblée (Krause, 2005).

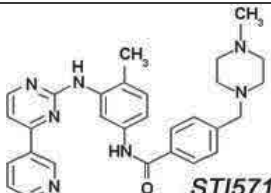
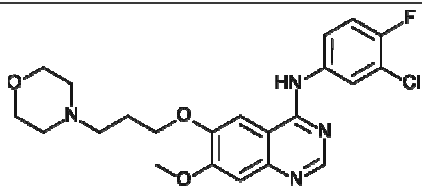
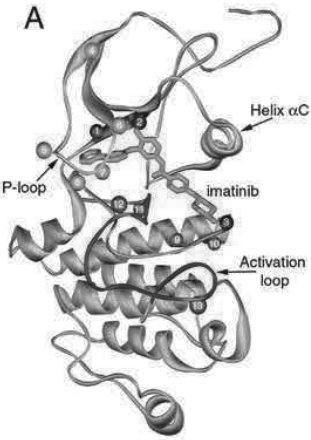
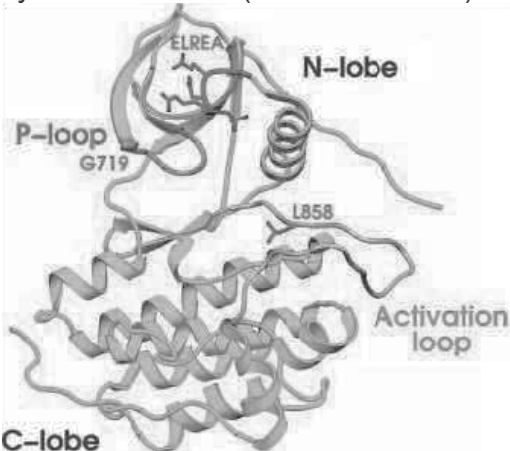
|                       |                                                                                                                                      |                                                                                                                            |
|-----------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Nom commercial        | <b>Gleevec</b>                                                                                                                       | <b>Iressa</b><br>(2 <sup>e</sup> génération : Tarceva, Erlotinib OSI574)                                                   |
| Nom de la molécule    | Imatinib mesylate STI571                                                                                                             | Gefitinib ZD1839                                                                                                           |
| Fabricant             | Novartis                                                                                                                             | Astra Zenaca                                                                                                               |
| Formule               |                                                     |                                          |
| Protéine kinase cible | Tyr kinase Bcr-Abl, mais aussi c-Kit et PDGF :<br> | Tyr kinase EGF-R (HER-1 = ErbB-1) :<br> |
| Cancer                | Leucémies myéloïdes chroniques (LMC) réfractaires à l'interféron $\alpha$ et tumeurs stromales gastro-intestinales (GIST)            | Cancer du poumon non à petites cellules métastasé                                                                          |
| Mécanisme             | ATP-compétitif                                                                                                                       | ATP-compétitif                                                                                                             |
| Résultats             | 95% de survie à 5 ans                                                                                                                | 33% de survie à 1 an contre 5% avec les traitements classiques<br>6 mois de gain de survie en moyenne                      |

Figure 7 : Caractéristiques des inhibiteurs pharmacologiques de protéines kinases développés récemment (Fayette, 2003 ; Krystal, 2000 ; Paez, 2004).

## **2° partie : La protéine kinase CK2**

La protéine kinase CK2 est l'une des premières enzymes de cette famille à avoir été identifiée. La première activité protéine kinase a été découverte en 1954 par Burnett et Kenedy (Meggio, 2003). Cette activité a été détectée dans des extraits de foie de rat en utilisant la caséine comme substrat phosphorylable *in vitro*. Un fractionnement chromatographique a permis de montrer que cette phosphorylation était due à deux protéines kinases : la première à sortir de la colonne d'élution a été baptisée « CK1 », pour casein kinase 1, et la seconde « CK2 », casein kinase 2. Leurs rôles physiologiques sont demeurés énigmatiques pendant longtemps (Pinna, 1994) et sont encore incomplètement compris. Cependant, il s'avère clairement aujourd'hui que restreindre la CK2 à la seule phosphorylation de la caséine est inapproprié, compte tenu de l'incroyable diversité de ses substrats : pour cette raison, on l'appelle désormais plus sobrement « Protéine kinase CK2 ».

CK2 est classiquement représentée sous forme de tétramère, composé de deux sous-unités catalytiques CK2 $\alpha$  et d'un dimère de sous-unités régulatrices CK2 $\beta$ .

### **I- Importance fonctionnelle de la CK2**

CK2 est le prototype d'une enzyme multifonctionnelle : elle s'immisce massivement dans de nombreuses voies de signalisation où elle agit de manière déterminante. On parle alors de « master kinase ».

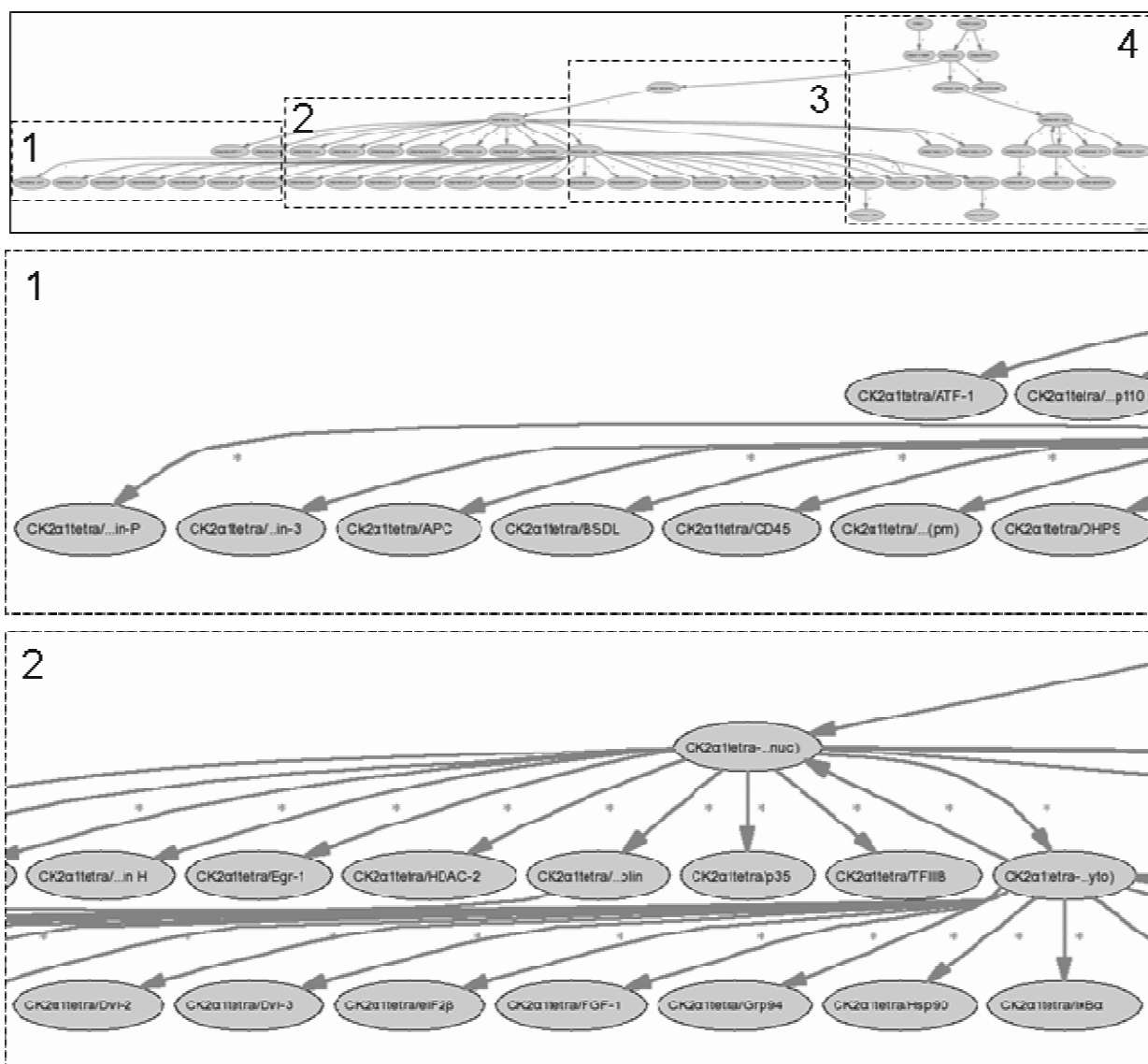
Point important, CK2 a été détectée dans tous les tissus, avec une expression importante dans le cerveau et les testicules (Xu, 1999). On la retrouve de façon ubiquitaire aussi bien chez la levure que chez l'homme (Meggio, 2003). Sa structure est **extrêmement conservée** au cours de l'évolution : ainsi, la CK2 $\alpha$  de maïs montre 30% de similarité avec la CK2 $\alpha$  humaine, et la CK2 $\alpha$  de souris est rigoureusement identique à la CK2 $\alpha$  humaine.

Contrairement à la plupart des protéines kinases, quiescentes jusqu'à ce que leur activité soit stimulée en réponse à des stimuli spécifiques et des effecteurs, CK2 est **constitutivement active** et indépendante de seconds messagers ou d'événements de phosphorylation. Un tel manque de mécanisme de régulation « on/off » est particulièrement marquant au vu de sa structure quaternaire (Pinna, 2002). Toutefois, comme nous le



décrivons plus loin, CK2 $\beta$  n'en demeure pas moins un composant central dans la régulation de CK2.

Point paradoxal, après avoir été pendant deux décennies une « protéine kinase à la recherche de ses substrats » (Pinna, 1994), CK2 est devenue la protéine kinase la plus **pléiotropique** chez les eucaryotes (Meggio, 2003). En 2002, 307 substrats de CK2 *in vitro* avaient été répertoriés et de nombreux autres sont identifiés et inventoriés régulièrement sur [www.signaling-gateway.org/molecule](http://www.signaling-gateway.org/molecule) (figure 8). Pagano (Pagano, 2006) estime que CK2 pourrait être responsable de 10 à 20% du phosphoproteome. On peut citer les principales implications de CK2 dans les voies Wnt, TNF $\alpha$ , et FasL, ou ses implications vis-à-vis des caspases, de PolIII... (Pinna, 2002) qui seront développées dans le paragraphe suivant. CK2 n'intervient cependant pas au titre d'un maillon « vertical » dans ces chaînes, mais plutôt de manière « horizontale » en régulant de manière positive ou négative certains substrats.



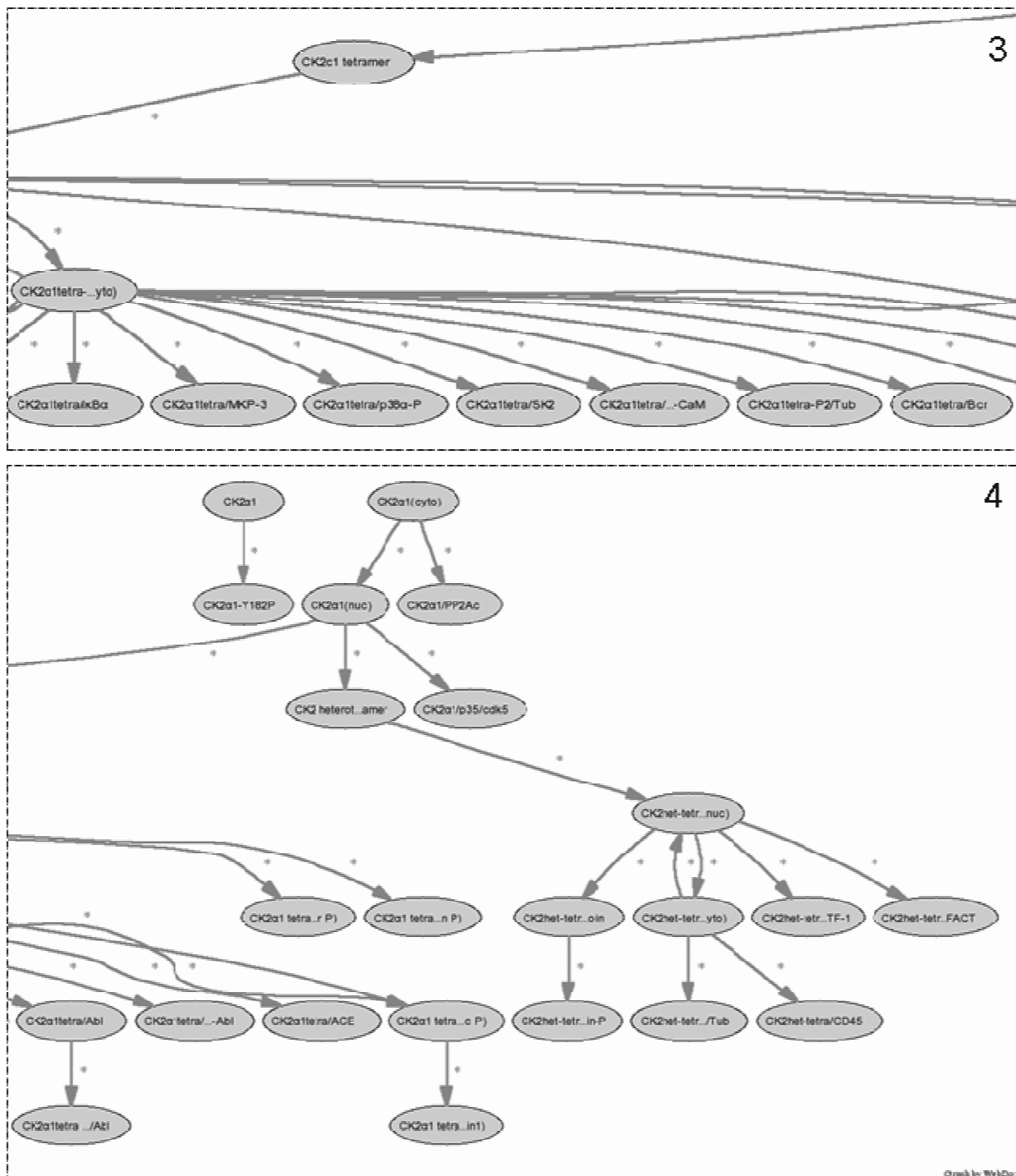


Figure 8 : Réseaux dans lesquels CK2 $\alpha$  est impliquée ([www.signaling-gateway.org/molecule](http://www.signaling-gateway.org/molecule)). Sont répertoriés sur ce site 56 états de CK2 $\alpha$ , 57 états de transitions et 145 fonctions enzymatiques.

Une des conséquences de cette surprenante pléiotropie est que la délétion aussi bien de CK2 $\alpha$  que de CK2 $\beta$  est létale chez les eucaryotes supérieurs : CK2 est impliquée dans une telle variété de voies de signalisation que, même si chacune de ses tâches n'est peut-être pas indispensable, l'ensemble des phosphorylations dont elle est responsable, prises collectivement, sont d'une importance vitale (Pinna, 2002).

## **1- CK2 et les décisions cellulaires de vie et de mort**

### **a- Rôle de CK2 dans la régulation du cycle de la division cellulaire**

CK2 a été décrite comme intervenant à différentes étapes du cycle cellulaire. Ainsi, chez la levure, la présence de CK2 est requise pour les transitions des phases G<sub>1</sub>/S et G<sub>2</sub>/M (Glover, 1998). De même, dans des cellules de mammifères, l'inhibition de CK2 par des oligonucléotides antisens, des anticorps anti-CK2 ou par des inhibiteurs chimiques provoque un arrêt du cycle cellulaire. On sait par ailleurs que CK2 peut s'associer au fuseau mitotique et aux centrosomes, et qu'elle interagit avec Pin-1, checkpoint de la réplication (Litchfield, 2003).

CK2 intervient donc dans le contrôle de la division cellulaire, notamment en phosphorylant différentes protéines importantes dans la régulation du cycle de division cellulaire (p34, cdc34, Topoll...) (Litchfield, 2003).

### **b- Rôle de CK2 dans la survie et l'apoptose**

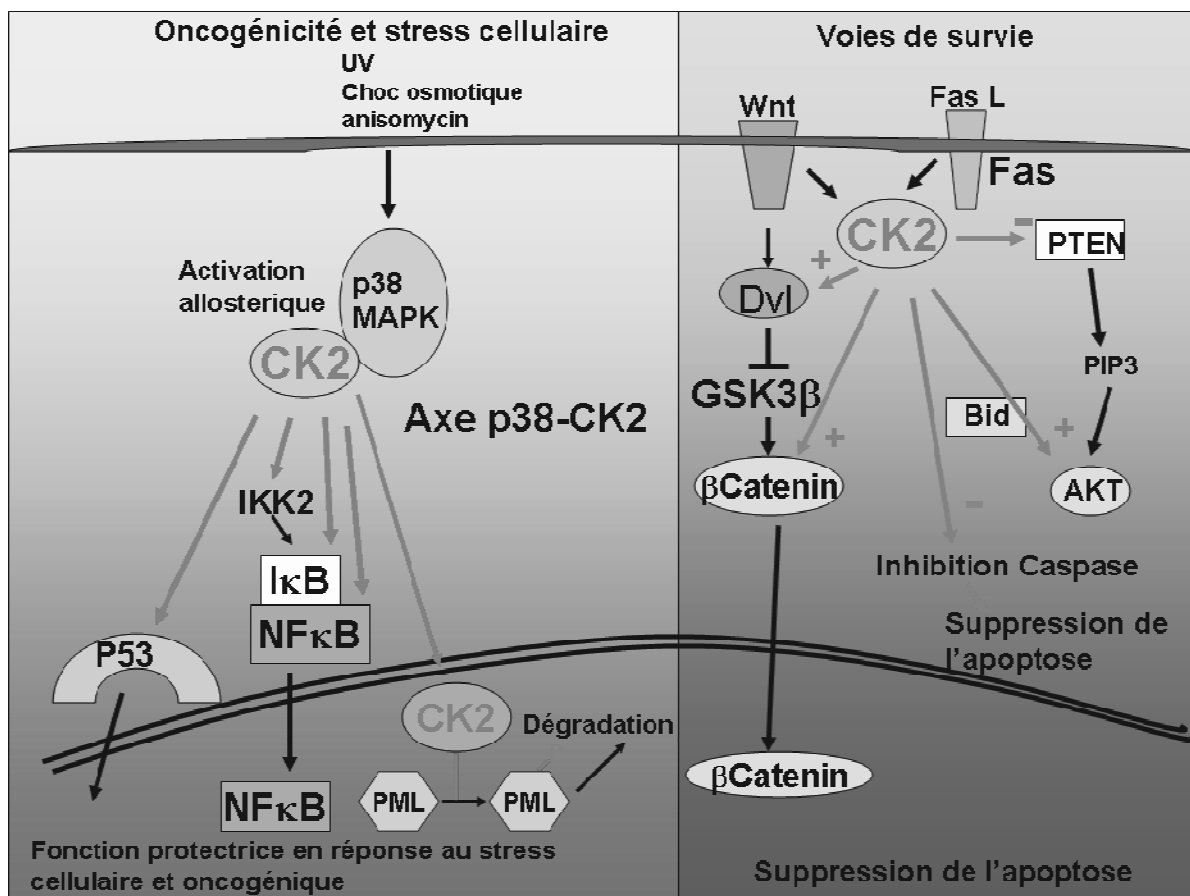
Des expériences réalisées avec de la CK2 inactive chez la levure montrent que non seulement la présence mais aussi l'activité catalytique de CK2 sont nécessaires à la viabilité des levures (Glover, 1998).

Plus récemment, la fonction antiapoptotique de CK2 a été suggérée en démontrant son rôle dans **l'inhibition de la voie des caspases** à travers différents mécanismes : la phosphorylation par CK2 de certaines protéines proapoptotiques (**Bid**, **HS1**, **ARC...**) ou proto-oncogéniques (**Max...**) les protège de la dégradation par les caspases (caspase 8 notamment), figure 9, (Litchfield, 2003). Ceci contribue à la survie cellulaire et souligne la fonction anti-apoptotique de CK2.

Autre argument allant dans le même sens, une augmentation de l'expression de CK2 contrecarre l'apoptose induite par l'etoposide et le diethylstilbestrol dans des cellules cancéreuses de prostate (Guo, 2001). De même, des inhibiteurs de CK2 (TBB) ou des oligonucléotides antisens déclenchent l'apoptose et augmentent la sensibilité des cellules tumorales aux agents chimiques thérapeutiques et aux stimuli apoptotiques (Ruzzene, 2002 ; Ravi 2002 ; Faust, 2000).

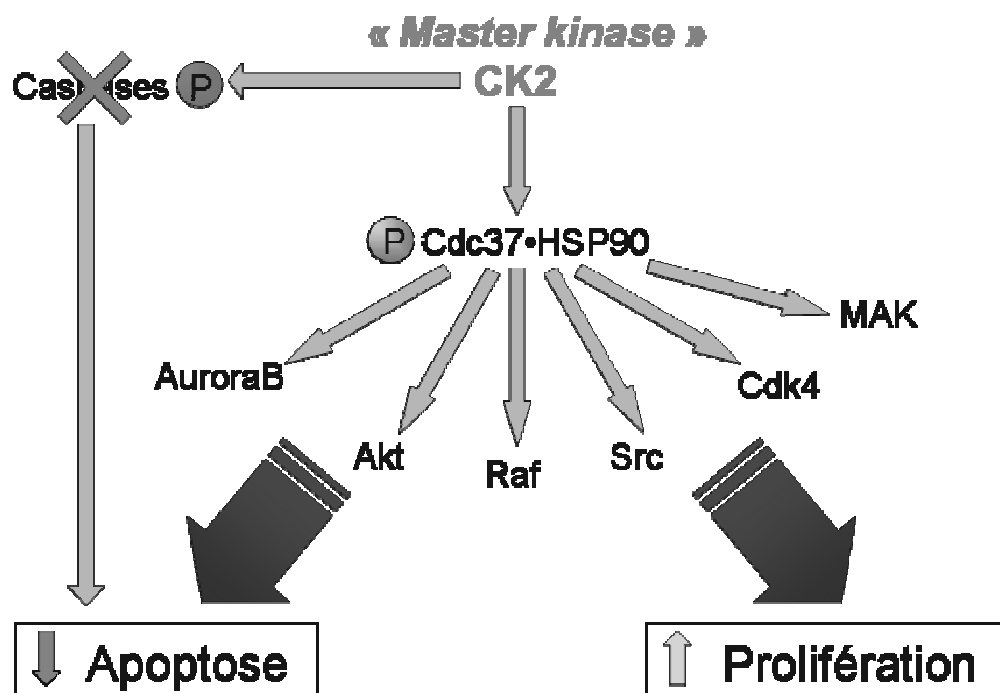
CK2 **stimule la voie de signalisation PI3K-AKT**, connue pour son rôle déterminant dans le contrôle de la prolifération et de la survie cellulaire (Guerra, 2006 ; Di Maira, 2005). L'altération de cette cascade de signalisation est fréquemment observée dans les tumeurs humaines (Osaki, 2004). L'inhibition de CK2 par différents inhibiteurs chimiques ou son atténuation par des siRNA a pour conséquence une régulation négative de Akt/PKB (Di Maira, 2005) et une induction de l'apoptose (Guerra, 2006 ; Olsen, 2007).

Par ailleurs, d'autres auteurs rapportent une implication de CK2 dans les voies de signalisation en réponse à différents stress (Ahmed, 2002), figure 9. Une augmentation de la phosphorylation de **p53** par CK2 a été observée **en réponse à différents types de stress** (UV, choc thermique,  $TNF\alpha$ ). Inversement, p53 sauvage inhibe CK2 (Schuster, 2001 ; Litchfield, 2003). Des radiations UV provoquent également une activation de CK2 de manière p38-MAPK dépendante, conduisant à la phosphorylation et à la dégradation de I $\kappa$ B (Kato, 2003). De même, la phosphorylation par CK2 du suppresseur de tumeur **PML** provoque sa dégradation. Or PML prend part au processus d'apoptose et de sénescence, et est souvent dégradé par le protéasome dans les cancers du poumon non-à-petites-cellules (Scaglioni, 2006 ; Lallemand-Breitenbach, 2006).



**Figure 9 : Principales voies impliquant CK2 dans la réponse au stress cellulaire et les voies de survie** (Scaglioni, 2006 ; Lallemand-Breitenbach, 2006 ; Hildesheim, 2005 ; Kato, 2003 ; Kweon, 2006 ; Ahmed, 2002). A gauche : Conditions de stress. Le stress engendre la formation du complexe p38-MAPK/CK2 qui permet la phosphorylation de p53 par CK2, induisant l'activité transcriptionnelle de p53. Le TNF $\alpha$  (Tumor necrosis factor  $\alpha$ ) ou l'IL-1 (Interleukin 1) augmentent l'activité transcriptionnelle de NF- $\kappa$ B via une phosphorylation par CK2 qui induit une translocation nucléaire du facteur NF- $\kappa$ B. CK2 phosphoryle également les protéines inhibitrices I $\kappa$ B et PML, aboutissant à leur dégradation. A droite : Survie cellulaire. Les protéines Dvl (Dishevelled) et  $\beta$ -caténine, appartenant à la voie de signalisation Wnt, sont phosphorylées par CK2, ce qui induit la stabilisation de la  $\beta$ -caténine et sa relocalisation nucléaire. Enfin, lorsque CK2 phosphoryle la protéine pro-apoptotique Bid (voie de signalisation apoptotique liée au récepteur Fas), le clivage de Bid par la caspase-8 est inhibé, empêchant le déclenchement de l'apoptose.

Plusieurs observations permettent d'attribuer à la CK2 les propriétés d'une « master kinase ». CK2 phosphoryle la co-chaperonne **Cdc37** et cette phosphorylation est nécessaire à son activité. Cdc37 est le pivot d'une série d'activations (repliement notamment) d'autres protéines kinases en aval, en coopération avec la chaperonne Hsp90 : Src, Raf1, Akt, MOK, AuroraB,...(figure 10, Miyata, 2005). Point remarquable, ces protéines kinases collaborent *in fine* à la stimulation de la prolifération et au blocage de l'apoptose.



**Figure 10 : Autre action de CK2 contribuant à l'augmentation de la prolifération et à l'inhibition de l'apoptose.** D'une part, la phosphorylation par CK2 du complexe Cdc37-HSP90 permet l'activation d'une série de protéines kinases en aval (Aurora B, Akt, Raf...) qui participent à ces deux phénomènes. D'autre part, la phosphorylation par CK2 des caspases a un effet inactivateur et renforce ces effets (adapté de Miyata, 2005).

Enfin, on peut signaler que CK2 se retrouve également impliquée dans de nombreux autres processus tels le développement embryonnaire, la différenciation, la réplication virale, la transition nucléocytoplasmique, la transcription, la traduction et la maturation des protéines, la transformation, la polarité cellulaire, la synthèse d'ARNt,... (pour revue, Ghavidel, 2001 ; Tawfic, 2001 ; Litchfield, 2003 ; [www.signaling-gateway.org](http://www.signaling-gateway.org) ).

Pris collectivement, ces résultats suggèrent que CK2 est bien un régulateur essentiel des voies contrôlant la prolifération et la survie cellulaire et concourent au surcroît d'intérêt porté récemment à cette protéine kinase (Meggio, 2003).

## **2- CK2 et cancer**

Compte tenu de son rôle central dans la régulation des voies de signalisation qui contrôlent la prolifération et la survie cellulaire, il n'est pas étonnant qu'un lien CK2-cancer ait été établi. Ainsi, dans de nombreux types de tumeurs, l'activité de CK2 est dérégulée. De plus, un déséquilibre dans l'expression des deux sous-unités est souvent détecté.

### **a- CK2 est un oncogène**

Le potentiel oncogénique de CK2 a d'abord été suggéré par l'observation agronomique suivante : des animaux de bétail infectés par le parasite *Theileria parva* développent un syndrome lymphoprolifératif fatal associé à une surexpression de CK2 (Seldin, 1995). Cette observation a été confirmée dans un modèle de souris transgéniques coexprimant c-Myc et CK2 dans leurs lymphocytes : cette expression ciblée conduit à une leucémie néo-natale (Channavajhala, 2002). Dès lors, CK2 a été considérée comme un oncogène.

Cette notion a depuis été renforcée par plusieurs observations. Nous ne décrivons ici que deux exemples.

#### **○ Surexpression de CK2 dans les tumeurs mammaires**

**CK2 est surexprimée** aussi bien **dans des tumeurs mammaires** de rat (induites par le gavage au 7,12-dimethylbenz[a]anthracène, DMAB) que dans des tumeurs mammaires humaines. Cette surexpression peut être reproduite artificiellement, à l'aide de souris transgéniques PPTV-CK2 $\alpha$ , et conduit elle aussi à une hyperplasie et dysplasie de la glande mammaire (figures 11 et 12). La surexpression de CK2 est donc bien associée à la tumorigenèse mammaire (Landesman-Bollag, 2001).

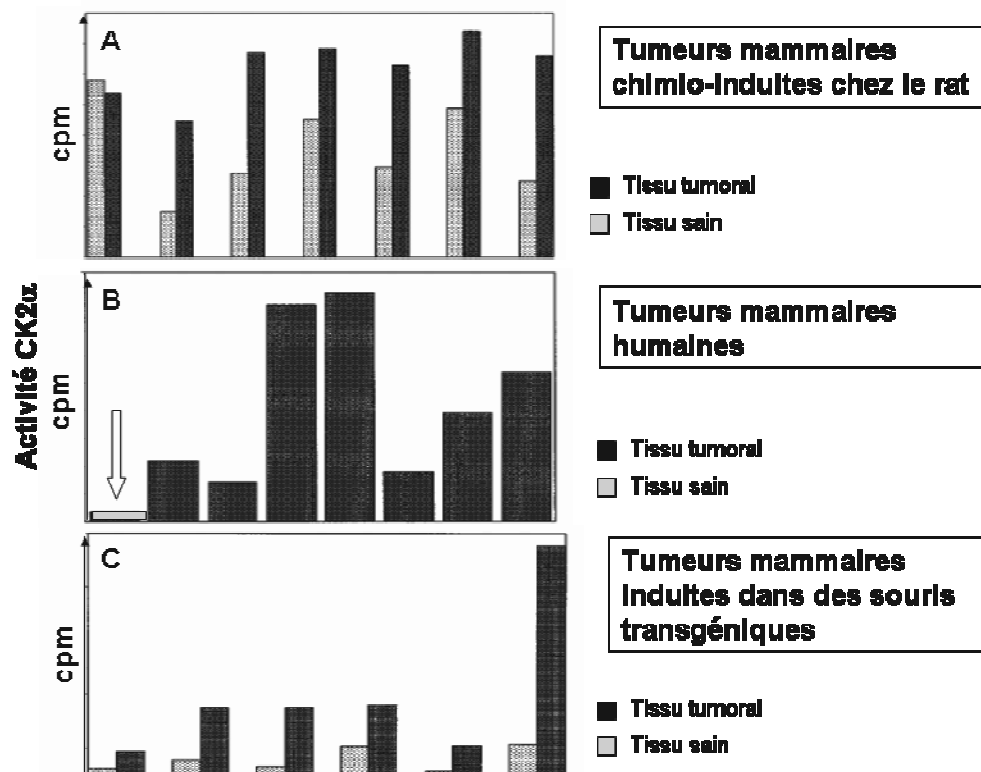


Figure 11 : Activité CK2 détectée dans différentes tumeurs mammaires. A : mesure chez 7 rats ayant une tumeur mammaire chimio-induite ; B : mesure dans 7 biopsies humaines ; C : mesure chez 6 souris transgéniques ayant des tumeurs mammaires induites (Landesman-Bollag, 2001).

| TISSUS     | CK2 (pmol/min/mg) | T / N |
|------------|-------------------|-------|
| NORMAL     | 10.8 ± 5.3        |       |
| BENIN      | 16.3 ± 3.2        | 1.6   |
| CANCER     | 71 ± 34.9         | 6.6   |
| METASTASES | 77.7 ± 31.6       | 7.2   |

T/N = Tumeur / Normal

Figure 12 : Une surexpression de CK2 est détectée dans les carcinomes mammaires (Landesman-Bollag, 2001).

- Stabilisation d'oncogènes et/ou déstabilisation de suppresseurs de tumeur

CK2, par ses phosphorylations, stabilise des oncogènes critiques ( $\beta$ -catenin dans la **voie Wnt**), alors insensibles à la dégradation par le protéasome, et participe ainsi à la tumorigenèse (Seldin, 2005), figure 13.

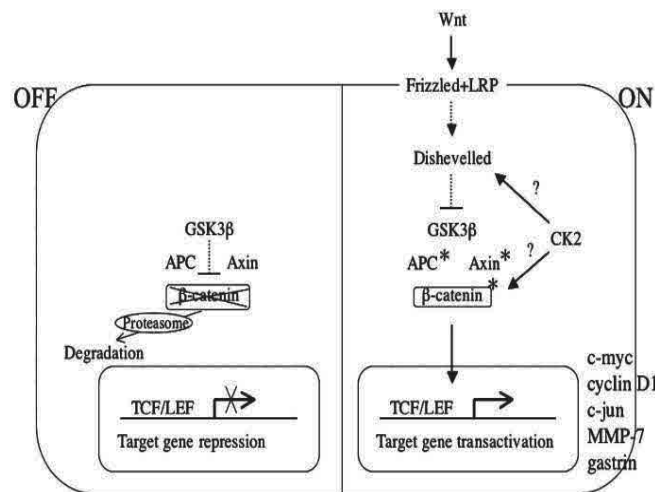


Figure 13 : **Représentation schématique de la voie Wnt.** En l'absence de stimulation de la voie Wnt (OFF, à gauche), GSK3 $\beta$  phosphoryle la  $\beta$ -caténine, induisant sa dégradation dans le protéasome. En présence d'un signal Wnt (ON, à droite), GSK3 $\beta$  est inhibée d'une part et CK2 phosphoryle la  $\beta$ -caténine d'autre part, ce qui stabilise la  $\beta$ -caténine et lui permet de transactiver des gènes impliqués dans la prolifération, la survie et la formation de métastases (Seldin, 2005).

A l'opposé, comme déjà décrit précédemment, la phosphorylation du suppresseur de tumeur PML conduit à sa dégradation dans le protéasome (Scaglioni, 2006).

CK2 régule donc de nombreux acteurs moléculaires de la cancérogenèse (Buchou, 2003).

### **b- CK2 est un marqueur de mauvais pronostic**

Plusieurs études ont permis d'établir que la surexpression de CK2 dans certains cancers est corrélée à un mauvais pronostic.

#### **o Carcinome du poulmon à cellules squameuses**

La première étude à montrer une corrélation entre une surexpression de CK2 $\alpha$  et un mauvais pronostic a été réalisée en 2004 (O-Charoenrat, 2004). Parmi les 16 patients étudiés atteints de carcinome à cellules squameuses, 6 présentaient une surexpression de CK2 $\alpha$  (cluster 3) et les 10 autres un niveau d'expression normal (cluster 2). La survie des patients à 90 mois chute rapidement dans le groupe surexprimant CK2 $\alpha$  (10%) alors qu'elle se maintient à 50% dans le cluster 2 (Figure 14-A).



- Leucémie myéloïde aiguë

Une autre étude réalisée par un groupe coréen sur 48 patients atteints de leucémie myéloïde aiguë a également établi une corrélation impressionnante entre la surexpression de CK2 $\alpha$  et la survie globale à 4 ans (Kim, 2007, figure 14-B).

- Adénocarcinomes de prostate

Enfin, dans une étude publiée en 2007, le laboratoire a mis en évidence que la surexpression de CK2 $\alpha$  observée par immunohistochimie sur une cohorte de 131 adénocarcinomes de prostate était un facteur de mauvais pronostic de cette pathologie (Laramas, 2007, figure 14-C). De plus, la localisation nucléaire de CK2 $\alpha$  est significativement corrélée à un score de Gleason élevé ( $\geq 7$ ), un tableau clinique avancé (cT3-T4) et davantage d'invasion lymphatique.

Score de Gleason : Un score de Gleason élevé équivaut à un mauvais pronostic. Il est établi à partir de l'examen d'une biopsie. Il se chiffre de 1 à 10. Il est calculé comme la somme de 2 scores évaluant les deux types de patterns prédominants (chacun notés de 1 à 5 avec 1 = le tissu ressemble à un tissu normal ; 5 = le tissu n'a pas de glandes reconnaissables).

Système TNM staging : Tumor, Node, Metastasis. Ce score évalue l'état d'avancement du cancer : taille de la tumeur, profondeur, envahissement des ganglions lymphatiques... afin d'orienter le traitement. Par exemple, pour une valeur cT3N1M0 :

- la première lettre définit le stade clinique (c, examen physique et radiologique) ou le stade pathologique (p, examen microscopique).

- T : tumeur primaire, de 0 à 4 (0 = *in situ*, 4 = métastases généralisées)

- N : envahissement des ganglions lymphatiques. De 0 à 4.

- M : métastases, 0 ou 1 (0 = pas de métastases, 1 = métastases).

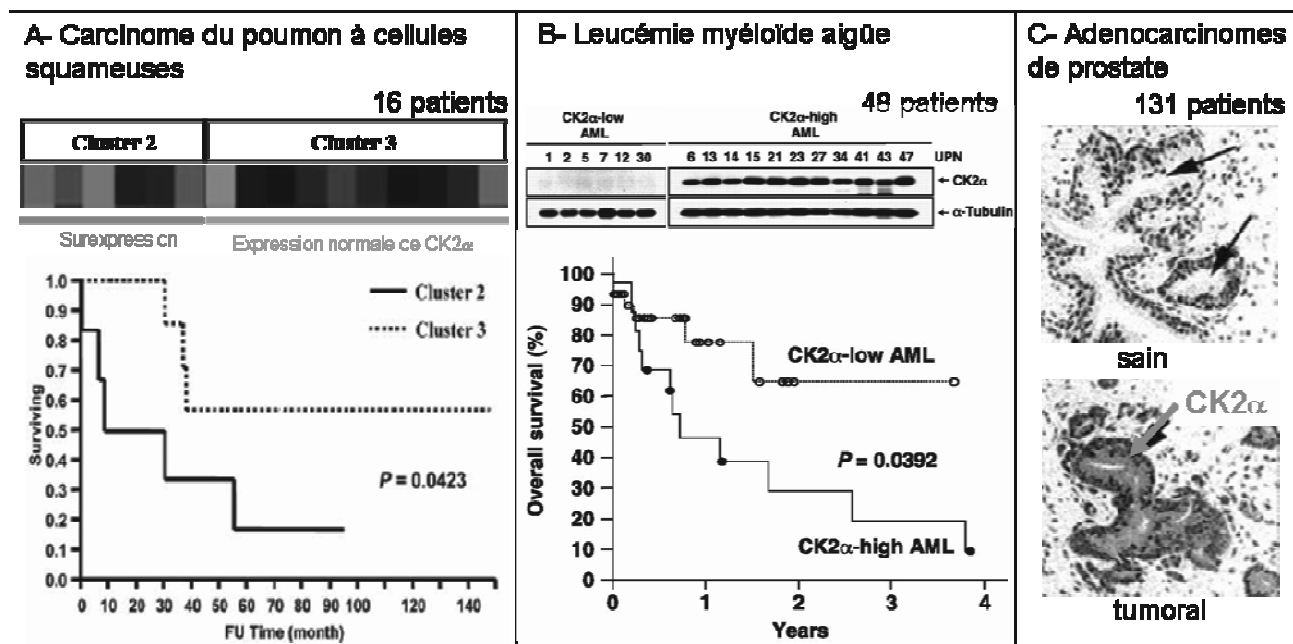


Figure 14 : La surexpression de CK2a est corrélée à un mauvais pronostic.

Au total, ces observations concourent à définir CK2 comme un biomarqueur de pronostic défavorable utilisable en clinique mais également comme une cible thérapeutique prometteuse.

### c- CK2 est une cible thérapeutique potentielle

Les premiers essais d'inhibition de CK2 ont montré un arrêt de la croissance tumorale d'une part, et une régression tumorale d'autre part.

Ainsi, l'inhibition de CK2 par des oligonucléotides antisens entraîne une **régression de xénogreffes tumorales de prostate** dans des souris *nude* (Slaton, 2004), figure 15.

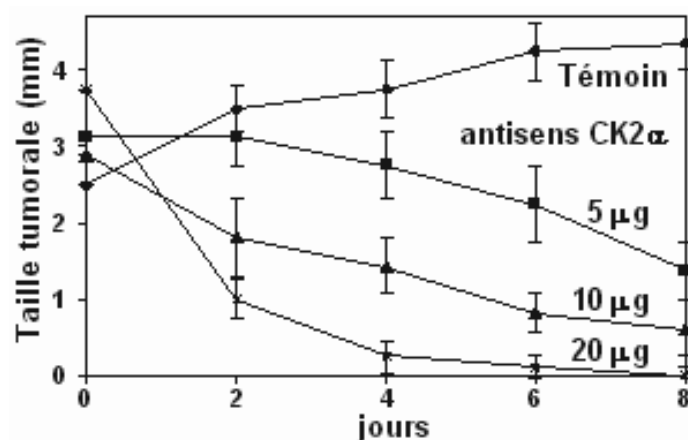


Figure 15 : Effets de l'administration directe d'oligonucléotides antisens CK2 $\alpha$  dans des xénogreffes tumorales de prostate.

De plus, l'inhibition de l'activité catalytique de CK2 (par le DRB, 5,6-dichlorobenzimidazole) ou de son expression par un shRNA dans des cellules tumorales de colon **restaure l'apoptose** induite par le facteur TRAIL (figure 16, Izeradjene ; 2005, Shin, 2005).

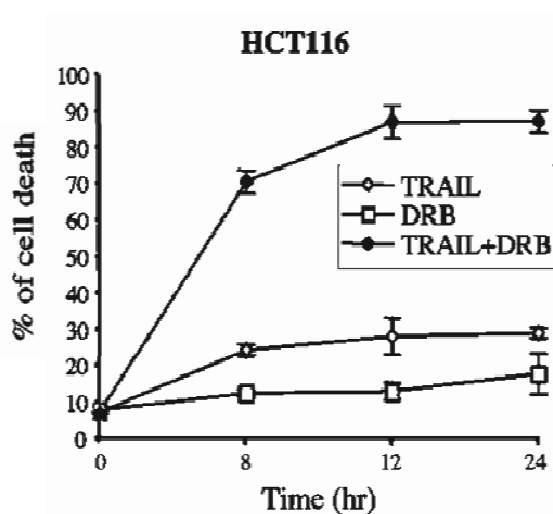
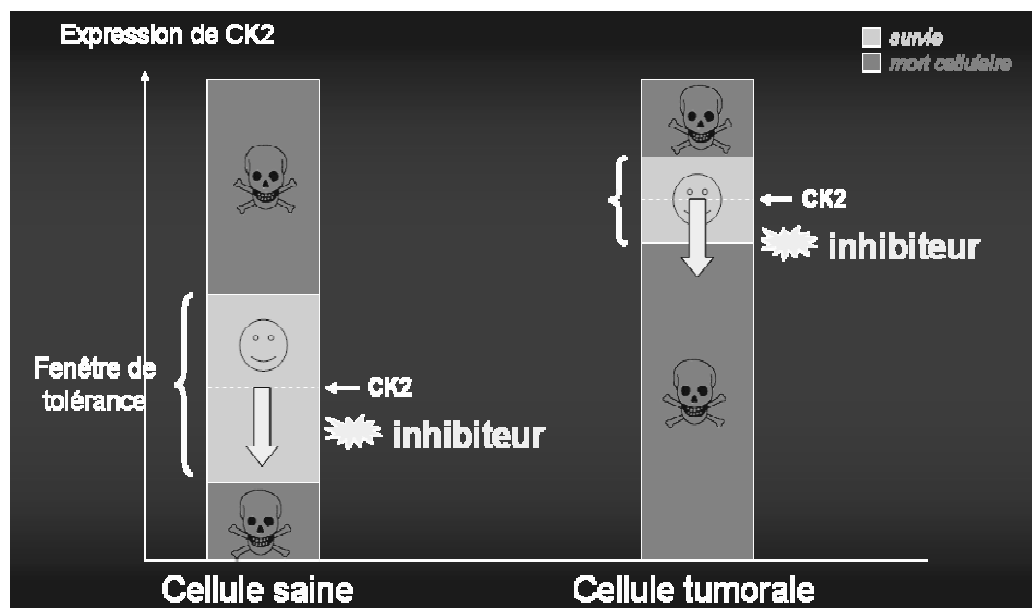


Figure 16 : Cellules tumorales de colon traitées avec le facteur pro-apoptotique TRAIL en présence ou en absence d'un inhibiteur de CK2 (DRB).

Point important, cette apoptose induite n'affecte pas les cellules saines, pas ou peu sensibles aux antisens anti-CK2. Cette sensibilité différentielle des cellules saines et tumorales peut représenter une opportunité pour le développement d'inhibiteurs thérapeutiques. Elle permet également d'avancer que, contrairement à une idée répandue – il ne serait pas judicieux d'inhiber une enzyme ubiquitaire et vitale pour les cellules –, cette sensibilité différentielle peut représenter une « fenêtre thérapeutique » (figure 17). Une cellule saine a un niveau d'expression de CK2 $\alpha$  bas, contrairement à une cellule tumorale dont la survie dépend fortement d'une surexpression de CK2.



**Figure 17 : Hypothèse expliquant pourquoi inhiber CK2, pourtant ubiquitaire et vitale, peut être bénéfique face à des cellules tumorales** (basé sur les observations de Slaton, 2004). L'inhibition de CK2 par des oligonucléotides antisens entraîne une régression de xénogreffes tumorales de prostate sans affecter les cellules normales *in vivo* (Slaton, 2004).

En outre, inhiber CK2 peut avoir un **effet synergique** vis-à-vis d'autres molécules thérapeutiques et potentialiser leurs effets. Des inhibiteurs de CK2 (TBB) ou des oligonucléotides antisens déclenchent l'apoptose et augmentent la sensibilité des cellules tumorales aux agents chimiques thérapeutiques et aux stimuli apoptotiques (Ruzzene, 2002 ; Ravi, 2002 ; Faust, 2000). Selon Seeber (2005), atténuer l'activité de CK2 par des oligonucléotides antisens ou des siRNA serait insuffisant pour induire une apoptose.

Enfin, une étude (Perea, 2004) a identifié par phage-display un peptide cyclique inhibiteur de CK2, P15, c(CWMSPRHLGTC). Ce peptide, fusionné au peptide de pénétration cellulaire Tat dérivé de la protéine HIV-Tat ( $^{48}\text{GRKKRRQRRRPPQ}^{68}$ ), induit l'apoptose dans différentes lignées tumorales (poumon : TC-1, H-125, H-82 ; col de l'utérus : SiHa, CaSki, HeLa ; leucémie : Jurkat). Injecté à des souris porteuses de xénogreffes de cellules TC-1, ce peptide induit une régression tumorale (figure 18).

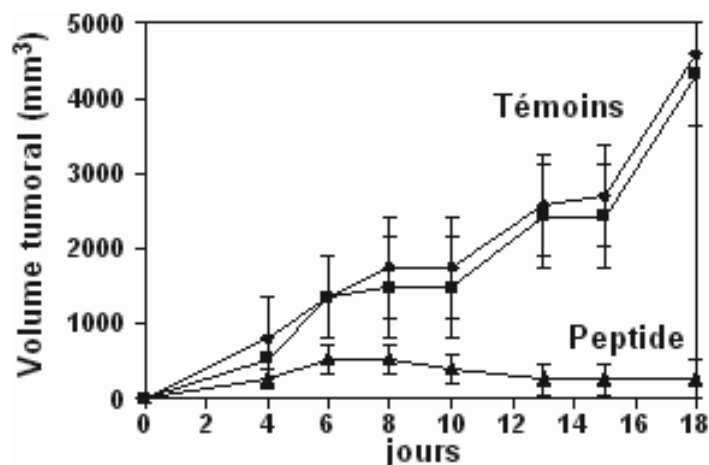


Figure 18 : Régression observée dans des xénogreffes tumorales par l'injection quotidienne du peptide P15-Tat (Perea, 2004).

Au total, ces résultats sont encourageants pour développer des inhibiteurs chimiques de CK2.

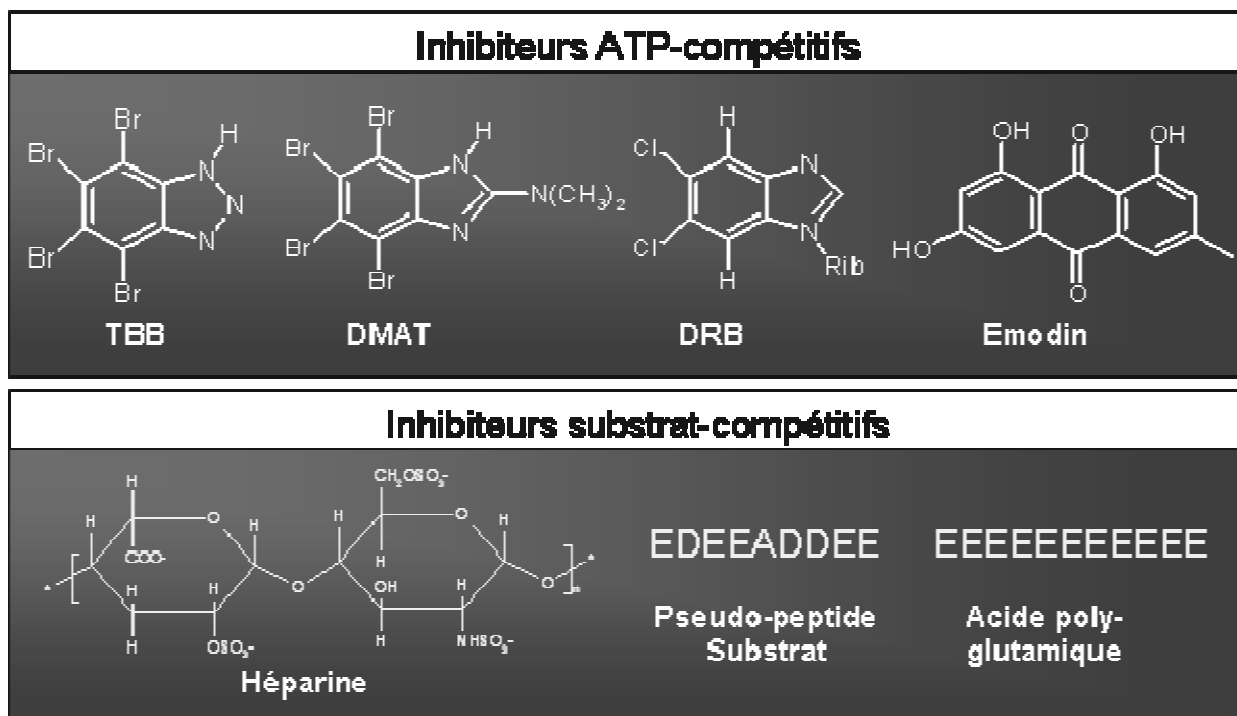
### 3- Inhibiteurs connus de CK2

La stratégie principale a consisté à identifier des inhibiteurs chimiques de son activité catalytique.

L'inhibiteur chimique de référence est le **TBB (tétra-bromobenzimidazole)**, figure 19, développé par le groupe de L. Pinna (Sarno, 2005). Il est relativement puissant ( $IC_{50} = 1\mu M$ ) et spécifique (vis-à-vis de 33 protéines kinases testées). Cette surprenante spécificité peut être atteinte car, contrairement aux autres protéines kinases, CK2 présente une poche catalytique plus petite au niveau du site de fixation de l'ATP. Malheureusement, aucun résultat d'efficacité du TBB dans des modèles animaux n'a été publié, suggérant des échecs à ce niveau. De nombreux analogues ont été dérivés (figure 19), dont le DMAT (2-diméthylamino-4,5,6,7-tetrabromo-1H-benzimidazole),  $IC_{50} = 0,14\mu M$ .

D'autres classes d'inhibiteurs, moins spécifiques, ont également été répertoriées : des composés de type flavonoïdes, des dérivés de l'hydroxyantraquinone, des hydroxycoumarines, debenzimidazoles halogénés et d'indoloquinazoline (figure 19). Dans tous les cas, ces composés miment l'ATP et occupent sa place dans la poche du site catalytique.

D'autres inhibiteurs sont compétitifs vis-à-vis du substrat protéique de CK2 : l'héparine, un pseudo-peptide substrat et l'acide poly-glutamique (figure 19). Ils sont puissants *in vitro* mais se révèlent instables en milieu biologique et peu perméables à travers les membranes.



**Figure 19 : Inhibiteurs de CK2 publiés.** Tous ciblent CK2 $\alpha$  et la plupart sont ATP-compétitifs. Quelques uns sont substrat-compétitifs ou non-compétitifs. (Sarno, 2005 ; Pagano, 2004 ; Pagano, 2004 ; Zien, 2003 ; Sarno, 2002 ; Cozza, 2006 ; Battistutta, 2000 ; Sarno, 2003).

Pourtant, à ce jour, trois principales faiblesses touchent ces inhibiteurs :

- En premier lieu, aucun n'a été validé chez l'animal (Sarno, 2005). Il demeure donc des problèmes métaboliques faisant que le composé n'atteint pas sa cible. Ceci a trait au degré de complexité plus élevé d'un organisme entier par rapport à une culture cellulaire et justifie la nécessité de poursuivre la recherche de nouveaux inhibiteurs.
- D'autre part, la majorité de ces inhibiteurs décrits sont ATP-compétitifs et on se heurte aux contraintes inhérentes à ce type de mécanisme : les molécules étant des mimétiques de l'ATP, il est probable qu'elles puissent interférer avec d'autres processus ATP-dépendants, ce qui diminue leur spécificité. La concentration cellulaire en ATP étant d'environ 1mM, ces composés devront entrer en compétition avec celui-ci, ce qui augmente la difficulté. Le développement d'inhibiteurs possédant un mode d'action inédit serait souhaitable.
- Enfin, des composés inhibiteurs de l'activité catalytique d'une protéine kinase aussi pléiotropique que CK2 inhibent la protéine kinase en bloc, et neutralisent globalement sans spécificité toutes les voies dans lesquelles elle intervient. Comme nous allons le voir, la structure quaternaire de la CK2 permet d'envisager d'autres stratégies

novatrices pour le développement d'inhibiteurs permettant une modulation plus fine, « à la carte » de différentes voies de signalisation.

Dans ce contexte, la résolution de la structure tridimensionnelle de la CK2, aussi bien de ses sous-unités individuelles que du tétramère nous a apporté un éclairage indispensable pour la conception de nouvelles molécules inhibitrices.

## II- Structure de la CK2

Contrairement à la majorité des protéines kinases, CK2 est une enzyme classiquement décrite sous la forme d'un tétramère composé de 2 sous-unités catalytiques (isoformes CK2 $\alpha$  et/ou CK2 $\alpha'$ ) et 2 sous-unités régulatrices (CK2 $\beta$ ).

### 1- Sous-unité catalytique CK2 $\alpha$

La structure de la sous-unité catalytique est comparable à celle des autres protéines kinases, avec deux lobes articulés autour d'une charnière, l'un riche en hélices  $\alpha$  et l'autre en feuillets  $\beta$  (figures 20 et 21). La plupart des inhibiteurs développés jusqu'à présent visent son site catalytique, en particulier le site de fixation de l'ATP qui est légèrement plus étroit que celui des autres protéines kinases, ce qui permet d'envisager des inhibiteurs spécifiques.

|                                |             |            |            |             |            |             |
|--------------------------------|-------------|------------|------------|-------------|------------|-------------|
| <b>CK2<math>\alpha</math></b>  | 10          | 20         | 30         | 40          | 50         | 60          |
|                                | MSGPVPSPRAR | VYTDVNTHRP | REYWDYESHV | VEWGNQDDYQ  | LVRKLGRGKY | SEVF EAINIT |
|                                | 70          | 80         | 90         | 100         | 110        | 120         |
| <b>391aa</b>                   | NNEKVVKIL   | KPVKKKKIKR | EIKILENLRG | GPNIITLADI  | VKDPVSRTPA | LVFEHVNNTD  |
|                                | 130         | 140        | 150        | 160         | 170        | 180         |
| <b>45144Da</b>                 | FKQLYQTLTD  | YDIRFYMYEI | LKALDYCHSM | GIMHRDVKPH  | NVMIDHEHRK | LRLIDWGLAE  |
|                                | 190         | 200        | 210        | 220         | 230        | 240         |
| <b>ACC#</b>                    | FYHPGQEYNV  | RVASRYFKGP | ELLVDYQMYD | YSLDMWSLGC  | MLASMIFRKE | PFFHGHNDYD  |
| <b>P68400</b>                  | 250         | 260        | 270        | 280         | 290        | 300         |
|                                | QLVRIAKVLG  | TEDLYDYIDK | YNIELDPRFN | DILGRHSRKR  | WERFVHSENQ | HLVSPEALDF  |
|                                | 310         | 320        | 330        | 340         | 350        | 360         |
|                                | LDKLLRYDHQ  | SRLTAREAME | HPYFYTVVKD | QARMGSSSMP  | GGSTPVSSAN | MMSGISSVPT  |
|                                | 370         | 380        | 390        |             |            |             |
|                                | PSPLGPLAGS  | PVIAAANPLG | MPVPAAAGAQ | Q           |            |             |
| <b>CK2<math>\alpha'</math></b> | 10          | 20         | 30         | 40          | 50         | 60          |
|                                | MPGPAAGSRA  | RVYAEVNSLR | SREYWDYEAH | VPSWGNQDDY  | QLVRKLGRGK | YSEVF EAINI |
|                                | 70          | 80         | 90         | 100         | 110        | 120         |
| <b>350aa</b>                   | TNNERVVVKI  | LKPVKKKKIK | REVKILENLR | GGTNI IKLID | TVKDPVSKTP | ALVF EYINNT |
|                                | 130         | 140        | 150        | 160         | 170        | 180         |
| <b>41213Da</b>                 | DFKQLYQILT  | DFDIRFYMYE | LLKALDYCHS | KGIMHRDVKP  | HNVMIDHQK  | KLRLIDWGLA  |
|                                | 190         | 200        | 210        | 220         | 230        | 240         |
| <b>ACC#</b>                    | EFYHPAQEYN  | VRVASRYFKG | PELLVDYQMY | DYSLDMWSLG  | CMLASMIFRR | EPFFHGDQNY  |
| <b>P19784</b>                  | 250         | 260        | 270        | 280         | 290        | 300         |
|                                | DQLVRIAKVL  | GTEELYGYLK | KYHIDLDPHF | NDILGQHSRK  | RWENFIHSEN | RHLVSPEALD  |



|  |            |            |            |            |            |
|--|------------|------------|------------|------------|------------|
|  | 310        | 320        | 330        | 340        | 350        |
|  | LLDKLLRYDH | QQRLTAKEAM | EHFYFYPVVK | EQSQPCADNA | VLSSGLTAAR |

Figure 20 : Séquences protéiques de la CK2 $\alpha$  et  $\alpha'$  ([www.expasy.org](http://www.expasy.org)).

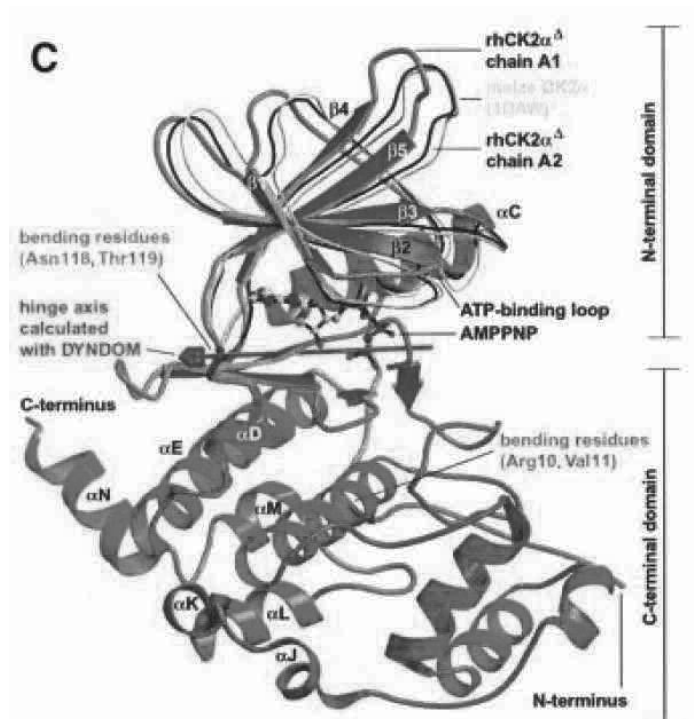


Figure 21 : Structure cristallographique de la sous-unité catalytique CK2 $\alpha$  (d'après pdb 1JWH, Niefind, 2001).

## 2- Sous-unité régulatrice CK2 $\beta$ :

La plupart des protéines kinases fonctionnent de manière monomérique. Seule une poignée d'entre elles ont une architecture multimérique : la Phosphorylase kinase, la cAMP-dépendant protéine kinase, les cyclin-dépendant protéine kinases, la DNA-dépendant protéine kinase, la 5'-AMP-activated protéine kinase, I $\kappa$ B kinase, PKA. La CK2 fait partie de ces protéines kinases multimériques car sa sous-unité catalytique s'associe avec une haute affinité avec une sous-unité régulatrice CK2 $\beta$  pour former un complexe hétérotétramérique CK2 $\alpha$ 2 $\beta$ 2.

La sous-unité régulatrice CK2 $\beta$  a une structure primaire unique et aucun homologue évident chez les mammifères, bien qu'elle soit présente chez la *Drosophile* ou *Saccharomyces cerevisiae* (Pinna, 2002). Elle est extraordinairement conservée entre les espèces : la CK2 $\beta$  de levure présente 45% d'homologie avec la séquence de mammifères (Bidwai, 1995), et celles de poule, de souris et d'homme sont rigoureusement identiques (figure 22).

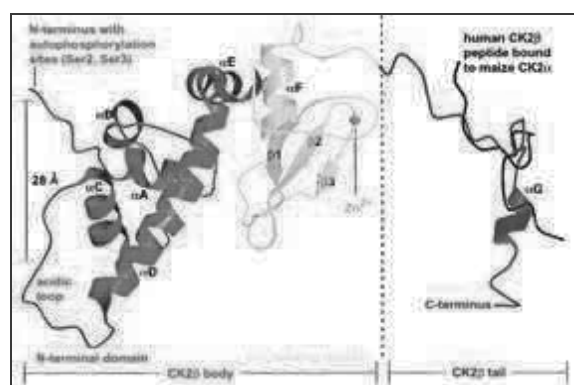
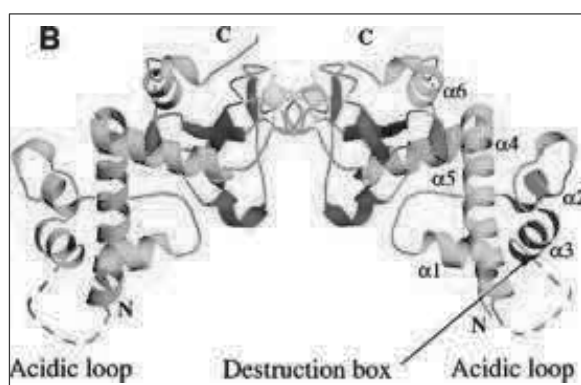
L'inactivation génique de *ck2β* chez la souris est létale précocement chez l'embryon (Buchou, 2003). Elle provoque l'absence de fission chez la levure *Saccharomyces pombe*. Ces travaux démontrent le caractère essentiel de CK2β pour la viabilité et la croissance cellulaire respectivement ([www.signaling-gateway.org](http://www.signaling-gateway.org)).

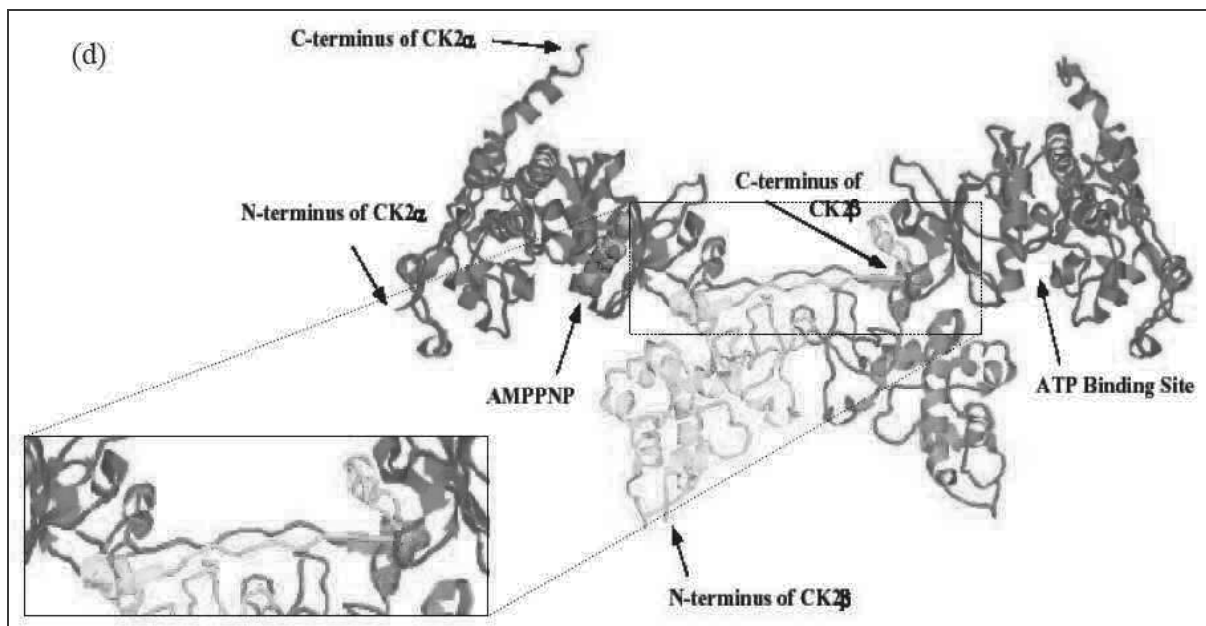
|                |            |            |             |            |            |            |
|----------------|------------|------------|-------------|------------|------------|------------|
| <b>ck2β</b>    | 10         | 20         | 30          | 40         | 50         | 60         |
|                | MSSSEEVSWI | SWFCGLRGNE | FFCEVDEDEYI | QDKFNLTGLN | EQVPHYRQAL | DMILDLEPDE |
| <b>215aa</b>   | 70         | 80         | 90          | 100        | 110        | 120        |
|                | ELEDNPNQSD | LIEQAAEMLY | GLIHARYILT  | NRGIAQMLEK | YQQGDFGYCP | RVYCENQPML |
| <b>24942Da</b> | 130        | 140        | 150         | 160        | 170        | 180        |
|                | PIGLSDIPGE | AMVKLYCPKC | MDVYTPKSSR  | HHHTDGAYFG | TGFPHMLFMV | HPEYRPKRPA |
| <b>ACC#</b>    | 190        | 200        | 210         |            |            |            |
| <b>P67870</b>  | NQFVPRLYGF | KIHPMAYQLQ | LQAASNFKSP  | VKTIR      |            |            |

Figure 22 : Séquence protéique de la CK2β ([www.expasy.org](http://www.expasy.org)).

#### a- Structure de CK2β :

La structure cristallographique de CK2β a été résolue au laboratoire (Chantalat, 1999) à 1,7Å. Quelques éléments remarquables peuvent être mentionnés. La forme native de CK2β se présente systématiquement sous la forme d'un **dimère**, via une interaction homotypique d'un motif en **doigt de Zinc** (Chantalat, 1999). Son extrémité C-terminale se détache du corps de la protéine et, au sein du dimère, les deux extrémités C-terminales s'intercroisent. Notons que les *deux* chaînes CK2β du dimère interagissent avec CK2α, essentiellement au niveau de ces parties C-terminales (figure 23).





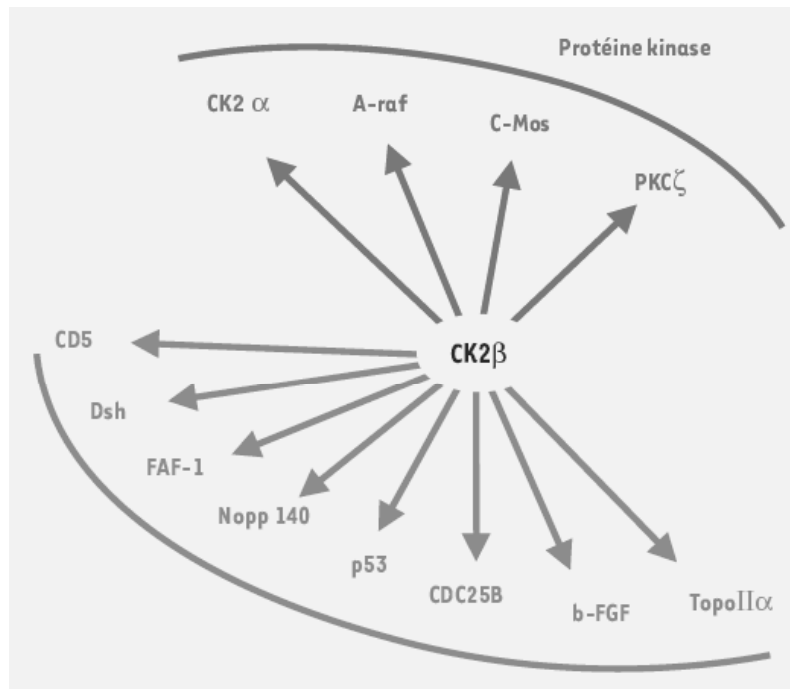
**Figure 23 : Structure cristallographique de la sous-unité régulatrice CK2β.** En haut à gauche : Structure du dimère CK2β (Chantalat, 1999). Cette structure ne contient pas les extrémités C-terminales (182-215) qui sont flexibles et ne se structurent qu'au contact des sous-unités catalytiques. En haut à droite : Structure d'une sous-unité CK2β (d'après Niefind, 2001). En bas : Structure du tétramère CK2α<sub>2</sub>β<sub>2</sub> (Niefind, 2001) mettant en évidence le croisement entre les deux extrémités C-terminales de CK2β.

CK2β possède une **boucle acide** (Asp55-Asp64) exposée, site d'interaction potentiel avec certains partenaires (les polyamines par exemple) (Litchfield, 2003).

Deux sérines localisées à son extrémité N-terminale (**MSSSEEVSWI...**) sont autophosphorylées par CK2α lorsqu'elle est associée en complexe tétramérique CK2α<sub>2</sub>β<sub>2</sub> : on parle de transphosphorylation. Des observations du laboratoire ont montré que les **deux résidus C-terminaux** (Ile214 et Arg215) sont clivés dans différentes tumeurs (cancer du sein, gliomes). Il ne s'agit pas d'une mutation mais d'une protéolyse uniquement observable dans les cellules tumorales (résultats non publiés).

### **b- Partenaires de CK2β**

Une pléthore de partenaires protéiques de CK2β a été répertoriée à travers des études réalisées tant *in vitro* qu'*in vivo* (co-immunoprécipitation ou criblage en double hybride dans la levure), figure 24 (Grein, 1999). Ces observations suggèrent que CK2β fonctionne comme une **plateforme de recrutement** de certains substrats pour orienter efficacement leur phosphorylation par CK2α (Bibby, 2005).



**Figure 24 : Diversité des partenaires de CK2β** (Buchou, 2003). CK2β interagit par son extrémité C-terminale avec CK2α, mais également avec d'autres protéines kinases comme c-Mos, A-Raf ou la PKCζ. CK2β forme également des complexes stables avec des facteurs de transcription tels que CD5, Dsh, FAF-1, Nopp140, p53, la topoisomérase IIα, b-FGF ou CDC25B.

Certains partenaires de CK2β, comme FGF-2 ou les polyamines, se fixent au niveau du domaine acide de CK2β et induisent une stimulation de l'activité de CK2α (Leroy, 1997).

Dans les cellules, CK2β est synthétisée en excès par rapport à CK2α, en particulier dans le cerveau et les testicules (Guerra, 1999). Cette existence de CK2β libre dans ces tissus a été confirmée par immunoprécipitation, ce qui corrobore un rôle dual de CK2β, associée à l'holoenzyme CK2 mais également en tant que protéine indépendante. Cette dernière possibilité est particulièrement illustrée par les observations qui montrent que CK2β peut interagir *via* son extrémité C-terminale avec d'autres ser/thr protéines kinases : **A-Raf** (Boldyreff, 1997), **c-Mos** (Chen, 1997), **Chk1** (Guerra, 2003), **Lyn** (Meggio 1995), **PKCζ** (Bren, 2000), **p90<sup>rsk</sup>** (Kusk, 1999), **Chk2** (Bjorling-Poulsen, 2005). Ainsi, CK2β diminue la phosphorylation par Chk2 de p53 *in vitro* (Bjorling-Poulsen, 2005). CK2β serait donc une protéine régulatrice au sens large, régulant non seulement CK2α mais aussi d'autres protéines kinases importantes dans différentes voies de transduction.

### 3- Organisation en tétramère et apports de la cristallographie

#### a- Un complexe de haute affinité

CK2 a longtemps été décrite comme un complexe tétramérique obligatoire constitué de 2 sous-unités catalytiques  $\alpha$  et  $\alpha'$  un dimère de sous-unités régulatrices  $\beta$  (figure 25). En effet, *in vitro*, les sous-unités recombinantes mises en présence se réassocient instantanément en un complexe stable de haute affinité. De même, biochimiquement, si on purifie l'une des sous-unités à partir d'un lysat cellulaire, on la retrouve systématiquement associée à l'autre (Bibby, 2005).

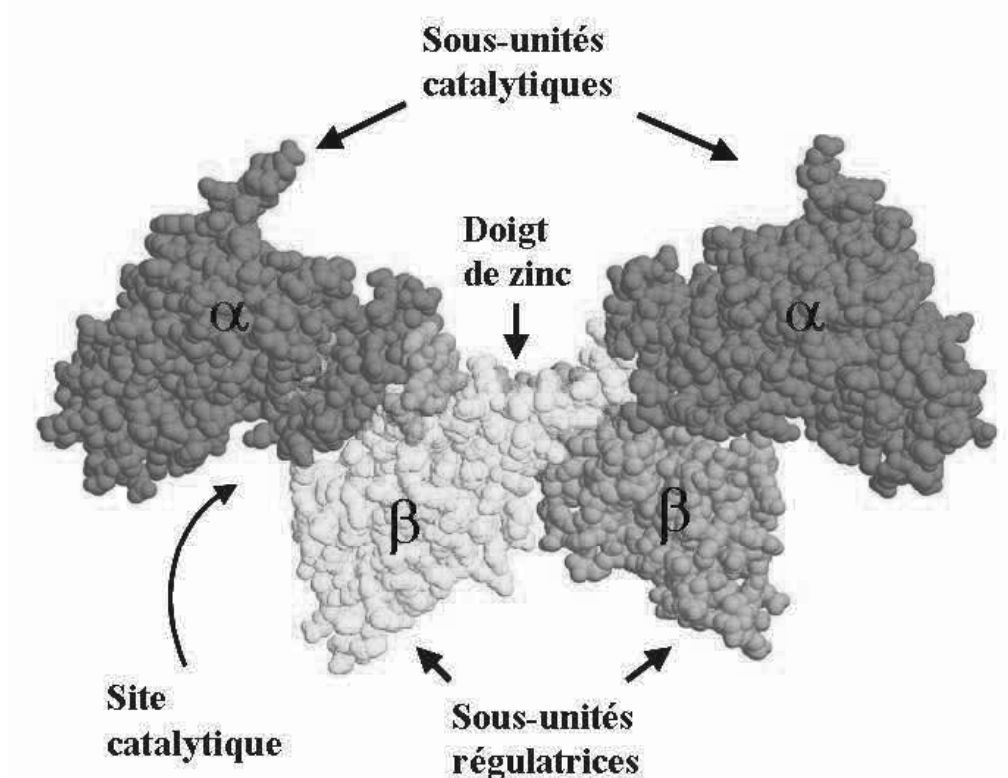


Figure 25 : Structure tétramérique de la CK2 (Niefind, 2001).

L'affinité entre CK2 $\alpha$  et CK2 $\beta$  a été mesurée par des expériences de Résonance Plasmonique de Surface (BIAcore) (Martel, 2002). Le  $K_D$  mesuré est de **5,4nM**, ce que l'on peut qualifier de haute affinité (figure 26).

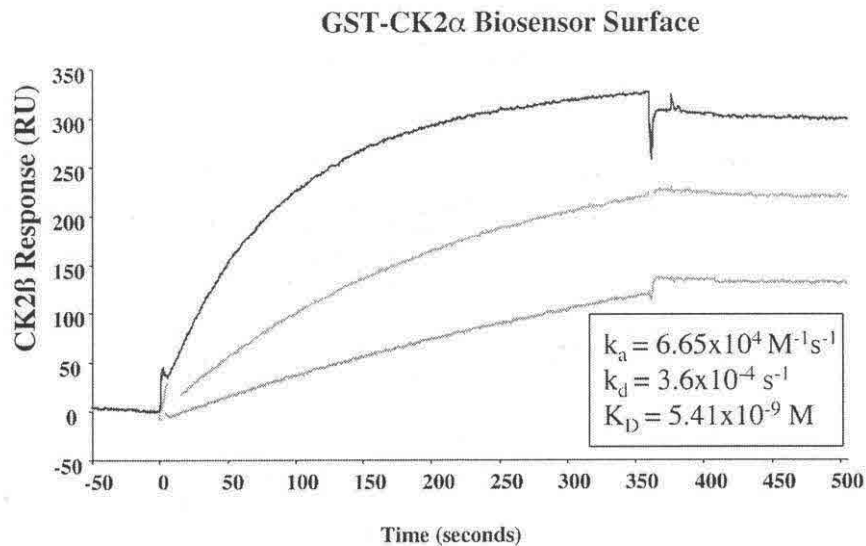


Figure 26 : Interaction moléculaire entre les sous-unités de CK2 en BIAcore (Martel, 2002), déterminée avec une gamme de concentration de CK2β (37, 74, 111 et 148nM) analysée avec de la GST-CK2α immobilisée.

### b- Une faible surface d'interaction

Cette vision traditionnelle de la CK2 a commencé à être remise en question avec la résolution de la structure tridimensionnelle de l'holoenzyme (Niefind, 2001) à 3,1Å. Cette structure a permis de se rendre compte que la surface d'interaction entre CK2α et CK2β n'était que de 832 Å<sup>2</sup>, ce qui est relativement faible. Une telle surface est typique d'un complexe transitoire et flexible et non d'un complexe permanent (surface moyenne de 1722 Å<sup>2</sup>) (figure 27).

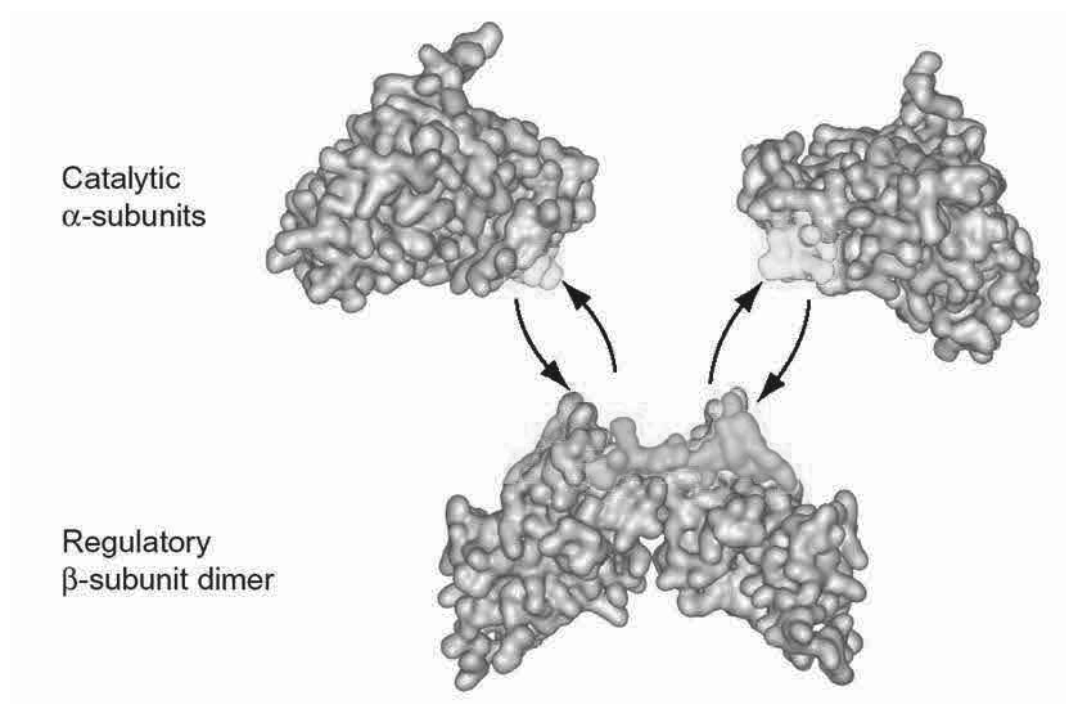


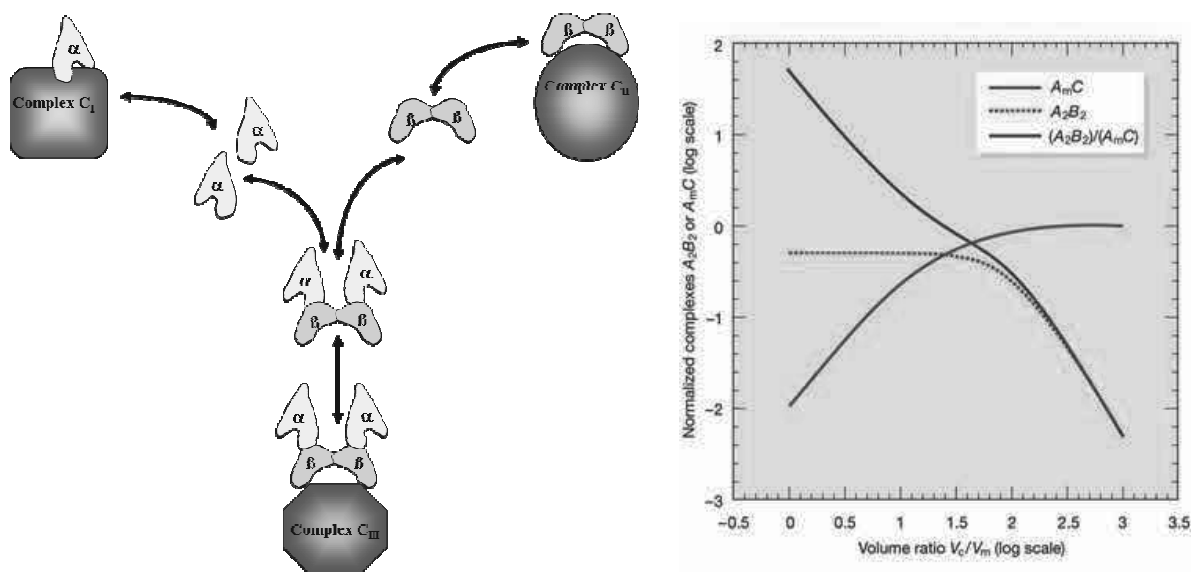
Figure 27 : Nouvelle vision de la CK2, un complexe dynamique avec une faible surface d'interaction.

Ces données ont logiquement soulevé l'idée que CK2 serait un complexe soumis à un équilibre dynamique d'association-dissociation *in vivo*.

### c- Modélisation mathématique

Une vision dynamique de l'holoenzyme dans la cellule a été étayée par une modélisation mathématique.

Dans ce modèle, chaque sous-unité de CK2 peut s'engager dans des complexes multiprotéiques et former des **sous-populations** dans la cellule. Effectivement, l'environnement intracellulaire est différent de celui du tube à essai. La concentration locale en partenaires de faible affinité est alors augmentée : une dissociation des sous-unités de CK2 est possible (figure 28, Filhol, 2004). A l'inverse, dans un lysat protéique, dans lequel toute l'architecture et l'organisation cellulaires sont rompues, la balance penche en faveur de l'interaction de plus forte affinité, CK2 $\alpha$ -CK2 $\beta$ .



**Figure 28 : Représentation schématique des différentes populations de CK2.** Dans les cellules vivantes, des concentrations locales en partenaires pourraient stabiliser des associations de faible affinité avec chacune des sous-unités de CK2, indépendamment l'une de l'autre. Ceci conduirait à la formation de complexes macromoléculaires transitoires.

A ce stade, la validation expérimentale de ce modèle de complexe dynamique était nécessaire.

### III- Lien entre structure et fonction

#### 1- Dynamisme de l'interaction dans la cellule

L'engagement de CK2 $\beta$  dans d'autres complexes protéiques est probable, sachant qu'elle est exprimée en excès par rapport à CK2 $\alpha$  et qu'elle a de multiples partenaires. Ceci est cohérent avec l'observation concernant de modestes populations de CK2 $\beta$  qui ne co-localisent pas avec CK2 $\alpha$  (Bibby, 2005).

Pareillement, une fraction importante de CK2 $\alpha$  a été isolée sous une forme liée à des composants nucléaires et non à la CK2 $\beta$  (Stigare, 1993). De même, on ne trouve que de la CK2 $\alpha$  dans le réticulum endoplasmique rugueux alors que les deux sous-unités sont présentes dans le réticulum endoplasmique lisse (Faust, 2001). L'examen de la localisation des sous-unités dans divers types cellulaires révèle parfois une distribution asymétrique des sous-unités de CK2 individuelles (Bibby, 2005). Cependant, les stratégies conventionnelles pour identifier la localisation de protéines ne s'appuient que sur des cellules fixées et n'offrent qu'une vision statique de la CK2.

L'hypothèse d'un complexe dynamique CK2 a été définitivement confirmée grâce à des techniques élégantes d'imagerie de fluorescence sur cellules *vivantes* (Martel, 2001, Filhol, 2003, figure 29). Les sous-unités de CK2 fusionnées à des protéines fluorescentes ont été suivies dans leurs translocations noyau-cytoplasme. Il a été mis en évidence que CK2 $\alpha$  et CK2 $\beta$  transitaient à des vitesses différentes d'un compartiment cellulaire à un autre et donc indépendamment l'une de l'autre. CK2 $\alpha$  est importée plus rapidement vers le noyau (< 10 sec) que CK2 $\beta$ . CK2 $\alpha$  peut également faire la navette entre les deux compartiments, contrairement à CK2 $\beta$  qui ne transite vers le noyau qu'à sens unique.



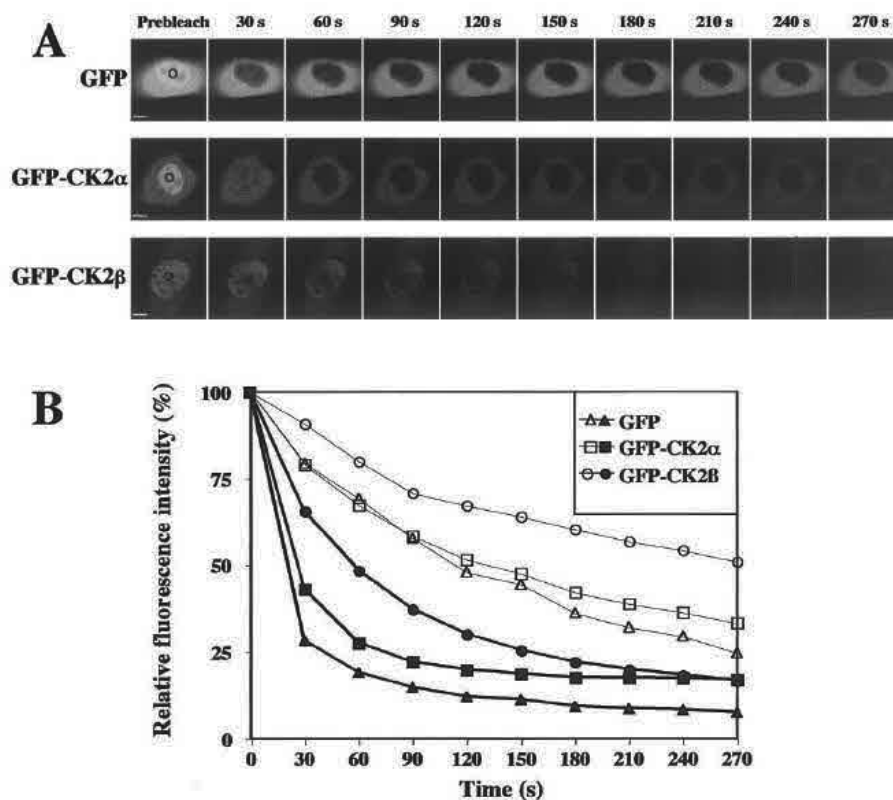


Figure 29 : Mobilité différentielle des sous-unités de CK2 dans des cellules vivantes NIH 3T3 grâce à la technique du FLIP, fluorescence loss in photo bleaching (Filhol, 2003 ; White, 1999). A : Images enregistrées avant et après photoblanchiment effectué répétitivement au même endroit  $\circ$ . B : Enregistrement de la fluorescence globale du noyau (symboles noirs) ou du cytoplasme (symboles creux).

La formation du complexe CK2 $\alpha$ -CK2 $\beta$  est donc dynamique et comme nous allons le voir ceci a des conséquences fonctionnelles sur l'activité catalytique de CK2 en modulant sa spécificité de substrat.

## 2- Spécificité de substrat

La structure de la CK2 repose donc sur un équilibre entre une forme monomérique et tétramérique (CK2 $\alpha$  + CK2 $\alpha$  + CK2 $\beta_2$   $\leftrightarrow$  CK2 $\alpha_2\beta_2$ ) (figure 30) et cette association extrêmement dynamique conditionne l'accessibilité des substrats à la poche catalytique (figures 31 et 32). En effet, la sous unité CK2 $\beta$  agit comme une « plateforme de tri » qui régule l'accessibilité à la sous unité  $\alpha$  de façon positive ou négative.

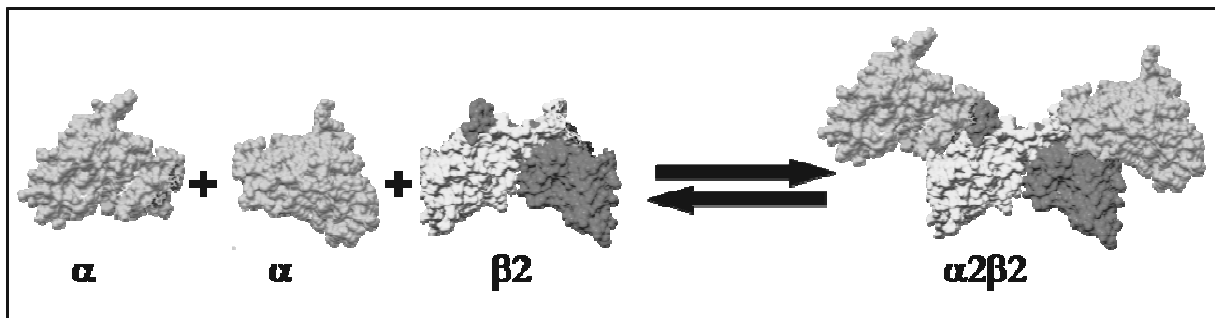


Figure 30 : La CK2 est en équilibre dynamique entre 2 formes structurales : une forme dissociée et une forme tétramérique CK2 $\alpha_2\beta_2$ .

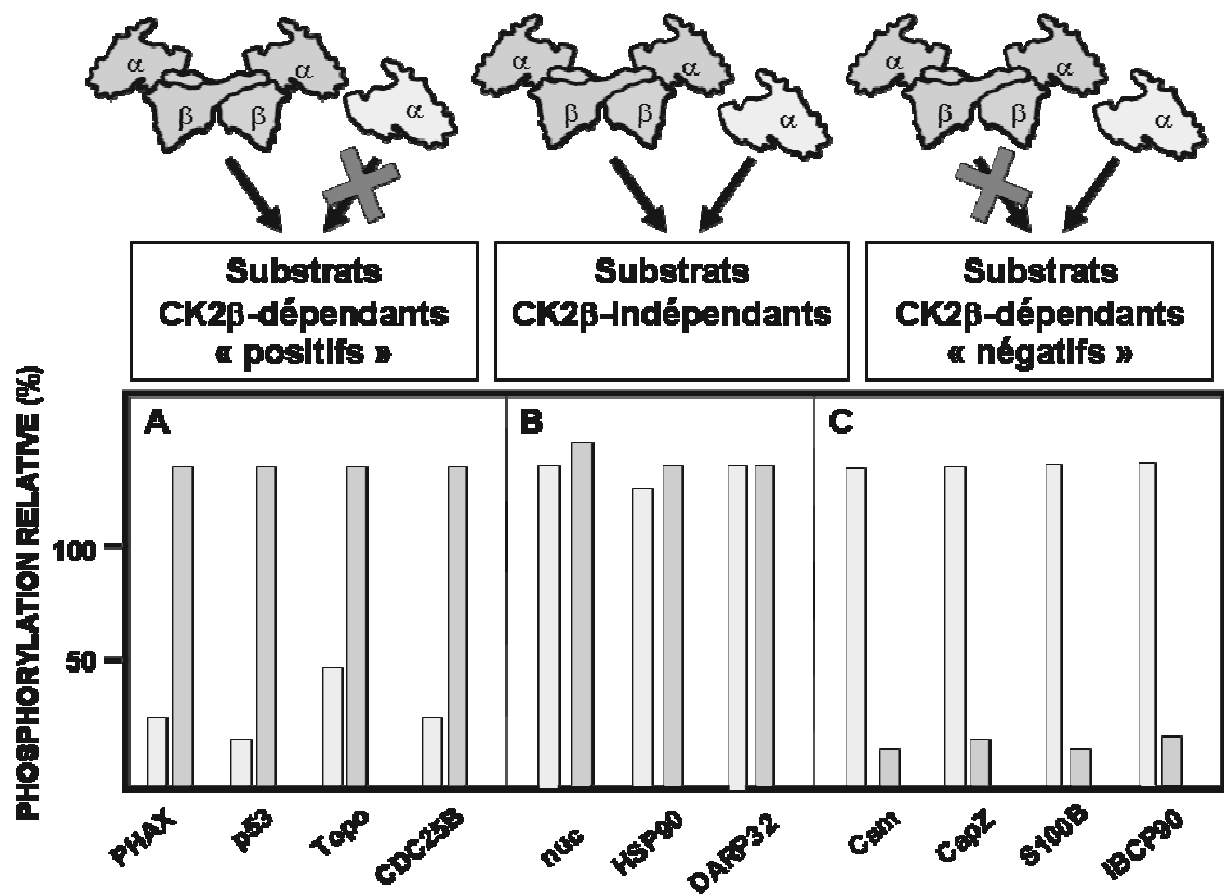


Figure 31 : Classification des substrats de CK2 (d'après Buchou, 2003). On peut ainsi définir 3 catégories de substrats susceptibles d'être phosphorylés par CK2 $\alpha$  : A : les substrats CK2 $\beta$ -dépendants « positifs » (protéines phosphorylées uniquement par le tétramère  $\alpha_2\beta_2$ ), C : les substrats CK2 $\beta$ -dépendants « négatifs » reconnus uniquement par la forme monomérique CK2 $\alpha$  (le dimère CK2 $\beta$  inhibe l'accès à la poche catalytique) et B : les substrats CK2 $\beta$ -indépendants dont la phosphorylation n'est pas influencée par la présence de la sous unité régulatrice.

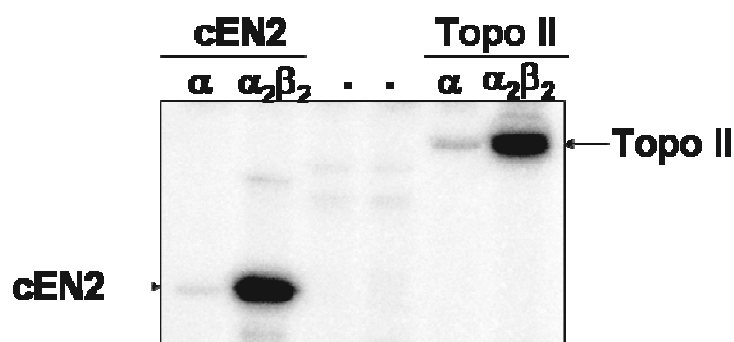


Figure 32 : Autoradiographie de la phosphorylation de 2 substrats CK2 $\beta$ -dépendants « positifs », cEN2 et Topo, en présence de CK2 $\alpha$  ou de CK2 $\alpha$ 2 $\beta$ 2.

La présence de la sous-unité régulatrice CK2 $\beta$  définit la spécificité de substrat de CK2 $\alpha$ . Parmi les substrats caractérisés à ce jour du point de vue de leur dépendance à CK2 $\beta$ , la majorité requièrent la présence de CK2 $\beta$  et sont donc CK2 $\beta$ -dépendants « positifs ».

Il est donc probable que l'association réversible de CK2 $\beta$  à CK2 $\alpha$  représente une composante essentielle dans la régulation encore mystérieuse de cette protéine kinase. Plus concrètement, les propriétés dynamiques intrinsèques du complexe CK2 et les conséquences fonctionnelles qui en découlent laissent entrevoir une possibilité de moduler et de réguler finement l'activité de CK2 en bloquant l'interaction entre ses sous-unités.

**Ces propriétés nous ont conduit à concevoir des stratégies pour développer des inhibiteurs de cette interaction CK2 $\alpha$ -CK2 $\beta$ .** Devant le pessimisme de certains concernant la faisabilité d'une telle entreprise, nous avons au préalable recherché des précédents en matière d'inhibiteurs d'interactions protéine-protéine.

### **I- Introduction :**

Une stratégie émergente dans la recherche de molécules pharmacologiques consiste à cibler des interactions protéine-protéine critiques pour la cellule tumorale et à l'inhiber grâce à des petites molécules.

Cette approche présente l'avantage de moduler plus finement une voie protéique, en l'orientant vers telle ou telle autre voie, sans la bloquer totalement. La faisabilité et la preuve du concept ont été apportées par différents succès concernant des interactions protéine-protéine d'intérêt pour diverses pathologies.

Jusqu'à présent, le développement de petites molécules inhibitrices ciblant des interactions protéine-protéine était considéré comme "à haut risque" en raison du caractère plan et de l'étendue des surfaces d'interaction. Néanmoins, un nombre croissant d'études démontre que cette stratégie est en réalité envisageable, car une interaction repose souvent sur seulement trois ou quatre résidus critiques : les « hot spots ». Il est surprenant de constater que la simple mutation de ces quelques résidus-clés suffit à interrompre la formation du complexe. Les molécules inhibitrices d'interactions protéine-protéine, telles les « nutlins » inhibant l'interaction p53-HDM2, ou les inhibiteurs de l'interaction Bcl2-Bax sont aujourd'hui des candidats thérapeutiques sérieux, capables d'induire efficacement l'apoptose de cellules cancéreuses humaines.

Ceci souligne la faisabilité d'une approche qui utilise des petites molécules ciblant ces interactions protéine-protéine en mimant exactement ces hot spots.

### **II- Article revue**

***Laudet B, Prudent R, Filhol O, Cochet C.***

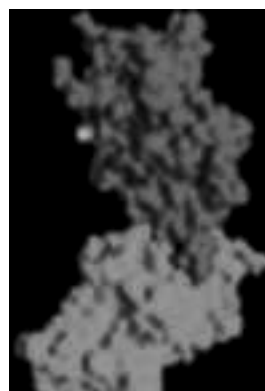
***Des agents thérapeutiques ciblant des interactions protéine-protéine : mythe ou réalité ?***

***Med Sci (Paris). 2007 Mar;23(3):273-8.***

► Les interactions protéine-protéine jouent un rôle fondamental dans les voies de signalisation qui régulent de nombreuses fonctions cellulaires. Les propriétés structurales et fonctionnelles des interfaces protéine-protéine sont à présent mieux connues, offrant par là des opportunités pour des interventions thérapeutiques. Le développement de petites molécules capables de moduler ce type d'interactions est difficile. Néanmoins, des progrès significatifs dans cette direction ont été réalisés sur plusieurs fronts. À l'aide de quelques exemples, nous résumons dans cet article les travaux récents dans ce domaine en émergence. ◀

## Des agents thérapeutiques ciblant des interactions protéine-protéine Mythe ou réalité ?

Béatrice Laudet, Renaud Prudent,  
Odile Filhol, Claude Cochet



Inserm U873, Institut  
de Recherches en Technologies  
et Sciences pour le Vivant,  
CEA Grenoble,  
17, rue des Martyrs,  
38054 Grenoble Cedex 9, France.  
[claudc.cochet@cea.fr](mailto:claudc.cochet@cea.fr)

Dans un organisme vivant, les cellules sont régulièrement exposées à une variété de signaux à partir de leur micro-environnement. Nombre de ces signaux sont détectés par des récepteurs présents à la surface des cellules, puis amplifiés et « transduits » par des réseaux complexes de signalisation intracellulaire. L'organisation spatiale et l'activation de ces réseaux dépendent de façon cruciale d'interactions spécifiques entre les différentes protéines qui les composent. Les processus d'apoptose, notamment, mettent en jeu des réseaux complexes d'interaction protéine-protéine qui dictent la survie ou la mort cellulaire ; les interactions protéine-protéine sont donc fondamentales pour la régulation des points de contrôle de l'homéostasie cellulaire. Elles constituent un réseau dynamique et adaptable, l'« interactome », capable d'intégrer des signaux intra- comme extracellulaires et de modifier le comportement cellulaire.

### Propriétés des interactions protéine-protéine

Les interactions protéine-protéine mises en jeu dans les complexes enzyme-substrat ne seront pas décrites dans cet article, consacré aux propriétés des interactions

« non catalytiques » qui conduisent à des homo- ou hétéro-oligomérisations de protéines.

Différentes approches combinées de biologie structurale permettent de comprendre comment fonctionnent les interfaces protéine-protéine au sein de ces complexes moléculaires. Bien que les principes structuraux et fonctionnels qui gouvernent ces interactions soient d'une grande diversité, les interfaces protéine-protéine sont, dans de nombreux cas, larges (typiquement 1 300 à 3 000 Å<sup>2</sup>), et leurs surfaces compactes, hydrophobes et relativement planes [1, 2]. La combinaison des analyses cristallographiques et de mutagenèse dirigée a révélé la présence, au niveau de ces interfaces, d'acides aminés essentiels pour l'interaction (*hot spots*).

La résolution de la structure tridimensionnelle de différents complexes protéiques a permis de mettre en évidence l'existence de régions centralisées et accessibles, constituées d'acides aminés cruciaux pour l'interaction des protéines composant ces complexes [3]. Ces *hot spots* sont présents sur les deux côtés de l'interface protéine-protéine. Les structures cristallographiques montrent que ces régions sont hautement complémentaires l'une de l'autre, avec des résidus hydrophobes d'une surface s'engageant précisément dans des « puits » présents sur la face opposée. Il est remarquable de constater que dans le cas du complexe p53-Mdm2 (*double-minute*

Article reçu le 13 février 2006, accepté le 2 juin 2006.

protein 2), la mutation de seulement 3 des 393 acides aminés de p53 suffit à empêcher la formation du complexe [4]. De nombreuses études suggèrent que la présence de ces *hot spots* confère à ces régions les

propriétés nécessaires à la liaison de ligands [5]. L'apparente complémentarité entre les deux surfaces créée par ces *hot spots* se traduit par un certain degré de flexibilité

|          | Méthode d'analyse                                                     | Principe                                                                                                                                                              | Schéma | Références |
|----------|-----------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|------------|
| In vivo  | Double hybride (levure)                                               | L'interaction est révélée <i>in vivo</i> par reconstitution de l'activité d'un activateur transcriptionnel                                                            |        | [10, 11]   |
|          | Fluorescence/bioluminescence resonance energy transfer (FRET/BRET...) | Fusion des protéines A et B à deux fluorochromes. Transfert d'énergie non radiatif si les deux fluorochromes sont à moins de 20 Å.                                    |        | [12, 13]   |
|          | Complémentation de fragments de protéine                              | Fusion des protéines A et B à deux fragments inactifs d'une protéine rapporteur (YFP, ubiquitine ...). L'interaction reconstitue l'activité de la protéine rapporteur |        | [14, 15]   |
| In vitro | Ultracentrifugation analytique                                        | Révélation des interactions par analyse de la densité des complexes protéiques formés                                                                                 |        | [16]       |
|          | Résonance plasmonique de surface (SPR)                                | L'interaction de la protéine B avec la protéine A immobilisée sur une surface sensible aux variations de masse permet une analyse quantitative de l'interaction       |        | [17]       |
|          | Microcalorimétrie isotherme à titration (ITC)                         | Détermination de paramètres thermodynamiques par mesure des variations thermiques produites par l'interaction de 2 protéines en solution                              |        | [18]       |
|          | Résonance magnétique nucléaire (RMN)                                  | Mesure des variations des spins nucléaires des atomes interagissant lors de l'interaction des protéines                                                               |        | [19]       |
|          | Cristallographie                                                      | L'analyse des rayons X projetés sur les protéines cristallisées permet de reconstituer le complexe                                                                    |        | [20]       |

Figure 1. Principales méthodes utilisées pour l'identification et l'analyse des interactions protéine-protéine. YFP : yellow fluorescent protein.



et d'adaptabilité, qui permet la fixation séquentielle, sur une même protéine, de multiples partenaires [6].

Les interactions protéine-protéine peuvent être définies sur la base de la durée de vie des complexes qui sont soit très stables et permanents, soit transitoires, s'associant ou se dissociant constamment *in vivo*. Il existe également un type d'associations fortes, mais néanmoins transitoires, qui requièrent un signal moléculaire pour altérer l'affinité mutuelle des composants du complexe. La protéine kinase AMPc-dépendante (PKA) est un exemple de ce type de complexe, où la fixation de l'AMP cyclique sur la sous-unité régulatrice (R) de la kinase rompt son interaction avec la sous-unité catalytique (C) [7]. Il faut souligner ici que la plupart des complexes transitoires ont des rôles régulateurs importants [6], le corollaire en étant que les mécanismes contrôlant leur formation sont vitaux pour les fonctions biologiques de ces complexes.

### Inhiber ou rompre des interactions protéine-protéine

Le dysfonctionnement d'interactions protéine-protéine hautement spécifiques, lié notamment à des mutations, est à l'origine de différentes pathologies, dont le cancer. La perturbation de ces complexes protéiques a également des effets physiologiques majeurs. La possibilité d'interférer avec les interactions responsables de la formation de ces complexes devrait donc permettre d'exercer un contrôle unique sur des événements cellulaires majeurs, à l'origine de diverses pathologies, et permettre de développer de nouveaux agents thérapeutiques.

Les inhibiteurs d'interactions protéine-protéine sont susceptibles de présenter plusieurs avantages par rapport à d'autres types d'inhibiteurs. D'une part, l'extrême complémentarité des interfaces protéine-protéine offre la possibilité de développer des inhibiteurs hautement spécifiques, évitant ainsi l'inhibition de cibles cellulaires non spécifiques (*off-target*). D'autre part, les complexes protéiques ciblés par ces inhibiteurs devraient être moins sujets à des mutations leur conférant une résistance, contrairement aux protéines qui fixent des inhibiteurs au niveau de leur site actif : de fait, une simple mutation sur une sous-unité au niveau de l'interface nécessite une mutation complémentaire sur l'autre sous-unité pour restaurer l'interaction ; comme une double mutation simultanée sur des sous-unités différentes n'est guère possible, il est hautement improbable que la protéine ciblée acquière une résistance à l'inhibiteur.

Toutefois, il faut admettre que ces avantages ont été pendant longtemps tempérés par le fait que, contrairement à la démarche classique qui repose sur l'inhibition d'une activité enzymatique, le ciblage de ce type d'interaction par des composés chimiques conventionnels semblait particulièrement difficile. Aujourd'hui, les développements spectaculaires de la génomique et de la protéomique, ainsi que l'émergence de nouvelles cibles thérapeutiques impliquant des interactions protéine-protéine, ont récemment stimulé, avec succès, une recherche orientée vers le ciblage de ce type d'interaction.

### Démarche

Les propriétés intrinsèques des interfaces protéiques, flexibilité et capacité à adopter des conformations multiples, sont mises à contribution pour le développement de petites molécules pharmacologiques capables

d'interagir avec ces interfaces protéiques. Ce développement requiert au préalable une connaissance approfondie du réseau dans lequel elles s'inscrivent, afin de s'assurer de la pertinence de l'interaction ciblée : il s'agit notamment de s'assurer de l'absence de voie alternative, qui rend cette interaction cruciale pour la transmission du signal. Dans le cas des tumeurs surexprimant Mdm2, par exemple, on choisira une interaction nécessaire pour la survie de cellules cancéreuses, mais facultative pour les cellules normales [8].

Diverses méthodes [9] peuvent être mises en œuvre pour l'analyse des interactions protéine-protéine (Figure 1). La co-cristallisation d'un complexe protéique ou, à défaut, une étude de complémentarité *in silico* permettent de caractériser l'interface ciblée et le type d'interaction mis en jeu. Ainsi, une surface d'interaction inférieure à 900 Å<sup>2</sup>, signature probable d'un complexe transitoire, est une configuration favorable pour le développement d'inhibiteurs. Une étude détaillée de la structure permet également d'identifier les acides aminés contribuant de manière prépondérante à l'interaction ; la mutation (*ala-scanning*) de ces acides aminés d'intérêt, puis l'analyse des mutants par des approches structurales, thermodynamiques ou biophysiques telles que celles qui sont décrites dans la Figure 1 valident ces *hot spots* potentiels.

Une fois l'interface caractérisée, la recherche de molécules inhibitrices peut s'effectuer par trois approches : le criblage réel, le criblage virtuel ou la conception *de novo*.

### Criblage réel

Il consiste à tester systématiquement des banques de molécules, ou chimiothèques, à l'aide d'un test d'interaction simple, rapide, robuste, reproductible, miniaturisé et automatisé. *In vitro*, ce test fait appel à des techniques de type ELISA ou à la polarisation de fluorescence ; le criblage peut également reposer sur un test cellulaire, dans lequel l'interaction protéine-protéine peut notamment être évaluée par la technique de double hybride ou le FRET (Figure 1). Il est important de noter que l'utilisation de banques de composés fonctionnellement très diverses (petites molécules chimiques, peptides, voire peptidomimétiques) semble essentielle pour la découverte de molécules ayant ce type de propriétés uniques. Une technique récente d'identification d'inhibiteurs des interactions protéine-protéine repose sur l'utilisation de mélanges de très petites molécules (fragments) : si ces molécules possèdent isolément une faible affinité pour une cible, leur association en présence de la protéine augmente considérablement leurs propriétés inhibitrices [21].

## Criblage virtuel

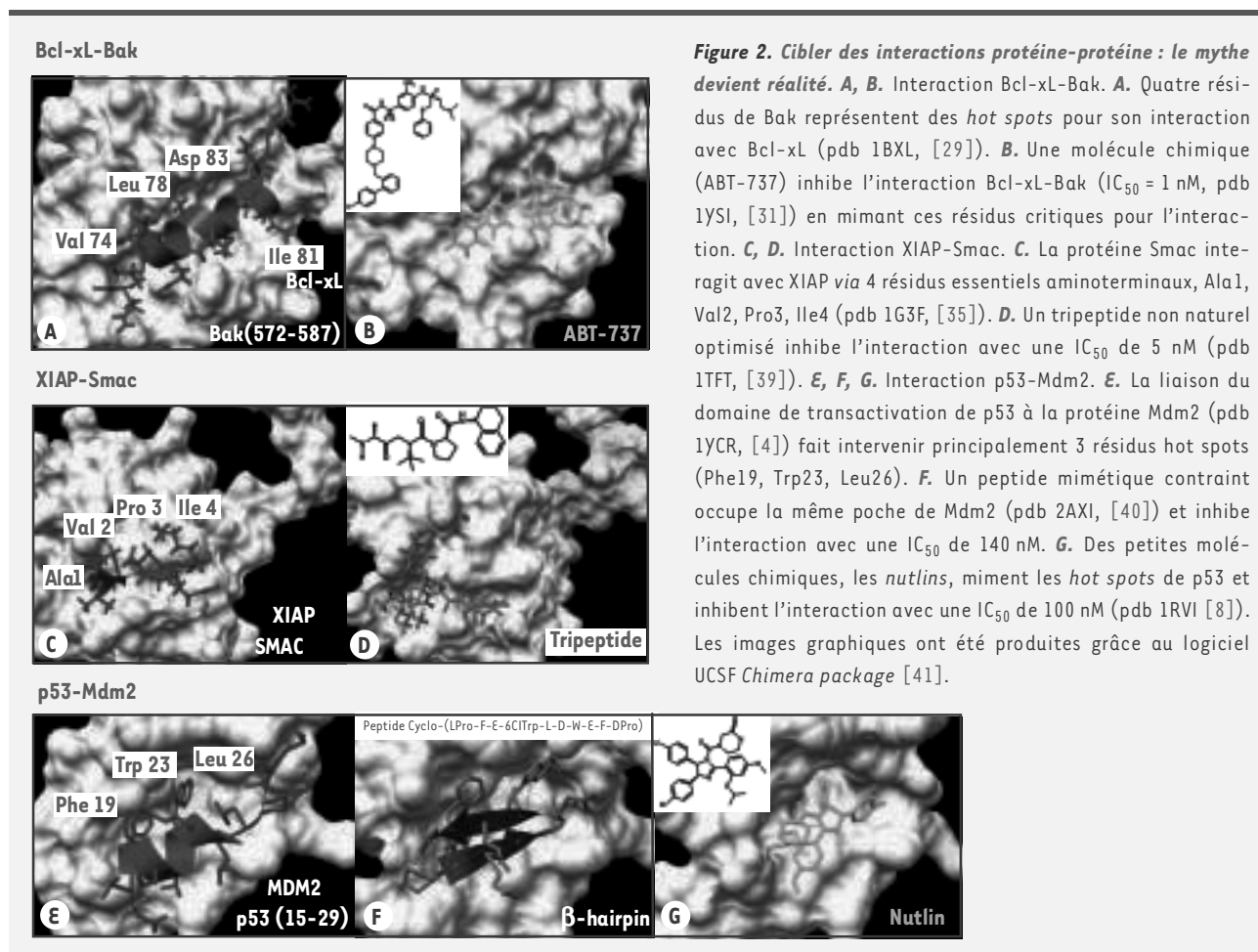
La deuxième stratégie s'appuie sur les développements récents de la bio-informatique. Elle consiste à tester *in silico* la complémentarité de forme et l'interaction probable entre une molécule et la structure cristallographique de la protéine, ce que l'on appelle le *docking*. On peut ainsi tester plusieurs millions de molécules référencées dans diverses chimiothèques en quelques heures. L'objectif initial est souvent de créer une sous-chimiothèque enrichie en « touches » potentiellement positives, afin d'accroître le taux de réussite lors des tests réels.

## Conception *de novo*

Une approche encore plus audacieuse est la conception *de novo*, qui consiste à construire rationnellement une molécule à partir des seules données structurales du complexe. L'enjeu, particulièrement difficile, est de synthétiser ensuite cette molécule « idéale » inhibitrice de la formation du complexe. Cependant, l'enthousiasme initial suscité par cette dernière approche doit être tempéré [22] : en effet, les algorithmes actuels ne prennent, pour l'instant, pas ou peu en compte des phénomènes primordiaux tels que la flexibilité conformationnelle des protéines ou l'influence du solvant et des ions dans l'interaction protéine-ligand.

## Évaluation des composés

Dans tous les cas, les molécules pré-sélectionnées après criblage doivent être validées en culture cellulaire, et le phénotype attendu résultant de l'exposition à ces molécules doit être le même que celui observé avec des mutants d'interaction. Dans ce contexte, les inhibiteurs sont soumis à diverses contraintes cellulaires. Ils doivent notamment être capables d'accéder aux compartiments cellulaires où se trouvent leurs cibles. Par ailleurs, l'influence des modifications post-traductionnelles des protéines sur leurs interactions est une propriété dont on peut tirer parti. Il est ainsi possible de développer des inhibiteurs d'interaction de protéines de surface, fondés sur des polysaccharides agissant comme leurs glycosidiques : l'interaction protéine-protéine est dans ce cas rompue par compétition avec la partie glycosylée [23]. L'ubiquitinylation est un autre type de modification post-traductionnelle exploitable ; à titre d'exemple, des composés nommés ubistatines [24] sont capables, en se fixant sur les polymères d'ubiquitine, de rompre l'interaction ubiquitine-protéasome.







Enfin, dans le cadre d'essais précliniques, les propriétés pharmacologiques et thérapeutiques des composés retenus sont évaluées dans des modèles animaux appropriés à la pathologie considérée.

## Quelques résultats

Des résultats significatifs ont d'ores et déjà été obtenus par cette orientation thérapeutique, dans des domaines aussi variés que l'inflammation (Jak/Stat) [25], la prolifération cellulaire (anti-IGFR) [26] et la virologie (protéase du VIH) [27]. Toutefois, cette revue se limitera à une brève description de nouveaux agents anticancéreux ciblant des interactions protéine-protéine opérant dans les processus d'apoptose (Figure 2).

### Interaction Bcl2-Bax

La découverte de molécules capables de sensibiliser des cellules résistantes à l'apoptose est une stratégie attractive pour le développement de nouveaux agents anticancéreux [28]. Certains membres de la famille des protéines anti-apoptotiques telles que Bcl-x<sub>L</sub> et Bcl-2 interagissent avec des protéines pro-apoptotiques appartenant à la même famille, telles que Bak ou Bax. Des études en RMN ont révélé que ces interactions reposent sur un domaine BH3 (*Bcl-2 homology domain 3*) présent dans Bax. Un peptide de 16 acides aminés (*BH3 peptide*) dérivé du domaine BH3 de Bax forme une hélice  $\alpha$  qui interagit avec une poche hydrophobe de Bcl-x<sub>L</sub> [29] et inhibe l'interaction Bcl-x<sub>L</sub>-Bax (Figure 2A). Le criblage d'une banque de 16 320 petites molécules chimiques a, par la suite, permis d'identifier deux composés capables d'inhiber la liaison du peptide BH3 à Bcl-2. L'un de ces composés, ABT-737, bloque l'hétérodimérisation entre Bax et Bcl-2 (Figure 2B) ; il induit l'apoptose de cellules transformées et sensibilise les cellules tumorales surexprimant Bcl-2 aux chimiothérapies [30]. Par ailleurs, d'autres composés chimiques ciblant cette interaction provoquent la régression de tumeurs du poumon dans un modèle de xénogreffe chez la souris [31].

### Interaction Smac-XIAP

Les protéines de la famille des IAP (*inhibitors of apoptosis proteins*) sont des inhibiteurs endogènes des caspases ; elles sont surexprimées dans de nombreux cancers, où elles contribuent aux mécanismes de résistance à l'apoptose observée dans les cellules cancéreuses [32]. Les IAP possèdent un domaine à doigt de zinc, appelé Bir (*Baculovirus inhibitory repeat*), qui est le site d'interaction avec Smac (*second mitochondria-derived activator of caspases*), une protéine mitochondriale activatrice des caspases au cours de l'apoptose [33]. Un tripeptide non naturel dérivé de Smac inhibe son interaction avec XIAP (*X-linked mammalian inhibitor of apoptosis protein*) (Figure 2D). Ce type de peptides sensibilisent des cellules tumorales à l'apoptose induite par le facteur apoptotique TRAIL (*TNF-related apoptosis-inducing ligand*) et stimulent l'activité antitumorale de ce facteur dans un modèle de xénogreffe intracrânienne de gliome [34]. Des études cristallographiques ont montré que seuls quatre acides aminés de Smac se fixent sur le domaine Bir de XIAP (Figure 2C) et sont essentiels pour bloquer ses effets anti-apoptotiques [35]. Là encore, la conformation de ces quatre acides aminés au sein du complexe IAP-Smac a servi de support pour la synthèse rationnelle d'une molécule chimique capable, en se fixant avec une haute affinité à IAP, de promouvoir l'activation des caspases, en synergie avec le TNF $\alpha$

et TRAIL, et d'induire l'apoptose de cellules cancéreuses humaines. Enfin, en raison de son interférence avec la signalisation TNF $\alpha$ -NF $\kappa$ B, ce « mime chimique » de Smac pourrait conduire au développement d'agents thérapeutiques dans le cadre des pathologies de l'inflammation [36].

### Interaction p53-Mdm2

La protéine p53 est une cible thérapeutique attractive en oncologie en raison de sa capacité à induire la mort cellulaire par apoptose, et donc de permettre l'éradication des cellules cancéreuses. Toutefois, l'activité de p53 est réprimée par un régulateur négatif, la protéine Mdm2, dont l'amplification dans de nombreux cancers favorise une prolifération incontrôlée. L'inhibition de l'interaction p53-Mdm2 dans ces cancers représente donc une stratégie intéressante pour activer une apoptose p53-dépendante dans les tumeurs surexprimant Mdm2 [37]. Intervenir sur le complexe p53-Mdm2 est apparu possible lorsqu'il a été montré que de petits peptides correspondant à l'extrémité aminotermine de p53, en se fixant sur l'extrémité aminotermine de Mdm2, bloquent l'interaction p53-Mdm2 dans des cellules tumorales et induisent leur apoptose [37]. La structure de Mdm2 complexée à ce peptide (Figure 2F) a révélé que les chaînes latérales de trois acides aminés de p53 s'engagent dans une cavité hydrophobe de la molécule Mdm2 (Figure 2E), ce qui est suffisant pour former le complexe p53-Mdm2 [4]. Ces observations ont rapidement stimulé la recherche de composés chimiques de faible poids moléculaire, capables de bloquer cette interaction. Le criblage d'une banque de molécules chimiques a alors permis d'isoler une classe de composés appelés Nutlins (Figure 2G), qui déplacent p53 de son complexe avec Mdm2 avec des valeurs de IC<sub>50</sub> de l'ordre de 100 nM à 300 nM [8]. Comme attendu, les Nutlins provoquent l'activation de p53 et l'apoptose de cellules cancéreuses. Plus spectaculaire encore, l'administration orale de Nutlin pendant 3 semaines à des souris *nude* porteuses de xénogreffes de cellules d'ostéosarcome conduit à un arrêt de la croissance des tumeurs [8].

## Conclusions et perspectives

En conclusion, l'identification de petites molécules capables de moduler des interactions protéine-protéine est restée pendant longtemps un domaine largement sous-exploité par la recherche pharmacologique. Cependant, le développement de différentes technologies innovantes et la validation récente de ce type d'inhibiteurs dans des essais précliniques, comme c'est le cas de la colchicine, inhibiteur de l'interaction tubuline  $\alpha$ -tubuline  $\beta$  [38], démontrent que les interactions protéiques intracellulaires constituent une nouvelle source de cibles thérapeutiques importantes. Les molécules

modulatrices de ces interactions représentent une nouvelle classe d'outils originale et prometteuse, tant en recherche fondamentale qu'en thérapeutique. Elles peuvent aider à différencier les multiples fonctions portées par une même protéine, à replacer la protéine dans une cascade de réactions, ainsi qu'à disséquer et reconstituer des réseaux de signalisations protéiques. Enfin, et surtout, on peut prédire sans risque que cette stratégie a de grandes chances de faire émerger de nouvelles familles d'agents pharmacologiques actifs dans diverses pathologies. ♦

## SUMMARY

### Therapeutic agents targetting protein-protein interactions: myth or reality?

Protein-protein interactions have a key role in transduction pathways that regulate many cellular functions. Structural and functional properties of protein-protein interface are now better understood, therefore offering attractive opportunities for therapeutic intervention. Developing small molecules that modulate protein-protein interactions is challenging. Nevertheless, significant progress in this endeavour has been made on several fronts. Here, we use few illustrative examples to summarize recent work in this emerging field. ♦

## REMERCIEMENTS

Les travaux du groupe Structure et fonctions de la CK2 de l'unité U873 bénéficient du soutien financier de l'Inserm, du CEA et de la Ligue nationale contre le cancer (équipe labellisée EL2004.LNCC/CC2).

## RÉFÉRENCES

- Lo Conte L, Chothia C, Janin J. The atomic structure of protein-protein recognition sites. *J Mol Biol* 1999 ; 285 : 2177-98.
- Nooren IMA, Thornton JM. Structural characterization and functional significance of transient protein-protein interactions. *J Mol Biol* 2003 ; 325 : 991-1018.
- Bogan AA, Thorn KS. Anatomy of hot spots in protein interfaces. *J Mol Biol* 1998 ; 280 : 1-9.
- Kussilev PH, Gorina S, Marechal V, et al. Structure of the MDM2 oncoprotein bound to the p53 tumor suppressor transactivation domain. *Science* 1996 ; 274 : 948-53.
- Teague SJ. Implication of protein flexibility for drug discovery. *Nat Rev Drug Discov* 2003 ; 2 : 527-41.
- DeLano WL, Ullsch MH, de Vos AM, Wells JA. Convergent solutions to binding at a protein-protein interface. *Science* 2000 ; 287 : 1279-83.
- Kim C, Xuong NH, Taylor SS. Crystal structure of a complex between the catalytic and regulatory (RI $\alpha$ ) subunits of PKA. *Science* 2005 ; 307 : 690-6.
- Vassilev LT, Vu BT, Graves B, et al. In vivo activation of the p53 pathway by small-molecule antagonists of MDM2. *Science* 2004 ; 303 : 844-8.
- Piehl J. New methodologies for measuring protein interactions in vivo and in vitro. *Curr Opin Struct Biol* 2005 ; 15 : 4-14.
- Toby GG, Golemis EA. Using the yeast interaction trap and other two-hybrid-based approaches to study protein-protein interactions. *Methods* 2001 ; 24 : 201-17.
- Serebriiskii IG, Kotova E. Analysis of protein-protein interactions utilizing dual bait yeast two-hybrid system. *Meth Mol Biol* 2004 ; 261 : 263-96.
- Trugnan G, Fontanges P, Delautier D, Ait-Slimane T. FRAP, FLIP, FRET, BRET, FLIM, PRIM... De nouvelles techniques pour voir la vie en couleur ! *Med Sci (Paris)* 2004 ; 20 : 1027-34.
- Pfleger KD, Eidne KA. Illuminating insights into protein-protein interactions using bioluminescence resonance energy transfer (BRET). *Nat Methods* 2006 ; 3 : 165-74.
- Thaminy S, Miller J, Stajlar I. The split-ubiquitin membrane-based yeast two-hybrid system. *Meth Mol Biol* 2004 ; 261 : 297-312.
- Hu CD, Kerpola TK. Simultaneous visualization of multiple protein interactions in living cells using multicolour fluorescence complementation analysis. *Nat Biotechnol* 2003 ; 21 : 539-45.
- Lebowitz J, Lewis MS, Schuck P. Modern analytical ultracentrifugation in protein science: a tutorial review. *Protein Sci* 2002 ; 11 : 2067-79.
- Karlsson R, Falt A. Experimental design for kinetic analysis of protein-protein interactions with surface plasmon resonance biosensors. *J Immunol Methods* 1997 ; 200 : 121-33.
- Pierce MM, Raman CS, Nall BT. Isothermal titration calorimetry of protein-protein interactions. *Methods* 1999 ; 19 : 213-21.
- Kay LE. NMR studies of protein structure and dynamics. *J Magn Resonance* 2005 ; 173 : 193-207.
- Dauter Z. Current state and prospects of macromolecular crystallography. *Acta Crystallographica D Biol Crystallogr* 2006 ; 62 : 1-11.
- Erlanson DA, McDowell RS, O'Brien T. Fragment-based drug discovery. *J Med Chem* 2004 ; 47 : 3463-82.
- Wermuth CG. Les grandes méthodes de découverte sont-elles appropriées ? *Biofutur* 2003 ; 239 : 23-7.
- Kitov PI, Sadowska JM, Mulvey G, et al. Shiga-like toxins are neutralized by tailored multivalent ligands. *Nature* 2000 ; 403 : 669-72.
- Verma R, Peters NR, D'Onofrio M, et al. Ubistatins inhibit proteasome-dependent degradation by binding the ubiquitin chain. *Science* 2004 ; 306 : 117-20.
- Luo C, Laaja P. Inhibitors of JAKs/STATs and the kinases: a possible new cluster of drugs. *Drug Discov Today* 2004 ; 9 : 268-75.
- Garcia-Echeverria C, Pearson MA, Marti A, et al. In vivo antitumor activity of NVP-AEW541. A novel, potent, and selective inhibitor of the IGF-IR kinase. *Cancer Cell* 2004 ; 5 : 231-8.
- Song M, Rajesh S, Hayashi Y, Kiso Y. Design and synthesis of new inhibitors of HIV-1 protease dimerization with conformationally constrained templates. *Bioorg Med Chem Lett* 2001 ; 11 : 2465-8.
- Huang Z. Bcl-2 family proteins as targets for anticancer drug design. *Oncogene* 2000 ; 19 : 6627-31.
- Sattler M, Liang H, Nettesheim D, et al. Structure of Bcl-xL-Bak peptide complex: recognition between regulators of apoptosis. *Science* 1997 ; 275 : 983-6.
- Degterev A, Lugovskoy A, Cardone M, et al. Identification of small-molecule inhibitors of interaction between the BH3 domain and Bcl-xL. *Nat Cell Biol* 2001 ; 3 : 173-82.
- Oltschendorf T, Elmore SW, Shoemaker AR, et al. An inhibitor of Bcl-2 family proteins induces regression of solid tumours. *Nature* 2005 ; 435 : 677-81.
- Bilim V, Kasahara T, Hara N, et al. Role of XIAP in the malignant phenotype of transitional cell cancer (TCC) and therapeutic activity of XIAP antisense oligonucleotides against multidrug-resistant TCC in vitro. *Int J Cancer* 2003 ; 103 : 29-37.
- Du C, Fang M, Li Y, et al. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell* 2000 ; 102 : 33-42.
- Fulda S, Wick W, Weller M, Debatin KM. Smac agonists sensitize for Apo2L/TRAIL- or anticancer drug-induced apoptosis and induce regression of malignant glioma in vivo. *Nat Med* 2002 ; 8 : 808-15.
- Liu Z, Sun C, Olejniczak ET, et al. Structural basis for binding of Smac/Diablo to the XIAP BIR3 domain. *Nature* 2000 ; 408 : 1004-8.
- Li L, Thomas RM, Suzuki H, et al. A small molecule Smac mimic potentiates TRAIL- and TNF $\alpha$ -mediated cell death. *Science* 2004 ; 305 : 1471-4.
- Fulda S, Wick W, Bottger V, Sparks A, et al. Design of a synthetic Mdm2-binding mini protein that activates the p53 response in vivo. *Curr Biol* 1997 ; 7 : 860-9.
- Mukherjee AK, Basu S, Sarkar N, Ghosh AC. Advances in cancer therapy with plant based natural products. *Curr Med Chem* 2001 ; 8 : 1467-86.
- Oost TK, Sun C, Armstrong RC, et al. Discovery of potent antagonists of the antiapoptotic protein XIAP for the treatment of cancer. *J Med Chem* 2004 ; 47 : 4417-26.
- Fasan R, Dias RL, Moehle K, et al. Structure-activity studies in a family of beta-hairpin protein epitope mimetic inhibitors of the p53-HDM2 protein-protein interaction. *ChemBiochem* 2006 ; 7 : 515-26.
- Petersen EF, Goddard TD, Huang CC, et al. UCSF Chimera. A visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem* 2004 ; 25 : 1605-12.

TIRÉS À PART  
C. Cochet

## **OBJECTIF DU TRAVAIL DE THESE : trouver des outils capables de perturber l'interaction CK2 $\alpha$ – CK2 $\beta$**

Etant donnés le rôle crucial de l'interaction entre les sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$  de CK2 pour la régulation de son activité et l'implication de CK2 dans la tumorigénèse, nous avons souhaité mettre en place des stratégies visant à concevoir et valider des molécules capables d'inhiber l'interaction entre les deux sous-unités de CK2.

Les arguments décrits précédemment suggèrent que l'interaction CK2 $\alpha$ -CK2 $\beta$  doit être suffisamment labile pour qu'il soit *possible* de trouver des molécules antagonistes capables de perturber cette interaction. Disposer de telles molécules inhibitrices aurait un double intérêt :

- Par leur capacité à rompre l'association CK2 $\alpha$ -CK2 $\beta$ , ces antagonistes permettraient de mieux comprendre le contrôle qu'exerce CK2 $\beta$  sur l'activité catalytique de cette protéine kinase et d'identifier ses protéines cibles CK2 $\beta$ -dépendantes. Contrairement aux inhibiteurs d'activité protéine-kinase classiques, qui inhibent en bloc l'activité catalytique vis-à-vis de tout substrat, ces outils permettraient ainsi d'exercer une *modulation fine* et sélective de l'activité CK2 sans l'inhiber totalement.
- D'autre part, en raison du caractère « suppresseur d'apoptose » de la CK2, une inhibition sélective de CK2 pourrait avoir des répercussions sur l'oncogénèse et ces molécules inhibitrices pourraient par là se révéler être des agents anticancéreux potentiels.

## **DEMARCHE**

Forts des exemples couronnés de succès que nous avons décrits dans cette revue, notre stratégie a été :

- 1) dans un premier temps de s'assurer qu'il était possible de mettre en place un test d'interaction *in vitro*, en démontrant que la dynamique des sous-unités pouvait être reproduite *in vitro*.
- 2) de mettre en place un criblage à haut débit afin d'isoler des molécules inhibitrices. Un premier essai ayant été infructueux, nous avons ciblé une chimiothèque conçue spécialement pour les interactions protéine-protéine. Malheureusement, la collaboration n'a pas pu être poursuivie.
- 3) L'échec de l'approche par criblage nous a conduit à nous tourner vers une approche rationnelle (« rational drug design ») en partant des données cristallographiques. En s'appuyant sur les données structurales du complexe, nous avons déterminé avec précision

les acides aminés critiques pour l'interaction, ceci pour concevoir de manière orientée la synthèse d'un peptide antagoniste de l'interaction CK2 $\alpha$ -CK2 $\beta$  (figure 33).

4) La caractérisation de ce peptide a permis d'isoler un pharmacophore et de rechercher par criblage virtuel des molécules chimiques mimétiques reproduisant les effets biologiques de ce peptide. Ces molécules ont été validées *in vivo* et leurs effets sur la prolifération et la survie des cellules cancéreuses ont été évalués.

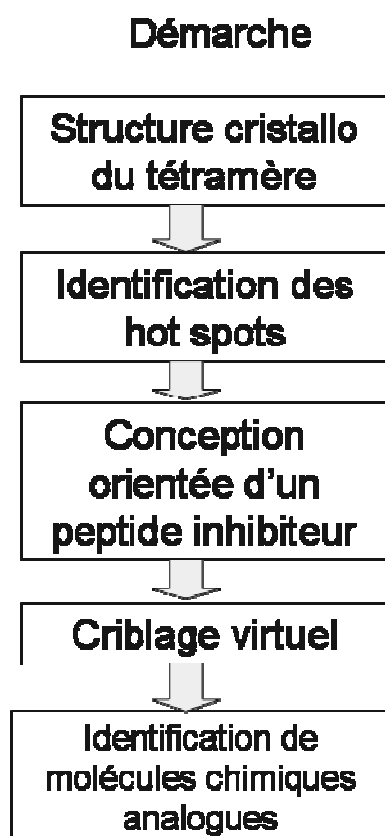


Figure 33 : Démarche choisie *in fine* pour l'identification d'inhibiteurs de l'interaction CK2 $\alpha$ -CK2 $\beta$ .

# RESULTATS

## RESULTATS

### **1° partie : Mise en évidence d'une mobilité différentielle des sous-unités de CK2 dans les compartiments cellulaires**

#### **I- Introduction**

La description traditionnelle de CK2 sous forme de complexe hétérotétramérique obligatoire (Martel, 2002) a été remise en question par les apports de la cristallographie et de l'imagerie cellulaire. Effectivement, la disproportion de CK2 $\alpha$  et CK2 $\beta$  dans différents tissus laissait soupçonner que ces sous-unités devaient avoir des fonctions ponctuellement indépendantes du complexe CK2 et interagir avec d'autres complexes macromoléculaires (Bibby, 2005). Cette hypothèse a été renforcée par la résolution de la structure tridimensionnelle du tétramère, qui a clairement mis en évidence une faible surface d'interaction entre CK2 $\alpha$  et CK2 $\beta$ , typique d'un complexe transitoire (Niefind, 2001). De même, le concept d'une dissociation d'un complexe de forte affinité grâce à l'existence de sous-populations de partenaires de plus faible affinité a été modélisé mathématiquement (Filhol, 2004).

L'hypothèse a finalement été totalement corroborée par la visualisation de la dynamique différentielle des sous-unités de CK2 en cellules vivantes par la technique de FLIP (fluorescence loss in photobleaching). L'association de CK2 $\alpha$  et CK2 $\beta$  supprime leur importation nucléaire (Filhol, 2003).

D'autres méthodes complémentaires d'imagerie de fluorescence ont été utilisées pour suivre les mouvements de CK2 $\alpha$  et CK2 $\beta$  dans la cellule : FRET avec photoblanchiment (fluorescence resonance transfer energy, FRAP (fluorescence recovery after photobleaching), FCS (fluorescence correlation spectroscopy) et photoactivation. Leur principe est rappelé schématiquement sur la figure 96 de la section Matériel et méthodes. Ces expériences montrent que la reconstitution du tétramère peut avoir lieu aussi bien dans le cytoplasme que dans le noyau.

#### **II- Article**

***Theis-Febvre N, Martel V, Laudet B, Souchier C, Grunwald D, Cochet C, Filhol O.  
Highlighting protein kinase CK2 movement in living cells.  
Mol Cell Biochem. 2005 Jun;274(1-2):15-22.***

# Highlighting protein kinase CK2 movement in living cells

Nathalie Theis-Febvre,<sup>1</sup> Véronique Martel,<sup>1</sup> Béatrice Laudet,<sup>1</sup>  
Catherine Souchier,<sup>2</sup> Didier Grunwald,<sup>3</sup> Claude Cochet<sup>1</sup>  
and Odile Filhol<sup>1</sup>

<sup>1</sup>INSERM EMI 104, Département Réponse et Dynamique Cellulaires, CEA 38054, Grenoble, France; <sup>2</sup>INSERM U309, Institut Albert Bonniot, 38706 La Tronche, France; <sup>3</sup>INSERM EMI 9931, Département Réponse et Dynamique Cellulaires, CEA 38054 Grenoble, France

## Abstract

Protein kinase CK2 has traditionally been described as a stable heterotetrameric complex ( $\alpha_2\beta_2$ ) but new approaches that effectively capture the dynamic behavior of proteins, are bringing a new picture of this complex into focus. To track the spatio-temporal dynamics of CK2 in living cells, we fused its catalytic  $\alpha$  and regulatory  $\beta$  subunits with GFP and analog proteins. Beside the mostly nuclear localization of both subunits, and the identification of specific domains on each subunit that triggers their localization, the most significant finding was that the association of both CK2 subunits in a stable tetrameric holoenzyme eliminates their nuclear import (Mol Cell Biol 23: 975–987, 2003). Molecular movements of both subunits in the cytoplasm and in the nucleus were analyzed using different new and updated fluorescence imaging methods such as: fluorescence recovery after photo bleaching (FRAP), fluorescence loss in photo bleaching (FLIP), fluorescence correlation spectroscopy (FCS), and photoactivation using a biphoton microscope. These fluorescence-imaging techniques provide unprecedented ways to visualize and quantify the mobility of each individual CK2 subunit with high spatial and temporal resolution. Visualization of CK2 heterotetrameric complex formation could also be recorded using the fluorescence resonance energy transfer (FRET) technique. FRET imaging revealed that the assembling of this molecular complex can take place both in the cytoplasmic and nuclear compartments. The spatio-temporal organization of individual CK2 subunits and their dynamic behavior remain now to be correlated with the functioning of this kinase in the complex environment of the cell. (Mol Cell Biochem **274**: 15–22, 2005)

**Key words:** protein kinase CK2, localization, targeting, movement, subunit interaction

## Introduction

Protein kinase CK2 is a pleiotropic and almost universal protein kinase that has crucial roles in cell differentiation, proliferation and survival [2, 3]. Many of the identified CK2 substrates that are critical for cell proliferation and viability are localized in different cell compartments. It is, therefore, suspected that targeting CK2 to specific sub-cellular loca-

tions is crucial to many of its roles. Although the common view describes this enzyme as a tetrameric complex consisting of two  $\alpha$  catalytic subunits and two  $\beta$  regulatory subunits, accumulating evidence indicate that free populations of both CK2 subunits can exist and exert specific functions in the cell [1, 4, 5]. Sub-cellular localization and targeting of protein kinases play important roles in signal transduction that regulates many cellular processes. Thus, understanding

how a multifunctional enzyme like CK2 can achieve specificity of action over time and space requires an understanding of both the localization and the functional interaction of its subunits. Due to the advent of fluorescent protein technology, it has been feasible to visualize, track and quantify molecules and events in living cells [6, 7].

In the current work, we have applied recent fluorescent microscopy imaging techniques to monitor the localization and trafficking of the CK2 subunits and their interaction in the complex environment of a cell.

## Materials and methods

### *Constructs of plasmids encoding photoactivatable GFP-CK2 subunits*

The cDNA encoding CK2 $\alpha$  and CK2 $\beta$  were sub-cloned from EGFP-CK2 $\alpha$  or  $\beta$  [1] into PA-GFPc1 plasmid [8].

### *Transient transfection of NIH 3T3 cells*

NIH 3T3 cells were transiently co-transfected using Fugene 6 reagent (Roche) according to the manufacturer's instructions, with PA-GFP, PA-GFP CK2 $\alpha$  or PA-GFP CK2 $\beta$  together with DsRED-N1 plasmid (ratio 1/2) to visualize the transfected cells before photoactivation. One day after transfection, the cell medium was changed to remove the pH indicator phenol red and 10 mM HEPES was added to DMEM supplemented with 10% fetal calf serum (FCS) to buffer it.

### *Photo-activation*

Activation of GFP fluorescence either in the nucleus or in the cytoplasm was performed using a biphoton microscope (LSM510-NLO, Zeiss) at the 720 nm wavelength in a small area (circle  $30 \times 30$  pixels) using 10 iterations with 50% of the maximum laser power (fs Ti: Sa Tsunami, Spectra Physics). Photo-activated GFP images were then acquired at 488 nm using argon laser.

Control experiments showed that bleaching of the PA-GFP (photoactivatable GFP) during imaging was not detected. An image of the entire cell before and after photoactivation was recorded.

### *Nuclear import measurement*

Typically, PA-GFP containing cells were detected via DsRed expression. PA-GFP proteins were photoactivated inside the cytoplasm, in different spots (at least three) during 1 min max-

imum and immediately after, an image of the entire cell was recorded every 60 s during 15 min. The fluorescence intensity in both nucleus and cytoplasm was measured and the ration of these intensities minus the initial intensity was plotted over time. Three PA-GFP CK2 $\alpha$ , four PA-GFP CK2 $\beta$  and two PA-GFP control-expressing cells were monitored in three independent experiments.

### *Measurement of PA-GFP CK2 subunits mobility*

NIH 3T3 fibroblasts transiently expressing PA-GFPCK2 subunits were submitted to a "visible pulse chase experiment": photoactivation was performed in a tiny region of interest (ROI) ( $30 \times 30$  pixels) either in the cytoplasm or in the nucleus, and immediately after, the fluorescent signal was followed in a time series (every 62 ms) for  $\sim 3$  min, to follow the PA-GFP. Fluorescence intensity was plotted over time, and the resulting curves were fitted using Origin Software with an exponential decay function:  $y = a_1 \exp(-x/t_1) + a_2 \exp(-x/t_2) + y_0$ .

### *Labeling of CK2 $\beta$ with Cy3*

Recombinant CK2 $\beta$  was labeled with Cy3 as recommended by the manufacturer (Amersham Kit PA23001): 200  $\mu$ g of bacterially expressed CK2 $\beta$  were equilibrated in 0.1 M Na Carbonate pH 9.3 and added to the labeling kit for 30 min at 22 °C. To remove the unbound Cy3, the reaction was loaded on a G50 gel filtration column equilibrated in PBS and concentrated in a Vivaspinn micro concentrator (cutoff 30 kDa, Vivascience).

### *Microinjection*

NIH 3T3 mouse fibroblasts stably expressing GFP, GFP CK2 $\alpha$  or GFP CK2 $\beta$  [1] were grown at 37 °C in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% (v/v) FCS in 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. Prior to microinjection, the cells were placed on medium supplemented with 10 mM HEPES-pH 7.4, and the solution containing Cy3-labeled CK2 $\beta$  was centrifuged for 15 min at 1,00,000 g in a TL100 Beckman Airfuge. NIH 3T3 cells were microinjected using a semiautomatic micro injector (Eppendorf). After injection, the cells were allowed to recover for one hour at 37 °C in 5% CO<sub>2</sub> atmosphere before fixation with 4% Para formaldehyde for 20 min.

### *FRET imaging*

Fluorescence images of fixed cells were acquired on a confocal laser-scanning microscope (LEICA TCS-SP2). GFP



and Cy3 were excited with the 488 nm wavelength of an argon laser and a 543 nm wavelength of an He/Ne laser respectively. FRET was determined by the acceptor photo bleaching method according to the following sequence: (i) a pre-photo bleach GFP (donor) image was acquired by scanning with 488 nm light; (ii) an intracellular ROI was selected and rendered free of Cy3 (acceptor) by repeated scanning with the 543 nm laser ray until all Cy3 was photo destructed; (iii) a post-photo bleach GFP image was acquired by scanning with a 488 nm laser; (iv) the FRET efficiencies in the ROI were calculated from image subtraction between the two (post-bleach and pre-bleach) GFP images.

## Results

### *Nuclear import kinetics of CK2 subunits*

Previous results have shown that both CK2 subunits contain nuclear localization domains that target them independently to the nucleus. However, for technical reasons, the dynamic of the GFP-CK2 $\beta$  nuclear import could not be analyzed in this study [1]. To go further in this direction, we took advantage of the recently developed photoactivatable fluorescent protein, PA-GFP [9]. This protein displays little fluorescence under excitation at the imaging wavelength (488 nm) but exhibits up to 100-fold increase in fluorescence after irradiation at a different wavelength. Both CK2 subunits were cloned into the PA-GFP plasmid and expressed in NIH 3T3 fibroblasts. To highlight and follow the fate of PA-GFP proteins in living cells, we selectively photoactivated a subpopulation of PA-GFP CK2 subunits in the cytoplasmic compartment of expressing cells and observed their behaviors over time (Fig. 1). The photoactivation was efficiently performed using a biphoton excitation at 720 nm, illustrating a new application of multiphoton fluorescence microscopy. After  $\sim 1$  s of photoactivation within different spots in the cytoplasm (determined by Nomarski imaging), the cytoplasmic pool of PA-GFP CK2 subunits became highly fluorescent under 488 nm excitation and the fluorescent signal appeared relatively homogeneous. This observation suggests a high mobility of the photoactivated molecules inside this cell compartment (Fig. 1A a, a', a''). Continued imaging with 488 nm light revealed rapid movement of the photoactivated GFP alone, across the nuclear envelope, and into the nucleus, resulting in its equilibration throughout the cell in a matter of 5 min (Fig. 1A a, b, c, d and B) as previously described [8]. For PA-GFP-CK2 $\alpha$ , the nuclear translocation was less rapid than for PA-GFP alone, as shown in Fig. 1A a', b', c', d' and B. The equilibration of the fluorescence signal throughout the cell was only detectable after 15 min. In contrast, during this

time frame, the nuclear translocation of PA-GFP-CK2 $\beta$  was barely detectable (Fig. 1A a'', b'', c'', d'' and B). Panel B in Fig. 1 represents the ratio of fluorescence intensity normalized by the fluorescence intensity at  $t = 0$ , for several types of PA-GFP-molecule expressing cells measured both in the nucleus and in the cytoplasm. Altogether, these experiments show that the nuclear import kinetics of CK2 subunits are different, CK2 $\beta$  being the less rapid in this translocation. The fact that CK2 $\alpha$  is slower than GFP alone agrees for an active transport of this kinase subunit as compare to the passive diffusion of PA-GFP.

### *Mobility of PA-GFP-CK2 subunits in living cells*

In our previous study, the FLIP technique clearly showed that GFP-CK2 $\alpha$  moves faster than GFP-CK2 $\beta$  both in the cytoplasm and in the nucleus [1]. A fluorescent correlation spectroscopy (FCS) approach revealed that both CK2 subunits could be separated in two subpopulations: one of fast moving CK2 subunits displaying diffusion constants similar to that of GFP and an-other subpopulation of slow moving CK2 subunits. This last population was characterized as CK2 subunits that are highly restricted in their mobility suggesting that they might be associated with less mobile structures in high molecular complexes. However, in contrast to the FLIP experiments, the FCS analysis did not indicate that in the fast moving population CK2 $\alpha$  and CK2 $\beta$  were diffusing at different rates. For this reason, we choose a third approach using PA-GFP photoactivation in a “visible pulse chase,” to study the mobility of both CK2 subunits. A short pulse of activating light (720 nm with the biphoton excitation) confined only to one compartment of the cell (cytoplasm or nucleus) labeled the CK2 subunits expressed in this location. This generated an initial pool of fluorescent CK2 subunits that owing to their respective mobility diffused away from this region in all directions. The extent and rate at which this occurs can be quantified and used with computer-modeling approaches to describe the kinetic parameters of the protein. Measurements of fluorescence in the area in which CK2 subunits moved over time (Fig. 2) were performed both in the cytoplasm and in the nucleus. A typical graph is shown in Fig. 2 for each PA-GFP expressing cell type, after photoactivation inside the nucleus. The fluorescence decrease observed after the photoactivation step was fitted using a bi-exponential decay model. The main characteristic times are reported in Table 1. These results show that (i) there is no significant difference in the mobility of the three proteins in the nucleus as compared to the cytoplasm, (ii) the diffusion time for PA-GFP ( $0.66 \pm 0.06 \mu\text{s}$ ) is significantly shorter than that of the PA-GFP-CK2 subunits ( $> \mu\text{s}$ ) confirming that CK2 subunits are less mobile than GFP alone. However, this technical approach does

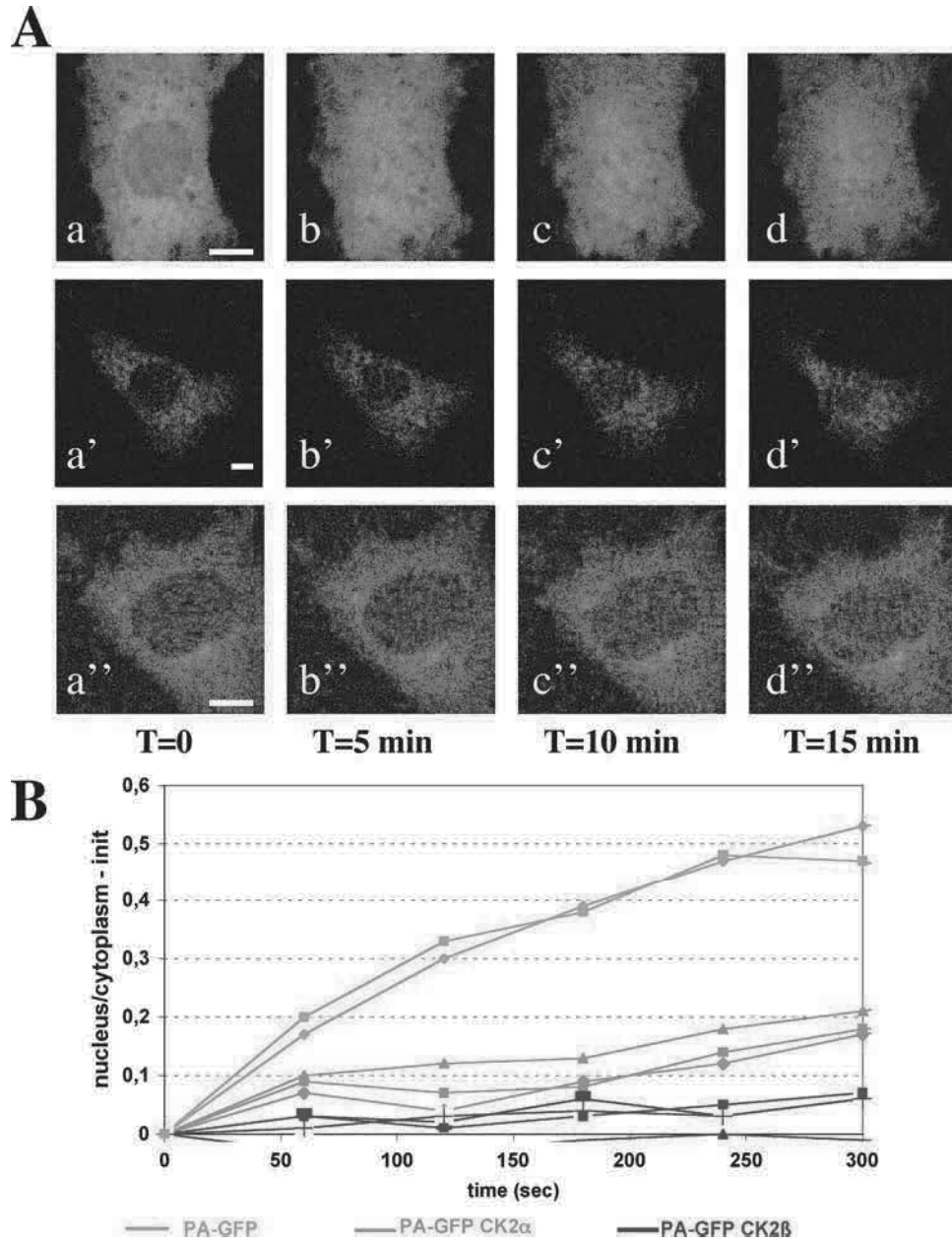


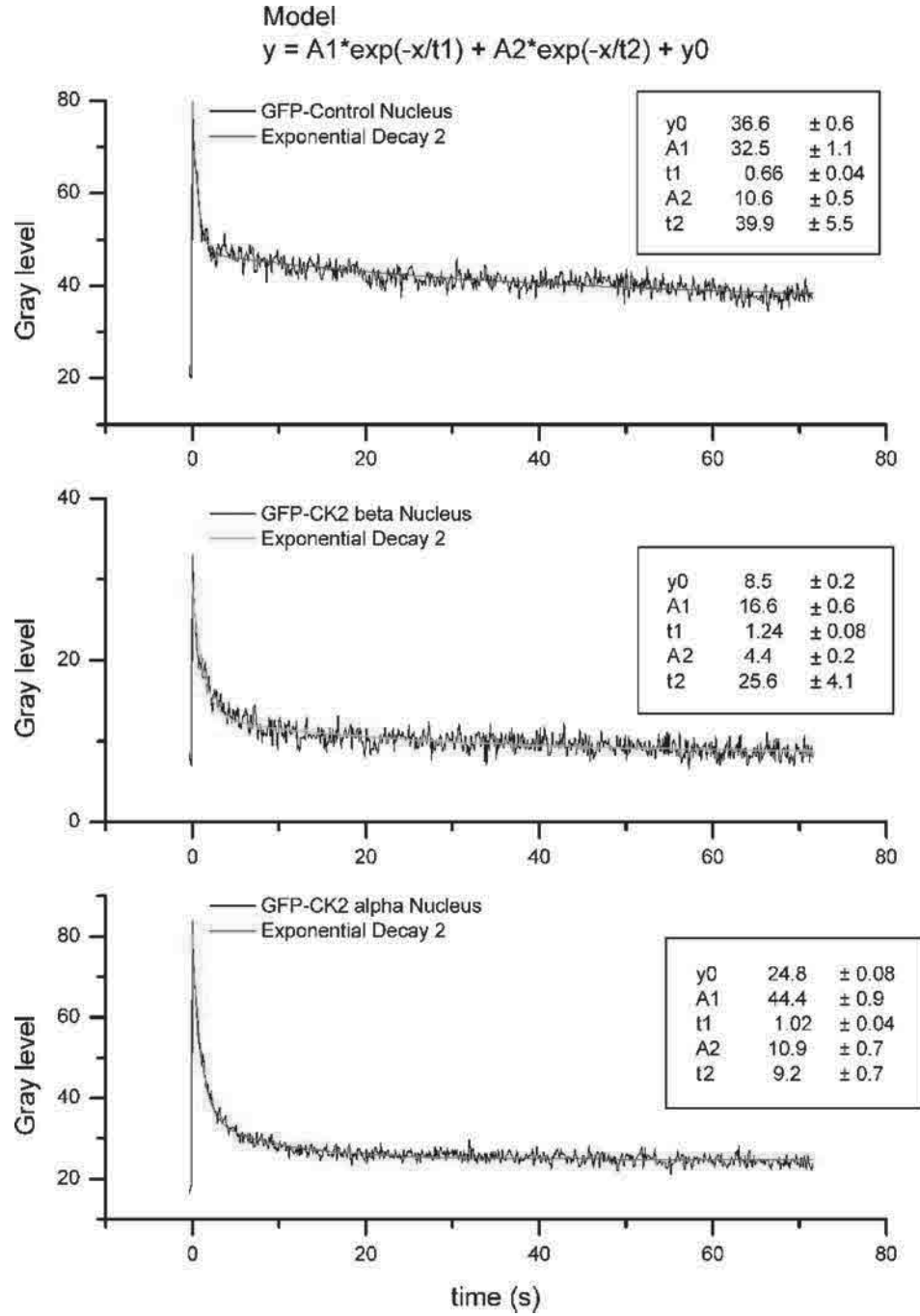
Fig. 1. Nuclear import of PA-GFP CK2 subunits. NIH 3T3 cells transiently transfected with either PA-GFP (a–d), PA-GFP-CK2 $\alpha$  (a'–d') or PA-GFP-CK2 $\beta$  (a''–d'') were photoactivated by illuminating inside the cytoplasm as described in Materials and methods section. Immediately after photoactivation, images of the whole cell were recorded every minute for 15 min. (A) Indicated time points are illustrated for each PA-GFP fusion proteins. Bar, 5  $\mu$ m. (B) The ratio of fluorescence intensity between the nucleus and the cytoplasm recorded in the three types of cells was plotted over time.

not provide evidence for a difference in mobility between CK2 subunits as previously observed by FLIP experiments [1].

However, the demonstration within the cell of a subtle equilibrium between the different forms of CK2 subunits raises the question of the reality of their functional interaction in living cells [5].

#### *Interaction of CK2 subunits visualized by in situ FRET experiments*

To visualize the interaction of CK2 subunits in a cell environment, we used *in situ* FRET experiments. After microinjection of Cy3-CK2 $\beta$ , cells were fixed and processed as described under Materials



*Fig. 2.* Photo activation of PA-GFP CK2 subunits in living cells. NIH 3T3 cells transiently expressing PA-GFP, PA-GFP-CK2 $\alpha$  or PA-GFP-CK2 $\beta$  were photoactivated using a biphoton microscope in a small spot, either in the nucleus or in the cytoplasm. The fluorescent signal was then followed in a time series every 62 ms (600 images) inside the spot. A representative experiment is shown for PA-GFP, PA-GFP-CK2 $\alpha$  and PA-GFP-CK2 $\beta$  photoactivated inside the nucleus. Gray level corresponding to fluorescence intensity was plotted over time. Using Origin software, the curve was fitted with the exponential decay model.

and Methods, for acceptor photo bleaching FRET microscopy.

GFP-CK2 $\alpha$  expressing NIH 3T3 cells were microinjected with Cy3-CK2 $\beta$  in the cytoplasm and the corresponding

FRET efficiencies were determined (Fig. 3A). The first acquired image (D1) represents the fluorescence intensity distribution of the donor GFP-CK2 $\alpha$  directly excited at 488 nm. The second image (A1) represents the fluorescence intensity

Table 1. Photoactivation experiment

| Cell             | Localization | N  | $\tau_1$ ( $\mu$ s) | $\tau_1$          |
|------------------|--------------|----|---------------------|-------------------|
| GFP <sup>b</sup> | Nucleus      | 9  | $0.66 \pm 0.06^a$   | $0.66 \pm 0.06^b$ |
|                  | Cytosplasm   | 10 | $0.66 \pm 0.11$     |                   |
| GFP-CK2 $\alpha$ | Nucleus      | 28 | $1.04 \pm 0.10$     | $1.02 \pm 0.06$   |
|                  | Cytosplasm   | 20 | $0.99 \pm 0.06$     |                   |
| GFP-CK2 $\beta$  | Nucleus      | 8  | $1.20 \pm 0.10$     | $1.33 \pm 0.11$   |
|                  | Cytosplasm   | 10 | $1.44 \pm 0.18$     |                   |

<sup>a</sup>Mean  $\pm$  S.E.M.,  $\tau_1$  value of the exponential model.

<sup>b</sup>Kruskal Wallis rank test, significant differences between GFP fusion proteins.

distribution of the acceptor Cy3-CK2 $\beta$  excited at 543 nm. The acceptor fluorophore was subsequently photo bleached in a define area of the field (demarcated by a white rectangle in A2 and D2) by repeated scanning with a 543 nm laser ray, thereby abolishing FRET. A second donor fluorescence image (D2) was obtained with 488 nm excitation. An increase of donor fluorescence intensity in the region of acceptor photo bleaching, would be expected only in cellular structures exhibiting FRET. Indeed, a brighter signal from the donor GFP-CK2 $\alpha$  was apparent in the cytoplasm containing Cy3-CK2 $\beta$ , indicating the existence of a complex between GFP-CK2 $\alpha$  and Cy3-CK2 $\beta$  in this cell compartment. The FRET efficiency throughout the cell was calculated by a simple image arithmetic operation (Fig. 3A, FRET [D2-D1]). As expected, the FRET signal outside the white rectangle was near zero.

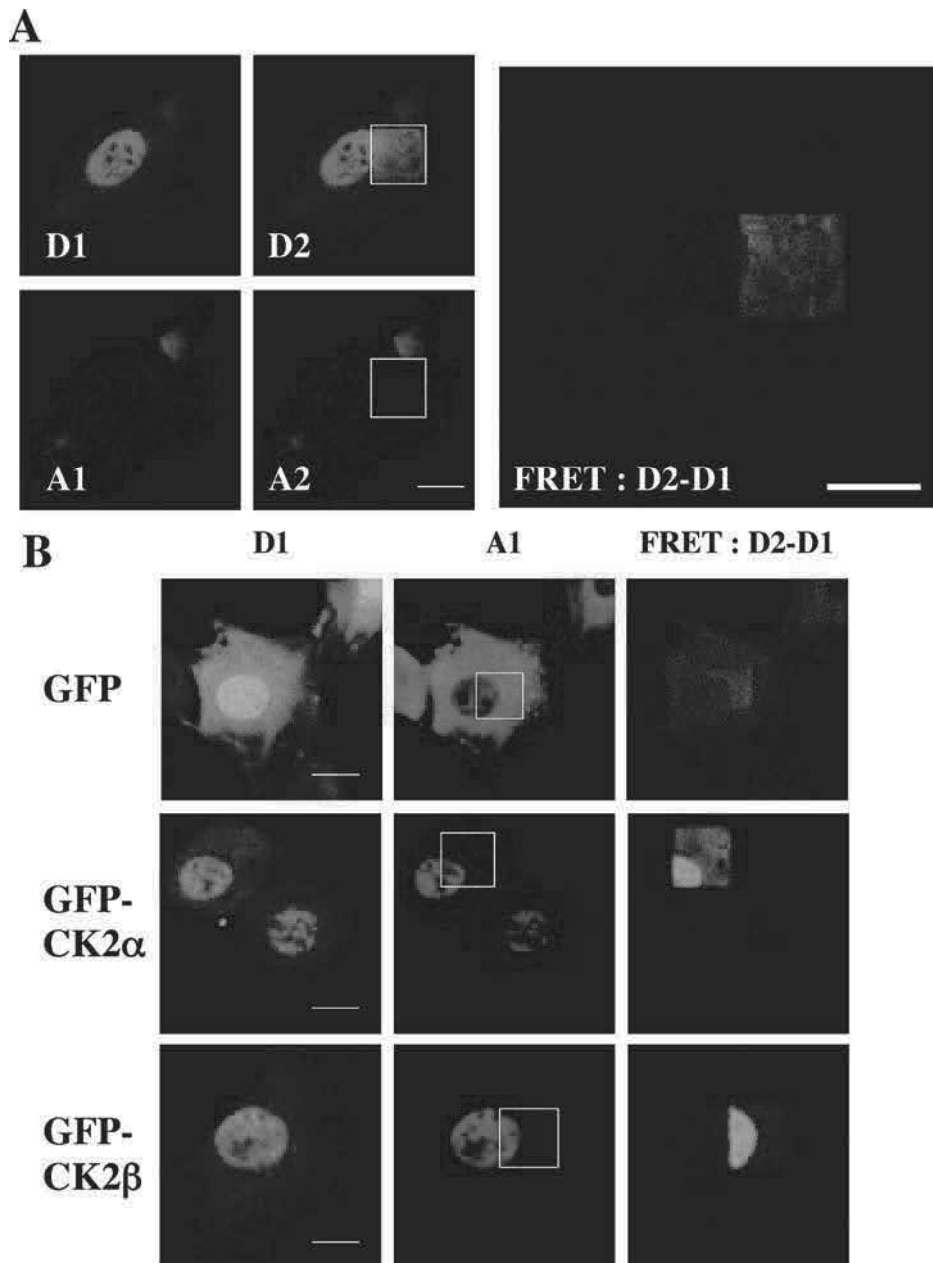
The same technique was used to investigate the interaction of different GFP-tagged proteins with Cy3-CK2 $\beta$  (Fig. 3B). Column 1 (D1) depicts the donor (GFP, GFP-CK2 $\alpha$ , GFP-CK2 $\beta$ ) fluorescence intensity distribution in the cells, and column 2 (A1) the microinjected Cy3-CK2 $\beta$  signal; the white rectangle denotes the location of the acceptor free region after Cy3 photo destruction. The FRET efficiencies were calculated by subtraction of the donor fluorescence intensity images after and before Cy3 photo destruction (Fig. 3B, column 3, D2-D1). FRET was negligible in GFP expressing cells, but clearly detectable in the nucleus and to a lower extent in the cytoplasm of CK2 $\alpha$  and CK2 $\beta$  expressing cells, (compare Fig. 3B, FRET D2-D1 and Fig. 3A, FRET D2-D1). From these observations, we conclude that specific populations of CK2 $\alpha$  and CK2 $\beta$  are in close molecular proximity. The range over which FRET between a donor (GFP) and an acceptor (Cy3) fluorescent molecule varies in a sensitive manner is dictated by  $R_0$  (the distance at which the FRET efficiency is 50%).  $R_0$  for GFP/Cy3 system is between 2 and 6 nm [10]. Because no FRET signal could be detected with GFP alone, the observed FRET signals represent the interaction between Cy3-CK2 $\beta$  and CK2 $\alpha$  or CK2 $\beta$

respectively (Fig. 3). Unexpectedly, the FRET signal observed in cells expressing Cy3-CK2 $\beta$  and GFP-CK2 $\beta$  suggests that these two proteins are also in close molecular proximity. This homologous interaction between CK2 $\beta$  subunits can take place both in the nucleus and to a lesser extent, in the cytoplasm.

## Discussion

In this study we describe experiments aimed at going further into dynamic aspects of CK2 in living cells, focusing on three points: (i) comparison of both CK2 subunits nuclear import, (ii) intrinsic mobility using photoactivatable-GFP fused to CK2 subunits and (iii) *in situ* visualization of the subunit interaction by the FRET technology. Using the recently developed photoactivatable GFP proteins [9], we could show that GFP-CK2 $\beta$  enters into the nucleus much slower than GFP-CK2 $\alpha$ . This is in agreement with the idea that the nuclear import of both subunits is mediated by independent mechanisms. CK2 $\alpha$  contains in its sequence a classical NLS motif that is absent in CK2 $\beta$ . The rate of the regulatory subunit nuclear import is conceivable with the hypothesis that CK2 $\beta$  may “piggy pack” its way into the nucleus [11]. The FLIP and the FCS analysis showed that CK2 subunits are highly mobile. In addition, a differential kinetic behavior of each subunit was revealed by the FLIP analysis [1]. Using the photoactivation technique as a third independent approach, we have determined that the diffusion coefficients for each CK2 subunit fall into the same range of measurements. However, the resolution of the photoactivation technique and perhaps, the lack of enough cell number analyzed do not reveal a statistical difference in the kinetic behavior of each CK2 subunit. It is noteworthy that the FLIP and photoactivation techniques give access to results that represent the sum of movement of CK2 subunits in all their forms: activated, inactivated, free, bound, or bound to different partners. FCS analysis suggested the existence in living cells of two subpopulations of fast and slow moving CK2 subunits that could represent on one hand, the highly mobile free CK2, and on the other hand, less mobile CK2 subunit-containing macromolecular complexes. These observations also revealed that the CK2 subunits are not permanently associated, as previously thought, and that their molecular interaction is in fact highly dynamic.

*In situ* visualization of this molecular interaction could be demonstrated via the ectopically targeted expression of the CK2 $\beta$  to the plasma membrane [12]. These observations are strengthened by our FRET experiments that clearly demonstrate that in living cells, Cy3-CK2 $\beta$  interacts both with CK2 $\alpha$  and CK2 $\beta$ . X-ray crystallographic studies revealed that CK2 $\beta$  is a dimeric protein [13]. In the holoenzyme, two CK2 $\alpha$  that are not in contact with each other interact with a



*Fig. 3.* Detection of molecular interaction between CK2 subunits by acceptor photo bleaching FRET microscopy. NIH 3T3 mouse fibroblasts stably expressing GFP, GFP-CK2 $\alpha$  or GFP-CK2 $\beta$  were microinjected with Cy3-CK2 $\beta$ . (A) Sequence of events to obtain FRET signal from acceptor photobleaching. A donor image D1 (GFP-CK2 $\alpha$  expressing cell) and an acceptor image A1 (Cy3-CK2 $\beta$ ) are acquired. The acceptor is photo bleached in a specific area of the cell by continuous scanning with the 543 nm laser line (A2). The intracellular reference regions created by Cy3 photo destruction are enclosed in white rectangles. After photo destruction of Cy3 a second donor image D2 is obtained. The FRET signal is shown in the difference image (D2-D1). (B) Vertical column from left to right: Column 1, fluorescence of stably GFP fusion proteins expressing cells indicated on the left (donor before bleaching = D1); Column 2, fluorescence of microinjected Cy3-CK2 $\beta$  (acceptor before bleaching = A1). The region in which the acceptor was photo bleached is marked with a white rectangle. Column 3, FRET signal calculated from the subtraction of post- and pre-Cy3 photo bleaching donor fluorescence images.

central building block that is represented by the CK2 $\beta$  dimer [14]. Since it is assumed that both Cy3-CK2 $\beta$  and GFP-CK2 $\beta$  are dimeric proteins [1, 13], the increase in fluorescence of the donor GFP-CK2 $\beta$  in FRET experiments could either reflect the incorporation of CK2 $\beta$  in high-order structure of the CK2

holoenzyme [15, 16], or the dynamic association/dissociation of the CK2 $\beta$  dimer.

Sub-cellular localization and targeting of protein kinases is a common theme in signal transduction. The sub-cellular dynamics of the CK2 subunits and the transient nature of

their interaction are the hallmarks of intracellular signaling molecules [3]. Our observations strengthen the notion that the regulation of CK2 activity must be understood within this context. Further studies are now required to correlate this complex dynamic with the functioning of this kinase in the cell environment.

## Acknowledgments

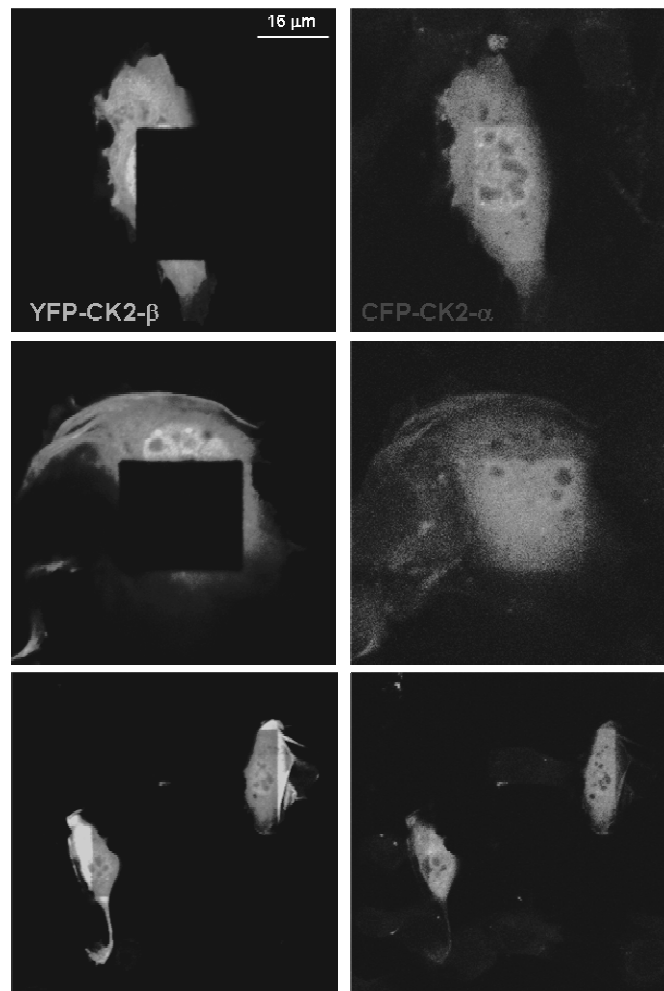
We thank Jacques Mezzega for the biphoton experiments. This work was supported by grants from the Institut National de la Santé Et de la Recherche Médicale (INSERM), the Commissariat à l'Energie Atomique and the Ligue Nationale contre le Cancer (équipe labellisée).

## References

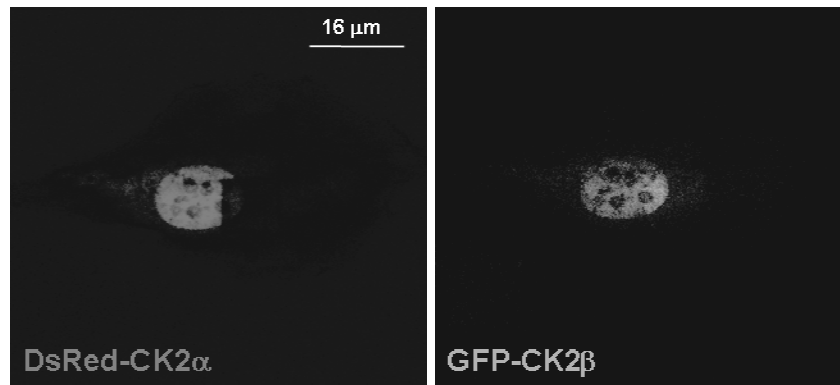
1. Filhol O, Nueda A, Martel V, Gerber-Scokaert D, Benitez MJ, Souchier C, Saoudi Y, Cochet C: Live-cell fluorescence imaging reveals the dynamics of protein kinase CK2 individual subunits. *Mol Cell Biol* 23: 975–987, 2003
2. Ahmed K, Gerber DA, Cochet C: Joining the cell survival squad: An emerging role for protein kinase CK2. *Trends Cell Biol* 12: 226–230, 2002
3. Litchfield DW: Protein kinase CK2: Structure, regulation and role in cellular decisions of life and death. *Biochem J* 369: 1–15, 2003
4. Guerra B, Siemer S, Boldyreff B, Issinger OG: Protein kinase CK2: evidence for a protein kinase CK2beta subunit fraction, devoid of the catalytic CK2alpha subunit, in mouse brain and testicles. *FEBS Lett* 462: 353–357, 1999
5. Filhol O, Martiel JL, Cochet C: Protein kinase CK2: A new view of an old molecular complex. *EMBO Rep* 5: 351–355, 2004
6. Lippincott-Schwartz J, Patterson GH: Development and use of fluorescent protein markers in living cells. *Science* 300: 87–91, 2003
7. van Roessel P, Brand AH: Imaging into the future: Visualizing gene expression and protein interactions with fluorescent proteins. *Nat Cell Biol* 4: E15–E20, 2002
8. Patterson GH, Lippincott-Schwartz J: A photoactivatable GFP for selective photolabeling of proteins and cells. *Science* 297: 1873–1877, 2002
9. Patterson GH, Lippincott-Schwartz J: Selective photolabeling of proteins using photoactivatable GFP. *Methods* 32: 445–450, 2004
10. Wouters FS, Bastiaens PI, Wirtz KW, Jovin TM, Bastiaens PH, Wanders RJ, Seedorf U: FRET microscopy demonstrates molecular association of non-specific lipid transfer protein (nsL-TP) with fatty acid oxidation enzymes in peroxisomes. The non-specific lipid transfer protein (sterol carrier protein 2) acts as a peroxisomal fatty acyl-CoA binding protein. *EMBO J* 17: 7179–7189, 1998
11. Martel V, Filhol O, Nueda A, Gerber D, Benitez MJ, Cochet C: Visualization and molecular analysis of nuclear import of protein kinase CK2 subunits in living cells. *Mol Cell Biochem* 227: 81–90, 2001
12. 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* 973: 272–277, 2002
13. Chantalat L, Leroy D, Filhol O, Nueda A, Benitez MJ, Chambaz EM, Cochet C, Dideberg O: Crystal structure of the human protein kinase CK2 regulatory subunit reveals its zinc finger-mediated dimerization. *EMBO J* 18: 2930–2940, 1999
14. 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* 20: 5320–5331, 2001
15. Glover CV: A filamentous form of *Drosophila* casein kinase II. *J Biol Chem* 261: 14349–14354, 1986
16. Valero E, De Bonis S, Filhol O, Wade RH, Langowski J, Chambaz EM, Cochet C: Quaternary structure of casein kinase 2. Characterization of multiple oligomeric states and relation with its catalytic activity. *J Biol Chem* 270: 8345–8352, 1995

### III- Résultats complémentaires

Le modèle de FRET par extinction de l'accepteur a été utilisé en réalisant des transfections transitoires d'une construction permettant l'expression d'une sous-unité dans des cellules exprimant de manière stable une construction fluorescente de l'autre sous-unité. Les différentes constructions utilisées sont : couple YFP-CK2 $\beta$  et CFP-CK2 $\alpha$ , ou couple GFP-CK2 $\beta$  et DsRed-CK2 $\alpha$ . La transfection transitoire est en effet moins lourde expérimentalement que la microinjection. Ceci a permis de visualiser l'interaction entre CK2 $\alpha$  et CK2 $\beta$  dans la cellule (figures 34 et 35) et de conclure de la même manière que des populations spécifiques de CK2 $\alpha$  et CK2 $\beta$  se trouvent à proximité (moins de 6 nm).



**Figure 34 : Détection de l'interaction CK2 $\alpha$ -CK2 $\beta$  *in vivo* par la méthode de FRET par photoblanchiment de l'accepteur en microscopie confocale.** Des cellules NIH-3T3 ont été transfectées de manière transitoire afin d'exprimer YFP-CK2 $\beta$  et CFP-CK2 $\alpha$ . L'accepteur (YFP-CK2 $\beta$ ) a été blanchi dans le carré sélectionné (colonne de gauche) permettant une augmentation de l'intensité du donneur (CFP-CK2 $\alpha$ , colonne de droite), témoin de l'interaction entre les sous-unités de CK2.



**Figure 35 : Détection de l'interaction CK2 $\alpha$ -CK2 $\beta$  *in vivo* par la méthode de FRET par photoblanchiment de l'accepteur en microscopie confocale.** Des cellules NIH-3T3 exprimant de manière stable la GFP-CK2 $\beta$  ont été transfectées afin d'exprimer DsRed-CK2 $\alpha$ . Une zone (carré) a été sélectionnée et l'accepteur (DsRed-CK2 $\alpha$ ) a été blanchi (colonne de gauche). L'intensité du donneur (GFP-CK2 $\beta$ ) est alors augmentée (colonne de droite), témoin de l'interaction entre les sous-unités de CK2.

Ces nouveaux résultats, en confirmant le dynamisme de l'interaction CK2 $\alpha$ -CK2 $\beta$  *in vivo*, nous ont convaincu de l'utilité de développer des antagonistes de cette interaction.



## **2° partie : Recherche de molécules inhibitrices de l'interaction CK2 $\alpha$ -CK2 $\beta$ par criblage à haut débit**

La première stratégie envisagée pour identifier des inhibiteurs de l'interaction CK2 $\alpha$ -CK2 $\beta$  a été de mettre en place des criblages de diverses chimiothèques. Un test d'interaction mettant en jeu de la MBP-CK2 $\beta$  immobilisée et de la GFP-CK2 $\alpha$  a été mis au point et robotisé, comme décrit dans la section Matériels et Méthodes.

### **I- Résultats du criblage de la Chimiothèque du NCI**

La chimiothèque « Mechanistic Set » du NCI regroupe 900 composés répartis sur 11 plaques 96 puits. Ces molécules ont été testées sur 60 lignées tumorales pour leur capacité à inhiber la prolifération cellulaire par le NCI. Ce sont des petites molécules chimiques : leur poids moléculaire moyen est de 500 Da.

Le criblage a été réalisé manuellement, à raison de 4 plaques par jour. Chaque plaque comporte 8 témoins positifs et 8 témoins négatifs. Le Z' factor (Zhang, 1999) moyen du criblage a été de 0,699. Les composés ont été testés en simple à 40  $\mu$ M, sachant que la concentration en GFP-CK2 $\alpha$  et MBP-CK2 $\beta$  est de 0,1  $\mu$ M (soit un excès de 400 fois en molarité de molécule).

11 molécules ont donné un pourcentage d'inhibition égal à 100%, 13 molécules > 75% et 23 molécules > 100%. Ces molécules « activatrices » ont été écartées. Après « hit picking », les 24 molécules inhibitrices ont été testées à nouveau en duplicat à 40  $\mu$ M : 7 composés confirment leur inhibition à 100%, 7 autres à >75% : M1, M2, M8, M9, M4, M10, M11, M12, M13, M14, M15, M16. A 4  $\mu$ M, seuls 4 composés sont toujours actifs (100% d'inhibition) : M1, M2, M8, M9.

M1 et M2 ont été préalablement sélectionnés par un criblage d'inhibition de l'activité catalytique de CK2 $\alpha$  réalisé au laboratoire (Renaud Prudent). En conséquence, 20 composés inhibiteurs de l'activité catalytique de CK2 $\alpha$  ont également été testés afin de voir si certains ont un effet sur l'interaction CK2 $\alpha$ -CK2 $\beta$ . Le TBB n'a aucun effet sur cette interaction à 40  $\mu$ M ; cependant, l'héparine et 2 composés (S6 et S7) inhibent l'interaction CK2 $\alpha$ -CK2 $\beta$  > 75% à 40  $\mu$ M.

Certains composés possèdent une fluorescence intrinsèque et le test d'interaction utilisé lors du premier criblage est basé sur la détection de fluorescence de la GFP-CK2 $\alpha$ . En conséquence, un autre type de test a été mis au point, qui repose sur l'interaction de [<sup>35</sup>S]-CK2 $\alpha$  avec la MBP-CK2 $\beta$  immobilisée. Ceci permet de s'affranchir de toute interférence liée à une fluorescence intrinsèque des molécules (faux négatif) ou à un « quenching » des molécules (faux positif). L'utilisation de ce test a permis de confirmer les composés **M13**, **M16**. Leur IC<sub>50</sub> est estimée à 36 et 34  $\mu$ M respectivement.

Malheureusement, l'activité inhibitrice de ces composés n'a pas été confirmée dans des tests secondaires réalisés par la suite (ultracentrifugation sur gradient de saccharose, BIAcore, ...).

M13 et M16 sont le **cis-platine** et un **dérivé du cis-platine**, des agents intercalants de l'ADN. Une activité inhibitrice potentielle vis-à-vis de l'interaction des sous-unités de CK2 serait loin d'être spécifique et n'a pas été investiguée davantage.

Face à cet échec, notre stratégie s'est orientée vers le criblage d'une chimiothèque de peptidomimétiques conçue pour inhiber des interactions protéine-protéine.

## **II- Résultats du criblage de la Chimiothèque de peptidomimétiques**

Les composés utilisés dans nos tests sont des peptidomimétiques, de taille plus importante (500 à 1500 Da), car les surfaces d'interactions protéine-protéine sont réputées être plus étendues que des sites catalytiques. La plupart sont dimériques, ce qui leur permet de bénéficier de l'effet de multivalence, et ont été synthétisées de manière combinatoire. Une chimiothèque de 40 000 composés (40 plaques) nous a été fournie gracieusement par le laboratoire de Dale Boger, Scripps (San Diego). Plusieurs composés issus de cette chimiothèque ont montré un pouvoir inhibiteur dans certaines interactions protéine-protéine : Myc-Max (Berg, 2002), Integrin-Paxillin (Ambroise, 2002).

### **Classification des peptidomimétiques :**

On distingue 3 types de peptidomimétiques, répertoriés en type I, II et III (Ripka, 1998). Les peptidomimétiques de type I possèdent une ou plusieurs liaisons amide et ont une organisation générale similaire aux peptides (un squelette et des chaînes latérales). Leur squelette est souvent superposable à un squelette peptidique. Ils peuvent comporter des résidus d'acides aminés non naturels ou des  $\beta$ -acides aminés.

Les peptidomimétiques de type II sont des mimétiques fonctionnels : ce sont des petites molécules non peptidiques qui se lient à un récepteur peptidique, mais ce ne sont pas des analogues structuraux directs du peptide naturel. Ces agonistes se fixent en réalité dans des sous-poches (« subsite ») du récepteur, différentes de celles ciblées par le peptide parent. Les peptidomimétiques de type III ont un squelette totalement différent d'un squelette peptidique mais possèdent des groupements ressemblant aux résidus des acides aminés. Leur squelette leur permet d'orienter ces groupements de manière adéquate et de mimer ainsi un peptide.

Le criblage a été réalisé de manière robotisée en collaboration avec la plateforme du CMBA (L. Lafanechère, CEA, Grenoble) à raison de 8 plaques par jour.

### **1- Résultats primaires et confirmation secondaire**

Le Z' factor moyen obtenu pour l'ensemble du criblage est de 0,840. 15 touches ont été sélectionnées avec un pourcentage d'inhibition de l'interaction CK2 $\alpha$ -CK2 $\beta$  supérieur à 45% à 100  $\mu$ M final (Figure 36). Après « hit picking », les touches ont été confirmées manuellement en test d'interaction GFP à 100  $\mu$ M et 10  $\mu$ M. Un seul point est réalisé par touche étant donné que l'on ne dispose que de 10  $\mu$ L de chaque composé. Sur les 15 touches sélectionnées par le robot, 8 touches sont confirmées avec plus de 45% d'inhibition à 100  $\mu$ M, dont 5 également supérieures à 50% : P1, P5, P6, P12, P13. A 10  $\mu$ M, deux touches présentent plus de 45% d'inhibition de l'interaction CK2 $\alpha$ -CK2 $\beta$  : P10 et P12 (Figure 36). Les touches sélectionnées sont ensuite évaluées dans le test d'interaction reposant sur la radioactivité ([<sup>35</sup>S]-CK2 $\alpha$ ) de manière à éliminer les faux-positifs (quencheurs de fluorescence) liés au test de fluorescence. Les composés sont testés à 100 et 10  $\mu$ M en simple. Comme dans le criblage de la chimiothèque du NCI, on peut noter que de nombreux composés donnent un résultat différent dans un test non-fluorescent. 3 composés montrent un pourcentage d'inhibition supérieur à 45% : P7, P8 et P9 (figure 36).

| ID CEA | Fluorescence assay                  |                         |                        | Radioactive assay       |                        |      |
|--------|-------------------------------------|-------------------------|------------------------|-------------------------|------------------------|------|
|        | 100 $\mu$ M<br>(robot<br>screening) | 100 $\mu$ M<br>(manual) | 10 $\mu$ M<br>(manual) | 100 $\mu$ M<br>(manual) | 10 $\mu$ M<br>(manual) |      |
| P1     | 72,8                                | 84,1                    | 12,7                   | 20,1                    | 29,0                   | S    |
| P2     | 56,0                                | 36,9                    | 15,6                   | 5,1                     | 35,7                   | S    |
| P3     | 46,7                                | 15,4                    | 16,5                   | 13,0                    | 32,1                   | M    |
| P4     | 48,8                                | 19,0                    | -10,7                  | 21,4                    | 29,7                   | M    |
| P5     | 53,9                                | 62,3                    | 8,1                    | 13,9                    | 37,3                   | S    |
| P6     | 54,0                                | 68,3                    | 6,5                    | 36,2                    | 45,4                   | S    |
| P7     | 45,2                                | -47,1                   | 19,0                   | 85,1                    | 62,3                   | >100 |
| P8     | 45,7                                | 53,1                    | 36,9                   | 89,5                    | 67,7                   | >100 |
| P9     | 45,3                                | 49,2                    | 39,7                   | 90,8                    | 77,7                   | >100 |
| P10    | 46,2                                | 96,3                    | 74,8                   | 10,5                    | 24,2                   | M    |
| P11    | 47,8                                | 18,8                    | 26,9                   | 4,2                     | 34,2                   | M    |
| P12    | 56,1                                | 75,1                    | 47,1                   | -9,0                    | 27,8                   | M    |
| P13    | 58,7                                | 83,8                    | 33,9                   | -18,2                   | 37,3                   | M    |
| P14    | 58,9                                | 24,1                    | 41,9                   | 25,6                    | 29,7                   | M    |
| P15    | 49,6                                | 27,1                    | 38,4                   | 27,4                    | 36,8                   | M    |

Figure 36 : **Résultats du criblage de la chimiothèque de peptidomimétiques et confirmation manuelle après hit picking.** Le pourcentage d'inhibition est calculé à partir des témoins positifs (8) et négatifs (8) de chaque plaque. S : singleton, composé individuel, M : mélange de 10 composés, >100 : mélange de plus de 100 composés.

## 2- Déconvolution des touches

Le criblage ayant été réalisé en aveugle, les concepteurs de la chimiothèque, Dale Boger et Sukwon Hong (Scripps, CA), ont été contactés à nouveau afin de connaître la composition des touches.

Les touches P1, P2, P5 et P6 correspondent à des composés uniques. Les touches P3, P4, P10 à P15 correspondent à des mélanges de 10 composés. Les touches P7, P8 et P9 sont des mélanges de plus de 100 composés.

### a- Singletons : P1, P2, P5, P6

Il s'agit de molécules présentant une symétrie bilatérale. Ceci peut améliorer l'efficacité par effet de multivalence (Biessen, 1995).

Après obtention des composés individuels, ils ont été testés à nouveau avec une gamme de 12 à 400 $\mu$ M. Les valeurs d'inhibition identifiées par le criblage ne se confirment pas : à 400 $\mu$ M, ils ne dépassent pas 20% d'inhibition.

**b- Mélanges simples (M10) : P3, P4, P10 à P15**

Ces touches n'ont pas été confirmées lors des répétitions des tests, tant en fluorescence qu'en radioactivité.

**c- Touches P6, P7, P8, P9 : « Positional scanning et delete synthesis »**

Les plaques 26 et 27 auxquelles appartiennent les touches P6, P7, P8 et P9 comportent deux sous-chimiothèques combinatoires : « Positional scanning » et « Deletion synthesis ». Les synthèses des composés ont été réalisées en combinatoire : il s'agit d'une synthèse de mélanges en phase liquide. Cette méthode est plus rapide que la synthèse parallèle de composés individuels ou de mélanges simples, et plus facile techniquement que les synthèses split-and-mix par exemple. Une chimiothèque de type Positional scanning doit permettre de déduire l'identité de la molécule optimale par déconvolution immédiate à partir d'un seul criblage (Ambroise, 2002 ; Boger, 2003 ; Boger, 1998 ; Boger, 2000). Cette méthode a été appliquée avec succès pour l'inhibition de l'interaction entre la paxilline et l' $\alpha$ 4-intégrine, impliquée dans l'inflammation chronique et une migration cellulaire accrue des cellules Jurkat T humaines (Ambroise, 2002).

- **« Positional scanning et delete synthesis » : principe**

Ces sous-chimiothèques correspondent à un mélange de molécules symétriques dont le squelette possède 3 **points de diversité** : A, B ou C. Pour le point A, 6 **substituants** sont disponibles, pour le point B, 6 également, pour le point C, 10 substituants. Le squelette étant symétrique, on peut avoir plusieurs isomères méta-méta, méta-para ou para-para. Soit entre 360 et 1080 combinaisons possibles (figures 37 et 38).

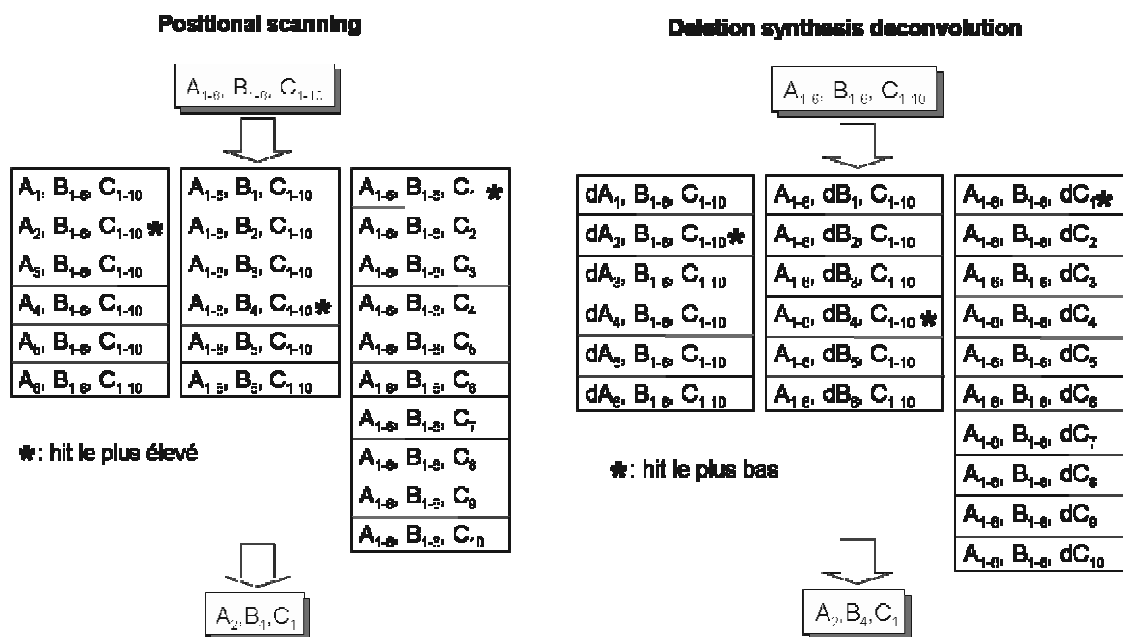


Figure 37 : Exemple de techniques de déconvolution « positional scanning » et « deletion synthesis » pour une chimiothèque contenant 4 positions variables avec 4 substitutions possibles pour chaque position (Boger, 2003). Positional scanning : dans chaque sous-librairie, un composé individuel est placé sur une position mais des mélanges sont utilisés pour toutes les autres positions. La sous-librairie la plus active dans chaque set (\*) indique le substituant optimal pour chaque position. Deletion synthesis : dans chaque sous-librairie, un composé individuel est manquant pour une position (ex : dA2 signifie tous les substituant A excepté A2), mais les mélanges complets sont utilisés pour les autres positions. La sous-librairie la moins active dans chaque set (\*) indique le substituant optimal pour cette position, le substituant manquant étant le plus actif.

## • Résultats

La structure de ces mélanges combinatoires est indiquée ci-dessous (figure 38).



résultats de fluorescence et de radioactivité sont en accord : A1B4C1. Malheureusement, cette combinaison n'est pas celle qui ressort dans le « positional scanning ».

Une explication possible à ces contradictions pour le groupement sélectionné serait que celui-ci n'est pas spécifique ou que la molécule tolère une variabilité à ce niveau (point non pharmacophorique).

### **Positional Scanning**

#### **% inhibition**

| Test :          | Fluorescence | Radioactive |  |
|-----------------|--------------|-------------|--|
| Concentration : | 100 uM       | 10 uM       |  |
| sA1             | 27,0         | 43,9        |  |
| sA2             | 32,9 *       | 44,0        |  |
| sA3             | 22,3         | 49,5 *      |  |
| sA4             | 14,2         | 37,8        |  |
| sA5             | 0,8          | 39,8        |  |
| sA6             | 27,7         | 35,2        |  |
| sB1             | 44,1 *       | 33,4        |  |
| sB2             | 10,2         | 44,5        |  |
| sB3             | 43,8         | 64,2 *      |  |
| sB4             | 20,5         | 34,2        |  |
| sB5             | 17,4         | 48,8        |  |
| sB6             | -18,1        | 38,2        |  |
| sC1             | 10,0         | 34,9        |  |
| sC2             | 40,9         | 37,3        |  |
| sC3             | 12,3         | 59,5 *      |  |
| sC4             | 6,7          | 47,1        |  |
| sC5             | -2,2         | 38,4        |  |
| sC6             | 27,7         | 59,0 *      |  |
| sC7             | 41,2 *       | 54,5 *      |  |
| sC8             | 19,9         | 34,8        |  |
| sC9             | -8,2         | 46,1        |  |
| sC10            | 28,6         | 52,2 *      |  |

### **Delete Synthesis**

#### **% inhibition**

| Test :          | Fluorescence | Radioactive |  |
|-----------------|--------------|-------------|--|
| Concentration : | 100 uM       | 10 uM       |  |
| dA1             | 11,3 *       | 20,7 *      |  |
| dA2             | 43,6         | 38,2        |  |
| dA3             | 22,2         | 35,9        |  |
| dA4             | 15,9         | 32,1        |  |
| dA5             | 25,1         | 28,2        |  |
| dA6             | 12,3         | 23,2        |  |
| dB1             | 39,1         | 36,1        |  |
| dB2             | 25,4         | 25,1        |  |
| dB3             | 20,7         | 23,3        |  |
| dB4             | 6,9 *        | 3,6 *       |  |
| dB5             | 20,6         | 18,8        |  |
| dB6             | 8,5          | 21,8        |  |
| DC1             | 9,8 *        | 5,1 *       |  |
| DC2             | 17,1         | 17,8        |  |
| DC3             | 13,7         | 15,0        |  |
| DC4             | 21,9         | 21,7        |  |
| DC5             | 16,3         | 18,7        |  |
| DC6             | 20,0         | 12,7        |  |
| DC7             | 28,6         | 29,8        |  |
| DC8             | 26,9         | 24,5        |  |
| DC9             | 21,6         | 24,1        |  |
| DC10            | 30,2         | 28,6        |  |

Figure 39 : **Résultats secondaires concernant la plaque 27** (Fluorescence : résultats du criblage par le robot ; Radioactivité : criblage manuel).

### **3- Epilogue**

Ces mélanges de molécules étant synthétisés de manière combinatoire, le nombre final de composés par puits varie de 300 à 1700 composés individuels. Une déconvolution par purification est impossible : les composés individuels ne sont pas disponibles. Pour en obtenir un, il faut refaire la synthèse complète. C'est pourquoi il est préférable de connaître la combinaison optimale pour réaliser la synthèse. Ce modèle de chimiothèque est encore en cours de développement.



Devant les 5 ou 6 possibilités émergentes, les chimistes de San Diego n'ont pas souhaité réaliser les synthèses et poursuivre l'investigation. Nous nous sommes donc tournés vers une stratégie plus rationnelle basée sur la structure cristallographique.

### **3° partie : Identification des hot spots de l'interaction CK2 $\alpha$ -CK2 $\beta$ et conception d'un peptide cyclique mimétique antagoniste de l'interaction à partir des données structurales**

#### **I- Introduction**

La CK2 a longtemps été décrite comme tétramère stable constitué de 2 sous-unités catalytiques CK2 $\alpha$  et d'un dimère de sous-unités régulatrices CK2 $\beta$ . Leur affinité, déterminée en BIAcore (Martel, 2002) est particulièrement élevée ( $K_D = 5,4$  nM). De plus, à partir d'extrait cellulaire, la protéine CK2 est systématiquement purifiée sous la forme d'un complexe tétramérique. Ces observations ont pendant longtemps étayé la vision d'un complexe stable et irréversible.

La résolution de la structure cristallographique de l'holoenzyme à 3,1 Å est venue remettre en question ce dogme : comme précédemment mentionné, la surface d'interaction entre CK2 $\alpha$  et CK2 $\beta$  n'est que de 832 Å<sup>2</sup>, surface typique d'un complexe transitoire (Niefind, 2001). L'hypothèse d'un équilibre association-dissociation a été soutenue par un modèle mathématique décrivant la possibilité, dans le milieu cellulaire, d'un engagement de chaque sous-unité dans des complexes multiprotéiques de plus faible affinité mais en concentration locale élevée, et ce en dépit d'une forte affinité entre elles. Des sous-populations de différentes formes de CK2 pourraient exister dans la cellule (Filhol, 2004).

Enfin, la dynamique spatio-temporelle des sous-unités de CK2 a été mise en évidence *in vivo* grâce à des techniques d'imagerie en fluorescence (Filhol, 2003 ; Theis-Febvre, 2003).

La mise en place d'une stratégie visant à développer des molécules inhibitrices de cette interaction posait de nombreuses questions. En effet, de nombreuses stratégies inhibitrices s'appuient sur la dissociation d'un complexe protéique par des petites molécules mimétiques de l'une des interfaces. Comme présenté précédemment, avant d'appliquer ce type de stratégie à la CK2, des informations sur les caractéristiques de l'interface entre ses sous-unités étaient indispensables : le complexe est-il dissociable ? quels sont les hot spots de l'interface ? sont-ils suffisamment restreints pour envisager un mimétique chimique ? une mini-protéine ou un peptide mimétique peuvent-ils antagoniser l'un des deux partenaires ? Autant de questions auxquelles j'ai pu répondre dans un travail publié dans Biochemical Journal.

## **II- Article**

***Laudet B, Barette C, Dulery V, Renaudet O, Dumy P, Metz A, Prudent R, Deshiere A, Dideberg O, Filhol O, Cochet C.***

***Structure-based design of small peptide inhibitors of protein-kinase CK2 subunit interaction.***

***Biochem J. 2007 Aug 23.***

# Structure-based design of small peptide inhibitors of protein-kinase CK2 subunit interaction

**Running Title: Inhibitors of CK2 subunit interaction.**

Béatrice LAUDET\*†‡, Caroline BARETTE§, Vincent DULERY||‡, Olivier RENAUDET||‡, Pascal DUMY||‡, Alexandra METZ\*†‡, Renaud PRUDENT\*†‡, Alexandre DESHIERE\*†‡, Otto DIDEBERG¶, Odile FILHOL\*†‡, Claude COCHET\*†‡<sup>1</sup>.

\*INSERM, U873, Grenoble, F-38054, France; †CEA, iRTSV/LTS, Grenoble, F-38054, France; ‡Université Joseph Fourier, Grenoble, France; §CEA, iRTSV/CMBA, Grenoble, F-38054, France; ||CNRS, UMR-5250, ICMG FR-2607, Grenoble, France; ¶CNRS, CEA, IBS/LCM, Grenoble, France.

<sup>1</sup>To whom correspondence should be addressed:

U873-LTS, iRTSV, CEA, 17 rue des Martyrs, 38054 Grenoble cedex 9, France.

Tel 33-4-38-78-42-04; Fax: 33-4-38-78-50-58; E-mail: [claudc.cochet@cea.fr](mailto:claudc.cochet@cea.fr).

---

X-ray crystallography studies as well as live-cell fluorescent imaging have recently challenged the traditional view of Protein-kinase CK2. Unbalanced expression of catalytic and regulatory CK2 subunits has been observed in a variety of tissues and tumors. Thus, the potential intersubunit flexibility suggested by these studies raises the likely prospect that the CK2 holoenzyme complex is subject to disassembly and re-assembly. In this study, we show evidence for the reversible multimeric organization of the CK2 holoenzyme complex *in vitro*. We used a combination of site-directed mutagenesis, binding experiments and functional assays to show that both *in vitro* and *in vivo*, only a small set of primary hydrophobic residues of CK2 $\beta$  which contacts at the center of the CK2 $\alpha$ /CK2 $\beta$  interface dominates affinity. The results indicate that a double mutation in CK2 $\beta$  of amino acids - Y188 and F190 – which are complementary and fill up a hydrophobic pocket of CK2 $\alpha$  is the most disruptive to CK2 $\alpha$  binding both *in vitro* and in living cells. Further characterization of hot spots in a cluster of hydrophobic amino acids centered around Y188-F190 led us to the structure-based design of small peptide inhibitors. One conformationally constrained 11-mer peptide (Pc) represents a unique CK2 $\beta$ -based small molecule that was particularly efficient

1) to antagonize the interaction between the CK2 subunits, 2) to inhibit the assembly of the CK2 holoenzyme complex, 3) to strongly affect its substrate preference.

**Key words:** CK2 protein-kinase, protein-protein interaction, cyclic peptide, peptide disruptor, hot spot, substrate specificity.

---

Abbreviations used: MBP, maltose binding protein; GST, glutathione-S-transferase; BiFC, bimolecular fluorescence complementation; YFP, yellow fluorescent protein; GFP, green fluorescent protein; FRET, fluorescence resonance energy transfer.

## INTRODUCTION

All but a handful of the protein kinase family members are monomeric enzymes which are often regulated by reversible phosphorylation. In contrast, the regulation and the molecular architecture of multi-subunit Ser/Thr protein kinases such as phosphorylase kinase [1], cAMP-dependent protein kinase [2], cyclin-dependent protein kinases [3], DNA-dependent protein kinase [4], 5'-AMP-activated protein kinase [5] and I $\kappa$ B kinase [6] rely on the reversible binding of regulatory subunits to the catalytic subunits of these enzymes. The presence of the regulatory subunit can either play a negative role on the catalytic subunit (ex. cAMP-dependent protein kinase [7]) or is a prerequisite for activation (ex. cyclin-dependent protein kinases [3]).

Protein kinase CK2 shares with few other protein kinases a quaternary structure consisting of two catalytic subunits (CK2 $\alpha$ /CK2 $\alpha'$ ) and two regulatory subunits (CK2 $\beta$ ) [8]. However, as compared to other multi-subunit protein kinases, CK2 exhibits notable distinguishing structural and functional features [9, 10]. CK2 catalytic subunits possess constitutive activity [11, 12], but CK2 $\beta$  is a central component of the tetrameric CK2 complex [13], controlling CK2 substrate specificity, cellular localization and enzymatic activity. In this respect, CK2 $\beta$  operates as a targeting subunit and/or a docking platform affecting the accessibility to the catalytic site of binding substrates whose phosphorylation is either stimulated or prevented by the CK2 $\beta$  subunit [14, 15]. In this context, the spontaneous high affinity association of recombinant CK2 subunits in a stable heterotetrameric complex (dissociation constant  $K_D = 5.4$  nM) as well as numerous complementary biochemical observations led to the long-held tenet that CK2 is a strong obligate complex. However, this traditional view was challenged when X-ray crystallography studies revealed that the CK2 $\alpha$ /CK2 $\beta$  interface is smaller than the surface contacts that are usually observed in stable protein complexes [13]. The possible intersubunit flexibility suggested by these studies was further reinforced by the observation of independent movement of CK2 $\alpha$  and CK2 $\beta$  in living cells [16]. In

addition, the presence in mouse brain and testicles of a CK2 $\beta$  fraction devoid of CK2 $\alpha$  [17] and a pool of free CK2 $\alpha'$  in prostate tumor cells [18] have been reported. Collectively, these observations raise the likely prospect that the CK2 holoenzyme complex is subject to disassembly and re-assembly [19]. As CK2 substrates localize to many different subcellular compartments, a dynamic interaction of CK2 subunits should increase the kinase specificity and the assembly of the complex is a likely point of regulation [20]. The ability to interfere with specific protein-protein interactions has already provided powerful means of influencing the functions of selected proteins within the cell [21, 22]. Thus, the potential intersubunit flexibility of the CK2 holoenzyme complex makes it amenable to drug-discovery efforts aimed at inhibiting this protein-protein interaction.

In this work, we show evidence for the reversible multimeric organization of the CK2 holoenzyme complex *in vitro*. Site-directed mutagenesis, binding experiments and functional assays provided further insights into the molecular interaction between the CK2 subunits demonstrating that both *in vitro* and *in vivo*, only a small set of primary hydrophobic residues of CK2 $\beta$  which contacts at the center of the interface dominates affinity. Characterization of hot spots led us to a structure-based design of small peptide inhibitors derived from the CK2 $\beta$  carboxyterminal domain. One conformationally constrained 11-mer peptide can efficiently antagonize the interaction between the CK2 subunits representing the first small molecule that binds to this hydrophobic interface. This study represents the first step of a systematic approach to set the framework for the discovery and development of chemical inhibitors of this interaction.

## EXPERIMENTAL

### Materials

[ $\gamma$ <sup>32</sup>P]-ATP (3,000 Ci/mmol) was purchased from MP Biosciences. The peptide substrate (RRREDEESDDEE) for CK2 kinase assay was obtained from NeomPS. The purity of this peptide (89 %) was determined by HPLC on a nucleosil C18 column using a linear triethanolamine phosphate-acetonitrile gradient. Solvents were of analytical grade. Cyclic peptides, biotinylated cyclic peptides and Ala-mutated cyclic peptides were synthesized by Eurogentec. The pEYFPc1 vector was purchased from Clontech Laboratories. EcoRI and BamHI restriction enzymes were from Invitrogen, and SacI and AgeI from New England Biolabs.

### Chemicals, peptide synthesis and purification

All chemical reagents and solvents were purchased from Sigma Aldrich, Acros or Carlo-Erba and were used without further purification. All protected amino acids were obtained from Advanced ChemTech

Europe, Bachem Biochimie SARL and France Biochem S.A.. RP-HPLC analyses were performed on Waters equipment. The analytical (Nucleosil 120 Å 3 µm C<sub>18</sub> particles, 30 x 4.6 mm<sup>2</sup>) was operated at 1.3 mL/min and the preparative (Delta-Pak 300 Å 15 µm C<sub>18</sub> particles, 200 x 25 mm<sup>2</sup>) at 22 mL/min with UV monitoring at 214 nm and 250 nm using a linear A-B gradient (buffer A: 0.09% CF<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>H in water; buffer B: 0.09% CF<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>H in 90% acetonitrile). Mass spectra were obtained by electron spray ionization (ESI-MS) on a VG Platform II in the positive mode.

The protected linear peptides were assembled manually on solid-phase using the standard Fmoc/*t*-Bu strategy with PyBOP<sup>®</sup> as coupling reagent on the acido labile SASRIN<sup>®</sup> resin. They were cyclized directly without further purification as reported previously [23]. For all peptides, Glycine was chosen as the C-terminal end to secure the subsequent cyclization step from epimerization. The protected cyclic peptides were finally treated with a solution of TFA/TIS/H<sub>2</sub>O (95:2.5:2.5) for two hours. After evaporation, the cyclic peptides were purified by RP-HPLC. The purified cyclic peptides were homogenous and showed expected primary ion molecular weights by mass spectrometry.

## **Proteins**

Human recombinant His-tagged CK2α, GST-CK2α and GFP-CK2α were obtained as previously described [16, 24]. Expression and purification of chicken recombinant MBP-CK2β was performed as previously described [25]. GST-CK2β (182-215) referred as GST-β C-ter was obtained by cloning by PCR the 33 C-terminal amino acids of CK2β in pGEX4T1. Two recombinant proteins, MBP-CDC25B (kindly provided by Bernard Ducommun, Toulouse, France) and GST-Olig2 (1-177) (personal communication, Thierry Buchou), were used as CK2β-dependent CK2 substrates.

## ***In vitro* kinase assay**

CK2 kinase assays were performed in a final assay volume of 18 µL containing 3 µL of CK2α (36 ng) and a mixture containing 1 mM of the peptide substrate, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, and 1 µCi [<sup>32</sup>P]-ATP. Final concentration of ATP was 100 µM. Assays were performed under linear kinetic conditions for 5 min at RT before termination by the addition of 60 µL of 4% TCA [26].

## ***In vitro* CK2α-CK2β interaction assay**

The CK2α-CK2β interaction assay involved competition between plate-bound MBP-CK2β and various soluble peptides for binding to soluble [<sup>35</sup>S]-methionine-labelled CK2α. The assay was performed in Reacti-Bind streptavidin coated high binding capacity 96-well plates (Pierce) in which each well was coated with 250 ng of biotinylated MBP-CK2β (Sulfo-NHS-LC-LC-Biotin with a spacer arm of 30.5 Å

length, Pierce) in 50 mM Tris-HCl, pH 7.2, 0.4 M NaCl buffer for 1 h at RT. After 3 washes with 50 mM Tris-HCl, pH 7.2, 0.15 M NaCl, 0.05% Tween 20, the wells were blocked with 50 mM Tris-HCl, pH 7.2, 0.15M NaCl and 3% BSA for 1 h at RT. After 3 washes, competing peptides were added to each well in 50 mM Tris-HCl, pH 7.2, 0.4 M NaCl, along with [<sup>35</sup>S]-methionine-labelled CK2 $\alpha$  (10<sup>5</sup> cpm) synthesized *in vitro* by using the TnT Quick Coupled Transcription/translation System (Promega). The plates were incubated for 1 h at RT and after 3 washes, the radioactivity or the fluorescence of each well in the plate was determined using a scintillation counter. Positive control (100% competition) was determined with a 10-fold molar excess of untagged CK2 $\alpha$ , and negative control (0% competition) was performed in the absence of competitor. IC<sub>50</sub> is defined as the concentration of peptide necessary to inhibit 50% of CK2 $\alpha$ -CK2 $\beta$  complex formation.

### **Pull-down assays**

GST-tagged proteins were immobilized on glutathione-sepharose 4 Fast Flow beads (Amersham Biosciences), for 1 h at 4°C, in 10 mM Tris-HCl, pH 7.5. Beads were then incubated with CK2 $\alpha$  for 1 h at 4°C. After 4 washes, CK2 $\alpha$  activity was measured as described above.

MBP-CK2 $\beta$  (5  $\mu$ g) was immobilized on amylose beads (New England Biolabs) for 1 h at 4°C in 10 mM NaHPO<sub>4</sub>, pH 7.2, 0.5 M NaCl, 10 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol, 1 mM EGTA, 0.05% Tween 20. Buffer was replaced by 10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 0.15 M NaCl, 0.05% Tween 20. Then, increasing amounts of GST- $\beta$  C-ter were added along with 5  $\mu$ g of GST-CK2 $\alpha$  for 20 min at 4°C. After 4 washes, 1/10 of beads were used for CK2 activity assay, and the remaining beads were used for CK2 $\alpha$  detection by Western-blotting.

### **Size exclusion chromatography**

An Ultrogel ACA34 gel filtration column (0.5 x 30 cm) was equilibrated in 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 0.4M NaCl and calibrated using aldolase (MW = 158 kDa), bovine serum albumin (MW = 68 kDa) and carbonic anhydrase (MW = 29 kDa) as standards. CK2 $\alpha$  (50  $\mu$ g) alone or CK2 $\alpha$  (50  $\mu$ g) incubated with GST- $\beta$  C-ter (30  $\mu$ g) for 30 min at 4°C were loaded onto the column. Eluted fractions (0.25 ml) were collected and assayed for the presence of CK2 $\alpha$  and GST- $\beta$  C-ter by Western-blotting .

### **Site-directed mutagenesis**

Site-directed mutagenesis of CK2 $\beta$  was performed with the pMALc2-CK2 $\beta$  vector using the Quick Change Site-Directed Mutagenesis kit (Stratagene) and specific primers from Eurogentec to generate different mutant MBP-CK2 $\beta$  proteins. Primers were for M166A sens 5' G TTC CCC CAT GCG CTC TTC ATG GTG 3', Y188A sens 5' GTG CCC AGG CTG GCT GGG TTC AAG ATC CAC CCT ATG G



3', F190A sens 5' GTG CCC AGG CTG TAT GGG GCC AAG ATC CAC CCT ATG G 3'. MBP-CK2 $\beta$  mutant proteins were expressed in BL21 E. coli and purified as described previously [25] and stored at -80°C in 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 7.0, 0.5 M NaCl, 10 mM  $\beta$ -mercaptoethanol, 1 mM EGTA, and proteases inhibitors (Sigma).

### **Surface Plasmon Resonance spectroscopy**

Surface plasmon resonance measurements were performed using a BIAcore 3000 instrument (BIAcore AB). The running buffer was HBS (10 mM Hepes pH 7.3, 0.15 M NaCl, 3 mM EDTA, 0.005% polysorbate 20). The carboxymethylated dextran surface of a CM5 sensor chip (BIAcore AB) was activated by injecting a solution of N-hydroxysuccinimide and N-ethyl-N-(dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride (coupling solution BIAcore AB). Anti-GST antibody was diluted to 30  $\mu$ g/ml in 10 mM acetate buffer pH 5.0 and injected over the surface of the sensor chip for 7 min at a flow rate of 5  $\mu$ L/min. The unreacted sites of the sensor chip surface were then quenched by injection of 1 M ethanolamine pH 8.5. GST-CK2 $\alpha$  (50  $\mu$ g/ml) was immobilized on the surface at a flow rate of 5  $\mu$ L/min in HBS. Different MBP-CK2 $\beta$  mutants were diluted to 50  $\mu$ g/ml in HBS buffer and injected over the surface at a flow rate of 5  $\mu$ L/min. Regeneration of the surfaces was achieved by injection of 10 mM glycine-HCl pH 2.2.

### **Plasmid constructs, cell transfections and BiFC analysis**

Full-length chicken CK2 $\alpha$  sequence was cloned into the pEYFPc1 vector using EcoRI restriction sites, then oriented with BamHI digestion to generate the pEYFPc1-CK2 $\alpha$  construct. Full-length mouse CK2 $\beta$  sequence was cloned into the same pEYFPc1 vector using BamHI restriction sites, then oriented with EcoRI digestion to generate the pEYFPc1-CK2 $\beta$  construct. Subsequently, the EYFP sequence was substituted by the 1-154 or the 155-238 fragments of EYFP. These fragments were PCR amplified and inserted using SacI-AgeI to generate BiFC plasmid constructs. The resulting N- and C-terminal YFP-CK2 fusions are referred to as: YN-CK2 $\alpha$ , YN-CK2 $\beta$ , YC-CK2 $\alpha$ , YC-CK2 $\beta$  respectively. Primers (Eurogentec) were for YN-CK2 $\alpha$  or YN-CK2 $\beta$ : 5' G CTA CCG GTC GCC ACC ATG GTG AGC AAG 3' and 5' CAC AAC GTC TAT ATC ATG CGA GCT CAG GCT TCG AAT TCT GC 3' respectively. Primers were for YC-CK2 $\alpha$  or YC-CK2 $\beta$ : 5' CCG TCA GAT CCG CTC GCG CTA CCG GTC ATG GCC GAC AAG CAG AAG AAC GGC 3' and 5' CG AAG CTT GAG CTC GAG ATC TGA GTC CGG 3' respectively. All the constructs were verified by sequencing.

HeLa cells were grown in DMEM supplemented with 10% FCS. One day before transfection, cells were seeded in Lab-Tek chambers (Nunc) and transfected with the different BiFC plasmid constructs using

Lipofectamine 2000 reagent (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. Four hours after transfection, cells were washed with PBS and incubated with fresh medium for 24 h at 37°C and then switched to 30°C for 2 h to promote fluorophore maturation [27]. Preliminary experiments have shown that a fraction of YN-CK2 $\alpha$  or YC-CK2 $\alpha$  and YN-CK2 $\beta$  or YC-CK2 $\beta$  could interact with endogenous CK2 $\beta$  and CK2 $\alpha$ , trapping a part of YFP devoted to fluorescence complementation [28]. Therefore, to enhance the signal, immunostaining of YFP was performed by indirect immunofluorescence using the mouse anti-GFP antibody (Abcam) which recognizes only full-length YFP, but neither N-ter (1-154) nor C-ter (155-238) YFP (see Figure 1 in supplemental data). Under similar transfection conditions, polyclonal anti-GFP antibody (Abcam) did not discriminate between full-length and YFP-half molecules (data not shown). Thus, cells were fixed with 4% paraformaldehyde for 10 min, permeabilized with 0.5% Triton X-100 for 10 min, preincubated with 5% goat serum for 30 min at RT, and incubated with the mouse anti-GFP as primary antibody for 1 h at RT, washed with PBS and incubated with goat anti-mouse IgG-conjugated Cy3 (Molecular Probes) for 45 min at RT in the dark. Nuclei were stained by 2 $\mu$ g/ml Hoechst 33342 (Sigma) and coverslips were mounted with Dako (Dakocytomation), and examined using a Zeiss Axiovert 200 Microscope and a 40x1.3 Plan Neofluor objective. The results were expressed as % of cells that were above the fluorescence threshold observed in cells expressing only YN-CK2 $\alpha$  or YN-CK2 $\beta$ . Because the amount of expressed proteins is critical to the interpretation of results, the expression levels of the different chimeras were also analyzed in transfected cells by Western blotting using anti-CK2 $\alpha$  or CK2 $\beta$  antibodies as previously described [16, 29].

## RESULTS

### Reversibility of the CK2 subunit multimeric organization *in vitro*

Surface plasmon resonance measurements with purified recombinant CK2 $\alpha$  and CK2 $\beta$  subunits showed that they assemble rapidly ( $t_{1/2}$  = 60 sec) into a stable heterotetrameric complex with nanomolar affinity ( $K_d$  = 5.4 nM) with a  $k_a$  and  $k_d$  of  $6.6 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  and  $3.6 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$  respectively [30]. However, X-ray crystallography has revealed that the CK2 $\alpha$ /CK2 $\beta$  interface was relatively small (832 Å<sup>2</sup>) and flexible raising the possibility that CK2 tetramers may be subjected to disassembly and re-assembly [13]. To test this hypothesis we performed a competition binding assay in which complexes between MBP-CK2 $\beta$  and [<sup>35</sup>S]-methionine-labelled CK2 $\alpha$  were incubated with increasing molar excess of CK2 $\alpha$ . As shown in figure 1A, [<sup>35</sup>S]-methionine-labelled CK2 $\alpha$  was efficiently displaced from the preformed complex by the CK2 $\alpha$  subunit. The residual radioactivity (15%) may represent [<sup>35</sup>S]-methionine-labelled CK2 $\alpha$  present in misfolded CK2 complexes that are resistant to dissociation. In the presence of a 10-fold molar excess of

CK2 $\alpha$ , the  $t_{1/2}$  of CK2 complex dissociation was evaluated to be  $\approx 38$  min showing that unlike the fast association of CK2 subunits ( $t_{1/2} = 1$  min), the kinetic of disassembly was rather slow (figure 1B). These data are consistent with the association/dissociation rate constants determined previously [30].

### **Molecular and functional analysis of the CK2 $\beta$ C-terminus**

Analysis of the crystal data has revealed the major contribution of the  $\alpha/\beta$  tail contact for the stability of the CK2 holoenzyme [13]. In addition, CK2 $\beta$  mutants in which the zinc finger motif has been disrupted failed to dimerize and to recruit CK2 $\alpha$ , showing that this dimerization is essential for the proper docking of CK2 $\alpha$  [31, 32]. A CK2 $\alpha$ -interacting domain was delineated by residues 181-203 in the CK2 $\beta$  C-terminus [33]. Thus, we have expressed and purified from bacteria a CK2 $\beta$  fragment encompassing residues 182-215 fused to GST (GST- $\beta$  C-ter). Size exclusion chromatography analysis indicated that this fusion protein behaves as a dimeric protein through GST-GST interaction (data not shown). Reconstitution experiments showed that this mini protein was sufficient for a productive high-affinity interaction with CK2 $\alpha$  in a pull-down assay (Figure 2A). Size-exclusion chromatography analysis showed that the free CK2 $\alpha$  eluted as a monomer (42 kDa). In contrast, CK2 $\alpha$  incubated with GST- $\beta$  C-ter was eluted as free CK2 $\alpha$  as well as a CK2 $\alpha$ /GST- $\beta$  C-ter complex with an apparent MW of 150 kDa (Figure 2B). These data indicate that this interaction generates a stable hetero-complex bridging two catalytic subunits. Thus, the region delineated by residues 182-215 in GST- $\beta$  C-ter contains an autonomous CK2 $\alpha$ -interacting domain. We then examined the effect of this CK2 $\beta$  domain on the formation of the CK2 holoenzyme complex in a solid phase competition assay. As illustrated in Figure 2C, the interaction between CK2 $\alpha$  and CK2 $\beta$  was strongly impaired by the presence of increasing concentrations of the GST- $\beta$  C-ter protein. These results show that the 33 amino acids C-terminal region of CK2 $\beta$  binds tightly to CK2 $\alpha$  and behaves as an antagonist of the CK2 subunit interaction.

### **Identification and validation of CK2 $\beta$ hot spots for high-affinity CK2 $\alpha$ binding**

The crystal structure of the CK2 holoenzyme has suggested the predominant contribution of specific residues for the interfacial contacts of the CK2 $\beta$  tail with CK2 $\alpha$ , which were localized in a cluster of hydrophobic amino acids centered around Y188. As already pointed out by Niefind *et al* [14] this highly conserved segment of CK2 $\beta$  forms a structural element containing a  $\beta$ -hairpin loop with Y188 at its top (Figure 3A). This analysis provided a general outline of the CK2 $\alpha$  binding site but did not identify experimentally the specific residues involved in the binding. Guided by the high-resolution structure of the CK2 holoenzyme, we used alanine mutagenesis to target CK2 $\beta$  residues (M166, Y188, F190) in this CK2 $\alpha$ -docking site that make the most significant contacts with CK2 $\alpha$ . Residues within CK2 $\alpha$  that are

involved in interactions with these CK2 $\beta$  residues are mainly hydrophobic residues like I69, P104, Y39, L41, V42, I57, I59, V105. In addition, carbonyl oxygen of Y188 and K191 CK2 $\beta$  backbone are making H-bonds with N $\epsilon$  of Q36 and L41 of CK2 $\alpha$  respectively. However it is known that the holoenzyme structure is stable under high ionic strength, suggesting that these H-bonds may be barely involved in the subunit interaction [10]. Therefore, we tested M166A, Y188A, F190A mutants by quantitative binding analysis. Figure 4 A shows that the CK2 $\alpha$  binding activity of the single mutant F190A (CK2 $\beta$ -F) was significantly reduced and this activity was completely abrogated for the Y188A/ F190A double mutant (CK2 $\beta$ -YF) and for the M166A/Y188A/F190A triple mutant (CK2 $\beta$ -MYF). To validate these data, the binding properties of the CK2 $\beta$  mutants were also analyzed by surface plasmon resonance spectroscopy. As shown in Figure 4B, the binding activity of the CK2 $\beta$ -F single mutant was markedly decreased and the CK2 $\beta$ -YF double or the CK2 $\beta$ -MYF triple mutations virtually abolished interaction.

### **Functional properties of CK2 $\beta$ mutants**

Since it is clear that in many cases, CK2 $\beta$  mediates the interaction between the catalytic subunits and its cellular substrates, thereby modulating their phosphorylation, we assumed that any mutation perturbing the CK2 subunit interaction would affect the phosphorylation of CK2 $\beta$ -dependent substrates. A functional analysis of WT CK2 $\beta$  and CK2 $\beta$ -M, CK2 $\beta$ -YF and CK2 $\beta$ -MYF mutants was performed testing their effect on the CK2-mediated phosphorylation of CDC25B [34]. The data show that, while the phosphorylation of CDC25B was weakly affected in the presence of the single CK2 $\beta$ -M mutant, the double CK2 $\beta$ -YF and triple CK2 $\beta$ -MYF mutants were inefficient for CK2-mediated phosphorylation of CDC25B (Figure 5, lanes 1-5). Similarly, autophosphorylation of the CK2 $\beta$ -YF and CK2 $\beta$ -MYF mutants was strongly affected (Figure 5, lanes 6-9) indicating that these mutants are also defective for the supramolecular organization of the CK2 holoenzyme [35]. Thus, Y188 and F190 represent key CK2 $\beta$  hot spot residues for a functional interaction with CK2 $\alpha$  *in vitro*.

### ***In vivo* validation of CK2 $\beta$ hot spots**

To visualize the CK2 subunit interaction in living cells, we applied a BiFC assay (Bimolecular Fluorescence Complementation) which allows the investigation of interacting molecules *in vivo* [27]. The BiFC assay is based on the formation of a fluorescent complex by fragments of the Yellow Fluorescent Protein (YFP) brought together by the association of two interaction partners fused to non-fluorescent YFP half-molecules. This approach enables visualization of the proteins interaction under conditions that closely reflect the normal physiological environment. Previous work from our laboratory have shown that visualization of CK2 subunit interaction by fluorescence resonance energy transfer (FRET) analysis

required that the fluorochromes should be positioned on the N-terminal region of CK2 $\alpha$  and CK2 $\beta$  [36]. Thus, the (1-154; YN) and (155-238; YC) fragments of YFP were fused to the NH<sub>2</sub> terminus of CK2 $\alpha$ , CK2 $\beta$  or different CK2 $\beta$  mutants. The corresponding constructs were co-transfected in HeLa cells and the BiFC assay was performed using immunostaining of YFP to enhance the signal as described in Experimental Procedures (see also Figure 1 in supplementary data). Cells transfected with full length YFP fused to CK2 $\alpha$  (Figure 6A, panel a) or to CK2 $\beta$  (not shown) exhibit a strong fluorescence after YFP immunostaining. As expected, cells separately transfected with YN-CK2 $\alpha$ , YC-CK2 $\beta$  expression vectors (Figure 6A, panels b and c) or YN-CK2 $\beta$ , YC-CK2 $\alpha$  (not shown) did not exhibit any detectable fluorescence even after immunostaining. Co-transfection of YN-CK2 $\alpha$  and YC-CK2 $\beta$  yielded reconstitution of YFP upon specific binding in 36.8% of the cells (Figure 6A panel d and Figure 6B). When the fusion partners YN-CK2 $\alpha$  and YC-CK2 $\beta$  were cross-exchanged, reconstitution was also observed (not shown). Similarly, co-expression of YN-CK2 $\alpha$  and YC fused to CK2 $\beta$ -M, CK2 $\beta$ -Y, or CK2 $\beta$ -F single mutants allowed the observation of a characteristic fluorescent signal (Figure 6A panel e and Figure 6B). In contrast, a weak complementation (14.4% of the cells above the fluorescence threshold) was observed with CK2 $\beta$ -YF double mutant and YFP reconstitution was barely detected (2.4%) for YN fused to CK2 $\beta$ -MYF triple mutant (Figure 6A, panel f), despite strong protein expression as determined on immunoblots (Figure 6C, lanes 3, 6). These results indicate that substitutions of CK2 $\beta$  residues Y188 and F190 strongly influence the efficiency of bimolecular complex formation supporting the hypothesis that their mutation inhibit interaction with CK2 $\alpha$  in the cellular context.

### **Constrained cyclic peptides as antagonists of CK2 subunit interaction**

The dramatic effects of the two hot spot mutants on CK2 $\beta$  binding observed both *in vitro* and in the cellular context suggest that the interaction domain could be narrowed down to a short contiguous sequence. High-resolution structure of the CK2 holoenzyme has revealed that a cluster of well-defined hydrophobic residues present on the CK2 $\beta$  chain are facing hydrophobic residues N-terminally located at the outer surface formed by the juxtaposition of the anti-parallel  $\beta$ 4/ $\beta$ 5 sheets of CK2 $\alpha$  [13, 37]. This cluster which contains the identified hot spots Y188 and F190 represents a segment of highly conserved residues (<sup>186</sup>RLYGFKIH<sup>193</sup>) exhibiting a specific structural feature: it points away from the protein core, forms a 90°  $\beta$ -hairpin loop with Y188 at its top which binds into a shallow hydrophobic groove present in the  $\beta$ 4/ $\beta$ 5 sheets of CK2 $\alpha$  [13]. The interface relies on the steric complementarity between this CK2 $\alpha$  groove and the hydrophobic face of the CK2 $\beta$  hairloop and, in particular, on a triad of CK2 $\beta$  amino acids Y188, G189, F190 which inserts deep into the CK2 $\alpha$  groove (Figure 3A). To assess whether peptides derived from this CK2 $\beta$  region could antagonize the CK2 subunit interaction, we developed a binding

assay in which MBP-CK2 $\beta$  was bound on streptavidin-coated microtiter plates and incubated with [ $^{35}\text{S}$ ]-methionine-labeled CK2 $\alpha$ . Compounds that disrupt the CK2 $\alpha$ /CK2 $\beta$  complex thus register reduced radioactivity relative to the background. We then used the X-ray structure of CK2 $\beta$  in the holoenzyme complex as a template for the design of conformationally constrained peptides derived from the CK2 $\beta$  carboxyterminal domain and centered around the Y188 and F190 hot spots. A eight residue peptide ( $^{186}\text{R}$ -H $^{193}$ ) which contained the cluster of hydrophobic residues (L187, Y188, I192) and three additional glycine residues was cyclized via two cysteins to staple its conformation and to mimic the binding face of CK2 $\beta$  with CK2 $\alpha$  (figure 3B). The biological activity of this peptide referred as Pc peptide, was first examined in a CK2 $\alpha$  pull-down assay. Figure 7A shows that the same amount of CK2 $\alpha$  activity could be found associated to biotinylated CK2 $\beta$  or biotinylated Pc indicating that this cyclic peptide stably interacts with CK2 $\alpha$ . This interaction could be also visualized by surface plasmon resonance spectroscopy (data not shown). To assess whether the Pc peptide could antagonize the CK2 subunit interaction, a CK2 subunit binding assay was performed in the presence of increasing concentrations of Pc peptide. Representative results are shown in Figure 7B. The presence of the Pc peptide strongly antagonized the formation of the CK2 complex ( $\text{IC}_{50}$ = 3  $\mu\text{M}$ ). Importantly, an almost complete disassembly of the preformed complex was observed in the presence of the Pc peptide ( $\text{IC}_{50}$ = 6.5  $\mu\text{M}$ ). The effect of varying the length from 8 to 14 amino acids in a series of head-to-tail cyclized peptide analogues was examined. Although all length variants significantly blocked the interaction, the eleven residue Pc peptide was the most effective (Figure 7C). Noteworthy, a linear form of Pc was much less active in this binding assay ( $\text{IC}_{50}$ = 30  $\mu\text{M}$ ) and a linear form of Pc with an inverted sequence was without effect, showing that both the sequence and the constrained conformation of the peptide are essential for its antagonist activity. To explore the functional impact of each amino acid side chain on the Pc peptide antagonist activity, we synthesized a series of cyclic peptides in which each amino acid in the sequence RLYGFKIH was subjected to a systematic single-site replacement strategy. These derivatives were first tested at two fixed peptide concentrations (1.5 and 15  $\mu\text{M}$ ) in the CK2 subunit interaction assay. As shown in Figure 8A, the largest effects of single alanine mutants were observed for residues F7 or G6 and to a less extent for residues Y5 and I9. Alanine substitutions of neighboring positions (R3, L4, K8, H10) caused marginal reductions in binding indicating that these residues serve a more passive role. Quantitative determination of the  $\text{IC}_{50}$  values further shows that the most disruptive alanine substitutions are confined in a small patch that extends from Y5 to F7 and the largest reduction in binding was for F7 (Figure 8B). In accord with the definition of the corresponding CK2 $\beta$  hot spots, these data highlight the importance of these residues for the biological activity of peptide Pc. A functional analysis of this peptide was performed testing its effect on the phosphorylation of the Olig-2 transcription factor which is catalyzed exclusively by the tetrameric form of CK2 (personal

communication, Thierry Buchou). Figure 9 shows that the presence of increasing concentrations of Pc led to a strong decrease of the original Olig-2 phosphorylation, reflecting a Pc-induced progressive dissociation of the catalytically active CK2 holoenzyme complex.

## DISCUSSION

The irreversible nature of the CK2 holoenzyme formation has been challenged by both its crystal structure and live cell imaging studies [13, 16]. Free populations of each CK2 subunit have been identified in several organs [17] and differential subcellular localizations have also been reported for CK2 $\alpha$  and CK2 $\beta$ . In many cases, CK2 $\beta$  operates as a docking platform affecting the accessibility of the catalytic site for binding substrates [15]. From a structural point of view, the CK2 $\beta$  subunit can provide CK2 specificity by either shielding a substantial surface of the CK2 $\alpha$  subunit or at the same time, providing a new surface near the catalytic active site. Since the free catalytic subunit and the holoenzyme exhibit divergent substrate preferences, it could be predicted that such a balance is crucial in the control of the many cellular processes that are governed by this multi-faceted enzyme [19].

Here we show that the CK2 holoenzyme complex is subject to disassembly and re-assembly *in vitro*. The rather slow rate of dissociation of the holoenzyme complex *in vitro* might not reflect the situation in intact cells where interacting partners could induce conformational changes, shifting the balance in favor of the dissociation [19]. A relatively small portion of CK2 $\beta$  encompassing the 33-residue C-terminal region constitutes a minimum CK2 $\alpha$  binding domain which is necessary and sufficient for high affinity interaction with CK2 $\alpha$ . The CK2 holoenzyme crystal structure has revealed that several residues in this domain make significant contacts with CK2 $\alpha$ . Based on these data, the finding that emerges from our mutagenesis study is that only a small set of primary hydrophobic contacts at the center of the interface dominates affinity *in vitro* allowing the identification of residues Y188 and F190 as the most important interaction points of CK2 $\beta$ . Mutations of these residues had strong functional consequences since the CK2 $\beta$ -YF and CK2 $\beta$ -MYF mutants were 1) unable to sustain the formation of a stable CK2 complex, 2) defective for its supramolecular organization and 3) inefficient for CK2-mediated phosphorylation of a CK2 $\beta$ -dependent substrate like CDC25B.

BiFC analysis from YN-CK2 $\alpha$  and YC-CK2 $\beta$  reproducibly demonstrated a specific interaction whereas the individual tagged proteins did not yield fluorescence. A characteristic BiFC pattern was detected with CK2 $\beta$ -M, CK2 $\beta$ -Y, or CK2 $\beta$ -F single mutants indicating that these CK2 $\beta$  mutants mediate CK2 $\alpha$  recognition. In contrast, BiFC fluorescence could be monitored only at a very low intensity with CK2 $\beta$ -YF double mutant demonstrating that these two amino acids are essential for a productive complex

formation in the normal cellular environment. These observations which corroborated our *in vitro* quantitative binding analysis were supportive of the ability to design peptides that can affect the CK2 subunit interaction. This led us to a structure-based design of CK2 $\beta$ -derived conformationally constrained peptides that can efficiently antagonize this high affinity interaction. Among a series of cyclic peptides, the disulfide bridged Pc peptide was the most active peptide variant. This cyclic peptide was considerably more potent than its identical linear form, indicating that cyclization staples the peptide in a fixed conformation, a strategy that is known to strongly enhance peptide affinity for their target by limiting flexibility and multiple conformational changes [38]. Consistent with the identification of Y188 and F190 as CK2 $\beta$  hot spots, alanine-scanning analysis has confirmed that change of these two hydrophobic residues was highly detrimental for the inhibitory activity of the Pc peptide.

### **Potential biological relevance of CK2 subunit antagonists**

To our knowledge, the 11-mer peptide Pc represents the first small antagonist that binds to the CK2 interface and inhibits its high affinity subunit interaction. Functional analysis showed that Pc could act as an antagonist of CK2 $\beta$ -dependent phosphorylation through the inhibition/disruption of the CK2 holoenzyme complex. Structural modifications of this cyclic peptide such as attachment to cell permeable adducts will be required to confer *in vivo* activity. Future efforts should also focus on the design of peptidomimetics with enhanced activity and selectivity.

Alternatively, our study further indicates that it should be possible to obtain small chemical molecules that bind to the CK2 $\alpha$  hydrophobic groove and inhibit its interaction with CK2 $\beta$  in a manner similar to the Pc peptide. Molecules that selectively inhibit the CK2 subunit interaction would be useful in determining the importance of CK2 $\beta$  in the control of the many cellular processes that are governed by this multifunctional kinase. In particular, such inhibitors would provide more rapid and reversible tools than siRNA or overexpression methods for correctly identifying relevant CK2 $\beta$ -dependent substrates. They will also serve as leads for the rational design of function-specific drugs that disrupt some actions of CK2, but leave other intact, allowing to deregulate specific intracellular pathways. Furthermore, selective disruption of the CK2 $\alpha$ /CK2 $\beta$  interaction could find important applications to pharmacologically test the importance of this interaction in tumor cell growth. With the help of structure-based rational design, the idea of finding small chemical molecules with significantly higher affinities for CK2 $\alpha$  using the Pc peptide as a lead molecule does not seem far-fetched.

### **FOOTNOTES**



We thank Thierry Buchou for providing recombinant GST-Olig2, Jean-Baptiste Raiser for assistance in molecular modelling, Nicole Thielens for assistance in BIAcore and Bernard Ducommun for providing recombinant CDC25B. This work was supported by the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), the Commissariat à l'Energie Atomique (CEA), the Ligue Nationale contre le Cancer (Equipe labellisée 2007), and the Institut National du Cancer (grant n°57) and by the Centre National pour la Recherche Scientifique (CNRS) and the Université Joseph Fourier (UJF). We also acknowledge the Plateau de Synthèse de la Plate-Forme Chimie Nanobio and the Ministère de la Recherche for grant No. 15432-2004 to V.D.

## REFERENCES

- 1 Andreeva, I. E., Livanova, N. B., Eronina, T. B., Silonova, G. V. and Poglazov, B. F. (1986) Phosphorylase kinase from chicken skeletal muscle. Quaternary structure, regulatory properties and partial proteolysis. *Eur. J. Biochem.* **158**, 99-106
- 2 Gibson, R. M., Ji-Buechler, Y. and Taylor, S. S. (1997) Interaction of the regulatory and catalytic subunits of cAMP-dependent protein kinase. Electrostatic sites on the type Ialpha regulatory subunit. *J. Biol. Chem.* **272**, 16343-16350
- 3 Nigg, E. A. (1995) Cyclin-dependent protein kinases: key regulators of the eukaryotic cell cycle. *Bioessays*. **17**, 471-480
- 4 Hsu, H. L., Yannone, S. M. and Chen, D. J. (2002) Defining interactions between DNA-PK and ligase IV/XRCC4. *DNA Repair (Amst)*. **1**, 225-235
- 5 Dyck, J. R., Gao, G., Widmer, J., Stapleton, D., Fernandez, C. S., Kemp, B. E. and Witters, L. A. (1996) Regulation of 5'-AMP-activated protein kinase activity by the noncatalytic beta and gamma subunits. *J. Biol. Chem.* **271**, 17798-17803
- 6 Rothwarf, D. M., Zandi, E., Natoli, G. and Karin, M. (1998) IKK-gamma is an essential regulatory subunit of the IkappaB kinase complex. *Nature*. **395**, 297-300
- 7 Gibson, R. M. and Taylor, S. S. (1997) Dissecting the cooperative reassociation of the regulatory and catalytic subunits of cAMP-dependent protein kinase. Role of Trp-196 in the catalytic subunit. *J. Biol. Chem.* **272**, 31998-32005
- 8 Pinna, L. A. (2002) Protein kinase CK2: a challenge to canons. *J. Cell. Sci.* **115**, 3873-3878
- 9 Allende, J. E. and Allende, C. C. (1995) Protein kinases. 4. Protein kinase CK2: an enzyme with multiple substrates and a puzzling regulation. *Faseb J.* **9**, 313-323
- 10 Litchfield, D. W. (2003) Protein kinase CK2: structure, regulation and role in cellular decisions of life and death. *Biochem. J.* **369**, 1-15

- 11 Hu, E. and Rubin, C. S. (1990) Expression of wild-type and mutated forms of the catalytic (alpha) subunit of *Caenorhabditis elegans* casein kinase II in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **265**, 20609-20615
- 12 Grankowski, N., Boldyreff, B. and Issinger, O. G. (1991) Isolation and characterization of recombinant human casein kinase II subunits alpha and beta from bacteria. *Eur. J. Biochem.* **198**, 25-30
- 13 Niefind, K., Guerra, B., Ermakowa, I. and Issinger, O. G. (2001) Crystal structure of human protein kinase CK2: insights into basic properties of the CK2 holoenzyme. *Embo J.* **20**, 5320-5331
- 14 Chantalat, L., Leroy, D., Filhol, O., Nueda, A., Benitez, M. J., Chambaz, E. M., Cochet, C. and Dideberg, O. (1999) Crystal structure of the human protein kinase CK2 regulatory subunit reveals its zinc finger-mediated dimerization. *Embo J.* **18**, 2930-2940
- 15 Bibby, A. C. and Litchfield, D. W. (2005) The Multiple Personalities of the Regulatory Subunit of Protein Kinase CK2: CK2 Dependent and CK2 Independent Roles Reveal a Secret Identity for CK2beta. *Int. J. Biol. Sci.* **1**, 67-79
- 16 Filhol, O., Nueda, A., Martel, V., Gerber-Scokaert, D., Benitez, M. J., Souchier, C., Saoudi, Y. and Cochet, C. (2003) Live-cell fluorescence imaging reveals the dynamics of protein kinase CK2 individual subunits. *Mol. Cell. Biol.* **23**, 975-987
- 17 Guerra, B., Siemer, S., Boldyreff, B. and Issinger, O. G. (1999) Protein kinase CK2: evidence for a protein kinase CK2beta subunit fraction, devoid of the catalytic CK2alpha subunit, in mouse brain and testicles. *FEBS Lett.* **462**, 353-357
- 18 Li, X., Guan, B., Maghami, S. and Bieberich, C. J. (2006) NKX3.1 is regulated by protein kinase CK2 in prostate tumor cells. *Mol. Cell. Biol.* **26**, 3008-3017
- 19 Filhol, O., Martiel, J. L. and Cochet, C. (2004) Protein kinase CK2: a new view of an old molecular complex. *EMBO Rep.* **5**, 351-355
- 20 Allende, C. C. and Allende, J. E. (1998) Promiscuous subunit interactions: a possible mechanism for the regulation of protein kinase CK2. *J. Cell. Biochem. Suppl.* **30-31**, 129-136
- 21 Berg, T. (2003) Modulation of protein-protein interactions with small organic molecules. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **42**, 2462-2481
- 22 Chene, P. (2006) Drugs targeting protein-protein interactions. *ChemMedChem.* **1**, 400-411
- 23 Renaudet, O. and Dumy, P. (2003) Chemoselectively template-assembled glycoconjugates as mimics for multivalent presentation of carbohydrates. *Org. Lett.* **5**, 243-246
- 24 Heriche, J. K., Lebrin, F., Rabilloud, T., Leroy, D., Chambaz, E. M. and Goldberg, Y. (1997) Regulation of protein phosphatase 2A by direct interaction with casein kinase 2alpha. *Science.* **276**, 952-955

- 25 Leroy, D., Filhol, O., Quintaine, N., Sarrouilhe, D., Loue-Mackenbach, P., Chambaz, E. M. and Cochet, C. (1999) Dissecting subdomains involved in multiple functions of the CK2beta subunit. *Mol. Cell. Biochem.* **191**, 43-50
- 26 Filhol, O., Cochet, C., Wedegaertner, P., Gill, G. N. and Chambaz, E. M. (1991) Coexpression of both alpha and beta subunits is required for assembly of regulated casein kinase II. *Biochemistry.* **30**, 11133-11140
- 27 Hu, C. D. and Kerppola, T. K. (2003) Simultaneous visualization of multiple protein interactions in living cells using multicolor fluorescence complementation analysis. *Nat. Biotechnol.* **21**, 539-545
- 28 Kerppola, T. K. (2006) Visualization of molecular interactions by fluorescence complementation. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **7**, 449-456
- 29 Martel, V., Filhol, O., Colas, P. and Cochet, C. (2006) p53-dependent inhibition of mammalian cell survival by a genetically selected peptide aptamer that targets the regulatory subunit of protein kinase CK2. *Oncogene.* **25**, 7343-7353
- 30 Martel, V., Filhol, O., Nueda, A. and Cochet, C. (2002) Dynamic localization/association of protein kinase CK2 subunits in living cells: a role in its cellular regulation? *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **973**, 272-277
- 31 Canton, D. A., Zhang, C. and Litchfield, D. W. (2001) Assembly of protein kinase CK2: investigation of complex formation between catalytic and regulatory subunits using a zinc-finger-deficient mutant of CK2beta. *Biochem. J.* **358**, 87-94
- 32 Filhol, O., Benitez, MJ., Cochet, C. . (2004) A Zinc ribbon motif is essential for the formation of functional tetrameric protein kinase CK2. *Biosciences*, 124-129
- 33 Marin, O., Meggio, F., Sarno, S. and Pinna, L. A. (1997) Physical dissection of the structural elements responsible for regulatory properties and intersubunit interactions of protein kinase CK2 beta-subunit. *Biochemistry.* **36**, 7192-7198
- 34 Theis-Febvre, N., Filhol, O., Froment, C., Cazales, M., Cochet, C., Monsarrat, B., Ducommun, B. and Baldin, V. (2003) Protein kinase CK2 regulates CDC25B phosphatase activity. *Oncogene.* **22**, 220-232
- 35 Pagano, M. A., Sarno, S., Poletto, G., Cozza, G., Pinna, L. A. and Meggio, F. (2005) Autophosphorylation at the regulatory beta subunit reflects the supramolecular organization of protein kinase CK2. *Mol. Cell. Biochem.* **274**, 23-29
- 36 Theis-Febvre, N., Martel, V., Laudet, B., Souchier, C., Grunwald, D., Cochet, C. and Filhol, O. (2005) Highlighting protein kinase CK2 movement in living cells. *Mol. Cell. Biochem.* **274**, 15-22

- 37 Ermakova, I., Boldyreff, B., Issinger, O. G. and Niefind, K. (2003) Crystal structure of a C-terminal deletion mutant of human protein kinase CK2 catalytic subunit. *J. Mol. Biol.* **330**, 925-934
- 38 Leduc, A. M., Trent, J. O., Wittliff, J. L., Bramlett, K. S., Briggs, S. L., Chirgadze, N. Y., Wang, Y., Burris, T. P. and Spatola, A. F. (2003) Helix-stabilized cyclic peptides as selective inhibitors of steroid receptor-coactivator interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **100**, 11273-11278
- 39 Emsley, P. and Cowtan, K. (2004) Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* **60**, 2126-2132
- 40 Vagin, A. A., Steiner, R. A., Lebedev, A. A., Potterton, L., McNicholas, S., Long, F. and Murshudov, G. N. (2004) REFMAC5 dictionary: organization of prior chemical knowledge and guidelines for its use. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* **60**, 2184-2195
- 41 (1994) The CCP4 suite: programs for protein crystallography. *Acta. Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* **50**, 760-763
- 42 Pettersen, E. F., Goddard, T. D., Huang, C. C., Couch, G. S., Greenblatt, D. M., Meng, E. C. and Ferrin, T. E. (2004) UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. *J. Comput. Chem.* **25**, 1605-1612

## FIGURE LEGENDS

### Figure 1 Reversibility of the CK2 subunit assembly *in vitro*

(A) Exchange of CK2 $\alpha$  in the subunit complex. Preformed complexes between immobilized MBP-CK2 $\beta$  and [ $^{35}$ S]-methionine-labelled-CK2 $\alpha$  were incubated for 1h with increasing concentrations of unlabelled CK2 $\alpha$ . After washing, the amount of [ $^{35}$ S]-methionine-labelled-CK2 $\alpha$  present in the complex was determined by radioactivity counting. (B) Kinetic of dissociation of the CK2 subunit complex. Preformed complexes between [ $^{35}$ S]-methionine-labelled-CK2 $\alpha$  and MBP-CK2 $\beta$  were incubated for different time with a 10-fold molar excess of unlabelled CK2 $\alpha$ . After washing, the amount of [ $^{35}$ S]-methionine-labelled-CK2 $\alpha$  remaining in the complex was determined by radioactivity counting. Results are the means  $\pm$  S.D. (n = 3).

### Figure 2 Interaction of a CK2 $\beta$ C-terminal fragment with CK2 $\alpha$

(A) Stable association of CK2 $\alpha$  with a GST- $\beta$  C-ter fragment. Agarose beads containing different GST-tagged proteins were incubated with or without CK2 $\alpha$  as indicated. After washing, the amount of associated CK2 $\alpha$  was evaluated by CK2 kinase assay as described in the experimental section. (B) Size

exclusion chromatography of either free CK2 $\alpha$  (upper panel) or CK2 $\alpha$ /GST- $\beta$  C-ter complex (lower panel). Collected fractions were assayed for the presence of CK2 $\alpha$  by Western blotting. Elution of molecular weight standards is indicated. (C) Antagonist effect of the GST- $\beta$  C-ter fragment. Immobilized MBP-CK2 $\beta$  was incubated with the indicated fold excess of GST- $\beta$  C-ter and a fixed amount of CK2 $\alpha$ . After washing, the amount of associated CK2 $\alpha$  was assessed by CK2 kinase assay and Western blotting.

### Figure 3 Structure and mode of binding of Pc peptide on CK2 $\alpha$

(A) Surface representation of the binding pocket of CK2 $\alpha$  interacting with a short C-terminal loop of CK2 $\beta$ . Crystal structure of the CK2 holoenzyme shows that a C-terminal fragment of the CK2 $\beta$ 1 chain encompassing residues 186-193 (colored in green) forms a loop inserting into a deep hydrophobic pocket of CK2 $\alpha$  [14]. Surface representation of the CK2 $\alpha$  cleft in grey highlights its pocket-like characteristics. The phenyl and phenol rings of the two non-polar and aromatic CK2 $\beta$  residues Y188 and F190 respectively (colored in red), are in quasi planar opposite orientation and fit tightly in it. M166 (colored in red) located on the second CK2 $\beta$ 2 chain (colored in yellow) is labeled. (B) Molecular model of Pc peptide in CK2 $\alpha$  pocket. A rough molecular model of Pc peptide (in blue) was obtained from the CK2 $\beta$ 1 structure previously determined (PDB code 1JWH, [13]). In details, the CK2 $\beta$ 1 structure segment (<sup>186</sup>RLYGFKIH<sup>193</sup> in green) was taken as template for the corresponding central peptide segment and the terminal aminoacids were manually added using the program Coot [39]. A basic geometric idealization of peptide bonds was then performed using the program Refmac 5 [40] from Ccp4 [41]. For clarity, only key interacting residues of CK2 $\beta$ 1 are shown (in red). The cystein disulfide bridge is colored in orange. The superimposition of Pc peptide with the CK2 $\beta$ -C-terminal loop demonstrates that Pc emulates the interaction of the natural ligand CK2 $\beta$  with CK2 $\alpha$ . Pictures were prepared with the Chimera software [42] and the 1JWH PDB structure [14].

### Figure 4 CK2 $\alpha$ binding activity of CK2 $\beta$ mutant proteins

(A) Solid phase CK2 $\alpha$  binding assay of different CK2 $\beta$  mutants. Immobilized WT CK2 $\beta$  was incubated with [<sup>35</sup>S]-methionine-labelled CK2 $\alpha$  in the presence of increasing concentrations of soluble WT MBP-CK2 $\beta$  or MBP-CK2 $\beta$  mutants as indicated. After washing, the amount of associated CK2 $\alpha$  was evaluated by radioactivity counting. Results are the means  $\pm$  S.D. (n = 3). (B) Real time binding kinetics between immobilized GST-CK2 $\alpha$  and different MBP-CK2 $\beta$  mutant proteins measured by surface plasmon resonance. The interaction between immobilized GST-CK2 $\alpha$  and MBP-CK2 $\beta$  mutants was recorded as described in Experimental Procedures.

### Figure 5 Phosphorylation of CDC25B by CK2 $\alpha$ in presence of CK2 $\beta$ or CK2 $\beta$ mutants

MBP-CDC25B (1.5  $\mu$ M) was pre-incubated for 15 min with CK2 $\alpha$  (0.6  $\mu$ M) in the presence of 0.35  $\mu$ M of WT MBP-CK2 $\beta$  or the indicated MBP-CK2 $\beta$  mutants. Phosphorylation reaction was carried out for 5 min at RT in the presence of 25  $\mu$ M [ $\gamma$ <sup>32</sup>P]-ATP-MgCl<sub>2</sub>. Phosphorylated proteins were separated on SDS PAGE and analyzed by autoradiography (upper panel) or Coomassie staining (lower panel). 1: CDC25B, 2: WT MBP-CK2 $\beta$  + CDC25B, 3: MBP-CK2 $\beta$ -M + CDC25B, 4: MBP-CK2 $\beta$ -YF + CDC25B, 5: MBP-CK2 $\beta$ -MYF + CDC25B, 6: WT MBP-CK2 $\beta$ , 7: MBP-CK2 $\beta$ -M, 8: MBP-CK2 $\beta$ -YF, 9: MBP-CK2 $\beta$ -MYF.

### Figure 6 Visualization of interactions between CK2 $\alpha$ and CK2 $\beta$ or CK2 $\beta$ mutants in living cells by Bimolecular Fluorescence Complementation

(A) Immunofluorescence images of HeLa cells transfected with plasmids expressing the YFP fragments fused to CK2 $\alpha$ , CK2 $\beta$  or CK2 $\beta$  mutants as indicated in each panel. Twenty four hours after transfection, immunostaining of YFP was performed to enhance the signal as described in Experimental Procedures. The diagrams on the left of the images represent the experimental strategies used. (B) Quantification of the BiFC signal in cells co-transfected with different plasmid constructs. Results are expressed as % of cells that were above the fluorescence threshold observed in cells expressing only YN-CK2 $\alpha$  or YN-CK2 $\beta$ . (C) Western blot analysis of the levels of protein expression. Cells corresponding to panels d, e, f in Figure 6A that expressed the indicated proteins were harvested, and the cell extracts were analysed by Western blotting using anti-CK2 $\alpha$  (lanes 1, 2, 3) and CK2 $\beta$  (lanes 4, 5, 6) antibodies. Lanes 1, 4: YN-CK2 $\alpha$  + WT YC-CK2 $\beta$ , lanes 2, 5: YN-CK2 $\alpha$  + YC-CK2 $\beta$ -M, lanes 3, 6: YN-CK2 $\alpha$  + YC-CK2 $\beta$ -MYF.

### Figure 7 Disruption of CK2 subunits interaction by CK2 $\beta$ -derived cyclic peptides

(A) Binding of Pc peptide or CK2 $\beta$  to CK2 $\alpha$ . Increasing concentrations of biotinylated Pc peptide (-▲-) or biotinylated MBP-CK2 $\beta$  (-Δ-) were immobilized on streptavidin beads and incubated with CK2 $\alpha$  (0.3  $\mu$ M) for 15 min at 4°C. After washing, the amount of associated CK2 $\alpha$  was evaluated by CK2 kinase assay. (B) Inhibition of CK2 $\alpha$ /CK2 $\beta$  complex formation by Pc peptide (-▲-). Immobilized MBP-CK2 $\beta$  was incubated with increasing concentrations of Pc peptide, followed by the addition of [<sup>35</sup>S]-methionine-labelled CK2 $\alpha$  (10<sup>5</sup> cpm). After washing, bound CK2 $\alpha$  was determined by radioactivity counting. Dissociation of preformed CK2 $\alpha$ /CK2 $\beta$  complex by Pc peptide (-■-). [<sup>35</sup>S]-methionine-labelled CK2 $\alpha$  was incubated with immobilized MBP-CK2 $\beta$ , followed by the addition of increasing concentrations of Pc peptide. After washing, bound CK2 $\alpha$  was determined by radioactivity counting. (C) Inhibition of CK2 $\alpha$ /CK2 $\beta$  complex formation by different Pc peptide derivatives. Increasing concentrations of the

different peptides were tested as in (B). Pc (-▲-), Linear peptide GAGGRLYGFKIHGGP (-■-), inverted linear peptide PGGHIKFGYLRGGAG (-Δ-), Head-to-tail peptide analogues: PcL1 RLYGFKIHGPAGG (-□-), PcL2 RLYGFKIHGPGAGG (-●-) and PcL3 RLYGFKIHGGPGAGG (-○-). Results are the means  $\pm$  S.D. (n = 3).

### Figure 8 Antagonist effects of peptide Pc variants carrying single-site mutations

(A) Various Pc peptide variants generated by alanine scanning were tested at 1.5  $\mu$ M (□) or 15  $\mu$ M (■) for their antagonist effect on the association of CK2 subunits as described in figure 7C. The mean and standard deviation (n = 3) of representative experiment are shown. (B) IC<sub>50</sub> values determined for each peptide variant.

### Figure 9 Antagonist effect of Pc peptide on CK2-mediated phosphorylation of a CK2 $\beta$ -dependent substrate

Preformed CK2 complexes were incubated for 15 min at 4°C with increasing concentrations of Pc peptide followed by the addition of GST-Olig2 (5  $\mu$ g) and 25  $\mu$ M [ $\gamma$ <sup>32</sup>P]-ATP-MgCl<sub>2</sub> for 5 min at RT. Phosphorylated proteins were separated on SDS-PAGE and analyzed by autoradiography (upper panel) or Coomassie staining (lower panel). The results are representative of two independent experiments. C: control without CK2.

### Supplementary Figure 1 Visualization of interactions between CK2 $\alpha$ and CK2 $\beta$ in living cells by BiFc

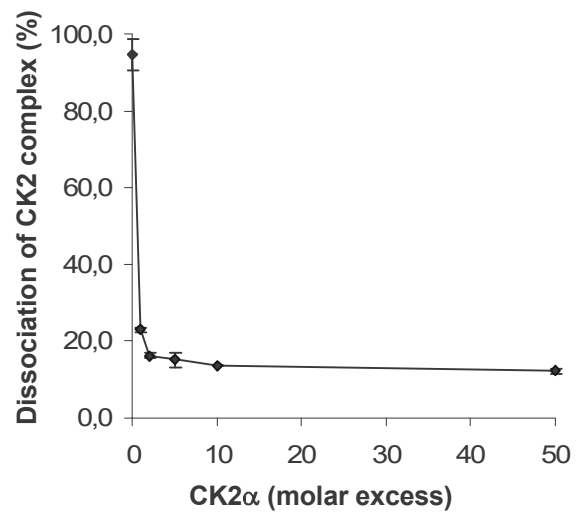
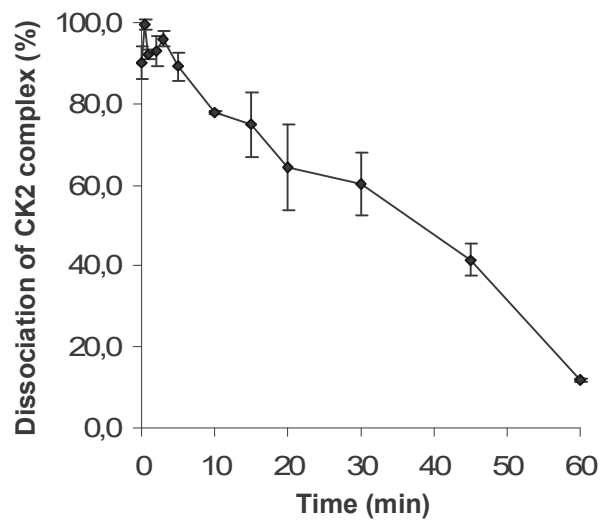
(A) YFP fluorescence emission and indirect immunofluorescence images of HeLa cells transfected with plasmids expressing the YFP fragments fused to CK2 $\alpha$  or CK2 $\beta$  as indicated in each panel. Cells were directly observed for YFP fluorescence (panels a, d, g, j, m) or immunostained for YFP (panels b, e, h, k, n) with monoclonal anti-GFP antibody followed by Cy3-labelled secondary antibody to enhance the signal as described in Experimental procedures. The diagrams on the left of the images represent the experimental strategies used. (B) Western blot analysis of the levels of protein expression. Cells extracts corresponding to panels m, n, o in Figure 1A were analysed by Western blotting using anti-CK2 $\alpha$  (lane 1) and CK2 $\beta$  (lane 2) antibodies.

YFP raw fluorescence (FITC) is approximately 20 times lower [31] in conditions of YFP bimolecular complementation (panel m) than with full-length YFP (panels a and g). Since expression levels of YN-CK2 $\alpha$  and YC-CK2 $\beta$  are lower than endogenous CK2 $\alpha$  and CK2 $\beta$  (Figure 1B), this low fluorescence emission could be explained by competition of the endogenous CK2 subunits for bimolecular complex

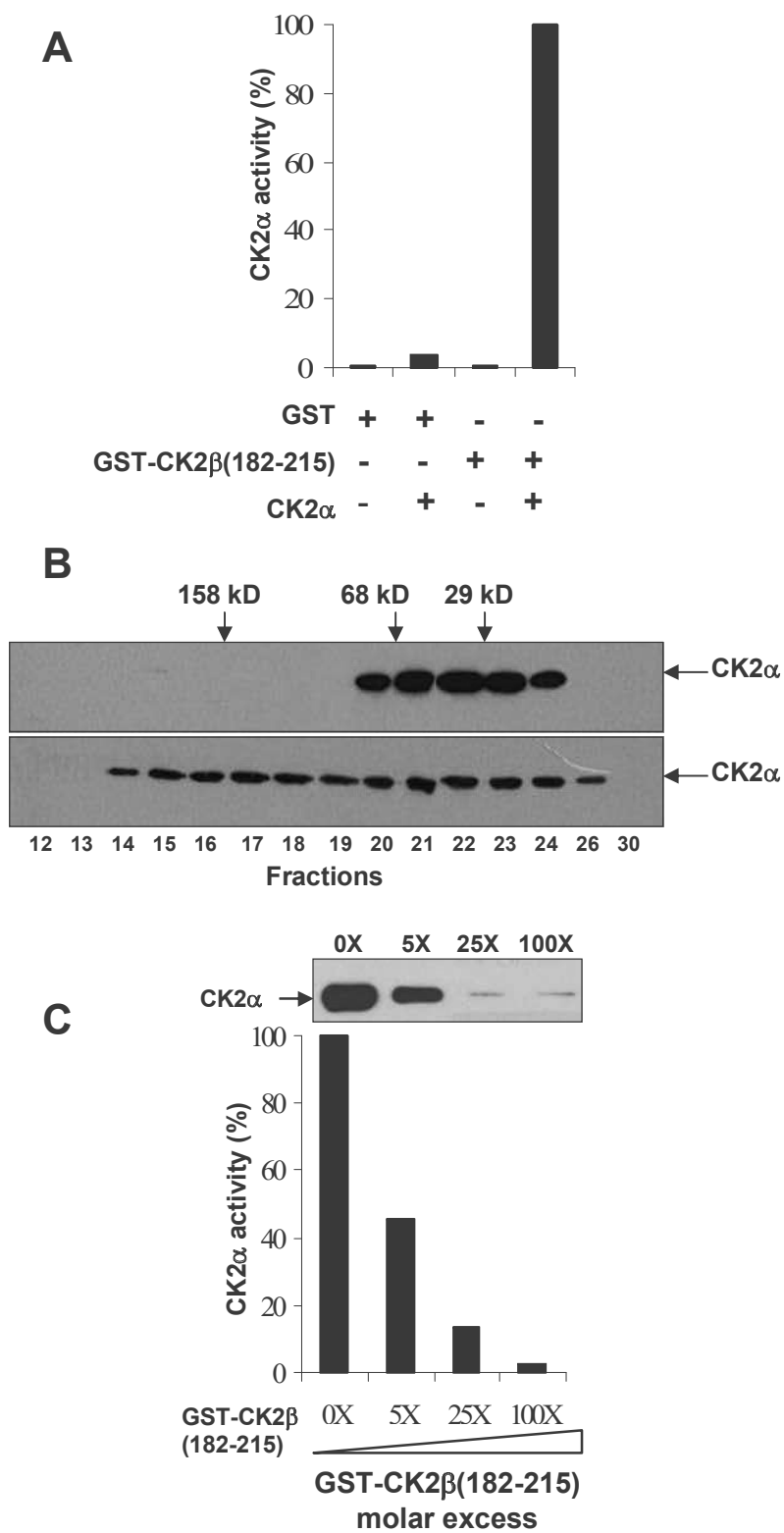
formation. Note that the monoclonal anti-GFP antibody used in this study recognizes only full-length YFP (panels b, h) but not YC or YN fragments (panels e, k) (unpublished observation). Therefore, indirect immunofluorescence with this mouse anti-GFP antibody can be used to enhance the detection of bimolecular complex formation (panel n).

## **FIGURES**

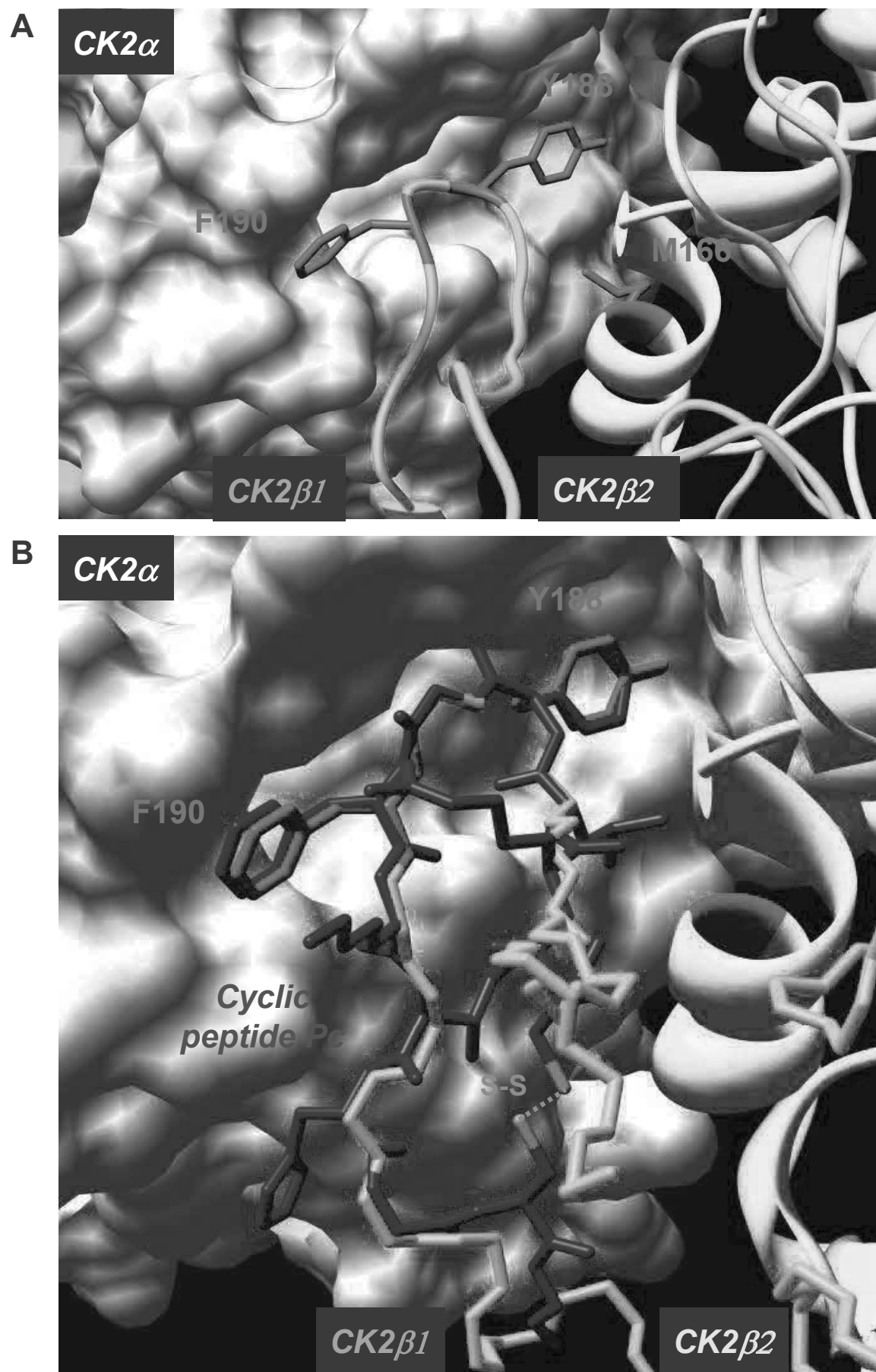


**A****B**

**Figure 1**



**Figure 2**



**Figure 3**

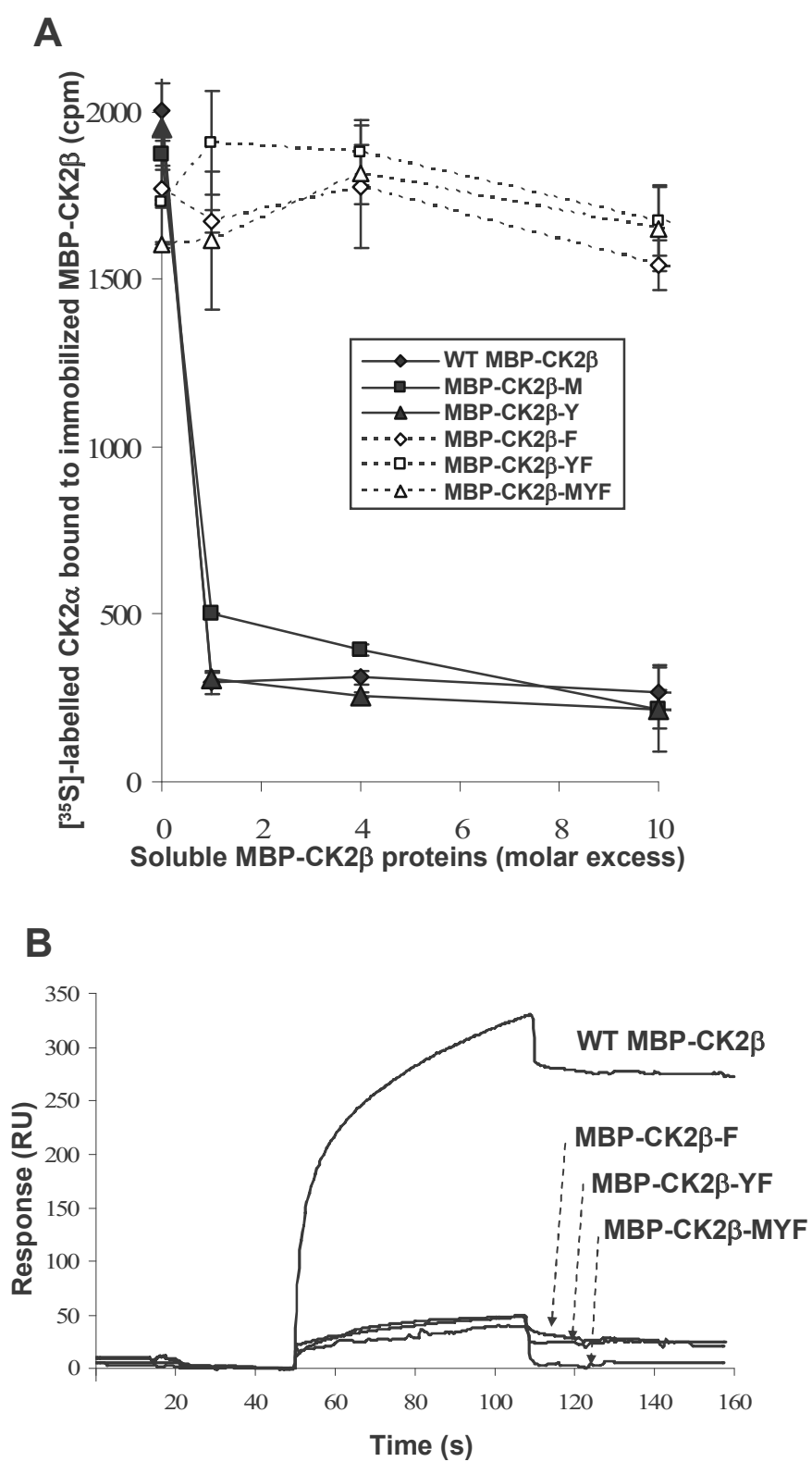


Figure 4

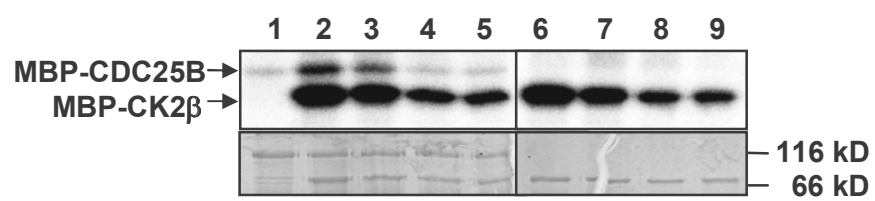
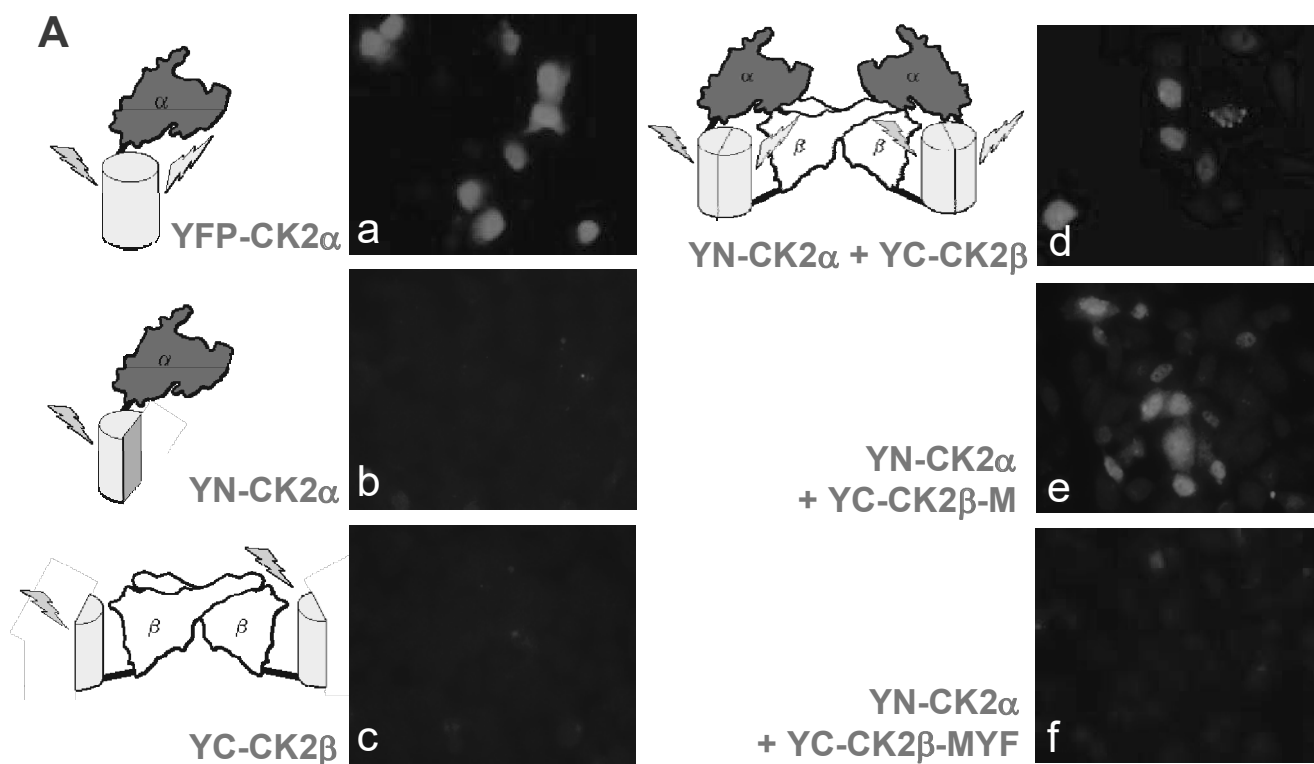


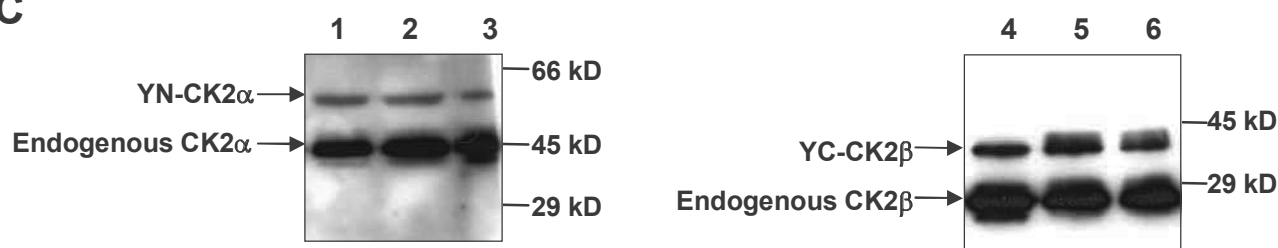
Figure 5



**B**

| Co-transfection                      | YFP complementation |
|--------------------------------------|---------------------|
| YN-CK2 $\alpha$ + YC-CK2 $\beta$     | 36,8 %              |
| YN-CK2 $\alpha$ + YC-CK2 $\beta$ M   | 20,5 %              |
| YN-CK2 $\alpha$ + YC-CK2 $\beta$ YF  | 14,4 %              |
| YN-CK2 $\alpha$ + YC-CK2 $\beta$ MYF | 2,4 %               |
| YC-CK2 $\alpha$ + YN-CK2 $\beta$     | 22,6 %              |
| YC-CK2 $\alpha$ + YN-CK2 $\beta$ M   | 26,2 %              |
| YC-CK2 $\alpha$ + YN-CK2 $\beta$ YF  | 9,6 %               |
| YC-CK2 $\alpha$ + YN-CK2 $\beta$ MYF | 2,4 %               |

**C**



**Figure 6**

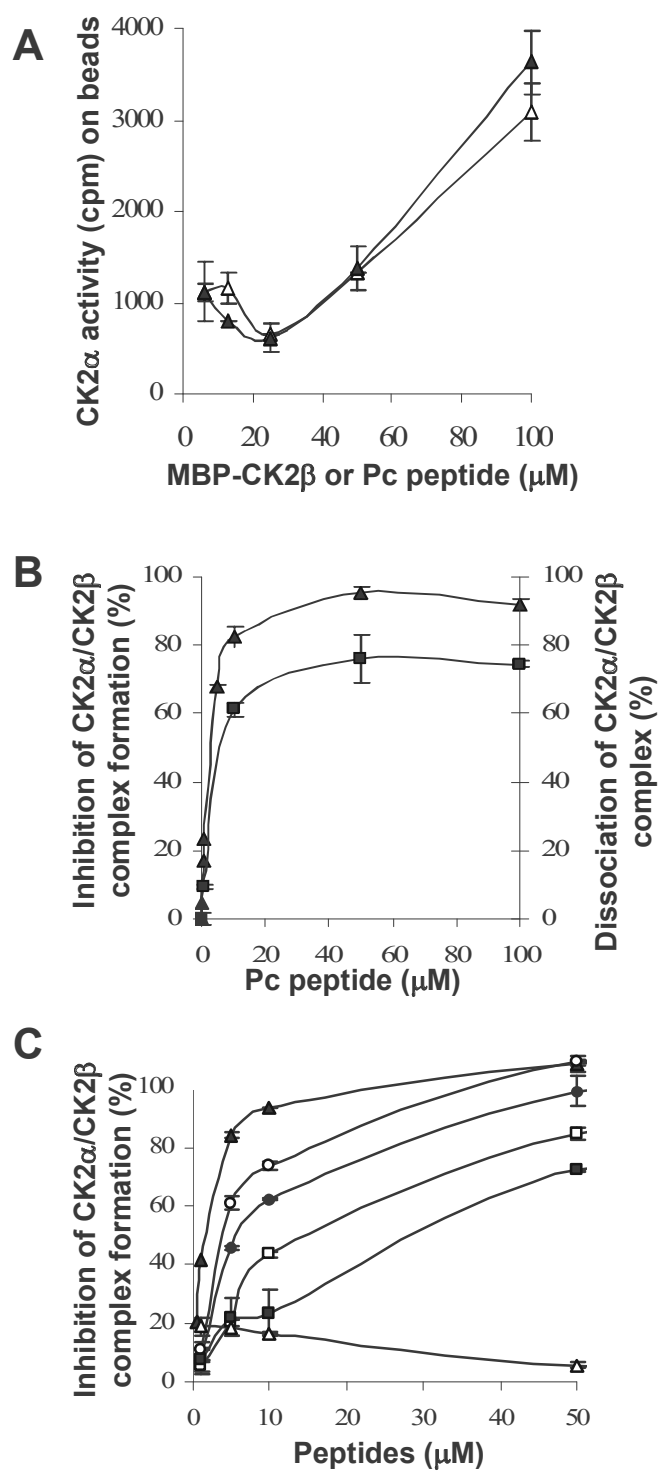
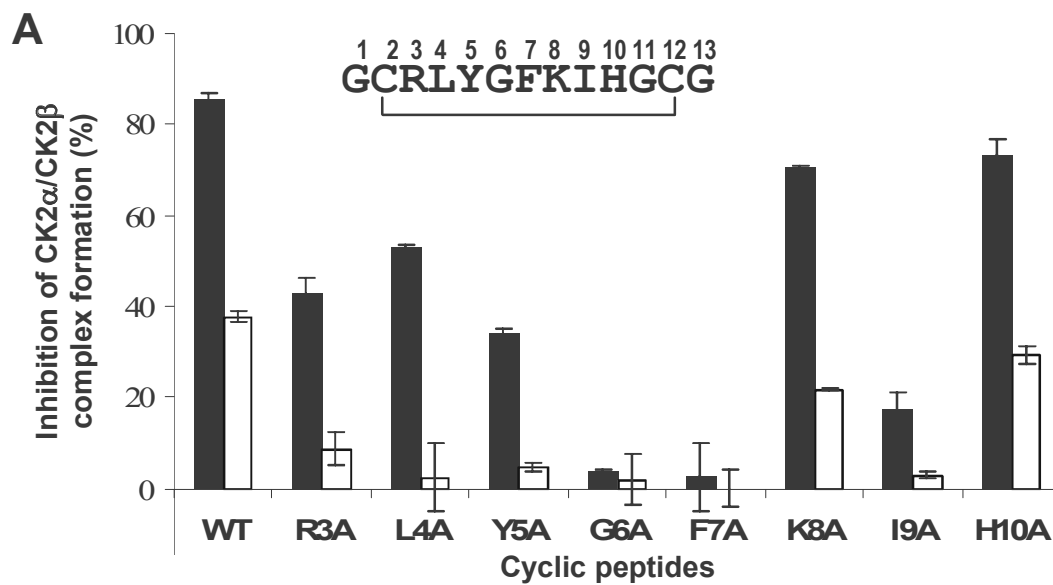


Figure 7

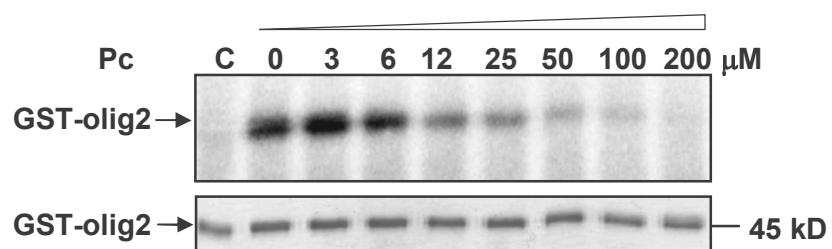


**B**

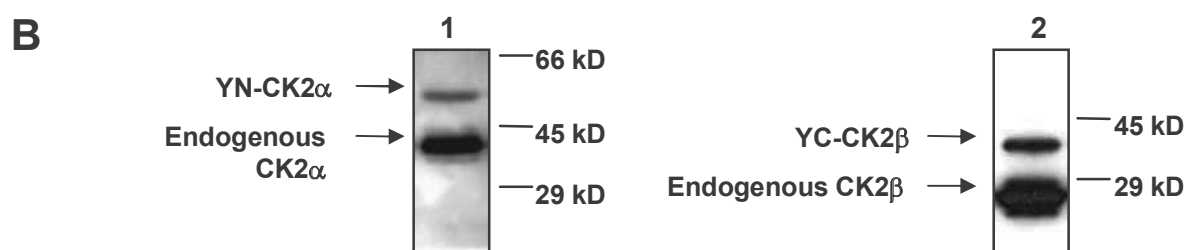
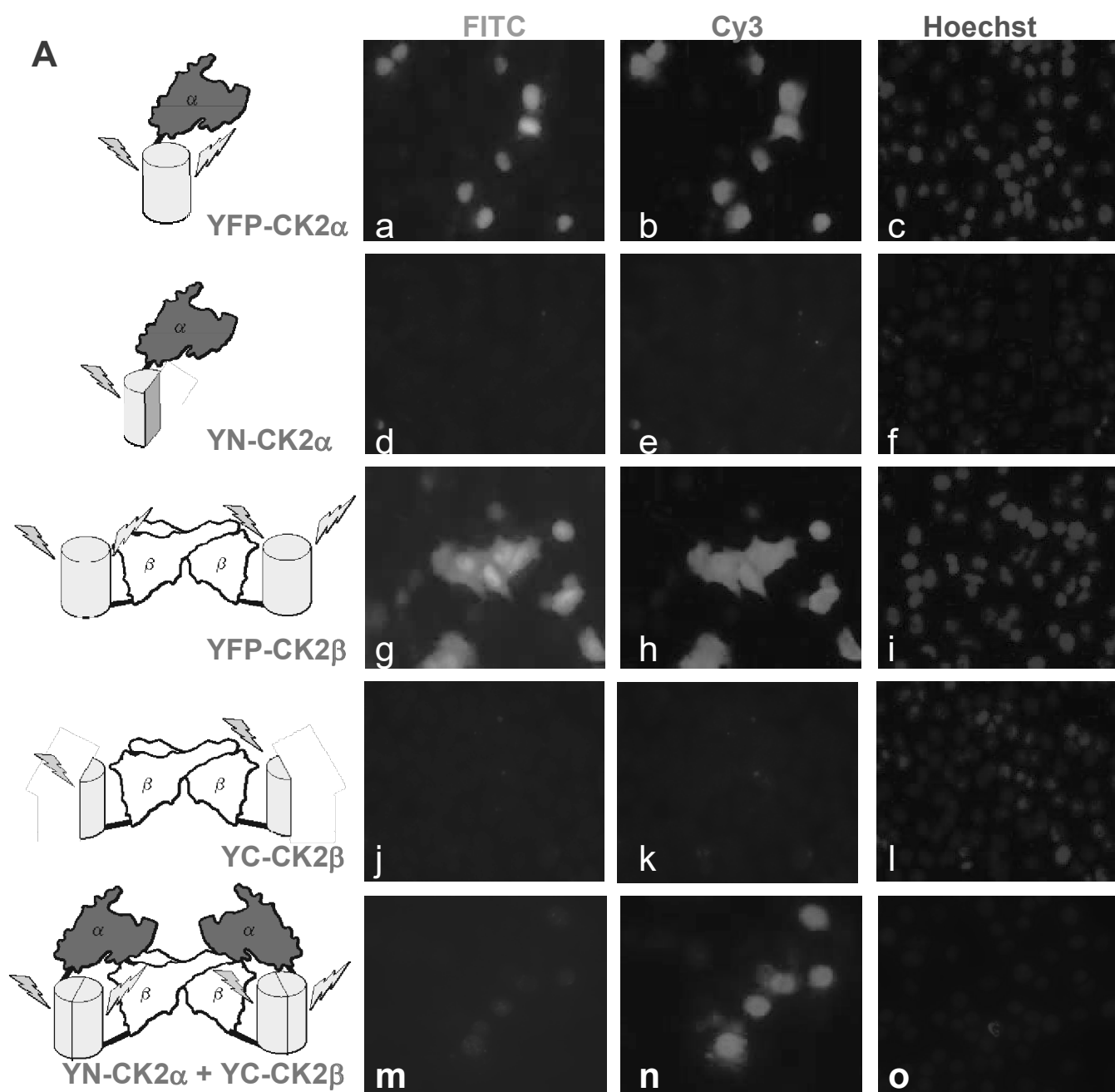
| Cyclic peptides         | IC <sub>50</sub> (μM) |
|-------------------------|-----------------------|
| Pc (GCRLYGFKIHGCG)      | 3.0                   |
| Pc-R3A (GCALYGFKIHGCG)  | 16.5                  |
| Pc-L4A (GCRAYGFKIHGCG)  | 22.0                  |
| Pc-Y5A (GCRLAGFKIHGCG)  | 54.0                  |
| Pc-G6A (GCRLYAFKIHGCG)  | > 100.0               |
| Pc-F7A (GCRLYGAKIHGCG)  | >> 100.0              |
| Pc-K8A (GCRLYGFAlHGCG)  | 6.5                   |
| Pc-I9A (GCRLYGFKAHGCG)  | 85.0                  |
| Pc-H10A (GCRLYGFKIAGCG) | 15.0                  |

**Figure 8**





**Figure 9**



Supplementary data Figure 1

### **III- Commentaire des principaux résultats**

Les principaux résultats de l'article sont repris et commentés brièvement ci-après.

#### **1- L'interaction entre les sous-unités de CK2 est dynamique *in vitro***

Un test de compétition *in vitro* a été mis au point et miniaturisé. Une des sous-unités (MBP-CK2 $\beta$  biotinylée, 3,6 pmol) est immobilisée en plaque 96 puits recouverts de streptavidine. Une quantité molaire identique de GFP-CK2 $\alpha$  (3,6 pmol) est ajoutée, suivie d'un excès molaire croissant de CK2 $\alpha$ -His. A partir d'un excès molaire de 10x, la CK2 $\alpha$ -His est capable de déplacer en 30 min la GFP-CK2 $\alpha$  du complexe préformé. On observe un échange des sous-unités du complexe que l'on peut mettre en évidence par un excès de l'une des sous-unités étiquetée différemment. Ceci prouve que, même *in vitro*, l'interaction entre CK2 $\alpha$  et CK2 $\beta$  est réversible. Ces résultats nous ont permis de valider l'approche *in vitro* pour rechercher des composés inhibiteurs de l'interaction CK2 $\alpha$ -CK2 $\beta$ .

#### **2- Analyse de la partie C-terminale de CK2 $\beta$**

Des études de délétion de fragments ont permis de définir la partie C-terminale de CK2 $\beta$  (170-215) comme la zone d'interaction majeure avec CK2 $\alpha$  (Boldyreff, 1993 ; Marin, 1997). La structure cristallographique du complexe (Niefind, 2001) nous a conduit à restreindre cette zone à la partie 182-215. Une mini-protéine CK2 $\beta$ -182-215 fusionnée à la protéine GST a été produite sous forme recombinante. Cette mini-protéine possède la capacité à 1) interagir avec CK2 $\alpha$  et 2) à jouer le rôle d'un antagoniste de CK2 $\beta$  vis-à-vis de l'interaction avec CK2 $\alpha$ .

#### **3- Identification des hot spots de l'interaction CK2 $\alpha$ -CK2 $\beta$**

La zone d'interaction entre CK2 $\alpha$  et CK2 $\beta$  est grossièrement définie, néanmoins la contribution spécifique de chaque acide aminé – les « hot spots » - n'avait jamais été déterminée. Plusieurs arguments nous ont permis de choisir judicieusement un nombre restreint de positions à tester par mutagenèse dirigée. Une observation fine de la structure cristallographique du complexe tétramérique de CK2 (Figure 3) nous a incité à nous concentrer sur 3 résidus de CK2 $\beta$  (M166, Y188, F190) et à générer les protéines mutées sur ces résidus. Ces protéines mutantes ont été évaluées en compétition dans un test

d'interaction *in vitro* et en BIAcore : cette analyse révèle que la mutation en Alanine de Y188 et F190 est particulièrement critique pour l'interaction avec CK2 $\alpha$  (Figure 4).

L'importance de ces deux résidus a été confirmée par un test fonctionnel *in vitro* dans lequel la phosphorylation par CK2 $\alpha$  de CDC25B est fortement dépendante de la présence de CK2 $\beta$  (substrat CK2 $\beta$ -dépendant « positif »). Dans les mêmes conditions, la phosphorylation de ce substrat en présence du double mutant CK2 $\beta$  Y188A-F190A est fortement diminuée (Figure 5).

Hot spot : Les hot spots se définissent comme les résidus critiques de l'interface, contribuant à la majeure partie de l'énergie libre d'interaction : un résidu est défini comme un hot spot si sa mutation en Alanine entraîne une modification significative de l'énergie libre d'interaction ( $\Delta\Delta G \geq 2$  Kcal/mol). Ce sont les acides aminés minimaux dont la mutation suffit à rompre le complexe. Bien que les surfaces d'interaction soient relativement planes et étendues, il est remarquable de constater que seulement 2 à 5 acides aminés jouent un rôle clé dans l'interaction. Il s'agit souvent de résidus hydrophobes tels R, Y, W. Ces résidus sont davantage conservés que ceux du reste de la surface protéique (Bogan, 1998 ; Li, 2004).

Ces résultats ont été confirmés *in vivo* dans un modèle de complémentation bimoléculaire de fluorescence (BiFc) où le double mutant CK2 $\beta$  Y188A-F190A ne peut manifestement plus interagir avec CK2 $\alpha$  (Figure 6). La description du test BiFc sera détaillée plus loin.

Les acides aminés Y188 et F190 de CK2 $\beta$  ressortent donc comme des "hot spots" pour l'interaction CK2 $\alpha$ -CK2 $\beta$ .

#### **4- Conception d'un peptide cyclique inhibiteur de l'interaction CK2 $\alpha$ -CK2 $\beta$**

La connaissance de ces hot spots nous a permis de concevoir la synthèse orientée d'un peptide centré sur Y188-F190 et mimant la principale zone d'interaction de CK2 $\beta$  avec CK2 $\alpha$  en collaboration avec le Dr. Otto Dideberg (Laboratoire de Cristallographie, Institut de Biologie Structurale, Grenoble). La région 186-193 de CK2 $\beta$  a été choisie pour synthétiser un peptide mimétique antagoniste. La conformation de ce peptide a été contrainte par cyclisation, grâce à l'ajout aux extrémités de deux cystéines formant un pont disulfure. Ceci a permis de le rigidifier et de lui donner une conformation similaire à la boucle de CK2 $\beta$  (Figure 3).

Ce peptide cyclique a été testé *in vitro* pour son effet inhibiteur de l'interaction CK2 $\alpha$ -CK2 $\beta$ . Il est capable d'inhiber la formation du complexe avec une IC<sub>50</sub> de 3  $\mu$ M mais également de dissocier le complexe préformé (IC<sub>50</sub> = 7  $\mu$ M, Figure 7).

La cyclisation via les cystéines présente l'inconvénient d'être peu résistante aux changements de conditions d'oxydo-réduction de la cellule. De plus, les glycines ajoutées aux extrémités favorisent l'ancrage de protéases et peuvent diminuer la durée de vie du peptide dans la cellule. Nous avons donc proposé de synthétiser un peptide cyclisé par la chaîne carbonée, plus résistant aux protéolyses et aux conditions redox de la cellule. L'équipe de chimistes de Pascal Dumy (DCM, Grenoble) a ainsi synthétisé 3 peptides de type head-to-tail correspondant à ces critères : PcL1 : RLYGFKIH PGAGG, PcL2 : RLYGFKIH GPGAGG, PcL3 : RLYGFKIH GPGAGG. Le peptide PcL3 est quasiment aussi efficace que le peptide initial pour sa capacité à inhiber l'interaction CK2 $\alpha$ -CK2 $\beta$  *in vitro* (IC<sub>50</sub> = 4  $\mu$ M, Figure 7).

En revanche, un peptide linéaire perd dramatiquement son pouvoir inhibiteur (IC<sub>50</sub> = 30  $\mu$ M), mettant en relief l'importance de la contrainte de cyclisation pour lui conférer une structure bioactive. L'interaction du peptide avec la sous-unité CK2 $\alpha$  est confirmée par une analyse par GST-pull-down (Figure 7).

Une caractérisation par Ala-scanning des différentes positions du peptide cyclique a confirmé l'importance de 3 résidus incluant Y et F pour l'activité biologique : ces résidus représentent donc le pharmacophore du peptide inhibiteur. La glycine mutée en Alanine apparaît perturbatrice probablement pour des raisons de repliement, de flexibilité et de cyclisation du peptide. L'isoleucine semble avoir un rôle plus secondaire (Figure 8).

Enfin, nous avons observé que ce peptide est également capable d'inhiber de manière dose-dépendante la phosphorylation d'un substrat CK2 $\beta$ -dépendant « positif » (Figure 9).

#### IC<sub>50</sub> pour une interaction protéine-protéine :

L'IC<sub>50</sub> pour un inhibiteur d'interaction protéine-protéine est définie comme la concentration nécessaire pour inhiber 50% de la formation du complexe.

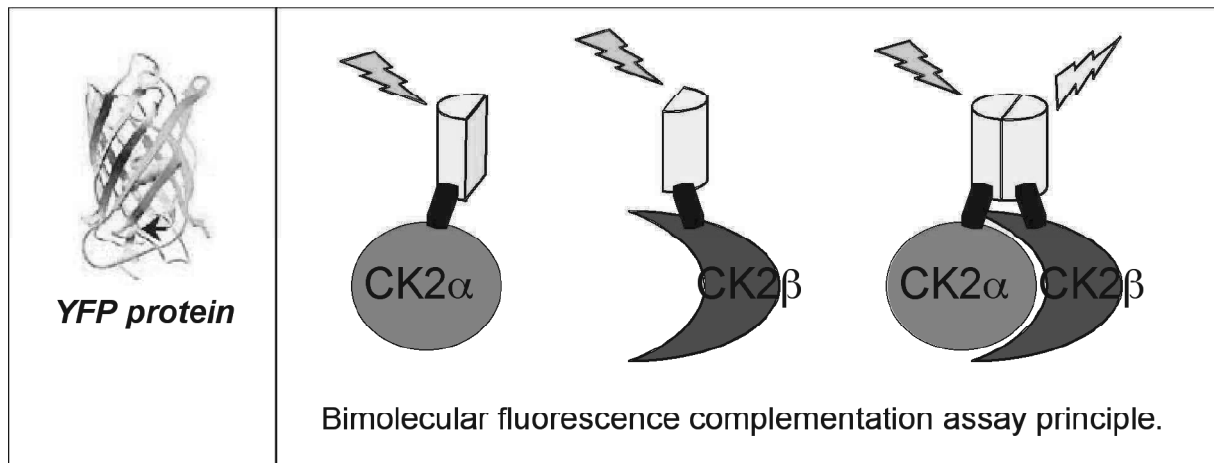
## **IV- Résultats annexes**

Nous exposerons ici le développement de diverses stratégies et techniques qui ont été indispensables pour la conception rationnelle et la validation de molécules inhibitrices de CK2. Dans un premier temps, le principe et la mise au point du test BiFc seront détaillés. Puis nous reviendrons sur des résultats complémentaires ayant trait à l'identification et à la validation des hot spots de l'interaction et aux peptides cycliques inhibiteurs.

## 1- Le test de complémentation de fluorescence bimoléculaire

### a- Principe du BiFc

La complémentation bimoléculaire de fluorescence repose sur la reconstitution de la protéine YFP, dont la partie 1-154 a été fusionnée à la première protéine interagente et dont la partie 155-238 a été fusionnée à la seconde protéine partenaire. S'il y a interaction entre les deux protéines, l'YFP se reforme et la fluorescence est visible. S'il n'y a pas d'interaction, les deux fragments d'YFP n'émettent aucune fluorescence (suppl Figure 1, figure 40), (Kerppolla, 2006 ; Kerppolla, 2006 ; Schmidt, 2006 ; Hu, 2003 ; Shyu, 2006 ; Grinberg, 2004).



**Figure 40 : Principe du BiFc.** La protéine fluorescente YFP est constituée de 11 feuillets assemblés en tonneau autour d'une hélice  $\alpha$  centrale. Les travaux de Hu et Kerppola (2004) ont montré qu'il était possible de préparer deux fragments complémentaires de YFP, et de les fusionner à des protéines d'intérêt, afin de visualiser leur interaction dans la cellule.

### b- Mise au point de la stratégie BiFc

- Contrôle de la taille des constructions YFP en Western blot

Les constructions YFP fusionnées à CK2 $\alpha$  ou CK2 $\beta$  ont été vérifiées pour leur taille en Western blot à partir de lysats de cellules HeLa transfectées avec les différents plasmides (figure 41).

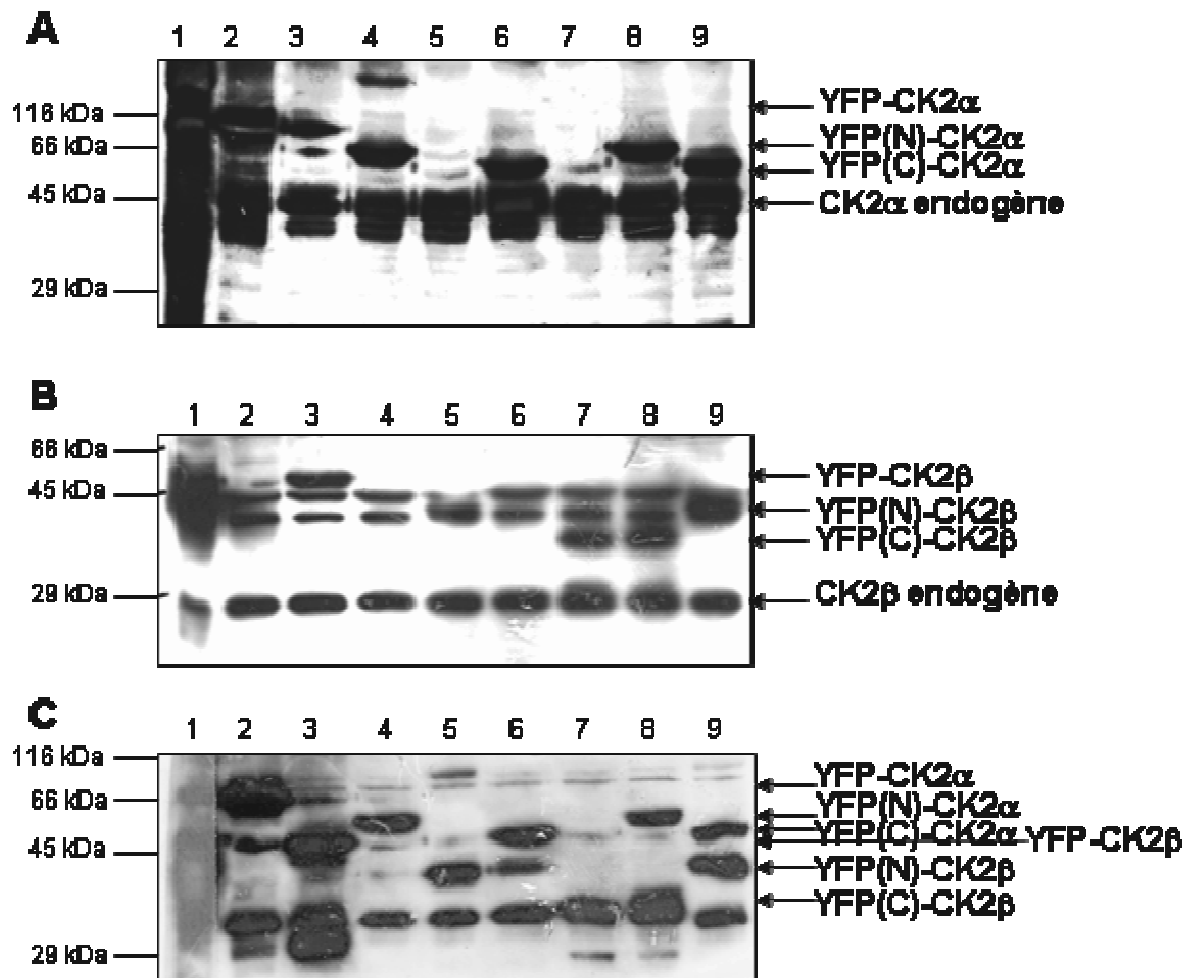


Figure 41 : Analyse en Western blot des constructions YFP après transfection en cellules HeLa. A : Anti-CK2 $\alpha$  ( $\alpha$ -coc). B : Anti-CK2 $\beta$  ( $\beta$ -C). C : Anti-GFP polyclonal (Abcam). Ligne 1 : marqueur de poids moléculaire ; 2 : pEYFP-CK2 $\alpha$  ; 3 : pEYFP-CK2 $\beta$  ; 4 : pEYFP(N)-CK2 $\alpha$  ; 5 : pEYFP(N)-CK2 $\beta$  ; 6 : pEYFP(C)-CK2 $\alpha$  ; 7 : pEYFP(C)-CK2 $\beta$  ; 8 : pEYFP(N)-CK2 $\alpha$  + pEYFP(C)-CK2 $\beta$  ; 9 : pEYFP(C)-CK2 $\alpha$  + pEYFP(N)-CK2 $\beta$ .

Poids moléculaires attendus :

YFP-CK2 $\alpha$  = 27 + 42 = 69 kDa.

YFP-CK2 $\beta$  = 27 + 29 = 56 kDa.

YFP(N)-CK2 $\alpha$  = 17,5 + 42 = 59,5 kDa.

YFP(N)-CK2 $\beta$  = 50 = 17,5 + 29 = 46,5 kDa.

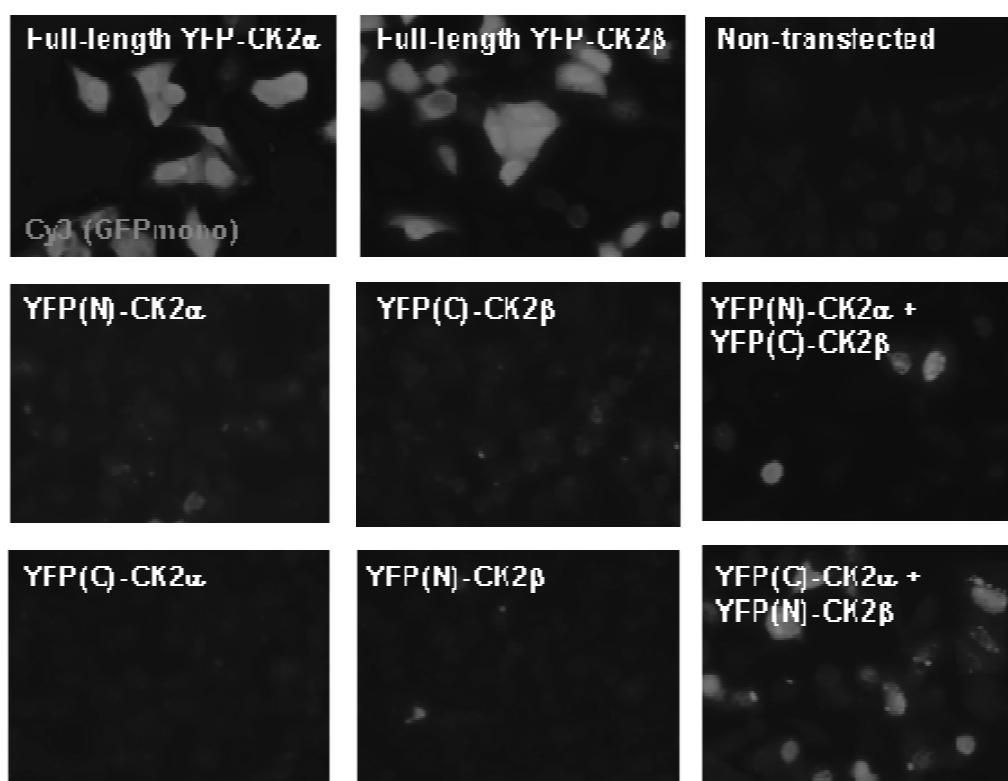
YFP(C)-CK2 $\alpha$  = 50 = 9,5 + 42 = 51,5 kDa.

YFP(C)-CK2 $\beta$  = 40 = 9,5 + 29 = 38,5 kDa.

Toutes les constructions protéiques présentent bien les tailles attendues.

- Permutation fonctionnelle des constructions YFP

Les constructions ont été réalisées dans les deux sens : YFP(N) et YFP(C) ont été fusionnées à CK2 $\alpha$  et CK2 $\beta$ . La complémententation de fluorescence fonctionne aussi bien pour une cotransfection YFP(N)-CK2 $\alpha$  + YFP(C)-CK2 $\beta$  que YFP(C)-CK2 $\alpha$  + YFP(N)-CK2 $\beta$  (figure 42).



**Figure 42 :** Transfection transitoire de YFP-CK2 $\alpha$  ou YFP-CK2 $\beta$  sur des HeLa. On peut noter que l'intensité de fluorescence de la protéine YFP entière est largement supérieure à celle de l'YFP complémentée.

**c- Limites du test**

- L'étape de maturation achève la reconstitution de YFP de manière irréversible

Des tests ont été réalisés afin d'optimiser la durée de maturation à 30°C. Effectivement, selon (Tsien, 1998), cette étape de maturation varie de 0 à 24h. S'il y a une différence significative entre 0 et 1h de maturation, nous avons observé que le signal n'était pas particulièrement amélioré que ce soit à 1, 2, 4, 6, 20 ou 24h de maturation. Nous avons donc fixé cette étape à 2h.



En effet, c'est lors de cette étape qu'a lieu l'une des dernières réactions de formation du chromophore (figure 43) et qui est irréversible.

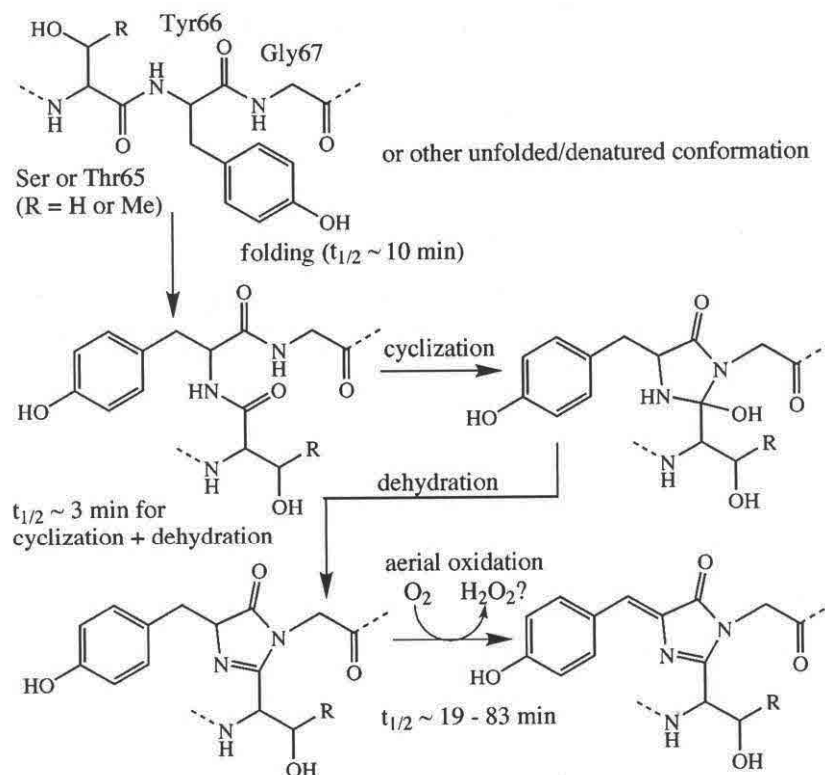
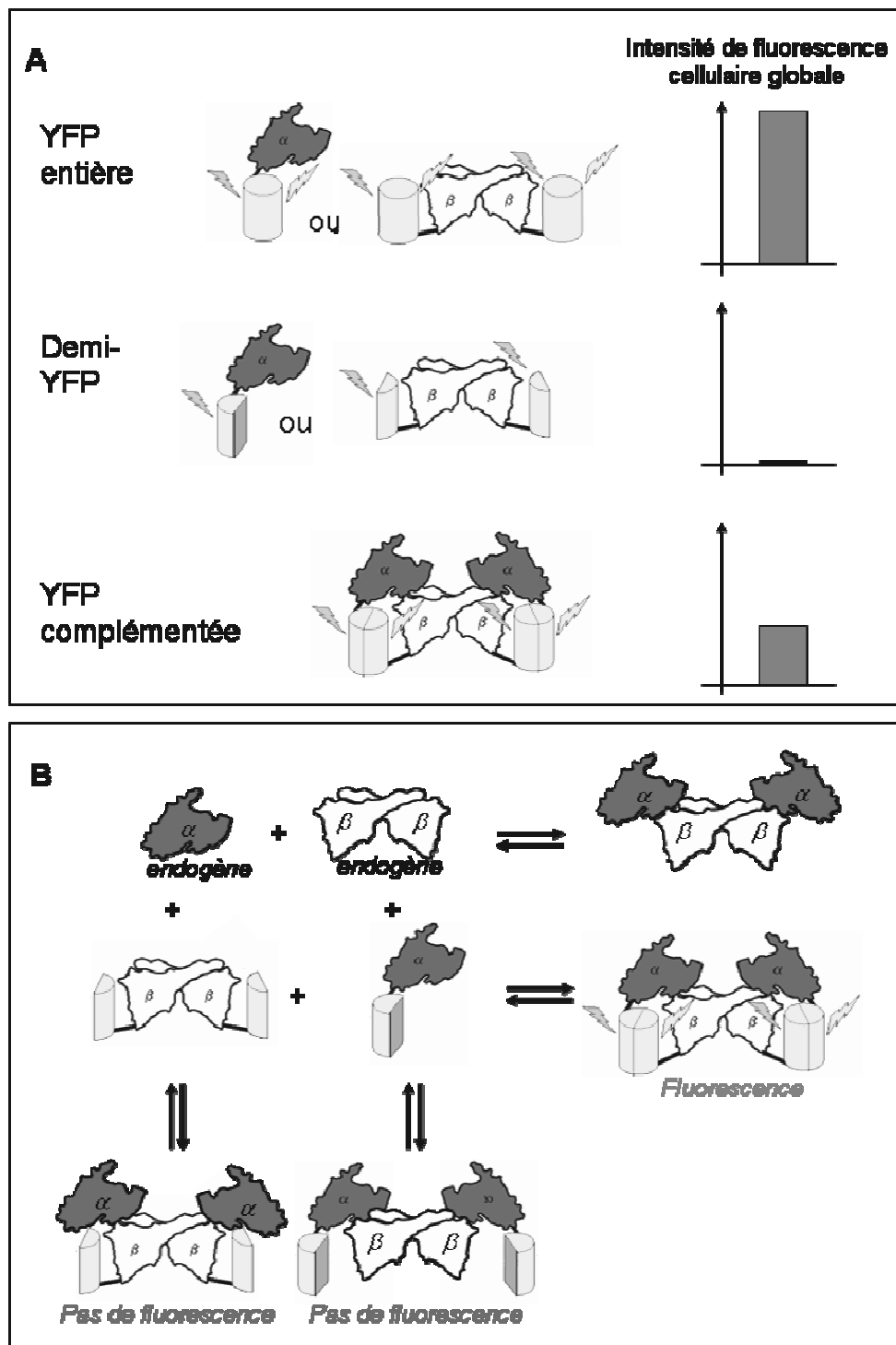


Figure 43 : Mécanisme proposé pour la biosynthèse intramoléculaire du chromophore GFP. L'étape d'oxidation est irréversible (Tsien, 1998).

- Une immunofluorescence indirecte permet d'amplifier le signal de BiFc

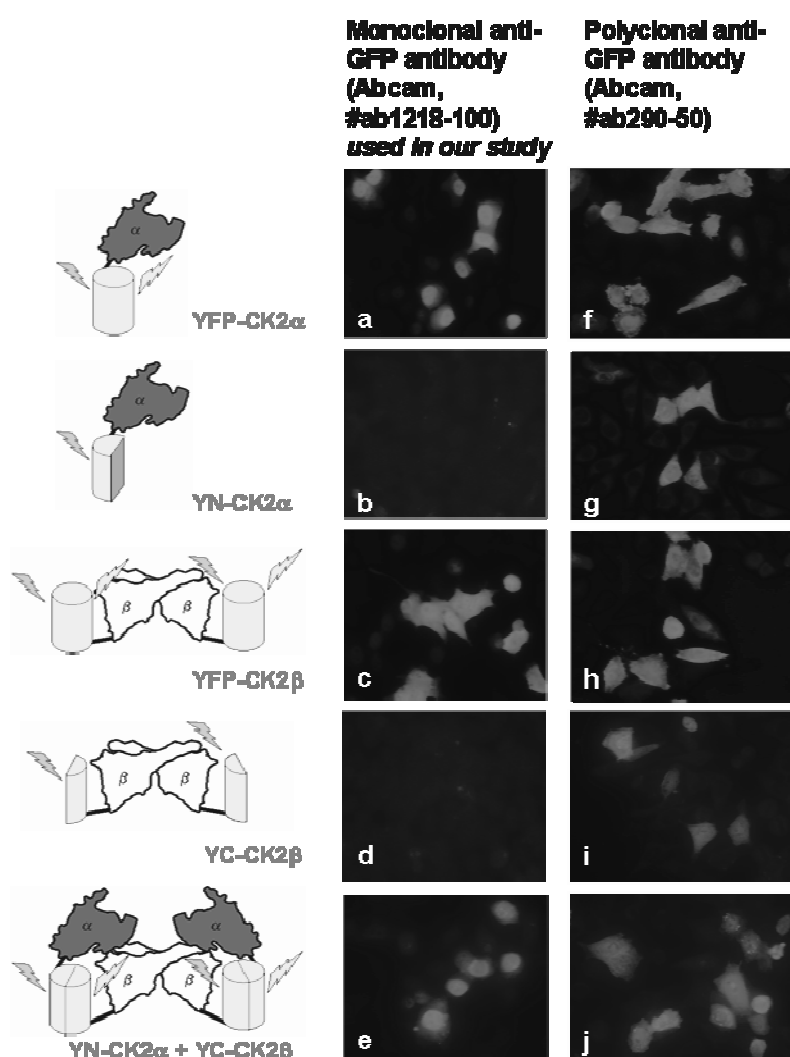
En théorie, la complémentation de la fluorescence de l'YFP devrait être suffisante pour évaluer l'interaction entre deux protéines. Cependant, comme le précise Kerppola (2006), les constructions YFP-CK2 peuvent interagir avec les sous-unités de la protéine CK2 endogène, ce qui atténue la fluorescence globale de la cellule (figure 44).



**Figure 44** : Représentation schématique expliquant pourquoi l'intensité de fluorescence obtenue en BiFc est plus faible que la fluorescence brute de l'YFP (A) : les demi-YFP fusionnées à CK2 $\alpha$  ou CK2 $\beta$  et transfectées dans la cellule peuvent s'engager avec la CK2 $\beta$  et la CK2 $\alpha$  endogènes respectivement et sont donc « piégées » (B). Ajouté au rendement de transfection qui n'est jamais de 100%, cela explique que le signal de fluorescence complémenté soit plus faible et justifie la mise en œuvre d'une détection de YFP par immunodétection.

○ Choix de l'anticorps anti-GFP pour l'immunofluorescence

Pour amplifier le signal de l'YFP reconstituée, on peut utiliser les anticorps dirigés contre la GFP, qui ne diffère que de 2 ou 3 résidus avec YFP. Un anticorps polyclonal reconnaissant toutes les formes d'YFP (entière, YFP(N), YFP(C), YFP complémentée) ne permet pas de discriminer les différentes formes d'YFP. Parmi les anticorps monoclonaux testés, les anticorps monoclonaux Abcam ne reconnaissent que l'YFP entière ou complémentée (figure 45) et pas les formes YFP(N) ou YFP(C). Cette propriété remarquable (non connue du fabricant) a été mise à profit pour amplifier spécifiquement les conditions où YFP est complémentée.



**Figure 45 : L'anticorps anti-GFP polyclonal (Abcam, #ab290-50) reconnaît toutes les formes d'YFP :** YFP entière (panels f, h), demi-YFP, N ou C-terminale (panels g, i), ou YFP reconstituée (panel j). A l'inverse, l'anticorps monoclonal anti-GFP (Abcam, #ab1218-100) utilisé dans notre étude peut discriminer les deux formes : il ne reconnaît que l'YFP entière (panels a, c) ou reconstituée (panel e) YFP mais pas la demi-protéine (panels b, d). Nous avons profité de cette propriété originale dans nos expériences pour augmenter le signal BiFc et améliorer ainsi la détection et la spécificité.

D'autres anticorps ont également été testés : l'anticorps monoclonal anti-GFP Euromedex ne reconnaît que la partie N-ter de YFP mais pas la partie C-ter en Western blot (résultats non montrés).

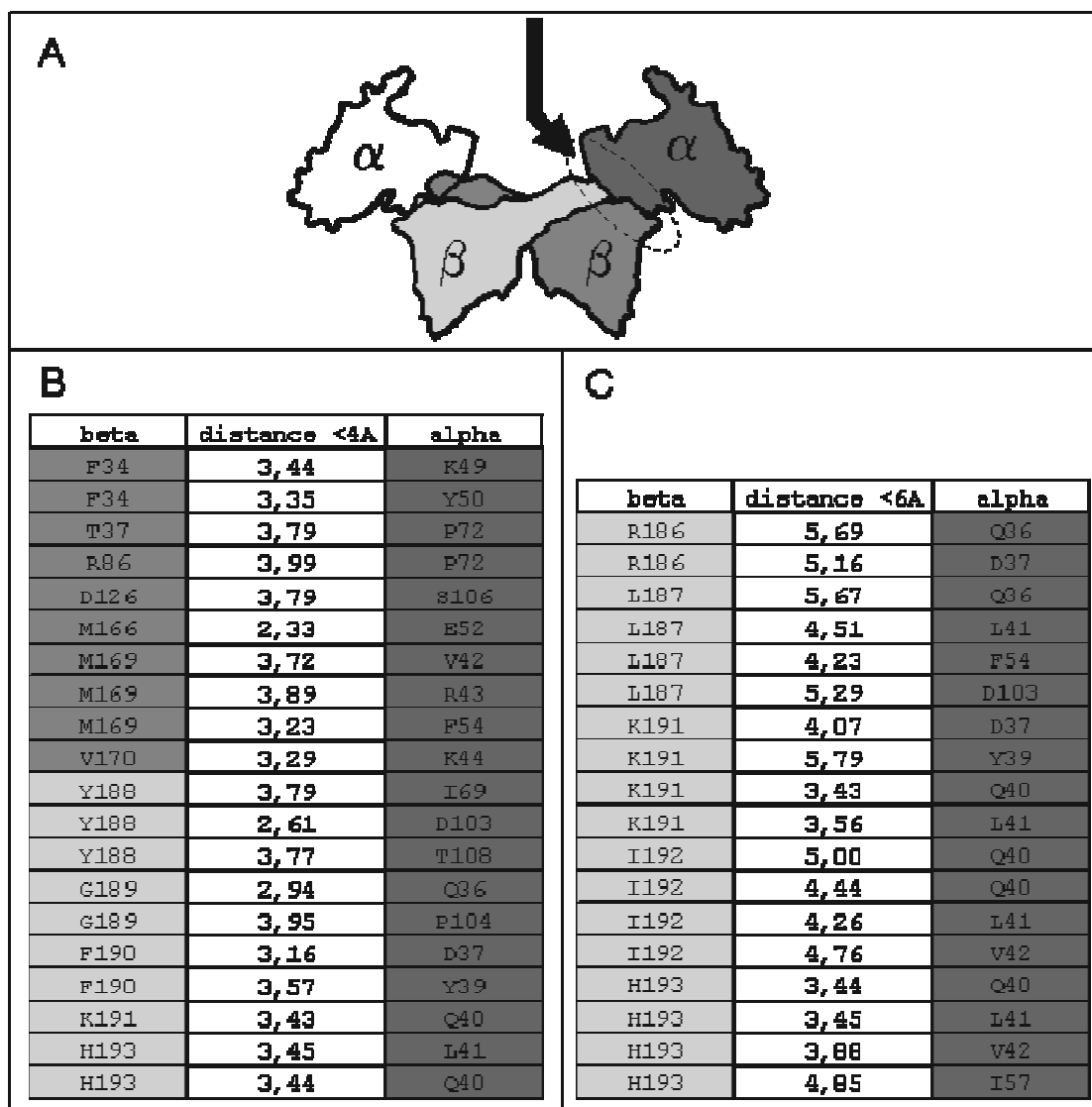
## **2- Résultats annexes relatifs à la validation des hot spots de l'interaction CK2 $\alpha$ -CK2 $\beta$**

Plusieurs arguments supplémentaires ont étayé nos hypothèses pour définir les hot spots précédemment cités : un calcul des distances entre les atomes des deux sous-unités, des alignements de séquences mettant en exergue les résidus conservés au cours de l'évolution, une prédiction virtuelle des hot spots,...

### **a- Calcul des distances entre atomes de CK2 $\alpha$ et CK2 $\beta$**

Afin d'évaluer les hot spots potentiels et de guider le choix des résidus à muter, la distance entre atomes des sous-unités CK2 $\alpha$  et CK2 $\beta$  a été calculée à partir de la structure cristallographique du tétramère 1JWH.pdb (Niefind, 2001) à l'aide du logiciel MOLMOL (figures 46, 47 et 48). On peut souligner qu'au niveau de l'interface CK2 $\alpha$ -CK2 $\beta$ , les deux dimères de CK2 $\beta$  interagissent avec CK2 $\alpha$ . La boucle considérée pour le design du peptide cyclique correspond à la partie C-terminale de CK2 $\beta$  (ici, pour l'interface considérée, CK2 $\beta$  verte). Côté CK2 $\beta$  verte, on retrouve les mêmes résidus impliquées : Y188, G189, F190, K191, H192 et dans une moindre mesure R186, L187, I192. Au niveau de l'autre sous-unité CK2 $\beta$  (rouge), les résidus F34, T37, R86, D126, M166, M169 et V170 ressortent comme étant les plus proches de CK2 $\alpha$ . On note la présence majoritaire des résidus hydrophobes mais aussi de quelques résidus polaires et/ou chargés.

Côté CK2 $\alpha$ , les résidus faisant face au dimère CK2 $\beta$  sont principalement des résidus hydrophobes (F54, I57, I69, L41, P104, P72, V42, Y39, Y50) avec quelques résidus polaires chargés ou non (D103, D37, E52 acides, K44, K49, R43 basiques, ainsi que Q36, Q40 non chargés).



**Figure 46 :** Calcul des distances entre atomes. Ici, pour des raisons de clarté, ne sont pas énumérés les atomes identifiés (O, C $\alpha$ , C $\beta$ , N...) mais les résidus dont un atome au moins se trouve à la distance énoncée (en Å) d'un atome au moins d'un résidu de l'autre sous-unité. A : interaction CK2 $\alpha$ -CK2 $\beta$  considérée, à partir de la structure cristallographique du tétramère 1JWH. B : Résidus de CK2 $\beta$  et CK2 $\alpha$  dont 2 atomes au moins se trouvent à une distance inférieure à 4 Å l'un de l'autre. C : Même chose en considérant une distance maximale de 6 Å.

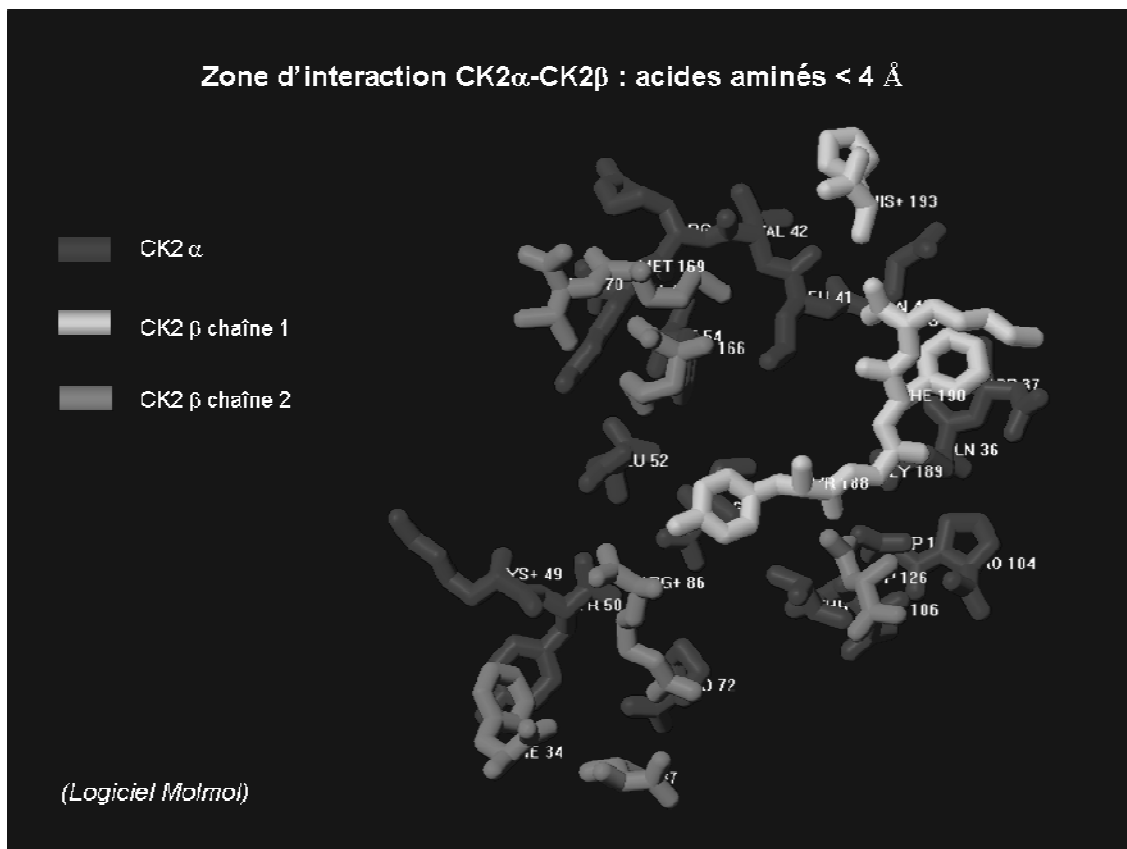
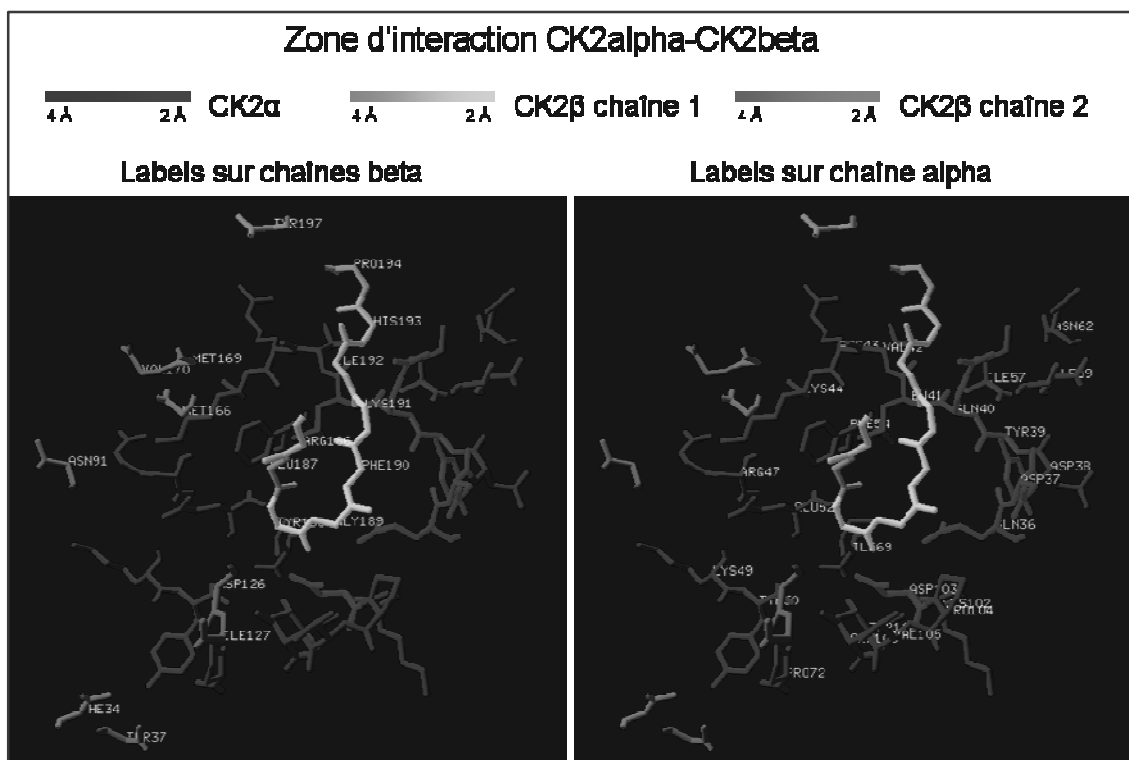
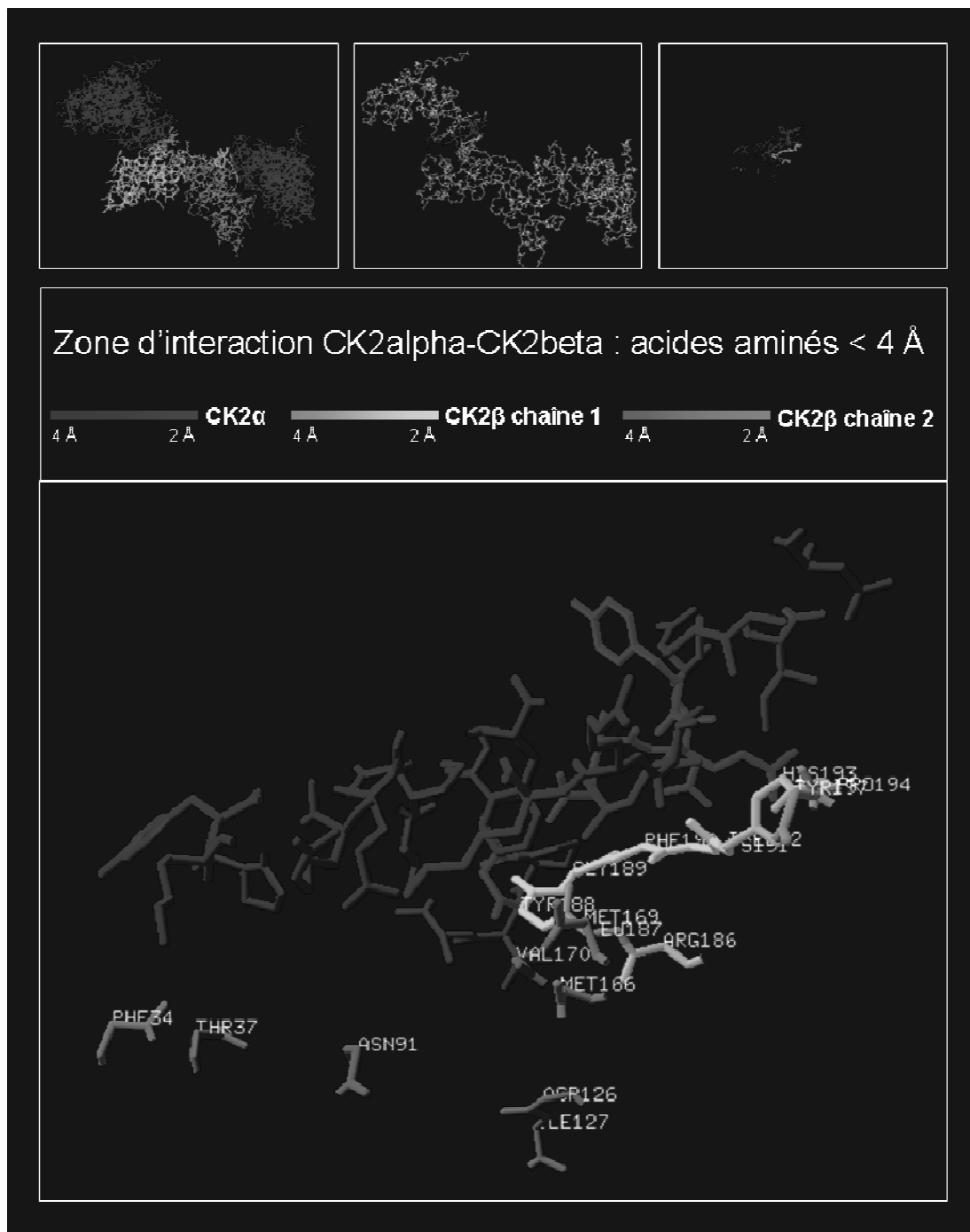


Figure 47 : Visualisation des hot spots potentiels de CK2 $\alpha$  et CK2 $\beta$  à l'aide de Molmol.





**Figure 48 :** Visualisation des hot spots potentiels de CK2α et CK2β à l'aide de SwiwwPdbViewer, situés à moins de 4 Å de la sous-unité opposée en réalisant un dégradé de couleurs : plus le résidu est clair, plus il est proche de la sous-unité opposée.

#### **b- Alignements de séquences entre CK2β animales et végétales**

La CK2β est une protéine particulièrement bien conservée au cours de l'évolution entre les espèces. Chez les végétaux, CK2β interagit très faiblement avec CK2α (Pechkova, 2003), contrairement à la CK2β des animaux. Les résidus les plus conservés étant souvent ceux qui

sont critiques pour l'interaction, un alignement de séquences peut aider à proposer des positions à muter (figure 49).

**Zones d'interaction avec CK2- $\alpha$  :**

|                   |                                                             | <b>166</b>           | <b>185-188</b>                      |
|-------------------|-------------------------------------------------------------|----------------------|-------------------------------------|
| <b>Animaux :</b>  |                                                             |                      |                                     |
|                   | <b><math>\alpha</math> et <math>\beta</math> associées</b>  |                      |                                     |
|                   | Human                                                       | MLFMVHPEYRPKRPNQFV   | PRIYGFKIHPMAYQLQLQAASNFKSPVKTIR---- |
|                   | Xenopus                                                     | MLFMVHPEYRPKRPNQFV   | PRIYGFKIHPMAYQLQLQAASNFKSPVKTMR---- |
|                   | Carpe                                                       | MLFMVHPEYRPKRPNQFV   | PRIYGFKIHPMAYQLQLQAASSFKSPVKAIR---- |
|                   | Daniorerio                                                  | MLFMVHPEYRPKRPNQFV   | PRIYGFKIHPMAYQLQLQAASSFKSPVKAIR---- |
|                   | Takifugu                                                    | MLFMVHPEYRSKRPNQFV   | PRIYGFKIHPMAYQLQLQAASSIKSPVKSIR---- |
|                   | Ciona                                                       | MLFMVHPEYRPKRPTNQFV  | SRIYGFKIHPMAYQLQLQAASQKLKNSKLRH---- |
|                   | Drosophila                                                  | MLFMVHPEYRPKRPTNQFV  | PRIYGFKIHS LAYQIQQAANFKMP LRAKN---- |
|                   | Spodoptera                                                  | MLFMVHPEYRPKRPNQFV   | PRIYGFKIHP LAYQIQQAANFKMP LRSLS---- |
|                   | Celegans                                                    | MLFFVHPDLRPRRPVTQFV  | PRIYGFKIHPVAYGGQEGNSGGNTANNVAAA---- |
| <b>Végétaux :</b> |                                                             |                      |                                     |
|                   | <b><math>\alpha</math> et <math>\beta</math> dissociées</b> |                      |                                     |
|                   | Arabidop 1                                                  | LFLMTYGNLKPQKPTQSYVP | KIFGFKVHKP-----                     |
|                   | Arabidop 2                                                  | LFLMAYGNMKPQKPAQNYVP | KIFGFKVHNKQ-----                    |
|                   | Arabidop 3                                                  | LFLMTYGHLPQKASQSYTQ  | RVEGFKLHKP-----                     |
|                   | Arabidop 4                                                  | LFLMTYGHLPQKATQNYVP  | RVEGFKLHKP-----                     |
|                   | Nicotiana                                                   | LFLMTYGHLPQKSTQNYVP  | PRVFGFKLHKT-----                    |
|                   | Maize 1                                                     | LFLMTYEHLPQKLSQRYVP  | PRVFGFKLHKP-----                    |
|                   | Maize 2                                                     | LFLMTYPHLPQKPSQYVP   | PRVFGFKLHKPS-----                   |
|                   | Maize 3                                                     | LFLMTYPHLPQKPLQYVP   | PRVFGFKIRKP-----                    |

Figure 49 : Alignement de séquences de CK2 $\beta$  animales et végétales. La **Met166** est une Leucine chez les végétaux. La **Leu187** et la **Tyr188** sont des Valines et Phénylalanines respectivement. L'Ile192 est remplacée par des leucines, ce qui reste similaire. Un **Glu** est ajouté avant la dernière proline chez les végétaux, ce qui peut modifier l'incurvation de la boucle CK2 $\beta$ -185-194. Or les expériences réalisées avec différents peptides « head-to-tail » (PcL1, PcL2, PcL3) suggèrent que le degré de courbure du peptide peut influencer du simple au double sur l'efficacité du peptide.

### c- Prédiction des hot spots par mutagenèse virtuelle

La structure cristallographique du complexe CK2 a été entrée dans un logiciel de prédiction des hot spots des interactions protéine-protéine par Ala-scanning virtuel, Robetta, (Kortemme, 2002, Kortemme, 2004), figure 50. Ce logiciel estime la contribution de l'énergie libre de liaison de chaque résidu d'une interface protéine-protéine. Après chaque mutation virtuelle, l'énergie de liaison résultante est calculée à nouveau. Pour l'interaction p53-MDM2 par exemple, le logiciel retrouve bien les 3 positions critiques F19, W23, L26 avec un  $\Delta\Delta G > 2$ . Pour l'interaction CK2 $\alpha$ -CK2 $\beta$ , la F190 ressort majoritairement ( $\Delta\Delta G = 2,30$ ). Les résidus Y188, H193 et M169 sont également ceux dont la mutation en Ala déstabiliserait le complexe, selon ce logiciel. Sont également mentionnés R186, L187, K191, I192, F34, M166 et V170 dans une moindre mesure.



| Acides aminés de CK2b-1 (verte) interagissant avec CK2a | $\Delta\Delta G$ | Acides aminés de CK2a interagissant avec CK2b-1 (verte) | $\Delta\Delta G$ |
|---------------------------------------------------------|------------------|---------------------------------------------------------|------------------|
| R186                                                    | 0.13             | Q36                                                     | 0.92             |
| L187                                                    | 0.42             | D37                                                     | 0.52             |
| <b>Y188</b>                                             | <b>0.86</b>      | Q40                                                     | 0.83             |
| <b>F190</b>                                             | <b>2.30</b>      | <b>L41</b>                                              | <b>1.15</b>      |
| K191                                                    | 0.14             | V42                                                     | 0.74             |
| I192                                                    | 0.59             | R43                                                     | -0.04            |
| H193                                                    | 0.94             | F54                                                     | 0.34             |
|                                                         |                  | I57                                                     | 0.55             |
|                                                         |                  | I59                                                     | 0.52             |
|                                                         |                  | D103                                                    | -0.55            |
|                                                         |                  | V105                                                    | 0.00             |
| Acides aminés de CK2b-2 (rouge) interagissant avec CK2a | $\Delta\Delta G$ | Acides aminés de CK2a interagissant avec CK2b-2 (rouge) | $\Delta\Delta G$ |
| F34                                                     | 0.91             | L41                                                     | 0.24             |
| M166                                                    | 0.21             | K44                                                     | 0.18             |
| <b>M169</b>                                             | <b>1.34</b>      | R47                                                     | 0.05             |
| V170                                                    | 0.07             | Y50                                                     | 0.54             |
|                                                         |                  | E52                                                     | -0.15            |
|                                                         |                  | F54                                                     | 0.73             |
|                                                         |                  | V105                                                    | 0.18             |

Figure 50 : Prédiction virtuelle des hot spots selon le logiciel Robetta avec la structure 1JWH.pdb. Valeur négative du  $\Delta\Delta G$  : La mutation en Ala stabilise le complexe CK2 $\alpha$ -CK2 $\beta$ . Valeur positive du  $\Delta\Delta G$  : La mutation en Ala déstabilise le complexe CK2 $\alpha$ -CK2 $\beta$ . Plus la valeur s'écarte de 0, plus le complexe est déstabilisé.

### 3- Résultats annexes relatifs à l'étude des peptides cycliques inhibiteurs

#### a- Effets du peptide cyclique sur la spécificité de substrat

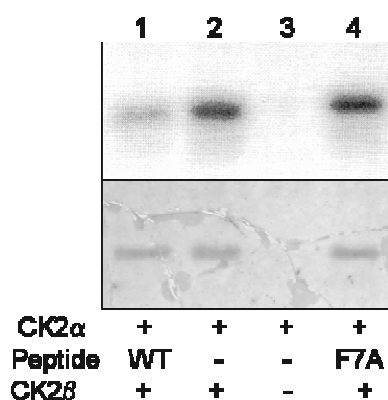
Dans la publication, le peptide cyclique est testé vis-à-vis d'un substrat protéique CK2 $\beta$ -dépendant « positif » (dont la phosphorylation requiert la présence de CK2 $\beta$ ). Ici, nous montrons de même que l'autophosphorylation de CK2 $\beta$  est inhibée d'une part, et d'autre part que la phosphorylation d'un substrat CK2 $\beta$ -indépendant n'est pas modifiée.

##### ○ Autophosphorylation de CK2 $\beta$ en présence du peptide cyclique

##### • Test sur des protéines recombinantes

Afin d'évaluer l'efficacité du peptide cyclique d'un point de vue fonctionnel, celui-ci est testé vis-à-vis de sa capacité à inhiber l'autophosphorylation de CK2 $\beta$ . En effet, la **transphosphorylation** de la sous-unité CK2 $\beta$  recombinante est CK2 $\beta$ -dépendante « positive ». Un composé inhibant l'interaction entre CK2 $\alpha$  et CK2 $\beta$  doit logiquement inhiber

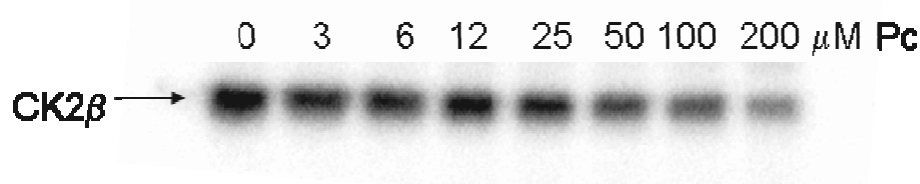
cette phosphorylation. Le peptide Pc (30 $\mu$ M soit 10 fois l'IC<sub>50</sub> *in vitro*) atténue fortement cette phosphorylation alors que son mutant inactif F7A n'a aucun effet (figure 51).



**Figure 51 : Autophosphorylation de CK2 $\beta$  en présence du peptide Pc et de son mutant F7A.** 2 : témoin positif ; 3 : témoin négatif ; 1 : test Pc ; 4 : test peptide mutant F7A. 144 ng de CK2 $\alpha$  et 380 ng de CK2 $\beta$  clivée de sa MBP sont incubés dans 30  $\mu$ L de 0, 1M Tris, pH 7,5, 0,5 M NaCl, en présence de 30  $\mu$ M des peptides Pc ou F7A. La réaction d'autophosphorylation a lieu pendant 4min. Partie supérieure : autoradiographie, partie inférieure : coloration Coomassie.

- Test sur des protéines natives

En vue d'évaluer l'efficacité du peptide cyclique sur de la CK2 non recombinante, Pc a été testé avec de la CK2 $\alpha$ 2 $\beta$ 2 extraite de poumon de bœuf et purifiée en 1990 (J.J. Feige, C. Cochet). Ici aussi, on observe bien une diminution de l'autophosphorylation de CK2 $\beta$  de manière dose-dépendante avec le peptide cyclique (figure 52). Ceci renforce la validité des tests précédents, la CK2 recombinante et native ayant une structure analogue au niveau de la zone d'interaction CK2 $\alpha$ -CK2 $\beta$ .



**Figure 52 : Autophosphorylation de CK2 $\beta$  native en présence d'une quantité croissante de Pc.** 135 ng de CK2 $\alpha$ 2 $\beta$ 2 ont été préincubés 30 min à 22°C avec une quantité croissante de Pc. La réaction de phosphorylation a lieu pendant 5 min à 22°C, puis le mélange est déposé en gel SDS-PAGE et autoradiographié.

- Phosphorylation d'un substrat CK2 $\beta$ -indépendant

Le peptide cyclique Pc est supposé mimer la partie C-terminale de CK2 $\beta$  afin d'inhiber l'interaction CK2 $\alpha$ -CK2 $\beta$ . D'un point de vue fonctionnel, inhiber cette interaction revient à

inhiber la phosphorylation de substrats CK2 $\beta$ -dépendants sans perturber la phosphorylation de substrats CK2 $\beta$ -indépendants.

Afin de contrôler que l'activité de CK2 $\alpha$  n'est pas inhibée en bloc et demeure intacte vis-à-vis d'un substrat CK2 $\beta$ -indépendant, un dosage kinase a été réalisé à l'aide du peptide substrat RRREDEESDDEE classiquement utilisé. Ce peptide est phosphorylé de la même manière par CK2 $\alpha$  seule ou par CK2 $\alpha_2\beta_2$  (figure 53). En présence du peptide cyclique Pc (100  $\mu$ M), le niveau de phosphorylation du peptide substrat est identique au témoin sans Pc (figure 53). De même, le peptide cyclique mutant F7A, totalement inefficace pour inhiber l'interaction CK2 $\alpha$ -CK2 $\beta$ , n'intervient pas sur l'activité de CK2 $\alpha$  vis-à-vis de la phosphorylation de ce substrat CK2 $\beta$ -indépendant (figure 53).

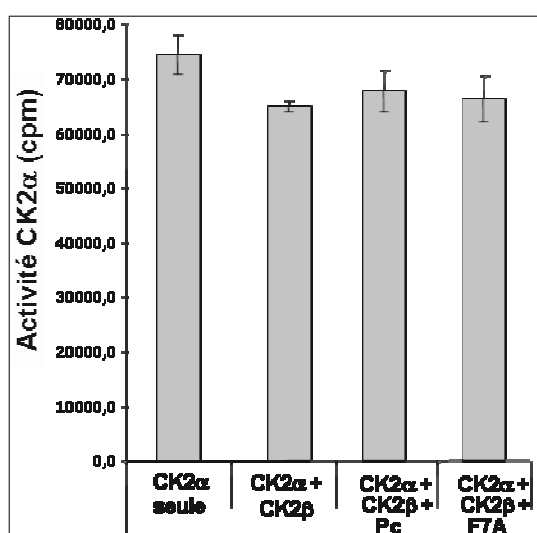


Figure 53 : Dosage d'activité CK2 $\alpha$  vis-à-vis du peptide substrat (CK2 $\beta$ -indépendant) en présence du peptide cyclique Pc et de son mutant F7A (100  $\mu$ M).

## b- Effets du peptide cyclique sur des cellules en culture

### ○ Ajout du peptide Pc sur des cellules en culture

Dans le but d'explorer l'efficacité du peptide cyclique dans les cellules, et d'évaluer les conséquences d'une rupture de l'association entre CK2 $\alpha$  et CK2 $\beta$ , nous avons voulu tester dans un premier temps si le peptide entraînait dans les cellules spontanément. Pour cela, des cellules MCF7, MCF10A et HeLa ont été incubées avec 200  $\mu$ M de peptide Pc et de ses mutants. Après 48h, aucun effet significatif sur la viabilité des cellules n'est observé (figure 54).

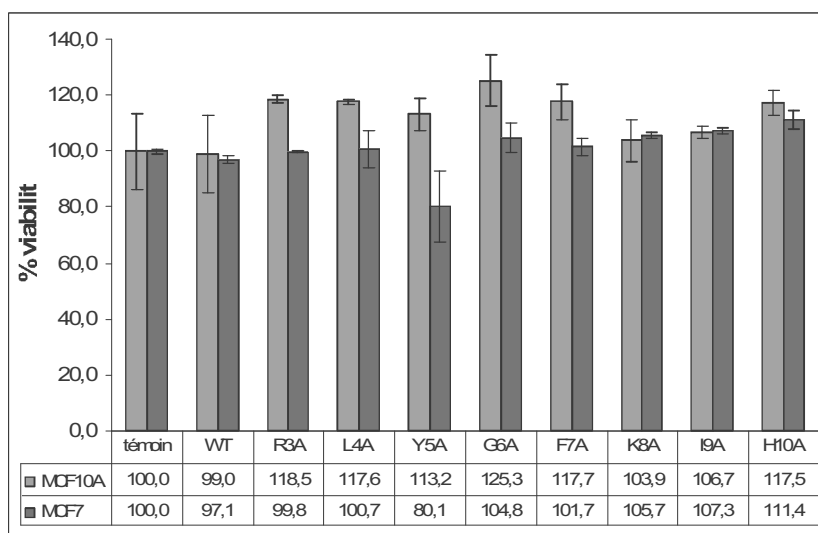


Figure 54 : **Test de viabilité cellulaire** (Cell-Titer-Glo) des MCF10A et MCF7 avec 200 µM de peptide cyclique Pc ou ses mutants, 48h.

○ Micro-injection du peptide Pc dans des cellules MCF10A

N'entrant manifestement pas dans les cellules de manière spontanée, comme c'est le cas de nombreux peptides, le peptide cyclique Pc ou son mutant F7A ont été microinjectés dans des cellules MCF10A. Après 1, 24 ou 48h, aucun phénotype n'a été observé du point de vue morphologique (immunofluorescence indirecte actine), concernant la localisation de CK2 $\alpha$  et CK2 $\beta$  ou l'activation des caspases.

Plusieurs hypothèses ont été formulées : le pont disulfure de Pc est peut-être réduit dans la cellule rapidement, entraînant la linéarisation du peptide et le rendant inefficace ; le peptide peut aussi être clivé par des protéases, protéolyse facilitée par les glycines aux extrémités favorisant l'amarrage des enzymes. Ces suppositions ont guidé la synthèse de peptides cyclisés de type « head-to-tail », plus résistants aux protéases et irréductibles quelles que soient les conditions redox. Il est prévu de microinjecter le peptide PcL3, dont l'IC<sub>50</sub> est très proche de celle du Pc (4µM vs 3µM) (Figure 7C de la publication).

Une autre hypothèse serait que, même si le peptide atteint sa cible, il n'inhibe pas l'interaction CK2 $\alpha$ -CK2 $\beta$  à 100% et le peu de CK2 $\beta$  réussissant à interagir avec CK2 $\alpha$  suffit à assurer les phosphorylations indispensables de la cellule.

Après avoir identifié les hot spots de l'interaction CK2 $\alpha$ -CK2 $\beta$ , le peptide cyclique Pc et le peptide head-to-tail PcL3 représentent les premiers et les meilleurs inhibiteurs de cette interaction décrits jusqu'à aujourd'hui. Cependant, il est difficile de les utiliser *in vivo*. Partant

de ces informations, nous avons alors consacré nos efforts à identifier des molécules chimiques jouant le même rôle.

Parallèlement, une approche de synthèse de peptides combinatoire de type split-and-mix est prévue afin de d'optimiser tout de même le peptide cyclique et d'améliorer son efficacité. Des essais de co-cristallisation CK2 $\alpha$ -Pc sont également en cours. Il est également prévu de tenter des microinjections du peptide PcL3, dont l'IC<sub>50</sub> est très proche de celle du Pc. Une autre piste d'étude est de fusionner la séquence du peptide Pc linéaire à celle d'une protéine « carrier » et de réaliser une transfection transitoire afin de les surexprimer dans la cellule et d'essayer d'inhiber l'interaction CK2 $\alpha$ -CK2 $\beta$  *in vivo*. Ces perspectives seront développées plus loin.

Le meilleur antagoniste actuel de l'interaction CK2 $\alpha$ -CK2 $\beta$  étant un peptide cyclique, il est cependant nécessaire d'évoluer d'un inhibiteur de nature *peptidique* à une molécule de nature *chimique*, qui présentera des caractéristiques plus proches de celles attendues aussi bien pour un outil de recherche que pour un candidat médicament : perméabilité cellulaire accrue, stabilité, spécificité, affinité, plus petite taille correspondant davantage aux critères de Lipinski assurant une meilleure « druggabilité »,... Les peptides cycliques identifiés, certes actifs, ne pénètrent pas dans les cellules. La recherche d'analogues non-peptidiques a alors été envisagée.

En se basant sur les informations accumulées concernant les points pharmacophoriques du peptide cyclique et des protéines mutantes, plusieurs approches bioinformatiques ont été testées. L'une d'elles s'est révélée féconde et un composé tête de liste a été isolé. Il a servi de point de départ à la synthèse d'analogues et au test d'autres composés disponibles. Un de ses dérivés s'est montré actif dans un test cellulaire détourné du BiFc. D'autres composés ont également exhibé des résultats encourageants *in vitro*. Enfin, des résultats encourageants pour d'autres composés actifs *in vitro* ont été également obtenus.

### **I- Recherche d'analogues chimiques par docking à haut débit**

#### **1- Principe du docking**

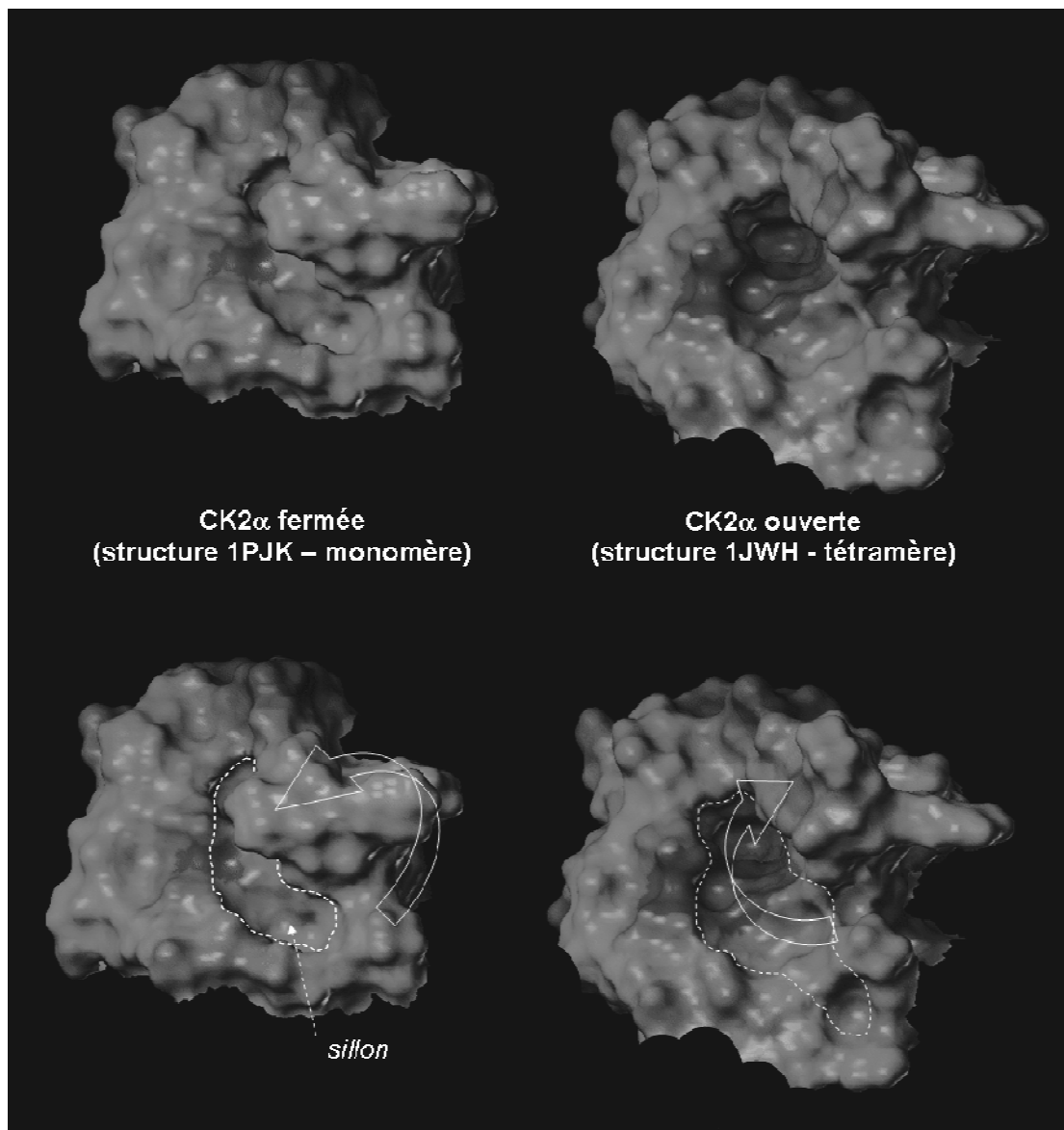
Le docking moléculaire a pour but de prédire si deux molécules biologiques interagissent ou non entre elles, et si oui, dans quelle orientation l'interaction est maximale et l'énergie du complexe est minimale. Il repose sur l'exploration systématique de l'espace des configurations pour générer et évaluer un grand nombre de liaisons potentielles (Kitchen, 2004, Cavasotto, 2004, Cavasotto, 2007). Il doit permettre d'identifier, dans une base de données de structures moléculaires, les composés capables d'interagir avec une structure donnée. Ici, l'approche de docking protéine-ligand a été choisie. La protéine (CK2 $\alpha$ ) est considérée comme le récepteur rigide et le ligand (issu d'une banque de petites molécules) est flexible. L'algorithme informatique est chargé de faire tourner la molécule autour de la protéine (une zone d'interaction peut être définie) et de déterminer si la molécule peut ou non interagir avec la protéine en attribuant un score d'affinité ligand-récepteur. Selon les programmes, il ne s'agit pas d'une simple interpénétration conformationnelle, car le logiciel peut tenir compte des champs de force moléculaires, de la solvation, de la présence ou non d'eau,... L'inclusion de ces paramètres se mesure en augmentation de temps de calcul consacré à chaque composé.

Cette méthode de criblage présente l'avantage de tester *in silico* un nombre considérable de molécules sans avoir recours à la mise en place d'un criblage réel. Les molécules affichant le meilleur score sont ensuite testées *in vitro*. Le taux d'enrichissement en hits d'une présélection par criblage virtuel est d'environ 40 fois par rapport à un criblage aléatoire.

Les points faibles de la méthode concernent le fait que l'algorithme ne peut pas prendre en compte à la fois la réelle flexibilité de la protéine récepteur et celle des molécules. Un nombre limité de possibilités doit être fixé. De même, tous les paramètres concernant les énergies de liaison et les champs de force ne peuvent pas être considérés. Il faut poser un compromis entre le temps de calcul, l'acuité du résultat et le nombre de composés à tester. L'efficacité et la sélectivité des fonctions de score sont aussi un autre facteur limitant.

## **2- Criblage par docking**

En collaboration avec Antoine Fortuné (Département de Pharmacologie Moléculaire, Meylan), un criblage par docking a été réalisé sur CK2 $\alpha$  issue du tétramère 1JWH.pdb (Niefind, 2001). Après avoir délimité la zone d'interaction avec CK2 $\beta$ , l'objectif était de trouver des petites molécules pouvant se loger dans le sillon de CK2 $\alpha$ , normalement occupé par CK2 $\beta$  (figure 55), sachant que CK2 $\beta$  ne comble pas à 100% cette cavité d'après la structure cristallographique. Trouver un ligand ayant plus d'affinité pour CK2 $\alpha$  que CK2 $\beta$  doit donc être possible.



**Figure 55 : Zone de CK2 $\alpha$  utilisée pour le docking.** Un changement conformationnel a lieu sur CK2 $\alpha$  lorsque celle-ci est liée ou non à CK2 $\beta$ . CK2 $\beta$  (boucle C-terminale) vient se loger dans un sillon de CK2 $\alpha$  en déplaçant un bras de CK2 $\alpha$ .

La chimiothèque utilisée est la Zinc (UCSF) comportant 3 millions de structures correspondant à des composés commerciaux et du NCI.

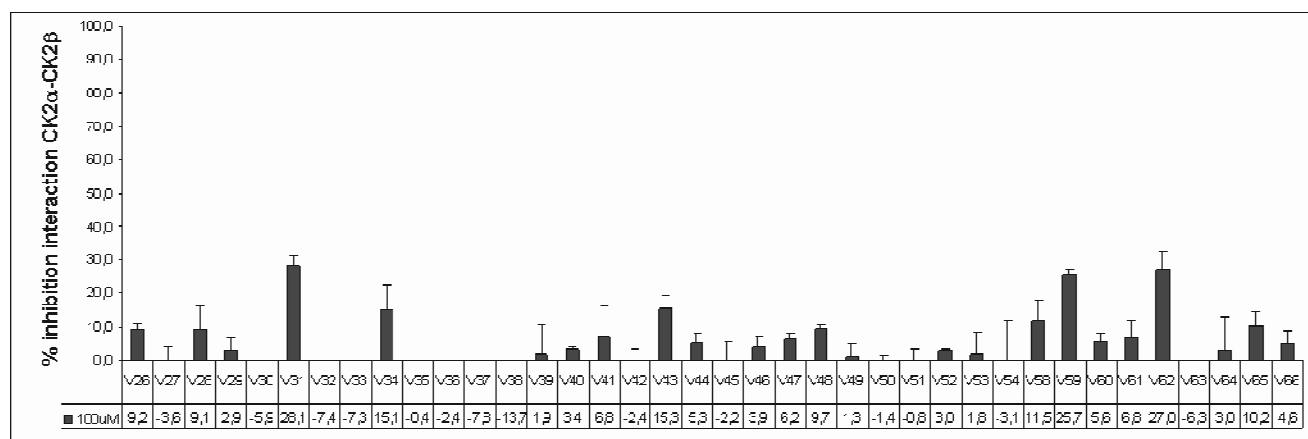
Une présélection est réalisée par criblage 3D basé sur la similarité morphologique avec le peptide cyclique et la boucle CK2 $\beta$ -186-192, sans tenir compte de la chimie (logiciel Surflex). Cette présélection est nécessaire pour limiter le nombre de composés à docker car le docking est très consommateur en temps de calcul. 800 000 structures sont sélectionnées pour être testées par docking.



Les logiciels utilisés sont Surflex (docking haut débit), Autodock (docking), XScore (fonction de score d'affinité ligand-récepteur), GRID (pour les champs d'interactions moléculaires, docking et QSAR 3D). Le docking cible la zone de contact de CK2 $\alpha$  avec CK2 $\beta$ . Il tient compte des points pharmacophoriques en plus de la forme (orientation, électrostaticité, donneurs et accepteurs de protons, hydrophobicité). Le criblage est réalisé sur une grappe de 28 PC en 12 à 15 jours de calcul. Une liste de 2000 molécules classées par potentiel d'intérêt est générée.

### 3- Résultats

40 molécules situées en tête de liste parmi les 2000 molécules sélectionnées ont pu être testées *in vitro* (figure 56) selon la disponibilité des stocks NCI.



**Figure 56 : Résultats des composés sélectionnés par docking et testés *in vitro* à 100  $\mu$ M en duplicat (test d'interaction CK2 $\alpha$ -CK2 $\beta$  radioactif).**

Malheureusement, aucune molécule sélectionnée ne montre une activité significative *in vitro*. Plusieurs hypothèses peuvent expliquer cela. En premier lieu, le docking moléculaire a pour but d'enrichir une chimiothèque en vrais positifs. 10% des vrais positifs se trouvent donc dans les 2000 molécules sélectionnées et il faut donc en tester au moins 200 pour avoir des chances de tomber sur des vrais positifs. Ici, seulement 40 composés ont pu être testés. D'autre part, au vu de la structure des composés (la plupart sont de très petites molécules), celles qui montrent un score élevé sont celles qui s'insèrent au mieux dans la poche de CK2 $\alpha$  ; or plus une molécule est petite et mieux elle se nichera dans la poche. Toutefois une interaction protéine-protéine étant souvent relativement étendue, une molécule trop petite ne réussira pas à perturber efficacement le complexe au point de le dissocier. Elle pourra également avoir tendance à être peu spécifique et à interagir avec d'autres domaines de la protéine. De même, une molécule très flexible se logera au mieux dans le sillon décrit sur

CK2 $\alpha$  et aura un très bon score d'affinité. Or les résultats relatifs au peptide cyclique ont montré l'importance de la rigidité du peptide (le peptide linéaire est 10 fois moins efficace que le peptide contraint). Les résidus F et Y aussi bien de CK2 $\beta$  que du peptide Pc sont maintenues opposées dans le même plan, contraints par la boucle ou la cyclisation, et cette caractéristique spatiale semble indispensable. Enfin, les limites du docking relatives à la flexibilité de la protéine, à la complexité de l'algorithme et au temps de calcul sont connues et, actuellement, peu de composés ont pu être identifiés et validés jusqu'à un stade clinique par cette stratégie émergente.

## **II- Recherche d'analogues chimiques par criblage virtuel en 2D**

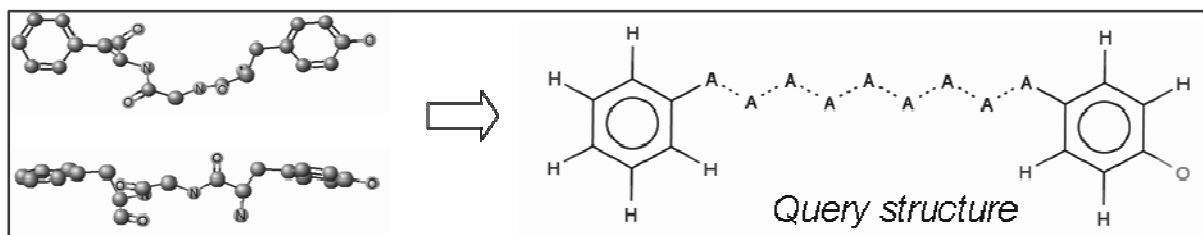
Devant l'échec du criblage virtuel par docking, nous avons utilisé une autre stratégie moins sophistiquée mais qui a étonnamment généré des résultats positifs et permis des avancées significatives du projet.

### **1- Principe et mise en œuvre du criblage virtuel en 2D**

Les données issues de la caractérisation du peptide cyclique sont les suivantes : 1) les résidus Y et F jouent un rôle très important, 2) leurs cycles sont situés quasiment dans le même plan de manière contrainte et 3) cette rigidité est fondamentale. Ceci définit une partie du pharmacophore actif.

En collaboration avec Samia Aci (Laboratoire de Bioinformatique et Mathématiques, CEA Grenoble), un criblage virtuel en 2 dimensions a été réalisé. Une recherche de sous-structures et de similarités a été demandée au logiciel en s'appuyant sur ces données. Le logiciel Chemaxon nous a permis de rechercher des molécules répondant à la requête suivante (figure 57) :

- 2 cycles aromatiques, un phenyl et un oxo-phényl
- séparés l'un de l'autre par 10 liaisons covalentes, qui peuvent être aussi bien simples, que doubles ou aromatiques (les pointillés signifient "n'importe quel type de liaison") impliquant n'importe quel type d'atome (signification du symbole A).



**Figure 57 : Structure de requête entrée dans le logiciel Chemaxon en vue d'un criblage virtuel 2D** (recherche de sous-structures et de similarités). A gauche, séquence peptidique extraite de la structure de CK2 $\beta$  Y188-G189-F190. A droite, structure de requête définie pour le criblage.

La chimiothèque utilisée est celle du NCI contenant 250 000 structures chimiques correspondant à 238 000 composés. Le criblage a été réalisé en 24h.

Environ 200 composés correspondant à des sous-structures et 200 autres correspondant à des similarités ont été sélectionnés. Ils ont été soumis à des filtres secondaires (poids moléculaire inférieur à 200 Da et supérieur à 2000,  $\log P < 5$ , ...) et à un criblage « visuel » par un chimiste médicinal (R. Prudent, CEA Grenoble) tenant compte à la fois des caractéristiques de « druggabilité » d'une molécule chimique et de celles de l'interaction CK2 $\alpha$ -CK2 $\beta$  (hydrophobicité) (détails dans la section Matériels et Méthodes).

## **2- Résultats du criblage virtuel en 2D**

25 composés sélectionnés par le criblage virtuel ont finalement été testés *in vitro* (figures 58 et 59) selon la disponibilité des stocks NCI.

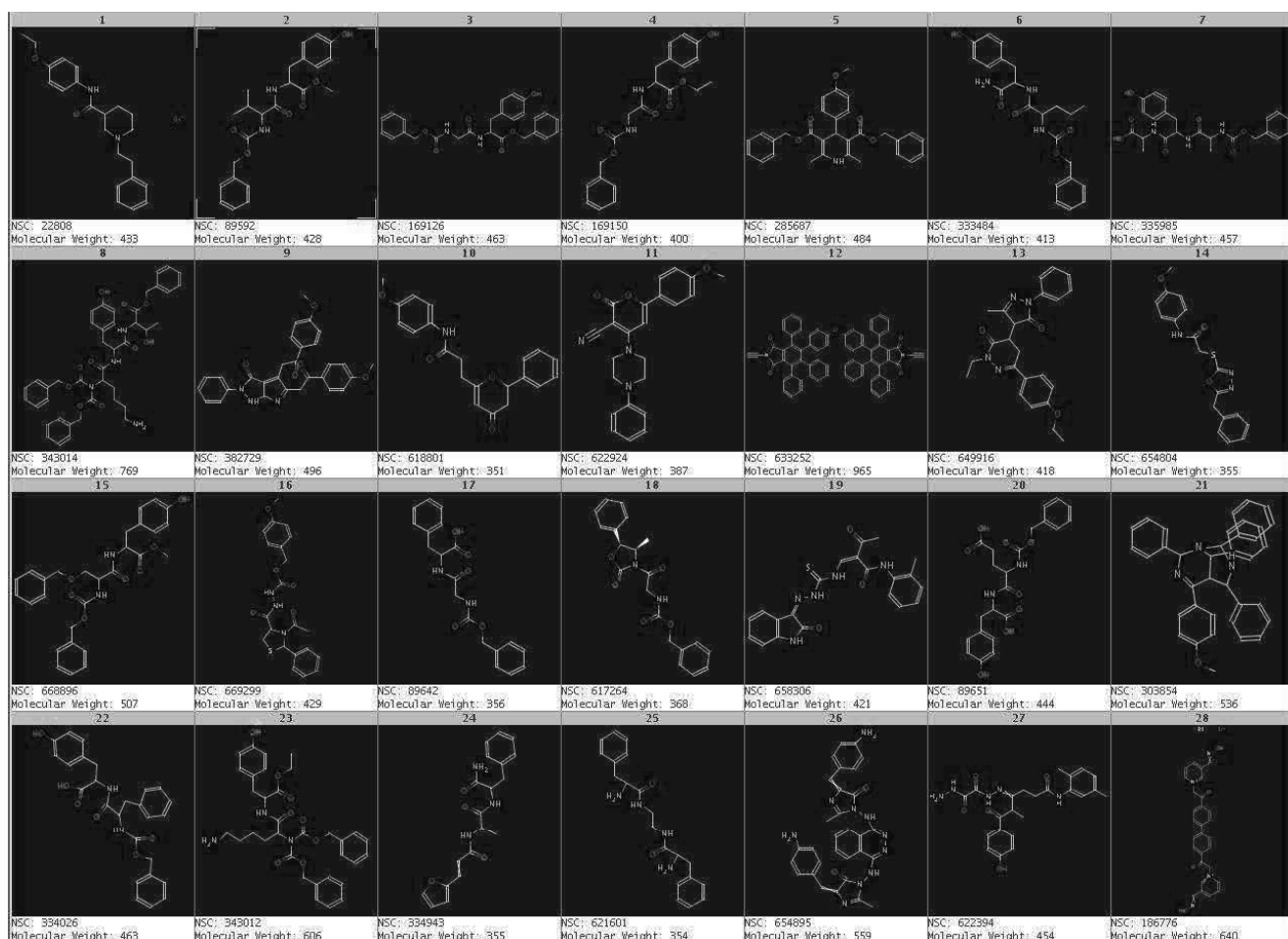


Figure 58 : Structure des 25 composés sélectionnés par criblage virtuel 2D et testés *in vitro* (visualisation Marvin).

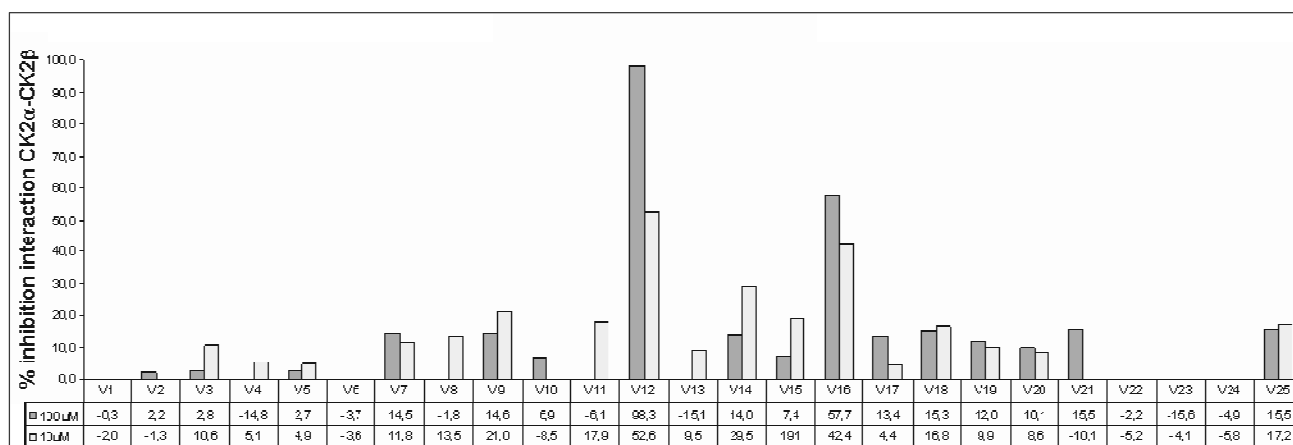


Figure 59 : Résultats des composés sélectionnés par criblage virtuel 2D et testés *in vitro* à 100 et 10  $\mu$ M (test d'interaction CK2 $\alpha$ -CK2 $\beta$  radioactif).

Deux composés, V12 et V16, testés à 100  $\mu$ M, inhibent de façon remarquable l'interaction à 98 et 61% respectivement, et à 49 et 47% à 10  $\mu$ M. Toutefois, l'activité de V16 ne s'est pas confirmée dans les tests secondaires.

### 3- Caractérisation de V12

#### a- Description du composé V12, « Bipâquerette »

La structure de V12 donnée par le NCI (NSC 633252) comportait une erreur chimique et sa structure réelle a été confirmée en spectrométrie de masse et en RMN 1H par les chimistes du Laboratoire de Jean-Noël Denis (DCM, Grenoble), figure 60.

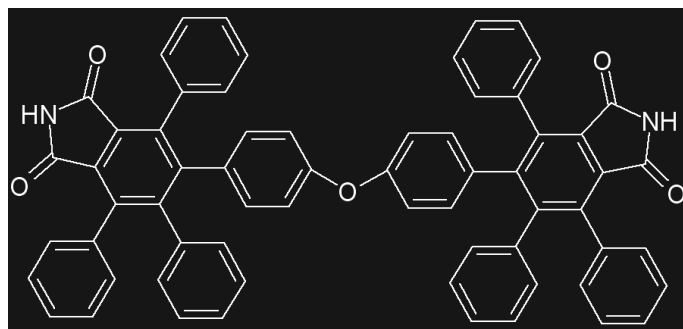


Figure 60 : Structure du composé V12.

V12 est un composé de type N-hydroxyphthalimide (MW = 918 Da), que nous avons surnommé « Bipâquerette » en raison de sa forme. Très peu de données sont disponibles concernant ce composé. Le monomère a été cité en 1996 comme intermédiaire de synthèse et catalyseur d'oxydation. Aucune activité biologique n'a été publiée. Ce composé a été inclus dans plusieurs criblages réalisés par le NCI :

- NCI AIDS Screen 10/1999,
- NCI AIDS Screen 03/2002,
- Cancer Screen 09/2003 Data : 5 doses sur 60 lignées cellulaires,
- NCI AIDS Screen Current Data 04/2004,
- NCI Cancer Screen Current Data 08/2004 : 5 doses sur 60 lignées cellulaires,
- NCI 60 cell line screen dose response,
- NCI Cancer Screen New Data, 60 cell/5 dose, 09/2005,
- Stage 0 Yeast Screen Data, NCI Seattle yeast anticancer drug screen.

De façon intéressante, V12 inhibe la croissance d'une lignée de cellules tumorales de cancer du poumon non-à-petites-cellules, du colon et du système nerveux central (figure 61).

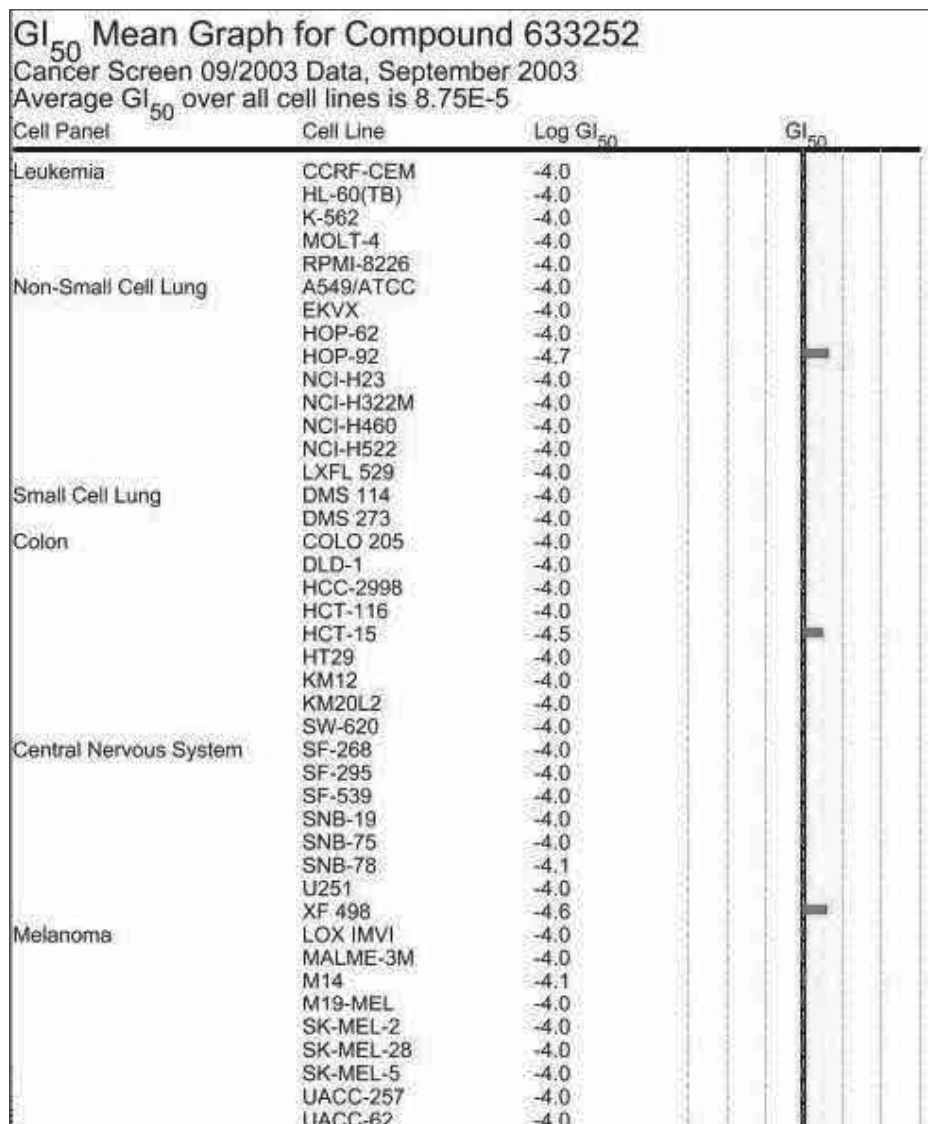


Figure 61 : Résultats de criblage réalisés par le NCI concernant la prolifération de 60 lignées tumorales traitées par V12.

V12 est particulièrement hydrophobe. Son LogP est de 14,9, son LogD (pH 7,4) de 13,6. Ce caractère hydrophobe est cohérent avec les propriétés de l'interface CK2 $\alpha$ -CK2 $\beta$  et des interactions protéine-protéine en général. Cependant, cela peut être un obstacle pour son efficacité cellulaire.

**LogP** : LogP est un indicateur d'hydrophobicité. Il représente le coefficient de partage octanol-eau.

LogP > 0 : molécule hydrophobe.

LogP < 0 : molécule hydrophile.

Le LogP rend compte de la tendance d'une molécule à s'accumuler dans les membranes biologiques.

Les valeurs optimales pour qu'un composé médicamenteux soit absorbé par le corps humain sont :

Pénétration du système nerveux central :  $\log P = 2,0$

Absorption orale :  $\log P = 1,8$

Absorption intestinale :  $\log P = 1,35$

Absorption colorectale :  $\log P = 1,32$

Absorption sublinguale :  $\log P = 5,5$

Absorption percutanée :  $\log P = 2,6$  (et faible poids moléculaire).

LogD : Mesure du LogP à un pH donné.

$$\text{LogD} = \text{LogP} - (1 + 10^{|\text{pH} - \text{pK}_a|}).$$

Plus le LogD à pH 7,4 est supérieur à 0, plus la clairance rénale du composé diminue et plus la clairance métabolique augmente. Les composés ayant un LogD élevé auront tendance à être métabolisés par les cytochromes P450 dans le foie.

On peut noter également que la présence des groupements phényles fait que la molécule est particulièrement rigide. Dans l'espace, ces groupements sont perpendiculaires au naphthimide et aucune rotation n'est possible. Ceci explique peut-être en partie l'efficacité de ce composé.

V12 se présente sous la forme d'un composé dimérique avec liaison éther, ce qui peut contribuer à son efficacité par effet de multivalence (Pepinsky, 1991) : lors du renouvellement et des échanges moléculaires de l'inhibiteur au niveau de son site de fixation, il peut être immédiatement recapté par son extrémité homologue, sans que ce soit une autre molécule de la solution qui prenne sa place.

## **b- Résultats des tests d'interaction**

### **• Détermination de l'IC<sub>50</sub> dans le test d'interaction CK2 $\alpha$ -CK2 $\beta$**

*In vitro*, l'IC<sub>50</sub> de V12 pour l'inhibition de l'interaction CK2 $\alpha$ -CK2 $\beta$  est de **35  $\mu\text{M}$** . Le composé est également capable de dissocier le complexe préformé avec une IC<sub>50</sub> de 200  $\mu\text{M}$ , mais il ne le dissocie qu'à 65% à cette concentration (figure 61).

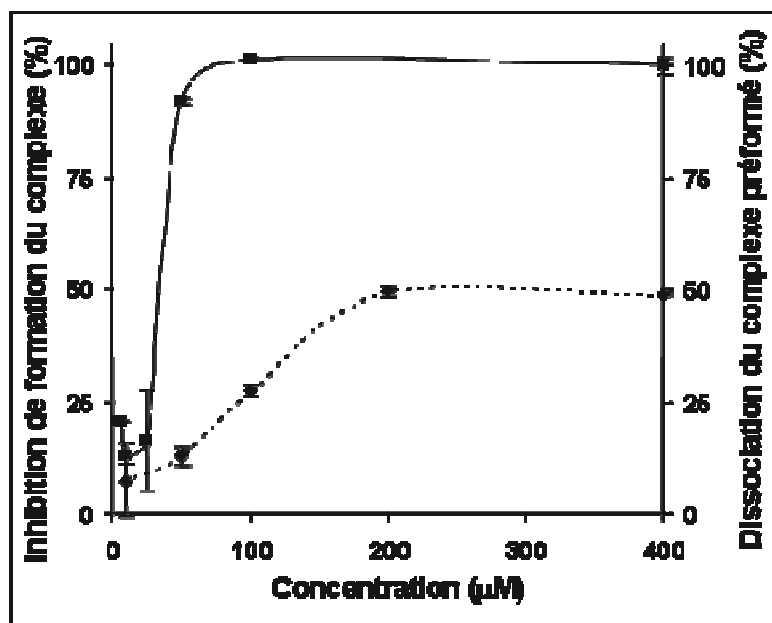


Figure 61 : Inhibition de la formation du complexe CK2 $\alpha$ -CK2 $\beta$  par V12 (trait plein) et dissociation du complexe préformé par V12 (pointillés).

- Evaluation de l'activité de V12 par immunoprécipitation d'un lysat cellulaire

Afin de mettre en évidence un effet de V12 sur la séparation physique de CK2 $\alpha$  et CK2 $\beta$ , une immunoprécipitation est réalisée dans un contexte de lysat cellulaire.

Des cellules HeLa sont transfectées avec une construction Flag-CK2 $\beta$  WT à l'aide de lipofectamine. Après 36h, les cellules sont lysées. Après une étape de « pré-clearing », les lysats cellulaires sont incubés avec 400  $\mu$ M final de V12 ou de DMSO et 60 000 cpm de [ $^{35}$ S]-CK2 $\alpha$  pendant 1h dans la glace. L'immunoprécipitation est réalisée avec un anticorps anti-Flag monoclonal (1h, 4°C), et de la protéine A (1h, 4°C). Après 4 lavages avec du tampon de lyse, la quantité de CK2 $\alpha$  immobilisée sur les billes est analysée par comptage de la radioactivité des billes et en Western blot.

On note que la présence de V12 dans le lysat se traduit par une diminution de la quantité de [ $^{35}$ S]-CK2 $\alpha$  fixée à Flag-CK2 $\beta$  (figure 62).



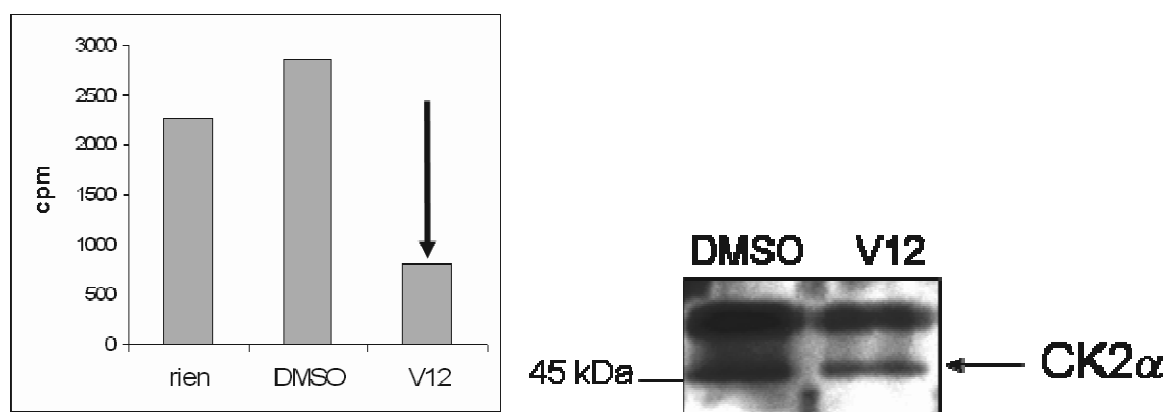


Figure 62 : Immunoprécipitation anti-Flag de Flag-CK2β en présence de V12 (400 μM). A gauche : évaluation de la quantité de [<sup>35</sup>S]-CK2α (en cpm) précipitée avec CK2β (sur les billes). A droite : analyse en Western blot (α-coc) des billes.

### c- Effets de V12 sur l'activité catalytique de CK2

- Phosphorylation d'un substrat CK2β-dépendant (GST-Olig2) en présence de V12 :

Dans le but d'évaluer V12 d'un point de vue fonctionnel, sa capacité à inhiber la phosphorylation d'un substrat CK2β-dépendant (GST-Olig2) a été testée *in vitro*. Un effet-dose est observé, avec une IC<sub>50</sub> estimée à 80 μM. La phosphorylation de ce substrat est totalement inhibée à 300 μM (figure 63).

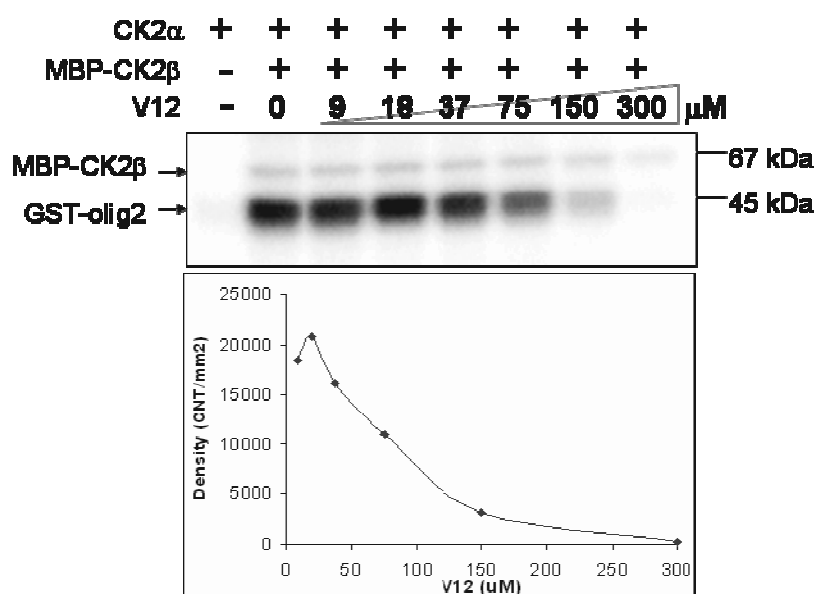


Figure 63 : Phosphorylation CK2β-dépendante de GST-Olig2 par CK2α en présence d'une gamme de V12. En haut : autoradiographie. En bas : quantification de l'intensité de phosphorylation en CNT/mm<sup>2</sup>.

- **Effets de V12 sur l'activité de CK2 dans un contexte de lysat cellulaire**

Une singularité supplémentaire de la CK2 est sa capacité à utiliser indifféremment le **GTP** ou l'ATP comme donneur de phosphate (Niefind, 2001). Cette donnée nous permet de concevoir un test dans lequel un lysat cellulaire est incubé avec du [ $^{32}$ P]-GTP, de la CK2 $\alpha$  et  $\beta$  et un composé inhibiteur. La phosphorylation des protéines du lysat cellulaire a lieu pendant 5min et l'analyse se fait en gel SDS-PAGE suivie d'une autoradiographie. Dans ces conditions, on observe la phosphorylation d'un nombre limité de protéines.

Une concentration croissante de V12 inhibe la phosphorylation de l'un des substrats, dit CK2 $\beta$ -dépendant, sans affecter celle des autres (figure 64).

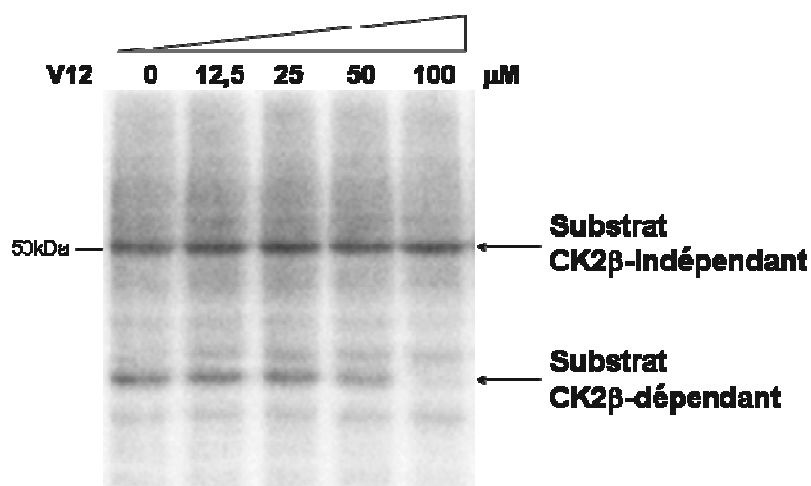


Figure 64 : **Autoradiographie de lysat de cellules GL26** (glioblastomes de souris) phosphorylé par CK2 (0,1 $\mu$ g de CK2 $\alpha$  et 0,1 $\mu$ g de CK2 $\beta$ ) en présence de [ $^{32}$ P]-GTP et de V12.

#### 4- Analogues de V12

En vue de réaliser une relation structure-activité de V12, nous avons recherché des molécules analogues. Pour cela, nous avons utilisé le logiciel ChEMBL (<http://chembank.broad.harvard.edu/>) qui est capable de rechercher des molécules possédant certains motifs et disponibles dans différentes bases de données (NCI, commerciales...). Trois analogues, V55, V56 et V57 (figure 65), ont été identifiés par cette méthode. Comme V12, ils proviennent du NCI et ont pu être testés.

D'autre part, des chimistes du DCM de Grenoble (groupe de J. Einhorn) ont reconnu en V12 un monomère synthétisé par leur laboratoire (L1, figure 65). Ils travaillent sur des composés de la famille des N-hydroxyphthalimide comme catalyseurs d'oxydation non métalliques utilisant l'oxygène moléculaire et cherchent à mettre au point des méthodologies de synthèse sélective. Ils ont accepté de nous fournir des analogues comportant ces motifs et de synthétiser des nouveaux N-hydroxyphthalimides à squelettes polyaromatiques afin de d'améliorer l'efficacité de ces composés comme inhibiteurs de l'interaction CK2 $\alpha$ -CK2 $\beta$ .

On peut noter que L1 a également été identifié comme un inhibiteur de l'activité catalytique CK2 lors du criblage de la chimiothèque du DCM (qui fait partie de la Chimiothèque Nationale). Il a une IC<sub>50</sub> de 1  $\mu$ M pour l'activité catalytique de CK2 $\alpha$  mais est inefficace pour bloquer l'interaction CK2 $\alpha$ -CK2 $\beta$ .

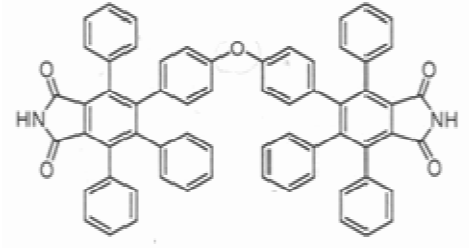
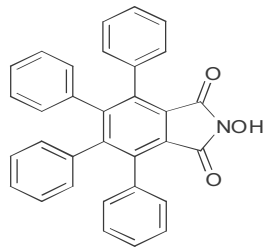
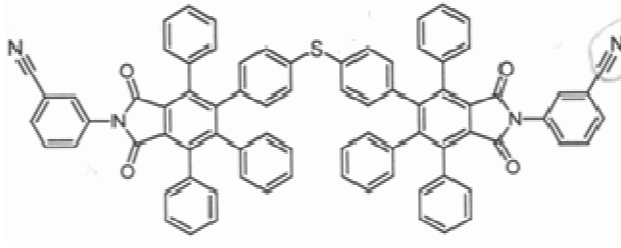
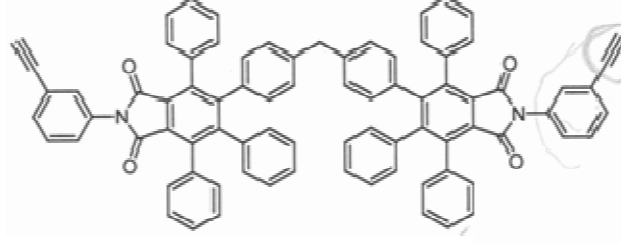
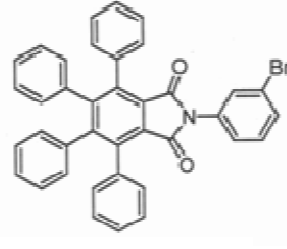
##### a- Structure des analogues de V12 et résultats

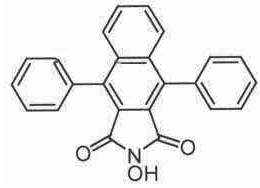
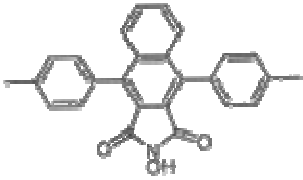
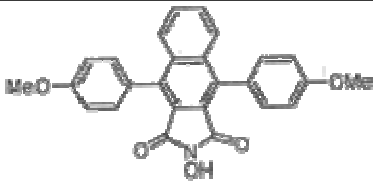
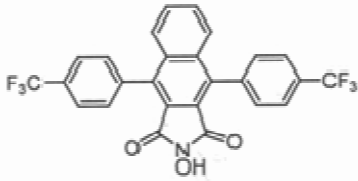
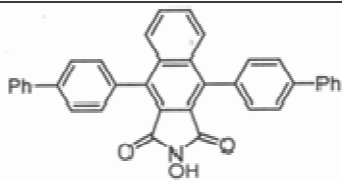
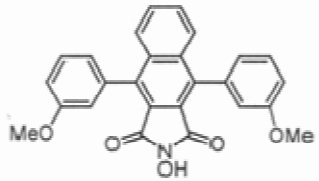
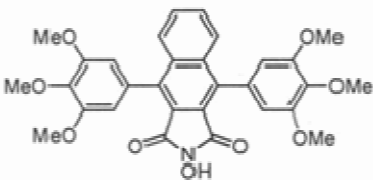
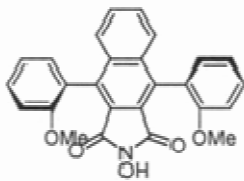
Le tableau suivant présente les structures et les résultats des différents analogues de V12 testés *in vitro* pour l'inhibition de l'interaction CK2 $\alpha$ -CK2 $\beta$  et dans le modèle de BiFc adapté pour tester des molécules sur l'interaction des sous-unités de CK2 dans des cellules en culture.

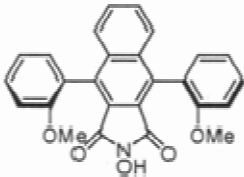
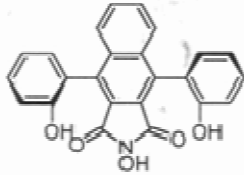
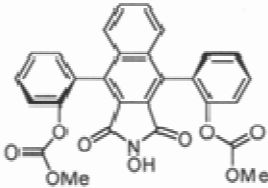
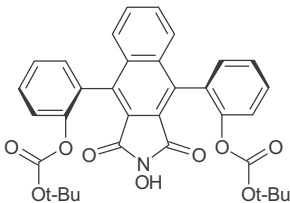
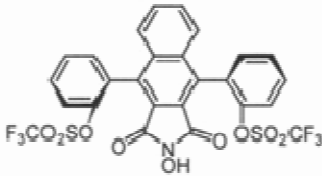
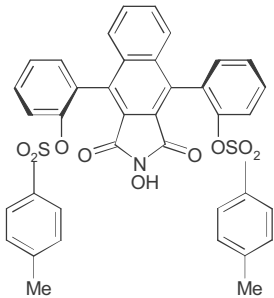
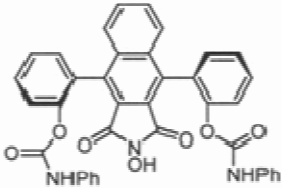
Pour le test BiFc, les molécules sont ajoutées 12h après transfection à 100  $\mu$ M. Effectivement, la reconstitution de l'YFP étant une réaction irréversible, les composés doivent être ajoutés *après* intégration des plasmides mais *avant* expression des protéines. Le niveau d'expression des protéines exogènes est contrôlé par Western blot afin de s'assurer qu'une diminution de fluorescence est bien due à une absence d'interaction entre CK2 $\alpha$  et CK2 $\beta$  (et donc une absence de reconstitution de l'YFP) et non à un défaut dans l'expression protéique bloquée par les composés.

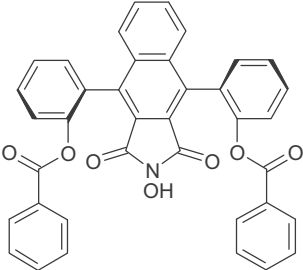
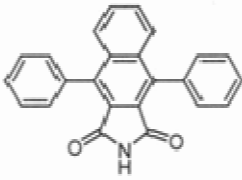
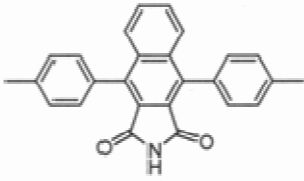
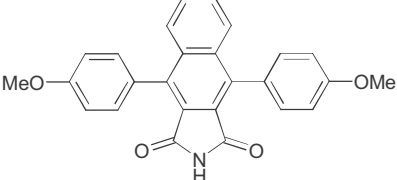
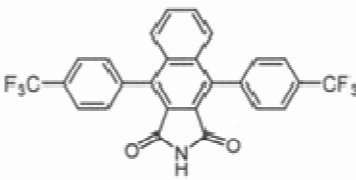
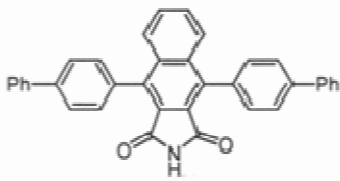
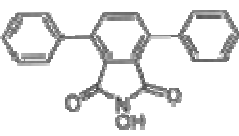
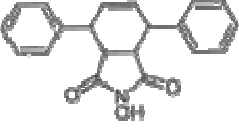
Les molécules restent en contact avec les cellules pendant 24h puis les cellules sont fixées. Une immunofluorescence avec l'anticorps monoclonal anti-GFP Abcam est réalisée pour

amplifier le signal. Dans les conditions témoins (DMSO), on compte en moyenne 31,8% de complémententation de fluorescence.

| Nom<br>CEA | Nom<br>DCM           | Formule                                                                              | Inhib-<br>ition à<br>400<br>$\mu\text{M}$ | $\text{IC}_{50}$ <i>in</i><br><i>vitro</i> | BiFc (%<br>compl.)<br>(DMSO :<br>31,8%) |
|------------|----------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------|--------------------------------------------|-----------------------------------------|
| V12        | NCI<br>NSC<br>633252 |     | 100%                                      | 35 $\mu\text{M}$                           | 19,2%                                   |
| L1         | LEDSS                |    | 45%                                       | -                                          | nt                                      |
| V55        | NCI<br>NSC<br>633248 |  | 100%                                      | 20 $\mu\text{M}$                           | 13,3%                                   |
| V56        | NCI<br>NSC<br>633251 |  | 100%                                      | 25 $\mu\text{M}$                           | 12,5%                                   |
| V57        | NCI<br>NSC<br>634226 |   | 0%                                        | -                                          | 11,7%                                   |

|     |              |                                                                                     |                        |           |                    |
|-----|--------------|-------------------------------------------------------------------------------------|------------------------|-----------|--------------------|
| JE1 | CAEIB7<br>1  |    | 55%                    | 350<br>μM | 10,2%              |
| JE2 | CAEIB3<br>9  |    | 0%                     | -         | Nt                 |
| JE3 | CAEIB4<br>7  |    | 0%                     | -         | 17,5%              |
| JE4 | CAEIB5<br>3  |    | 70%                    | 150<br>μM | Toxique<br>à 100μM |
| JE5 | CAEIB6<br>3  |  | 60%<br>(pla-<br>fonne) | 80μM      | 19,8%              |
| JE6 | JAEI64<br>A2 |  | 75%                    | 240<br>μM | 2,5%               |
| JE7 | JAEI65<br>A1 |  | 4%                     | -         | Nt                 |
| JE8 | JEB32a       |  | 32%                    | -         | Nt                 |

|          |             |                                                                                     |      |           |       |
|----------|-------------|-------------------------------------------------------------------------------------|------|-----------|-------|
| JE9      | JEC22g      |    | 100% | 200<br>μM | 16,5% |
| JE<br>10 | JEC22c      |    | 8%   | -         | Nt    |
| JE<br>11 | JEC22h      |    | 30%  | -         | Nt    |
| JE<br>12 | JEB67b      |   | 75%  | 300<br>μM | 17,0% |
| JE<br>13 | JEB125<br>a |  | 53%  | 400<br>μM | Nt    |
| JE<br>14 | JEC22d      |  | 5%   | -         | Nt    |
| JE<br>15 | JEC23b      |  | 31%  | -         | Nt    |

|          |             |                                                                                     |     |           |       |
|----------|-------------|-------------------------------------------------------------------------------------|-----|-----------|-------|
| JE<br>16 | JEC23<br>a  |    | 85% | 70μM      | 4,2%  |
| JE<br>17 | CAEIB6<br>8 |    | 11% | -         | nt    |
| JE<br>18 | CAEIB3<br>7 |    | 29% | -         | nt    |
| JE<br>19 | CAEIB4<br>5 |   | 2%  | -         | nt    |
| JE<br>20 | CAEIB7<br>7 |  | 19% | -         | nt    |
| JE<br>21 | CAEIB6<br>1 |  | 34% | -         | Nt    |
| JJ1      | JJ0601<br>3 |  | 50% | 400<br>μM | 15,1% |
| JJ2      | JJ0601<br>6 |  | 0%  | -         | Nt    |

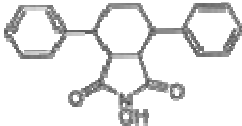
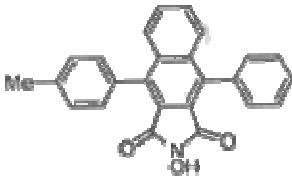
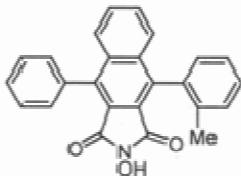
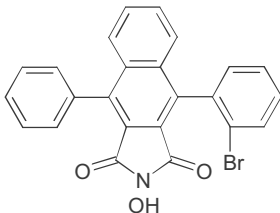
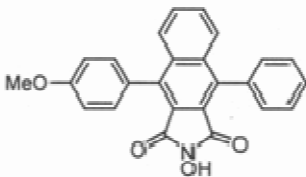
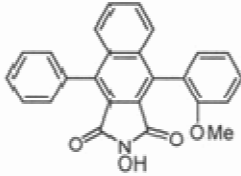
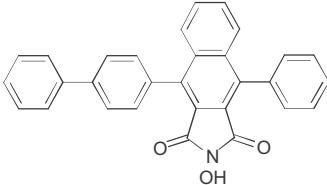
|     |         |                                                                                     |      |        |       |
|-----|---------|-------------------------------------------------------------------------------------|------|--------|-------|
|     |         |                                                                                     |      |        |       |
| JJ3 | JJ06017 |    | 1%   | -      | Nt    |
| JJ4 | JJ06040 |    | 98%  | 88μM   | 20,9% |
| JJ5 | JJ07025 |    | 100% | 77μM   | 10,8% |
| JJ6 | JJ07013 |   | 99%  | 59μM   | 7,0%  |
| JJ7 | JJ07036 |  | 98%  | 83μM   | 6,7%  |
| JJ8 | JJ07029 |  | 100% | 114 μM | 13,6% |
| JJ9 | JJ07040 |  | 100% | 150 μM | -     |

Figure 65 : Structure des composés analogues de V12 et résultats *in vitro* et en BiFc. Nt : non-testé.






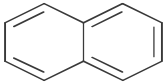
## b- Relations structure-activité

En vue de comprendre l'importance relative des différents groupements et d'améliorer l'efficacité de ces inhibiteurs, une étude de relation entre la structure et l'activité a été réalisée.

Le composé lead de référence est V12, identifié par criblage virtuel en 2D.


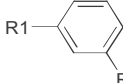
L'activité des composés est définie comme leur capacité à inhiber l'interaction CK2 $\alpha$ -CK2 $\beta$ .

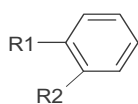
JJ3 est un dérivé du cyclohexane . Son cycle central est saturé, ce qui donne à ses groupements phényles latéraux une grande liberté de rotation, ajoutée à une variation de conformation en chaise/bateau du cycle central. Le cycle central de JJ2 (dérivé du cyclohexène ) est un peu plus insaturé, donc ses groupements latéraux sont moins flexibles, et celui de JJ1 est totalement insaturé (dérivé du benzène ) donc encore plus **rigide**. JJ1 étant plus efficace que les deux composés précédents, on peut en conclure que **le cycle central doit être complètement saturé pour limiter au maximum la rotation** des phényles latéraux, ce qui corrobore les observations faites pour le peptide cyclique.

JE1 possède un groupe naphthalène  que n'a pas JJ2 et qui le rend plus efficace. Ce **groupe naphthalène** semble donc être nécessaire. De même, sa présence limite davantage la flexibilité des groupements phényles latéraux.

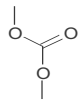
En comparant JE1 à JE5, on constate qu'un **groupement volumineux et hydrophobe** aux extrémités des deux cycles phényles améliore l'activité du composé.

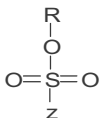
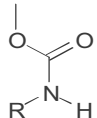
Cependant, en comparant les résultats pour les composés JE2-JE5, JE18-JE21, JJ4, JJ7,

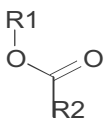
JJ9, dont ce groupement supplémentaire est situé en position para , les composés JE6 et JE7 dont le groupement est situé en position méta  et les composés JE9, JE15, JE16, JJ5, JJ6, JJ8 dont le groupement est en position ortho

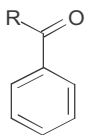


, on peut supposer que la meilleure disposition est **ortho**. Les composés JE8, JE10 et JE11 ont leurs groupements orientés **de part et d'autre** de la molécule, ce qui

semble être défavorable. Les composés JE11 et JE12 possèdent un carbonate  qui peut être facilement hydrolysé dans la cellule et rendre le composé inactif. De même pour

les esters sulfoniques  (JE13 et JE14) et les carbamates  (JE15), souvent utilisés dans les pro-drogues pour libérer le composé actif. A l'inverse, JE16, composé le

plus efficace au niveau cellulaire, contient 2 liaisons **esters**  métaboliquement plus

stables, qui permettent de conserver les extrémités benzoyls  hydrophobes et volumineuses. De plus, une **extrémité apolaire** est plus favorable qu'une extrémité polaire : Me- (JJ5) > Br- (JJ6) > ester+benzoyl (JJ16) ≈ -OMe (JE8, JE9, JJ8) > -OH (JJ10). Ceci est cohérent avec les données de la cristallographie relatives à l'interaction CK2α-CK2β et les informations tirées du peptide cyclique Pc : il s'agit majoritairement d'une zone hydrophobe, aussi bien du côté CK2β (boucle <sup>186</sup>RLYGFKIH<sup>193</sup> dont émergent 2 hot spots principaux Y188 et F190) que du côté CK2α (I69, P104, Y39, L41, V42, I57, I59, V105...), relativement plane, avec un sillon se creusant dans CK2α (figure 55), en partie comblé par la boucle de CK2β.

Enfin, la présence de ces groupements en position ortho peut contribuer à limiter le phénomène de π-stacking (empilement et agrégation de molécules hydrophobes, figure 66) et contribuer à améliorer l'activité des composés. Une autre hypothèse serait que cette conformation épouse davantage la cavité formée par le sillon de CK2 (sillon qui n'est pas totalement comblé par CK2β) ce qui rend ces composés plus efficaces. Ceci pourrait être exploré par modélisation moléculaire.

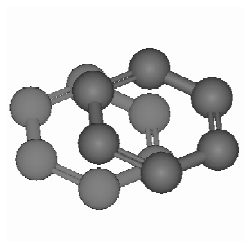
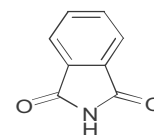
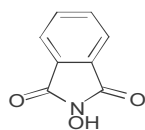


Figure 66 : **Interaction de type  $\pi$ -stacking (ou interaction « face-to-face »)**. Les cycles ne se superposent pas exactement l'un sur l'autre mais sont légèrement décalés ([www.chemsoc.org](http://www.chemsoc.org)).

Pour des raisons de simplification de synthèse, l'importance du N-phtalimido

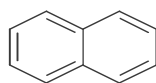


(JE17 à JE21) versus le N-hydroxynaphtimide (autres composés) a été évaluée. Le **N-hydrophynaphtimide** apparaît comme plus favorable.

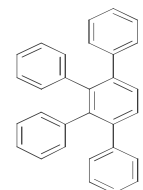


V12 est un composé **dimérique** (liaison éther  $R-O-R$ ) et bénéficie de *l'effet de multivalence* (Kitov, 2003, Dam, 2000), qui exacerbe son activité (contrairement à L1 ou V57), même s'il

ne présente pas de groupement naphthalène



mais un tetraphényl



V55 diffère de V12 par sa liaison thio-éther  $R-S-R$  entre les deux monomères et contient des groupements nitriles  $-C\equiv N$ . De même, V56 dimérise par un simple lien  $CH_2$

$R-CH_2-R$  et contient 2 groupements alcynes  $-C\equiv C-$ . Ces groupements peuvent combler l'espace occupé par les groupements situés en position méta identifiés précédemment, ce qui expliquerait que V55 et V56 soient légèrement plus actifs que V12.

Enfin, si V12 et ses analogues les plus proches (V55 et V56) sont inactifs *in vivo*, on peut supposer qu'ils sont piégés dans la membrane cellulaire en raison de leur extrême hydrophobicité. Ce problème de pharmacocinétique peut être résolu en envisageant la synthèse d'analogues structuraux enrichis en azote ou contenant un sucre par exemple, qui contribuent à améliorer la solubilité en milieu aqueux et le transport membranaire.

Les différents points mis en relief sont récapitulés dans la figure ci-dessous.

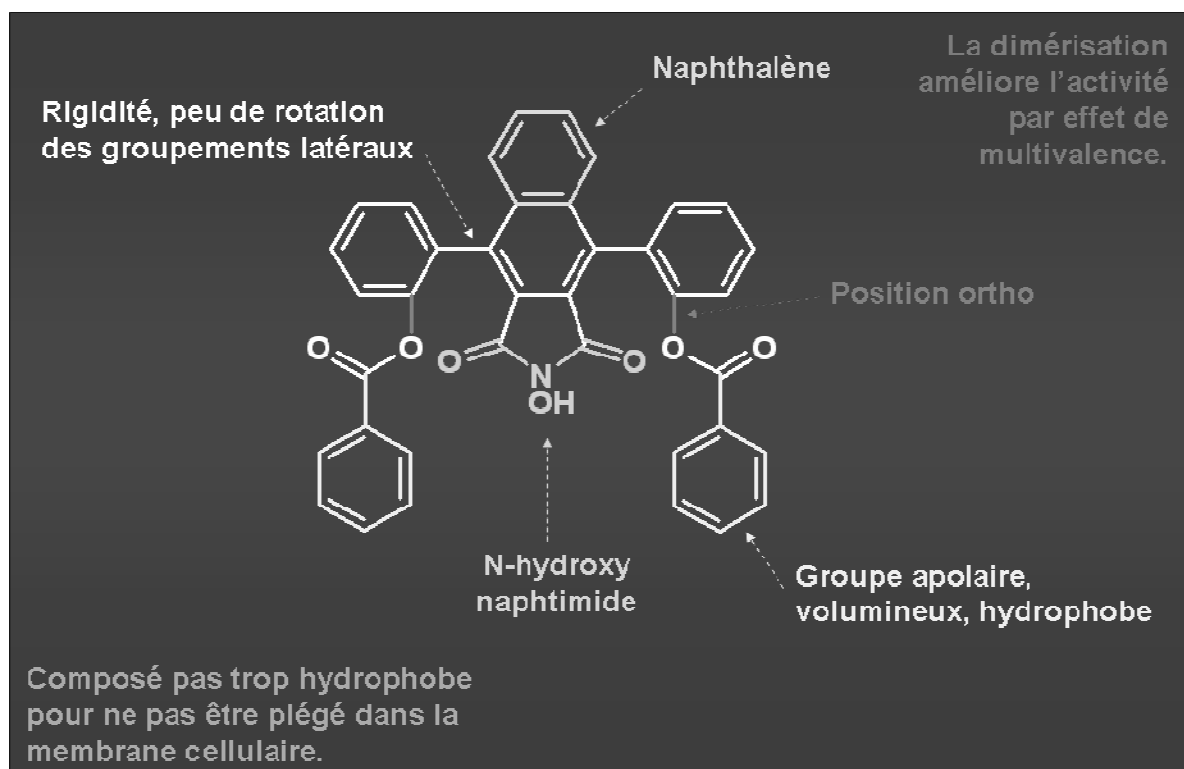


Figure 67 : Résultat de la SAR des analogues de V12.

### c- Effet des composés actifs sur la viabilité cellulaire

Les composés les plus efficaces en BiFc sont évalués sur la viabilité cellulaire à différentes concentrations et sur différentes durées (figures 68 et 69). La viabilité des cellules HeLa est mesurée à l'aide du kit Cell-Titer-Glo de Promega, basé sur une mesure de luminescence. Comme c'est le cas dans le test BiFc, V12 est inactif alors que JE16 induit des changements phénotypiques importants qui conduisent à une mort des cellules détectable dès 24h pour une concentration de 10  $\mu$ M.

Notons que la concentration mentionnée ici tranche avec l' $IC_{50}$  de JE16 *in vitro* (70  $\mu$ M). Cependant, il n'est pas rare d'observer des phénomènes d'accumulation de molécules chimiques dans la cellule, par transport actif ou non, et la concentration intracellulaire est alors largement supérieure à la concentration du milieu (Vonqaseuth, 2007).

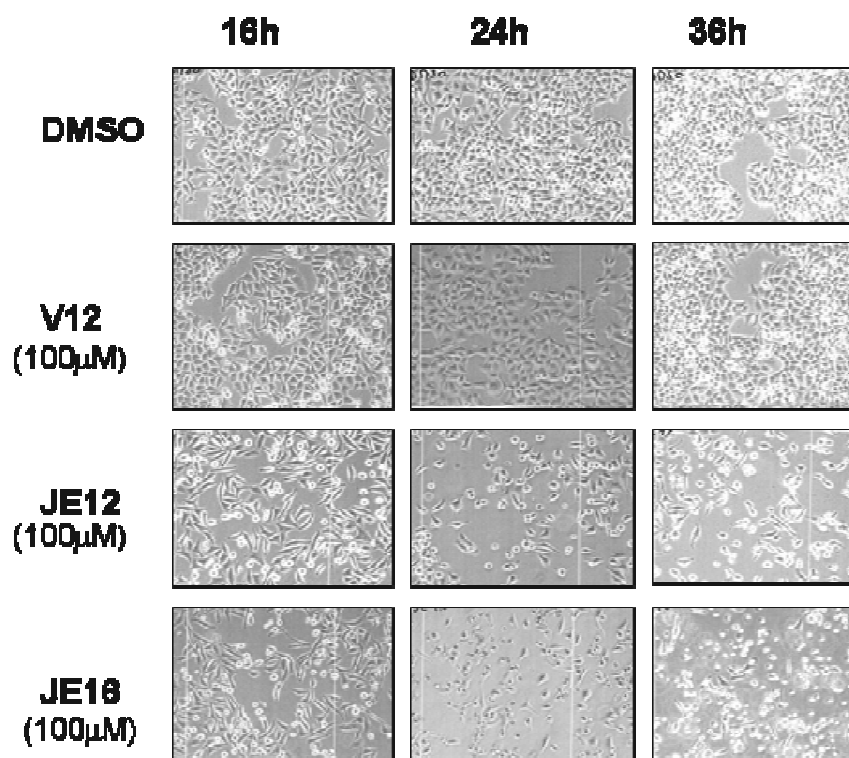


Figure 68 : Observation en microscopie optique (x100) de cellules HeLa traitées avec différents composés.

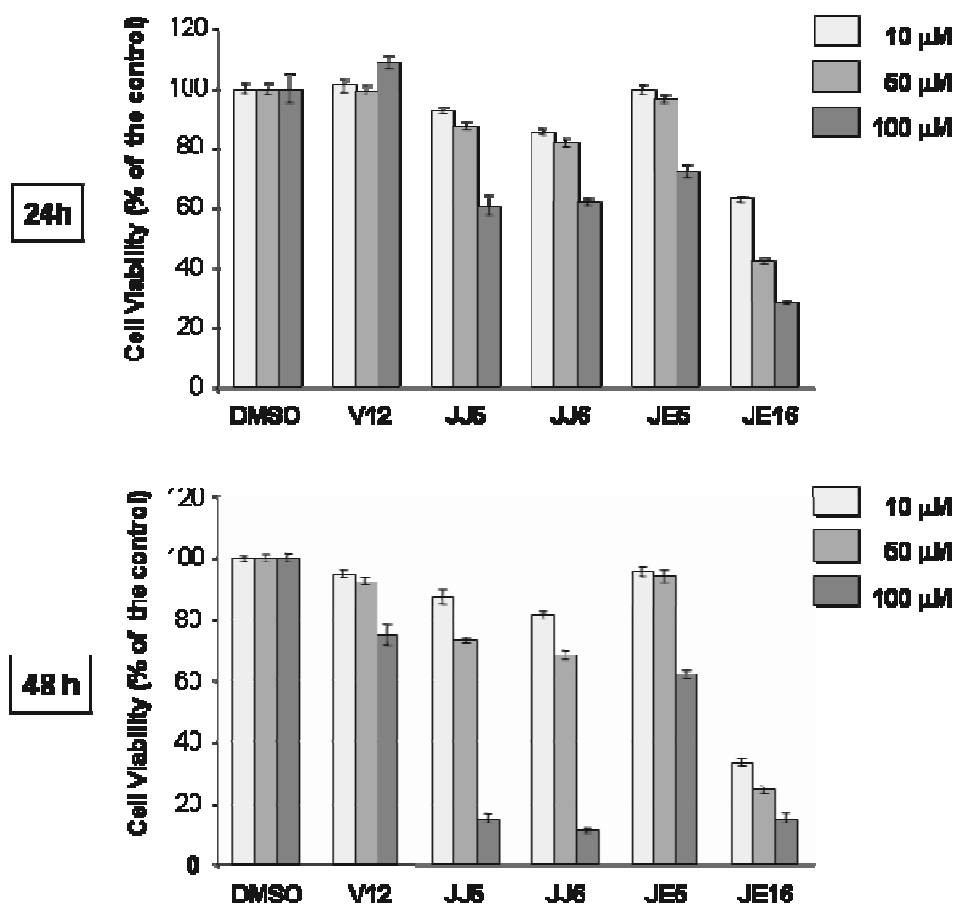


Figure 69 : Viabilité des cellules HeLa traitées avec différents composés. Les résultats sont donnés de manière relative par rapport au DMSO et représentent la moyenne de 3 expériences indépendantes.

Le composé le plus actif JE16 a ensuite été testé sur la viabilité de différentes lignées cellulaires tumorales (figures 70 et 71). Le DMSO et un composé inactif de structure proche de JE16 (JE12) sont utilisés à titre de témoins.

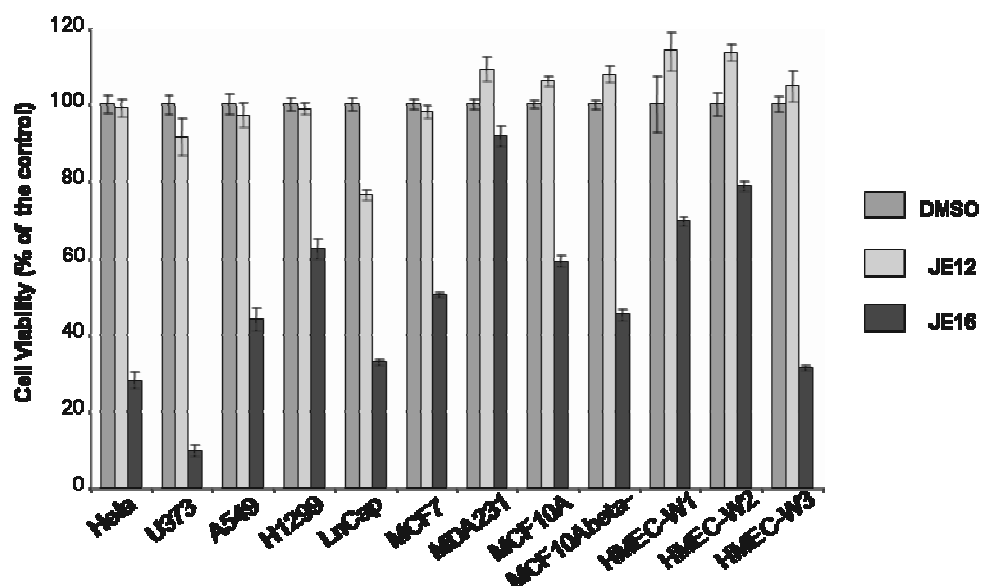


Figure 70 : Viabilité cellulaire de différentes lignées traitées avec JE16 (composé actif) ou JE12 (composé inactif) à 10  $\mu$ M pendant 48h. Les résultats sont donnés de manière relative par rapport au DMSO et représentent la moyenne de 3 expériences indépendantes.

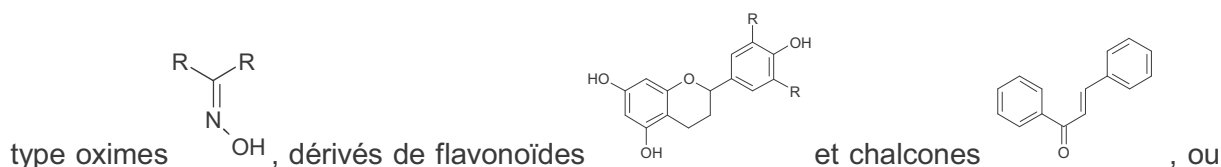
| Lignée     | Type                                       | Origine    |
|------------|--------------------------------------------|------------|
| Hela       | adenocarcinome                             | col uterus |
| U373       | glioblastome                               | cerveau    |
| A549       | carcinome                                  | poumon     |
| H1299      | carcinome                                  | poumon     |
| LnCap      | carcinome                                  | prostate   |
| MCF7       | adenocarcinome                             | sein       |
| MDA231     | adenocarcinome                             | sein       |
| MCF10A     | normal(fibrose)                            | sein       |
| MCF10A(96) | normal/CK2beta-                            | sein       |
| HMEC W1    | transformé hTERT                           | sein       |
| HMEC W2    | transformé hTERT + SV40-LargeT ag+ t       | sein       |
| HMEC W3    | transformé hTERT + SV40-LargeT ag+ t + ras | sein       |

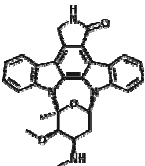
Figure 71 : Type et origine des différentes lignées cellulaires utilisées dans le test précédent.

On observe que JE16 est particulièrement actif sur de nombreuses lignées tumorales. Toutefois, ces expériences préliminaires ne permettent pas d'affirmer que l'inhibition de la viabilité des cellules par ce composé est spécifiquement corrélée à l'inhibition de la CK2. Des études supplémentaires sont en cours.

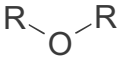
### III- Autres composés testés

Ayant identifié les caractéristiques requises pour inhiber l'interaction CK2 $\alpha$ -CK2 $\beta$  (hydrophobicité, rigidité, molécules étendues, planes polycycliques...) et validé le concept grâce à l'identification de V12, un certain nombre de composés nous ont été fournis par les chimistes du bassin chimiste grenoblois et ont été testés *in vitro*. Quelques uns se sont révélés efficaces et sont décrits ci-dessous. Des composés hydrophobes et polycycliques de



encore staurosporine , gracieusement fournis par des chimistes grenoblois (A. Boumendjel, Jean-Luc Decout, DPM, Meylan, O.Renaudet, DCM, Grenoble) ont également été testés sans résultat sur l'inhibition de l'interaction CK2 $\alpha$ -CK2 $\beta$ .

#### 1- Molécules de type éthers (O. Renaudet, DCM)

84 composés (notés de OR1 à OR90) de type éthers  ont été fournis par Olivier Renaudet (DCM, Grenoble) (Renaudet, 2004) et testés *in vitro*. Ils présentent 2 cycles aromatiques à leurs extrémités, espacés l'un de l'autre par une dizaine de liaisons, ce qui pourrait correspondre aux caractéristiques du pharmacophore déterminées à l'aide du peptide cyclique Pc.

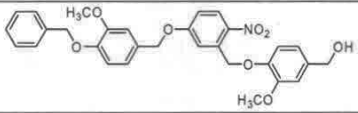
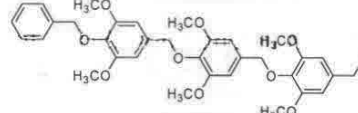
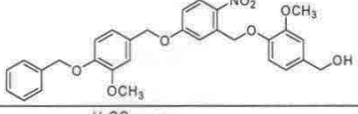
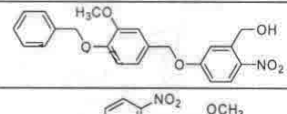
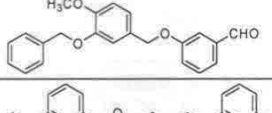
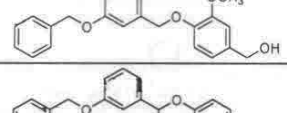
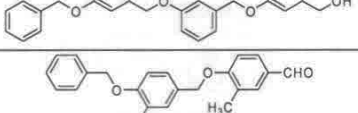
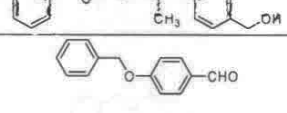
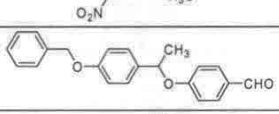
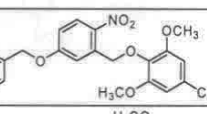
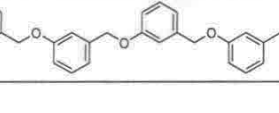
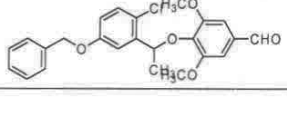
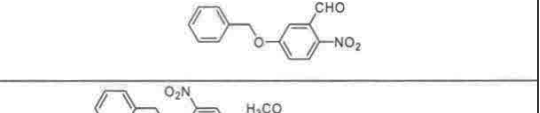
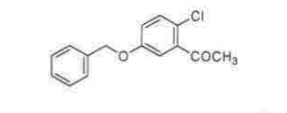
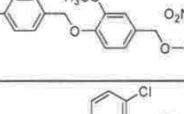
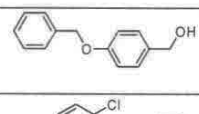
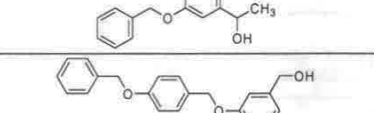
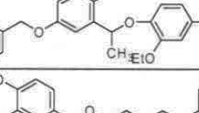
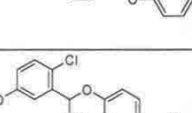
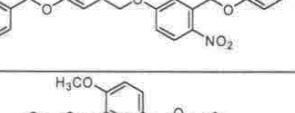
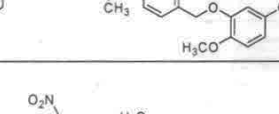
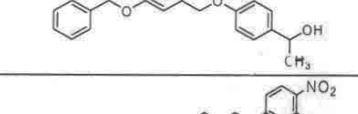
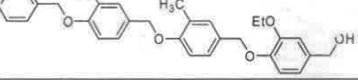
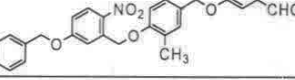


• Structures

| Code | Structure |
|------|-----------|
| 1    |           |
| 2    |           |
| 3    |           |
| 4    |           |
| 5    |           |
| 6    |           |
| 7    |           |
| 8    |           |
| 9    |           |
| 10   |           |
| 11   |           |
| 12   |           |

|    |  |
|----|--|
| 13 |  |
| 15 |  |
| 16 |  |
| 17 |  |
| 18 |  |
| 19 |  |
| 20 |  |
| 21 |  |
| 22 |  |
| 23 |  |
| 24 |  |
| 25 |  |
| 26 |  |
| 27 |  |



|    |  |    |  |
|----|--|----|--|
| 28 |  | 41 |  |
| 30 |  | 42 |  |
| 31 |  | 43 |  |
| 32 |  | 44 |  |
| 33 |  | 45 |  |
| 34 |  | 46 |  |
| 36 |  | 47 |  |
| 37 |  | 48 |  |
| 38 |  | 49 |  |
| 39 |  | 50 |  |
| 40 |  | 51 |  |
|    |  | 52 |  |
|    |  | 53 |  |

|    |                                                                                     |    |                                                                                       |
|----|-------------------------------------------------------------------------------------|----|---------------------------------------------------------------------------------------|
| 54 |    | 69 |     |
| 55 |    | 70 |    |
| 57 |    | 72 |    |
| 58 |    | 73 |    |
| 59 |    | 74 |    |
| 60 |    | 75 |    |
| 61 |    | 76 |    |
| 62 |   | 77 |   |
| 63 |  | 78 |  |
| 65 |  | 79 |  |
| 66 |  | 80 |   |
| 67 |  | 81 |  |
| 68 |  | 82 |  |

|    |  |
|----|--|
| 83 |  |
| 84 |  |
| 85 |  |
| 86 |  |
| 87 |  |
| 88 |  |
| 89 |  |
| 90 |  |

Figure 72 : Structure des 84 composés de type éthers.

- **Efficacité de ces composés *in vitro* :**

Les composés listés précédemment ont été testés *in vitro* pour leur capacité à inhiber l'interaction CK2 $\alpha$ -CK2 $\beta$  (figure 73).

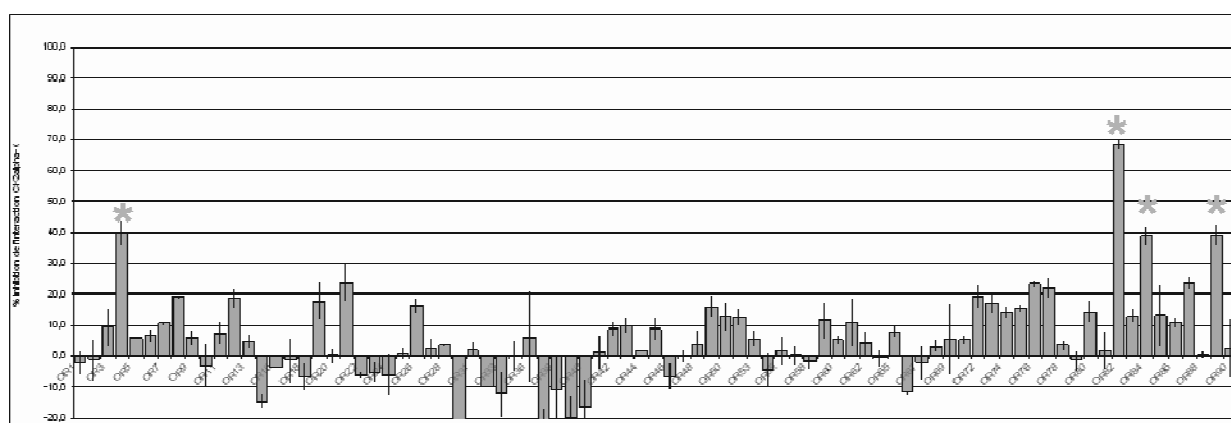


Figure 73 : Résultats du test des 84 composés de type éthers *in vitro*, à 400  $\mu$ M.

Quatre composés actifs émergent (figure 74) : OR4 : 39,7% d'inhibition de l'interaction CK2 $\alpha$ -CK2 $\beta$  ; OR82 : 68,2% d'inhibition ; OR84 : 38,9% d'inhibition ; OR89 : 39,2% d'inhibition. Leur IC<sub>50</sub> *in vitro* a été déterminée. OR82 présente une IC<sub>50</sub> de 350  $\mu$ M. Les 3 autres composés ont une IC<sub>50</sub> supérieure à 400  $\mu$ M.

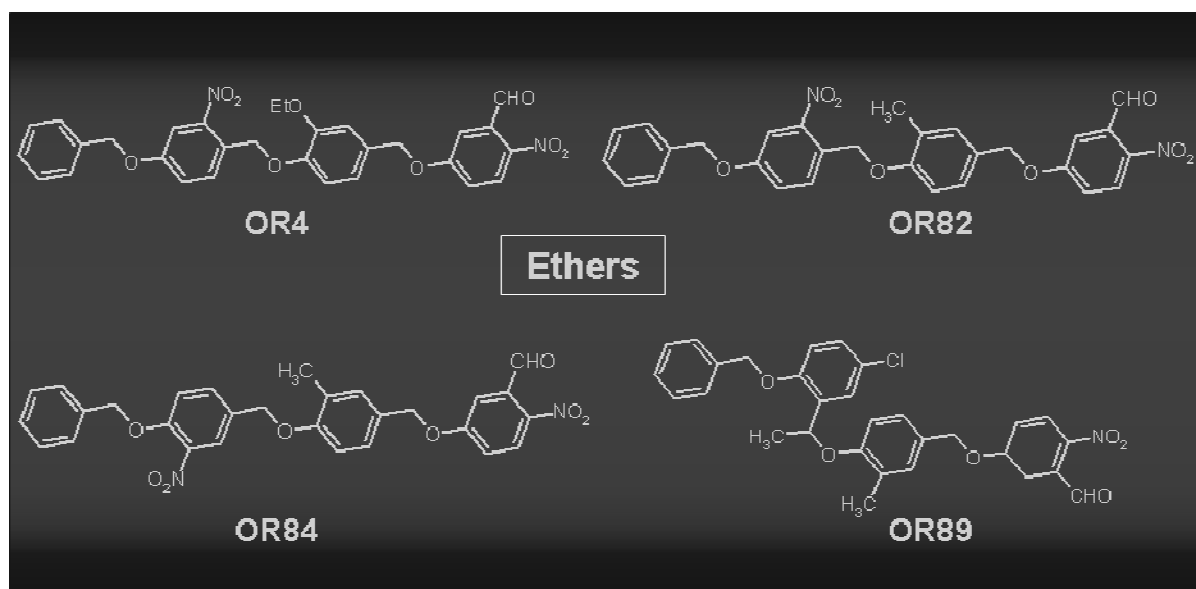
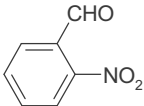



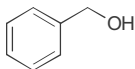
Figure 74 : Structure des 4 composés sélectionnés *in vitro*.

- **Relations structure-activité**

Parmi les composés sélectionnés, ces 4 composés sont les seuls à présenter un groupe

**nitrobenzaldéhyde**  en position **ortho**. La disposition ortho entre l'aldéhyde et le nitro apparaît critique, en comparant les composés 82 et 83, dont seule cette position varie. De même, les composés 38, 83, 85, 87, 88, 90 en position meta sont inactifs.

D'autre part, les composés inactifs présentent soit une fonction aldéhyde  seule

(composés 2, 6, 24, 27, 50...), soit une fonction alcool benzylique  . La fonction aldéhyde n'est donc pas suffisante, et le mode d'action du composé doit être plus complexe qu'un simple pontage de lysine.

Cependant, le motif orthonitrobenzaldéhyde semble être nécessaire mais pas suffisant, car les composés 30 et 49 qui possèdent ce motif sont inactifs.

En comparant les composés 4 et 82 (OR82 étant le plus actif), le **groupement méthyl du 2° cycle** apparaît plus favorable qu'un groupement ethoxy. En comparant les composés 4, 82 et 84, on peut également formuler l'hypothèse que le **groupement nitro du 3° cycle situé en position ortho** soit plus favorable qu'en position méta.

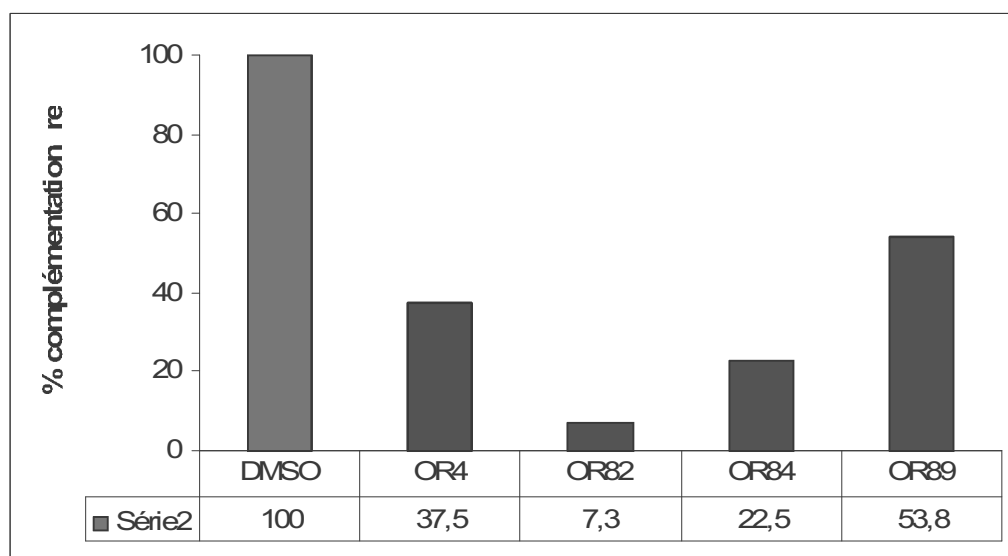
De même, le groupement méthyl, absent dans le composé 89 pourtant actif, peut voir son espace occupé par le méthyl situé à proximité de l'éther et compenser son encombrement. Le composé OR89 a un centre chiral et est un mélange racémique : on peut donc envisager qu'après séparation, l'une des deux formes soit davantage efficace.

Par ailleurs, sur la partie latérale gauche, on peut dire que les **3° et 4° cycles** sont nécessaires : des molécules plus courtes sont inefficaces (composés 5, 7, 12, 13, 15, 22, 31, 32, etc.). Il faut donc une certaine longueur de maille.

Autre point remarquable, ces molécules sont à la fois **relativement flexibles** et actives, alors que l'on a vu qu'une certaine rigidité était indispensable. Ceci laisse supposer qu'elle agissent selon un mode d'action (ou site d'interaction) différent de celui des composés de type Bipâquerette.

- **Efficacité de ces composés au niveau cellulaire**

Les 4 composés « lead » ont été testés dans le modèle BiFc décrit précédemment (figure 75).

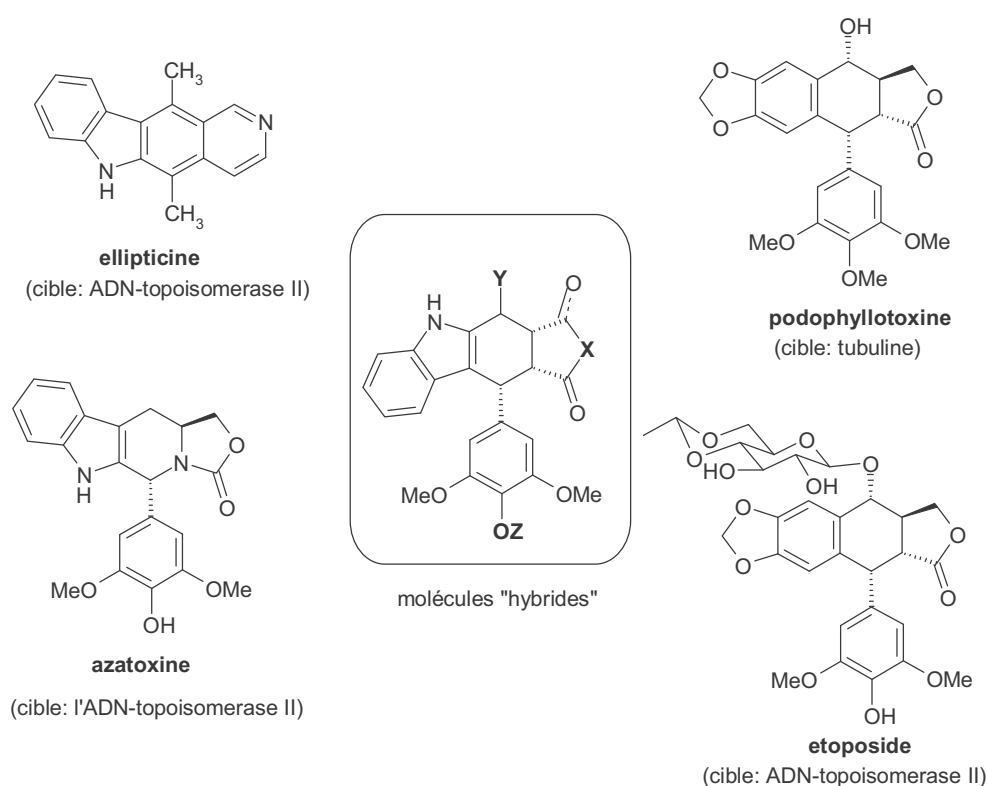


**Figure 75 : Résultats des 4 composés de type éthers en BiFc à 100  $\mu$ M.** Entre 400 et 600 cellules sur une douzaine d'acquisitions ont été comptées. Les résultats sont présentés en % de complémentation relatif au témoin DMSO.

Les 4 composés se révèlent être actifs dans ce test. De façon intéressante, le composé OR82, tête de liste *in vitro*, apparaît également le plus efficace *in vivo*.

## 2- Composés « hybrides » de type ellipticine/azatoxine/etoposide/podophyllotoxine (Y. Wong, DPM, Grenoble)

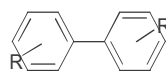
36 composés dérivés « hybrides » de type ellipticine/azatoxine/etoposide (cible connue : l'ADN-topoisomérase II) et podophyllotoxine (cible connue : tubuline), de la famille des lignanes, nous ont été fournis par Yung-Sing Wong, DPM, Grenoble, (figures 76 et 77), et ont été testés à 100  $\mu$ M *in vitro*.



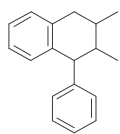
**Figure 76** : L'**ellipticine**, issue de la plante australienne *Ochrasia elliptica*, est un agent intercalant de l'ADN (forme un complexe stable ADN-Topoisomérase II), antinéoplasique et immunosuppresseur utilisé dans le traitement des cancers du sein métastasés (Garbett, 2004). L'**étoposide** est un inhibiteur de la topoisomérase II, utilisé dans le traitement d'un large spectre de cancers (poumon, testicule, lymphome, leucémie, myéloblastome). (Montecucco, 2007). L'**azatoxine** a été synthétisée par « rational design » à partir de l'ellipticine et de l'étoposide et a une activité « hybride » partageant l'activité ellipticine et etoposide sur l'ADN-topoisomérase (Cline, 1997). La **podophyllotoxine** est un produit naturel (extraite des rhizomes de American Mayapple *Podophyllum peltatum*) connu pour inhiber la polymérisation de la tubuline (Gordaliza, 2004) Elle sert de précurseur pour la synthèse de l'étoposide.

Ces molécules « hybrides » possèdent certaines caractéristiques pertinentes vis-à-vis des données pharmacophoriques relatives à l'interaction CK2 $\alpha$ -CK2 $\beta$  : elles sont **rigides**,

étendues, **polycycliques** avec un motif bi-arylique



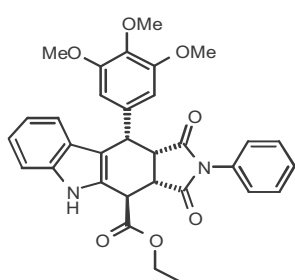
de type cyclolignane



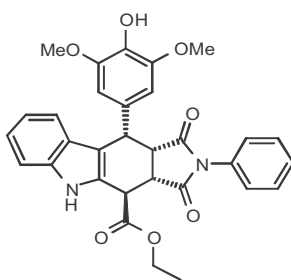
. Ce motif revêt une grande importance : il est reconnu comme étant une sous-structure privilégiée ayant des propriétés de reconnaissance forte avec les protéines. Ainsi, il apparaît dans 4,3% des médicaments d'aujourd'hui. Malgré ce large spectre d'affinité, un bon niveau de spécificité peut être atteint grâce aux variations des substituants (Hajduk, 2000).

Enfin, ces composés présentent un grand nombre de **centres asymétriques** (reconnaissance plus spécifique avec la protéine cible qui possède elle-même un caractère fortement asymétrique). Au cours de nos tests, ces molécules sont solubilisées dans l'éthanol ou le DMSO.

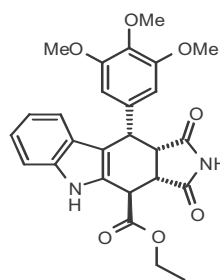
#### • Structure des composés



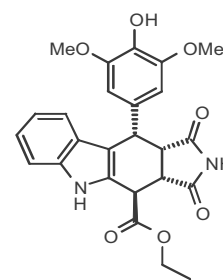
*rac-y s w 1 - 7 3*



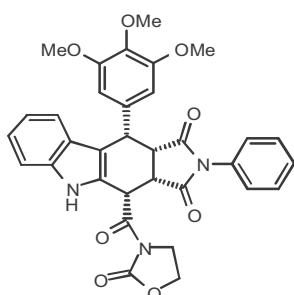
*rac-y s 5 0*



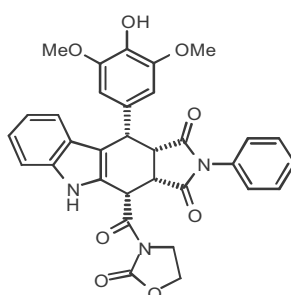
*rac-y s 1 0 9 f 1*



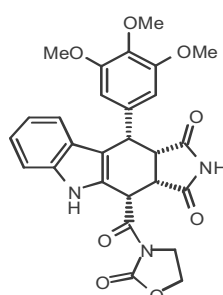
*rac-y s 1 0 0*



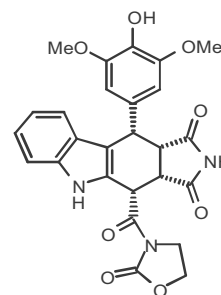
*rac-y s w 1 - 7 4*



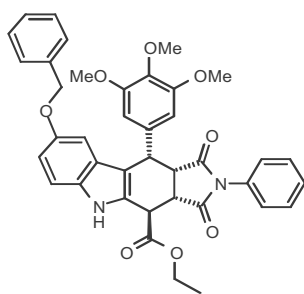
*rac-y s 4 5*



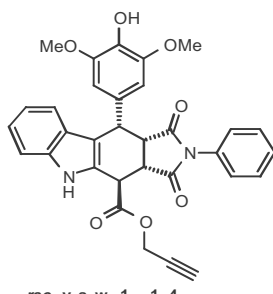
*rac-y s 1 8 9*



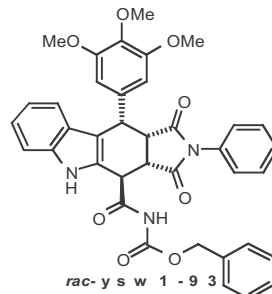
*rac-cse52f2*



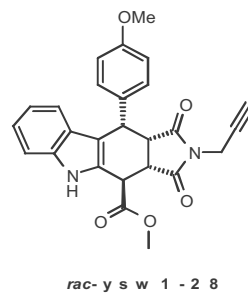
*rac-y s w 1 - 1 4 1*



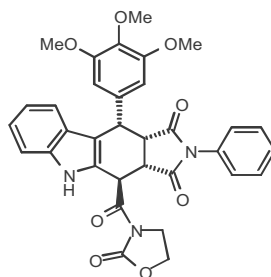
*rac-y s w 1 - 1 4*



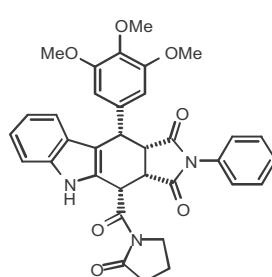
*rac-y s w 1 - 9 3*



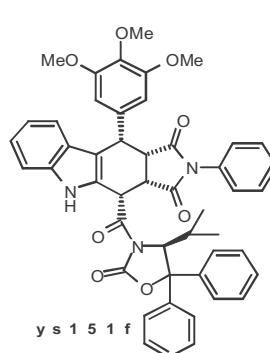
*rac-y s w 1 - 2 8*



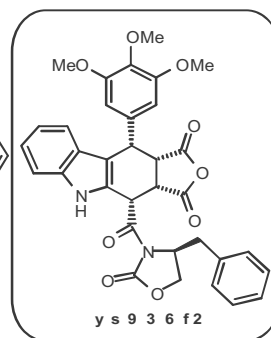
*rac-y s w 1 - 8 8 t*



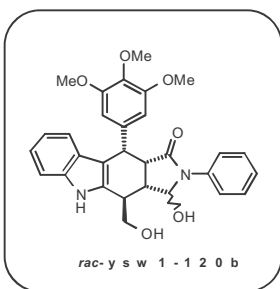
*rac-y s w 1 - 2 5*



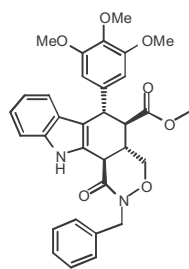
*y s 1 5 1 f*



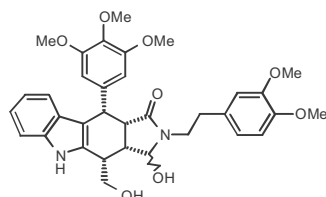
*y s 9 3 6 f 2*



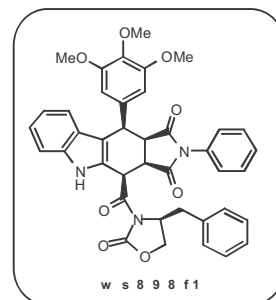
*rac-y s w 1 - 1 2 0 b*



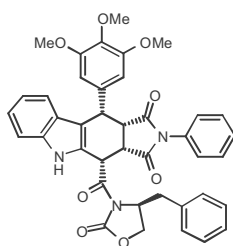
*rac-w s 9 2 5*



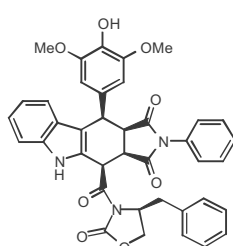
*rac-y s w 1 - 1 4 3*



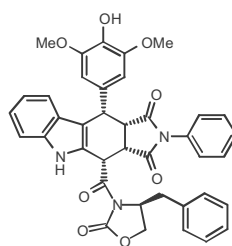
*w s 8 9 8 f 1*



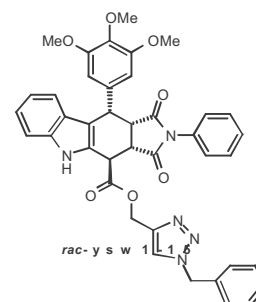
*w s 8 9 8 f 2*



*y s 1 8 3 f 1*



*y s 1 8 3 f 2*



*rac-y s w 1 - 1 6*



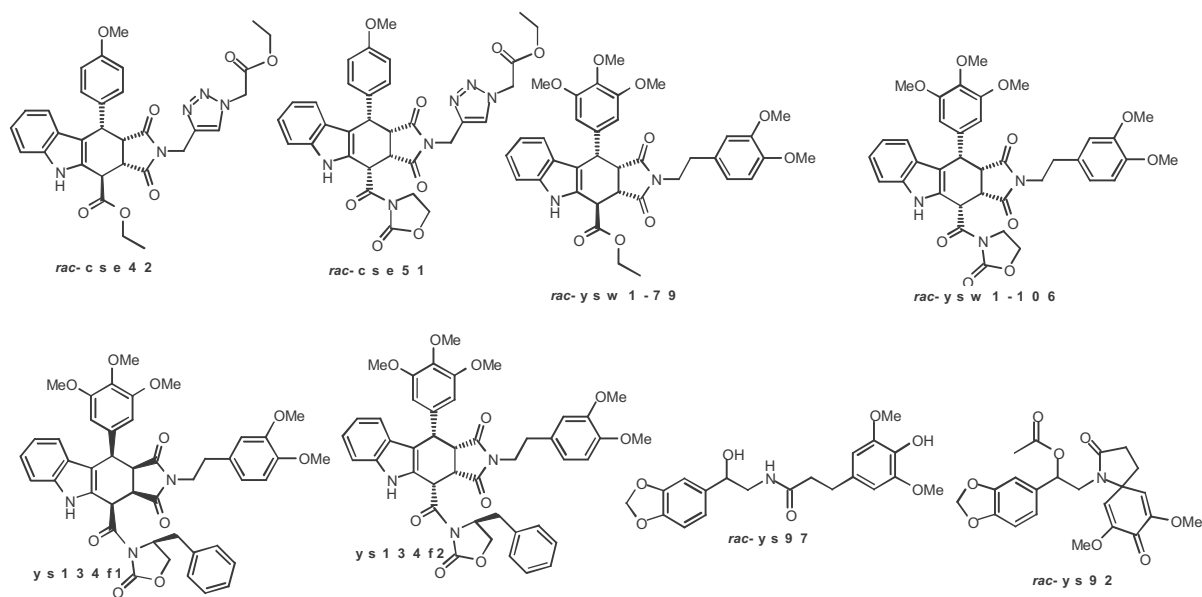
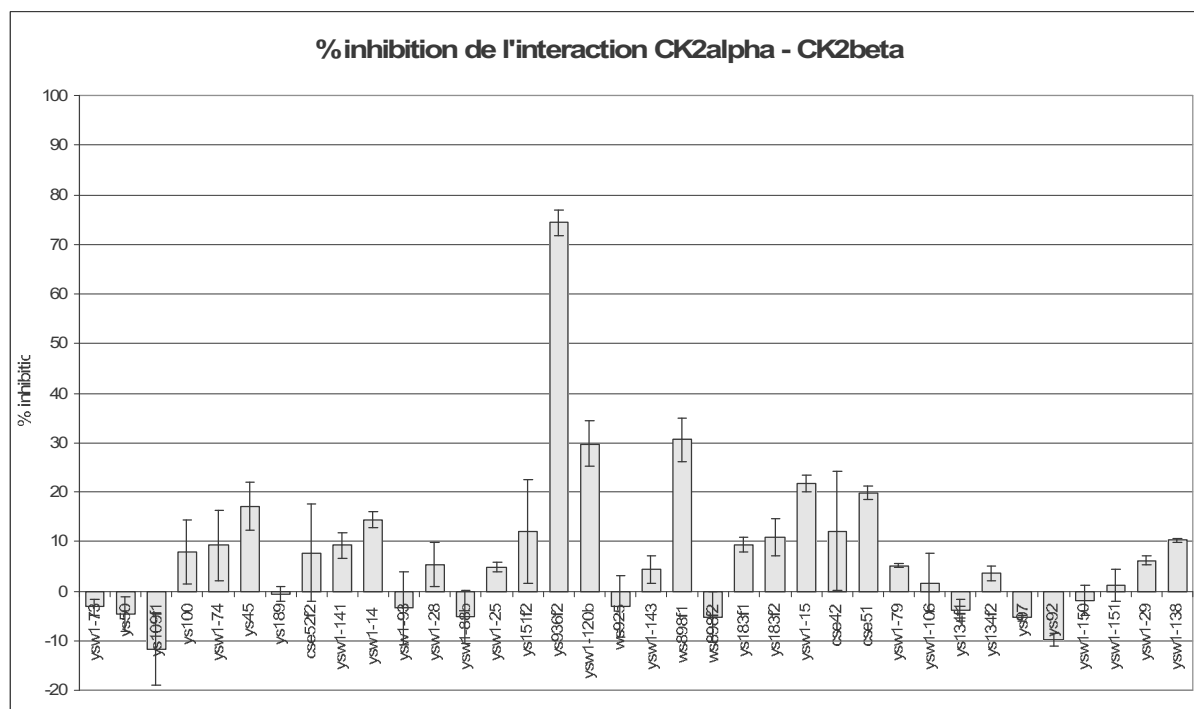


Figure 77 : Structure de 32 des 36 composés « hybrides ». Les molécules racémiques sont précédées de la mention *rac*.

- **Résultats et analyse des données des tests *in vitro* :**

Ces composés ont été évalués dans le test d'interaction radioactif CK2 $\alpha$ -CK2 $\beta$  à 100  $\mu$ M (figure 78). Trois composés ressortent de cette analyse (figure 79) : W16, W17 et W20.



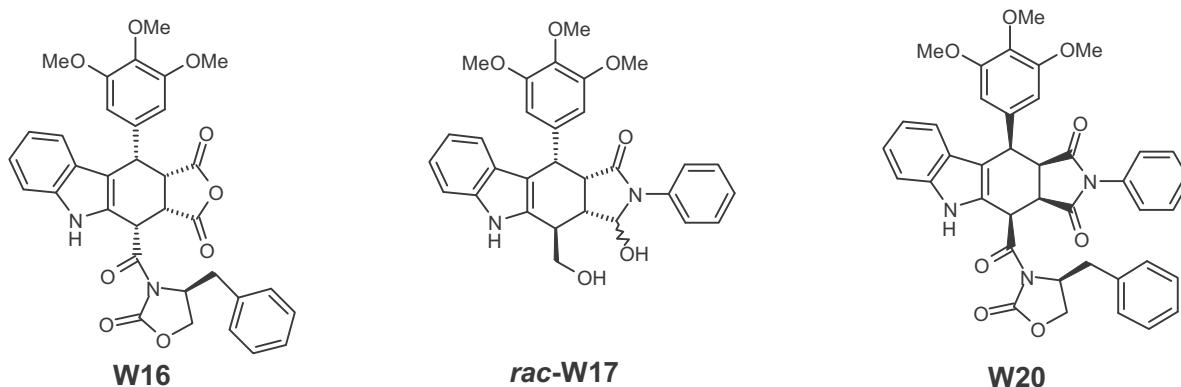


Figure 79 : Composés de la série « hybride » actifs pour inhiber l'interaction CK2 $\alpha$ -CK2 $\beta$ . W16 = ys936j2 ; W17 = ysw1-120b ; W20 = ws898f1.

Un composé possédant une fonction anhydride s'est révélé efficace à 75% à 100  $\mu$ M (W16, IC<sub>50</sub> = 40 $\mu$ M, MW = 610, figure x). Parmi les 36 composés, c'est en effet le seul à

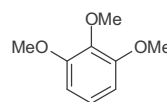
contenir ce motif, contrairement aux autres de type succinimide , amido-alcool

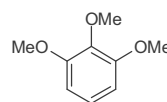
, arylamide, ou N-phényl succinimide et dérivés,

manifestement défavorables. Tous s'apparentent à des N-phthalimido non

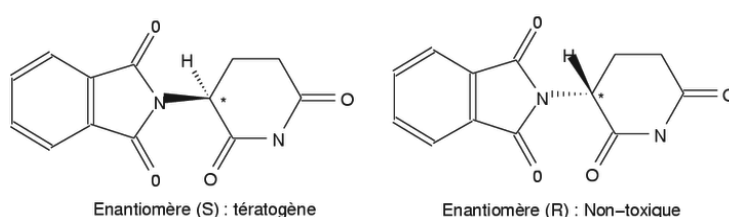
saturés, c'est-à-dire des cyclohexane-1,2-dicarboximide . La présence d'un substituant trop encombrant comme un groupement phényl ou une fonction protique (donneur de proton) tel que le NH du succinimide pourraient en être la cause. A noter que les produits actifs connus (azatoxine, etoposide, podophyllotoxine etc...) possèdent un cycle à cinq chaînons présentant eux aussi un atome d'oxygène en cette position (voir figure 76).

La partie indole apparaît également nécessaire mais pas suffisante. Elle semble néanmoins bien remplir son rôle de deuxième groupement aryl, important pour compléter le



motif bi-arylique. De même pour le groupement triméthoxy , il semblerait que son caractère hydrophobe soit important pour l'activité de la molécule. On retrouve ce même motif sur la podophillotoxine. On peut donc émettre l'hypothèse que ces motifs ont un « effet conjoint » pouvant expliquer l'efficacité des composés. Le produit *rac*-W17 présente d'ailleurs d'autres analogies structurales avec la podophillotoxine (présence d'une fonction alcool par exemple).

Par ailleurs, deux molécules sur les trois identifiées par le criblage sont énantiomériquement pures (W16 et W20), suggérant que pour les produits testés en racémique (*rac*), un des deux énantiomères pourrait être plus actif. Il est intéressant de souligner l'importance du caractère asymétrique des composés pour la reconnaissance de la protéine, particulièrement dans le cas d'une interaction protéine-protéine asymétrique comme l'interaction CK2 $\alpha$ -CK2 $\beta$ . La chiralité du cycle à 6 semble être importante. Par exemple, pour W20, son diastéréoisomère ws898f2, bien que possédant les mêmes fonctions mais orientées de façon différente dans l'espace tri-dimensionnel, ne présente pas d'activité notable. On peut ainsi citer l'exemple de la thalidomide (figure 80) dont un énantiomère est actif et l'autre est toxique.



**Figure 80 : Structure de la thalidomide (N-phthalimido-glutarimide).** Vendu comme hypnotique et antiémétique pour la femme enceinte dans les années 1950-60, ce composé est actuellement utilisé en France uniquement pour ses effets anti-angiogéniques dans certaines formes de myélomes, en inhibant TNF- $\alpha$  et en modulant de nombreuses cytokines (b-FGF, VEGF, cox-2...) (Leleu, 2005).

Enfin, de manière plus globale, on peut supposer que le composé agit majoritairement par interaction hydrophobe, notamment via les groupements bi-aryls, ce qui est une caractéristique majeure de l'interaction CK2 $\alpha$ -CK2 $\beta$ , et des interactions protéine-protéine en général.

Ces composés sont actuellement en cours de test BiFc pour évaluer leur efficacité et spécificité cellulaire.

# **DISCUSSION ET PERSPECTIVES**

## DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Au cours de ce travail de thèse, l'utilisation de techniques d'imagerie de fluorescence m'a permis de confirmer que CK2 est un complexe dynamique dans les cellules, et m'a conduit à mettre en place différentes stratégies pour développer des molécules inhibitrices de l'interaction CK2 $\alpha$ -CK2 $\beta$ , réputée de haute affinité.

En premier lieu, la mise au point d'un test d'interaction a permis de montrer que l'équilibre dynamique entre les sous-unités de CK2 est observable *in vitro*. Malgré la forte affinité du complexe, il est possible d'observer un renouvellement des sous-unités engagées dans le complexe *in vitro*. Cet échange de 85% est atteint après 1h d'incubation.

Notre première stratégie a consisté à réaliser un criblage à haut-débit d'une chimiothèque de petites molécules (NCI) et d'une chimiothèque plus ciblée de peptidomimétiques. Cette approche s'est soldée par un échec. Cependant, il serait intéressant d'explorer davantage l'implication du CisPt vis-à-vis de CK2 et ses conséquences. En effet, l'interaction du CisPt avec CK2 $\beta$  a déjà été rapportée (Kupper, 1994 ; Guerra, 1998). Le CisPt est en effet actuellement utilisé pour traiter certains cancers des testicules, de l'ovaire, de la sphère ORL, de l'oesophage, du col de l'utérus, de la vessie et de la peau, en inhibant la synthèse de l'ADN et donc la multiplication cellulaire.

De même, les 5 ou 6 combinaisons potentielles de peptidomimétiques tirées de la sous-chimiothèque « Positional scanning-Delete synthesis » pourraient être synthétisées et testées. Il est probable qu'une tolérance au niveau de certains groupements soit responsable de l'hétérogénéité des résultats de déconvolution. Le facteur limitant a été notre dépendance vis-à-vis des synthèses chimiques qui ne nous a pas permis de pousser plus loin l'investigation.

Cela ne remet pas en cause l'intérêt de ce type de criblage pour inhiber une interaction protéine-protéine, car de plus en plus de nouvelles molécules sont identifiées par cette méthode. Cela souligne plutôt une particularité supplémentaire de la protéine kinase CK2 et particulièrement la stringence de l'interaction entre ses sous-unités.

Nous nous sommes alors tournés vers une approche basée sur la structure cristallographique du tétramère. Une observation précise de la zone d'interaction CK2 $\alpha$ -CK2 $\beta$  a relevé la présence d'une boucle C-terminale de CK2 $\beta$  venant s'insérer dans un sillon hydrophobe de CK2 $\alpha$ . Afin de déterminer les propriétés de cette interface, il nous a paru essentiel de déterminer la contribution spécifique de chaque résidu. Effectivement, les

succès en matière d'inhibiteurs d'interaction protéine-protéine sont souvent précédés d'une caractérisation poussée de la zone d'interaction qui met en exergue seulement 2, 3 ou 4 résidus critiques – les « hot spots ». Bien que la surface d'interaction soit généralement plus étendue que celle d'un site catalytique, il est remarquable de constater que ces quelques résidus contribuent en fait pour 70 à 80% de l'énergie libre d'interaction et sont souvent décisifs pour l'assemblage, à la manière d'une baïonnette. Nous aurions pu alors envisager une mutagenèse systématique de la zone 185-192 de CK2 $\beta$  mais étant donnée la lourdeur des expérimentations, nous avons préféré accumuler d'autres arguments nous permettant de cibler préférentiellement 3 positions : M166, Y188, F190. Les protéines CK2 $\beta$  mutantes sur Y188 et F190 se sont révélées incapables d'interagir avec CK2 $\alpha$  par différentes approches biochimiques et cellulaires. Ces résultats nous ont permis de valider ces deux résidus comme les « hot spots » de l'interaction CK2 $\alpha$ -CK2 $\beta$ . Ils nous ont surtout convaincu qu'inhiber cette interaction protéine-protéine devait être possible. Cette étude pourrait être complétée par la mesure du  $K_D$  des protéines mutantes (en BIAcore par exemple) et par le calcul des énergies libres d'interaction  $\Delta\Delta G$  (en microcalorimétrie). Il serait également complémentaire de déployer la même approche pour identifier les hot spots sur la face CK2 $\alpha$ , dont la Leucine 41 semble elle aussi jouer un rôle critique.

Point important, ces données biochimiques ont été déterminantes pour la conception rationnelle du premier inhibiteur de l'interaction CK2 $\alpha$ -CK2 $\beta$  : un peptide cyclique de 11 acides aminés nommé Pc. Ce peptide peut aussi bien inhiber la formation du complexe ( $IC_{50} = 3\mu M$ ) que dissocier le complexe préformé ( $IC_{50} = 6,5\mu M$ ). Mesurer l'affinité du peptide Pc (en BIAcore) pourrait donner un élément de comparaison supplémentaire. Plusieurs peptides dérivés de Pc sont également actifs et ont permis de mettre l'accent sur l'importance de la contrainte et de la rigidité du peptide pour son activité. Ces résultats soulignent l'importance du sillon hydrophobe de CK2 $\alpha$  comme un nouveau site potentiellement sensible à une inhibition pharmacologique. La flexibilité du bras qui peut obturer ce sillon, observée par comparaison de la structure monomérique et tétramérique de CK2, induite par la fixation de CK2 $\beta$ , corrobore la nécessité d'une molécule suffisamment rigide pour être capable de mimer cette action. Cette propriété a été confirmée par la suite par l'identification de molécules inhibitrices particulièrement rigides.

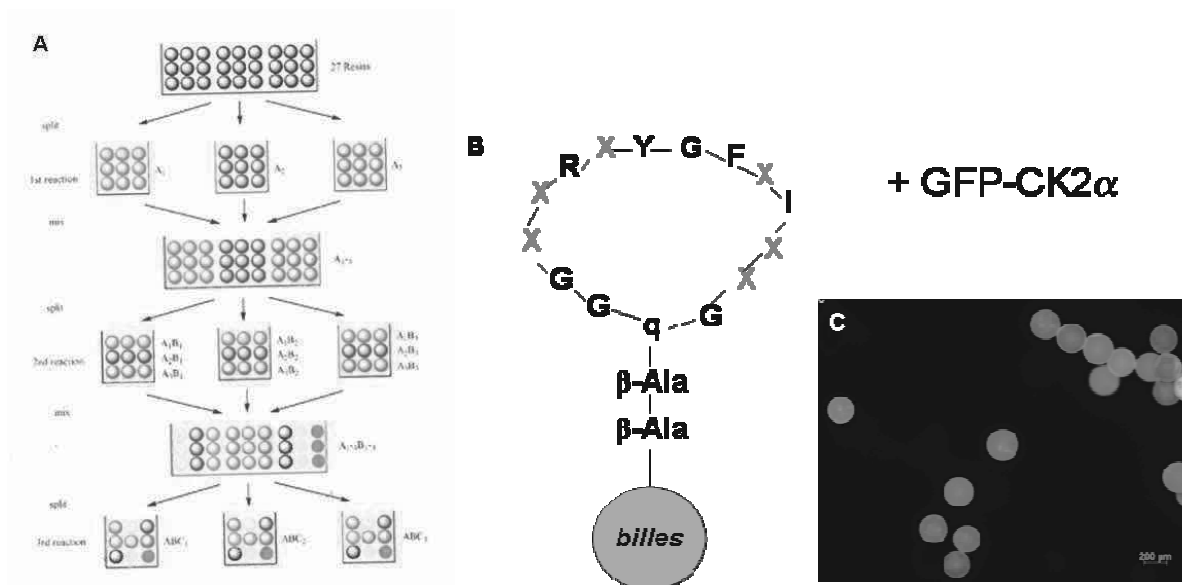
Les peptides inhibiteurs possèdent les conséquences fonctionnelles attendues pour la phosphorylation de substrats CK2 $\beta$ -dépendants *in vitro* : leur rôle d'antagoniste pour ces phosphorylations est atteint.

Afin d'évaluer son activité *in vivo*, le peptide Pc a été mis en présence de cellules en culture mais aucun phénotype concernant leur viabilité n'a été observé. Cependant, les inhibiteurs

peptidiques sont fréquemment connus pour ne pas entrer dans la cellule. Des tentatives de microinjection cellulaire du peptide Pc ont été réalisées sans succès. Il faut noter qu'un peptide cyclisé *via* des cystéines peut se linéariser en fonction des conditions de la cellule et être facilement dégradé, les protéases s'ancrant aux extrémités Gly du peptide Pc, qui dès lors ne trouve plus sa cible. Des essais de microinjection devraient être poursuivis avec le peptide PcL3, cyclisé de type head-to-tail, et donc théoriquement plus résistant tant aux protéases qu'aux variations de conditions redox. L'optimisation du peptide peut aussi se faire par l'utilisation d'acides aminés non-naturels (qui préserve la fonctionnalité des chaînes latérales) ou de D-acides aminés.

D'autres stratégies pourront être appliquées, notamment la fusion du peptide à la GFP suivi d'une transfection ou de fusion du peptide à une séquence « chariot » (Tat, penetratin, Protein Transducing Domains...) lui permettant de franchir la barrière membranaire (avec éventuellement une sonde fluorescente permettant un suivi en microscopie confocale).

Une recherche d'optimisation des peptides inhibiteurs est également en cours. D'une part, des essais de co-cristallisation CK2 $\alpha$ (1-335)-peptide Pc ont déjà été réalisés en collaboration avec Jean-Baptiste Reiser (Laboratoire de Cristallogénèse et cristallographie des protéines, IBS, PSB partnership for structural biology CIBB Carl Institute Building). Les premiers cristaux obtenus par soaking (trempage) ont diffracté avec plusieurs mailles, car le cristal était peut-être morcelé, et ont donné plusieurs figures de diffraction inexploitable pour l'instant. D'autre part, une méthode de synthèse combinatoire de type split-and-mix a permis de réaliser une librairie d'environ 15 625 peptides cycliques (squelette de 14 acides aminés head-to-tail, basé sur celui de PcL3) immobilisés sur billes Tentagel (V.Dulery, O.Renaudet, DCM, Grenoble). Six positions du peptide ont été aléatoirement variées. Les peptides seront incubés avec de la CK2 $\alpha$  fusionnée à GFP pendant 1h, lavés, et les billes fluorescentes seront isolées. Ce type de combinaison permet ensuite une déconvolution mathématique après séquençage et analyse en spectrométrie de masse (Ying, 2005, Wittmann, 2004), figure 81.



**Figure 81 : Principe de la synthèse d'une librairie de peptides combinatoires de type split-and-mix (A).** Six positions des peptides 14-mer immobilisés sur billes sont variées aléatoirement (B) puis incubés avec de la GFP-CK2α (C). Les billes fluorescentes sont celles portant un peptide interagissant avec CK2α.

Les propriétés particulières du sillon hydrophobe de CK2α et du peptide Pc nous ont conduit à rechercher des inhibiteurs chimiques qui peuvent s'avérer plus intéressantes que des peptides. Nous nous sommes pour cela appuyés sur les résultats concernant le peptide cyclique et ses points pharmacophoriques.

Dans un premier temps, un criblage virtuel a permis d'identifier une molécule chimique hydrophobe de type N-hydroxyphthalimide, V12, capable d'inhiber l'interaction CK2α-CK2β avec une IC<sub>50</sub> *in vitro* de 35μM. En collaboration avec des chimistes du bassin grenoblois (J.Jacq, J.Einhorn, DCM, Grenoble), une série d'analogues de V12 a également été testée. Pour évaluer leurs effets cellulaires, le modèle de complémentation bimoléculaire de fluorescence (BiFc) développé pour valider les protéines mutantes de CK2β a été adapté pour mettre au point un test cellulaire d'interaction. Les molécules chimiques ont été évaluées dans ce test et guident aujourd'hui les nouvelles synthèses en vue d'améliorer leur efficacité (collaboration J.Jacq, thésard au DCM). L'identification des groupements importants pour l'activité de la molécule est un point important. Cette connaissance permettra de greffer une biotine servant à immobiliser le composé sur une colonne ; un lysat cellulaire passé sur cette colonne renseignerait sur la spécificité du composé (retrouve-t-on bien CK2 ? existe-t-il d'autres cibles « off-targets » ?). Le greffage d'une sonde fluorescente ou radioactive permettrait de suivre la molécule dans la cellule. Le composé JE16 (un dérivé de V12) est à présent le composé phare qui montre un effet spectaculaire sur la viabilité des cellules en culture. Il demeure toutefois indispensable de réaliser des études



complémentaires afin de pouvoir établir un lien direct entre l'inhibition de l'interaction CK2 $\alpha$ -CK2 $\beta$  par JE16 et l'inhibition de la viabilité cellulaire et de s'assurer que JE16 n'est pas un composé cytotoxique.

Le test BiFc utilisé dans notre étude nous renseigne à la fois sur la pénétrabilité des composés dans la cellule mais répond aussi à la question de savoir si la cible (l'interaction CK2 $\alpha$ -CK2 $\beta$ ) est bien atteinte. Une diminution de fluorescence (après avoir vérifié que le niveau d'expression des protéines n'est pas affecté) permet d'affirmer que l'interaction entre les sous-unités de CK2 est compromise. Ce test ne permet toutefois pas de conclure quant à la spécificité des molécules, qui peuvent très bien interagir avec d'autres protéines cellulaires. La principale faiblesse de ce test réside dans le caractère irréversible de la reconstitution de la protéine YFP, ce qui nécessite donc d'ajouter les composés à tester à un moment judicieux afin de visualiser un empêchement d'association. De plus, ce test ne permet pas de visualiser une dissociation du complexe CK2 $\alpha$ -CK2 $\beta$ . Néanmoins, il représente le premier test cellulaire capable de visualiser l'interaction des sous-unités de CK2 dans des cellules vivantes et à ce titre, il est actuellement prévu de l'automatiser afin de réaliser des criblages robotisés permettant d'identifier d'autres composés inhibiteurs (collaboration L. Lafanechère, CMBA, CEA, Grenoble). Par ailleurs, il serait intéressant de développer d'autres tests cellulaires mettant en jeu une complémentarité réversible : ubiquitine,  $\beta$ -galactosidase,  $\beta$ -lactamase, firefly luciférase... (Kerppola, 2006).

Malgré l'échec du criblage par docking, une autre tentative est en cours en collaboration avec le laboratoire de Ruben Abagyan et Adrian Sanjay Saldanha de la Scripps Clinic (San Diego, Etats-Unis). Leurs logiciels (ICM-Virtual Ligand Screening, Molsoft, [www.molsoft.com](http://www.molsoft.com)) développés très récemment ont permis de cribler 1,2 million de composés « drug-like » commerciaux et retenu 123 composés en tant qu'inhibiteurs potentiels de l'interaction CK2 $\alpha$ -CK2 $\beta$ . Ils se sont focalisés sur ce même sillon hydrophobe de CK2 $\alpha$ . Le criblage des 123 composés sélectionnés est en cours dans notre laboratoire.

Une caractérisation plus poussée des molécules de type éther (O. Renaudet, DCM, Grenoble) et des dérivés de l'ellipticine (Y. Wong, DPM, Grenoble) est également en cours.

Comme nous l'avons mentionné dans l'introduction, plusieurs protéines kinases interagissent avec et sont régulées par CK2 $\beta$  (A-Raf, c-Mos, Chk1, Lyn, PKC $\zeta$ , p90<sup>rsk</sup>, Chk2...). Il serait donc intéressant d'examiner l'effet de nos inhibiteurs sur l'interaction entre ces protéines kinases et CK2 $\beta$ . Ces protéines kinases interagissant également avec l'extrémité C-terminale

de CK2 $\beta$ , si nos composés miment la boucle de CK2 $\beta$  interagissant avec CK2 $\alpha$ , seront-ils capables de rompre l'interaction entre CK2 $\beta$  et ces protéines kinases ? se fixent-ils aussi sur ces protéines kinases ? Un alignement de séquences primaires n'a pour l'instant pas mis en évidence de similitudes frappantes, mais une superposition des structures tridimensionnelles est prévue en collaboration avec des industriels (Fabrice Moriaud, société MEDIT, Molecular Extended Distribution in Information Technology, Palaiseau). Ceci permettrait de faire ressortir des domaines similaires entre ces protéines (hot spots ?) et apporterait des informations complémentaires pour l'orientation de la synthèse des inhibiteurs. En cas d'effet inhibiteur, il serait intéressant d'étudier les voies de signalisation dans lesquelles ces protéines sont impliquées.

Les inhibiteurs de l'interaction CK2 $\alpha$ -CK2 $\beta$  représentent donc d'abord des outils complémentaires pour étudier CK2 et comprendre son fonctionnement. Les différents substrats de CK2 n'ont pas été tous caractérisés du point de vue de leur CK2 $\beta$ -dépendance. Etant donné l'incroyable pléiotropie de CK2 et son rôle indéniable dans les pathologies cancéreuses, il est probable que l'interaction CK2 $\alpha$ -CK2 $\beta$  soit une cible critique permettant d'envisager des effets bénéfiques. Les conséquences fonctionnelles de cette inhibition devront être évaluées au niveau cellulaire (prolifération, survie, différenciation), notamment en comparant des cellules normales et cancéreuses.

Pour cela, la caractérisation des phénotypes observés en présence de ces inhibiteurs est en cours d'étude (activation de la voie des caspases,...). Les travaux menés en ce moment au laboratoire (Alexandre Deshières, Odile Filhol) sur un knock-down du gène de CK2 $\beta$  par shRNA pourraient aussi permettre d'aborder plus en détail les aspects fonctionnels d'une rupture de l'interaction CK2 $\alpha$ -CK2 $\beta$ . Effectivement, des cellules épithéliales mammaires infectées par des shRNA dirigés contre CK2 $\beta$  montrent un phénotype de perte de contact cellule-cellule en culture bidimensionnelle et une impossibilité à se différencier en acini mammaires. Ce phénotype peut être restauré par l'infection de CK2 $\beta$  insensible au shRNA (CK2 $\beta$  de poulet ayant la même séquence protéique que la CK2 $\beta$  humaine mais quelques différences au niveau de la séquence nucléotidique). Une infection avec de la CK2 $\beta$  mutante Y188A-F190A incapable d'interagir avec CK2 $\alpha$  est en cours afin de voir si le phénotype sauvage est restauré ou non et par là, de comprendre si l'interaction CK2 $\alpha$ -CK2 $\beta$  y contribue ou non.

# **MATERIELS ET METHODES**

## **MATERIELS ET METHODES**

### **I- BIOLOGIE MOLECULAIRE**

#### **Matériels et produits chimiques**

Différents types de bactéries chimiquement compétentes ont été utilisés. Pour la production d'ADN, les souches utilisées sont des *E.coli* DH5 $\alpha$  (laboratoire TS), Top10 (Invitrogen), XL1-Blue (Stratagene). Les milieux utilisés pour la culture bactérienne sont un milieu standard LB et un milieu SOC (Invitrogen), avec antibiotiques (Carbenicilline ou Kanamycine).

#### **Transformation de bactéries compétentes par choc thermique**

Les bactéries chimiquement compétentes (50 $\mu$ L) stockées à -80°C sont incubées 15min dans la glace, puis transférées dans un tube (Falcon, 14mL) en présence de 10 à 50ng d'ADN et incubées 30min dans la glace. La transformation est réalisée par choc thermique 45sec à 42°C, suivie de 2min dans la glace. Les bactéries sont ensuite incubées 1h à 37°C avec 500 $\mu$ L de milieu SOC (Invitrogen) sous agitation et étalées sur boîte LB-agar en présence de l'antibiotique de sélection.

#### **Mini, midi, et maxi-preps de plasmides**

Pour purifier rapidement l'ADN plasmidique de bactéries, les kits de mini-prep (Macherey-Nagel), midi-prep (Macherey-Nagel) ou maxi-prep (Qiagen) sont utilisés à partir de 5, 50 ou 250mL de culture sur la nuit selon le protocole du fabricant. Les culots d'ADN sont repris dans de l'eau stérile. La concentration en ADN plasmidique est déterminée par lecture de la densité optique à 260nm à l'aide du spectrophotomètre ND-1000 Nano-Drop. Les ADN sont conservés à -20°C.

#### **Mutagenèse dirigée**

Pour construire différents mutants de MBP-CK2 $\beta$ , une mutagenèse dirigée en Alanine a été réalisée à partir du vecteur pMALc2-CK2 $\beta$  (poulet), pECFP-CK2 $\beta$ , pEGFP-CK2 $\beta$ , pEYFP-CK2 $\beta$  (souris), d'amorces spécifiques (figure 84, Eurogentec) et du kit Quick Change Site-Directed Mutagenesis (Stratagene) selon le protocole du fabricant. Le principe repose sur une amplification par PCR de l'intégralité du plasmide à l'aide de la PfuTurbo DNA

polymerase et une paire d'amorces à cheval sur la mutation souhaitée. L'ADN parent est ensuite dégradé par l'enzyme DpnI qui ne reconnaît que l'ADN *dam* méthylé.

La disparition ou l'apparition d'un site de restriction à proximité de la mutation a été choisie afin de cribler rapidement les clones ayant intégré la mutation. L'ADN plasmidique des clones sélectionnés est séquencé (Genome Express) pour vérification.

| Mutation    | Séquence des amorces                                                                    | Site de restriction modifié                          |
|-------------|-----------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------|
| M166A       | Sens 5' G TTC CCC CAT GCG CTC TTC ATG GTG 3'<br>F P H A L S M V                         | La mutation en Ala supprime le site NdeI CATATG      |
| M169A       | Sens 5' G TTC CCC CAT ATG CTC TTC GCG GTG 3'<br>F P H M L S A V                         | Pas de modification.                                 |
| Y188A       | Sens 5' GTG CCC AGG CTG GCT GGG TTC AAG ATC CAC CCT ATG G 3'<br>V P R L A G F K I H P M | Le site NcoI (CCATGG) ou Styl (CCWWGG) est supprimé. |
| F190A       | Sens 5' GTG CCC AGG CTG TAT GGG GCC AAG ATC CAC CCT ATG G 3'<br>V P R L Y G F K I H P M | Idem.                                                |
| Y188A-F190A | Sens 5' GTG CCC AGG CTG GCT GGG GCC AAG ATC CAC CCT ATG G 3'<br>V P R L A G A K I H P M | Idem.                                                |

Figure 84 : Séquence des amorces utilisées pour la mutagenèse dirigée.

Les triples mutants ont été réalisés par mutagenèses successives sur les plasmides mutés ponctuellement.

L'ADN est visualisé après migration à 100V dans un gel d'agarose 0,8% dans du tampon TAE 0,5X en présence de Bromure d'Ethidium 1/20 000 sous UV.

### Sous-Clonage

Plusieurs sous-clonages ont été réalisés. A titre d'exemple concernant la méthodologie, deux d'entre eux seront développés ici.

- **Sous-clonage avec PCR de l'insert de pMALc2-MBP-CK2β166-188-190 vers le vecteur pMSCVNeoHA-CK2β**

Le fragment CK2β de pMALc2-MBP-CK2β mutants est amplifié par PCR avec les amorces LZ1 et LZ2 (94°C, 5min - 20 cycles de - 94°C, 30'' - 55°C, 30'' – 74°C, 1min30'' – 74°C, 8min – 4°C). L'amorce LZ1 correspond au site de restriction de EcoRI, suivi du tag HA et de 7

codons de CK2 $\beta$  (5' TT **GAA TTC** GCG GCC ACC ATG TAT CCT TAT GAT GTT CCT GAT TAT GCT ATG AGC AGC TCC GAG GAG GTG 3'). L'amorce LZ2 comprend les 5 derniers codons de CK2 $\beta$ , un codon stop et le site de restriction de BglII (5' GA **AGA TCT** TCA GCG GAT GGT CTT CAC G 3'). L'ADN amplifié est purifié sur un grand gel d'agarose 1%, extrait (kit GeneClean III, Q-Biogene), et digéré EcoRI-BglII (Invitrogen) 16h à 37°C. De même, le vecteur pMSCVNeoHA-CK2 $\beta$  est digéré 1h à 37°C avec EcoRI-BglII, déposé sur un grand gel d'agarose et extrait. La ligation (2h, 22°C, Fermentas) est réalisée entre l'insert et le vecteur. Un  $\mu$ L du produit de ligation est utilisé pour transformer des bactéries compétentes Top 10 (Invitrogen) ou DH5 $\alpha$ . A titre de témoin, on utilise le vecteur linéarisé seul en transformation. Après étalement sur boîtes LB-agar-Carbenicilline, 1 nuit à 37°C, quelques clones sont amplifiés dans 5mL de LB-Carbe, 1 nuit à 37°C sous agitation. L'ADN des colonies est extrait par mini-prep (kit Macherey-Nagel), digéré EcoRI-BglII, et déposé sur gel d'agarose pour vérifier la présence de l'insert. Les plasmides sont séquencés pour contrôle avec les amorces LZ1 et LZ2 (Genome Express).

- **Sous-clonage de l'insert de pMALc2-MBP-CK2 $\beta$ 188-190 vers le vecteur pSG5-HA**

Après une double digestion XhoI-PflmI (New England Biolabs), 1h à 37°C, les inserts des deux plasmides sont séparés des vecteurs linéarisés par gel d'agarose suivi d'une purification avec GeneClean kit III. La ligation s'effectue avec la T4DNA Ligase (Invitrogen), suivie d'une transformation en bactéries Top10, étalées en boîte LB-agar-Kanamycine sur la nuit à 37°C. Quelques colonies sont amplifiées et leur ADN, extrait par mini-prep, est digéré avec les mêmes enzymes pour contrôler la présence et la taille de l'insert.

### **Extraction d'ARN de cellules de mammifères, transcription réverse et détection par PCR de CK2 $\beta$ aviaire**

Après un rinçage avec du PBS, l'ARN est extrait des cellules de mammifères à l'aide du kit Absolutely RNA Miniprep Kit (#400800, Stratagene). L'ARN est repris dans le tampon d'élution fourni, dosé à 260 et 280nm (NanoDrop) et conservé à -80°C.

L'ADNc est produit par transcription réverse et la présence de la CK2 $\beta$  exogène (aviaire) est testée par PCR semi-quantitative avec une amorce comportant la séquence HA et les premiers codons de CK2 $\beta$  de poulet (5' CCT TAT GAT GTT CCT GAT TAT GCT 3') et une autre comportant une zone de CK2 $\beta$  de poulet différente sur 3 paires de bases de celle de

l'isoforme humaine (zone nucléotidique 171-187, 5' CCTCCAACTCCTCGTCAG 3'). D'après le logiciel Amplify 3.1 for MacOSX ([www.engels.genetics.wisc.edu/amplify/](http://www.engels.genetics.wisc.edu/amplify/)), ces amorces ont une faible probabilité d'amplifier la CK2b humaine (primability = 80, stability = 60 vs 100 et 100 pour la CK2β chicken). Ceci nous permet de n'amplifier que la HA-CK2β chicken ajoutée rétroviralement et non la CK2β humaine endogène.

### **Séquences shRNA-CK2β**

Des shRNA dirigés contre CK2β humaine ont été synthétisés (Sigma, figure 85). Ce sont des particules lentivirales permettant d'éteindre un gène dans des cellules de mammifères. Après infection, des lignées cellulaires stables exprimant le shRNA peuvent être établies en sélectionnant avec la puromycine.

| Nom            | Nom CEA | Séquence                                                            |
|----------------|---------|---------------------------------------------------------------------|
| TRCN0000003794 | 94      | CCGGC <u>TTTGGTTACTGTCCTCGTGTCTCGAGACACGAGGACAGTAACCAAAG</u> TTTTT  |
| TRCN0000003796 | 96      | CCGGT <u>GGTTTCCCTCACATGCTCTTCTCGAGAAGAGCATGTGAGGGAAACCA</u> TTTTT  |
| TRCN0000003797 | 97      | CCGGTGAAGACTACATCCAGGACA <u>ACTCGAGTTGTCCTGGATGTAGTCTTCAT</u> TTTTT |

**Figure 85 : Séquence des shRNA dirigés contre CK2β.**

Ici, 3 shRNA anti-CK2β humaine sont disponibles. Ils diffèrent de la séquence de CK2β aviaire par 2 nucléotides (en rouge), dont celui situé en position 10, critique pour l'appariement. Une transfection de cellules shRNA CK2β humain avec la forme aviaire de CK2β ne devrait donc pas être affectée et devrait pouvoir restaurer le phénotype WT.

## II- BIOCHIMIE

### Matériel et produits chimiques

- Peptides

Les peptides ont été synthétisés par la société Eurogentec ou par V.Dulery et O.Renaudet (DCM, Grenoble).

Pour le peptide cyclisé via des cystines, une détection des thiols –SH par test d'Ellman est réalisée afin de contrôler que 100% de peptide est bien cyclisé. Deux solutions A et B contenant respectivement 2mM de DTNB, 50mM d'acétate de sodium et 1M Tris, pH8 sont préparées. 50µL de A sont mélangés avec 100µL de B et 840uL d'eau, puis 10µL de peptide à 1mM sont ajoutés. Après une incubation de 5min à 22°C, l'absorbance à 412nm est mesurée. A titre de control, le DTT 1mM est utilisé. Les valeurs obtenues sont : pour le peptide Pc 0,001 ; pour le DTT, 0,243. On peut donc considérer que >99,5% des ponts disulfure du peptide Pc n'ont pas été réduits dans les conditions de stockage (eau, -20°C).

- Bactéries

Les souches utilisées sont des bactéries chimiquement compétentes. Pour l'expression de protéines, les souches utilisées sont des E.coli BL21 (laboratoire TS) ou Star (Novagen). Les milieux utilisés pour la culture bactérienne sont un milieu standard LB et un milieu SOC (Invitrogen), avec antibiotiques (Carbenicilline ou Kanamycine).

- Anticorps

Anticorps Primaires :

| Anti-                         | Mono/polyclonal            | Dilution           |
|-------------------------------|----------------------------|--------------------|
| GST                           | Mono                       | 1/1000 en WB       |
| CK2 $\alpha$ ( $\alpha$ -coc) | Poly                       | 1/5000 en WB       |
| CK2 $\beta$ C-ter             | Poly                       | 1/1000 en WB       |
| Lamine C                      | Poly (guinea pig)          | 1/1000 en IF       |
| actine                        | Phalloïdine Alexa Fluo 488 | 1/100 avec Hoechst |
| HA 12CA5                      | mono                       | 1/1000 en WB       |
| $\alpha$ -tubuline            | mono                       | 1/10 000 en WB     |



|                   |      |              |
|-------------------|------|--------------|
| E-cadhérine       | mono | 1/300 en IF  |
| Caspase 3 activée | Poly | 1/1000 en IF |
| $\beta$ -caténine | Mono | 1/250 en IF  |
| GFP Abcam         | mono | 1/200 en IF  |
| GFP Abcam         | Poly | 1/200 en IF  |
| GFP Euromedex     | Mono | 1/5000 en WB |

Anticorps secondaires :

|                             |                |              |
|-----------------------------|----------------|--------------|
| Goat anti-mouse-HRP         | 1/5000 en WB   | 1/1000 en IF |
| Goat anti-rabbit-HRP        | 1/10 000 en WB |              |
| Anti-guinea pig – Alexa 633 |                | 1/1000 en IF |
| Goat anti-mouse-Cy3         |                | 1/1000 en IF |
| Goat anti-rabbit-Alexa 488  |                | 1/1000 en IF |

La Phalloïdine-Alexa 488 est utilisée au 1/200 en immunofluorescence lors du traitement avec l'anticorps secondaire.

- **Chimiothèques**

Les 2 chimiothèques criblées *in vitro* nous ont été fournies gracieusement dans le cadre de collaborations académiques.

- Chimiothèque du NCI

La chimiothèque du NCI « Mechanistic Diversity set » (879 composés) est un échantillon de la chimiothèque globale du NCI (plus de 250 000 composés), qui ont été sélectionnés pour leur capacité à inhiber la croissance de 60 lignées tumorales mais dont le mécanisme d'action demeure inconnu. Leur structure est disponible sur <http://dtp.nci.nih.gov>. Les composés sont répartis individuellement en plaques 96 puits (80 composés par plaque, colonnes 1 et 12 libres pour les témoins), dilués dans du DMSO à la concentration moyenne de **10mM** et conservés à -20°C en plaque thermo scellée et en présence de dessicant.

- Chimiothèque de Peptidomimétiques

La chimiothèque de peptidomimétiques (40 000 composés) provient du laboratoire de Dale Boger, du Department of Chemistry and The Skaggs Institute for Chemical Biology, The Scripps Research Institute, La Jolla, CA, Etats-Unis. Ces composés ont été conçus pour

moduler (inhiber, favoriser ou mimer) des interactions protéine-protéine (Boger, 2003, Ambroise, 2002) : leur taille est généralement plus importante que les composés classiques (500 à 2000Da), les zones d'interaction étant assez importantes ; ce sont souvent des dimères, afin d'augmenter leur efficacité par effet de multivalence (Biessen, 1995).

La chimiothèque est formatée de la manière suivante :

- une sous-chimiothèque de petite taille (1000 composés) se présente sous la forme de composés individuels (S : singletons), à la concentration moyenne de **5mM** dans du DMSO. Sont fournis 10 $\mu$ L.
- Une sous-chimiothèque de taille moyenne (1000 à 10 000 composés) est constituée de mélanges restreints (M : 10 composés/puit), à 5mM dans du DMSO (le mélange des 10 molécules constitue une solution à 5mM).
- Une autre sous-chimiothèque en cours de développement (25 000 à 1 000 000 de composés) de composés assemblés en combinatoire en phase liquide (chimiothèques « Positional scanning » ou « Deletion synthesis ») comprenant 100 à 28 000 composés/puits.

- Chimiothèques virtuelles

Pour les chimiothèques utilisées pour le criblage virtuel, voir dans la partie «IV- Bioinformatique ».

### **Production de protéines recombinantes fusionnées à MBP, GST, GFP ou His**

- **GFP-CK2 $\alpha$**

- Production

La GFP-CK2 $\alpha$  est produite en cellules Sf9 en suspension et à l'obscurité, infectées 72h par baculovirus contenant la séquence de His<sub>6</sub>-GFP-CK2 $\alpha$  (cellule : virus de 1 :1 à 1 :10). L'expression est contrôlée par observation d'une goutte au microscope à fluorescence (filtre FITC) et par une préculture de 10mL, lysée dans TDG, 0,5M NaCl, 0,5% Triton, 45min à 4°C puis 10min à 22°C suivi d'une centrifugation 54 à 5 000g, analyse en Western blot anti-CK2 $\alpha$ . Les cellules sont collectées par centrifugation 15min à 2000rpm, lavées 2 fois au PBS suivi de centrifugation 5min à 2000rpm. Le culot est congelé à -80°C.

- Lyse

Les cellules sont lysées dans 50mM Tris-HCl pH 8,5, 1% NP40, 10mM  $\beta$ -Mercaptoethanol, 0,5 $\mu$ g/mL leupeptine et aprotinine, 1 $\mu$ g/mL AEBSF, pendant 5min à 4°C sur roue, puis centrifugées 10min à 10000rpm.

- Purification

La purification s'effectue à l'obscurité. Le surnageant est incubé 1h à 4°C sur roue avec 1mL de colonne NiNTA (Invitrogen) préalablement rincée 5 fois avec le tampon de lavage 20mM Tris-HCl pH8, 0,5M KCl, 20mM Imidazole, 10% Glycérol, 10mM  $\beta$ -mercaptoéthanol. La suspension est montée dans une colonne et le filtrat rejeté. La colonne est lavée par 10 volumes de tampon de lavage, 2 volumes de tampon de lavage avec 1M KCl, puis 2 volumes de tampon de lavage. L'élution est réalisée avec 5 à 10 volumes de 20mM Tris-HCl pH 8,5, 100mM KCl, 100mM Imidazole, 10% glycérol, 10mM  $\beta$ -mercaptoéthanol, par fractions de 0,5mL.

Les fractions contenant de la protéine sont ensuite incubées 1h à 4°C sur roue sur une deuxième résine d'Héparine-sépharose préalablement lavée dans le tampon de colonne 20mM Tris-HCl pH 8,5, 2% glycérol, 1mM DTT, afin d'éliminer l'imidazole des tampons précédents et les contaminants. La colonne montée est lavée par 10 volumes de tampon de colonne additionné de 0,3M NaCl. L'élution est réalisée avec 10 volumes de tampon de colonne additionné de 1M NaCl. Les fractions sont analysées par gel SDS-PAGE et celles contenant la protéine sont concentrées sur Centricon (cutoff 30kDa). La protéine est aliquotée et conservée à -80°C.

- **GST-CK2 $\alpha$ -HA et GST**

- Production

Cinq mL de culture bactérienne (bactéries BL21) sont dilués dans 50 puis dans 250mL de LB+Carbenicilline et incubés sous agitation, 37°C, jusqu'à  $DO_{600\text{ nm}} = 0,6$ . L'expression est induite par l'ajout de 0,5mM final d'IPTG, 2h à 37°C, sous agitation. Les bactéries sont centrifugées 30min, 2000rpm, à 4°C et les culots pe sés et congelés à -80°C. L'induction est contrôlée en gel SDS-PAGE 12%.

- Lyse

Les culots sont décongelés dans la glace, repris dans 50mL de PBS, cocktail d'inhibiteurs (Sigma) puis lysés par sonication avec suivi Bradford. Après ajout de 1% Triton, la suspension est incubée 30min dans la glace puis centrifugée 30min, 10000rpm, 4°C.

- Purification

Le surnageant est incubé sur la nuit à 4°C, sur roue, avec 1mL de glutathion-sépharose (Amersham Biosciences) préalablement rincée dans le tampon de lyse. La colonne est

montée sur une seringue avec rondelle de Téflon, rincée avec 4 volumes de PBS, puis lavée avec 4 volumes de PBS, 0,3M NaCl, avec suivi Bradford. L'élution est réalisée avec 6 volumes de 50mM Tris-HCl, pH 8, 10mM glutathione réduite. Les fractions (500µL) sont analysées en Bradford et en gel SDS-PAGE, puis concentrées au Centricon 30 (Amicon). La glutathione réduite est éliminée par passage sur colonne Biospin P6 (Biorad). La protéine est dosée au BCA, aliquotée et stockée à -20°C.

- **GST-CK2 $\alpha$ -1-335**

- Production

Une transformation extemporanée de pGEX-CK2 $\alpha$ 1-335 (1µg) dans des bactéries Star (Novagen) est réalisée. Une colonie est repiquée dans 5mL de LB+Carbenicilline, puis dilués dans 50 puis 250mL puis 8 X 250mL de milieu et incubés sous agitation, 37°C, jusqu'à DO<sub>600 nm</sub> = 0,6. L'expression est induite par l'ajout de 0,5mM d'IPTG, pendant 5h à 22°C, sous agitation. Les bactéries sont centrifugées 30min, 4000rpm, à 4°C et les culots pesés et congelés à -80°C. L'induction est contrôlée en gel SDS-PAGE 12%.

- Lyse

Les culots sont décongelés dans la glace, repris dans 50mL de tampon de lyse (Tris 40mM, pH 7,5, Triton x100 0,3%, NaCl 750mM, EDTA 2mM, EGTA 2mM, DTT 2mM, lysozyme 1mg/mL, inhibiteurs de protéases cocktail 1 (Sigma) 250µL/g de culot). Le mélange est ensuite passé à travers une seringue (Gauge Neegle 22µm) pour casser l'ADN, puis ultracentrifugé à 9000rpm, 30min, à 4°C et repassé une seconde fois dans la seringue. Un aliquot est prélevé à chaque étape pour contrôler l'état de la protéine en gel SDS-PAGE 12%.

- Purification

Le surnageant est incubé sur la nuit à 4°C, sous agitation, avec 6mL de glutathion-sépharose (Pharmacia) préalablement rincée 3 fois dans 50mL de Tris 50mM pH 7,5, NaCl 0,15M. Les billes sont rincées avec 6 x 50mL de Tris 40mM, pH 7,5, NaCl 750mM, Triton 0,3% avec suivi Bradford. On réalise un échange de tampon avec 3 lavages de 50mL de Tris 50mM, pH 7,4, NaCl 0,15M, MgCl<sub>2</sub> 20mM.

- **MBP-CK2 $\beta$  et mutants**

- Production

Cinq mL de culture bactérienne (bactéries BL21) sont dilués dans 50 puis dans 500mL de LB+Carbenicilline et incubés sous agitation, 37°C, jusqu'à DO<sub>600 nm</sub> = 0,6. L'expression est induite par l'ajout de 0,2mM d'IPTG, 2h à 37°C, sous agitation. Les bactéries sont centrifugées 30min, 2000rpm, à 4°C, les culots sont lavés dans du PBS puis congelés à -

80°C. L'induction est contrôlée en gel SDS-PAGE 12% à l'aide d'aliqots de culture prélevés avant, pendant et après l'induction.

- Lyse

Les culots bactériens sont décongelés dans la glace et repris dans 0,05 volume de tampon de lyse (10mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 30mM NaCl, 0,25% Tween 20, 10mM β-Mercaptoéthanol, 10mM EDTA, 10mM EGTA, 10µg/mL leupeptine, 25µg/mL aprotinine, 100µg/mL AEBSF, pH 7,0). Les bactéries sont ensuite lysées par sonication suivie par dosage des protéines à l'aide de la méthode de Bradford. La solution est ensuite ajustée à 0,5M NaCl pour faciliter la solubilisation de CK2β, puis centrifugée 5min à 4000rpm pour enlever les débris cellulaires. Le surnageant est dilué au demi avec le tampon de colonne (10mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,5M NaCl, 10mM β-Mercaptoéthanol, 1mM EGTA, 10µg/mL leupeptine (Sigma), 25µg/mL aprotinine (Sigma), 100µg/mL AEBSF (Sigma), pH 7,0).

- Purification sur colonne d'amylose

L'extrait bactérien est incubé sur la nuit à 4°C sous agitation avec de la résine d'amylose (New England Biolabs) préalablement rincée 3 fois dans le tampon de colonne. Une colonne est ensuite montée et le filtrat rejeté. La résine est lavée par 3 volumes de tampon de colonne contenant 0,25% Tween 20, puis 6 volumes de tampon de colonne, avec suivi Bradford. L'élution est réalisée avec 3 volumes de tampon de colonne sans leupeptine mais contenant 10mM de maltose. Les fractions collectées sont analysées en dosage Bradford et en gel SDS-PAGE.

Les fractions contenant la protéine purifiée sont concentrées sur colonne Vivaspin concentrator (VivaScience, cutoff 10 kDa). Le maltose est éliminé à l'aide de colonnes Biospin P6 (Biorad) prééquilibrées dans 50mM Tris-HCl pH 7,4, 0,5M NaCl, étant donné que CK2β peut former des multimères en solution lorsque la concentration en sels est basse (faible force ionique). La concentration de la protéine est déterminée par dosage Bradford ou BCA. MBP-CK2β est stockée à -80°C (Leroy, 1999)

- Clivage de la MBP

La MBP peut être clivée de la CK2β à l'aide du Facteur X<sub>A</sub> (Roche). Cependant, la MBP favorise la solubilisation de la CK2β qui a tendance à s'agréger et à précipiter. 25 mg de CK2β sont dilués à 5,5mg/mL dans Tris-HCl 25mM pH 7,4, glycérol 2%, DTT 0,05mM, CaCl<sub>2</sub> 0,5mM final pour un volume de 5mL. 250µg de Facteur X<sub>A</sub> repris dans 250µL d'eau sont ajoutés et incubés à 22°C avec suivi toutes les heures en gel SDS-PAGE 12% coloré au Coomassie. Après 7h, la réaction est arrêtée par l'ajout de leupeptine 10µg/mL, ce qui trouble la solution. Après centrifugation, le surnageant est incubé sur la nuit à 4°C avec 2mL d'héparine-sépharose lavée et équilibrée dans Tris-NaCl 0,15M. Une colonne est montée en chambre froide et lavée par 18mL de TDG, NaCl 0,15M. L'élution se fait par TDG, NaCl 1M,

en 4 fractions de 1mL avec suivi Bradford et gel SDS-PAGE. Les fractions ne contenant que CK2 $\beta$  sont mélangées et concentrées au Centricon 30 (Amicon).

Tampon TDG = Tris-HCl 10mM, pH 7,4, DTT 1mM, Glycérol 2%.

### **Production de CK2 $\alpha$ $^{35}\text{S}$ en lysat de réticulocyte**

Cinq  $\mu\text{g}$  de plasmide pSG5-CK2 $\alpha$  sont ajoutés à 200 $\mu\text{L}$  de TNT T7 Quick Master Mix (Promega) de lysat de réticulocyte, ainsi que 25 $\mu\text{L}$  d'eau et 220 $\mu\text{Ci}$  de Met $^{35}\text{S}$  (Amersham), incubés 2h à 30°C, puis passés sur colonne de gel filtration BioSpin P6 (Biorad) prééquilibrée dans un tampon Tris-HCl 50mM, pH 7,4, NaCl 150mM selon le protocole du fabricant. La CK2 $\alpha$  radiomarkée est aliquotée et conservée à -20°C. Le marquage est évalué par dosage de 1, 2 et 4 $\mu\text{L}$  de CK2 $\alpha$  par compteur à scintillation (Tri-Carb 2100 TR, Packard), 1min pour le  $^{35}\text{S}$ .

### **Dosage de protéines**

Les dosages de protéines sont réalisés par dosage Bradford (150 $\mu\text{L}$  de réactif de Bradford + 5 $\mu\text{L}$  d'échantillon) ou BCA (Pierce) selon le protocole du fabricant.

Pour les mutants MBP-CK2 $\beta$ , les concentrations ont été également vérifiées en gel SDS-PAGE 12% et coloration Coomassie, avec une gamme de MBP-CK2 $\beta$  WT.

### **Biotinylation de MBP-CK2 $\beta$**

MBP-CK2 $\beta$  est stockée dans un tampon Tris dont les amines primaires peuvent réagir avec la biotine. Le tampon est échangé par du PBS, 0,5M NaCl, pH7,2, avec une colonne Sephadex G25 (volumes de 0,5 à 2,5mL) ou une colonne Biospin P6 (Biorad) (volumes de 25 à 125 $\mu\text{L}$ ). La biotine choisie (Sulfo-NHS-LC-LC-Biotin, Pierce) possède un long bras espaceur (30,5 Å) afin de maximiser l'interaction avec la streptavidine sans gêne stérique. La réaction de biotinylation s'effectue 2h dans la glace, suivie par un échange de tampon avec l'une des deux colonnes pré-citées prééquilibrées dans 50mM Tris-HCl pH 7,4, 0,4M NaCl.

### **Gel SDS-PAGE, Western blot, déshybridation**

Les gels SDS-PAGE 12% sont réalisés selon la méthode Laemmli puis électrotransférés sur membrane PVDF préalablement trempée dans de l'éthanol, 1h, 100V. La membrane est

saturée avec un tampon PBS-Tween (PBST) 0,05%- BSA 1% ou lait écrémé 3%, puis incubée avec l'anticorps primaire sur la nuit à 4°C. Après 3 lavages de 5min au PBST, la membrane est incubée avec l'anticorps secondaire 1h à 22°C, suivie de 3 lavages au PBST, et révélée avec de l'ECL+ (GE Healthcare).

La membrane peut être déshybridée, après 3 lavages PBST, en l'incubant 30min à 50°C dans du  $\beta$ -mercaptoéthanol 100mM, Tris-HCl 62,5mM, pH 6,8, SDS 2%, en agitant toutes les 10min. Après 3 rinçages PBST, la membrane peut à nouveau être bloquée.

### **Coloration au Bleu de Coomassie et au Nitrate d'argent**

Les gels SDS-PAGE sont colorés dans une solution contenant 2,5% de Bleu de Coomassie G250, 45,5% d'éthanol et 9% d'acide acétique, 5min au micro-ondes. Ils sont ensuite décolorés dans 30% d'éthanol, 10% acide acétique, plusieurs fois 5min au micro-ondes.

Les gels peuvent également être colorés au Nitrate d'argent selon le protocole du fabricant (Silver Stain Plus, Biorad).

### **Dosage d'activité kinase $^{32}\text{P}$**

L'activité kinase spécifique de la CK2 est déterminée dans un volume réactionnel de 18 $\mu\text{L}$  contenant 3 $\mu\text{L}$  de CK2 $\alpha$  (36ng) et un mélange contenant 150 $\mu\text{M}$  de peptide substrat (RRREDEESDDEE, Neosystem Laboratory, Strasbourg, France), 20mM de  $\text{MgCl}_2$ , 25 $\mu\text{M}$  d'ATP, 20mM Tris HCL (pH 7,4), 0,15mM NaCl et 1 $\mu\text{Ci}$  [ $^{32}\text{P}$ ]-ATP (Amersham). Le test est réalisé en présence ou non de CK2 $\beta$  en quantité équimolaire par rapport à CK2 $\alpha$ . Le dosage est réalisé en conditions linéaires (5 à 10min d'incubation), la réaction est stoppée par 60 $\mu\text{L}$  d'acide trichloroacétique 4%, puis 200 $\mu\text{g}$  de caséine sont ajoutés. Après incubation 10min à 4°C, les échantillons sont centrifugés 8min à 14000 rpm. 60 $\mu\text{L}$  du surnageant sont ensuite déposés sur des carrés (4cm<sup>2</sup>) de papier P81 de phosphocellulose (Whatman). Les carrés sont ensuite rincés 3 fois par une solution aqueuse d'acide phosphorique 0,5% à 4°C puis placés dans 5mL de liquide de scintillation. Le comptage est réalisé par un compteur à scintillation (Filhol, 1991).

### **Variations du test kinase : avec protéine substrat ou, avec [ $^{32}\text{P}$ ]-GTP**

Le test est réalisé dans les mêmes conditions que le test précité avec la protéine substrat (GST-olig2, CDC25B, Engrailed, CapZ...) en remplacement du peptide substrat. En fin de

réaction, le mélange est déposé sur gel SDS-PAGE 12%. Le gel est fixé à l'acide acétique, coloré au Bleu de Coomassie, neutralisé dans du Tris-HCl 1M, pH 7,2, emballé dans un film plastique et autoradiographié. Après différents temps d'exposition (1 à 72h), la cassette est révélée au PhosphorImager (Molecular Device).

CK2 ayant la propriété originale et peu répandue d'utiliser indifféremment l'ATP ou le GTP comme donneur de phosphate, cette faculté est mise à profit pour explorer l'effet inhibiteur de certains composés sur la phosphorylation de substrats GTP-dépendants (et donc CK2-dépendants) dans des lysats cellulaires. Pour cela, on utilise 6 µg de lysat de cellules HeLa traitées 24h avec 100µM d'inhibiteur, dans un volume réactionnel de 18µL contenant Tris 50mM, pH 7,4, NaCl 0,15M, MgCl<sub>2</sub> 20mM, inhibiteurs de phosphatases cocktail 2 (Sigma), 0,3µL de [<sup>32</sup>P]-GTP. La réaction a lieu 5min à RT et est stoppée par 3µL de tampon Laemli 6X. Le tout est déposé en gel SDS-PAGE 12% et révélé par autoradiographie au PhosphorImager.

### **Test d'interaction CK2α-CK2β**

- **Principe**

Le test d'interaction CK2a-CK2b mis au point met en jeu une compétition entre la MBP-CK2β immobilisée en plaque et les composés à tester (peptides, protéines MBP-CK2b mutantes ou molécules chimiques) vis-à-vis de l'interaction avec de la CK2α radiomarquée au [<sup>35</sup>S] ou fusionnée à de la GFP (figure 86).



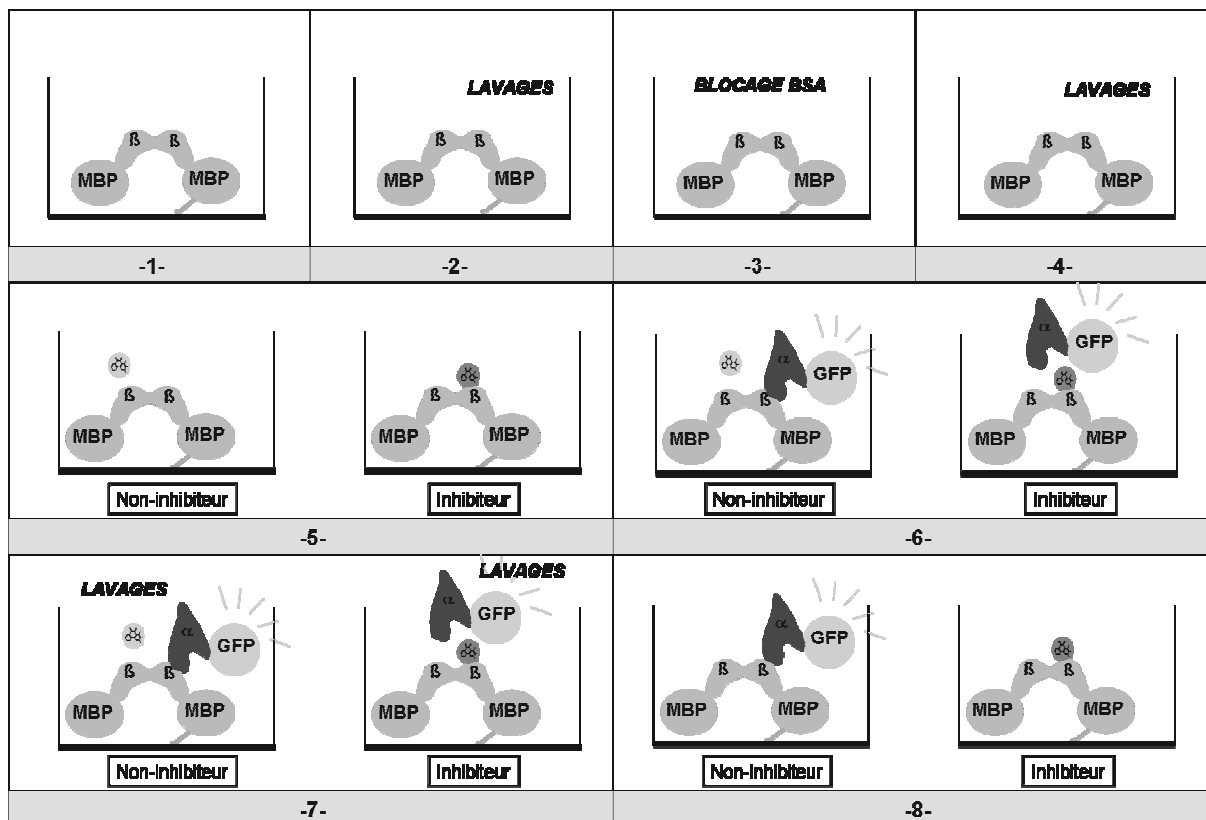


Figure 86 : **Test d'interaction CK2α-CK2β**. 1 : La MBP-CK2β biotinylée est déposée en plaques 96 puits couvertes de streptavidine. 2 : Trois lavages sont réalisés afin d'enlever les protéines non immobilisées. 3 : Une saturation est réalisée avec un tampon contenant de la BSA. 4 : Trois lavages sont effectués. 5 : Les composés à tester sont déposés. 6 : La CK2α marquée est ensuite déposée. 7 : Après 1h d'incubation, 3 lavages éliminent la CK2α marquée qui n'a pu interagir avec CK2β. 8- La fluorescence (ou radioactivité) restante est comptée.

- **Mise au point**

La première étape a consisté à déterminer les **quantités de protéines** (MBP-CK2β, [<sup>35</sup>S]-CK2α ou GFP-CK2α) nécessaires par des expériences de gammes croissantes (de 30 à 4000ng/point), afin d'obtenir une fixation et un signal maximaux. Une fois la **saturation** déterminée, la quantité choisie a été de 70% du plateau, afin de permettre au test de détecter une éventuelle augmentation de la fixation de CK2α. Des cinétiques ont également été réalisées afin de déterminer les **temps d'incubation** nécessaires aux différentes étapes. Le test a été effectué à différentes **températures** (4, 23, 33, 37°C) et afin de limiter les variations, le choix d'une température fixe de 23°C en pièce contrôlée s'est imposé.

Les **témoins** positifs utilisés ont été de la CK2α marquée différemment (CK2α-His ou GST-CK2α-HA) mis en compétition dans le test avec des quantités croissantes.

Dans un second temps, le test a été **miniaturisé** afin d'optimiser les quantités de protéine et de réactifs nécessaires aux criblages. Le volume minimal de réaction a été défini à 50μL.

Des ajustements ont ensuite permis de contrôler que la différence de signal était suffisamment significative et reproductible pour tester des composés. Le **Z' factor** (Iversen, 2006, Zhang, 1999) a été calculé sur plusieurs séries de 8 témoins positifs et négatifs minimum afin d'obtenir une valeur supérieure à 0,5 : 0,669 en test manuel, 0,840 en test robotisé (en damier sur 48 témoins positifs et 48 négatifs, figure 87). Plusieurs tests ont été réalisés afin de contrôler la **reproductibilité**. Des aliquots de protéines ont été congelés pour limiter le nombre de cycles de décongélation-recongélation. Le **CV** doit également être inférieur à 5 ou 10% pour assurer une bonne reproductibilité du test (ici, CV = 2,3).

Z' factor : Facteur utilisé dans les tests de criblage jugeant la qualité du test : reproductibilité, force, significativité, robustesse, etc. Il faut au moins 8 témoins Bioactifs et 8 témoins Bioinactifs.

$$Z' = 1 - \frac{(3 \times \text{écart-type témoins Bioactifs} + 3 \times \text{écart-type témoins Bioinactifs})}{\text{Abs (moyenne témoins Bioactifs} - \text{moyenne témoins Bioinactifs)}}$$

Abs (moyenne témoins Bioactifs – moyenne témoins Bioinactifs)

Si  $0 < Z' < 0,5$ , le test est relativement fiable.

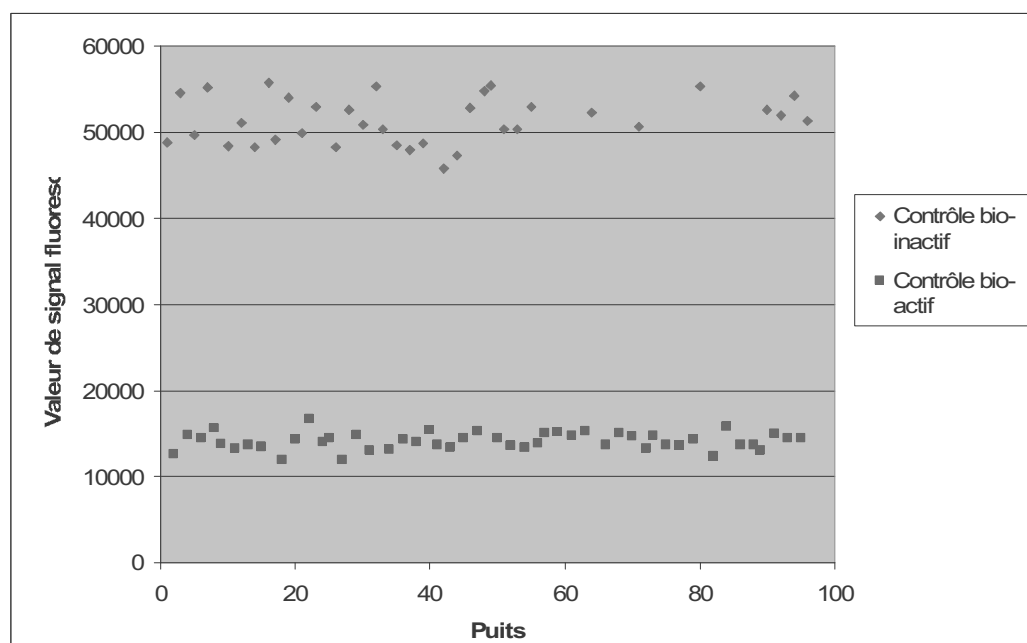
Si  $Z' > 0,5$ , le test peut être soumis à un criblage.

(Zhang, 1999)

$$CV = \frac{\text{écart-type}}{\text{Moyenne}} \times 100$$

Moyenne

Le CV doit être < 5 ou 10% pour garantir une bonne reproductibilité du test.



**Figure 87 : Valeur des contrôles bioactifs et bioinactifs dans le test d'interaction en fluorescence robotisé.**

L'écart entre les deux populations de témoin est suffisamment significatif pour démarrer le criblage, comme le confirme le calcul du Z' factor.

- **Robotisation**

Un **planning** minuté de traitement des plaques a été ajusté permettant de tester 4 plaques/jour pour un utilisateur manuel et 10 plaques/jour pour le robot dont 2 plaques témoins.

Le criblage effectué sur la plateforme du CMBA (Laurence Lafanechère, Centre de Criblage pour des Molécules BioActives, CEA, Grenoble) a été réalisé par Caroline Barette, sur un robot TECAN (Mannedorf, Suisse, 2002, figure 88) avec le logiciel FACTS 7.4.1.



**Figure 88 :** Organisation du robot et de la plateforme de criblage du CMBA, CEA, Grenoble.

La durée de distribution des protéines MBP-CK2 $\beta$  et GFP-CK2 $\alpha$  par le robot est de 1 et 2h respectivement, de sorte que le robot puisse gérer les différentes opérations. Le tampon de distribution des protéines a été élaboré pour stabiliser les protéines dans ce laps de temps et avoir un niveau de fixation et d'interaction reproductibles. En effet, dans les tampons utilisés manuellement, les protéines se retrouvent dégradées après 1h à 4°C et on observe une diminution de signal. Des essais ont été réalisés avec 2% glycérol, 5% glycérol, 100 $\mu$ g/mL BSA, 1mg/mL BSA, 0,1%, 0,3%, 0,9% Triton, 1mM DTT, 0,025% azide de sodium, seuls ou

en combinaison, en contrôlant le Z' factor obtenu. Finalement, les conditions suivantes ont été adoptées :

- MBP-CK2 $\beta$  biotinylée est stabilisée 1h dans la glace dans du tampon 50mM Tris-HCL, pH 7,4, 0,4M NaCl, 1mg/mL de BSA et 0,1% Triton, 0,025% azide de sodium. Elle est diluée à 25ng/uL afin de distribuer 10uL (250ng) par puits.
- GFP-CK2 $\alpha$  est stabilisée 2h à 4°C dans 50mM Tris, 0,15M NaCl, 1mg/mL BSA. Elle est diluée à 25ng/ $\mu$ L et 10 $\mu$ L/puits sont distribués.
- GST-CK2 $\alpha$ -HA est diluée à 250ng/ $\mu$ L dans 50mM Tris, 0,15M NaCl et 10 $\mu$ L/point (excès molaire 10x) sont distribués par le robot pour les témoins positifs.

Le robot dépose au préalable 25 $\mu$ L de 50mM Tris, 0,4M NaCl par puits pour un volume de réaction final de 50 $\mu$ L. Le temps de blocage est de 1h45 à 2h pour les 1° et 8° plaques de la journée. Le Z' factor demeure supérieur à 0,5 (0,640 à 0,770) dans ces conditions.

Le criblage des 40 000 composés de la chimiothèque de peptidomimétiques est réalisé en 5 jours, à raison d'une série de 8 plaques par jour en 5h45. La MBP-CK2 $\beta$  reste en solution au plus 1h05 avant d'être distribuée et la solution de GFP-CK2 $\alpha$  au plus 2h40.

Les molécules sont fournies à 5mM dans 10 $\mu$ L de DMSO. Elles sont diluées 2 fois afin que le robot distribue un volume de 5 $\mu$ L pour une concentration finale dans le test de 100 $\mu$ M.

Enfin, le calcul des **quantités de réactifs** nécessaires au criblage complet a permis la préparation de plusieurs litres de tampons de sorte que l'intégralité du criblage soit fait dans les mêmes conditions. Ainsi, pour le criblage des 40 000 molécules, ont été prévus, en tenant compte du volume mort des réservoirs de distribution du robot :

- 30 litres de tampon de lavage (50mM Tris, pH 7,2, 150mM NaCl, 0,05% Tween 20), stockés à 4°C
- 20 litres de tampon 50mM Tris, pH 7,2, 150mM NaCl, stockés à 4°C
- 300mL de tampon 50mM Tris, pH 7,2, 150mM NaCl, 3% BSA, filtrés, aliquotés et stockés à -20°C
- 500mL de tampon 50mM Tris, pH 7,2, 0,4M NaCl, stocké à 4°C
- 2,5mg de MBP-CK2 $\beta$  biotinylée, aliquotée
- 2mg de GFP-CK2 $\alpha$ , aliquotée
- 5mg de GST-CK2 $\alpha$

Ont également été inclus dans le criblage, à titre de témoins positifs et négatifs, le peptide cyclique, les mutants YF et RI du peptide cyclique, et la GST-CK2 $\beta$ -Cter.

- **Réalisation**

Le test est réalisé en plaques 96 puits recouvertes par de la streptavidine Reacti-Bind « High-binding capacity » (Pierce) dans un volume final de 50 µL. Après 3 lavages avec 50mM Tris-HCl, pH 7,2, 0,15M NaCl, 0,05% Tween 20, 250 ng/puits de MBP-CK2β biotinyllée sont immobilisés dans 50mM Tris-HCl, pH 7,2, 0,4M NaCl, 1h à température ambiante. Après 3 lavages, les puits sont bloqués avec 50mM Tris-HCl, pH 7,2, 0,15M NaCl, 3% BSA, 1h à température ambiante. Après 3 lavages, les composés à tester sont ajoutés dans 50mM de Tris-HCl, pH 7,2, 0,4M NaCl, la plaque est agitée, puis la CK2α radiomarquée (10<sup>5</sup> cpm/puits) ou fusionnée à une protéine fluorescente (250ng) est ajoutée et incubée 1h à température ambiante. Après 3 lavages, la radioactivité ou la fluorescence restante de chaque puits est déterminée à l'aide d'un compteur à scintillation (chaque puits est rincé avec 1% SDS et compté, compteur à scintillation Tri-Carb 2100 TR, Packard, 1min pour le <sup>35</sup>S) ou une lecteur de fluorescence (FLUOstar Optima, BMG Laboratories) respectivement.

Le **témoin positif** (100% d'inhibition de l'interaction) est défini avec de la CK2α non marquée en excès molaire 10x, d'après les résultats obtenus précédemment.

Le **témoin négatif** (0% d'inhibition de l'interaction) est réalisé avec du tampon seul (Tris-NaCl, H<sub>2</sub>O ou DMSO selon les composés testés).

Le **pourcentage d'inhibition** est calculé selon la formule :

$$\% \text{ inhibition} = (100 / ((\text{moy min} - \text{moy max})) \cdot (x - \text{max}))$$

Min = valeur moyenne (en cpm) des témoins positifs.

Max = valeur moyenne (en cpm) des témoins négatifs.

X = valeur brute du composé testé en cpm.

L'**IC<sub>50</sub>** est définie comme la concentration en composé nécessaire pour inhiber 50% de la formation du complexe CK2α-CK2β. La **dissociation** du complexe préformé est réalisée en déposant d'abord la CK2α marquée, suivie d'une agitation, de 15min d'incubation, puis de l'ajout des composés, suivi d'1h d'incubation.

Pour les tests manuels, des témoins positif et négatif sont répartis tous les 10 points. Chaque point est réalisé en double. Pour les tests robotisés (fluorescence), les témoins sont répartis sur les colonnes 1 et 12, en alternant négatif et positif. Chaque composé n'est testé qu'une fois.

## BIAcore

Le principe du fonctionnement de la résonance plasmonique de surface (BIAcore) est décrit dans la figure ci-dessous.

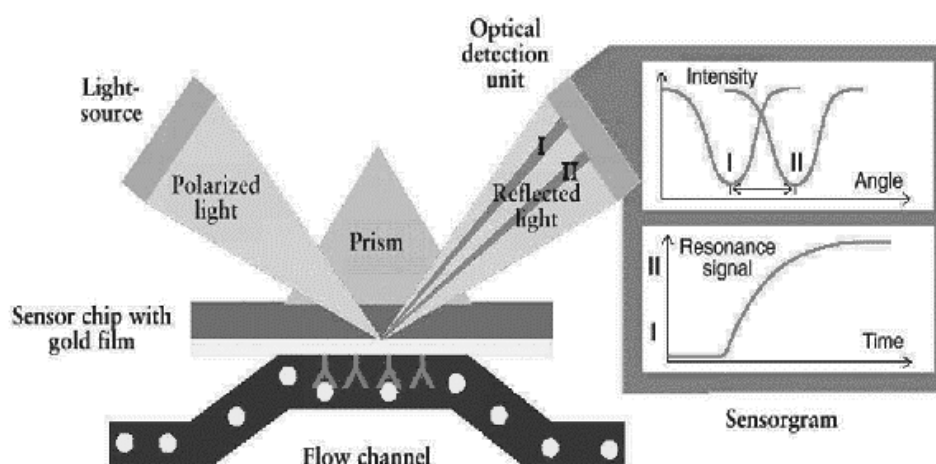
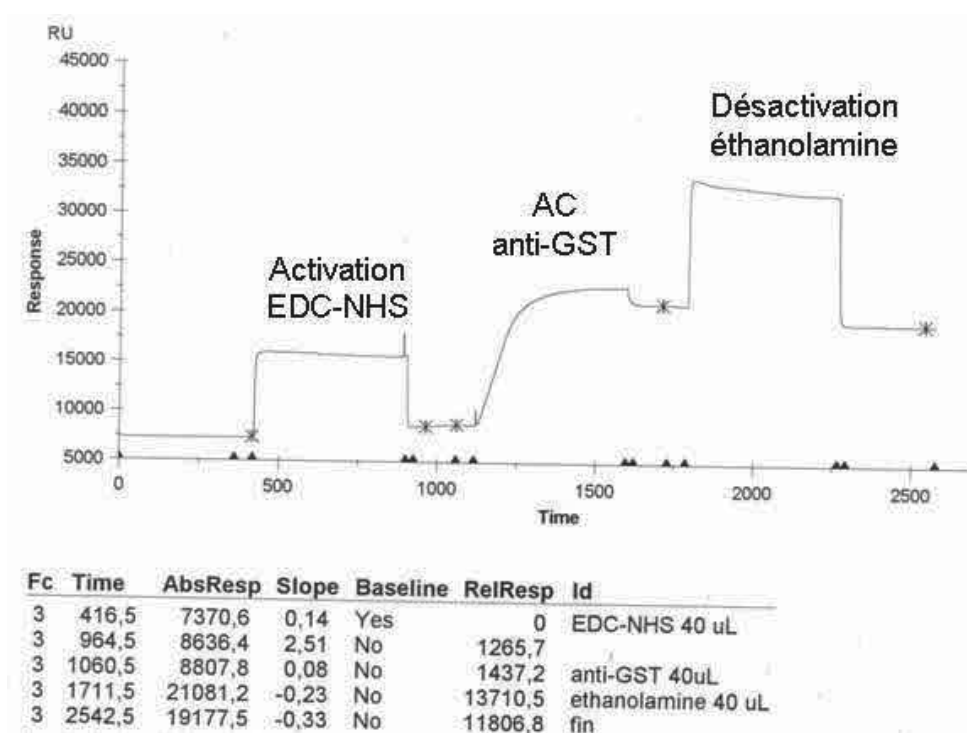


Figure 89 : **Principe de fonctionnement du BIAcore.** Une lumière polarisée est réfléchiée contre une surface couverte d'un film doré sur une face. Les protéines interactantes sont immobilisées sur la face opposée (via des anticorps par exemple). S'il y a interaction avec les protéines circulant dans le fluide, l'angle du rayon réfléchi est modifié. Cette variation est enregistrée sur un détecteur, convertie en Unités de Réponse (RU), ce qui permet de quantifier le degré d'interaction entre les deux protéines.

Les mesures de résonance plasmonique de surface ont été réalisées sur un BIAcore 1000 (monocanal, injection automatique), un BIAcore 3000 (multicanaux, injection automatique) et un BIAcore X (injection manuelle) (BIAcore AB).

Le tampon utilisé est du HBS (10mM Hepes pH 7.3, 0.15M NaCl, 3mM EDTA, 0.005% polysorbate 20), dégazé et filtré (Nalgene), avec un flux constant de 5µL/min. Pour immobiliser l'anticorps, la « sensor chip » CM5 (surface de dextran carboxyméthylée) est d'abord **activée** en injectant 30µL de solution EDC-NHS 1/1-v/v (N-ethyl-N-(diméthylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride et N-hydroxysuccinimide, BIAcore AB), en mode QUICKINJECT. L'anticorps anti-GST est ensuite dilué à 30µg/mL dans du tampon d'**immobilisation** (10mM acetate, pH 5,0), et 35µL sont injectés. La surface de la sensor chip est alors **désactivée** par l'injection de 30µL de 1M ethanolamine, pH 8,5 (Figure 90).



**Figure 90 : Sensorgramme d'immobilisation d'anti-GST sur des sensor chip CM5 en Biacore.**

La GST-CK2 $\alpha$  (50 $\mu$ g/mL dans HBS) est immobilisée sur la surface par injection de 30 $\mu$ L sur la sensor chip. Les différents mutants MBP-CK2 $\beta$  sont ensuite dilués à 50 $\mu$ g/mL dans HBS et 30 $\mu$ L sont injectés. La régénération de la surface s'effectue par l'injection de 10 $\mu$ L de 10mM glycine-HCl, pH 2,2. Une seconde injection identique peut être nécessaire pour revenir à la ligne de base.

Des sensor chips couvertes de streptavidine peuvent être réalisées à partir de sensor chips CM5. La surface est activée avec un mélange v/v d'EDC/NHS. Un mélange contenant 20 $\mu$ L de streptavidine à 1mg/mL et 80 $\mu$ L de tampon acétate, pH ajusté à 4-5 à l'acide acétique, est ensuite injecté. Environ 4000RU sont immobilisés. La désactivation se fait par injection de 50 $\mu$ L d'éthanolamine (figure 91). Le peptide cyclique biotinylé (0,1mM) peut à son tour être injecté, suivi de l'injection de CK2 $\alpha$ -His. La régénération se fait avec glycine-HCl, pH2 ou 1M NaCl.

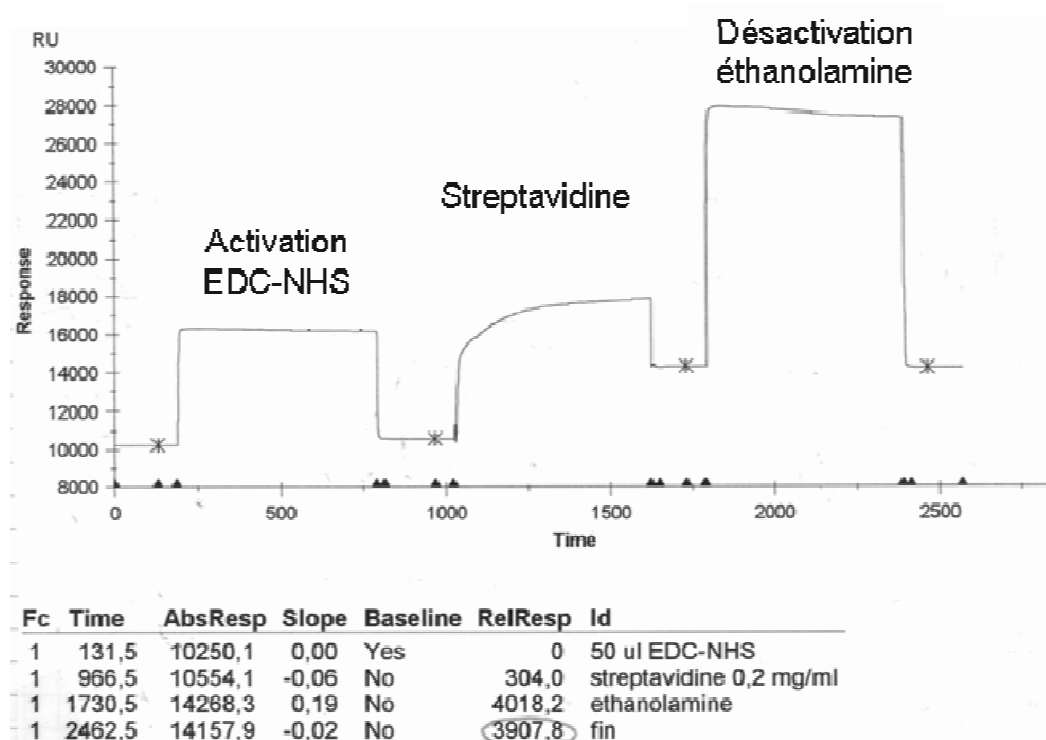


Figure 91 : Sensorgramme d'immobilisation de streptavidine sur des sensor chip CM5 en Biacore.

Les données sont traitées à l'aide du logiciel BIAevaluation, permettant de superposer les sensorgrammes (fonctions Fit).

### Immunoprécipitation

Les cellules sont lysées et les protéines totales dosées au BCA. 50µL de billes (protéine A pour un anticorps monoclonal ou protéine G pour un polyclonal) sont lavées 3 fois dans 500µL de tampon de lyse et incubées 30min dans la glace avec le lysat en agitant de temps en temps : c'est l'étape de « pré-clearing ». Les billes sont ensuite jetées. L'anticorps (anti-Flag, anti-GFP,  $\beta$ -c,  $\alpha$ -coc...) est ensuite ajouté au lysat (1µL d'AC pour 500µL de lysat), 1h, sur la glace. 50µL de billes (protéine A ou G sepharose, Sigma) lavées 3 fois dans du tampon de lyse sont ajoutées au mélange et incubées sous agitation, la nuit à 4°C. Après 4 lavages avec 1mL de tampon de lyse contenant des inhibiteurs de protéases, les billes sont déposées en gel SDS-PAGE pour coloration Coomassie, Nitrate d'argent ou Western blot, ou en fiole de scintillation si la protéine est radioactive.

### Pull-down

Vingt µL de billes streptavidine (Sigma) sont rincées 2 fois dans 1mL de Tris 20mM, NaCl 0,2M avec centrifugation 2min, 4000g. 100µL de peptide ou de MBP-CK2 $\beta$  biotinylés de 6,25



à 100 $\mu$ M sont incubés avec la streptavidine 30min à 4°C sur r roue. Après 3 lavages de 1mL avec le même tampon, 20 $\mu$ L de CK2 $\alpha$  (1,5 à 12ng/ $\mu$ L) sont ajoutés et incubés 1h à 4°C sans agitation. Après centrifugation 2min à 14000g, 2 échantillons de 3 $\mu$ L de surnageant sont prélevés et testés en dosage d'activité kinase CK2 $\alpha$ .

### III- BIOLOGIE CELLULAIRE

#### Lignées cellulaires

- **Cellules HeLa (ATCC # CCL-2)**

Ces cellules sont issues d'un adénocarcinome humain de col de l'utérus. Ce sont des cellules adhérentes de type épithélial (figure 92).

Elles sont cultivées en milieu DMEM (Milieu Eagle Modifié de Dulbecco, Gibco) contenant 2mM de L-Glutamine et 10 mM de tampon Hepes + rouge phénol, supplémenté par du sérum de veau fœtal (SVF) 10% (décomplémenté 35 min à 55°C), Penicilline-Streptomycine (10µg/mL soit 1%). Elles sont maintenues à 37°C en atmosphère humide contenant 5% de CO<sub>2</sub>. Elles sont passées au 1/10<sup>e</sup> (soit 1 million de cellules pour une plaque p100) tous les 3 jours. Elles peuvent être congelées dans l'azote liquide dans DMEM, P/S, SVF 20% final, DMSO 10% final.

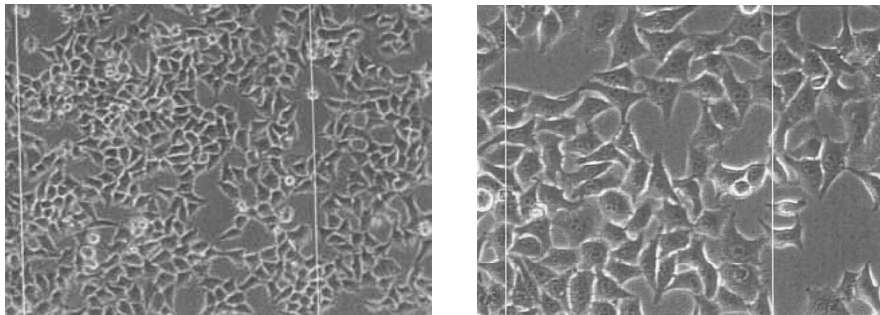


Figure 92 : **Cellules HeLa** (à gauche, grossissement 100x, microscopie optique ; à droite, 400x).

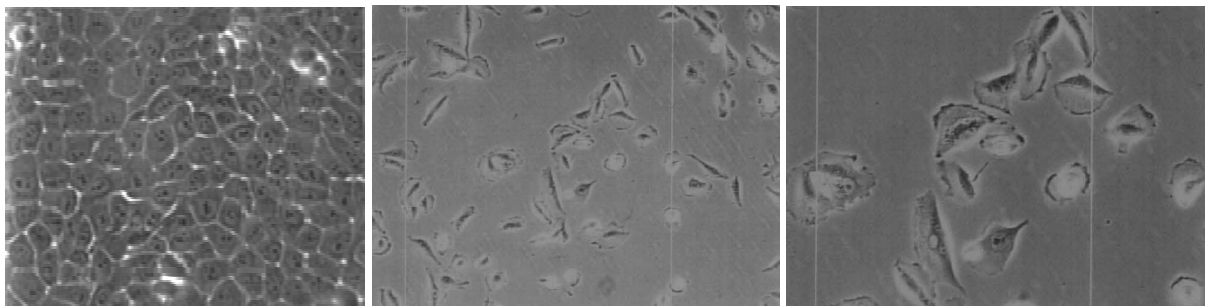
**Cellules HeLa** : Ces cellules proviennent d'une biopsie de Henrietta Lacks, américaine noire de 31 ans, atteinte d'un adénocarcinome du col de l'utérus, et décédée en 1951. Après la biopsie, ces cellules ont été dispersées dans les laboratoires de recherche sans son autorisation. D'abord nommées « Helen Lane » ou « Helen Larson » pour préserver son anonymat, la presse a révélé l'origine de ces cellules quelques années plus tard. La famille Lacks a porté plainte mais le jugement a estimé que les cellules rejetées par une personne ne sont pas sa propriété et peuvent être commercialisées. Ces cellules contiennent le papillomavirus HPV18. Elles comptent 82 chromosomes en moyenne (70 à 164), dont 4 copies du chromosome 12 et 3 copies des chromosomes 6, 8 et 17.

▪ **Cellules MCF10A (ATCC# CRL-10317)**

Ce sont des cellules épithéliales mammaires (Mammary Cells from Fibrocystic disease), humaines (caucasienne de 36 ans), adhérentes, non-tumorigènes, immortalisées mais non-transformées (figure 93).

Leur culture s'effectue dans un milieu de croissance complexe : Milieu MCF (DMEM/F12 : 1/1 + GlutaMax (Invitrogen) supplémenté par 5% Sérum de cheval (Eurobio) – Penicilline-Streptomycine 10µg/mL – EGF (Peprotech Inc Tebu) 2,5ng/mL – insuline (Sigma) 10µg/mL – HydroCortisone (Sigma) 50ng/mL – Toxine du choléra (Sigma) 10ng/mL. Après trypsination 20min à 37°C, les cellules sont centrifugées à 1200 rpm dans un milieu de resuspension, 5min et reprises dans 3mL de DMEM : F12 (1 :1), 20% sérum de cheval, 1% P-S. Elles sont passées au 1/6 tous les 3 jours.

Pour les MCF10 shRNA CK2β, une pression de sélection est maintenue avec 750ng/mL de puromycine.



**Figure 93 :** **MCF10A WT** (à gauche), grossissement 100x ; MCF10A shRNA6CK2β-96 (au centre et à droite), grossissement 100x et 200x.

Pour la culture en Matrigel (BD, figure 94) en 3D et la différenciation en acinis, les cellules MCF10A sont diluées à 40 000 cellules/mL de milieu de différenciation (milieu MCF sans sérum contenant 2% de Matrigel et 10ng/mL d'EGF) dans un volume de 500µL/puits de milieu MCF-Matrigel™ 2% - EGF 10ng/mL et ensemencées dans des chambres Labtek 8-puits fond verre préalablement « coatées » par 60 µL de Matrigel™ (liquide à 0°C, gel à -20°C, 22°C et 37°C). La culture dure 5 à 25 jours avec un renouvellement du milieu tous les 3-4 jours (Debnath, 2003).

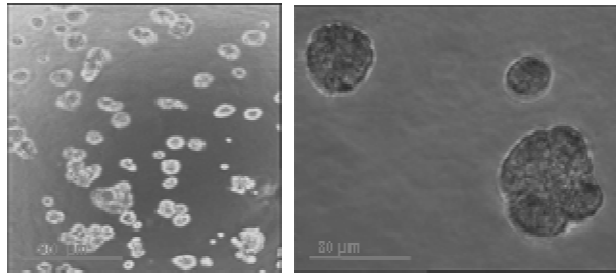


Figure 94 : Organisation en Matrigel des cellules MCF10A à 9 jours de culture.

- **Cellules MCF7 (ATCC# HTB-22)**

Ces cellules épithéliales mammaires proviennent d'un adénocarcinome (caucasienne de 69 ans) dans un milieu identique aux HeLa, complété en insuline (10µg/µL).

- **Cellules Sf9 (ATCC# CRL-1711)**

Ce sont des cellules d'ovaire de la puppe du papillon *Spodoptera frugiperda*.

Elles se cultivent à 28°C, air 100%, dans un milieu synthétique (SF-900 II avec de la L-Glutamine) sans sérum et sans antibiotique. Elles sont peu adhérentes, et sont passées 2 fois par semaine sans trypsination.

- **Cellules NIH-3T3-MEF (ATCC# CRL-1658)**

Ces fibroblastes d'embryon de souris s'entretiennent de la même manière que les cellules HeLa (figure 95).

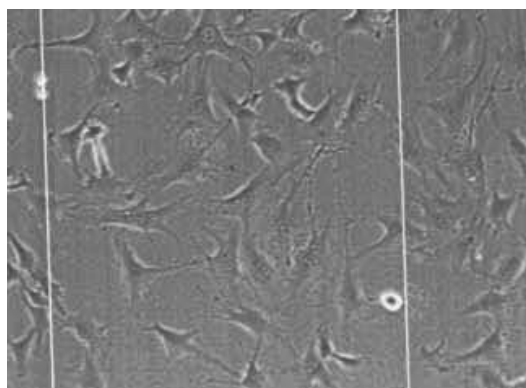


Figure 95 : Observation au microscope optique des cellules NIH 3T3, x100.

### **Test de mycoplasmes**

La présence de mycoplasmes est testée à l'aide du kit MycoAlert (# LT07-218, Cambrex) selon le protocole du fabricant.

### **Lyse des cellules**

Les cellules rincées au PBS sont maintenues sur la glace et grattées dans un tampon de lyse. Elles sont ensuite incubées 30min dans la glace en vortexant de temps en temps, centrifugées 15min à 14000rpm à 4°C. Le surnageant est conservé à -20°C. La concentration en protéine est estimée par dosage BCA (Pierce) avec une gamme de BSA selon le protocole du fabricant.

#### **Tampons de lyse :**

- RIPA (NaCl 150mM, Tris-HCl 10mM, pH 7,4, SDS 0,1%, Na deoxycholate 0,5%, EDTA 1mM, Triton X100 1%), inhibiteurs de protéases (cocktail 2, Sigma).
- TDG, NaCl 0,5M, Triton X100 0,5%, Leupeptine, Aprotinine, AEBSF.
- Tris-HCl 50mM, pH 7,5, NaCl 0,5M, EDTA 5mM, Triton X100 1%, AEBSF 100µg/mL, Aprotinine 25µg/mL, Leupeptine 10µg/mL.
- Tris-HCl 50mM, pH 7,4, NaCl 0,15M, EDTA 2mM, Triton X100 1%, NaF 50mM (inhibiteur de kinases), inhibiteurs de phosphatases (cocktail 2, Sigma), AEBSF 100µg/mL, leupeptine 10µg/mL, aprotinine 25µg/mL.

On peut noter que pour solubiliser la CK2β, une concentration de 0,4 à 0,5M NaCl est nécessaire.

### **Transfections transitoires**

- **Fugene 6**

Les cellules sont étalées sur lamelle de verre la veille de la transfection. Le Fugene 6 (Roche) est réchauffé 5min à 22°C. Un mélange de 1: 80 v/v de Fugene:DMEM (sans sérum ni antibiotique) est incubé 5min à 22°C dans un eppendorf. Les cellules sont rincées par du PBS et le milieu est remplacé par du DMEM + 10% SVF + P/S. L'ADN (0,1 à 0,5µg) est ajouté au mélange Fugene-DMEM (50µL par point de p24), incubé 15min à 22°C puis déposé goutte à goutte sur les cellules. Le rendement de transfection est d'environ 20%.

- **Lipofectamine 2000**

Les cellules à 60-80% de confluence sont rincées au PBS et incubées dans de l'OptiMEM (Invitrogen) + SVF 10% sans antibiotique, 1h à 37°C. La Lipofectamine 2000 (Invitrogen) est réchauffée 5min à 22°C. Une solution A contenant 4 µg d'ADN dans 250µL d'OptiMEM est préparée, ainsi qu'une solution B contenant 20µL de Lipofectamine dans le même volume d'OptiMEM. La solution B est incubée 5min à 22°C. A et B sont mélangées et incubées 20min à 22°C. Le mélange est déposé goutte à goutte. Après 3-4h, le milieu est à nouveau changé en OptiMEM, SVF 10%. Le rendement de transfection est de l'ordre de 40%.

- **Electroporation (système AMAXA)**

Après passage, 1 million de cellules en suspension rincées par du PBS sont centrifugées 3min à 1500rpm. Au dernier moment, le culot est repris avec 100µL de solution T (Amaza) et 2µg d'ADN sont ajoutés, pendant que 3mL de milieu complet sont réservés à 37°C. L'électroporation se fait dans la cuve fournie (programme 20, Amaza), puis 500µL de milieu à 37°C sont ajoutés et homogénéisés à l'aide d'une pipette-poire. Les 600µL sont transférés dans une p6 contenant 2mL de milieu à 37°C. Cette méthode est utilisée en particulier pour les MC10A, pour qui la lipofectamine est toxique et le fugene est très peu efficace.

## **FRET**

Les cellules NIH 3T3 adhérentes sur lamelles (25 000 cellules/puits) sont transfectées transitoirement (Fugene 6) par pECFP-CK2α + pEYFP-CK2β (ou pEYFP-CK2β mutants d'interaction) ou pDsRed-CK2α + pEGFP-CK2β (0,1µg + 0,1µg). Après 12h, un composé (V12, L1) peut être ajouté (25, 50 ou 100µM). Après 24 ou 48h, les cellules sont fixées 10min avec du PFA 4% et montées avec du Vectashield (Vector) sur lame, à l'obscurité.

Les cellules sont ensuite observées au microscope Confocal (LEICA). Le spectre d'émission du donneur (CFP ou GFP) doit couvrir le spectre d'absorption de l'accepteur (YFP ou DsRed). L'accepteur est blanchi dans une zone carrée déterminée (ROI : region of interest). S'il y a interaction entre les sous-unités et FRET, l'intensité du donneur dans la zone blanchie est augmentée.

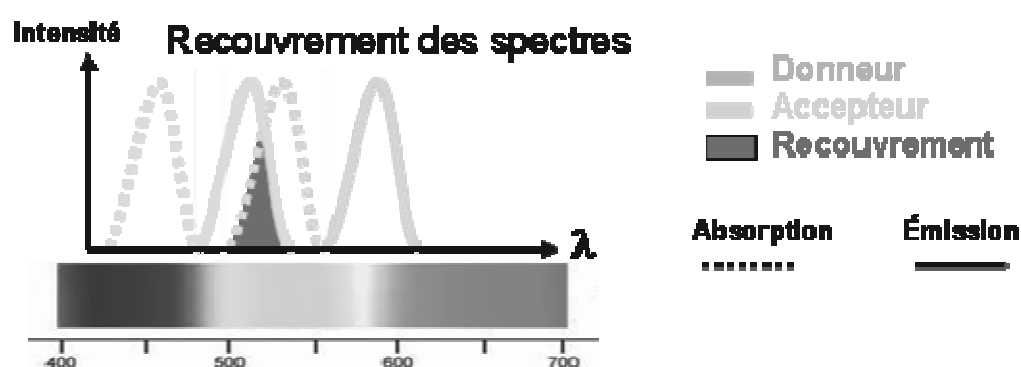
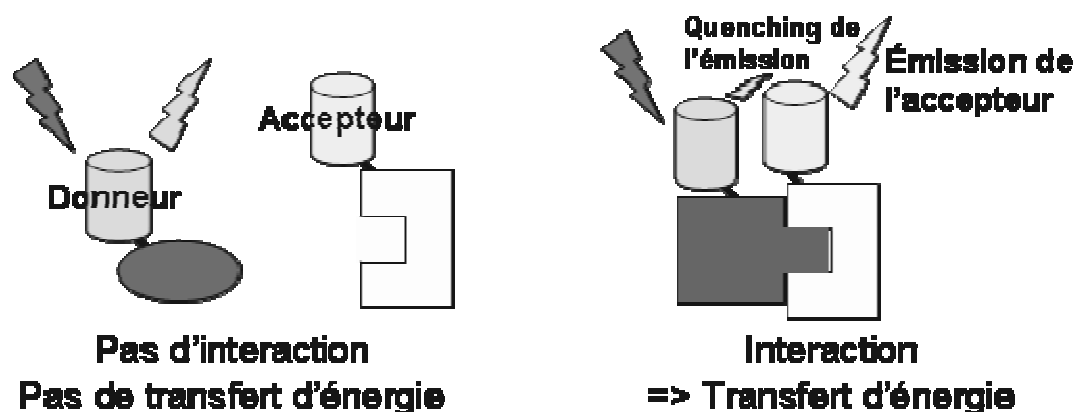
Les acquisitions se font au format 1024x1024, en mode xyz, objectif 40x, laser à 20% d'intensité, le diaphragme (« pinhole ») fixé à 2,00 airy, le laser Ar/ArKr à -1/4. L'enregistrement des acquisitions se fait en mode séquentiel (CFP puis YFP), sur 3 images à moyenner par acquisition en mode « between frame ». La séquence est la suivante :

- Lapse 1 : acquisition CFP et YFP.
- Lapse 2 : bleach YFP au laser à 100% d'intensité (Line Average 4, Average 6) sur la zone carrée sélectionnée.

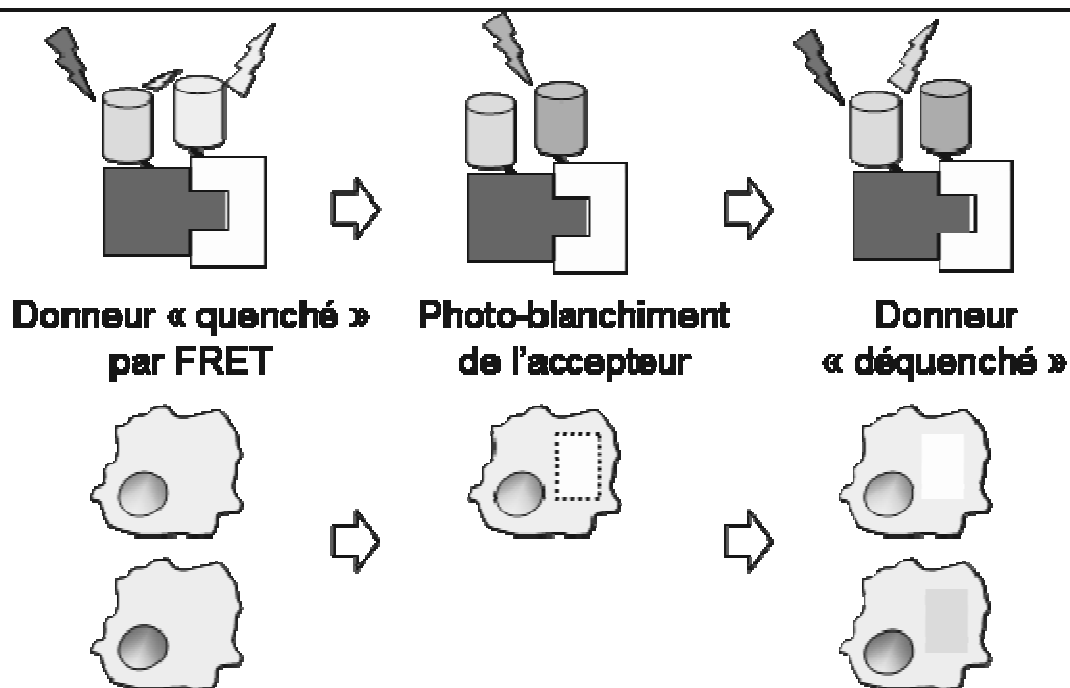
- Lapse 3 : acquisition CFP et YFP.

Les images peuvent être soustraites avec la fonction `Process-Arithmetic-Image&image` (figure 96).

## FRET : Fluorescence Resonance Transfer Energy



## FRET avec Photoblanchiment



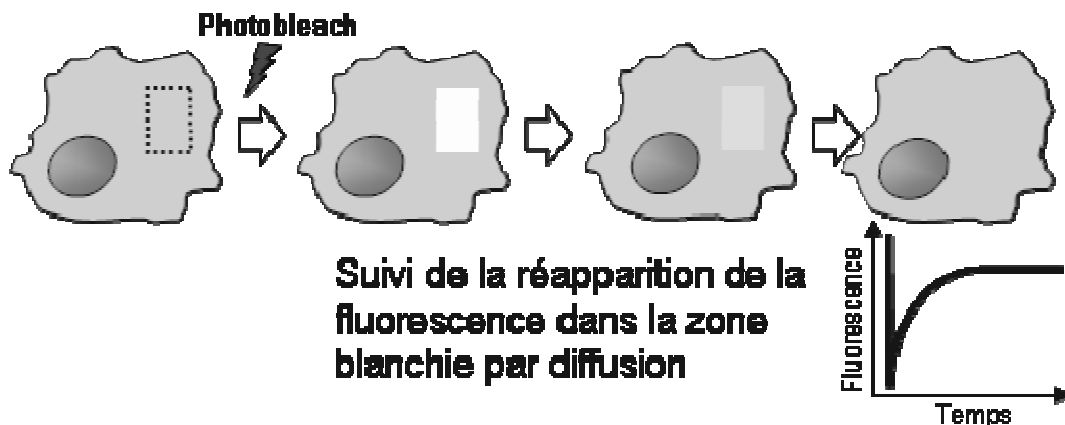


## **FCS : Fluorescence Correlation Spectroscopy**



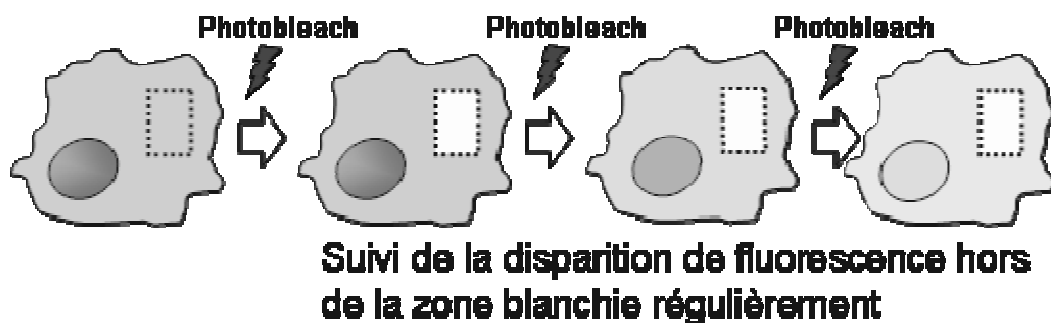
Mesure de l'intensité de fluorescence et analyse de ses fluctuations

## **FRAP : Fluorescence Recovery After Photobleaching**



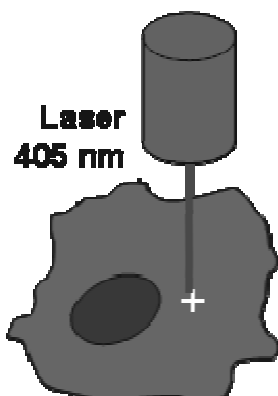
Suivi de la réapparition de la fluorescence dans la zone blanchie par diffusion

## **FLIP : Fluorescence Loss In Photobleaching**



Suivi de la disparition de fluorescence hors de la zone blanchie régulièrement

## **PA : Photoactivation**



Activation locale des protéines PA-GFP

Suivi du déplacement des protéines PA-GFP activées



Figure 96 : Principe du FRET et des principales méthodes d'imagerie de fluorescence (d'après [http://institut.cochin.inserm.fr/rubric\\_recherche/Plates-Formes/](http://institut.cochin.inserm.fr/rubric_recherche/Plates-Formes/) et Lippincott-Schwartz, 2001, Trugnan, 2004).

### **Microinjection de peptide cyclique**

Un million de cellules MCF10A, MCF7 ou HeLa sont déposées dans une p100 contenant 16 lamelles de verre de 12mm de diamètre. Lorsque les cellules ont adhéré, chaque lamelle est transférée dans une p60 avec 3mL de milieu. Huit  $\mu$ L de peptide à 1mM et 2 $\mu$ L de Dextran Texas Red (à l'obscurité) sont ultracentrifugés 15min à 45000rpm, à 4°C (Ultracentrifugeuse TL Beckman, rotor TLA 45). Deux  $\mu$ L de surnageant sont prélevés avec un cône ultrafin et transférés dans une aiguille à microinjection (Eppendorf). Au grossissement 32x, la pression d'injection est réglée à entre 85 et 100hPa, avec une pression constante entre 64 et 70hPa. Le temps d'injection est de 0,1sec. L'aiguille est centrée sur l'objectif et la microinjection se fait sous filtre FITC pour contrôler le flux. Entre une vingtaine et une cinquantaine de cellules par lamelle sont microinjectées, dont quelques unes en mode « blow » (une grande quantité est injectée) pour faciliter le repérage des cellules injectées par la suite. Les cellules sont fixées 1h à 72h après, au PFA 4% après rinçage PBS.

### **Immunofluorescence indirecte**

Après lavage PBS, les cellules sont fixées au PFA 4%, 10min à 22°C. Après 3 lavages au PBS, 3min, les cellules sont perméabilisées avec du Triton X100 0,5% dans du PBS, 10min à 22°C, puis lavées 3 fois au PBS, 3min. La saturation s'effectue avec du SVF ou sérum de chèvre 5% dans du PBS, 30min à 22°C. L'anticorps primaire est dilué à la concentration requise dans du PBS-sérum 5% (40 $\mu$ L pour des lamelles ou des labtecks) et incubé 1h à 37°C, 2h à 22°C ou la nuit à 4°C. Après 3 lavages PBS, 3min, l'anticorps secondaire est dilué dans du PBS-sérum 5% et les cellules sont incubées 45min à 22°C. Après lavage au PBS, les cellules sont incubées 10min dans une solution de Hoechst (2 $\mu$ g/mL). Après un dernier lavage au PBS, les lamelles sont montées sur lames avec du Vectashield (Vector) ou avec du Dako (DakoCytomation) et luttées au vernis (Resist & Shine, L'Oréal).

### **Microscopie**

Les cellules sont observées à l'aide d'un microscope Zeiss (Axiovert 200M), équipé du logiciel Axiovision 4.4, ou d'un microscope Leica DMIRBE couplé à un appareil confocal Leica à balayage laser TCS SP2.

### Test de viabilité cellulaire

En plaque 96 puits, 15000 (MCF7), 5000 (MCF10A) ou 10000 (HeLa) cellules/point sont déposées. Le lendemain, le milieu est remplacé par du milieu habituel contenant les composés à tester (10 à 200µM final). A 24h ou à 48h, les cellules sont observées puis rincées 3 fois avec du PBS. Cent µL de milieu sont ajoutés, suivis de 100µL de CellTiter-Glo (Luminescent Cell Viability assay, Promega). Ce réactif quantifie l'ATP des cellules vivantes. Après 2min d'agitation et 10min d'incubation, une lecture de luminescence est réalisée.

Ce test permet de déterminer le nombre de cellules viables en culture en quantifiant l'ATP présent, ce qui signe la présence de cellules métaboliquement actives. Le signal luminescent émis est proportionnel à la quantité d'ATP, elle-même proportionnelle au nombre de cellules vivantes.

La mono-oxygénation de la luciférine est catalysée par la luciférase en présence de  $Mg^{2+}$ , d'ATP et d' $O_2$  (figure 97).

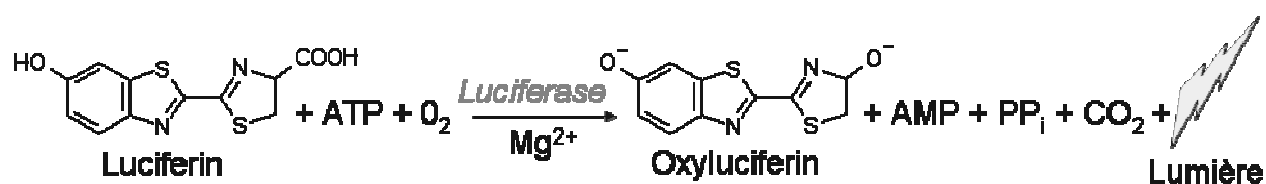


Figure 97 : Réaction luciférase.

### FACS

Afin d'enrichir les cellules NIH 3T3 stables GFP-CK2b en cellules fortement fluorescentes, celles-ci sont triées au FACS. Pour cela, 10 à 12 millions de cellules sont trypsinées, reprises dans du milieu complet, centrifugées 5min à 1000rpm, et reprises dans 1mL de PBS-EDTA 5mM. A titre de controle, des NIH 3T3 sont utilisées. Elles sont filtrées sur tube à hémolyse pour éliminer des agrégats qui pourraient boucher la buse du FACS puis passées au FACS. Les 8% les plus fluorescentes sont gardées, soit 370 000 cellules, et réétalées en p60 dans du milieu complet.

La procédure peut être réitérée quelques jours plus tard : les cellules les plus fluorescentes sont gardées (40%).

## **BiFc**

La mise en œuvre du BiFc est décrite dans la publication « Structure-based design of small peptide inhibitors of protein-kinase CK2 subunit interaction », Biochem. J.

La mise au point du test est décrite dans la section Résultats, 3<sup>e</sup> partie.

Pour l'immunofluorescence, l'anticorps anti-GFP monoclonal (Abcam) est utilisé au 1/200 et l'anticorps secondaire goat-anti-mouse-Cy3 au 1/1000. Entre 400 et 600 cellules (soit une douzaine de champs au grossissement 40X) sont comptées sous filtre Hoechst et Cy3. Dans les conditions témoins (DMSO), on compte en moyenne 31,8% de complémentation de fluorescence (pourcentage de cellules fluorescentes par rapport au nombre de cellules total).

## **Test de blessure**

200 000 cellules MCF10A sont étalées dans des plaques de 24 puits. Après attachement et à confluence, une blessure est pratiquée à l'aide d'un cône de P200 et les cellules sont rincées avec du PBS. La fermeture de la blessure est suivie au microscope optique après 2h, 6h, 9h, 24h, 48h, 72h.

## IV- BIOINFORMATIQUE

### Structures cristallographiques utilisées

Les structures utilisées proviennent de la Protein Data Bank ([www.pdb.org](http://www.pdb.org)). Pour CK2 $\alpha$ , la structure 1PJK a été utilisée humaine 1-335 (Niefind, 1998). Pour le tétramère CK2 $\alpha$ 2 $\beta$ 2, la structure 1JWH humaine a été utilisée (Niefind, 2001).

### Visualisation moléculaire

- Chimera

UCSF Chimera est un logiciel de visualisation et d'analyse moléculaire développé par Resource for Biocomputing, Visualization, and Informatics (University of California, San Francisco) financé par le NIH National Center for Research Resources. Chimera peut lire des structures moléculaires dans différents formats, présenter des structures dans des représentations variées et générer des images au format jpg et des animations vidéo. Chimera peut être téléchargé gratuitement pour les laboratoires académiques et les particuliers, et fonctionne sous Linux, Windows et MacOS X (Pettersen, 2004 et <http://www.cgl.ucsf.edu/chimera/>).

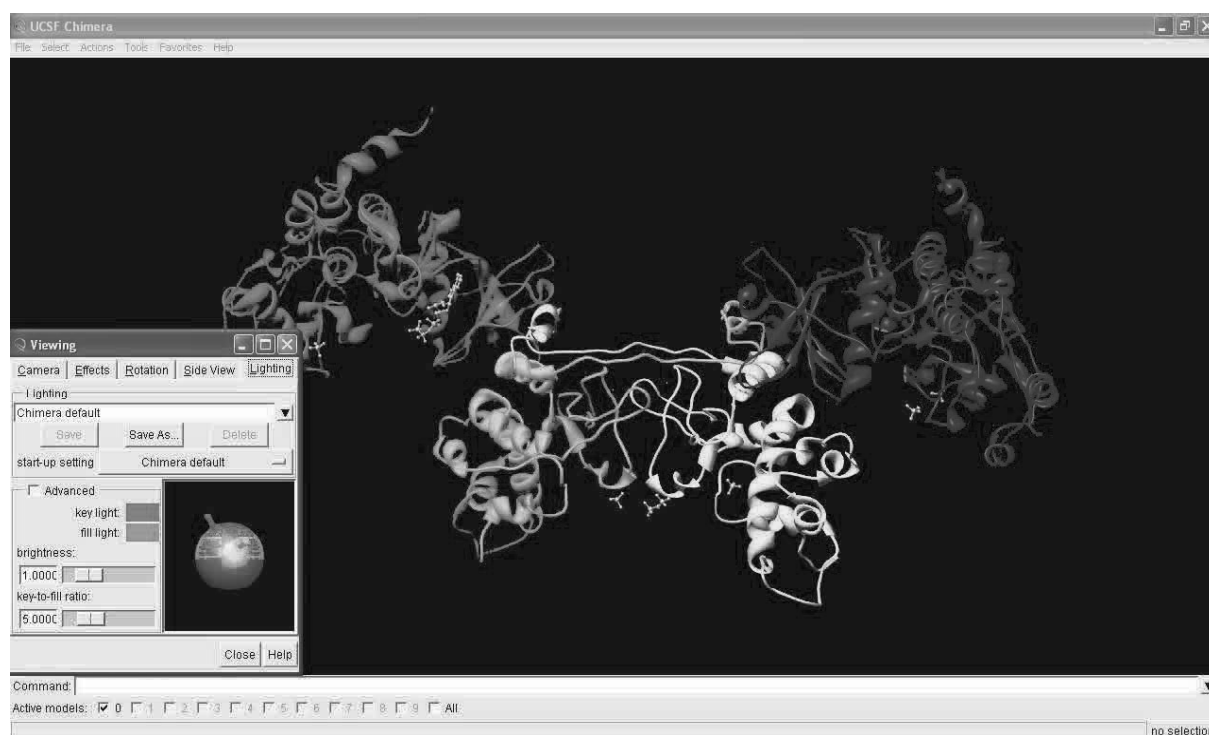


Figure 98 : Interface graphique de Chimera.

- **SwissPdbViewer**

SwissPdbViewer est également un logiciel de visualisation moléculaire, pouvant visualiser plusieurs molécules simultanément. SwissPdbViewer peut être téléchargé gratuitement pour les laboratoires académiques et les particuliers, et fonctionne sous Linux, Windows et MacOS X (Guex, 1997 et <http://www.expasy.ch/spdbv/> ).

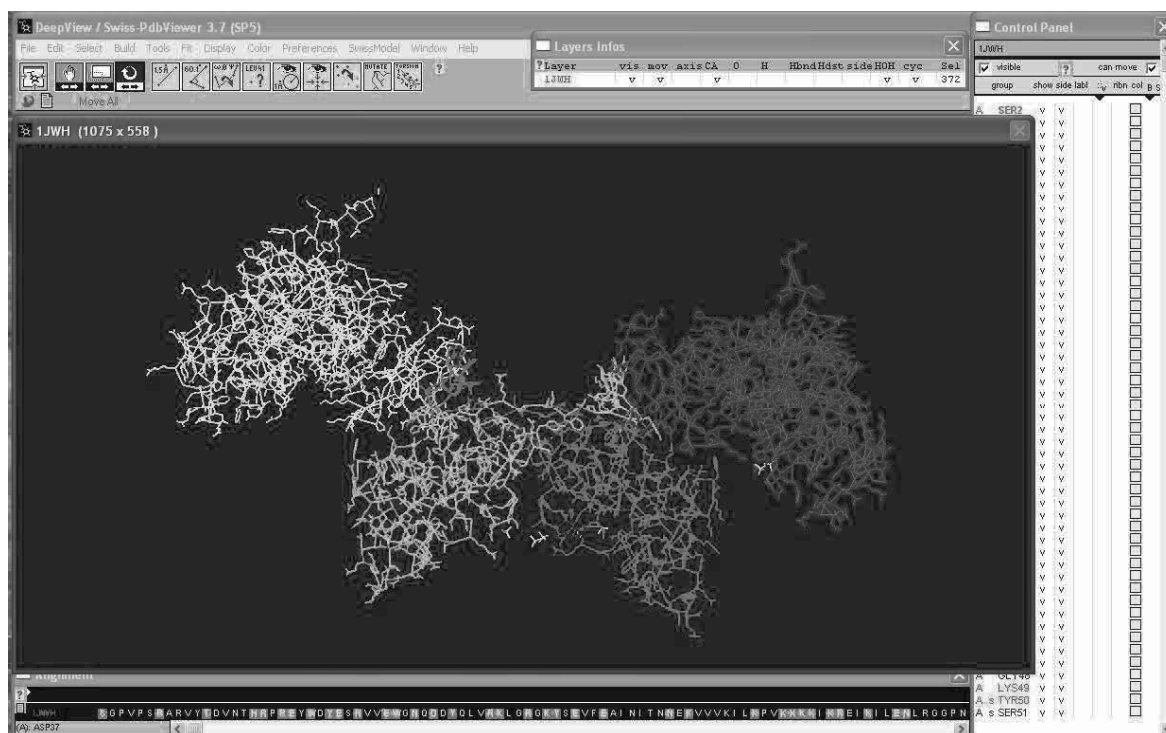


Figure 99 : Interface graphique de SwissPdbViewer.

- **Marvin (msketch)**

MarvinSketch et MarvinView sont deux logiciels Java développés par la société Chemaxon (<http://www.chemaxon.com/>). MarvinSketch est un éditeur de molécules chimiques utilisé pour dessiner des structures, des requêtes et des réactions. MarvinView est un logiciel de visualisation de molécules chimiques au format mol, sdf, smiles, smart, pdb,... en 2D ou 3D.

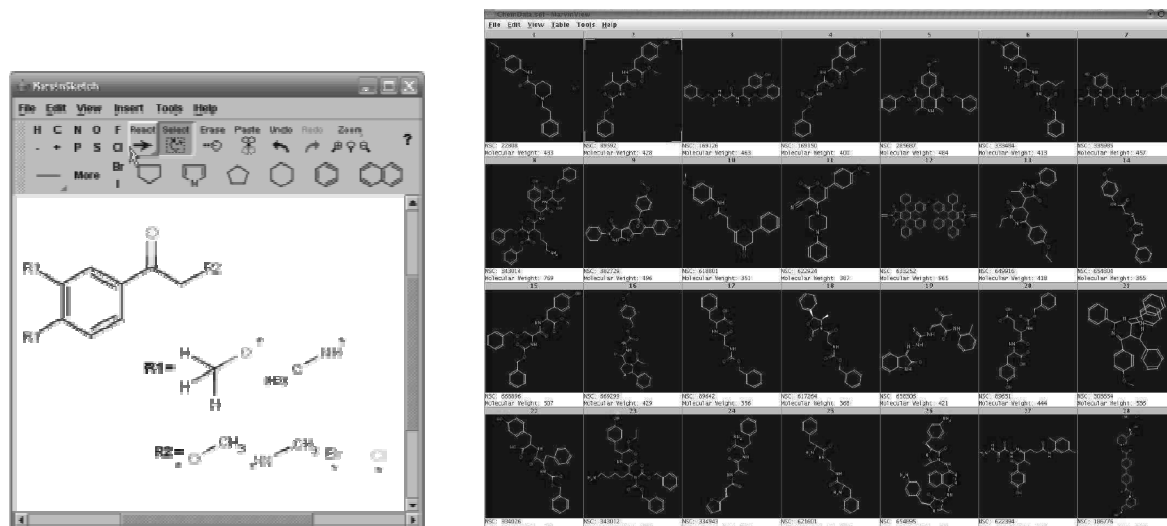


Figure 100 : Interface graphique de MarvinSketch (à gauche) et MarvinView (à droite).

- **MDL Isis/Draw 2.5**

Le logiciel MDL Isis/Draw en libre accès permet de dessiner des structures chimiques de molécules.

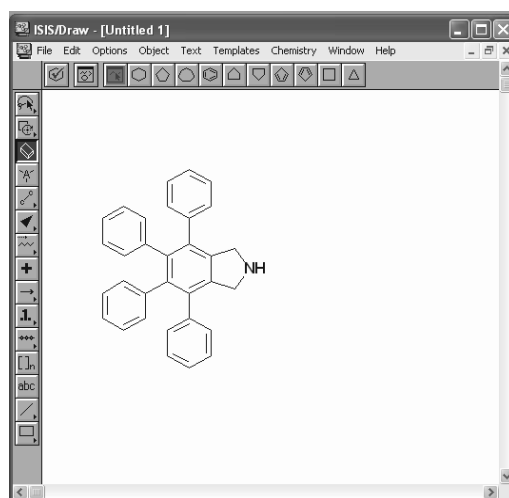


Figure 101 : Interface graphique de MDL Isis/Draw.

## **Prédiction des hot spots : logiciel ROBETTA**

Robetta est un logiciel de prédiction de structures protéiques et d'Ala-scanning des interactions protéine-protéine (Kortemme, 2002, Kortemme, 2004). Cette fonctionnalité estime la contribution de l'énergie libre de liaison de chaque résidu d'une interface protéine-protéine. Un modèle physique simple fournit un score à une série d'interfaces protéine-protéine dans lesquels les résidus au contact sont individuellement remplacés par de

l'alanine. Après chaque mutation virtuelle, l'énergie de liaison résultante est calculée à nouveau.

Il suffit d'entrer une structure tridimensionnelle d'un complexe protéine-protéine. Le logiciel sort une liste de « hot spots » ou chaînes latérales d'acides aminés prédits comme pouvant déstabiliser significativement l'interface s'ils sont mutés en alanine, de manière analogue aux résultats d'une mutagenèse dirigée alanine expérimentale. Sur 233 mutations de 19 complexes protéine-protéine, 79% des hot spots et 68% des résidus neutres ont été prédits correctement. Une interface peut être analysée en quelques dizaines de minutes. L'analyse se fait en ligne et les résultats sont disponibles pour n'importe quel utilisateur. Une valeur négative signifie que la mutation en Ala stabilise le complexe ; une valeur positive signifie que la mutation en Ala déstabilise le complexe. Plus la valeur s'écarte de 0, plus le complexe est déstabilisé.

Par exemple, pour l'interaction p53-Mdm2, les hot spots majeurs prédits à partir de la structure 1YCR.pdb sont les résidus 19 ( $\Delta\Delta G = 3,78$ ), 23 ( $\Delta\Delta G = 4,38$ ) et 26 ( $\Delta\Delta G = 2,02$ ), correspondant aux hot spots décrits et validés dans la littérature.

Pour le complexe CK2, la structure utilisée est 1JWH de Niefind, 2001.

### **Calcul de distances entre atomes : logiciel MOLMOL**

MOLMOL est un programme de graphique moléculaire pour la visualisation, l'analyse et la manipulation de structures 3D de macromolécules biologiques. Ce programme fonctionne sous UNIX et Windows et est accessible gratuitement (Koradi, 1996 et <http://hugin.ethz.ch/wuthrich/software/molmol/>).

Ce logiciel a été utilisé pour l'une de ses fonctionnalités : le calcul des distances entre atomes, ici entre CK2 $\alpha$  et les deux CK2 $\beta$  avec lesquelles la sous-unité catalytique interagit.

Le script réalisé est le suivant :

```
#Calcul distances CK2 atomes < 4 Angstroms

InitAll yes
ReadPdb 1JWH.pdb

CalcDist 4 4 4 1 1 0 0
```



La commande CalcDist calcule les distances entre atomes en identifiant les paires d'atomes ayant une distance inférieure à la distance déterminée (4 Å) et qui ne sont pas connectés par une ou deux liaisons.

### Visualisation des résidus < 4 Å

- avec Molmol

La macro utilisée pour visualiser les résidus de CK2 $\alpha$  et CK2 $\beta$  se trouvant à moins de 4 Å de distance de la sous-unité opposée est la suivante.

```
#Affichage.mac

InitAll yes
ReadPdb 1JWH.pdb
StyleBond invisible
Autoscale

#Sélection des aa de alpha2/beta3 avec distance < 4Å°

SelectRes 'mol.num = 2 & num = 36,103'
SelectBond 'res.selected'
StyleBond neon
RadiusBond 0.5
ColorBond 0 0 1
SelectAtom '(name = "CA") & (mol.num = 2) & (res.num = 36,103)'
LabelAtom "R N"

#Sélection des aa de alpha2/beta4 avec distance < 4Å°

SelectRes 'mol.num = 2 & num =
  37,41,40,44,50,52,54,42,43,49,69,72,104,106,108'
SelectBond 'res.selected'
StyleBond neon
RadiusBond 0.5
ColorBond 0 0 1
SelectAtom '(name = "CA") & (mol.num = 2) & (res.num =
  37,41,40,44,50,52,54,42,43,49,69,72,104,106,108)'
LabelAtom "R N"

#Sélection des aa de beta3/alpha2 avec distance < 4Å°

SelectRes 'mol.num = 3 & num = 188,189,190,191,193'
SelectBond 'res.selected'
StyleBond neon
RadiusBond 0.5
```

```

ColorBond 0 1 0
SelectAtom `(name = "CA") & (mol.num = 3) & (res.num =
188,189,190,191,193)`
LabelAtom "R N"

#Sélection des aa de beta4/alpha2 avec distance < 4Å°

SelectRes `mol.num = 3 & num = 166,34,170,169,37,86,126`
SelectBond `res.selected`
StyleBond neon
RadiusBond 0.5
ColorBond 1 0 0
SelectAtom `(name = "CA") & (mol.num = 4) & (res.num =
166,34,170,169,37,86,126)`
LabelAtom "R N"

SelectAtom `(name = "CA") & (mol.num = 3) & (res.num = 188)`
Center
AutoScale
ZoomRel 1
BackColor 0.0 0.0 0.0

ColorInit 1.0 1.0 1.0

```

- **avec SwissPdbViewer**

La macro suivante a été écrite pour visualiser les acides aminés de l'interaction CK2 $\alpha$ -CK2 $\beta$  situés à moins de 4 Å de la sous-unité opposée en réalisant un dégradé de couleurs : plus le résidu est clair, plus il est proche de la sous-unité opposée.

```

#####Mappingzoneinteraction

Please do

#Ouvre le fichier CK2
$path = "C:\home\SwissPDBviewer\spdb\structure\" ;
$filename = "1JWH2.pdb";
Open $path+$filename ;

#Sélectionne les chaines
$alpha1 = select in "1JWH2" chain "A";
$alpha2 = select in "1JWH2" chain "B";
$beta3 = select in "1JWH2" chain "C";
$beta4 = select in "1JWH2" chain "D";

#Distance à la chaine en Angstroms
$R = (float)0.0 ;
$S = (float)0.5 ;

```

```

#Définit $Residuel comme ne contenant rien
$Residuel = $alpha2-$alpha2 ;
$ResA = $alpha2-$alpha2 ;

$I = 0 ;
Do
{

#Sélectionne tous les éléments compris dans R et S A° autour de la chaine sélectionnée
$EnvA1S = select within $S of $alpha1 ;
$EnvB3S = select within $S of $beta3 ;
$EnvB4S = select within $S of $beta4 ;

$EnvA1R = select within $S of $alpha1 ;
$EnvB3R = select within $S of $beta3 ;
$EnvB4R = select within $S of $beta4 ;

#Sélectionne tous les éléments compris entre R et S A° et les placent dans EnvXXS
$EnvA1S = $EnvA1S - $EnvA1R ;
$EnvB3S = $EnvB3S - $EnvB3R ;
$EnvB4S = $EnvB4S - $EnvB4R ;

#Dégradé de couleurs
$R = $R+0.5 ;
$S = $S+0.5 ;
$Degrade = 1.2 -$R / 6.3 ;

#Definition des couleurs
$green = <0.0,$Degrade,0.0> ;
$red = <$Degrade,0.0,0.0> ;
$blue = <0.0,0.0,$Degrade> ;

#Zone d'interaction alpha1

#Rés de alpha1 (en bleu) à R A° de beta3 et de beta4
$EnvA1R = $EnvB3S + $EnvB4S - $beta4 - $beta3 - $alpha2 ;
Color res of $EnvA1R by $blue ;

#Rés de beta3 (en rouge) à R A° de alpha1
$EnvB3R = $EnvA1S - $alpha1 - $beta4 - $alpha2 ;
Color res of $EnvB3R by $red ;

#Rés de beta4 (en vert) à R A° de alpha1
$EnvB4R = $EnvA1S - $alpha1 - $beta3 - $alpha2 ;
Color res of $EnvB4R by $green ;

$Residuel = $Residuel + $EnvB3R + $EnvB4R ;
$ResA = $ResA + $EnvA1R ;

```

```
} while (++$I < 11) ;  
  
Select $Residuel ;  
Show res,side,label of $Residuel ;  
Select ResA ;  
Show res,side,label,vdw,ribbon,surface of $ResA ;  
Center on $Residuel ;  
Zoom 350.0 ;  
  
Thank you
```

## **Docking**

La recherche de molécules inhibitrices par docking a été réalisée en collaboration avec Antoine Fortuné (DPM, Meylan). Les logiciels utilisés sont Surflex (criblage par similarité et docking haut débit), Autodock (docking), XScore (fonction de score d'affinité ligand récepteur), GRID (pour les champs d'interactions moléculaires, docking et QSAR 3D).

La chimiothèque utilisée est la Zinc (UCSF) comportant 3 millions de structures correspondant à des composés commerciaux et du NCI. Une présélection par criblage basé sur la similarité morphologique avec le peptide natif est réalisée. Après la présélection, 800 000 structures sont testées en docking en 12 à 15 jours de calcul, sur une grappe de 28 ordinateurs PC.

## **Criblage virtuel : Chemaxon**

Afin d'identifier des inhibiteurs de l'interaction CK2 $\alpha$ -CK2 $\beta$  de nature chimique et non peptidique, un criblage virtuel a été réalisé en se basant sur les données pharmacophoriques rassemblées lors de la caractérisation du peptide cyclique Pc. Ce criblage a été réalisé en collaboration avec les bioinformaticiens du CEA (Samia Aci, BIM, CEA Grenoble).

- **Chimiothèques**

Les chimiothèques utilisées sont la chimiothèque Open NCI Database Release 2 (August 2000, <http://cactus.nci.nih.gov/ncidb2/download.html>) et la chimiothèque PubChem (<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>). La première contient 250 251 structures 2D (correspondant à 238 000 composés) au format sdf et smiles, la seconde en contient 660 000.

- **Logiciel Chemaxon**

Le logiciel utilisé est Chemaxon (<http://www.chemaxon.com/>) et son module JChem Base. ChemAxon est une société hongroise fournissant des plateformes de développement de logiciels chimiques pour les industries pharmaceutiques et de biotechnologies. Leurs produits sont en libre accès pour l'enseignement et la recherche académiques. JChem Base est un outil pour le développement d'applications permettant à la fois la recherche de données structurales et non-structurales. JChem Base intègre une variété de systèmes de données et des interfaces internet, et propose un outil de recherche rapide de sous-structures, de similarités, d'identité et de superstructure, à l'aide de l'empreinte 2D en pointillés.

- **Recherche de sous-structures et de similarités**

Deux types de recherche ont été ici réalisés : recherche de sous-structures et recherche de similarités. La recherche de sous-structures consiste à identifier des structures possédant les groupements demandés, avec le même espacement, et une variabilité non définie entre eux. Cette recherche s'appuie sur les structures en 2 dimensions. La recherche de similarités s'attache à identifier des structures qui ressemblent davantage à la structure demandée.

Dans un premier temps, une structure de requête a été définie, basée sur les résidus 188, 189 et 190 du peptide cyclique Pc, délimitant le pharmacophore actif du composé. La structure de requête ainsi définie est rapportée sur la figure 102. Elle consiste en 2 cycles aromatiques, un phenyl et un oxo-phényl séparés par 10 liaisons covalentes, qui peuvent être aussi bien simples, que doubles ou aromatiques (les pointillés signifient "n'importe quel type de liaison") impliquant n'importe quel type d'atome (signification du symbole A). La recherche de composés a été réalisée avec cette requête au format SMART en utilisant la commande jsearch de l'outil JChemBase. Le fichier de la base de données cible spécifié était le fichier SDF du dossier Open NCI Database Release 2 et l'option de recherche de sous-structure a été choisie pour cette requête.

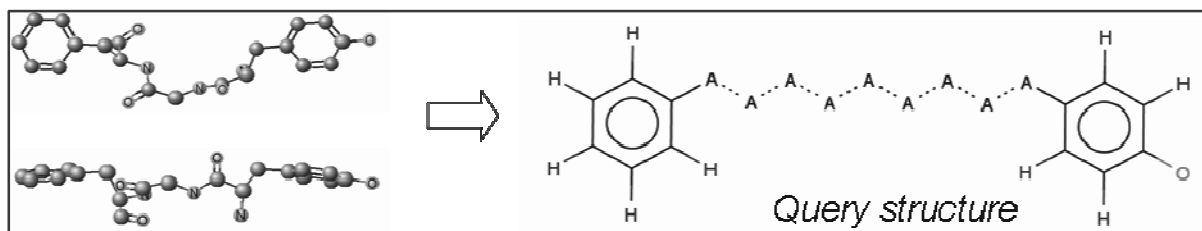


Figure 102 : Illustration de la définition de la structure de requête à partir du peptide cyclique : à gauche est reportée la conformation des 3 résidus 188, 189 et 190 du peptide cyclique Pc. On peut noter que les deux

cycles phényles sont dans le même plan. A droite est reportée la structure de requête exacte réalisée à partir du peptide Pc et utilisée pour la recherche de sous-structures.

- **Filtres secondaires**

Recherche de sous-structures :

191 composés possédant cette sous-structure ont été extraits. Ces 191 composés ont été ensuite soumis à plusieurs filtres pour réduire le nombre de composés à tester *in vitro*.

Recherche de similarités :

Le tripeptide F188-G189-Tyr190 ou une molécule exactement similaire n'existe pas dans ces bases de données. 34 molécules ont été identifiées par le logiciel comme possédant 90% de similarité, 200 autres avec 80% de similarité.

Ont ainsi été écartés les composés possédant :

- un poids moléculaire inférieur à 200 Da et supérieur à 2000,
- un  $\log P < 5$  (règle de Lipinski) afin de garder les composés hydrophobes, vu que l'interaction CK2 $\alpha$ -CK2 $\beta$  est principalement hydrophobe.
- les aldéhydes car ils se pontent sur les lysines et s'oxydent en acide carboxylique si l'espace est libre car on n'est pas en milieu anoxique.
- Les hydrazones, car elles dérivent d'un aldéhyde et sont attaquées prioritairement par les enzymes du métabolisme cellulaire (réductases).
- Les hydrazines pour les mêmes raisons : la molécule se coupe en deux.
- Les molécules réactives.
- Les sucres car ils n'entrent pas dans la cellule, ils sont trop hydrophiles.
- Les composés comportant des ponts disulfures : ils peuvent être réduits.
- Les composés trop chargés (O<sup>+</sup>, SH<sup>+</sup>, N<sup>+</sup>), car notre interaction est hydrophobe.
- Les aziridines, car elles peuvent s'ouvrir dans un contexte biologique.
- Les furanes sont hépatotoxiques : ils sont ouverts par le cytochrome P450, s'oxydent et vont ponter l'ADN.
- Les esters, hydrolysés en milieu cellulaire.
- Les métaux, chargés et rares dans les interactions cellulaires.
- Les composés possédant plus de 2 charges à pH 7,4.

- **Obtention des composés**

Les composés identifiés par leur numéro NSC peuvent être commandés au NCI à raison de 40 composés maximum par mois, gratuitement (2mg poudre sont fournis, stockés ensuite à 10mM dans du DMSO à -20°C). Cependant, un dernier facteur limitant a été la disponibilité des composés : l'état des stocks n'est pas accessible lors de la commande et certains composés sont épuisés. En définitive, 25 composés ont été testés *in vitro* dans le test d'interaction CK2 $\alpha$ -CK2 $\beta$  radioactif.

# **BIBLIOGRAPHIE**



## BIBLIOGRAPHIE

Ahmed K, Gerber DA, Cochet C. Joining the cell survival squad: an emerging role for protein kinase CK2. *Trends Cell Biol.* 2002 May;12(5):226-30.

Ambroise Y, Yaspan B, Ginsberg MH, Boger DL. Inhibitors of cell migration that inhibit intracellular paxillin/ $\alpha$ 4 binding: a well-documented use of positional scanning libraries. *Chem Biol.* 2002 Nov;9(11):1219-26.

Battistutta R, Sarno S, De Moliner E, Papinutto E, Zanotti G, Pinna LA. The replacement of ATP by the competitive inhibitor emodin induces conformational modifications in the catalytic site of protein kinase CK2. *J Biol Chem.* 2000 Sep 22;275(38):29618-22.

Berg T, Cohen SB, Desharnais J, Sonderegger C, Maslyar DJ, Goldberg J, Boger DL, Vogt PK. Small-molecule antagonists of Myc/Max dimerization inhibit Myc-induced transformation of chicken embryo fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002 Mar 19;99(6):3830-5.

Bibby AC, Litchfield DW. The Multiple Personalities of the Regulatory Subunit of Protein Kinase CK2: CK2 Dependent and CK2 Independent Roles Reveal a Secret Identity for CK2 $\beta$ . *Int J Biol Sci.* 2005;1(2):67-79.

Bidwai AP, Reed JC, Glover CV. Cloning and disruption of CKB1, the gene encoding the 38-kDa  $\beta$  subunit of *Saccharomyces cerevisiae* casein kinase II (CKII). Deletion of CKII regulatory subunits elicits a salt-sensitive phenotype. *J Biol Chem.* 1995 May 5;270(18):10395-404.

Biessen EA, Beuting DM, Roelen HC, van de Marel GA, van Boom JH, van Berkel TJ. Synthesis of cluster galactosides with high affinity for the hepatic asialoglycoprotein receptor. *J Med Chem.* 1995 Apr 28;38(9):1538-46.

Biessen EAL, Broxterman H, van Boom JH, van Berke TJC. The cholesterol derivative of triantennary galactoside with high affinity for the hepatic asialoglycoprotein receptor : a potent cholesterol lowering agent. 1995 *J Med Chem*, 38, 1846-1852.

Bjorling-Poulsen M, Siehler S, Wiesmuller L, Meek D, Niefind K, Issinger OG. The 'regulatory'  $\beta$ -subunit of protein kinase CK2 negatively influences p53-mediated allosteric effects on Chk2 activation. *Oncogene.* 2005 Sep 8;24(40):6194-200.

Bogan AA, Thorn KS. Anatomy of hot spots in protein interfaces. *J Mol Biol.* 1998 Jul 3;280(1):1-9. Review.

Boger DL, Schule G. Synthesis of Acyclic Precursors to (3S,4S)-4-Hydroxy-2,3,4,5-tetrahydropyridazine-3-carboxylic Acid and Incorporation into a Luzopeptin/Quinoxapeptin Dipeptide. *J Org Chem.* 1998 Sep 4;63(18):6421-6424.

Boger DL, Dechantsreiter MA, Ishii T, Fink BE, Hedrick MP. Assessment of solution-phase positional scanning libraries based on distamycin A for the discovery of new DNA binding agents. *Bioorg Med Chem.* 2000 Aug;8(8):2049-57.

Boger DL, Desharnais J, Capps K. Solution-phase combinatorial libraries: modulating cellular signaling by targeting protein-protein or protein-DNA interactions. *Angew Chem Int Ed Engl.* 2003 Sep 15;42(35):4138-76. Review.

Boldyreff B, Issinger OG. Structure of the gene encoding the murine protein kinase CK2 beta subunit. *Genomics*. 1995 Sep 1;29(1):253-6.

Boldyreff B, Issinger OG. A-Raf kinase is a new interacting partner of protein kinase CK2 beta subunit. *FEBS Lett*. 1997 Feb 17;403(2):197-9.

Bren GD, Pennington KN, Paya CV. PKC-zeta-associated CK2 participates in the turnover of free I $\kappa$ B $\alpha$ . *J Mol Biol*. 2000 Apr 14;297(5):1245-58.

Buchou T, Cochet C. Protein kinase CK2: an enzyme that likes to be different. *Med Sci (Paris)*. 2003 Jun-Jul;19(6-7):709-16. Review.

Buchou T, Vernet M, Blond O, Jensen HH, Pointu H, Olsen BB, Cochet C, Issinger OG, Boldyreff B. 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 Feb;23(3):908-15.

Cassier PA, Chabaud S, Trillet-Lenoir V, Peaud PY, Tigaud JD, Cure H, Orfeuvre H, Salles B, Martin C, Jacquin JP, Agostini C, Guastalla JP, Perol D, Bachelot T. A phase-III trial of doxorubicin and docetaxel versus doxorubicin and paclitaxel in metastatic breast cancer: results of the ERASME 3 study. *Breast Cancer Res Treat*. 2007 Jul 5.

Cavasotto CN, Abagyan RA. Protein flexibility in ligand docking and virtual screening to protein kinases. *J Mol Biol*. 2004 Mar 12;337(1):209-25.

Cavasotto CN, Orry AJ. Ligand docking and structure-based virtual screening in drug discovery. *Curr Top Med Chem*. 2007;7(10):1006-14. Review.

Channavajhala P, Seldin DC. Functional interaction of protein kinase CK2 and c-Myc in lymphomagenesis. *Oncogene*. 2002 Aug 8;21(34):5280-8.

Chantalat L, Leroy D, Filhol O, Nueda A, Benitez MJ, Chambaz EM, Cochet C, Dideberg O. Crystal structure of the human protein kinase CK2 regulatory subunit reveals its zinc finger-mediated dimerization. *EMBO J*. 1999 Jun 1;18(11):2930-40.

Chardot T, Shen H, Meunier JC. Dual specificity of casein kinase II from the yeast *Yarrowia lipolytica*. *C R Acad Sci III*. 1995 Sep;318(9):937-42.

Chen M, Li D, Krebs EG, Cooper JA. The casein kinase II beta subunit binds to Mos and inhibits Mos activity. *Mol Cell Biol*. 1997 Apr;17(4):1904-12.

Cline SD, Macdonald TL, Osheroff N. Azatoxin is a mechanistic hybrid of the topoisomerase II-targeted anticancer drugs etoposide and ellipticine. *Biochemistry*. 1997 Oct 21;36(42):13095-101.

Cohen P. Protein kinases--the major drug targets of the twenty-first century? *Nat Rev Drug Discov*. 2002 Apr;1(4):309-15. Review.

Cozza G, Bonvini P, Zorzi E, Poletto G, Pagano MA, Sarno S, Donella-Deana A, Zagotto G, Rosolen A, Pinna LA, Meggio F, Moro S. Identification of ellagic acid as potent inhibitor of protein kinase CK2: a successful example of a virtual screening application. *J Med Chem*. 2006 Apr 20;49(8):2363-6.

Debnath J, Muthuswamy SK, Brugge JS. Morphogenesis and oncogenesis of MCF-10A mammary epithelial acini grown in three-dimensional basement membrane cultures. *Methods*. 2003 Jul;30(3):256-68.

Di Maira G, Salvi M, Arrigoni G, Marin O, Sarno S, Brustolon F, Pinna LA, Ruzzene M. Protein kinase CK2 phosphorylates and upregulates Akt/PKB. *Cell Death Differ.* 2005 Jun;12(6):668-77.

Faust RA, Tawfic S, Davis AT, Bubash LA, Ahmed K. Antisense oligonucleotides against protein kinase CK2- $\alpha$  inhibit growth of squamous cell carcinoma of the head and neck in vitro. *Head Neck.* 2000 Jul;22(4):341-6.

Faust M, Jung M, Günther J, Zimmermann R, Montenarh M. Localization of individual subunits of protein kinase CK2 to the endoplasmic reticulum and to the Golgi apparatus. *Mol Cell Biochem.* 2001 Nov;227(1-2):73-80.

Fayette J, Soria JC, Thérapies moléculaires ciblées : l'exemple de l'Iressa (ZD1839), M/S n° 11, vol. 19, novembre 2003, 1052-4.

Filhol O, Cochet C, Wedegaertner P, Gill GN, Chambaz EM. Coexpression of both  $\alpha$  and  $\beta$  subunits is required for assembly of regulated casein kinase II. *Biochemistry.* 1991 Nov 19;30(46):11133-40.

Filhol O, Nueda A, Martel V, Gerber-Scokaert D, Benitez MJ, Souchier C, Saoudi Y, Cochet C. Live-cell fluorescence imaging reveals the dynamics of protein kinase CK2 individual subunits. *Mol Cell Biol.* 2003 Feb;23(3):975-87.

Filhol O, Martiel JL, Cochet C. Protein kinase CK2: a new view of an old molecular complex. *EMBO Rep.* 2004 Apr;5(4):351-5.

Garbett NC, Graves DE. Extending nature's leads: the anticancer agent ellipticine. *Curr Med Chem Anticancer Agents.* 2004 Mar;4(2):149-72.

Gatica M, Hinrichs MV, Jedlicki A, Allende CC, Allende JE. Effect of metal ions on the activity of casein kinase II from *Xenopus laevis*. *FEBS Lett.* 1993 Jan 4;315(2):173-7.

Ghavidel A, Schultz MC. Cell. TATA binding protein-associated CK2 transduces DNA damage signals to the RNA polymerase III transcriptional machinery. 2001 Sep 7;106(5):575-84.

Glover CV 3rd. On the physiological role of casein kinase II in *Saccharomyces cerevisiae*. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol.* 1998;59:95-133. Review.

Gordaliza M, Garcia PA, del Corral JM, Castro MA, Gomez-Zurita MA. Podophyllotoxin: distribution, sources, applications and new cytotoxic derivatives. *Toxicon.* 2004 Sep 15;44(4):441-59. Review.

Grein S, Raymond K, Cochet C, Pyerin W, Chambaz EM, Filhol O. Searching interaction partners of protein kinase CK2 $\beta$  subunit by two-hybrid screening. *Mol Cell Biochem.* 1999 Jan;191(1-2):105-9.

Grinberg AV, Hu CD, Kerppola TK. Visualization of Myc/Max/Mad family dimers and the competition for dimerization in living cells. *Mol Cell Biol.* 2004 May;24(10):4294-308.

Guerra B, Niefind K, Pinna LA, Schomburg D, Issinger OG. Expression, purification and crystallization of the catalytic subunit of protein kinase CK2 from *Zea mays*. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 1998 Jan 1;54(Pt 1):143-5.

Guerra B, Siemer S, Boldyreff B, Issinger OG. Protein kinase CK2: evidence for a protein kinase CK2beta subunit fraction, devoid of the catalytic CK2alpha subunit, in mouse brain and testicles. *FEBS Lett.* 1999 Dec 3;462(3):353-7.

Guerra B, Issinger OG, Wang JY. Modulation of human checkpoint kinase Chk1 by the regulatory beta-subunit of protein kinase CK2. *Oncogene.* 2003 Aug 7;22(32):4933-42.

Guerra B. Protein kinase CK2 subunits are positive regulators of AKT kinase. *Int J Oncol.* 2006 Mar;28(3):685-93.

Guex, N. and Peitsch, M.C. (1997) SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: An environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis* 18, 2714-2723.

Guo C, Yu S, Davis AT, Wang H, Green JE, Ahmed K. A potential role of nuclear matrix-associated protein kinase CK2 in protection against drug-induced apoptosis in cancer cells. *J Biol Chem.* 2001 Feb 23;276(8):5992-9.

Hajduk PJ, Gomtsyan A, Didomenico S, Cowart M, Bayburt EK, Solomon L, Severin J, Smith R, Walter K, Holzman TF, Stewart A, McGaraughty S, Jarvis MF, Kowaluk EA, Fesik SW. Design of adenosine kinase inhibitors from the NMR-based screening of fragments. *J Med Chem.* 2000 Dec 14;43(25):4781-6.

Hanahan D, Weinberg RA The hallmarks of cancer. *Cell.* 2000 Jan 7;100(1):57-70.

Hildesheim J, Salvador JM, Hollander MC, Fornace AJ Jr. Casein kinase 2- and protein kinase A-regulated adenomatous polyposis coli and beta-catenin cellular localization is dependent on p38 MAPK. *J Biol Chem.* 2005 Apr 29;280(17):17221-6.

Hu CD, Kerppola TK. Simultaneous visualization of multiple protein interactions in living cells using multicolor fluorescence complementation analysis. *Nat Biotechnol.* 2003 May;21(5):539-45.

Iversen PW, Eastwood BJ, Sittampalam GS, Cox KL. A comparison of assay performance measures in screening assays: signal window, Z' factor, and assay variability ratio. *J Biomol Screen.* 2006 Apr;11(3):247-52.

Izeradjene K, Douglas L, Delaney A, Houghton JA. Casein kinase II (CK2) enhances death-inducing signaling complex (DISC) activity in TRAIL-induced apoptosis in human colon carcinoma cell lines. *Oncogene.* 2005 Mar 17;24(12):2050-8.

Kannan N, Neuwald AF. Did protein kinase regulatory mechanisms evolve through elaboration of a simple structural component? *J Mol Biol.* 2005 Sep 2;351(5):956-72.

Kato T Jr, Delhase M, Hoffmann A, Karin M. CK2 Is a C-Terminal I $\kappa$ B Kinase Responsible for NF- $\kappa$ B Activation during the UV Response. *Mol Cell.* 2003 Oct;12(4):829-39.

Kerppola TK. Complementary methods for studies of protein interactions in living cells. *Nat Methods.* 2006 Dec;3(12):969-71.

Kerppola TK. Design and implementation of bimolecular fluorescence complementation (BiFC) assays for the visualization of protein interactions in living cells. *Nat Protoc.* 2006;1(3):1278-86.

Kim JS, Eom JI, Cheong JW, Choi AJ, Lee JK, Yang WI, Min YH. Protein kinase CK2alpha as an unfavorable prognostic marker and novel therapeutic target in acute myeloid leukemia. *Clin Cancer Res*. 2007 Feb 1;13(3):1019-28.

Kitchen DB, Decornez H, Furr JR, Bajorath J. Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: methods and applications. *Nat Rev Drug Discov*. 2004 Nov;3(11):935-49.

Koradi, R., Billeter, M., and Wüthrich, K. MOLMOL: a program for display and analysis of macromolecular structures. *J Mol Graphics*. 1996 14, 51-55.

Kortemme T, Kim DE, Baker D Computational alanine scanning of protein-protein interfaces. *Sci STKE*. 2004 219, pl2.

Kortemme T, Baker D. A simple physical model for binding energy hot spots in protein-protein complexes. *PNAS*. 2002 99, 22, 14116-21.

Krause DS, Van Etten RA. Tyrosine kinases as targets for cancer therapy. *N Engl J Med*. 2005 Jul 14;353(2):172-87. Review.

Krystal GW, Honsawek S, Litz J, Buchdunger E. The selective tyrosine kinase inhibitor STI571 inhibits small cell lung cancer growth. *Clin Cancer Res*. 2000 Aug;6(8):3319-26.

Kupper M, Koster M, Schmidt-Spaniol I, Wagner-Gillen I, Issinger OG. Characterization of protein kinase CK2 protein subunits and p53 in F9 teratocarcinoma cells in the absence and presence of cisplatin. *Cell Mol Biol Res*. 1994;40(5-6):587-92.

Kusk M, Ahmed R, Thomsen B, Bendixen C, Issinger OG, Boldyreff B. Interactions of protein kinase CK2beta subunit within the holoenzyme and with other proteins. *Mol Cell Biochem*. 1999 Jan;191(1-2):51-8.

Kweon SM, Wang B, Rixter D, Lim JH, Koga T, Ishinaga H, Chen LF, Jono H, Xu H, Li JD. Synergistic activation of NF-kappaB by nontypeable H. influenzae and S. pneumoniae is mediated by CK2, IKKbeta-IkappaBalpha, and p38 MAPK. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006 Dec 15;351(2):368-75.

Lallemant-Breitenbach V, de The H. CK2 and PML: regulating the regulator. *Cell*. 2006 Jul 28;126(2):244-5.

Landesman-Bollag E, Romieu-Mourez R, Song DH, Sonenshein GE, Cardiff RD, Seldin DC. Protein kinase CK2 in mammary gland tumorigenesis. *Oncogene*. 2001 May 31;20(25):3247-57.

Laramas M, Pasquier D, Filhol O, Ringeisen F, Descotes JL, Cochet C. Nuclear localization of protein kinase CK2 catalytic subunit (CK2alpha) is associated with poor prognostic factors in human prostate cancer. *Eur J Cancer*. 2007 Mar;43(5):928-34.

Laudet B, Barette C, Dulery V, Renaudet O, Dumy P, Metz A, Prudent R, Deshiere A, Dideberg O, Filhol O, Cochet C. Structure-based design of small peptide inhibitors of protein-kinase CK2 subunit interaction. *Biochem J*. 2007 Aug 23.

Laudet B, Prudent R, Filhol O, Cochet C. Therapeutic agents targetting protein-protein interactions: myth or reality? *Med Sci (Paris)*. 2007 Mar;23(3):273-8. Review. French.

Lazebnik Y. Can a biologist fix a radio? Or, what I learned while studying apoptosis. *Cancer Cell*. 2002 Sep;2(3):179-82.

Leleu X, Micol JB, Guieze R, Berthon C, Kuhnovsky F, Terriou L, Moreau AS, Yakoub-Agha I, Bauters F, Facon T. Thalidomide: mechanisms of action and new insights in hematology. *Rev Med Interne*. 2005 Feb;26(2):119-27.

Leroy D, Heriche JK, Filhol O, Chambaz EM, Cochet C. Binding of polyamines to an autonomous domain of the regulatory subunit of protein kinase CK2 induces a conformational change in the holoenzyme. A proposed role for the kinase stimulation. *J Biol Chem*. 1997 Aug 15;272(33):20820-7.

Leroy D, Filhol O, Quintaine N, Sarrouilhe D, Loue-Mackenbach P, Chambaz EM, Cochet C. Dissecting subdomains involved in multiple functions of the CK2beta subunit. *Mol Cell Biochem*. 1999 Jan;191(1-2):43-50.

Li X, Keskin O, Ma B, Nussinov R, Liang J. Protein-protein interactions: hot spots and structurally conserved residues often locate in complemented pockets that pre-organized in the unbound states: implications for docking. *J Mol Biol*. 2004 Nov 26;344(3):781-95.

Lippincott-Schwartz J, Snapp E, Kenworthy A. Studying protein dynamics in living cells. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2001 Jun;2(6):444-56. Review.

Litchfield DW. Protein kinase CK2: structure, regulation and role in cellular decisions of life and death. *Biochem J*. 2003 Jan 1;369(Pt 1):1-15. Review.

Manning G, Whyte DB, Martinez R, Hunter T, Sudarsanam S. The protein kinase complement of the human genome. *Science*. 2002 Dec 6;298(5600):1912-34. Review.

Marin O, Meggio F, Sarno S, Pinna LA. Physical dissection of the structural elements responsible for regulatory properties and intersubunit interactions of protein kinase CK2 beta-subunit. *Biochemistry*. 1997 Jun 10;36(23):7192-8.

Marin O, Meggio F, Pinna LA. Structural features underlying the unusual mode of calmodulin phosphorylation by protein kinase CK2: A study with synthetic calmodulin fragments. *Biochem Biophys Res Commun*. 1999 Mar 16;256(2):442-6.

Martel V, Filhol O, Nueda A, Gerber D, Benitez MJ, Cochet C. Visualization and molecular analysis of nuclear import of protein kinase CK2 subunits in living cells. *Mol Cell Biochem*. 2001 Nov;227(1-2):81-90.

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 Nov;973:272-7.

Meggio F, Donella Deana A, Ruzzene M, Brunati AM, Cesaro L, Guerra B, Meyer T, Mett H, Fabbro D, Furet P, et al. *Eur J Biochem*. Different susceptibility of protein kinases to staurosporine inhibition. Kinetic studies and molecular bases for the resistance of protein kinase CK2. 1995 Nov 15;234(1):317-22.

Meggio F, Pinna LA. One-thousand-and-one substrates of protein kinase CK2? *FASEB J*. 2003 Mar;17(3):349-68. Review.

Miyata Y, Nishida E CK2 binds, phosphorylates, and regulates its pivotal substrate Cdc37, an Hsp90-cochaperone. *Mol Cell Biochem*. 2005 Jun;274(1-2):171-9.

Montecucco A, Biamonti G. Cellular response to etoposide treatment. *Cancer Lett.* 2007 Jul 8;252(1):9-18. Epub 2006 Dec 12. Review.

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 May 1;17(9):2451-62.

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 Oct 1;20(19):5320-31.

Nistico C, Bria E, Cuppone F, Fornier M, Sperduti I, Carpino A, Pace A, Cognetti F, Terzoli E. Weekly epirubicin and paclitaxel with granulocyte colony-stimulating factor support in previously untreated metastatic breast cancer patients: a phase II study. *Anticancer Drugs.* 2007 Jul;18(6):687-692.

O-charoenrat P, Rusch V, Talbot SG, Sarkaria I, Viale A, Socci N, Ngai I, Rao P, Singh B. 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 Sep 1;10(17):5792-803.

Olsen BB, Bjørling-Poulsen M, Guerra B. Emodin negatively affects the phosphoinositide 3-kinase/AKT signalling pathway: a study on its mechanism of action. *Int J Biochem Cell Biol.* 2007;39(1):227-37.

Osaki M, Oshimura M, Ito H. PI3K-Akt pathway: its functions and alterations in human cancer. *Apoptosis.* 2004 Nov;9(6):667-76. Review.

Paez JG, Janne PA, Lee JC, Tracy S, Greulich H, Gabriel S, Herman P, Kaye FJ, Lindeman N, Boggon TJ, Naoki K, Sasaki H, Fujii Y, Eck MJ, Sellers WR, Johnson BE, Meyerson M. EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy. *Science.* 2004 Jun 4;304(5676):1497-500.

Pagano MA, Andrzejewska M, Ruzzene M, Sarno S, Cesaro L, Bain J, Elliott M, Meggio F, Kazimierczuk Z, Pinna LA. Optimization of protein kinase CK2 inhibitors derived from 4,5,6,7-tetrabromobenzimidazole. *J Med Chem.* 2004 Dec 2;47(25):6239-47.

Pagano MA, Meggio F, Ruzzene M, Andrzejewska M, Kazimierczuk Z, Pinna LA. 2-Dimethylamino-4,5,6,7-tetrabromo-1H-benzimidazole: a novel powerful and selective inhibitor of protein kinase CK2. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004 Sep 3;321(4):1040-4.

Pagano MA, Cesaro L, Meggio F, Pinna LA. Protein kinase CK2: a newcomer in the 'druggable kinome'. *Biochem Soc Trans.* 2006 Dec;34(Pt 6):1303-6.

Perea SE, Reyes O, Puchades Y, Mendoza O, Vispo NS, Torrens I, Santos A, Silva R, Acevedo B, Lopez E, Falcon V, Alonso DF. Antitumor effect of a novel proapoptotic peptide that impairs the phosphorylation by the protein kinase 2 (casein kinase 2). *Cancer Res.* 2004 Oct 1;64(19):7127-9.

Pechkova E, Zanotti G, Nicolini C. Three-dimensional atomic structure of a catalytic subunit mutant of human protein kinase CK2. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 2003 Dec;59(Pt 12):2133-9.

Pepinsky RB, Chen LL, Meier W, Wallner BP. The increased potency of cross-linked lymphocyte function-associated antigen-3 (LFA-3) multimers is a direct consequence of changes in valency. *J Biol Chem*. 1991 Sep 25;266(27):18244-9.

Pettersen, E.F., Goddard, T.D., Huang, C.C., Couch, G.S., Greenblatt, D.M., Meng, E.C., and Ferrin, T.E. "UCSF Chimera - A Visualization System for Exploratory Research and Analysis." *J. Comput. Chem*. 2004 25(13):1605-1612.

Pinna LA. A historical view of protein kinase CK2. *Cell Mol Biol Res*. 1994;40(5-6):383-90.

Pinna LA. Protein kinase CK2: a challenge to canons. *J Cell Sci*. 2002 Oct 15;115(Pt 20):3873-8. Review.

Ravi R, Bedi A. Sensitization of tumor cells to Apo2 ligand/TRAIL-induced apoptosis by inhibition of casein kinase II. *Cancer Res*. 2002 Aug 1;62(15):4180-5.

Renaudet O, Reymond JL. Synthesis of ether oligomers. *Org Lett*. 2004 Feb 5;6(3):397-400.

Ripka AS, Rich DH. Peptidomimetic design. *Curr Opin Chem Biol*. 1998 Aug;2(4):441-52. Review.

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 May 15;364(Pt 1):41-7.

Sarno S, Moro S, Meggio F, Zagotto G, Dal Ben D, Ghisellini P, Battistutta R, Zanotti G, Pinna LA. Toward the rational design of protein kinase casein kinase-2 inhibitors. *Pharmacol Ther*. 2002 Feb-Mar;93(2-3):159-68.

Sarno S, de Moliner E, Ruzzene M, Pagano MA, Battistutta R, Bain J, Fabbro D, Schoepfer J, Elliott M, Furet P, Meggio F, Zanotti G, Pinna LA. Biochemical and three-dimensional-structural study of the specific inhibition of protein kinase CK2 by [5-oxo-5,6-dihydroindolo-(1,2-a)quinazolin-7-yl]acetic acid (IQA). *Biochem J*. 2003 Sep 15;374(Pt 3):639-46.

Sarno S, Salvi M, Battistutta R, Zanotti G, Pinna LA. Features and potentials of ATP-site directed CK2 inhibitors. *Biochim Biophys Acta*. 2005 Dec 30;1754(1-2):263-70. Epub 2005 Sep 12. Review.

Scaglioni PP, Yung TM, Cai LF, Erdjument-Bromage H, Kaufman AJ, Singh B, Teruya-Feldstein J, Tempst P, Pandolfi PP. A CK2-dependent mechanism for degradation of the PML tumor suppressor. *Cell*. 2006 Jul 28;126(2):269-83.

Schmidt U, Richter K, Berger AB, Lichter P. In vivo BiFC analysis of Y14 and NXF1 mRNA export complexes: preferential localization within and around SC35 domains. *J Cell Biol*. 2006 Jan 30;172(3):373-81.

Schuster N, Götz C, Faust M, Schneider E, Prowald A, Jungbluth A, Montenarh M. Wild-type p53 inhibits protein kinase CK2 activity. *J Cell Biochem*. 2001;81(1):172-83.

Seeber S, Issinger OG, Holm T, Kristensen LP, Guerra B. Validation of protein kinase CK2 as oncological target. *Apoptosis*. 2005 Aug;10(4):875-85.

Seldin DC, Leder P. Casein kinase II alpha transgene-induced murine lymphoma: relation to theileriosis in cattle. *Science*. 1995 Feb 10;267(5199):894-7.



Seldin DC, Landesman-Bollag E, Farago M, Currier N, Lou D, Dominguez I. CK2 as a positive regulator of Wnt signalling and tumourigenesis. *Mol Cell Biochem*. 2005 Jun;274(1-2):63-7. Review.

Shin S, Lee Y, Kim W, Ko H, Choi H, Kim K. Caspase-2 primes cancer cells for TRAIL-mediated apoptosis by processing procaspase-8. *EMBO J*. 2005 Oct 19;24(20):3532-42. Erratum in: *EMBO J*. 2005 Dec 7;24(23):4209-10.

Shyu YJ, Liu H, Deng X, Hu CD. Identification of new fluorescent protein fragments for bimolecular fluorescence complementation analysis under physiological conditions. *Biotechniques*. 2006 Jan;40(1):61-6.

Slaton JW, Unger GM, Sloper DT, Davis AT, Ahmed K. Induction of apoptosis by antisense CK2 in human prostate cancer xenograft model. *Mol Cancer Res*. 2004 Dec;2(12):712-21.

Stigare J, Buddelmeijer N, Pigon A, Egyhazi E. A majority of casein kinase II alpha subunit is tightly bound to intranuclear components but not to the beta subunit. *Mol Cell Biochem*. 1993 Dec 8;129(1):77-85.

Tawfic S, Yu S, Wang H, Faust R, Davis A, Ahmed K. Protein kinase CK2 signal in neoplasia. *Histol Histopathol*. 2001 Apr;16(2):573-82. Review.

Theis-Febvre N, Martel V, Laudet B, Souchier C, Grunwald D, Cochet C, Filhol O. Highlighting protein kinase CK2 movement in living cells. *Mol Cell Biochem*. 2005 Jun;274(1-2):15-22.

Trugnan G, Fontanges P, Delautier D, Ait-Slimane T. FRAP, FLIP, FRET, BRET, FLIM, PRIM...new techniques for a colourful life. *Med Sci (Paris)*. 2004 Nov;20(11):1027-34. Review. French.

Tsien RY, Miyawaki A. Seeing the machinery of live cells. *Science*. 1998 Jun 19;280(5371):1954-5.

Vongpaseuth K, Roberts SC. Advancements in the understanding of Paclitaxel metabolism in tissue culture. *Curr Pharm Biotechnol*. 2007 Aug;8(4):219-36.

White J, Stelzer E. Photobleaching GFP reveals protein dynamics inside live cells. *Trends Cell Biol*. 1999 Feb;9(2):61-5.

Wilson LK, Dhillon N, Thorner J, Martin GS. Casein kinase II catalyzes tyrosine phosphorylation of the yeast nucleolar immunophilin Fpr3. *J Biol Chem*. 1997 May 16;272(20):12961-7.

Wittmann V, Seeberger S. Spatial screening of cyclic neoglycopeptides: identification of polyvalent wheat-germ agglutinin ligands. *Angew Chem Int Ed Engl*. 2004 Feb 6;43(7):900-3

Xu X, Toselli PA, Russell LD, Seldin DC. Globozoospermia in mice lacking the casein kinase II alpha' catalytic subunit. *Nat Genet*. 1999 Sep;23(1):118-21.

Ying L, Liu R, Zhang J, Lam K, Lebrilla CB, Gervay-Hague J. A topologically segregated one-bead-one-compound combinatorial glycopeptide library for identification of lectin ligands. *J Comb Chem*. 2005 May-Jun;7(3):372-84.

Zhang JH, Chung TD, Oldenburg KR. A Simple Statistical Parameter for Use in Evaluation and Validation of High Throughput Screening Assays. J Biomol Screen. 1999;4(2):67-73.

Zien P, Bretner M, Zastapilo K, Szyszka R, Shugar D. Selectivity of 4,5,6,7-tetrabromobenzimidazole as an ATP-competitive potent inhibitor of protein kinase CK2 from various sources. Biochem Biophys Res Commun. 2003 Jun 20;306(1):129-33.

### **Liens internet**

Logiciel Chimera : <http://www.cgl.ucsf.edu/chimera/>

Logiciel SwissPdbViewver : <http://www.expasy.ch/spdbv/>

Logiciel Molmol : <http://hugin.ethz.ch/wuthrich/software/molmol/>

Logiciel Chemaxon : <http://cactus.nci.nih.gov/ncidb2/download.html> et <http://www.chemaxon.com/>

Logiciel Robetta : <http://robeta.bakerlab.org/>

Protein Data Bank : [www.pdb.org](http://www.pdb.org)

ATCC (American Type Culture Collection) : [www.lgcprochem-atcc.com](http://www.lgcprochem-atcc.com)

Kinases répertoriées : [www.signaling-gateway.org](http://www.signaling-gateway.org)

Logiciel ChEMBL : <http://chembank.broad.harvard.edu/>

Site de ChEMBL : [www.chemsoc.org](http://www.chemsoc.org)

Logiciel Amplify : [www.engels.genetics.wisc.edu/amplify](http://www.engels.genetics.wisc.edu/amplify)

Site NCI : <http://dtp.nci.nih.gov>

Techniques de fluorescence : [http://institut.cochin.inserm.fr/rubric\\_recherche/plates-Formes](http://institut.cochin.inserm.fr/rubric_recherche/plates-Formes)

Logiciel Chemaxon : [www.chemaxon.com](http://www.chemaxon.com)

Chimiothèque Pubchem : <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>

Logiciel Molsoft : [www.molsoft.com](http://www.molsoft.com)

### **Stratégies pour inhiber une interaction protéine-protéine de haute affinité : l'exemple de la protéine kinase CK2.**

Les nombreux arguments qui plaident en faveur du potentiel oncogénique de la protéine kinase CK2 en font une cible thérapeutique prometteuse en cancérologie. Cette protéine kinase se présente sous la forme d'un complexe de deux sous-unités catalytiques CK2 $\alpha$  constitutivement actives et d'un dimère de sous-unités régulatrices CK2 $\beta$ . Notre laboratoire a montré que l'interaction dynamique entre ces sous-unités dans la cellule est une composante essentielle dans la régulation de cette enzyme. Pour mieux comprendre cette régulation dans les processus cellulaires normaux et pathologiques, il apparaît nécessaire de développer des molécules capables de perturber cette interaction protéine-protéine. Pour cela, trois stratégies complémentaires ont été utilisées : 1) caractérisation des « hot spots » de l'interaction CK2 $\alpha$ -CK2 $\beta$  à partir de la structure cristallographique du tétramère ; 2) conception rationnelle du premier ligand antagoniste de cette interaction sous la forme d'un peptide cyclique mimétique ( $IC_{50} = 3 \mu M$ ) ; 3) définition à partir de ce peptide d'un pharmacophore utilisable pour identifier des molécules chimiques analogues par une approche de criblage virtuel. Un cluster de molécules inhibitrices actives *in vitro* et *in vivo* a ainsi été identifié. Elles représentent les premiers inhibiteurs chimiques de cette interaction.

---

### **Strategies for inhibiting high affinity protein-protein interaction: example of CK2.**

Many arguments in favour of oncogenic potential of CK2 protein kinase make it a promising therapeutic target in oncology. This protein kinase is composed of a tetrameric complex of two catalytic subunits CK2 $\alpha$  constitutively active and a dimer of two regulatory subunits CK2 $\beta$ . Our laboratory showed that dynamic interaction between these two subunits in cell is an essential component for this enzyme regulation. For better understanding this regulation in normal and pathologic processes, it seems necessary to develop compounds able to perturb this protein-protein interaction. In this respect, three complementary strategies were used: 1) hot spots characterization for CK2 $\alpha$ -CK2 $\beta$  interaction based on tetramer crystal structure. 2) rational conception of the first antagonist of this interaction as a mimetic cyclic peptide ( $IC_{50} = 3 \mu M$ ). 3) pharmacophore definition based on this peptide allowing to identify chemical molecules analogs by virtual screening. A cluster of chemical compounds active as well *in vitro* as *in vivo* has been identified. They represent the first inhibitors for this interaction.