



**HAL**  
open science

# REGULATION DE L'ACTIVITE ET DE LA LOCALISATION DES PHOSPHATASES CDC25B

Nathalie Theis-Febvre

► **To cite this version:**

Nathalie Theis-Febvre. REGULATION DE L'ACTIVITE ET DE LA LOCALISATION DES PHOSPHATASES CDC25B. Biologie cellulaire. Université Paul Sabatier - Toulouse III, 2003. Français. NNT: . tel-00010054

**HAL Id: tel-00010054**

**<https://theses.hal.science/tel-00010054>**

Submitted on 6 Sep 2005

**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 TOULOUSE III - PAUL SABATIER**

Ecole Doctorale Biologie - Santé - Biotechnologies

Année universitaire 2002 - 2003

**THESE**

présentée en vue de l'obtention du

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITE TOULOUSE**

**Spécialité : Biologie Cellulaire et**

par

**Nathalie THEIS-FEBVRE**

**REGULATION DE L'ACTIVITE ET DE LA  
LOCALISATION DES  
PHOSPHATASES CDC25B**

Soutenue le 19 Mai 2003 dans la salle des Thèses de la faculté de médecine de Rangueil, devant le jury composé de :

Mme Véronique Baldin, Chargée de Recherche CNRS, Montpellier  
Mr Marc Billaud, Directeur de Recherche CNRS, Lyon  
Mr Bernard Ducommun, Professeur à l'Université P. Sabatier, Toulouse  
Mr Gilles Favre, Professeur à l'Université P. Sabatier, Toulouse  
Mme Odile Filhol-Cochet, Chargée de Recherche INSERM, Grenoble  
Mme Catherine Jessus, Directrice de Recherche CNRS, Paris

Directeur de thèse  
Rapporteur  
Directeur de thèse  
Examineur  
Examineur  
Rapporteur

Laboratoire de Biologie Cellulaire et Moléculaire du Contrôle de  
la Prolifération

Université Paul Sabatier - CNRS UMR 5088 IFR 109

## Résumé des travaux

L'activation séquentielle des Kinases Dépendantes des Cyclines (CDK), associées à leur sous-unité régulatrice la cycline, contrôle la progression des cellules eucaryotes dans le cycle cellulaire. L'activité des complexes CDK/cycline est notamment régulée par une balance entre phosphorylation inhibitrice (Wee, Myt) et déphosphorylation activatrice par les phosphatases CDC25. Dans les cellules humaines, trois phosphatases à double spécificité CDC25A, B et C sont impliquées dans la régulation de ces complexes en différents points du cycle cellulaire. CDC25A agit à la transition G1/S alors que CDC25C contrôle l'entrée en mitose. Par contre, CDC25B agirait en phase S ainsi qu'à la transition G2/M. L'existence de trois variants de CDC25B (B1, B2 et B3) issus d'un épissage alternatif pourrait expliquer cette controverse.

Afin d'étudier les rôles et les implications de chaque variant de CDC25B, nous avons d'abord étudié leur régulation par la protéine kinase CK2, kinase qui pourrait jouer un rôle dans le contrôle de la transition G2/M. Nos études *in vitro* ont démontré que CK2 phosphoryle les trois variants de CDC25B mais pas la protéine CDC25C. Une analyse par spectrométrie de masse de CDC25B indique qu'au moins deux résidus, les sérines 186 et 187, sont phosphorylés *in vivo* par CK2. De plus, CDC25B interagit avec CK2 *in vitro* et *in vivo* dans des cellules humaines et d'insectes. Enfin, la phosphorylation de CDC25B par CK2 augmente son activité phosphatase *in vitro* ainsi qu'*in vivo*. CK2 est donc un régulateur positif de l'activité catalytique des CDC25B.

Au cours du cycle cellulaire ou en réponse aux points de contrôle, CDC25B est également régulée au niveau de sa localisation intracellulaire. En effet, la phosphatase réalise une navette entre le cytoplasme et le noyau, navette qui peut être régulée notamment par phosphorylation. Nous avons montré que la protéine kinase AKT/PKB phosphoryle *in vitro* CDC25B sur la sérine 353 et qu'elle provoque son accumulation dans le cytoplasme. L'activation d'AKT/PKB par le peroxyde d'hydrogène reproduit la relocalisation de CDC25B. Par contre, si la mutation de la sérine 353 abolit sa phosphorylation par AKT/PKB, elle n'induit qu'un retard dans la relocalisation cytoplasmique de CDC25B ce qui indique que d'autres mécanismes participent à ce phénomène.

Ainsi nos différents travaux ont permis d'identifier deux nouveaux régulateurs de CDC25B, CK2 qui régule son activité catalytique et AKT/PKB qui participe au contrôle de sa localisation intracellulaire, et nous permettent de mieux comprendre la régulation de cette phosphatase même si de nombreux partenaires doivent encore être identifiés.

<b><u>INTRODUCTION</u></b> .....	<b>7</b>
I) LE CONTROLE DU CYCLE CELLULAIRE.....	8
1/ Découverte et caractérisation des complexes CDK/Cyclines.....	10
2/ La famille des CDK et celle des cyclines.....	11
3/ Régulation des complexes CDK/Cycline.....	15
(A) Présentation générale de l'activation des CDK.....	15
(B) Rôles des interactions.....	17
(C) Rôles des phosphorylations/déphosphorylations.....	21
II) CDC25 REGULATEUR UNIVERSEL DU CYCLE CELLULAIRE.....	26
1/ Caractérisation des CDC25.....	26
2/ Les CDC25 dans le cycle cellulaire et leurs cibles.....	30
3/ Régulations au niveau ARN messenger.....	33
4/ Régulations au niveau protéine.....	37
(A) Régulation de leur stabilité.....	37
(B) Régulation de leur activité catalytique.....	40
(C) Régulation de leur localisation intracellulaire.....	48
5/ Intégration de ces régulations : les mécanismes de surveillance.....	51
(A) Arrêt a la transition G1/S.....	53
(B) Arrêt à la transition G2/M.....	55
III) CDC25 ET.....	58
1/ ...le développement.....	58
2/ ...et l'oncogenèse.....	60
IV) BUT DE NOTRE ETUDE.....	65
<b><u>RESULTATS</u></b> .....	<b>66</b>
I) RÉGULATION DE L'ACTIVITÉ PHOSPHATASE DE CDC25B PAR CK2.....	67
1/ Introduction : présentation de CK2.....	67
(A) CK2, une sérine/thréonine kinase.....	67
(B) CK2 et le contrôle du cycle cellulaire.....	69
2/ Résultats : article.....	73
3/ Conclusion, discussion, modèle.....	87
II) RÉGULATION DE LA LOCALISATION DE CDC25B PAR AKT/PKB.....	92
1/ Introduction : présentation d'AKT/PKB.....	92
(A) AKT/PKB est une sérine/thréonine kinase.....	92
(B) Régulation d'AKT/PKB.....	92
(C) Rôles d'AKT/PKB et dérégulations.....	96
2/ Résultats : article.....	100
3/ Conclusion, discussion, modèle.....	123
<b><u>CONCLUSION ET PERSPECTIVES</u></b> .....	<b>131</b>
<b><u>MATERIELS ET METHODES</u></b> .....	<b>137</b>
I) PRODUCTION ET PURIFICATION DE PROTEINES RECOMBINANTES.....	138
1/ Protéines étiquetées MBP et purifiées à partir d' <i>Escherichia coli</i> .....	138

(A)	Expression.....	138
(B)	Purification .....	138
2/	<i>Protéines étiquetées GST et purifiées à partir d'Escherichia coli</i> .....	139
(A)	Expression.....	139
(B)	Purification .....	139
3/	<i>Le lysat de réticulocytes de lapin</i> .....	140
II)	ANALYSE DES PROTEINES.....	141
1/	<i>Electrophorèse SDS-PAGE</i> .....	141
2/	<i>Transfert des protéines sur membrane de nitrocellulose</i> .....	141
3/	<i>Immunodétection (Western Blot)</i> .....	142
4/	<i>Coloration des protéines au bleu de Coomassie</i> .....	142
5/	<i>Détection et quantification de protéines radiomarquées</i> .....	143
6/	<i>Gel SDS-PAGE en tampon Tricine pour la détection de peptides radiomarqués</i> <i>143</i>	
III)	MESURE DE L'ACTIVITE PHOSPHATASE .....	145
1/	<i>Utilisation d'un substrat exogène</i> .....	145
2/	<i>Utilisation d'un substrat physiologique : CDK1/Cycline B</i> .....	145
(A)	Préparation du substrat.....	145
(B)	Préparation de CDC25B.....	146
(C)	Essai phosphatase et mesure de l'activité CDK .....	146
IV)	CULTURE CELLULAIRE.....	148
1/	<i>Cellules humaines</i> .....	148
(A)	Présentation des différentes lignées .....	148
(B)	Transfection transitoire .....	148
(C)	Marquages métaboliques in vivo au <sup>35</sup> S .....	150
(D)	Immunofluorescence indirecte .....	150
2/	<i>Cellules Sf9</i> .....	151
(A)	Présentation et culture.....	151
(B)	Infections par le baculovirus .....	151
(C)	Amplification des baculovirus .....	151
V)	EXTRACTION DE PROTEINES ET IMMUNOPRECIPITATION.....	153
1/	<i>Protocole classique</i> .....	153
2/	<i>Pour analyse en spectrométrie de masse</i> .....	153
VI)	ESSAIS KINASE .....	155
1/	<i>Essai kinase avec CK2</i> .....	155
2/	<i>Mesure de l'activité CK2</i> .....	155
3/	<i>Essai kinase avec AKT/PKB</i> .....	156
4/	<i>Essai kinase sur peptides</i> .....	156
	<b><u>BIBLIOGRAPHIE</u></b> .....	<b>157</b>
	<b><u>ANNEXES</u></b> .....	<b>186</b>

## Liste des figures

- Figure 1 : Le cycle cellulaire des cellules eucaryotes
- Figure 2 : Les complexes CDK/cycline
- Figure 3 : Les complexes CDK/cycline contrôlent la circulation du cycle cellulaire
- Figure 4 : Contrôle temporel de l'activité des complexes CDK/cycline
- Figure 5 : Régulation basale de l'activité des complexes CDK/cycline
- Figure 6 : Localisation des complexes CDK1/cycline B et cycle cellulaire
- Figure 7 : Les inhibiteurs des CDK dans le cycle cellulaire
- Figure 8 : Les différentes CAK
- Figure 9 : La régulation de l'activité CDK1/cycline B par phosphorylation
- Figure 10 : Les différentes familles de phosphatases
- Figure 11 : Les phosphatases CDC25 dans différents organismes
- Figure 12 : Les phosphatases CDC25 humaines et le cycle cellulaire
- Figure 13 : Les différents variants d'épissage de CDC25B
- Figure 14 : Contrôle de la stabilité de CDC25B par les complexes CDK/cycline
- Figure 15 : Contrôle de la stabilité de CDC25A
- Figure 16 : Contrôle de la transition G2/M
- Figure 17 : Régulation de l'activité de la phosphatase CDC25C
- Figure 18 : Régulation de la phosphatase CDC25C par PP2A et Pin-1
- Figure 19 : Voie générale de la signalisation des points de contrôle
- Figure 20 : CDC25A et le point de contrôle à la transition G1/S
- Figure 21 : Régulation spatiale des CDC25 au point de contrôle G2/M
- Figure 22 : Les CDC25 au cours du développement chez la souris
- Figure 23 : Implications des CDC25 humaines dans différents types de cancers
- Figure 24 : Structure en rubans de l'holoenzyme CK2
- Figure 25 : Structure de l'holoenzyme CK2 et rôles principaux de chaque sous-unité
- Figure 26 : Représentation en rubans du dimère CK2 $\beta$
- Figure 27 : Structure en rubans de CK2 $\alpha$
- Figure 28 : Sites de phosphorylations par CK2 sur CDC25B2
- Figure 29 : Modèle de travail
- Figure 30 : Structure d'AKT/PKB
- Figure 31 : Mode de régulation d'AKT/PKB par les récepteurs à activité tyrosine kinase
- Figure 32 : Homologies entre les AGC kinases

Figure 33 : Effets cellulaires d'AKT/PKB en fonction des substrats impliqués

Figure 34 : Implications d'AKT/PKB dans le contrôle de l'apoptose et du cycle cellulaire

Figure 35 : Rôle central d'AKT/PKB dans différentes réponses cellulaires

Figure 36 : Effets d'AKT/PKB sur la localisation de certains de ses substrats

Figure 37 : Modèle de travail

Figure 38 : AKT/PKB et CDC25B

# ***Introduction***

**1<sup>re</sup> partie** : Le contrôle du cycle cellulaire

**2<sup>e</sup> partie** : CDC25 régulateur universel du cycle cellulaire

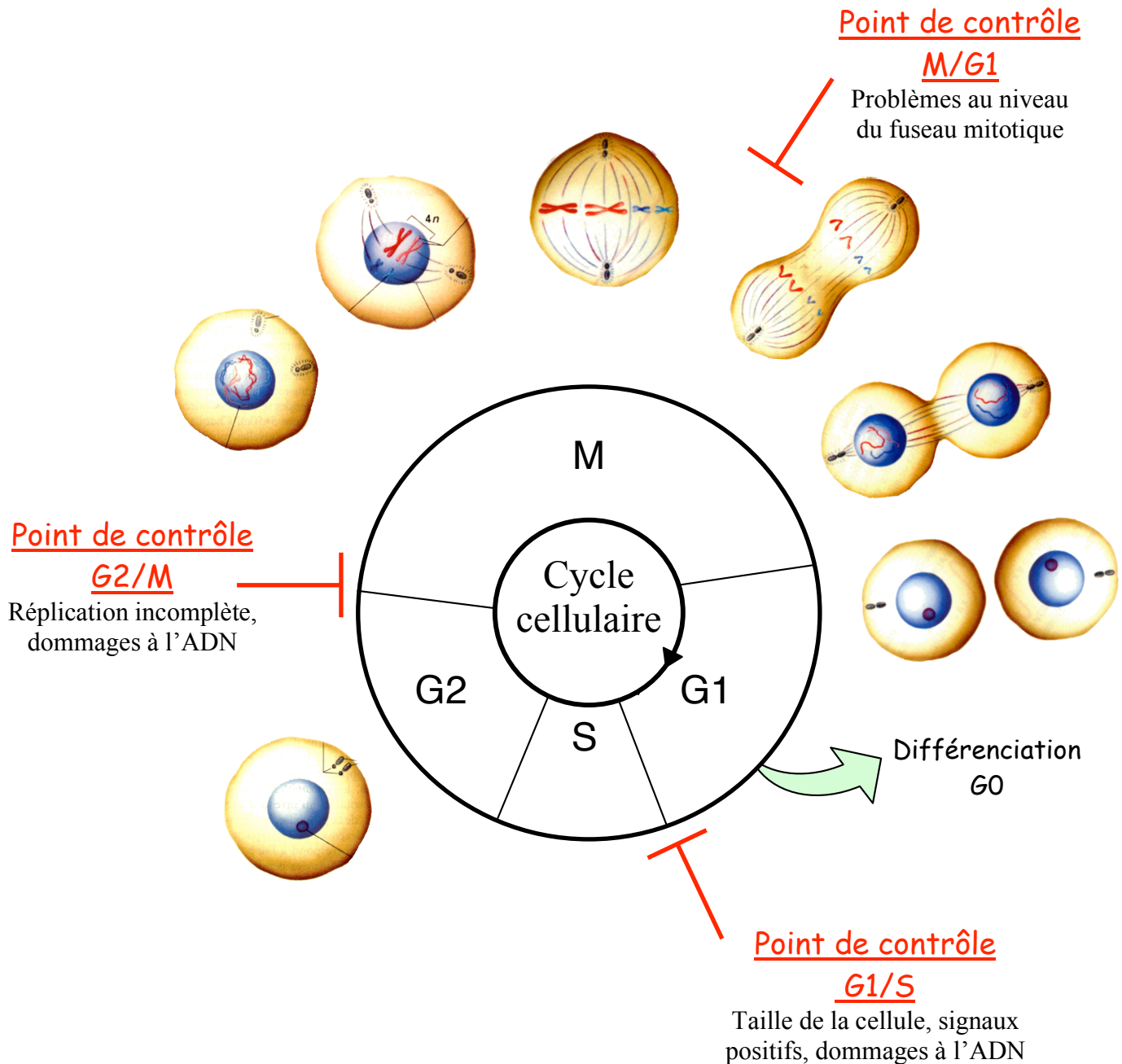
**3<sup>e</sup> partie** : CDC25 et...



## **I) LE CONTRÔLE DU CYCLE CELLULAIRE.**

Le cycle cellulaire est un processus par lequel une cellule duplique son contenu puis se divise pour donner deux cellules filles identiques. Il est constitué d'ensembles d'événements moléculaires et cellulaires orchestrés dans le temps et l'espace et qui doivent se réaliser suivant un ordre chronologique précis. Il permet ainsi le maintien d'une information génétique constante en quantité et en qualité au niveau des chromosomes malgré la duplication des cellules de génération en génération. Il est divisé en deux phases basées sur les observations au microscope [1] : une interphase où les chromosomes ne sont pas visibles, et une mitose (le terme vient du mot grec *Mito* qui signifie « filet ») où les chromosomes, visibles et condensés, ségrégent pour donner deux cellules filles. L'interphase est ensuite subdivisée en trois phases : G1, S et G2 (Figure 1) [2, 3]. La phase G1 (G pour « Gap ») est l'étape où la cellule se prépare à la duplication de son ADN et va intégrer tous les signaux environnementaux (mitogènes ou inhibiteurs de croissance) et décider soit de se diviser, soit de rentrer en phase G0 de pause ou quiescence, soit de sortir du cycle cellulaire pour se différencier. La phase S (pour Synthèse) correspond à l'étape de duplication des chromosomes qui restent associés sous forme de chromatides. La phase G2 (« Gap 2 ») est une étape de transition qui permet à la cellule de se préparer à la division mitotique. Enfin, la phase M de mitose permet la répartition des chromosomes dupliqués en deux lots identiques et donne naissance à deux cellules filles après la cytokinèse (revue : [3]).

Le bon déroulement du cycle cellulaire est lié à un schéma de régulation complexe pour chaque étape appelé contrôle du cycle cellulaire. Il va ainsi s'assurer que les différents événements du cycle se déroulent une seule fois par cycle, au bon moment et dans un ordre correct. Ce contrôle est lié à une « horloge interne » associée à des points de contrôle ou « checkpoint » pour vérifier l'intégrité cellulaire avant chaque étape [4, 5]. Ces checkpoints assurent la coordination fine des transitions entre les différentes étapes du cycle, mais peuvent également provoquer une pause dans le cycle cellulaire pour permettre à la cellule de réparer les dommages ou les erreurs qu'elle a accumulés avant de poursuivre son cycle de division (Figure 1).



**FIGURE 1 :** Le cycle cellulaire des cellules eucaryotes.

Sont représentés les principaux événements morphologiques et points de contrôle.

La cellule passe successivement quatre phases pour se diviser :

- **G1** ou **Gap1**, est une période de croissance caractérisée par une forte transcription et une synthèse active. Au cours de cette phase la cellule a la possibilité d'entrer en phase G0 de quiescence ou de sortir du cycle cellulaire pour se différencier.

- **S** pour **Synthèse**, est caractérisée par la répllication du matériel génétique.

- **G2** ou **Gap2**, est une phase de préparation à la mitose notamment par la synthèse des protéines qui seront nécessaires pour la division.

- **M** pour **Mitose**, est l'étape de division cellulaire. Elle est caractérisée par la condensation de l'ADN en chromosomes, la destruction de l'enveloppe nucléaire, la mise en place du fuseau mitotique pour permettre la ségrégation des chromosomes, et par la scission de la cellule en deux cellules filles identiques.

### *1/ Découverte et caractérisation des complexes CDK/Cyclines.*

Même si les aspects morphologiques du cycle cellulaire étaient connus depuis longtemps, les événements moléculaires qui orchestrent et coordonnent les différentes phases n'étaient pas identifiés. L'idée que des déterminants moléculaires permettent d'induire certains événements et d'informer la cellule sur sa position dans le cycle cellulaire résulte de travaux réalisés avec des fusions de cellules [6-8]. Leur caractérisation ensuite fut permise par des travaux qui ont débuté dans les années 1970. Une première étude menée sur des ovocytes d'Amphibiens permit l'identification du MPF ou « Maturation Promoting Factor » [9, 10]. Une autre était centrée sur des cribles génétiques chez les levures *Saccharomyces cerevisiae* et *Schizosaccharomyces pombe* et conduisit à l'isolement du gène *cdc2*.

Le MPF est une activité enzymatique présente dans le cytoplasme et capable d'induire l'entrée en méiose ou en mitose lorsqu'elle est micro-injectée respectivement dans un ovocyte ou une cellule. Cette activité MPF a été mise en évidence dans les ovocytes de différentes espèces [11-13], mais également dans des cellules d'embryons de xénope et de grenouille juste avant leur entrée en mitose [14, 15], dans des cellules de mammifères en culture [16] et dans les levures [17]. Comme le MPF régule aussi bien la méiose que la mitose, il fut renommé « M-phase Promoting Factor ». L'activité de ce facteur oscille durant le cycle cellulaire : il est maximal en mitose, disparaît en fin de division pour augmenter pendant l'interphase suivante [14]. Il est indispensable pour l'entrée en phase M [18, 19], il est associé à une activité protéine kinase [20] et la synthèse et la dégradation de protéines participent à son contrôle [14, 21, 22]. Mais sa caractérisation biochimique ne fut permise que grâce aux études menées en parallèle sur la levure.

Des cribles génétiques réalisés chez la levure permirent l'isolement de souches mutantes dont certaines s'arrêtent en des points spécifiques du cycle cellulaire. Ces mutants furent appelés CDC pour « Cell Division Cycle » et correspondent à des mutations thermosensibles (*cdc<sup>ts</sup>*) [23]. Le premier crible fut réalisé par L. Hartwell chez la levure à bourgeon *S. cerevisiae* [24] et permit la caractérisation d'un gène important pour sa prolifération, le gène *cdc28* [25-27]. Sur le même principe, un crible était réalisé par P. Nurse sur la levure à fission *S. pombe*. Des mutants de type CDC furent également isolés ainsi que des mutants qui, au lieu de s'arrêter, reentraient en mitose avec une taille plus petite que la normale [28]. L'étude de ces mutants a notamment permis la caractérisation du gène *cdc2* (revues : [29, 30]) qui est l'homologue fonctionnel du gène *cdc28* identifié chez *S. cerevisiae*

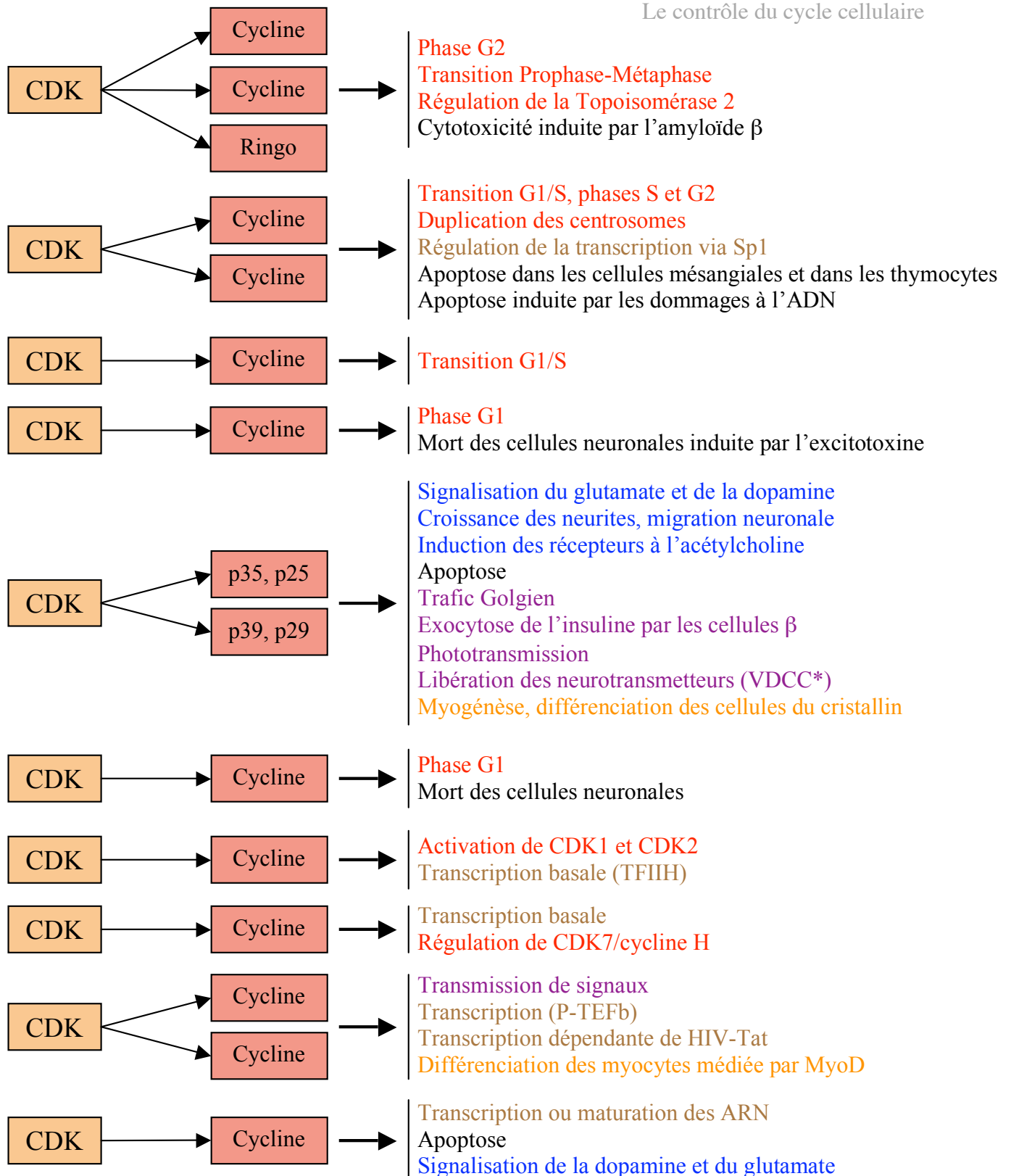
[31] et un régulateur positif de l'entrée en mitose [25, 32]. Le gène *cdc2* fut ensuite caractérisé et code pour une protéine kinase d'environ 34 kDa, nécessaire pour la transition G2/M.

Purifié, le MPF est constitué d'un complexe de deux protéines, une de 34 kDa et l'autre de 45 kDa [33]. Or, un anticorps spécifique de CDC2 ou une colonne d'affinité avec une petite protéine de levure, p13<sup>SUC1</sup> qui se lie à CDC2 [34, 35] sont capables de précipiter la protéine de 34 kDa du MPF [36, 37]. Ainsi, il fut démontré que la protéine de 34 kDa du MPF correspond à la protéine CDC2 de *S. pombe* et à CDC28 de *S. cerevisiae* [36-38]. La deuxième protéine du MPF, qui fait de 40 à 60 kDa suivant les organismes, fut identifiée comme une cycline : la cycline B [39, 40]. Les cyclines ont été isolées initialement dans les ovocytes d'oursin. Elles s'accumulent au cours du cycle et sont détruites en fin de mitose [41, 42], ce qui inactive le MPF [43, 44], alors que leur synthèse est nécessaire pour la transition G2/M [45]. La présence des cyclines dans le complexe MPF fut notamment démontrée par leur co-purification et leur co-précipitation avec CDC2 [39, 40, 46]. La cycline étant la sous-unité régulatrice de la protéine kinase [47-49], CDC2 fut alors renommée CDK1 pour « Cyclin Dependent Kinase 1 » et les premiers modèles de régulation du MPF furent élaborés [44, 50]. Dans ces modèles, la cycline est un activateur du MPF qui doit s'accumuler pour permettre l'entrée en mitose, puis qui est dégradé pour la sortie de mitose. A la même époque, le complexe CDC2/cycline B fut isolé et caractérisé dans les cellules humaines [51], de xénope [52] et de drosophile [53] démontrant l'universalité du MPF dans le contrôle de la transition G2/M.

Depuis, des activités CDK proches de celle du MPF ont été identifiées chez tous les eucaryotes et régulent les différentes phases du cycle. Les CDK furent alors considérées comme des régulateurs universels du cycle cellulaire.

## *2/ La famille des CDK et celle des cyclines.*

Un crible fonctionnel fut utilisé pour rechercher des homologues dans les cellules humaines et permit la caractérisation de la première molécule humaine homologue à CDC2 : p34<sup>CDC2</sup> [54]. CDK2, elle, fut identifiée par un crible différentiel d'expression d'ARN messagers chez le xénope [55], ainsi que par complémentation fonctionnelle chez *S. cerevisiae* [56]. Ensuite l'utilisation de la réaction de polymérisation en chaîne (PCR) a permis la recherche d'ADN complémentaires humains apparentés à *cdc2* et a conduit à l'isolement de plusieurs membres de la famille CDK [57]. Actuellement, chez les



**FIGURE 2 : Les complexes CDK/cycline.**

(D'après Knockaert et collègues, TRENDS in Pharmacological Sciences, 2002)

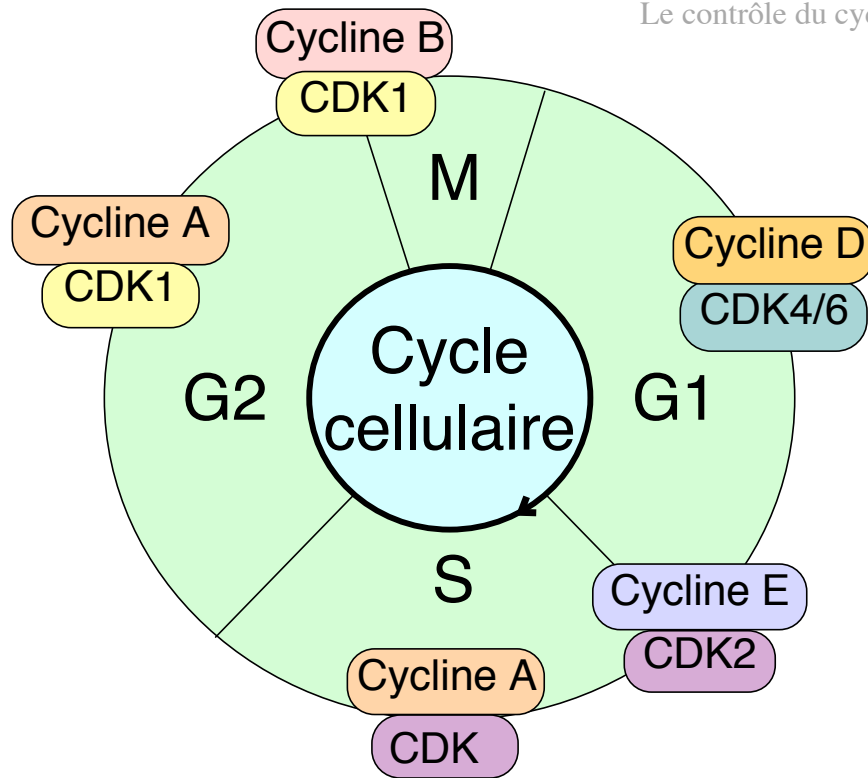
Ne sont représentés que les CDK pour lesquelles la cycline associée est connue, auxquelles il faut rajouter CDK10 qui aurait un rôle dans la transcription. Les cyclines orphelines incluent les cyclines F, G, I, M, O et P. Les CDK ont des fonctions essentielles dans le contrôle du cycle cellulaire (en rouge), la transcription (en marron), les neurones (en bleu), la différenciation (en orange), la mort cellulaire (en noir) et d'autres événements divers (en violet).

\* VDCC : « voltage-dependent  $\text{Ca}^{2+}$  channel »

mammifères, 13 CDK (dont CDK1 à CDK11) ont été identifiées et au moins 25 cyclines ont été décrites (Figure 2) [58].

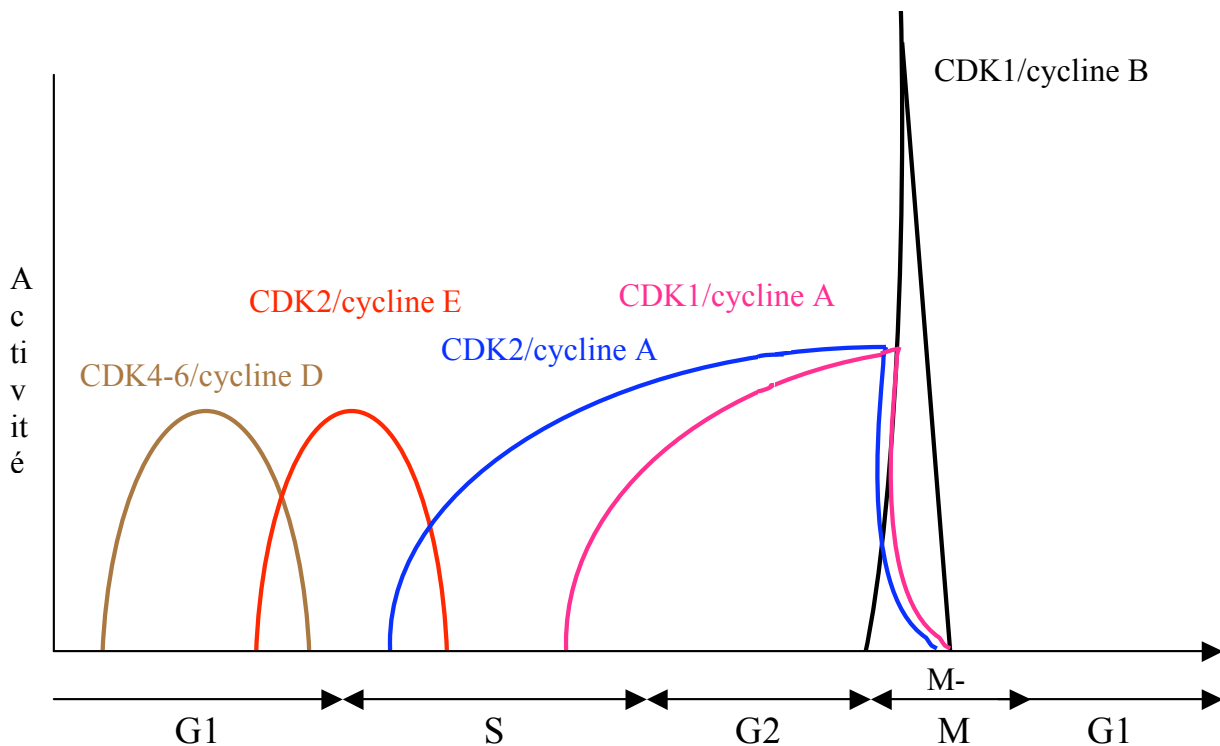
L'étude de l'activité des CDK (par surexpression ou micro-injection d'anticorps neutralisants) a permis de déterminer leur fonctionnement au cours du cycle cellulaire (Figures 3 et 4) [59]. Ainsi CDK4 et CDK6 sont activées séquentiellement pendant la phase G1 [60-62]. Elles phosphorylent et inhibent la protéine Rb ce qui libère le facteur de transcription E2F et permet l'expression de gènes nécessaires pour la transition G1/S. Puis CDK2 est activée à la transition G1/S et elle reste active jusqu'à la transition G2/M [63, 64]. Elle régule l'entrée en phase S, mais participe également au contrôle de la duplication des centrosomes et de la réplication de l'ADN ainsi qu'à l'inhibition des facteurs de transcription qui ont agi en phase G1. Et enfin, CDK1 est activée en phase G2 et à la transition G2/M. Elle contrôle notamment l'entrée en mitose, est nécessaire jusqu'en anaphase et phosphoryle de nombreux substrats dont l'APC, l'« Anaphase Promoting Complex ». Cette séquence permet ainsi la progression des cellules dans les différentes phases du cycle (revues : [65, 66]). Les autres CDK n'ont pas de rôle dans la régulation du cycle cellulaire (Figure 2). Certaines sont des composants de la machinerie transcriptionnelle (CDK7, CDK8, CDK9, CDK10 et CDK11) ou n'ont pas de rôle encore défini. CDK5, elle, a été détectée active dans les neurones où elle aurait un rôle dans la phosphorylation de protéines comme celles des neurofilaments ou bien dans le trafic intracellulaire (revues : [67-69]). Le complexe CDK7/cycline H est lui un peu à part car il joue un rôle à la fois dans la transcription et dans le contrôle du cycle cellulaire (voir § I-3-A et C) (revue : [70]).

Les cyclines se répartissent en trois groupes dont deux participent au contrôle du cycle cellulaire (Figures 2 et 3). Le groupe des cyclines de phase G1 (cyclines D et E) régulent la progression en phase G1 et la transition G1/S. Les cyclines de phase G2 ou mitotiques (A et B) sont nécessaires à la transition G2/M [71, 72]. Le troisième groupe (C, H, K, L, T) est impliqué dans la régulation de la transcription [71]. Enfin l'analyse du génome humain, séquencé récemment, a mis en évidence de nouvelles cyclines [71] dont la fonction exacte doit encore être déterminée.



**FIGURE 3 :** Les complexes CDK/cycline contrôlent la circulation du cycle cellulaire.

Le cycle cellulaire correspond à une série d'événements orchestrés dont la progression dans les étapes successives est contrôlée par l'activation et l'inactivation séquentielle des complexes CDK/cycline.



**FIGURE 4 :** Contrôle temporel de l'activité des complexes CDK/cycline.

(D'après Pines, Nature Cell Biology, 1999)

Les différents complexes CDK/cycline apparaissent à des moments différents du cycle cellulaire. Ainsi par exemple, le complexe CDK2/cycline E contrôle l'entrée en phase S, alors que le complexe CDK1/cycline B contrôle l'entrée en mitose.

(M-A : transition Métaphase-Anaphase)

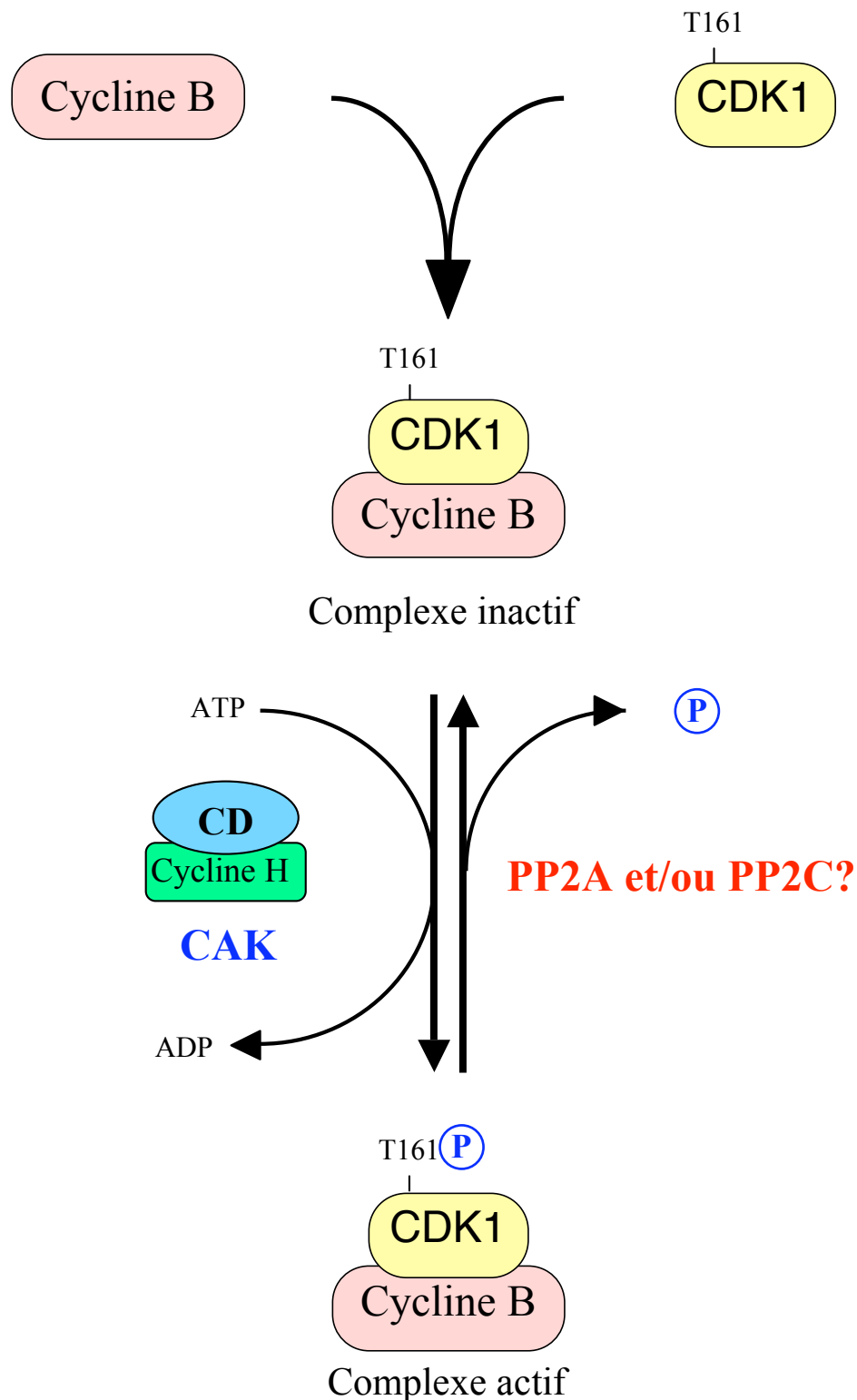
### *3/ Régulation des complexes CDK/Cycline.*

Vu le rôle central des CDK dans le contrôle du cycle cellulaire, leur activité est régulée à des niveaux variés excepté au niveau quantité car elles sont présentes à taux constants au cours du cycle cellulaire [73-75]. Le premier niveau est lié à l'interaction de protéines partenaires positifs (les cyclines) ou négatifs (les CKI). Mais leur activité est également régulée par des modifications post-traductionnelles (phosphorylation/déphosphorylation). Toutes ces régulations constituent un ensemble complexe et spécifique à chaque étape du cycle cellulaire. Ajoutée à d'autres mécanismes variés, la régulation de l'activité des CDK forme le cœur du système de contrôle du cycle cellulaire [76].

#### (A) PRÉSENTATION GÉNÉRALE DE L'ACTIVATION DES CDK.

Les détails structuraux de l'activation des CDK ont été compris après la détermination de la structure de CDK2 humaine [77]. Sa structure est proche de celle des autres Ser/Thr kinases avec un lobe amino-terminal de petite taille et un lobe carboxy-terminal plus large. Les différences principales sont d'une part la présence d'une large boucle flexible ou « T loop », appelée aussi « boucle d'activation », qui bloque la liaison du substrat au domaine carboxy-terminal, et d'autre part le fait que les résidus-clés du site catalytique ne sont pas dans une position correcte pour la réaction de phosphorylation. Ces deux différences font que pour être active la kinase doit subir de profonds changements de conformation (revues : [78, 79]). Tout d'abord, la liaison d'une cycline à la protéine CDK va induire un changement de conformation du site catalytique de la kinase (Figure 5). Ainsi la boucle d'activation ne va plus obstruer le site de liaison du substrat et les résidus importants pour la phosphorylation du substrat vont être orientés dans une position plus favorable. Ensuite, la boucle d'activation présente une thréonine hautement conservée entre les CDK (Thr161 sur CDK1, Thr160 sur CDK2). Ce résidu va être phosphorylé par une kinase, la CAK (« Cdk Activating Kinase »), ce qui va amener l'activité du complexe CDK/cycline à son maximum. Cette phosphorylation va en fait stabiliser l'interaction entre les deux sous-unités et placer la boucle d'activation dans la position la plus favorable pour la reconnaissance du substrat (Figure 5).





**FIGURE 5** : Régulation basale de l'activité des complexes CDK/cycline.

La liaison de la cycline B sur CDK1 va induire un premier changement de conformation du site catalytique. Puis, une fois formé, le complexe CDK1/cycline B est phosphorylé sur un résidu thréonine conservé au niveau de la boucle d'activation de la kinase, par le complexe CDK7/cycline H appelé CAK (« Cdk-Activating Kinase »). Cette phosphorylation permet l'activation complète du complexe CDK1/cycline B et est contrecarrée par l'action d'une Ser/Thr phosphatase, PP2A et/ou PP2C. Dans certains cas, la CAK peut phosphoryler CDK1 avant la formation du complexe avec la cycline B.

## (B) RÔLES DES INTERACTIONS.

### (i) Interaction CDK-Cycline.

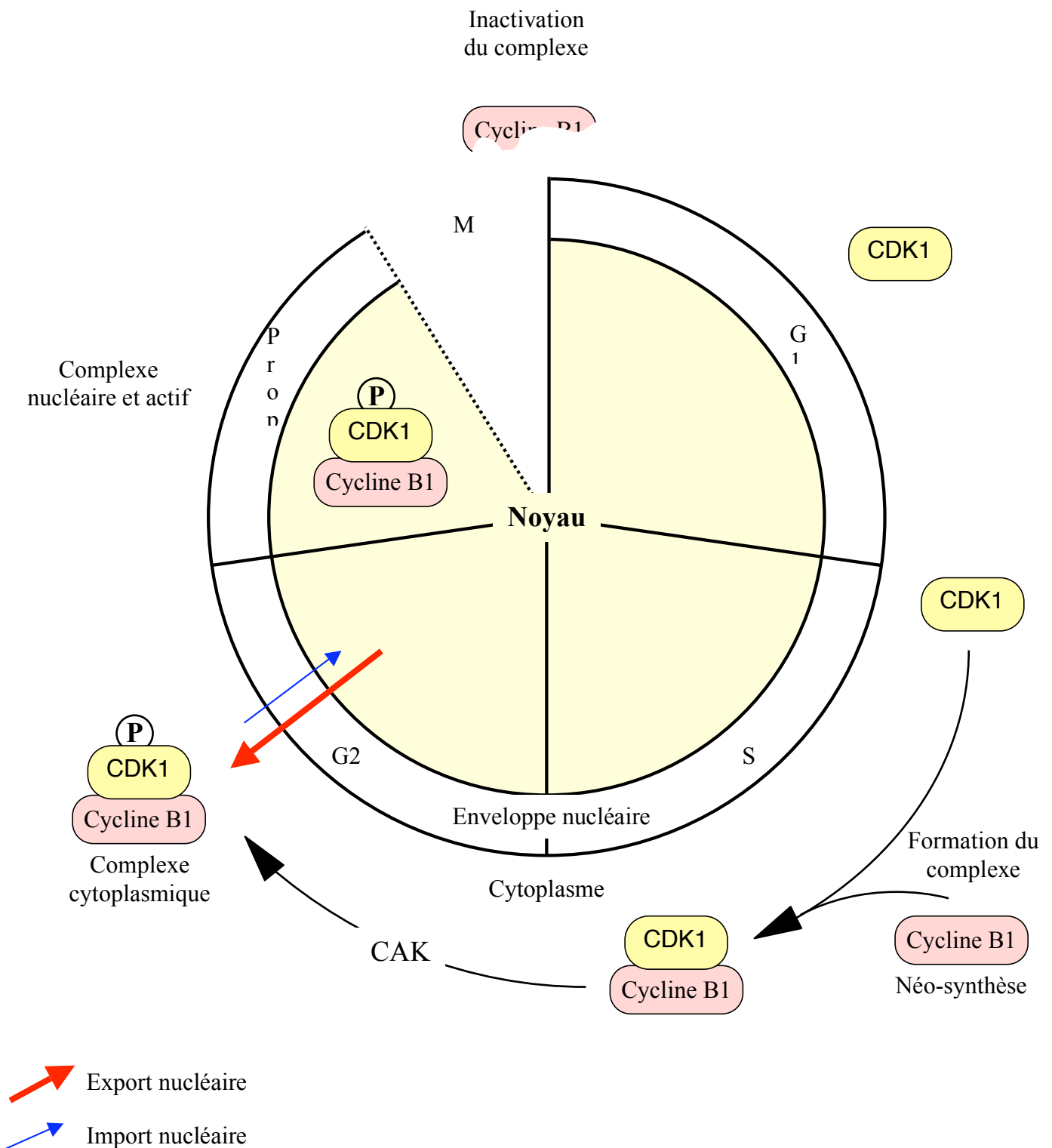
Les oscillations dans l'activité des CDK pendant le cycle cellulaire (Figure 4) sont liées en partie aux changements de quantités des cyclines dans la cellule (Figure 6), quantités qui sont régulées par un ensemble complexe de mécanismes actifs aussi bien au niveau de la transcription des gènes (revue : [80]) que de la dégradation des protéines, et spécifiques pour chaque étape du cycle cellulaire. La cinétique d'expression caractéristique de chacune permet la régulation de l'activité des CDK associées en des points précis du cycle cellulaire. La répartition des différents complexes dans le cycle cellulaire est représentée en Figures 3 et 4.

En plus des changements de conformation favorables à l'activité de la kinase [76, 81], l'interaction CDK/cycline peut modifier la spécificité de substrat de la kinase ([82, 83], revue : [72]). De plus, certaines cyclines possèdent des séquences qui permettent leur localisation dans un compartiment subcellulaire particulier et donc de cibler la kinase associée à un substrat donné ou au contraire à les éloigner [84, 85]. Ainsi, en interphase, le complexe CDK1/cycline B1 est majoritairement cytoplasmique (Figure 6), ce qui l'empêche d'accéder à ses cibles nucléaires comme la lamina, et la place à proximité d'une kinase inhibitrice Myt1 (voir § I-3-C). Mais en prophase, le complexe est rapidement transloqué dans le noyau pour permettre la poursuite de la mitose (Figure 6). Cette régulation de la localisation est liée à la cycline B1. En effet, sa phosphorylation au niveau de sa NES (« Nuclear Export Sequence ») permet, en prophase, la rétention nucléaire du complexe CDK1/cycline B1 [85, 86].

### (ii) Les CKI.

Les CKI, ou inhibiteurs des CDK, sont des monomères qui s'associent aux complexes CDK/cycline afin d'inhiber leur activité [87]. Ils sont regroupés en deux familles : ceux qui inhibent les complexes CDK/cycline par liaison au complexe (famille CIP/KIP) et ceux qui entrent en compétition avec les cyclines pour la liaison aux CDK (famille INK4) [88]. Dans tous les cas, leur liaison aux CDK interfère avec la phosphorylation activatrice par la CAK [89].

La famille INK4 comprend quatre membres, p16<sup>INK4a</sup> [90], p15<sup>INK4b</sup> [91], p18<sup>INK4c</sup> [92] et p19<sup>INK4d</sup> [93] qui lient et inhibent uniquement CDK4 et CDK6 en empêchant leur liaison aux cyclines D (Figure 7) [94, 95].



**FIGURE 6 :** Localisation des complexes CDK1/cycline B1 et cycle cellulaire.

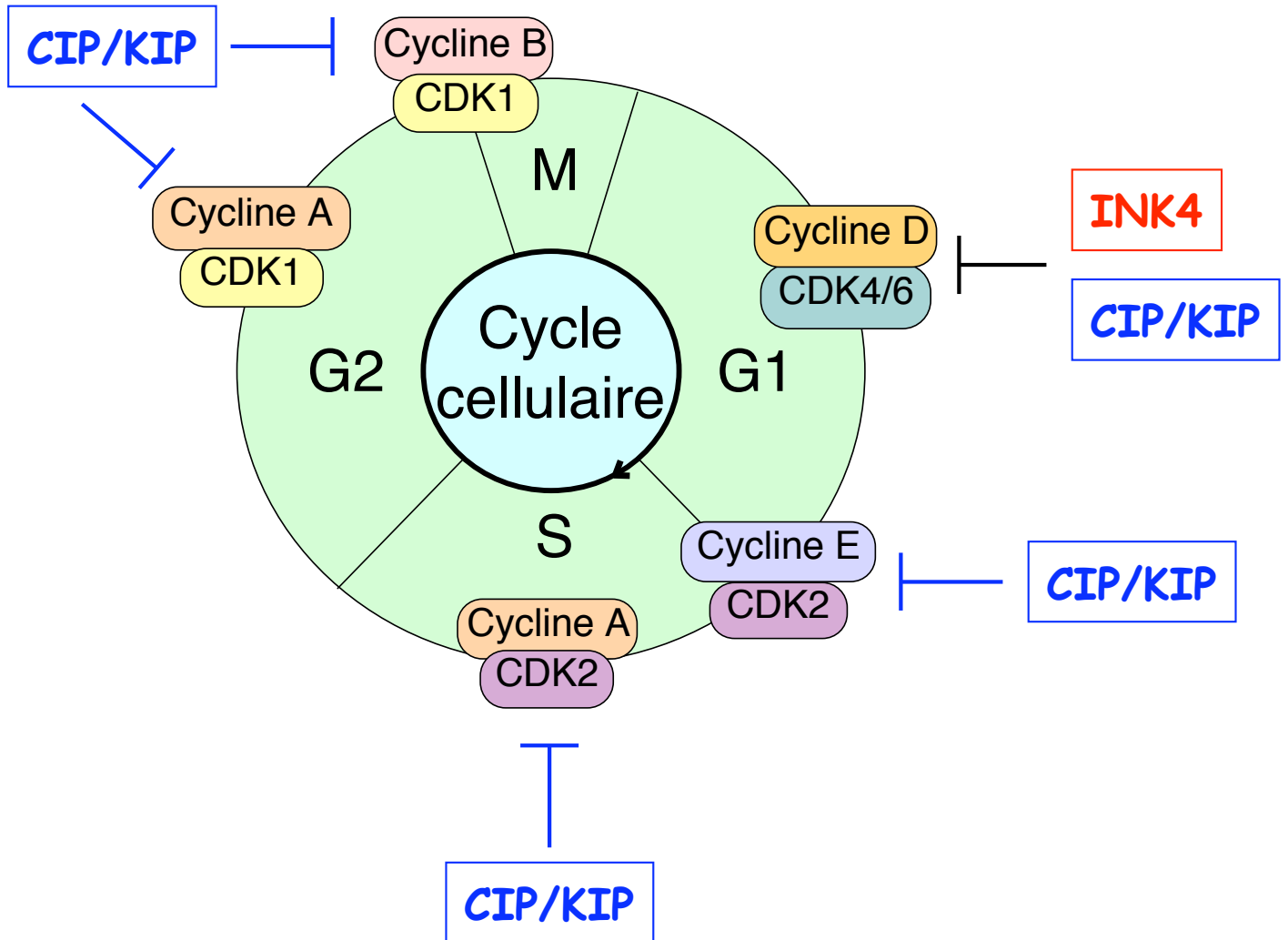
La synthèse de la cycline B1 en phase S permet la formation des complexes CDK1/cycline B1. Même si CDK1 est activée par sa phosphorylation sur Thr161 par la CAK, le complexe ne peut pas agir car il est maintenu dans le cytoplasme par un export nucléaire supérieur à son import. C'est seulement en fin de phase G<sub>2</sub> que le complexe est nucléaire afin d'assurer l'entrée en mitose. Puis en fin de mitose, la cycline B1 est dégradée afin d'inactiver complètement le complexe et permettre le passage des cellules dans la phase G<sub>1</sub> suivante.

La famille CIP/KIP a une action plus large car elle inhibe les complexes comprenant les cyclines A, B, D et E (Figure 7). Cette famille comprend trois membres : p21<sup>WAF1/CIP1</sup> ([96-98] revue : [99]), p27<sup>KIP1</sup> [100-102] et p57<sup>KIP2</sup> [103, 104]. Ces inhibiteurs sont impliqués dans le contrôle de la transition G1/S en s'associant aux complexes CDK2/cycline E ou cycline A pour arrêter le cycle cellulaire. Dans certains types cellulaires, p21<sup>CIP1</sup> peut également induire un arrêt en phase G2 (Figure 7) [105-107]. Toutes les protéines de la famille CIP/KIP possèdent des motifs caractéristiques dans leur partie amino-terminale qui leur permettent de lier à la fois les cyclines et les CDK [108-112], et leur liaison aux CDK diminue la phosphorylation du substrat puisqu'il ne peut plus interagir avec la kinase. Paradoxalement, cette famille d'inhibiteurs peut également activer les complexes CDK/cycline. En effet, grâce à leur capacité à lier à la fois les cyclines et les CDK, elles pourraient servir de protéines chaperonnes pour la formation du complexe [113, 114].

(iii) **Autres protéines.**

Parmi les protéines qui interagissent avec les complexes CDK/cycline, la protéine p13<sup>SUC1</sup> identifiée chez *S. pombe* [34] et chez *S. cerevisiae* [115], est une petite protéine adaptatrice qui appartient à la famille des CKS (« CDK Subunit »). Les CKS sont conservées de la levure à l'homme où deux molécules de cette famille, CKSHs1 et CKSHs2, ont été identifiées et trouvées associées à CDK2 [116]. Même si les structures cristallographiques de CKSHs1 seule ou associée à CDK2 ont été réalisées [81, 117], peu de choses sont connues concernant leur rôle exact. Pour p13<sup>SUC1</sup>, il a été montré qu'elle influencerait le ciblage au substrat des complexes CDK/cycline mitotiques et qu'elle serait nécessaire aussi bien pour l'entrée que pour la sortie de mitose [35, 118].

Plus récemment, une nouvelle protéine a été décrite comme associée à CDK1 dans les ovocytes de xénope. Identifiée dans deux cribles différents, elle fut appelée Speedy dans un cas et RINGO dans l'autre (« Rapid Inducer of G2/M progression in Oocytes ») [119, 120]. Elle est capable d'interagir et d'activer les kinases CDK1 et CDK2 en absence des cyclines [119, 120].



**FIGURE 7 :** Les inhibiteurs des CDK dans le cycle cellulaire.

Les CKI (pour inhibiteurs des CDK) inhibent les complexes CDK/cycline soit par association au complexe (famille CIP/KIP), soit par compétition avec la cycline pour la liaison à la kinase (famille INK4).

## (C) RÔLES DES PHOSPHORYLATIONS/DÉPHOSPHORYLATIONS.

### (i) Phosphorylation activatrice.

La formation du complexe CDK/cycline n'est pas suffisante pour la pleine activation de la kinase. Elle nécessite la phosphorylation d'un résidu adjacent au site catalytique : Thr161 sur CDK1, Thr160 sur CDK2 et Thr172 sur CDK4 [121-124]. Cette phosphorylation induit des changements dans la conformation de la protéine (voir § I-3-A) et est catalysée par la CAK ou « Cdk Activating Kinase » [77, 125]. La déphosphorylation de ce résidu sera ensuite assurée par les phosphatases de la famille PP2C et/ou PP2A (Figure 5) [126-128].

L'activité de la CAK est constante au cours du cycle cellulaire et aucune régulation ne lui est connue [71]. Chez les mammifères, cette phosphorylation requiert la liaison à la cycline, ce qui serait un moyen de moduler cette phosphorylation. Par contre chez les levures et dans les ovocytes de xénope [128], elle est réalisée avant la formation du complexe, ce qui signifie que des mécanismes additionnels de contrôle sont nécessaires pour réguler l'activité du complexe CDK/cycline. Dans certains cas, cette phosphorylation pourrait contribuer à stabiliser le complexe CDK/cycline [129, 130]. L'identité de la CAK varie suivant les espèces (Figure 8) [131], mais chez les eucaryotes supérieurs (vertébrés et *Drosophila melanogaster*) c'est un complexe trimérique constitué d'une protéine kinase de la famille des CDK, CDK7, de sa sous-unité régulatrice, la cycline H, et d'une troisième unité, MAT1 (« Ménage À Trois », [70]). Il est important de noter que la CAK des vertébrés participe aussi à la régulation de la transcription puisqu'une partie des complexes CDK7/cycline H/MAT1 est liée à TFIIF, un multimère associé à l'ARN polymérase II. La CAK participerait alors à la régulation de l'activité de la polymérase. Par ailleurs, il a été montré que MAT1 induit un changement dans la spécificité de substrat du complexe CDK7/cycline H puisque sa présence favorise l'ARN polymérase II par rapport au complexe CDK/cycline. Ainsi cette protéine initialement décrite comme facteur d'assemblage du complexe CDK7/cycline H [132, 133] agirait également comme modulateur de la spécificité de substrat [134].

<b>Espèce</b>	<b>Nom</b>	<b>Commentaires</b>
<i>S. cerevisiae</i>	CAK1 (Civ1)  <i>Kin 28</i>	Monomère Pas de cycline associée. <i>CDK7-related mais n'a pas d'activité CAK</i>
<i>S. pombe</i>	Csk1  Mcs6	Monomère « CAK1-like » CDK7-related Cycline associée : Mcs2
<i>D. melanogaster</i>	CDK7	Forme un trimère avec Mat1 et la cycline H
<i>X. laevis</i>	CDK7 (MO15)	Forme un trimère avec Mat1 et la cycline H
<i>H. sapiens</i>	CDK7	Forme un trimère avec Mat1 et la cycline H

**FIGURE 8 : Les différentes CAK.**

Suivant les espèces, la « CDK-Activating Kinase » varie. Chez les vertébrés et *D. melanogaster*, c'est un complexe trimérique constitué d'une protéine de la famille des CDK, CDK7, associée à son partenaire régulateur, la cycline H, et une troisième sous-unité, Mat1. Dans la levure à bourgeon par contre, la CAK est une petite protéine kinase monomérique, Cak1 qui présente peu d'homologies avec les CDK. L'homologue de CDK7 dans ces levures, Kin28, ne présente pas d'activité de type CAK. La levure à fission semble être intermédiaire entre les vertébrés et la levure à bourgeon : elle présente deux activités CAK. La première (Mcs6-Mcs2) est homologue à CDK7-cycline H alors que l'autre, Csk1, ressemble plus à Cak1 de la levure *S. cerevisiae*.

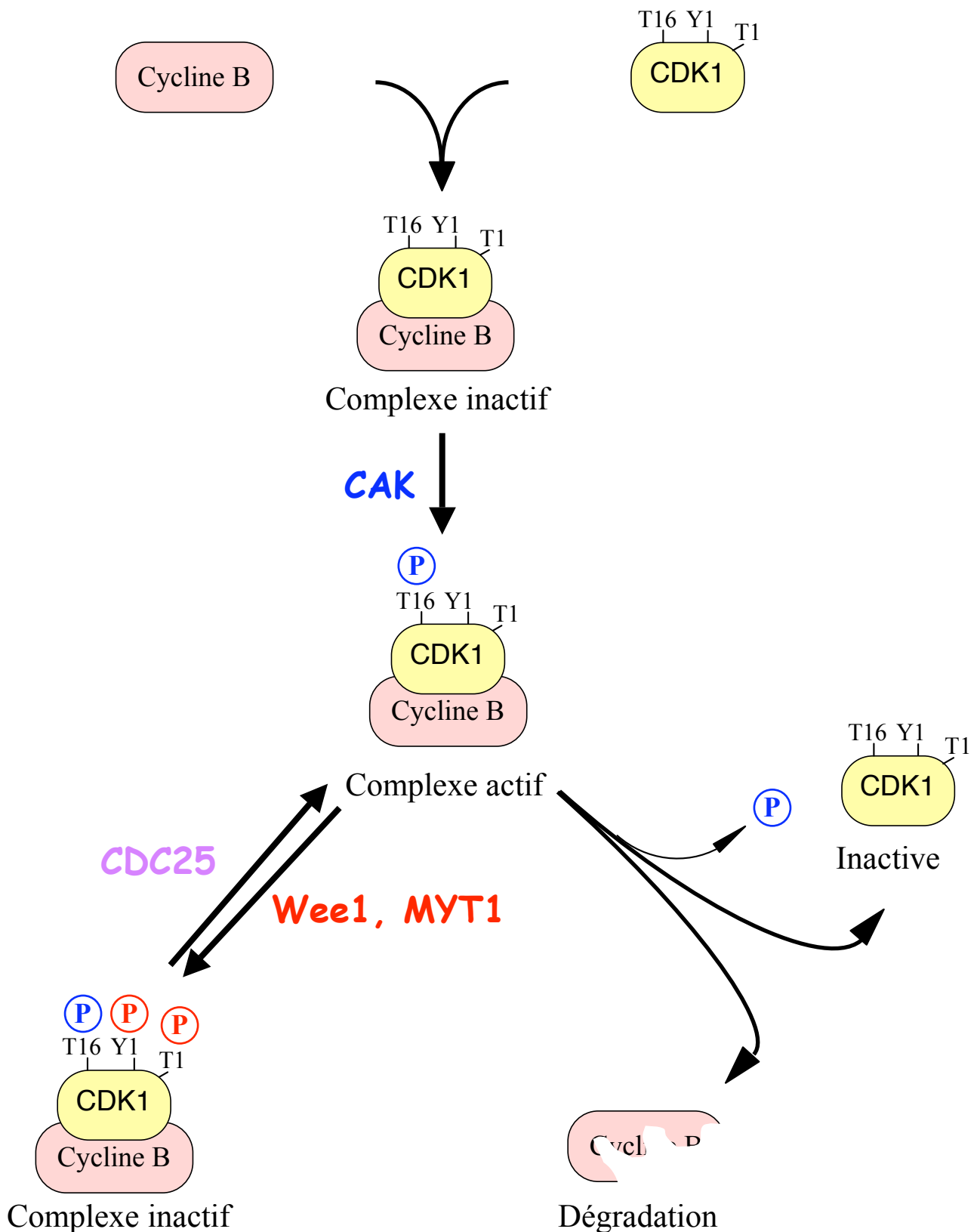
(ii) **Phosphorylations inhibitrices et déphosphorylations.**

Alors que la phosphorylation activatrice des CDK n'est pas régulée au cours du cycle cellulaire, deux phosphorylations inhibitrices jouent un rôle central dans la régulation de l'activité des CDK. Elles sont toutes les deux localisées dans le site actif de la kinase [66, 79]. La tyrosine 15 est conservée dans toutes les CDK majeures [121], alors que le deuxième site, thréonine 14, n'est présent que chez les eucaryotes supérieurs [135-137]. Tyr15 et Thr14 sont localisées à proximité du site de liaison de l'ATP et leur phosphorylation inhibe probablement l'activité des CDK en interférant avec l'ATP. La modulation du taux de phosphorylation sur ces deux sites est particulièrement importante pour l'activation du complexe CDK1/cycline B à l'entrée en mitose [135, 136], mais participe également au contrôle de l'activation des CDK en G1/S et en phase S.

Le statut de la phosphorylation sur Tyr15 et Thr14 est contrôlé par une balance entre l'activité de kinases inhibitrices et celle de phosphatases activatrices (Figure 9). L'enzyme principale responsable de la phosphorylation sur Tyr15 est WEE1 dont des homologues ont été identifiés chez tous les eucaryotes. Dans les cellules en interphase, WEE1 phosphoryle CDK1 sur la tyrosine 15 afin d'empêcher l'activation du complexe avant l'entrée en mitose [138-141]. Une deuxième kinase, MIK1, dont le rôle est partiellement redondant avec celui de WEE1, phosphoryle également CDK1 sur Tyr15 chez la levure *S. pombe* [142, 143]. Les vertébrés possèdent une autre kinase, MYT1, impliquée dans la phosphorylation de la Thr14 mais aussi de Tyr15 sur CDK1 [144-147]. Elle appartient à la même famille que WEE1 et a la particularité d'être associée aux membranes [145, 146]. L'inhibition de CDK1/cycline B par MYT1 est réalisée à la fois par sa phosphorylation inhibitrice et par une interaction stable entre le complexe et la kinase ce qui le maintient dans le cytoplasme [147, 148]. Si la phosphorylation de CDK1/cycline B par MYT1 est bien documentée, il n'en est pas de même pour les autres complexes CDK/cycline [121, 149].

La déphosphorylation activatrice des résidus Tyr15 et Thr14 est assurée par les phosphatases de la famille CDC25 qui font l'objet de la partie suivante.





**FIGURE 9** : La régulation de l'activité CDK1/cycline B par phosphorylation.

Une fois le complexe CDK1/cycline B formé, il subit différentes phosphorylations. La première est la phosphorylation par la CAK sur Thr161, ce qui active le complexe. Puis, ce sont les kinases Wee1 et MYT1 qui phosphorylent CDK1 sur Thr14 et Tyr15. Le complexe est alors inactif. Son activité est restaurée par l'action d'une phosphatase à double spécificité de la famille CDC25.

Le complexe peut également être inactivé par la dégradation de la cycline puis par déphosphorylation de CDK1 sur la Thr161 par une phosphatase qui n'a pas encore été clairement identifiée (PP2A et/ou PP2C).

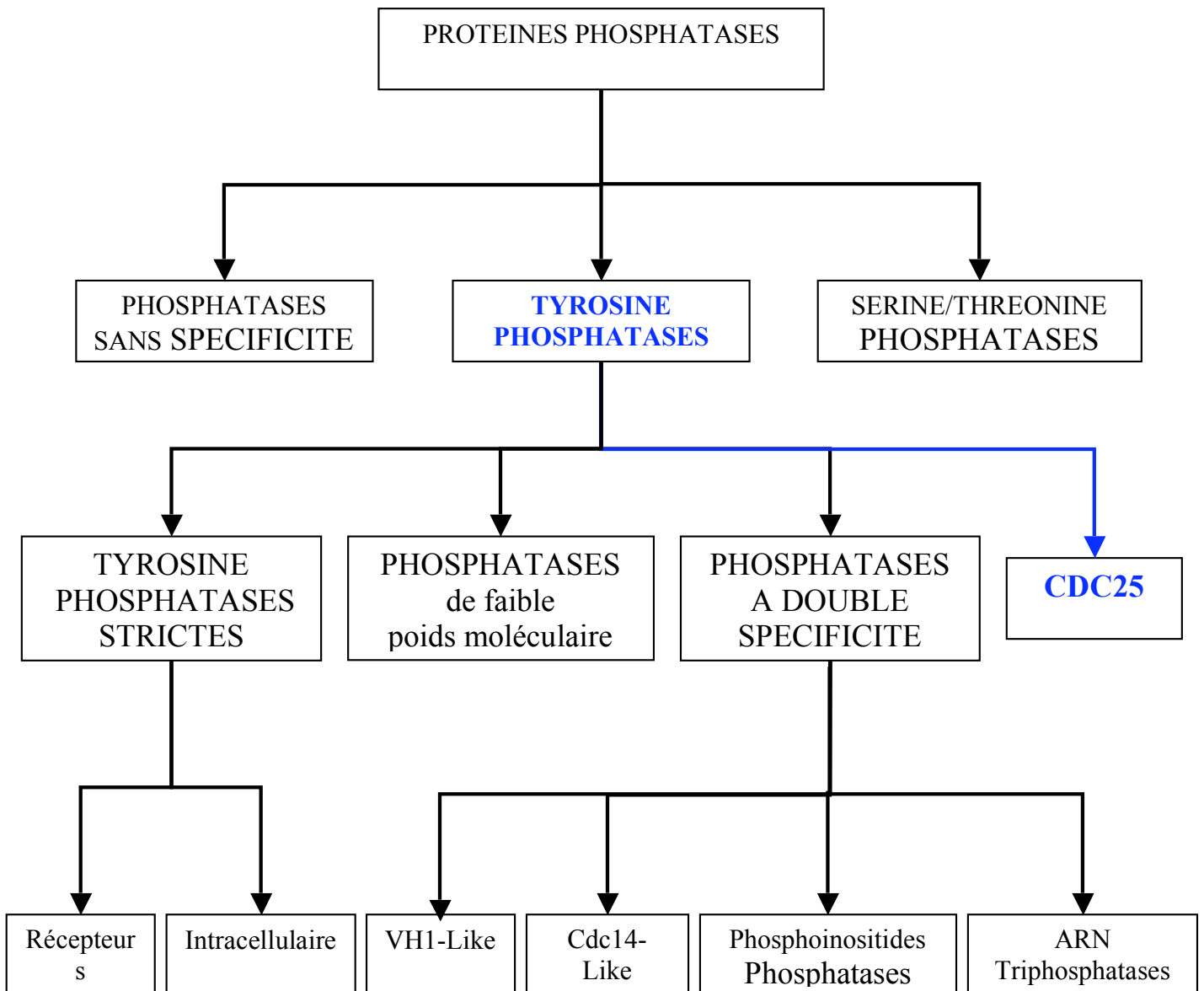
En conclusion, les CDK sont souvent considérées comme les moteurs du cycle cellulaire. Dans la mesure où leur activité va réguler de manière positive certains événements alors que d'autres vont être inhibés, elles seraient plutôt comme des feux de circulation permettant à des molécules d'agir et pas à d'autres. Les checkpoints et tous les mécanismes impliqués dans leur régulation, en agissant sur leur activité, assureraient la modulation de la vitesse du trafic cellulaire en fonction des événements extérieurs et/ou intérieurs susceptibles de provoquer des problèmes ultérieurs. Cette régulation passe par des événements très rapides de déphosphorylation activatrice et d'inhibition par destruction de la sous-unité régulatrice, la cycline [30]. Toute dérégulation de ces mécanismes de contrôle pouvant à terme induire une prolifération anarchique des cellules et conduire à l'apparition de tumeurs [150], il est important de comprendre au mieux cette mécanique et notamment les protéines responsables de l'activation des CDK par déphosphorylation : les protéines de la famille CDC25.

## II) CDC25 RÉGULATEUR UNIVERSEL DU CYCLE CELLULAIRE.

### *1/ Caractérisation des CDC25.*

Parmi les souches de levures créées par mutagenèse aléatoire, la souche *cdc25-22<sup>ls</sup>* a permis l'isolement du gène *cdc25* par complémentation fonctionnelle [151]. Si sa délétion entraîne un arrêt du cycle cellulaire à la transition G2/M, la surexpression de CDC25 induit une entrée prématurée des cellules en mitose dépendante de la dose [151, 152]. *cdc25* est donc un régulateur essentiel pour l'entrée en phase M. Son activité contrecarre la phosphorylation inhibitrice des kinases WEE1 et MYT1 (Figure 9) [143, 151]. En effet, le blocage en fin de phase G2 lié à la délétion de *cdc25* est caractérisé par une accumulation de complexes CDK1/cycline B inactifs car phosphorylés sur la tyrosine 15 [141, 153]. Par contre, un mutant de CDK1 non phosphorylable sur Tyr15 ne requiert plus *cdc25* pour l'entrée en mitose [141]. D'autre part, l'ajout à des extraits d'ovocyte de xénope de protéines CDC25 purifiées, induit leur entrée en mitose avec déphosphorylation de la Tyr15 de CDK1 et l'augmentation de l'activité Histone H1-kinase du complexe CDK1/cycline B [154, 155]. Le fait que CDC25 contrecarre l'action de kinases laisse supposer que c'est une phosphatase. En effet, CDC25 déphosphoryle directement CDK1 sur Tyr15 ce qui augmente son activité kinase [156-160]. Mais il fut également montré que CDC25 est une phosphatase atypique. Si elle possède le motif HCX<sub>5</sub>R commun à toutes les tyrosine-phosphatases [156] et est capable de déphosphoryler les résidus tyrosine phosphorylés [157, 161], elle présente aussi une forte homologie avec la phosphatase VH1 du virus de la vaccine, phosphatase qui a la particularité de déphosphoryler *in vitro* les résidus sérine et tyrosine [162]. Comme en plus des tyrosines, CDC25 déphosphoryle les résidus sérine présents sur la caséine phosphorylée [158], elle fut alors classée dans une catégorie de phosphatases, affiliée aux tyrosine-phosphatases : les phosphatases à double spécificité (Figure 10) [163]. Depuis il a été clairement montré que dans les cellules humaines où CDK1 est inhibée par phosphorylation sur tyrosine 15 et thréonine 14, CDC25 catalyse la déphosphorylation de ces deux résidus [164, 165].

Parmi ses caractéristiques biochimiques remarquables, CDC25 est capable d'hydrolyser le pNPP (para-NitroPhénylPhosphate), un composé organique qui sert de substrat *in vitro* pour de nombreuses tyrosine-phosphatases, et est sensible aux inhibiteurs classiques des phosphatases comme l'orthovanadate de sodium (Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>) [158, 159]. Son activité enzymatique est localisée dans son domaine carboxy-terminal et requiert le motif



**FIGURE 10** : Les différentes familles de phosphatases.

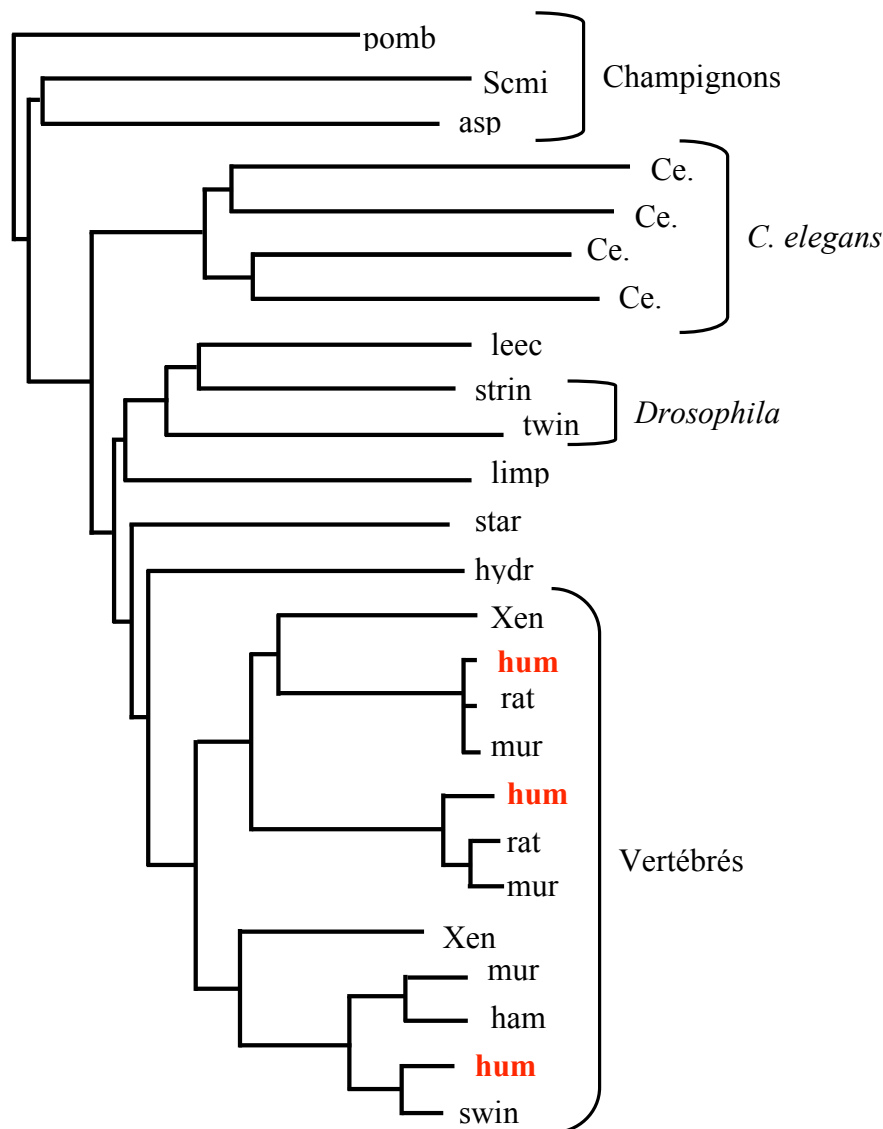
(D'après Fauman et Saper, TRENDS in Biochemical Sciences, 1996  
et Wang et collègues, Current Topics in Medicinal Chemistry, 2003)

La hiérarchie proposée est basée sur la comparaison des séquences en acides aminés et sur les données concernant la structure et la spécificité de substrat des phosphatases.

HCX<sub>5</sub>R pour être active [157, 161, 166]. Par contre contrairement à d'autres phosphatases comme VH1, CDC25 présente une forte spécificité de substrats pour les CDK phosphorylées [55, 157, 159, 167]. Enfin l'analyse cristallographique de la structure du domaine catalytique de deux phosphatases de la famille CDC25 (CDC25A : [168] ; CDC25B : [169]) a été réalisée. Elle a révélée qu'en dehors du motif HCX<sub>5</sub>R, les CDC25 présentent une structure très différente des autres phosphatases et qu'elles sont plus proches des Rhodanèses, des protéines de transfert de Soufre présentes chez les bactéries et dans la mitochondrie [168]. De plus un pont disulfure a été mis en évidence dans le domaine catalytique, pont qui lorsqu'il est réalisé, inhiberait l'activité catalytique de la phosphatase [168, 169]. Il permettrait d'expliquer la dépendance de la phosphatase pour des agents réducteurs comme le DTT pour conserver son activité *in vitro*. En parallèle, des études sur le mécanisme catalytique de l'enzyme ont été réalisées. En effet, comme elles sont très divergentes des autres phosphatases connues, les auteurs ne pouvaient pas faire de prédictions à partir de ces données. Mais pour le moment, malgré différentes études, le mécanisme d'action des phosphatases CDC25 n'est toujours pas clairement établi, ce qui renforce le caractère un peu particulier de cette phosphatase [170, 171].

Des homologues fonctionnels de CDC25 ont été identifiés chez tous les eucaryotes (Figure 11) soit par complémentation fonctionnelle dans la souche *cdc25-22<sup>ts</sup>*, soit par PCR dirigée contre les séquences conservées entre les *cdc25*. Chez les mammifères et notamment chez l'homme, trois protéines CDC25 ont été identifiées et sont codées par trois gènes différents : CDC25A, CDC25B et CDC25C [172-174]. Si les trois CDC25 humaines présentent environ 50 % d'homologie entre elles, l'ensemble des différentes CDC25 identifiées présente une homologie de séquence relativement faible (au maximum, 45 % d'acides aminés identiques au niveau du domaine catalytique). Malgré ces différences, elles complètent toutes de manière plus ou moins efficace la mutation *cdc25-22<sup>ts</sup>* chez la levure *S. pombe* [152, 163, 172-174].

La majorité des travaux qui seront abordés par la suite se rapportera aux protéines CDC25 humaines. Ceux qui concernent d'autres organismes, comme la levure ou le xénope seront présentés soit pour appuyer les résultats obtenus dans les cellules humaines, soit pour apporter des données complémentaires.



**FIGURE 11 :** Les phosphatases CDC25 dans différents organismes.

(D'après Ashcroft et collègues, Gene, 1998)

L'arbre phylogénétique du domaine phosphatase des CDC25 est basé sur l'analyse de trois domaines conservés entre les CDC25 dans leur domaine catalytique.

Abréviations : pombe, CDC25 de *S. pombe* ; Scmi1, MIH1 de *S. cerevisiae* ; asper, nimT d'*Aspergillus nidulans* ; Ce.1 à Ce.4, CDC25.1 à 4 de *C. elegans* ; leech, CDC25 d'*Helobdella robusta* (sangue) ; string et twine, CDC25 de *D. melanogaster* ; limpet, CDC25 de *Patella vulgata* (bernaque) ; starf, CDC25 d'*Asterina pectinifera* (étoile de mer) ; hydra, CDC25 d'*Hydra vulgaris* (hydre) ; XenA, CDC25A de *Xenopus laevis* (xénope) ; HumA, CDC25A humaine ; ratA, CDC25A de *Rattus norvegicus* (Rat) ; murA, CDC25M3 de *Mus musculus* (souris) ; humB, CDC25B humaine ; ratB, CDC25B de rat ; murB, CDC25M2 de souris ; Xen-1, CDC25-1 de xénope ; murC, CDC25M1 de souris ; hamst, CDC25 de *Mesocricetus auratus* (hamster) ; humC, CDC25C humaine ; swine, CDC25 de *Sus scrofa* (cochon).

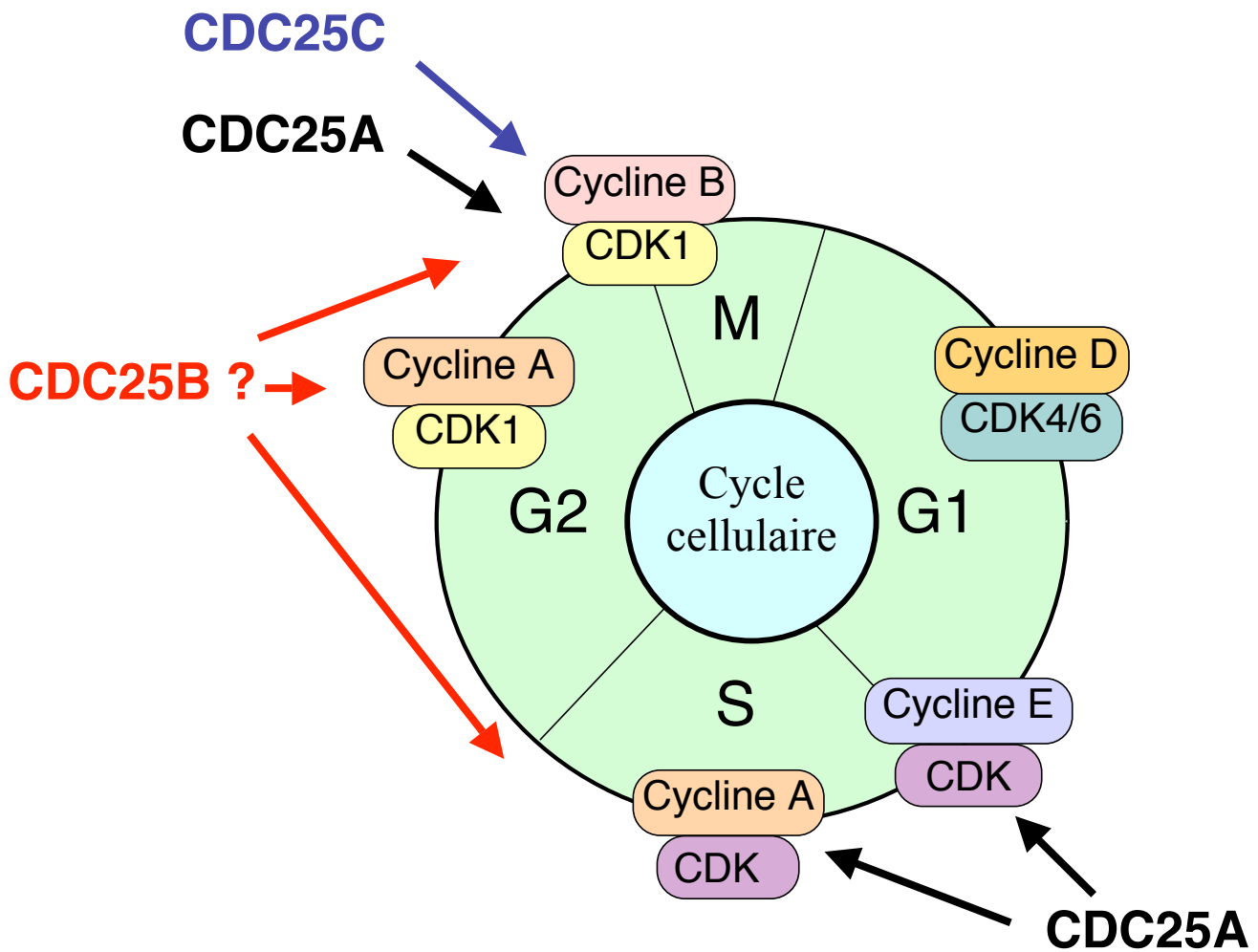
## *2/ Les CDC25 dans le cycle cellulaire et leurs cibles.*

L'étude de l'implication des phosphatases CDC25 dans le cycle cellulaire a été abordée par différentes approches comme l'utilisation d'anticorps neutralisants, d'oligonucléotides anti-sens ou la surexpression de ces protéines. Ces travaux ont permis de placer chacune des phosphatases dans le cycle cellulaire (Figure 12).

La micro-injection d'anticorps dirigés contre CDC25A dans des cellules synchronisées en phase G1 inhibe la réplication de l'ADN en provoquant un arrêt du cycle cellulaire à la transition G1/S [175, 176], bien que certains auteurs décrivent également un arrêt dans un état mitotique ce qui impliquerait la phosphatase dans la transition G2/M [173]. Sa surexpression dans des cellules humaines (lignées stables inductibles) provoque une entrée prématurée de ces cellules en phase S [177] ce qui confirme son rôle dans la transition G1/S (Figure 12) et qui est corrélée avec le fait que son activité est maximale au moment de la transition G1/S et pendant la phase S [176, 177]. Mais son activité reste encore élevée pendant la phase G2. Des expériences d'interférence aux ARN (RNAi) révèlent qu'en plus d'un retard dans la transition G1/S, la perte de l'activité CDC25A provoque également un retard dans la transition G2/M [178]. Ces expériences suggèrent fortement un rôle de CDC25A dans le contrôle de l'entrée en mitose (Figure 12).

La micro-injection d'anticorps dirigés contre CDC25B ou l'expression d'un mutant catalytiquement inactif de la phosphatase provoque une accumulation des cellules en fin de phase G2 [179-181], tandis que la surexpression d'une forme active va conduire à une entrée prématurée en mitose avec, dans certaines conditions, une condensation prématurée des chromosomes [174, 182]. Donc CDC25B joue un rôle en phase G2 et à la transition G2/M (Figure 12). Mais l'utilisation d'oligonucléotides anti-sens dirigés contre CDC25B conduit à un arrêt des cellules en phase S et non en phase G2 [183], ce qui reflète une probable implication de la phosphatase dans ces deux phases du cycle cellulaire. Ces résultats sont cohérents avec le profil de l'activité de CDC25B : son activité augmente au cours de la phase S et est maximale en phase G2 [179].

Enfin, la micro-injection d'anticorps spécifiques de CDC25C provoque un arrêt des cellules à la transition G2/M (Figure 12) [179, 184] et son activité phosphatase est maximale en ce point du cycle cellulaire [185]. Par contre sa surexpression est insuffisante pour induire des changements au niveau du cycle cellulaire [180] et elle doit être co-exprimée en même temps que la cycline B pour qu'une accélération de l'entrée en mitose soit observée [182].



**FIGURE 12 :** Les phosphatases CDC25 humaines et le cycle cellulaire.

La phosphatase CDC25C contrôle l'entrée en mitose en activant le complexe CDK1/cycline B.

La phosphatase CDC25A régule la transition G1/S et la progression en phase S en déphosphorylant les complexes CDK2/cycline E et CDK2/cycline A. Elle participerait également au contrôle de la transition G2/M.

Le point d'exécution de la phosphatase CDC25B est plus controversé puisqu'elle pourrait agir soit en phase G2 et à la transition G2/M, soit en phase S. De même, sa ou ses cibles n'ont pas encore été clairement identifiées.



Ainsi, au moins deux phosphatases, CDC25B et CDC25C, sont impliquées dans le contrôle de la transition G2/M. Mais plusieurs travaux indiquent qu'elles auraient des rôles différents. CDC25B serait impliquée dans des événements de l'entrée en mitose, plus précoces que CDC25C. Elle participerait notamment à la mise en place de la nucléation des microtubules à partir des centrosomes [180]. De plus, sa surexpression est capable d'induire une entrée prématurée des cellules en mitose alors que CDC25C en est incapable. CDC25B est donc considérée comme le « Starter » de l'entrée en phase M [182]. Ce schéma se complique avec l'implication, démontrée récemment, de CDC25A dans la transition G2/M. Les auteurs qui ont présenté ce travail proposent que CDC25A contribue à l'effet « Starter » attribué à CDC25B ainsi qu'à l'amplification du signal MPF nécessaire à l'entrée en mitose (Figures 12 et 16) [186-188].

L'identification des substrats de chacune des phosphatases CDC25 humaines a été principalement conduite par des études *in vitro* et l'utilisation de protéines recombinantes purifiées. Les premiers substrats testés furent les complexes CDK/cycline. Ainsi CDC25A agirait sur les complexes CDK2/cycline A et CDK2/cycline E qui sont actifs dans la même fenêtre du cycle que la phosphatase (Figure 12). De plus, une forme catalytiquement inactive de CDC25A interagit fortement avec ces deux complexes [166]. Enfin, *in vivo* sa surexpression provoque l'activation des complexes CDK2/cycline E et CDK2/cycline A [177, 189]. Il est important de noter qu'*in vivo*, CDC25A est également capable d'interagir avec CDK1/cycline B [173] ce qui rejoindrait une possible implication de la phosphatase en fin de cycle cellulaire. Concernant CDC25B, elle est capable de déphosphoryler *in vitro* les complexes CDK1/cycline A ou cycline B et CDK2/cycline A ou cycline E [165], mais une forme catalytiquement inactive de la phosphatase n'interagit qu'avec CDK2/cycline A [166, 190]. Les travaux de Lammer et collègues indiquent que suivant la phase du cycle, CDC25B aurait une affinité pour un complexe différent. Ainsi, en phase S, elle agirait préférentiellement sur CDK2/cycline A, alors qu'à la transition G2/M ce serait plutôt sur CDK1/cycline B (Figure 12) [179]. De son côté, CDC25C n'est capable de déphosphoryler qu'un seul complexe : CDK1/cycline B (Figure 12) [185, 191]. Des travaux précisent même que CDC25C a plus d'affinité pour les complexes CDK1/cycline B où CDK1 est phosphorylée à la fois sur Thr14 et Tyr15 que pour ceux qui présentent une seule phosphorylation inhibitrice [192]. Une étude biochimique a montré que la différence de spécificité de substrat entre les CDC25 est en partie liée aux différences dans la queue carboxy-terminale des protéines [193]. Ainsi le fait de greffer à CDC25C la queue de

CDC25B (ses 17 derniers acides aminés) la rend 10 à 20 fois plus efficace sur les complexes CDK2/cycline A qu'elle ne l'est [193].

Jusqu'à récemment, le dogme était que les phosphatases CDC25 n'ont pour cible que les complexes CDK/cycline. Mais de plus en plus de travaux rapportent leurs effets sur des protéines autres que les CDK. Ainsi, CDC25A lie et déphosphoryle le répresseur de transcription CUT1, ce qui augmente sa liaison à l'ADN, induit une diminution du taux de transcription du gène  $p21^{CIP1}$  et donc favorise la transition G1/S [194]. D'autre part, CDC25A est capable d'interagir avec  $p21^{CIP1}$  et d'entrer en compétition avec le CKI pour la liaison aux complexes CDK/cycline, ce qui protégerait le complexe qu'elle vient d'activer de l'action inhibitrice de  $p21^{CIP1}$  [195]. Pourtant, les auteurs qui ont créé la lignée permettant la surexpression inducible de CDC25A ne rapportent pas de modifications dans le niveau d'expression de  $p21^{CIP1}$  ni dans la quantité de CKI associés aux complexes CDK/cycline [177], ce qui sous-entend que ces régulations sont soit des événements mineurs dans le contrôle de la transition G1/S, soit qu'ils sont spécifiques à certains types cellulaires. CDC25A lie et inhibe la kinase ASK1 (« Apoptosis Signal-regulating Kinase 1 ») qui agit en amont de protéines kinases induites par les stress, ce qui est en faveur d'une survie cellulaire [196]. Enfin, CDC25A déphosphoryle et inhibe la protéine kinase Raf1 [197]. CDC25B interagit également avec des protéines autres que les CDK/cycline. Ainsi, il a été démontré récemment que CDC25B se lie aux récepteurs stéroïdiens et les active de manière indépendante de son activité phosphatase. CDC25B serait donc un cofacteur des récepteurs stéroïdiens [198, 199]. Enfin, CDC25C interagit transitoirement lors de l'entrée en mitose avec PCNA (« Proliferating Cell Nuclear Antigen »), une protéine auxiliaire de l'ADN polymérase  $\delta$  et essentielle à la fois pour la réplication et pour la réparation de l'ADN [200]. Mais pour le moment aucune précision sur la fonction de cette interaction n'a été apportée.

### *3/ Régulations au niveau ARN messenger.*

Le taux de l'ARN messenger de *cdc25C* fluctue au cours du cycle cellulaire. Très faible en phase G1, il apparaît et augmente en fin de phase S et pendant la phase G2 pour être maximal à la transition G2/M puis diminue pour quasiment disparaître lors du retour en phase G1 [172, 183, 184]. La transcription de l'ARN messenger de *cdc25C* est contrôlée par différents facteurs de transcription à effets positifs ou négatifs. Ainsi sa répression en phase G1 est due à la liaison du répresseur de transcription CDF-1 (« CDE-CHR Binding Factor 1 ») sur l'élément CDE/CHR (« Cell Cycle-Dependent Element – Cell Cycle genes

Homology Region ») du promoteur de *cdc25C* [201]. Cette liaison va bloquer la fonction des facteurs de transcription positifs NF-Y (« Nuclear Factor Y ») et Sp1-Sp3 fixés en amont [202, 203]. Lorsque les cellules passent en phase S, l'inhibition par CDF-1 est levée ce qui permet la transcription de l'ARN messager de *cdc25C* [201-205]. Il est intéressant de noter que la même régulation existe pour l'homologue murin de CDC25C [206]. Enfin, plus récemment il a été montré que la transcription de *cdc25C* est régulée négativement par la protéine p53, le suppresseur de tumeur (mais pas par p73 une protéine de la même famille) [207]. Même si un élément de réponse à p53 a été identifié [208], il semblerait que cette répression passe plutôt par une inhibition du facteur de transcription NF-Y [207]. Pourtant, malgré toutes ces fluctuations dans le taux de l'ARN messager de *cdc25C*, la protéine est présente en quantité constante au cours du cycle cellulaire [183, 184].

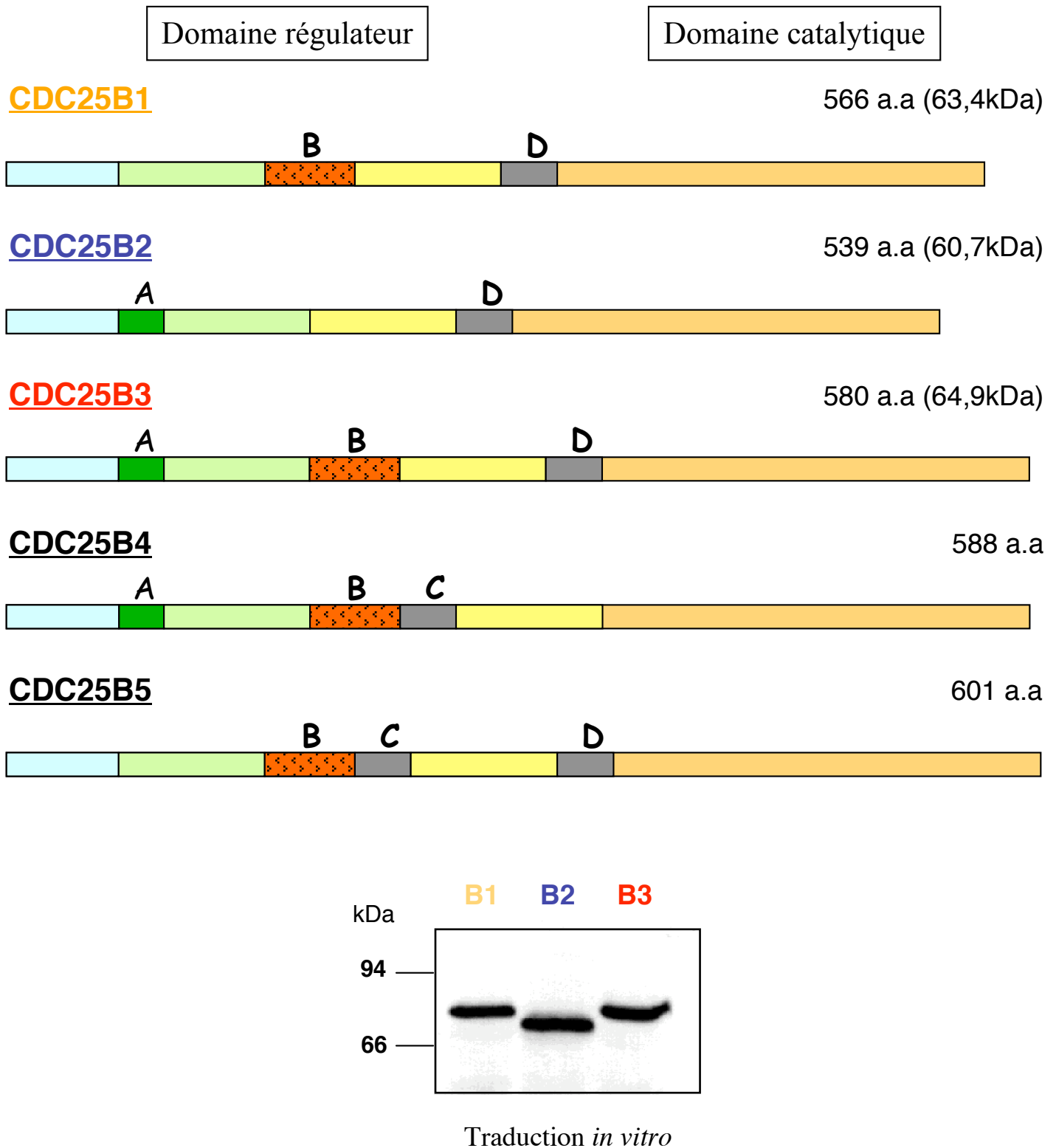
L'ARN messager de *cdc25A* fluctue lui aussi au cours du cycle cellulaire. En effet, il apparaît au cours de la phase G1, est à son taux maximum au moment de la transition G1/S puis diminue pendant la phase S pour réapparaître à la phase G1 suivante [175, 183]. Il est régulé positivement par le facteur de transcription hétérodimérique MYC/MAX [209-211], ainsi que par le facteur de transcription E2F [210]. Or E2F est inhibé par sa liaison aux protéines de la famille Rb (Rb, p130 et p107) [212, 213]. Cette inhibition est essentielle pour la répression de *cdc25A* lors de l'absence de facteurs de croissance et participe également au contrôle de sa transcription au cours du cycle cellulaire puisque la liaison des protéines Rb à E2F est levée par leur phosphorylation par les complexes CDK/cycline actifs en phase G1 [212]. De plus, cette répression de la transcription de *cdc25A* par Rb est la cible de virus transformants comme l'adénovirus [214] ou le papillomavirus humain. En effet, la protéine E7 du papillomavirus de type 16 (HPV16) inhibe la fonction des protéines de la famille Rb et permet l'expression non contrôlée du gène *cdc25A* ce qui peut conduire à terme à l'immortalisation et à la transformation tumorale des cellules infectées [215, 216].

La troisième protéine de la famille, CDC25B, est, elle aussi, régulée au niveau de sa transcription. Son ARN messager s'accumule au cours de la phase S pour atteindre son maximum pendant la phase G2 avant de disparaître lors du retour en phase G1 [174, 175, 183]. Comme *cdc25A*, *cdc25B* possède un site de liaison pour le facteur de transcription MYC/MAX [209]. Elle est également la cible de virus transformants comme SV40 ou les papillomavirus humains de type 16 et 18 [174] même si le mécanisme de cette augmentation de transcription n'est pas encore connu. Des études plus récentes ont montré que la quantité cellulaire du facteur général de transcription TBP (« Tata Binding Protein ») est limitante pour la transcription de *cdc25B* [217]. D'autre part, l'analyse du promoteur du gène *cdc25B*

murin a révélé l'existence de sites de liaison pour les facteurs NF-Y et Sp1-Sp3, essentiels pour l'activation de sa transcription en fonction du cycle cellulaire, ainsi qu'un site de répression dit CRR (« Cell Cycle Regulated Repressor ») [218].

Suite à un crible fonctionnel réalisé chez la levure *S. pombe*, trois ADN complémentaires *cdc25B* humains ont été identifiés : *cdc25B1*, *B2* et *B3* (Figure 13). Ils résultent de l'épissage alternatif d'un même ARN pré-messager [219]. Ils diffèrent par la présence ou l'absence de deux séquences codant pour les domaines A et B de 14 et 41 acides aminés respectivement et localisées dans la partie amino-terminale régulatrice de la protéine. L'expression relative de chacun des variants d'épissage de *cdc25B* a été examinée au niveau ARN messenger par RT-PCR et montre une variation suivant le type cellulaire [219] et la phase du cycle [183, 219]. Plus récemment, deux autres variants de CDC25B ont été identifiés : CDC25B4 et CDC25B5, issus également d'un épissage alternatif dans la séquence codant pour la partie amino-terminale de la protéine (Figure 13) [181]. Des différences d'abondance de chaque isoforme ont été aussi observées selon les lignées cellulaires [181]. Ces résultats amènent plusieurs questions. Existe-il une expression préférentielle d'une isoforme dans les cellules transformées ? Est-ce qu'au cours du cycle cellulaire les isoformes ont des fonctions ou des localisations différentes ou même une activation différente suivant la phase du cycle ? Des ébauches de réponses seront apportées par la suite.

Récemment, un mécanisme de régulation similaire a été décrit pour les phosphatases CDC25A et CDC25C [220]. Comme pour CDC25B, les épissages alternatifs sont localisés dans la partie codant pour le domaine régulateur amino-terminal de la protéine. Pour CDC25C, quatre nouvelles isoformes ont été décrites (CDC25C2, C3, C4 et C5) alors que pour CDC25A, une seule a été mise en évidence (CDC25A2) et à l'exception du variant C3 (protéine délétée du domaine catalytique), elles ont toutes un domaine catalytique intact. Par contre, ces nouveaux variants de CDC25A et CDC25C ont perdu des sites de phosphorylation, notamment par les CDK et la CaMKII, ce qui laisse supposer une régulation différente de ces isoformes par rapport à la protéine pleine taille. L'étude de l'expression des différentes isoformes de CDC25A et CDC25C a révélé que les protéines qui correspondent aux transcrits les plus longs (c'est-à-dire CDC25A1 et CDC25C1) ont potentiellement une activité phosphatase supérieure et sont majoritaires dans les lignées de cellules tumorales humaines ce qui est probablement lié à la forte capacité de prolifération de ces cellules. A l'opposée, la forme *cdc25C5* est prédominante dans des cellules qui se différencient [220].



**FIGURE 13** : Les différents variants d'épissage de CDC25B.

Les trois premières isoformes diffèrent par la présence ou non des séquences codant pour les domaines A et B de 14 et 41 acides aminés respectivement. Ces deux domaines sont localisés dans la partie amino-terminale régulatrice de la phosphatase. Les deux autres variants correspondent à des épissages additionnels au niveau des séquences codant pour les domaines C et D de 35 et 27 acides aminés respectivement.

#### *4/Régulations au niveau protéine.*

En tant que protéines-clés du cycle cellulaire, les phosphatases CDC25 sont régulées très précisément au cours du cycle. Elles sont notamment régulées par des événements de phosphorylation positifs ou négatifs qui vont contrôler leur stabilité, leur activité catalytique ou leur localisation subcellulaire.

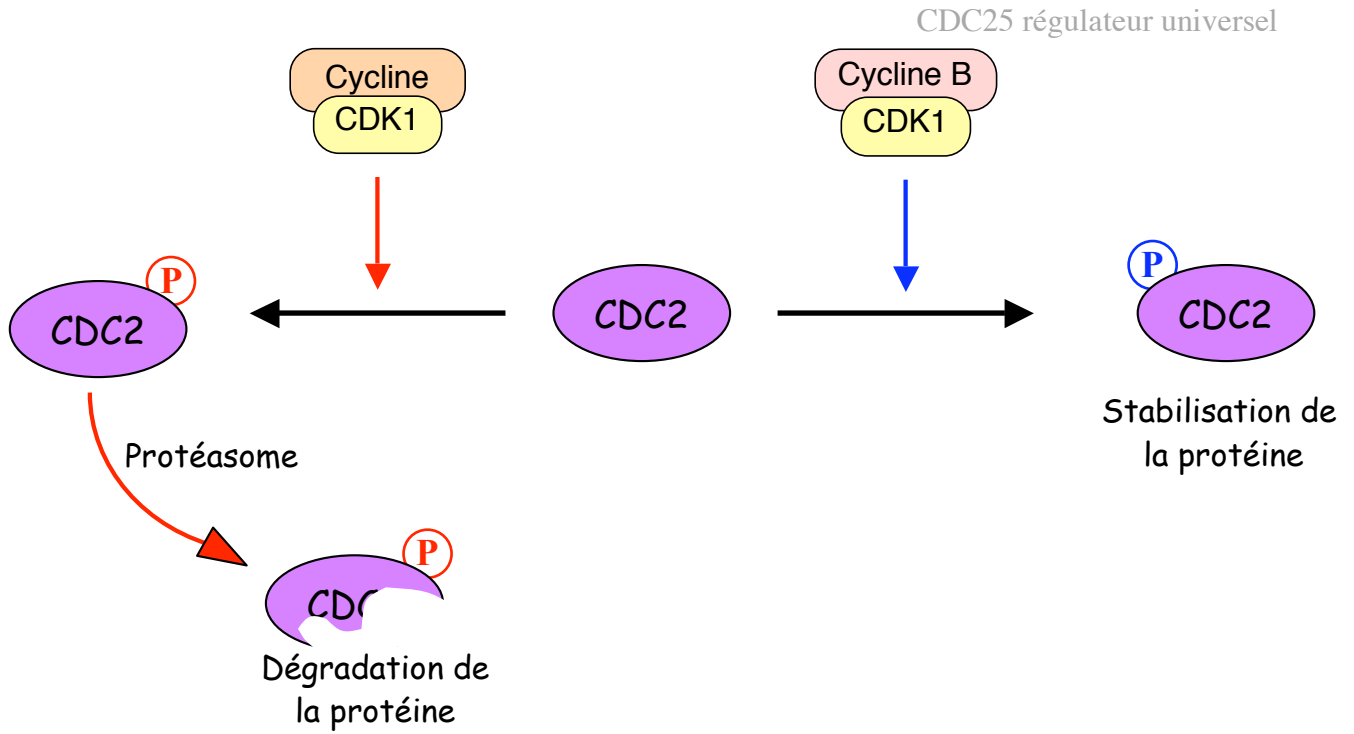
Nous venons de voir la régulation du taux d'ARN messenger des *cdc25*, mais il existe également des régulations de la quantité de protéine. Pour le moment, une seule étude a été réalisée sur la régulation de la traduction des ARN messenger *cdc25* et concerne la phosphatase CDC25 de *S. pombe*. Les auteurs démontrent que la traduction de l'ARN messenger de *cdc25* est dépendante du facteur d'initiation eIF4A et qu'elle est particulièrement sensible à toute réduction d'activité d'eIF4A. Ils ont également montré que l'initiation de la traduction de l'ARN messenger de *cdc25* dépend de sa partie 5' non traduite qui a une structure inhabituelle et agirait comme un senseur de la masse cellulaire puisqu'il faut que la cellule ait atteint une masse minimale avant d'entrer en mitose [221]. Concernant les CDC25 humaines, aucune étude n'a été publiée sur la régulation de leur traduction, mais des travaux de plus en plus nombreux rapportent des modifications de leur stabilité au cours du cycle cellulaire et en fonction de facteurs extérieurs.

#### **(A) RÉGULATION DE LEUR STABILITÉ.**

Des travaux conduits chez la levure *S. pombe* ont montré que le taux de protéine CDC25 est régulé par ubiquitinylation et dégradation par le protéasome. L'ubiquitinylation de CDC25 est contrôlée par PUB1, une protéine qui présente des homologies avec l'ubiquitine ligase humaine E6-AP et l'inactivation du gène *pub1* conduit à l'accumulation de CDC25 et donc à une entrée prématurée des cellules en mitose [222].

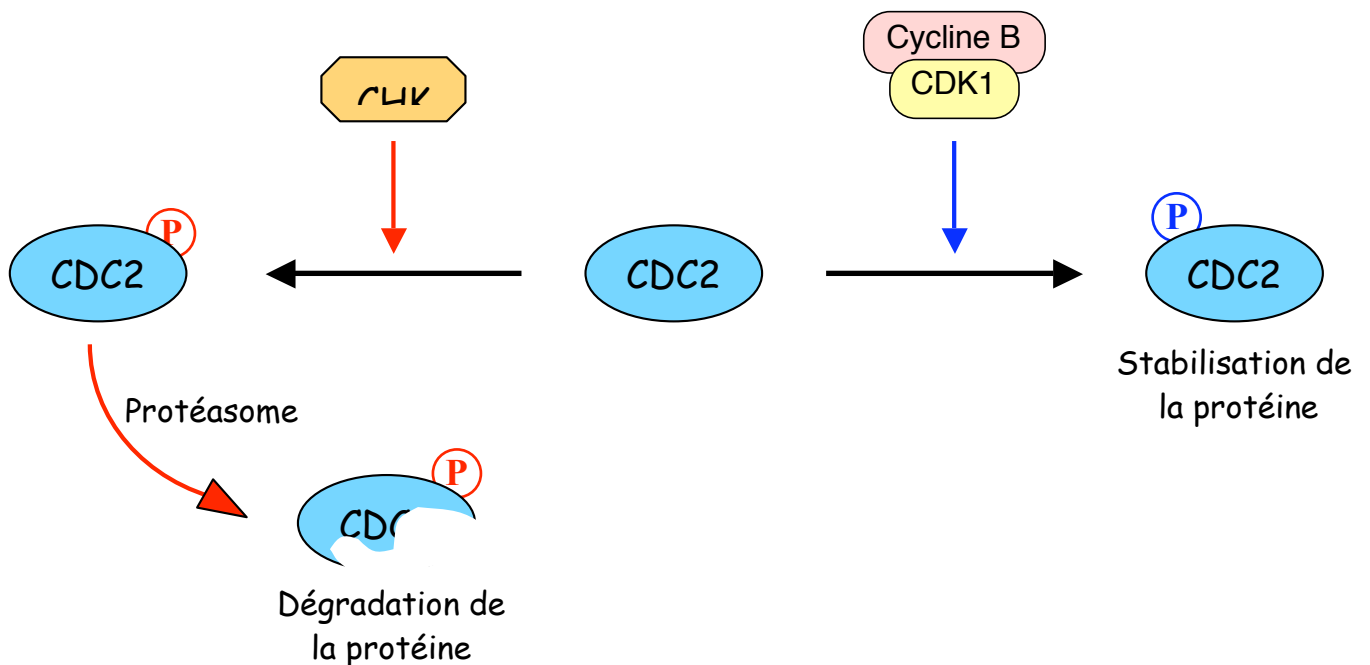
Les premiers travaux réalisés sur la stabilité des CDC25 humaines ont démontré par des approches *in vitro* et *in vivo* que la protéine CDC25B est très instable [223]. Cette instabilité est liée à sa dégradation par le système du protéasome même si aucune ubiquitinylation n'a été caractérisée [224]. Par contre il a été clairement démontré que cette dégradation est liée à la phosphorylation de la phosphatase par le complexe CDK1/cycline A alors que le complexe CDK1/cycline B est protecteur (Figure 14) [224, 225]. Ainsi, en phosphorylant CDC25B, CDK1/cycline A éviterait une entrée prématurée en mitose. Par

Introduction



**FIGURE 14 :** Contrôle de la stabilité de CDC25B par les complexes CDK/cycline.

La phosphorylation de CDC25B par le complexe CDK1/cycline A induit sa dégradation par le système du protéasome. Par contre, sa phosphorylation par CDK1/cycline B la stabilise et la protège de la dégradation induite par CDK1/cycline A.



**FIGURE 15 :** Contrôle de la stabilité de CDC25A.

La phosphorylation de CDC25A sur la Ser123 par CHK1 et/ou CHK2 induit la dégradation de la phosphatase par le protéasome, dégradation plus ou moins rapide suivant le taux de phosphorylation sur la Ser123. Par contre, comme pour CDC25B, sa phosphorylation par CDK1/cycline B la stabilise et la protège de la dégradation induite par les CHK.

contre une fois la mitose engagée, les complexes CDK1/cycline B vont protéger CDC25B de la dégradation afin d'assurer une activité phosphatase maximale nécessaire pour l'activation de tous les complexes CDK1/cycline B.

Plus récemment des travaux réalisés sur la phosphatase CDC25A ont démontré qu'elle aussi est dégradée par le système ubiquitine/protéasome dans des cellules qui cyclent et dans des cellules myéloïdes en phase de différenciation terminale [187]. Cette dégradation est également impliquée dans la diminution des quantités de CDC25A lors de dommages à l'ADN par les rayonnements UV ou par les rayons  $\gamma$ , ou bien lors d'un arrêt du cycle induit par l'hydroxyurée [188, 226]. Dans le cas des dommages à l'ADN par les rayons  $\gamma$ , sa dégradation est induite par sa phosphorylation sur la sérine 123 par la kinase CHK1 (Figure 15) [227]. Ainsi sa dégradation assure un retard et/ou un arrêt du cycle cellulaire à la transition G1/S, nécessaires pour la réparation des dommages. CDC25A est également dégradée au cours d'un cycle normal. Un premier travail a démontré que, au cours du cycle cellulaire, la dégradation de CDC25A est contrôlée par deux ubiquitine-ligases différentes. En effet, lors de la sortie de mitose, CDC25A est ubiquitinylée par le cyclosome ou APC (« Anaphase Promoting Complex ») associé à la protéine Cdh1 et cette ubiquitinylation requiert le motif KEN présent dans la partie amino-terminale de la protéine. Par contre en interphase ou lors de dommages à l'ADN, elle est ubiquitinylée par le complexe SCF (« Skp1/Cullin/F-box ») qui ne nécessite pas la présence du motif KEN [186]. D'autre part, une étude sur la demi-vie de CDC25A au cours du cycle cellulaire a révélé trois niveaux de stabilité de la protéine. Lors de l'entrée en mitose, la phosphatase est très stable et active suite à sa phosphorylation par le complexe CDK1/cycline B sur les sérines 15 et 117. La mutation de ces résidus en acides aminés non phosphorylables restaure l'ubiquitinylation de la phosphatase et la rend très instable [178]. Cette stabilisation de la protéine en mitose pose bien sûr le problème de sa probable implication dans le contrôle de la transition G2/M. D'autre part, pendant la phase S, la phosphatase présente une demi-vie intermédiaire associée à sa phosphorylation par la kinase CHK1 qui assure ainsi le renouvellement basal de la protéine. Enfin, lors de dommages à l'ADN, elle est ultra-labile car elle est phosphorylée à la fois par la kinase CHK1 et la kinase CHK2 ce qui augmente le taux de phosphorylation sur la sérine 123, un résidu essentiel pour cette dégradation [228]. Enfin, il est intéressant de noter que, lors du développement chez le xénope, il a été montré que l'allongement de la durée du cycle cellulaire à l'étape blastula est lié à l'activation de la kinase CHK1 qui va alors induire la dégradation de CDC25A pour retarder l'entrée en phase S [229].



Contrairement à CDC25A et B, peu de travaux ont été réalisés sur la stabilité de la phosphatase CDC25C. Il a été montré que CDC25C possède une boîte de dégradation de type KEN qui semble fonctionnelle puisqu'elle est nécessaire pour sa dégradation par le système ubiquitine/protéasome lors d'un traitement à l'arsénite qui induit un arrêt des cellules à la transition G2/M [230]. D'autre part, un travail rapporte la dégradation de CDC25C lors de stress oxydatifs apparemment par un contrôle de l'état de réduction d'un pont di-sulfure présent dans le domaine catalytique de la protéine [231]. Cependant aucun mécanisme n'est proposé pour expliquer cette dégradation.

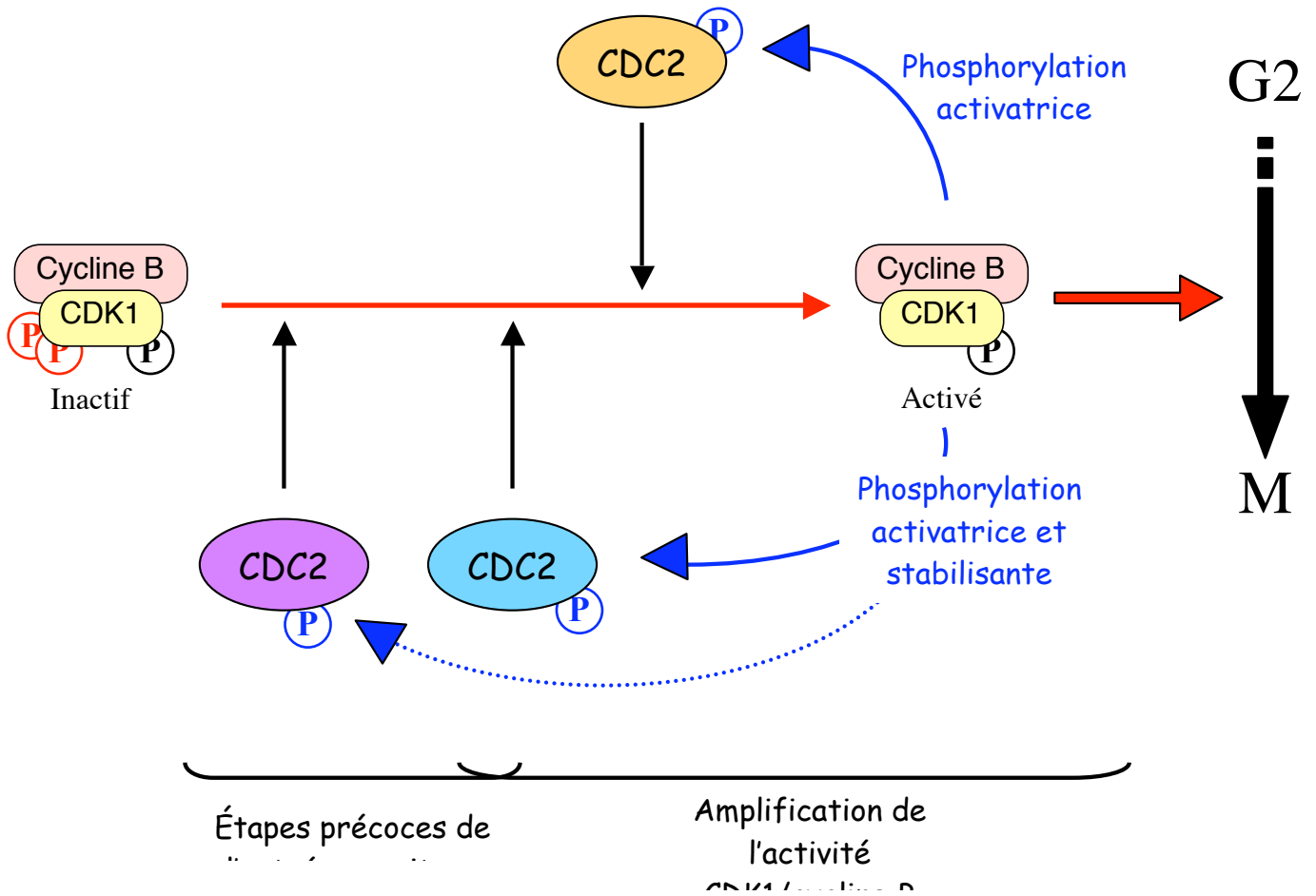
## (B) RÉGULATION DE LEUR ACTIVITÉ CATALYTIQUE.

Les phosphatases CDC25 possèdent une activité catalytique intrinsèque. Mais en des points précis du cycle cellulaire, des mécanismes permettent de moduler cette activité [159]. Ces effets peuvent être directs par modifications de l'activité catalytique ou bien indirects par modification de la localisation intracellulaire de l'enzyme. Dans les deux cas, ces régulations font intervenir des modifications post-traductionnelles (phosphorylation) et/ou des interactions avec des partenaires.

### (i) Par les complexes CDK/cycline.

Les premiers régulateurs identifiés de l'activité catalytique des phosphatases CDC25 sont les complexes CDK/cycline. L'augmentation de l'activité phosphatase de CDC25C humaine et de son homologue chez le xénope est liée à sa phosphorylation lors de l'entrée en mitose [155, 185, 232] par CDK1/cycline B [185, 233]. Cette phosphorylation serait nécessaire pour l'activité d'inducteur de l'entrée en mitose de CDC25C [233]. Ainsi, cette phosphorylation de CDC25C par son propre substrat crée une boucle de rétrocontrôle positif qui permet l'amplification de l'activation des complexes CDK/cycline lors de la transition G2/M (Figure 16) [185, 233]. Les sites de phosphorylation par CDK1/cycline B sur CDC25C ont été identifiés chez le xénope et chez l'homme [233, 234]. Tous localisés dans la partie amino-terminale de la protéine [232], leur mutation en acides aminés non phosphorylables prévient l'activation de CDC25 ce qui entraîne un arrêt du cycle cellulaire en phase G2 [234]. L'action de CDK1 sur CDC25 est favorisée par une interaction entre la phosphatase et la cycline B [155], interaction qui est nécessaire pour la mise en place de la boucle de rétrocontrôle positif entre les deux enzymes [235].

Une boucle de rétrocontrôle positif a également été caractérisée entre la phosphatase CDC25A et le complexe CDK2/cycline E au moment de l'entrée en phase S [176]. Par contre,



**FIGURE 16 :** Contrôle de la transition G2/M.

La déphosphorylation activatrice de quelques complexes CDK1/cycline B par CDC25B et CDC25A permet en retour leur stabilisation et/ou activation mais elle permet également en retour la mise en place d'une boucle de rétrocontrôle positif entre CDK1/cycline B et CDC25C. En effet, la phosphorylation de CDC25C par CDK1/cycline B active la phosphatase qui va alors déphosphoryler d'autres complexes CDK1/cycline B. L'ensemble de ces événements contrôle ainsi l'entrée en mitose des cellules.

CDC25B échappe pour le moment à ce genre de mécanisme. Pourtant, elle aussi est phosphorylée et activée lors de la transition G2/M [179, 183, 191]. Cependant aucun des complexes CDK/cycline présents en ce point du cycle cellulaire n'est capable *in vitro* de modifier l'activité catalytique des trois isoformes de CDC25B [236].

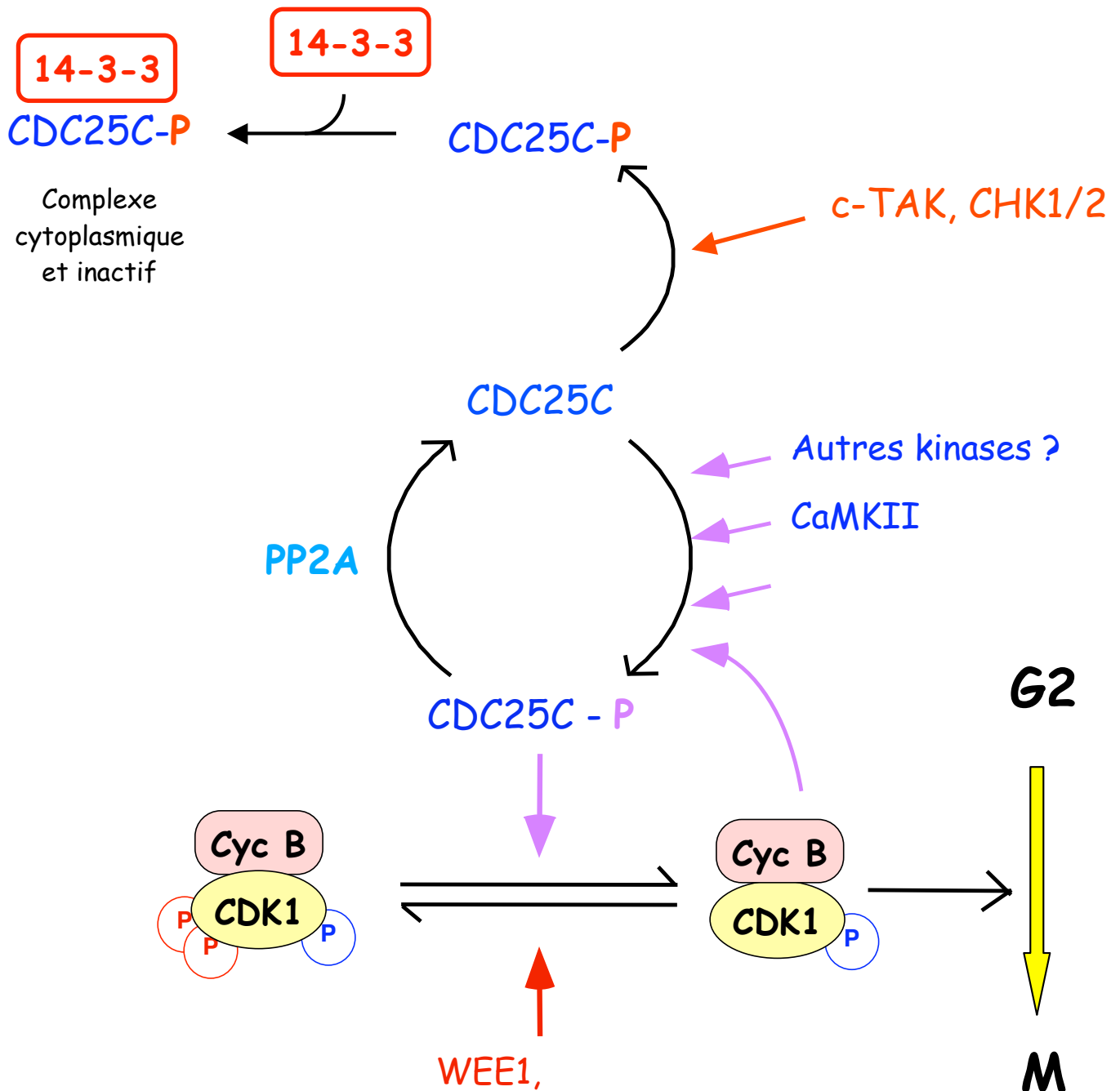
Les CKS auraient également un rôle dans l'activité des CDC25 vis-à-vis des complexes CDK/cycline. Ainsi chez le xénope, la présence de SUC1 augmente la phosphorylation par CDK1/cycline B de CDC25 [237] et les travaux de l'équipe de C. Jessus indiquent que les protéines de la famille de SUC1 sont nécessaires pour la mise en place de la boucle de rétrocontrôle positif entre CDC25 et CDK1/cycline B [238].

Nous venons de voir que l'entrée en mitose et la transition G1/S sont contrôlées par des boucles de rétrocontrôle positif entre la kinase CDK et son activateur, la phosphatase CDC25. Le problème est maintenant de déterminer qui est à l'origine de l'activation de départ. Pour l'entrée en mitose, le modèle proposé est que CDC25A et CDC25B, qui sont actives mais instables en phase G2, activeraient quelques complexes CDK1/cycline B. Ces complexes seraient suffisants pour, d'une part, stabiliser les deux phosphatases et donc amplifier leur action et, d'autre part, activer CDC25C pour mettre en place la boucle d'auto-amplification nécessaire pour le contrôle de la mitose (Figure 16). Il n'est pas exclu que CDC25A participe également à cette deuxième étape. Mais d'autres mécanismes participent à la mise en place de la boucle de rétrocontrôle positif entre CDK1/cycline B et CDC25C (Figure 17).

(ii) **Par les polo-like kinases.**

Les « polo-like kinases » ou PLK appartiennent à une famille de sérine/thréonine kinases impliquées dans de nombreux processus cellulaires importants notamment pour la progression des cellules en mitose comme la formation du fuseau mitotique, l'activation des complexes CDK/cycline mitotiques et leur inactivation à la sortie de mitose en régulant la dégradation des cyclines, et enfin la cytokinèse [239] (revues : [240-242]). Très conservées, elles ont été identifiées dans de nombreux organismes [243-250] ainsi que chez l'homme qui possède trois PLK différentes : Plk1, Prk/Fnk et Snk [251-253].

Dans les ovocytes de xénope, CDC25 s'associe et est phosphorylée par la kinase Plx1 (PLK du xénope) ce qui augmente son activité phosphatase [249]. Plx1 est nécessaire pour l'activation de CDK1/cycline B par CDC25 puisque son immuno-déplétion inhibe l'activation de CDC25 lors de la maturation méiotique [254]. CDC25C humaine est également phosphorylée et activée par Plk1 (Figure 17) [255]. Ainsi les PLK participeraient à la boucle



**FIGURE 17 :** Régulation de l'activité de la phosphatase CDC25C.

La phosphorylation de CDC25C par le complexe CDK1/cycline B permet l'activation de la phosphatase qui, en retour, va déphosphoryler et activer ce même complexe pour permettre l'entrée des cellules en mitose. D'autres kinases comme la polo-like kinase Plk1 ou la kinase dépendante du calcium et de la calmoduline, CaMKII phosphorylent et activent CDC25C. Ces phosphorylations activatrices sont contrecarrées par la Ser/Thr phosphatase PP2A.

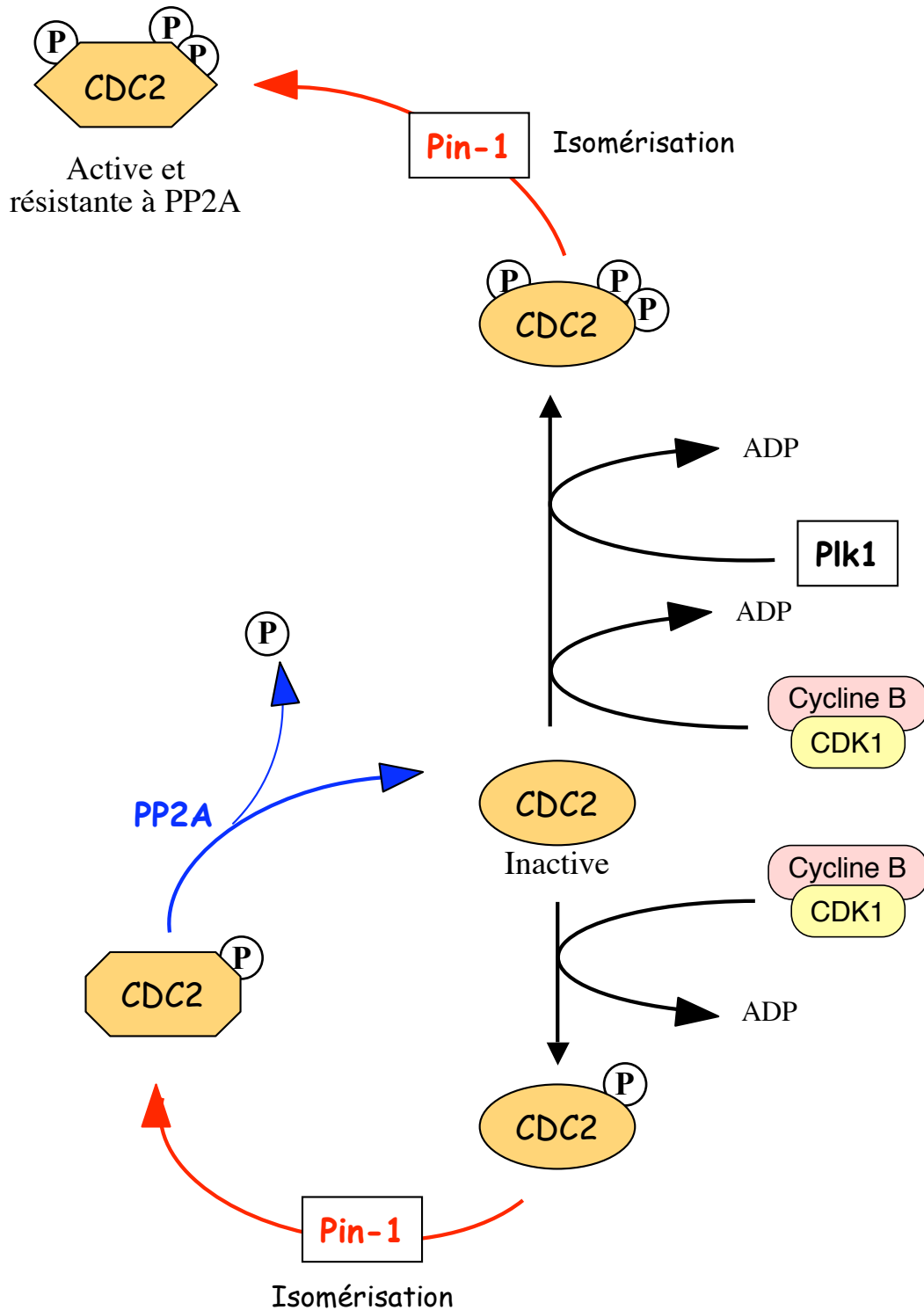
Enfin, la phosphorylation de CDC25C par les kinases c-TAK1, CHK1 et CHK2, va favoriser sa liaison aux protéines de la famille 14-3-3 et entraîner sa séquestration au niveau cytoplasmique pour l'empêcher d'agir sur les complexes CDK1/cycline B nucléaires.

d'amplification entre CDC25 et CDK1/cycline B, boucle qui serait d'autant plus accélérée que chez le xénope, Plx1 est phosphorylée et activée par CDK1/cycline B [256, 257]. Par contre, certains travaux indiquent qu'elle ne participerait pas directement à sa mise en place. En effet, des études menées chez le xénope indiquent que l'activation de CDC25 et l'amplification du signal entre CDK1/cycline B et CDC25 se feraient en deux étapes [238, 258].

**(iii) Par déphosphorylation et isomérisation.**

Les phosphorylations que nous venons de voir (CDK et PLK) sont contrecarrées par l'action d'une sérine/thréonine phosphatase multimérique PP2A (Figure 17) (revues : [259, 260]). Son implication dans le contrôle de l'entrée en mitose a été démontrée par l'utilisation d'un inhibiteur, l'acide okadaïque qui provoque une maturation prématurée des ovocytes de xénope, avec activation de CDC25 et de CDK1/cycline B [232, 261]. Il a été proposé que pendant l'interphase, PP2A inhiberait CDC25 afin d'empêcher l'activation de CDK1/cycline B tant que la réplication n'est pas achevée. Puis, lorsque les cellules rentrent en mitose, elle ne déphosphorylerait plus CDC25 ce qui permet la mise en place de la boucle d'amplification entre CDC25 et CDK1/cycline B [232, 238, 261]. PP2A déphosphoryle également CDK1 qu'elle inactive, et la kinase WEE1 qu'elle active. L'ensemble de ces régulations sur des protéines-clé de l'entrée en mitose permet un contrôle négatif fort sur la transition G2/M. Mais comment expliquer que lorsque les cellules rentrent en mitose, PP2A ne soit plus capable de déphosphoryler CDC25 alors qu'elle est toujours active sur d'autres substrats [261] ? Une explication possible pourrait être un changement dans la composition de PP2A ou dans sa localisation subcellulaire, bien qu'aucun travail ne rapporte de tels phénomènes.

Cette déphosphorylation de CDC25 serait contrôlée par la protéine Pin-1, une peptidyl-propyl isomérase requise pour l'entrée en mitose (revues : [262, 263]). Cette enzyme catalyse une rotation autour de la liaison peptidique entre une proline et une sérine ou d'une thréonine phosphorylée (S/T-P), changeant ainsi la conformation de la molécule [264]. Identifiée de la levure aux mammifères, sa délétion chez l'homme et chez le xénope induit un arrêt des cellules en mitose alors que sa surexpression inhibe l'entrée en phase M [265-267]. Différents travaux menés sur le xénope ont montré que CDC25 est un substrat de Pin-1 [268]. Son isomérisation peut influencer son activité soit positivement [269], soit négativement [267, 269], soit ne pas voir d'effet [266]. D'après les travaux de Stukenberg et collègues,



**FIGURE 18 :** Régulation de la phosphatase CDC25C par PP2A et Pin-1.

Lorsque CDC25C n'est phosphorylée que par CDK1/cycline B, son isomérisation par Pin-1 va favoriser sa déphosphorylation par PP2A et donc son inhibition.

Par contre si CDC25C est phosphorylée par CDK1/cycline B et par Plk1, son isomérisation par Pin-1 va l'activer et la protéger de la déphosphorylation par PP2A afin de permettre l'amplification de la boucle de rétrocontrôle positif entre CDC25C et CDK1/cycline B.

l'isomérisation par Pin-1 de CDC25 n'aurait pas les mêmes effets suivant les phosphorylations présentes sur la phosphatase (Figure 18). Si CDC25 est phosphorylée par CDK1/cycline B, l'action de Pin-1 va inhiber l'activité de CDC25, favoriser sa déphosphorylation par PP2A [268] et empêcher l'entrée en mitose ce qui est corrélé avec les résultats obtenus lors de la surexpression de Pin-1. Par contre, si CDC25 est phosphorylée à la fois par CDK1/cycline B et par Plx1, Pin-1 va alors induire une augmentation de son activité phosphatase ce qui va favoriser la boucle de rétrocontrôle positif nécessaire pour la transition G2/M [269]. Dans ce cas, Pin-1 est requise pour la progression en mitose ce qui concorde avec l'arrêt des cellules en phase M lorsque Pin-1 est absente. Ainsi l'action coordonnée de Pin-1 et des phosphorylations sur CDC25, permet une activation des CDK plus concertée. Il est intéressant de noter que Pin-1 et la protéine SUC1 se lient au même domaine de CDC25. Elles sont donc antagonistes pour la liaison à la phosphatase lors de l'entrée en mitose [237, 270] ce qui constitue un mécanisme additionnel pour contrôler cette étape du cycle.

(iv) Autres phosphorylations.

Les données de la littérature indiquent que de nombreuses autres protéines interviennent dans la régulation de l'activité de phosphatases CDC25 même si leurs implications ne sont pas toujours bien connues.

◆ La CaMKII

Membre de la superfamille des kinases dépendantes du calcium et de la calmoduline, cette kinase participe au contrôle du cycle cellulaire et est notamment un régulateur positif de la transition G2/M (revues : [271, 272]). Par l'utilisation d'inhibiteurs chimiques spécifiques de la CaMKII et d'anticorps neutralisant la kinase, il a été montré que CaMKII est requise pour l'entrée en mitose et que CDC25C est phosphorylée par CaMKII ce qui, *in vitro*, augmente son activité phosphatase (Figure 17) [273]. Ces données suggèrent donc que l'effet positif de la CaMKII sur l'entrée en mitose passe par la phosphorylation activatrice de CDC25C.

◆ Pim-1

Pim-1 est une sérine/thréonine kinase dont la surexpression a été constatée dans différentes tumeurs. CDC25A interagit avec Pim-1 et est phosphorylée par la kinase ce qui, *in vitro*, augmente son l'activité phosphatase. De plus, la surexpression des deux protéines dans des cellules Rat-1 induit de manière synergique la formation de colonies

en agar mou, caractéristique liée à la transformation cellulaire [274]. Il est intéressant de noter que Pim-1 phosphoryle également le CKI p21<sup>CIP1</sup> provoquant sa localisation au niveau cytoplasmique ce qui l'empêche d'agir sur les complexes CDK/cycline nucléaires [275]. Ainsi par son action sur CDC25A et p21<sup>CIP1</sup>, Pim-1 va favoriser la progression des cellules dans le cycle.

◆ Raf1

La kinase Raf1 est impliquée dans la signalisation cellulaire et joue un rôle clé dans la transmission des signaux générés par les facteurs de croissance (revues : [276-278]). Elle participe notamment au contrôle du cycle cellulaire. En effet, elle interagit directement avec les phosphatases CDC25A, CDC25B et CDC25C, et Raf1, CDC25A ou CDC25B et la protéine GTPase Ras (en amont de Raf1) co-localisent sous la membrane plasmique des cellules HeLa. Enfin, la phosphorylation de CDC25A par Raf1 augmente son activité catalytique [279]. En contrepartie, CDC25A déphosphoryle Raf1 créant un rétrocontrôle négatif [197]. Cette interaction entre Raf1 et CDC25A est favorisée par la présence d'un troisième partenaire, les protéines 14-3-3 qui se lient à la fois à Raf1 [280] et à la phosphatase [281]. Ainsi, par son action sur les CDC25, Raf1 serait un des liens existant entre signalisation et contrôle du cycle cellulaire. Chez le xénope, il existe également une interaction entre Raf et CDC25 puisque la phosphorylation de CDC25 par Raf contribuerait à l'activation des complexes CDK1/cycline B lors de la maturation ovocytaire induite par une stimulation à la progestérone [282].

◆ PKN

Contrairement aux précédentes kinases, PKN a un effet négatif sur l'activité catalytique de CDC25C. Sérine/thréonine kinase présentant de nombreuses homologies avec les protéines kinases de la famille de PKC, PKN inhibe la transition G2/M lorsqu'elle est micro-injectée dans des embryons de xénope. Cette inhibition est liée à la phosphorylation de CDC25C, ce qui diminue son activité phosphatase *in vitro* [283]. Le peu de choses connues sur cette kinase et sur sa régulation laissent penser que cette phosphorylation inhibitrice de CDC25C par PKN pourrait intervenir lors de stress comme les chocs thermiques où une relocalisation de PKN au niveau nucléaire est observée [284].



## ◆ Eg3

La protéine Eg3 est une sérine/thréonine kinase qui appartient à la famille KIN1/PAR1/MARK [285] et dont l'activité est régulée au cours du cycle cellulaire. Eg3 a la particularité d'appartenir à la même famille que c-TAK1 (§ II-4-C), une autre kinase de CDC25, ce qui laisse entendre qu'elles pourraient avoir des homologies de fonction. *In vitro*, Eg3 phosphoryle CDC25B sur le site de liaison aux protéines 14-3-3, mais cette phosphorylation n'a aucun effet sur la liaison à ces protéines. Par contre, des expériences de co-expression des deux protéines montrent qu'Eg3 a un effet négatif sur l'entrée en mitose et que cet effet est antagonisé par CDC25B [286]. Donc Eg3 pourrait être un inhibiteur de CDC25B. Cependant, les rôles d'Eg3 et de la phosphorylation de CDC25B par cette kinase restent encore à déterminer.

**(C) RÉGULATION DE LEUR LOCALISATION INTRACELLULAIRE.**

L'entrée en mitose est influencée par des changements régulés dans la localisation intracellulaire des phosphatases CDC25. Même si certains travaux le contredisent, il est admis maintenant que CDC25C est localisée dans le cytoplasme en interphase et qu'elle se relocalise au niveau nucléaire pendant la prophase [287-292]. En réalité, CDC25C réalise une navette continue entre le noyau et le cytoplasme et sa localisation apparente est la résultante d'un équilibre entre export et import nucléaire. Des études menées sur la phosphatase CDC25 de xénope ainsi que sur CDC25B et CDC25C humaines ont révélé qu'elles possèdent à la fois une séquence de localisation nucléaire ou NLS (« Nuclear Localization Sequence ») et une ou deux séquences d'export nucléaire ou NES (« Nuclear Export Sequence ») [290, 292-294]. Tout événement au cours du cycle cellulaire qui agira sur cet équilibre entre export et import nucléaire modifiera la localisation de la phosphatase.

**(i) Par liaison aux protéines 14-3-3.**

Les 14-3-3 sont une famille de protéines d'environ 30 kDa présentes chez tous les eucaryotes (revues : [295-298]). Elles ont la particularité de se fixer sur des sérines ou thréonines phosphorylées et contenues dans un consensus donné : R-S-X-Sp/Tp-X-P ou R-X-X-X-Sp/Tp-X-P où Sp et Tp correspondent aux résidus phosphorylés. Elles se lient ainsi à différentes protéines notamment à des régulateurs du cycle cellulaire comme CDC25 [281, 299], WEE1 [300] ou CDK1 [301].

Pour CDC25C, sa liaison aux protéines 14-3-3 est dépendante de sa phosphorylation sur un seul résidu : la sérine 216 [299, 302, 303]. Si cette sérine est mutée en alanine, il n'y a

plus formation du complexe CDC25C/14-3-3. En fait, la phosphorylation sur la sérine 216 de CDC25C induirait un changement de conformation qui est favorable à la liaison aux protéines 14-3-3 [304]. Des études par double hybride chez la levure *S. cerevisiae* ont démontré que CDC25B interagit aussi avec les protéines 14-3-3 [305]. La liaison CDC25C/14-3-3 est élevée en interphase puis diminue lors de la transition G2/M, mais si CDC25C est modifiée pour ne plus interagir avec les 14-3-3, la protéine mutée induit alors une entrée en mitose plus rapide que la protéine sauvage [303]. Ces deux résultats suggèrent que les protéines 14-3-3 sont des régulateurs négatifs de l'entrée en mitose et qu'elles agissent via CDC25.

Quelques travaux rapportent que les 14-3-3 ont un effet négatif sur l'activité des CDC25 [299, 303] notamment en inhibant sa liaison aux complexes CDK/cycline [304, 306], mais en général c'est une régulation de la localisation intracellulaire qui est décrite (Figure 17). En effet, que ce soit pour la protéine de xénope ou pour les formes humaines CDC25B et CDC25C, la perte du site de liaison aux 14-3-3 induit une augmentation de la localisation nucléaire de la phosphatase [290-292, 294]. Au contraire, la surexpression des 14-3-3 inhibe l'entrée dans le noyau de CDC25 lors de la transition G2/M [290]. Ainsi, la localisation cytoplasmique de CDC25 résulte de son export nucléaire via sa NES et de l'action des protéines 14-3-3. Donc seule une protéine CDC25 qui a perdu à la fois sa/ses NES et son site de liaison à 14-3-3 est à 100 % nucléaire [292, 294]. Le site 14-3-3 étant à proximité de la NLS de CDC25, il fut démontré chez le xénope, que la liaison des 14-3-3 à CDC25 inhibe son interaction avec les importines ce qui empêche son import et donc conduit à son accumulation cytoplasmique [290, 293, 303].

En plus d'inhiber son import nucléaire, la liaison des 14-3-3 à CDC25C va protéger la Ser216 de la déphosphorylation par PP2A ce qui permet de maintenir l'inhibition de CDC25C tant que la cellule n'est pas prête à rentrer en mitose [307]. Puis lors de l'entrée en phase M, le complexe CDC25/14-3-3 est rompu par un mécanisme encore incompris même si plusieurs hypothèses ont été avancées [296, 304]. Ainsi, la NLS est démasquée et permet une relocalisation nucléaire de CDC25 [290-292, 308].

(ii) **Phosphorylations qui contrôlent cette interaction.**

En interphase, la sérine 216 de CDC25C est le site majeur de phosphorylation de la protéine [309] et est phosphorylée *in vitro* par la kinase c-TAK1 (« Cdc Twenty five Associated Kinase ») ce qui permet la liaison de CDC25C aux protéines 14-3-3 (Figure 17) [302]. *In vivo*, la co-expression de cette kinase avec CDC25C augmente la phosphorylation

sur Ser216. c-TAK1 étant cytoplasmique, son action sur CDC25C favoriserait la séquestration de la phosphatase hors du noyau par liaison aux 14-3-3 pendant l'interphase [291, 302].

La perte du site d'interaction aux protéines 14-3-3 sur CDC25C induisant une altération des points de contrôle lors de dommages à l'ADN [299, 310], la phosphorylation de CDC25C par les kinases de checkpoint CHK1 et CHK2 a été étudiée et démontrée [299, 311-313]. Activées en réponse aux dommages subits par la cellule [314], elles phosphorylent CDC25C sur Ser216 ce qui conduit à sa liaison aux protéines 14-3-3 et à sa séquestration au niveau cytoplasmique et donc à un blocage des cellules en phase G2 (Figures 17 et 22) [315]. Une protéine CDC25 qui n'est plus phosphorylable par CHK1 et CHK2 ne permet plus l'arrêt en phase G2 en réponse aux dommages [313, 315] et elle n'est plus séquestrée dans le cytoplasme par les 14-3-3 [310, 316]. En plus de cette séquestration, certains auteurs décrivent une diminution de l'activité phosphatase de CDC25 après sa phosphorylation par CHK1/CHK2 en absence des protéines 14-3-3 [314, 315].

CDC25B serait également régulée au niveau de sa localisation par les 14-3-3 lors de dommages à l'ADN puisqu'un mutant de la sérine 323 (équivalente à la Ser216) qui est au niveau du site de liaison aux protéines 14-3-3 conduit à une altération de l'arrêt en phase G2 plus importante que la protéine sauvage [306]. Mais des travaux ont montré que CHK1 ne phosphoryle pas Ser323 et n'a pas d'effet sur la liaison entre CDC25B et 14-3-3 [305], ce qui indique un mécanisme de régulation de cette interaction différent de celui de CDC25C. La kinase p38 appartient aux voies de signalisation des MAPK (« Mitogen Activated Protein Kinase ») et est activée lors de stress comme les radiations UV (revues : [317, 318]) où elle participe au blocage en phase G2 des cellules. p38 phosphoryle CDC25B et CDC25C respectivement sur les Ser323 et Ser375 et sur la Ser216. Si la phosphorylation par p38 de CDC25C augmente *in vitro* sa liaison aux protéines 14-3-3, cette régulation ne semble pas importante *in vivo* car l'inhibition de p38 n'affecte pas le taux de protéines 14-3-3 associées à CDC25C. Par contre, pour CDC25B, l'activité p38 est requise pour l'interaction entre la phosphatase et 14-3-3 lors de radiations UV et une forme non phosphorylable de CDC25B sur Ser323 et/ou Ser375 inhibe le bloc G2/M induit par les UV [319]. Les auteurs montrent également que la sérine 323 est phosphorylée pendant l'interphase par une kinase autre que p38, pour maintenir la phosphatase dans un état inactif. Lors de l'entrée en mitose, cette phosphorylation diminue en parallèle à l'activation de CDC25B [319].

PKA est une sérine/thréonine kinase dont l'activité dépend d'un second messager, l'AMPc (Adénosine Mono-Phosphate Cyclique) et qui est capable d'agir sur la liaison CDC25/14-3-3. PKA est un régulateur négatif de la maturation méiotique des ovocytes de

xénope car elle phosphoryle CDC25 sur le site de liaison aux protéines 14-3-3 et conduit à sa séquestration dans le cytoplasme [320]. De plus, les auteurs indiquent que PKA participe à l'inhibition de CDC25 pendant l'interphase lors d'un cycle normal, puisque son inhibition provoque une entrée en mitose prématurée des cellules embryonnaires de xénope [320].

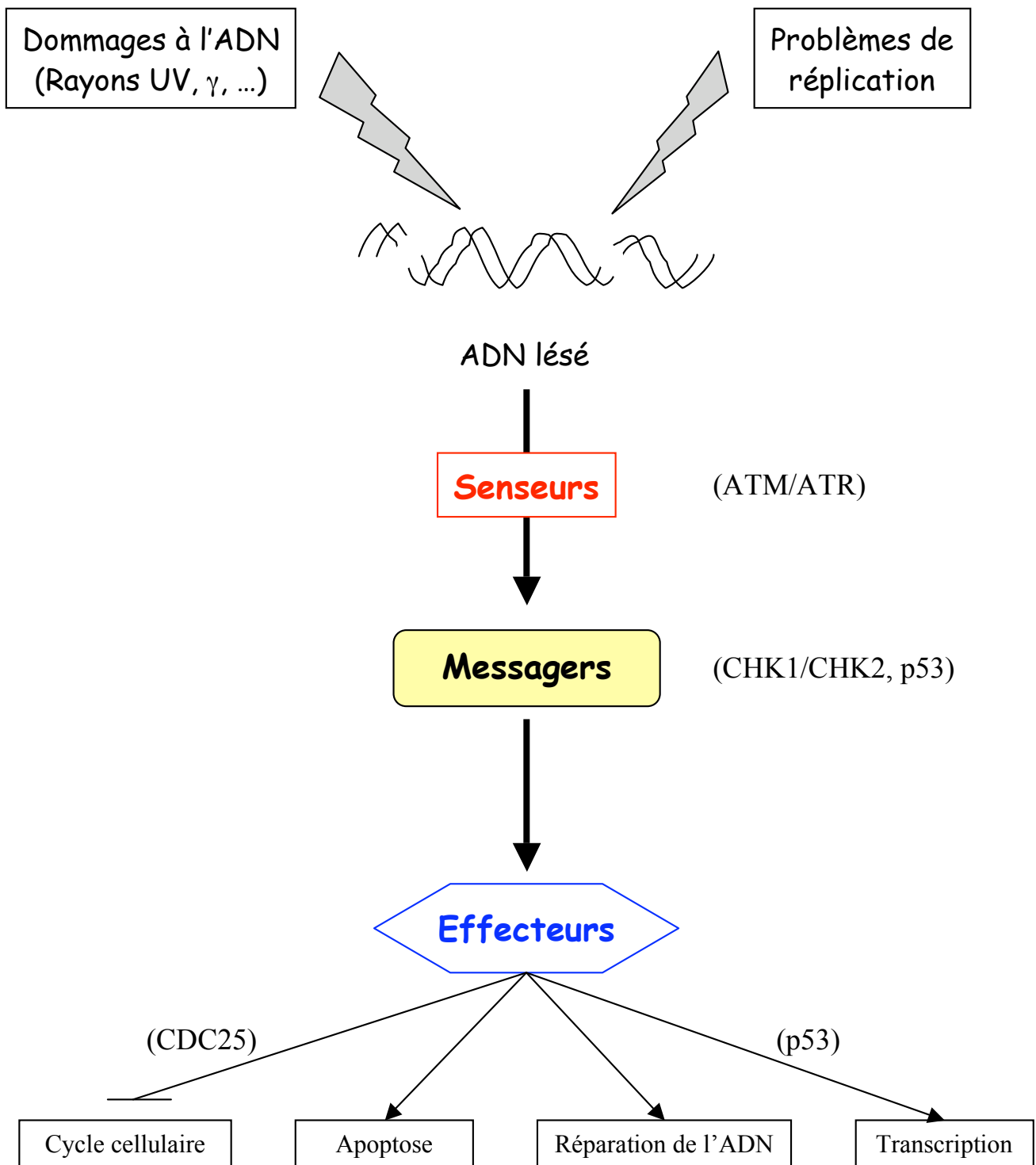
*(iii) Les complexes CDK/cycline.*

En plus de leurs rôles sur l'activité catalytique et la stabilité des CDC25, les complexes CDK/cycline participeraient également à la régulation de la localisation des phosphatases. Les travaux de Baldin et collègues révèlent que la phosphorylation du variant CDC25B1 par le complexe CDK1/cycline B sur la sérine 146 est importante pour l'activité d'inducteur de l'entrée en mitose de ce variant. Si cette phosphorylation n'a aucun effet sur l'activité catalytique de la phosphatase, elle est essentielle pour la rétention nucléaire de la protéine. L'activité d'inducteur de l'entrée en mitose de la protéine CDC25B1 serait donc dépendante de sa NLS qui va permettre sa localisation nucléaire, de sa phosphorylation sur la Ser146 par le complexe CDK1/cycline B qui permet sa rétention nucléaire [236] et d'un troisième événement qui reste à déterminer. Il est important de noter que c'est la première mise en évidence d'une régulation spécifique à un variant de CDC25B.

D'autre part, des travaux portant sur le contrôle de la localisation des phosphatases CDC25B et CDC25C lors de l'entrée en mitose ont montré que CDC25B avait besoin de la présence de la cycline B pour être cytoplasmique. Le modèle avancé par les auteurs était que la cycline B en interagissant avec CDC25B apportait la NES qui lui est nécessaire pour sa localisation cytoplasmique [182]. Mais une autre étude réalisée peu après a démontré que CDC25B possède sa propre NES qui est tout à fait fonctionnelle et donc que la cycline B n'est absolument pas requise pour l'export nucléaire de la phosphatase [294].

*5/ Intégration de ces régulations : les mécanismes de surveillance.*

Nous venons donc de voir que la régulation des phosphatases CDC25 correspond à un schéma complexe qui fait intervenir des phosphorylations et des déphosphorylations ainsi que des interactions avec des partenaires. L'ensemble de ces modifications va moduler soit son activité catalytique soit sa localisation intracellulaire. Un certain nombre de ces régulations sont reprises et adaptées pour arrêter le cycle cellulaire lorsque des dommages à l'ADN sont détectés par les points de contrôle.



**FIGURE 19 :** Voie générale de la signalisation des points de contrôle.

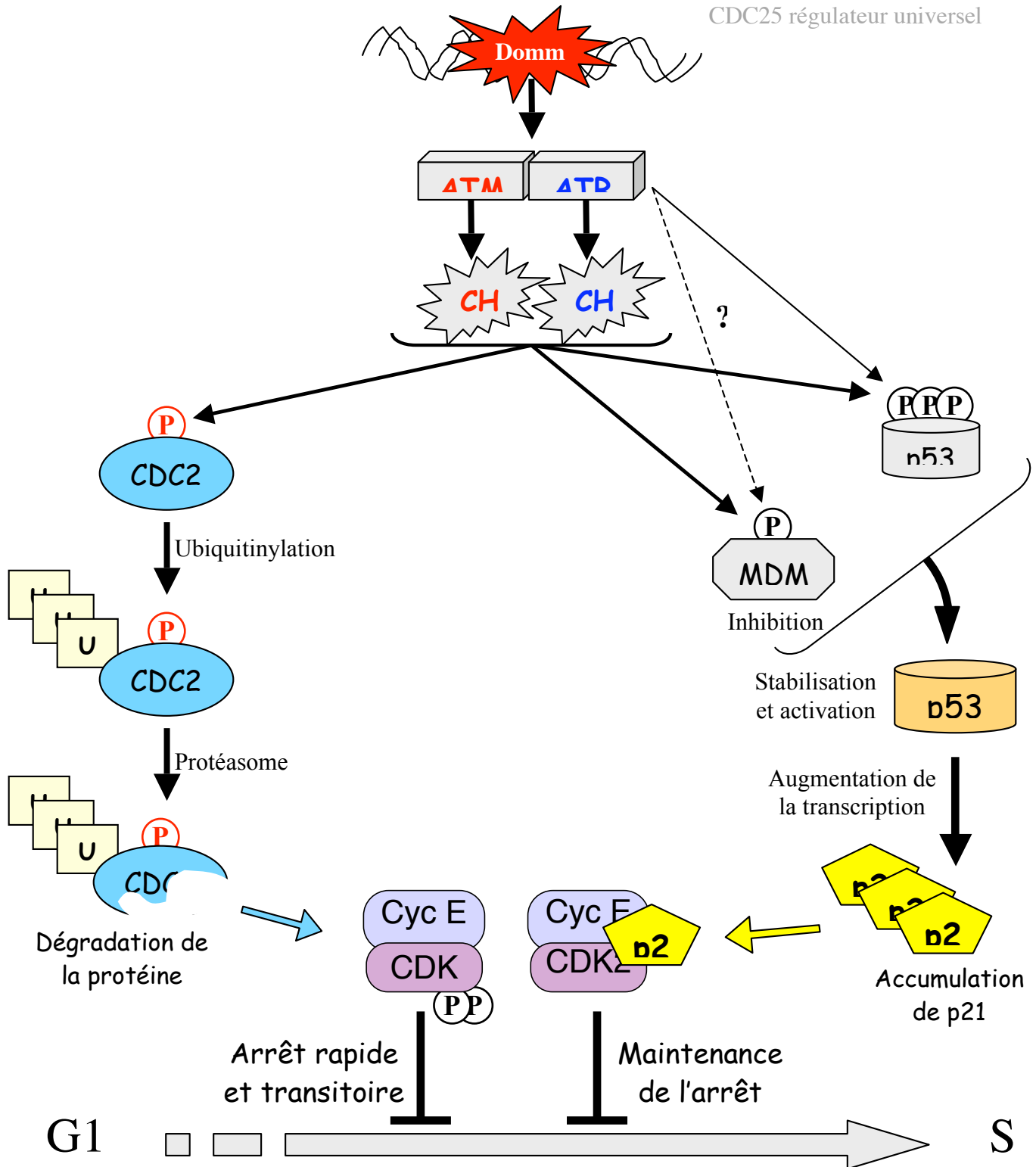
Lorsque l'ADN est lésé (dommages ou problèmes de réplication), les dommages sont détectés par des protéines senseurs qui vont ensuite activer la réponse cellulaire adéquate (arrêt de prolifération, réparation des dommages, mort cellulaire si les dommages sont trop importants et non réparables) par l'intermédiaire de protéines messagères et effectrices.

Dans le cas d'endommagements de l'ADN, les cellules s'arrêtent en deux points caractéristiques du cycle : aux transitions G1/S et G2/M. Les protéines kinases de la famille ATM/ATR jouent un rôle prépondérant dans les deux cas. Elles agissent dès la détection des dommages et font partie des protéines senseurs (Figure 19). Elles activent ensuite différentes protéines dont les kinases CHK1 et CHK2 [321, 322]. Ces kinases sont des messagères (Figure 19) qui, en régulant différents effecteurs du contrôle du cycle cellulaire, vont conduire à l'arrêt des cellules. Une autre cible des protéines ATM/ATR est le facteur de transcription à activité suppresseur de tumeurs p53, dont la régulation par les deux kinases va moduler l'expression de gènes impliqués dans la progression ou l'arrêt des cellules. Les phosphatases CDC25, elles, sont des cibles effectrices de l'arrêt vu leur implication dans le contrôle des complexes CDK/cyclines (revues : [323-328]).

### (A) ARRÊT A LA TRANSITION G1/S.

Suite à l'exposition des cellules aux rayons UV ou  $\gamma$ , CDC25A est ubiquitinylée et dégradée par le protéasome (Figure 20) [226, 227] ce qui conduit au maintien de la phosphorylation inhibitrice sur la Tyr15 de CDK2 et donc empêche les cellules de rentrer en phase S. L'ubiquitylation de CDC25A est médiée par sa phosphorylation par les kinases CHK1 et/ou CHK2 suivant le type de dommages subits [226, 227] et est dépendante des kinases ATM et ATR [226, 227, 314, 329]. Si la dégradation de CDC25A est inhibée, le blocage des cellules n'est plus assuré correctement et la survie cellulaire est altérée [226]. Donc la voie ATM/ATR - CHK1/CHK2 - CDC25A - CDK2 permet d'initier un arrêt rapide des cellules en phase G1 [325].

En parallèle à cette cascade très rapide, une deuxième se met en place pour assurer un blocage plus durable des cellules en phase G1, blocage qui peut conduire à la mort cellulaire si les dommages subits sont trop importants (Figure 20). Normalement très instable, la protéine p53 est alors stabilisée et son activité de facteur de transcription est activée par des événements de phosphorylation liés aux kinases ATM/ATR et CHK1/CHK2 (revue : [330]). Elle va ainsi permettre la transcription du CKI p21<sup>CIP1</sup> qui va s'accumuler, inhiber les complexes CDK/cycline et assurer un blocage total des cellules en phase G1. Cette réponse permet donc la maintenance du blocage initié par la voie dépendante de CDC25A [325].



**FIGURE 20** : CDC25A et le point de contrôle à la transition G1/S.

(D'après Bartek et Lukas, Current Opinion in Cell Biology, 2001)

Lorsque l'ADN est lésé, deux réponses parallèles se mettent en place, toutes les deux dépendantes de l'activation des kinases CHK1/2 par ATM/ATR. Pour la première voie, l'étape-clé est la phosphorylation de CDC25A par CHK1/2 ce qui induit son ubiquitinylation (Ub) et sa destruction rapide par le protéasome. L'absence d'activité CDC25A maintient CDK2 sous sa forme inactive phosphorylée sur Thr14 et Tyr15.

Mais une fois initié, l'arrêt à la transition G1/S doit être maintenu tant que les dommages ne sont pas réparés par une voie plus tardive qui requiert la phosphorylation de p53 et de son ubiquitine-ligase MDM2 par les kinases ATM/ATR et CHK1/2, ce qui stabilise p53 et permet son accumulation au niveau nucléaire. Elle va alors activer la transcription de plusieurs gènes dont celui du CKI p21<sup>CIP1</sup> qui va à son tour s'accumuler et inhiber les complexes CDK/cycline présents.

Il est intéressant de noter que lors de problèmes pendant la réplication, un ralentissement de la phase S est observé. Il est lié à l'activation de la voie ATM-CHK2-CDC25A-CDK2 comme lors du point de contrôle en phase G1. Par contre la voie ATM/ATR-p53-p21 n'est pas impliquée [325].

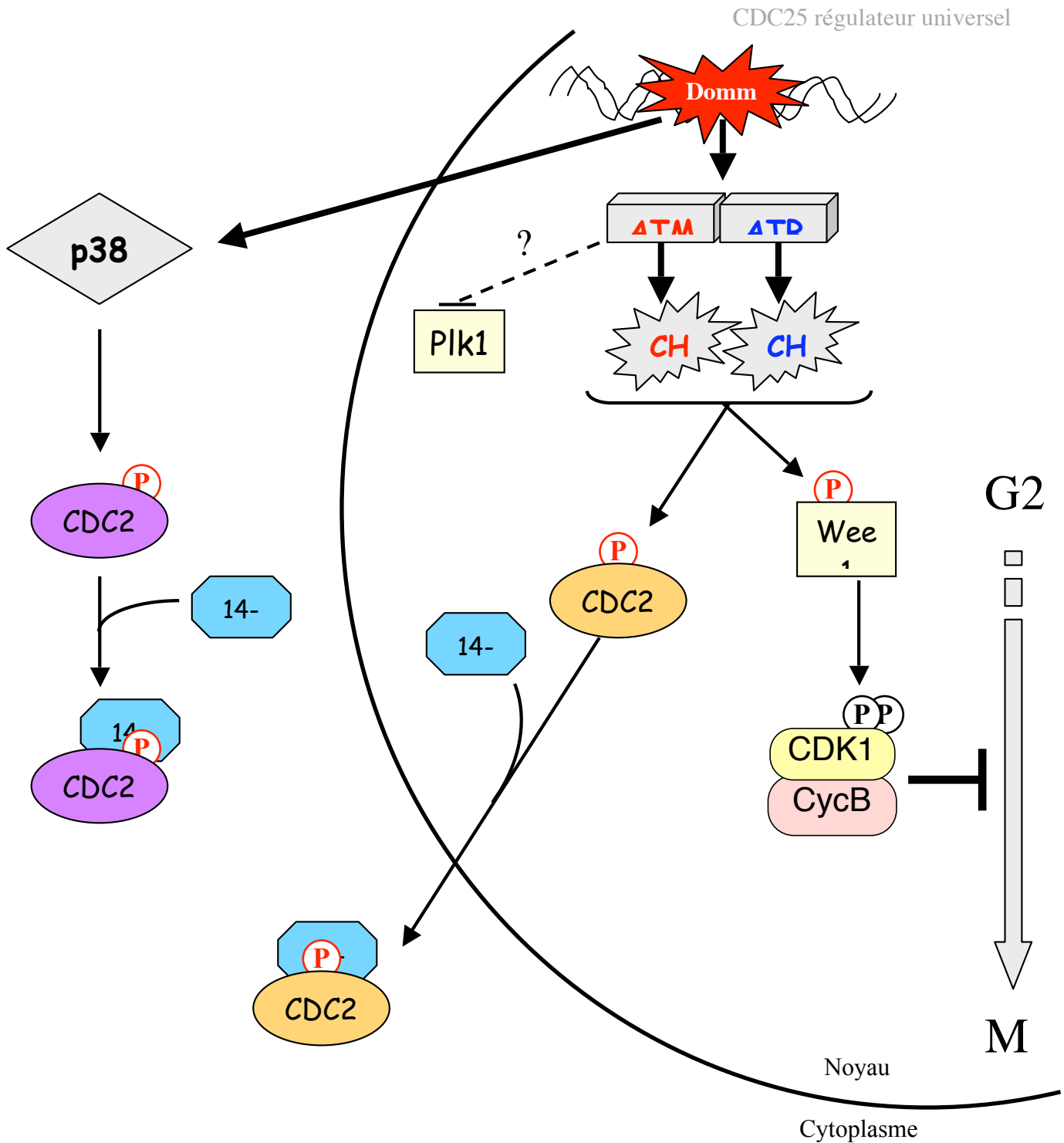
### **(B) ARRÊT À LA TRANSITION G2/M.**

Lors de dommages à l'ADN induits par des rayonnements UV ou par des radiations ionisantes, un arrêt des cellules en phase G2 est également observé. Cet arrêt est caractérisé par l'inactivation du complexe CDK1/cycline B avec maintien de sa phosphorylation sur les résidus Tyr15 et Thr14 [191, 299, 303, 312, 331-334].

Comme dans le cas du blocage des cellules en phase G1, la cascade ATM/ATR-CHK1/CHK2 est mise en jeu et va inhiber CDK1 notamment en phosphorylant la kinase WEE1 (Figure 21) [335]. Démontrée *in vivo* chez la levure *S. pombe*, *in vitro* cette phosphorylation par CHK1 est incapable d'augmenter l'activité kinase de WEE1 [336, 337], ce qui suggère que CHK1 agit sur d'autres substrats dont CDC25C. Comme nous l'avons vu précédemment (§ II-4-C), CDC25C est phosphorylée par CHK1 sur la sérine 216 [312] ce qui crée un site de liaison aux protéines 14-3-3 [299, 312] et provoque sa séquestration dans le cytoplasme (Figure 21) [299, 303, 311]. Enfin, une étude a montré que la transcription de CDC25C est altérée lors de l'arrêt en phase G2, baisse liée à l'inhibition du facteur de transcription NF- $\kappa$ B par une voie dépendante de p53 [338].

Concernant CDC25B, une autre phosphatase impliquée dans la transition G2/M, elle aussi est une cible des points de contrôle. Mais les mécanismes sont différents puisque la phosphorylation par CHK1 de son site de liaison aux protéines 14-3-3 n'est pas requise pour l'interaction de CDC25B avec ces protéines [305]. Par contre la phosphorylation de ce site par p38 est importante pour la réponse correcte des cellules au point de contrôle à la transition G2/M lors de dommages à l'ADN induits par les rayons UV (Figure 21) [319]. Ainsi l'activation parallèle des kinases CHK et p38 permet l'inhibition des deux phosphatases CDC25B et CDC25C et donc l'arrêt du cycle cellulaire à la transition G2/M [324]. CDC25A participerait également à ce blocage puisque, si elle n'est pas dégradée, le blocage en phase G2 des cellules, suite aux dommages à l'ADN, est partiellement levé [178].





**FIGURE 21** : Régulation spatiale des CDC25 au point de contrôle G2/M.

(D'après Lyon et collègues, Nature Reviews in Drug Discovery, 2002,

et Bulavin et collègues, Current Opinion in Genetics and Development, 2002)

Lors de dommages à l'ADN, CDC25B et CDC25C sont phosphorylées sur des sérines par respectivement les kinases p38 et CHK, ce qui crée un site de liaison pour les protéines 14-3-3. Cette interaction induit la rétention cytoplasmique des deux phosphatases. Le complexe CDK1/cycline B est alors maintenu inactif par la présence des phosphorylations inhibitrices sur CDK1. Parmi les autres cibles des points de contrôle qui sont importantes pour la régulation des phosphatases CDC25 ou des CDK/cycline, sont représentées la kinase Plk1, un activateur de CDC25C, qui est inhibé lors d'un arrêt à la transition G2/M par une voie dépendante d'ATM/ATR, et la kinase Wee1, un inhibiteur de CDK1 qui lui serait au contraire activé après sa phosphorylation par CHK1/2. L'ensemble de ces régulation permet de maintenir le complexe CDK1/cycline B inactif et d'empêcher l'entrée en mitose des cellules tant que les dommages subits ne sont pas réparés.

D'autres régulateurs de cette phase du cycle cellulaire participent à ce checkpoint G2/M. Ainsi, la kinase Plk1 est inhibée par une voie dépendante des kinases ATM/ATR, mais les intermédiaires entre ces kinases et Plk1 ne sont pas encore connus (Figure 21) [339, 340]. Cette inhibition de Plk1 pourrait participer à l'inhibition de CDC25C à la transition G2/M lors de dommages à l'ADN. D'autre part, chez la levure *S. pombe*, la délétion de la kinase Mik1 qui inhibe CDK1 ne permet pas de maintenir l'arrêt du cycle cellulaire en phase G2 [341]. Il existe également une régulation au niveau ARN de la cycline B par les dommages à l'ADN puisqu'une augmentation de l'instabilité de son ARN messager est observée dans le cas de radiations ionisantes [342], ainsi qu'une inhibition de sa transcription [338]. De plus, la protéine est séquestrée au niveau cytoplasmique par la protéine 14-3-3 $\sigma$  [301, 343], ce qui est important pour le blocage des cellules à la transition G2/M [344, 345]. D'autre part, l'expression de 14-3-3 $\sigma$  est augmentée lors des points de contrôle par une voie dépendante de p53 et est requise pour le bon déroulement de l'arrêt en phase G2 [346, 347]. p53 régule aussi l'expression du CKI p21<sup>CIP1</sup> qui est également important pour permettre un blocage maintenu en phase G2 puisque des cellules déficientes pour p21<sup>CIP1</sup> ne sont plus capables de rester bloquées à la transition G2/M suite à des radiations  $\gamma$  [348]. Un travail par invalidation de gènes montre que les deux voies 14-3-3 $\sigma$  et p21<sup>CIP1</sup> coopèrent pour assurer un point de contrôle correct en phase G2 [349].

### **III) CDC25 ET...**

#### *1/ ...le développement.*

Le fait qu'il existe trois CDC25 différentes chez tous les mammifères pose bien sûr le problème de leur implication et de leur régulation au cours du développement.

Chez la souris, le profil d'expression des ARN messagers des différentes CDC25 a été étudié au niveau des organes des animaux adultes ou bien au cours de l'embryogenèse. L'ensemble des données est résumé dans la Figure 22. Il est important de souligner que CDC25B et CDC25A ont, au cours du développement, des profils d'expression très différents. Ainsi, l'ARN messenger de *cdc25B* est déjà présent dans l'ovocyte et pendant les stades très précoces du développement alors que celui de *cdc25A* apparaît plus tard lorsqu'une véritable phase G1 se met en place entre chaque division embryonnaire. Par contre, CDC25A a un profil d'expression qui est beaucoup plus large et semble donc impliquée dans le contrôle de la croissance d'un plus grand nombre d'organes [350]. Par contre, s'il est connu, le profil d'expression de *cdc25C* n'est pas publié.

Chez *D. melanogaster*, deux gènes *cdc25* ont été identifiés : *String* et *Twine*. La protéine Twine est impliquée dans le contrôle de la méiose et est essentielle pour l'ovogenèse [351-354]. La protéine String, elle, est essentielle pour l'entrée en mitose et le développement puisque sa délétion provoque un arrêt des cellules embryonnaires en phase G2 alors que sa surexpression provoque une entrée prématurée des cellules en phase M [152, 355-357]. *String* est régulée au niveau transcriptionnel [358-360] par la présence de différentes séquences au niveau de son promoteur, séquences appelées PSE pour « Position-Specific Element » [361] et son ARN messenger s'accumule avant chaque entrée en mitose [362]. Mais il existe également des régulations post-traductionnelles qui contrôlent le niveau intracellulaire de String, puisqu'il a été démontré qu'au cours de la gastrulation, la protéine String est dégradée dans un domaine ventral pour retarder l'entrée en mitose des cellules de ce domaine [363]. Cette dégradation est liée à la présence d'une protéine appelée Tribbles [364, 365], mais le mécanisme qui relie Tribbles à String n'est pas encore connu (revue : [366]).

	1	2	4	8	16C	Morula	Blastocyte	Post-implantation	Adulte
<b>A</b>			Pas				+	Tous les organes Peu de	Testicules Ovaires Reins Foie Cœur Muscles
<b>B</b>	+	+	+	+	+	+	Maxi	Foie Tissu neuro-	Rate Poumons Cœur Cerveau Intestin Muscles
<b>C</b>							?		Rate Thymus

Références : -Kakizuka et collègues (Genes and Development, 1992)  
 -Wu et collègues (Developmental Biology, 1995)  
 -Wickramasinghe et collègues (Development, 1995)  
 - Paskind et collègues (Mammalian Genome, 2000)

**FIGURE 22** : Les CDC25 au cours du développement chez la souris.

L'expression des ARN messager de chaque isoforme a été étudiée par hybridation *in situ*, soit sur les embryons entiers soit sur différents tissus de souris adultes.

1C à 16C : nombre de cellules qui constituent l'embryon

En parallèle à ces travaux sur la régulation des CDC25 pendant le développement, des études génétiques menées chez *C. elegans* ont permis de confirmer l'implication des phosphatases CDC25 dans le contrôle de la prolifération pendant l'embryogenèse. Ce petit nématode possède quatre gènes codant pour des protéines CDC25 [367]. Des expériences d'interférence aux ARN (RNAi) qui inhibent l'expression de l'isoforme CDC25.1 conduisent à une mort embryonnaire avec des défauts de méiose et de mitose pendant les stades précoces de l'embryogenèse [368, 369]. Enfin, une étude menée avec un mutant de CDC25.1 (un allèle gain de fonction) démontre la capacité de la phosphatase à induire une hyperplasie puisque cette protéine mutante a la particularité d'augmenter le nombre de cellules au niveau de l'intestin (au moins 36 cellules versus 20 pour un nématode sauvage) [370]. Ainsi toute modification dans le patron d'expression ou de régulation de CDC25 peut conduire à une altération du contrôle de la prolifération des cellules et cela dès l'embryogenèse.

## 2/ ...et l'oncogenèse.

La plupart des processus néoplasiques résultent d'altérations dans le contrôle du cycle cellulaire, altérations qui conduisent à la transformation oncogénique des cellules. Classiquement, l'augmentation de la multiplication cellulaire est liée soit à la perte d'un gène codant pour une protéine suppresseur de tumeurs (comme p53 ou pRb), protéines qui ont normalement des propriétés antiprolifératives ou qui contrôlent le bon déroulement du cycle cellulaire, soit à l'amplification ou à la mutation d'un proto-oncogène qui promeut la prolifération cellulaire. Les CDK et leurs régulateurs dont les protéines CDC25 font partie de cette deuxième catégorie et sont impliqués dans de nombreux cancers (revue : [371]).

Les phosphatases CDC25 sont des activateurs de la prolifération cellulaire et donc peuvent agir comme promoteurs de la transformation maligne. En effet, différents travaux rapportent que CDC25A et CDC25B mais pas CDC25C présentent des propriétés oncogéniques. Elles sont notamment capables d'induire la transformation de fibroblastes embryonnaires de souris en coopération avec une forme oncogénique de la protéine Ras (Ha-Ras<sup>G12V</sup>) ou avec la perte du suppresseur de tumeurs pRb [279]. De plus, les travaux sur *C. elegans* confirment la capacité de CDC25 à induire une hyperplasie cellulaire (§ III-1) [370].

L'étude de tumeurs humaines révèle que CDC25A et CDC25B sont surexprimées dans de nombreux cas et dans de nombreux types de cancers différents, comme ceux du sein, du colon ou de l'estomac (Figure 23). Par contre une surexpression de CDC25C n'a été détectée

Type de tumeurs (Références)	<b>CDC25A</b>	<b>CDC25B</b>	<b>CDC25C</b>
<b>Cancers du sein</b> (Galaktionov, Sciences 1995)		Surexpression dans 32% des cas, mauvais pronostic	
<b>Cancers du sein</b> (Cangi, J Clin Invest, 2000)	Si surexprimée, le risque de mortalité est x 5		
<b>Cancers ovariens</b> (Broggini, Anticancer Res, 2000)	Expression dans 100% des cas, mauvais pronostic	Expression dans 100% des cas, mauvais pronostic	Expression dans 20% des cas
<b>Cancers de la prostate</b> (Ngan, Oncogene, 2003)		Surexpression dans 97% des cas, corrélée avec le grade de la tumeur	
<b>Carcinomes Tête/Cou</b> (Gasparotto, Cancer Res, 1997)	Surexpression dans 80% des cas	Surexpression dans 50% des cas	
<b>Lymphomes non Hodgkiniens</b> (Hernandez, Cancer Res, 1998)		Surexpression dans 56% des cas Corrélée à la surexpression de c-Myc dans les tumeurs agressives	
<b>Lymphomes non Hodgkiniens</b> (Hernandez, Int J Cancer, 2000)	Surexpression dans 35% des cas	Surexpression de CDC25B2 dans 32% des cas, corrélée à l'agressivité	
<b>Cancer du Colon</b> (Dixon, Exp Cell Res, 1998)	Augmentation de l'activité CDC25A dans 52% des cas		
<b>Cancers colo-rectaux</b> (Takemasa, Cancer Res, 2000)	Surexpression dans 47% des cas	Surexpression dans 43% des cas, le risque de mortalité est x 3,7	
<b>Cancers colo-rectaux</b> (Hernandez, Lab Invest, 2001)	Surexpression dans 51% des cas et 12% des tumeurs tardives	Surexpression dans 56% des cas, la surexpression de CDC25B2 (79%) est associée au grade de la tumeur	Surexpression dans 26% des cas
<b>Cancers gastriques</b> (Kudo, Jpn J Cancer Res, 1997)	Surexpression dans 38% des cas	Surexpression dans 70% des cas et corrélée avec le risque de métastases	
<b>Carcinomes des cellules muqueuses de l'oesophage</b> (Miayata, Clin Cancer Res, 2000)		Surexpression dans 46% des cancers radio-sensibles contre 6% dans les radio-résistants	
<b>Carcinomes des cellules muqueuses de l'oesophage</b> (Miayata, Cancer Res, 2001)		Surexpression = avantage thérapeutique, augmentation de l'apoptose après radiations	

<b>Carcinomes des cellules muqueuses de l'oesophage</b> (Hu, Clin Cancer Res, 2001)		Surexpression dans 79% des cas	
<b>Carcinomes des cellules muqueuses de l'oesophage</b> (Nishioka, British J Cancer, 2001)	Localisation cytoplasmique dans 46% des cas, nucléaire dans 51%, diminution de la survie	Localisation cytoplasmique dans 48% des cas	
<b>Cancers du poumon</b> (Wu, Cancer Res, 1998)	Surexpression dans 60% des cas	Surexpression dans 45% des cas	
<b>Cancers du poumon</b> (Sasaki, Cancer L, 2001)		Surexpression dans 70% des cas, diminution de la survie	
<b>Neuroblastomes</b> (Sato, Jpn J Clin Oncol, 2001)		Surexpression corrélée avec celle de N-Myc	
<b>Carcinomes thyroïdiens</b> (Ito, British J Cancer, 2002)	Surexpression dans 69% des cas	Surexpression dans 61% des cas	

que dans des cancers de l'ovaire [372] et des cancers colo-rectaux [373]. Dans un certain nombre de cas, la surexpression de CDC25A ou de CDC25B est corrélée à une diminution de la survie des patients comme cela a été décrit pour les carcinomes du sein où la surexpression de CDC25A multiplie par 5 le risque de mortalité [374], ou bien pour les cancers colorectaux où la présence de CDC25B augmente de 3,7 fois la mortalité [375]. Par contre, dans le cas de cancers de l'oesophage, la présence de CDC25B est un avantage thérapeutique puisqu'elle sensibilise les cellules cancéreuses aux radiations ce qui se traduit par une augmentation de la mortalité cellulaire par apoptose au niveau de la tumeur [376, 377]. Mais pour chacun des cancers analysés, jamais de réarrangement ou d'amplification géniques n'ont été détectés. Enfin il est important de souligner que lorsque les différents variants de CDC25B sont étudiés au sein des tumeurs, le variant CDC25B2 est retrouvé associé aux tumeurs les plus agressives [373, 378].

Il existe plusieurs hypothèses pour expliquer le potentiel oncogénique des phosphatases CDC25A et CDC25B. Concernant CDC25A, sa surexpression est un avantage prolifératif certain puisqu'elle contrôle l'entrée en phase S en activant le complexe CDK2/cycline E, mais également via son interaction avec la protéine Raf1 (§ II-4-B) [197, 279, 379]. La surexpression de CDC25A va alors accélérer la progression des cellules dans le cycle, mais également les protéger de la régulation imposée par la voie des MAPK. CDC25A peut également contribuer à la transformation cellulaire en inhibant des facteurs pro-apoptotiques induits par certains stress, comme ASK1 (§ II-2) [196]. Enfin, parce qu'elle est au centre du point de contrôle en G1/S lors de dommages à l'ADN, sa surexpression va contrecarrer sa dégradation induite par les kinases CHK1 et CHK2 et inhiber le blocage des cellules à la transition G1/S. Cette entrée des cellules en phase S sans avoir réparé les dommages subits, va favoriser l'apparition de mutations. Celles qui conféreront un avantage prolifératif vont conduire à une multiplication cellulaire anarchique et à une transformation tumorale [226, 227].

CDC25B apporte aussi un avantage de croissance vu son implication dans le contrôle de la transition G2/M. Elle est également un co-activateur des récepteurs aux stéroïdes dans la glande mammaire [198] et au niveau de la prostate [199]. Sa surexpression peut donc promouvoir une prolifération cellulaire en permettant une trans-activation inappropriée des récepteurs hormonaux. Si sa surexpression dans la glande mammaire de souris transgéniques n'induit pas l'apparition spontanée de tumeurs mais une hyperplasie des cellules de la glande [380], elle augmente la susceptibilité des cellules à l'action d'un carcinogène, le DMBA (9,10-diméthyl-1,2-benzanthracène) [381]. Elle ne serait donc pas impliquée dans le



dérèglement initial du cycle cellulaire, mais confèrerait un avantage certain aux cellules qui sortent d'un cycle normal et favoriserait leur transformation tumorale. Le fait qu'elle soit une cible des points de contrôle en phase G2, notamment via la protéine p38, est également un avantage pour les cellules qui la surexpriment car ainsi elle force l'entrée en mitose malgré la présence de dommages et contribue à l'instabilité génomique caractéristique des cellules tumorales.

Le lien entre CDC25 et cancer et leur implication dans le contrôle de la prolifération cellulaire font de ces protéines des cibles attractives pour la recherche de molécules inhibitrices qui seraient ensuite utilisables pour le traitement des pathologies. De nombreux groupes de recherche se sont attelés à ce travail et essayent de générer des molécules spécifiques et sélectives en espérant qu'elles pourront être utilisées *in vivo* ultérieurement. Les différentes voies de synthèse et de recherche de ces molécules sont résumées dans la revue de Lyon et collègues [382]. Elles sont basées sur des molécules naturelles, comme les benzoquinones, ou sur leurs dérivés, comme les analogues de la vitamine K, ou bien sur des molécules entièrement synthétiques et dessinées d'après les études de relations structure/fonction réalisées avec les autres molécules. Mais pour le moment aucune molécule n'a dépassé le stade de l'expérimentation animale.

## **IV) BUT DE NOTRE ÉTUDE.**

Lorsque j'ai commencé à travailler sur CDC25B, la plupart des données sur les phosphatases CDC25 humaines concernaient CDC25A et CDC25C. Leurs points d'exécution et leurs cibles étaient connus et des régulations de plus en plus nombreuses étaient rapportées. Par contre, concernant CDC25B, son point d'exécution était (et est toujours) controversé et peu ou pas de régulations lui étaient connues. De plus, l'existence d'au moins trois variants d'épissage de cette phosphatase amenait de nombreuses questions. La principale est : est-ce que ces trois variants présentent des différences dans la régulation de leur stabilité, de leur localisation intracellulaire ou de leur activité catalytique ? Ces différents phénomènes pouvant être liés à des événements de phosphorylation et/ou à des interactions avec des partenaires, le laboratoire s'était orienté dans la recherche de partenaires et de régulateurs de CDC25B en espérant identifier des régulations différentes entre les trois variants de la phosphatase. Un des projets concernait la recherche de kinases capables de phosphoryler CDC25B, et l'étude des impacts de ces phosphorylations sur la localisation, l'activité catalytique ou la stabilité de la phosphatase. Il permit l'identification de la kinase Eg3, un antagoniste de CDC25B [286], d'une phosphorylation spécifique au variant CDC25B1 par le complexe CDK1/cycline B [236], ainsi que de deux kinases qui m'intéressent plus particulièrement, CK2 (un régulateur de l'activité catalytique) et AKT/PKB (un régulateur de la localisation). Associés à la caractérisation des séquences de localisation de la phosphatase [294] et à l'identification de partenaires additionnels (14-3-3, récepteurs aux stéroïdes, p38...) [198, 199, 305, 306, 319], ces différents travaux nous permettent d'avoir maintenant une vue plus exhaustive de la régulation des CDC25B et de leurs rôles au cours du cycle cellulaire même s'il subsiste encore de nombreuses zones d'ombre.

# *Résultats*

**1<sup>re</sup> partie** : Régulation de l'activité phosphatase de CDC25B par la protéine kinase CK2

**2<sup>e</sup> partie** : Régulation de la localisation intracellulaire de CDC25B par AKT/PKB

## I) RÉGULATION DE L'ACTIVITÉ PHOSPHATASE DE CDC25B PAR CK2.

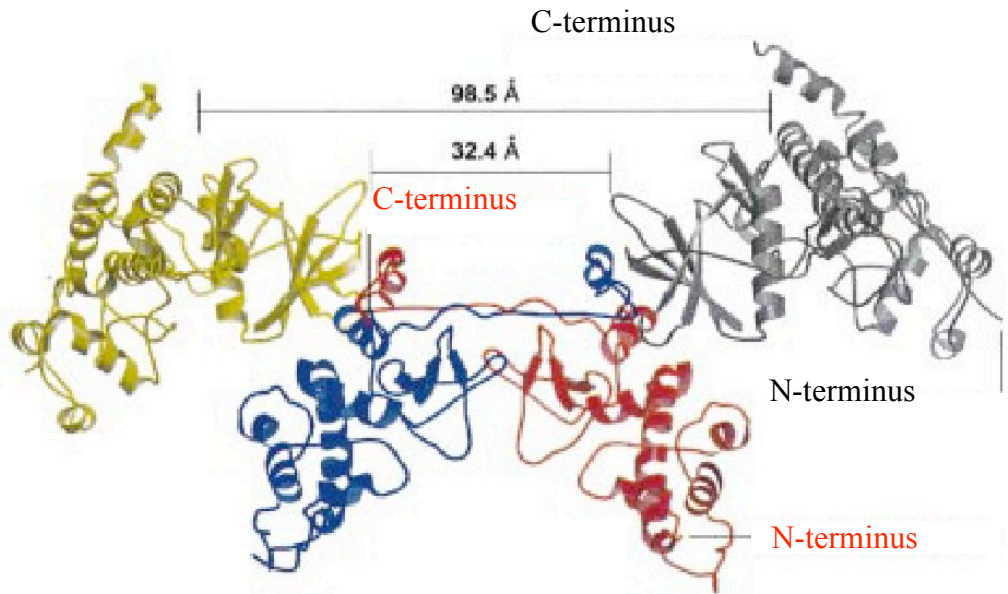
### *1/ Introduction : présentation de CK2.*

#### (A) CK2, UNE SÉRINE/THRÉONINE KINASE.

La protéine kinase CK2 est une sérine/thréonine kinase essentielle, ubiquitaire et fortement conservée chez les eucaryotes [383]. Son nom dérive de « casein kinase 2 » puisque sa découverte en 1954 par Burnett et Kennedy [384] était basée sur sa capacité à phosphoryler la caséine *in vitro* - bien que cette phosphorylation n'ait aucune réalité physiologique [385] - et le chiffre 2 indique que l'enzyme est éluée d'une colonne de chromatographie en DEAE-cellulose après une autre caséine kinase : CK1 [386]. Depuis sa découverte, plus de 300 substrats ont été caractérisés *in vitro* ou *in vivo* et sont listés dans la revue suivante [387]. Cependant, malgré les nombreuses études réalisées, CK2 reste peu comprise : sa régulation demeure obscure et elle semble avoir de nombreux rôles notamment dans la transmission du signal, l'expression génique ou le contrôle de la prolifération [386, 387].

CK2 est un hétéro-tétramère de 130 kDa constitué de deux sous-unités catalytiques,  $\alpha$  ou  $\alpha'$  (de 42-44 et 38 kDa respectivement), et de deux sous-unités régulatrices  $\beta$  (environ 26 kDa) qui peuvent former une enzyme tétramérique  $\alpha_2\beta_2$ ,  $\alpha'\beta_2$  ou  $\alpha\alpha'\beta_2$  [388] (Figure 24). Sérine/thréonine kinase atypique, elle est capable d'utiliser aussi bien l'ATP que le GTP comme donneur de phosphate [389] et sa sous-unité catalytique semble être constitutivement active même sous forme monomérique [386]. Son consensus minimal de phosphorylation est S/T-X-X-E/D/Sp/Tp (Sp et Tp correspondent à des acides aminés phosphorylés), favorisé par un environnement acide contrairement à la plupart des sérine/thréonine kinases [390]. Il est intéressant de noter que CK2 peut également agir comme tyrosine kinase [391-394], renforçant le caractère particulier de cette kinase.

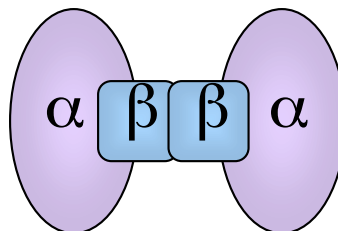
La sous-unité  $\beta$  est dite régulatrice car sa liaison à CK2 $\alpha$  a trois effets principaux (Figure 25) [390, 395] :



**FIGURE 24 :** Structure en rubans de l'holoenzyme CK2.  
(Extrait de Niefind et collègues, The EMBO Journal, 1999)

**Sous-unité catalytique  $\alpha$  :**

Utilise aussi bien l'ATP que le  
GTP  
Activité kinase  
Inhibée par les polyanions  
Hautement conservée



**Sous-unité régulatrice  $\beta$  :**

Stabilisation de l'holoenzyme  
Modulation de l'activité de l'enzyme  
Spécificité de substrats  
Ciblage à la membrane plasmique

**FIGURE 25 :** Structure de l'holoenzyme CK2 et les principaux rôles de chaque sous-unité.  
(D'après Faust et Montenarh, Cell Tissue Research, 2000)

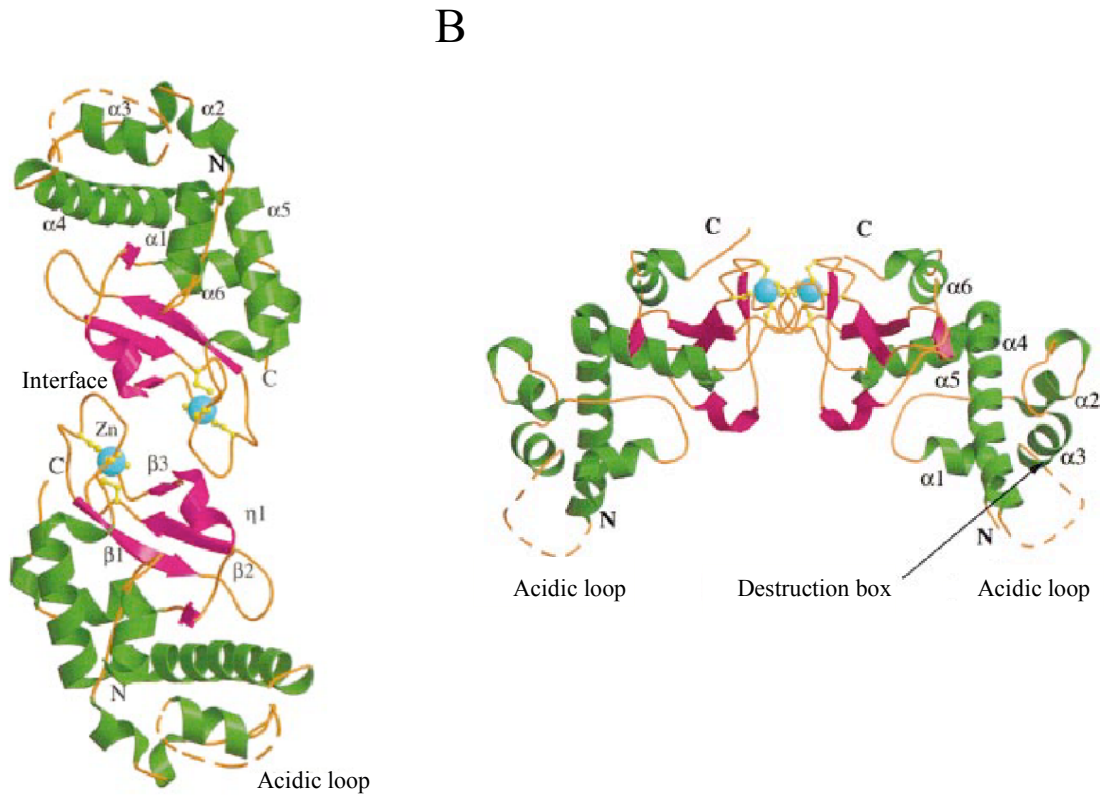
1. Elle stabilise l'holoenzyme.
2. Elle participe à la spécificité de substrats.
3. Elle module l'activité de l'enzyme vis-à-vis de ses substrats. En général, la présence de CK2 $\beta$  augmente l'activité kinase, sauf dans le cas de la Calmoduline dont la phosphorylation est inhibée par la sous-unité régulatrice [388].

Il est important de noter que des travaux de plus en plus nombreux rapportent l'existence des sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$  indépendamment l'une de l'autre [396-400]. Ainsi, CK2 $\beta$  interagit avec Mos [401] et l'inhibe, alors que sa liaison active A-Raf [402, 403]. De son côté, CK2 $\alpha$  est retrouvée associée avec PP2A dont elle augmente l'activité phosphatase, mais uniquement si CK2 $\beta$  est absente [404].

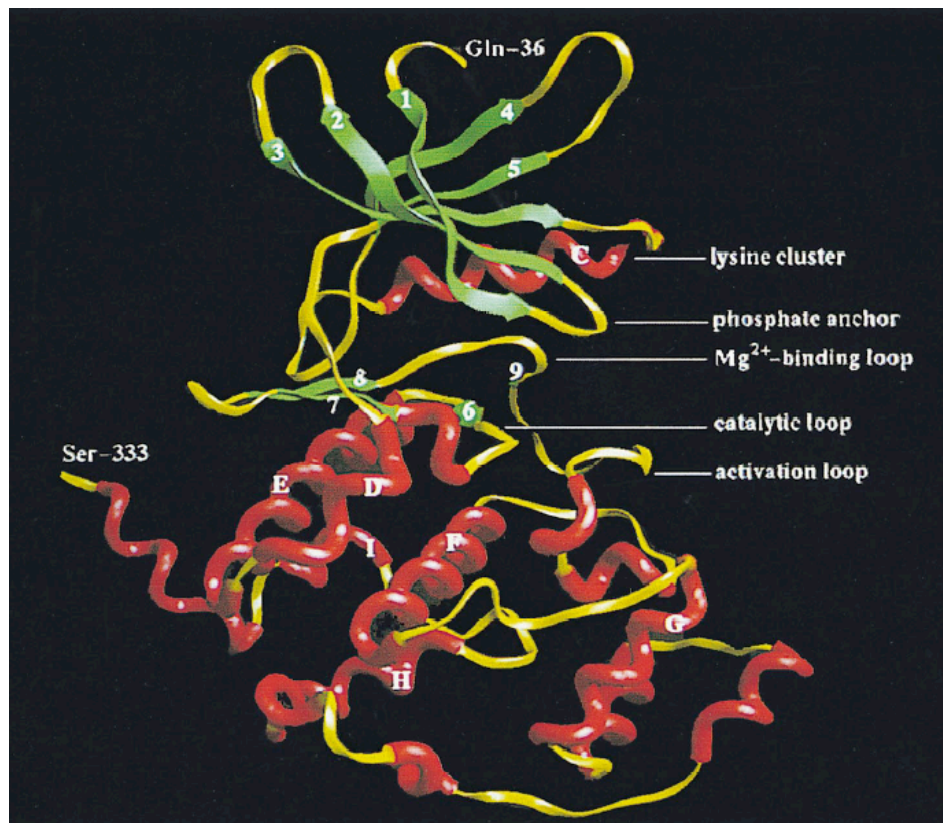
Typiquement CK2 $\beta$  est composée de 215 acides aminés hautement conservés entre les espèces (88 % d'homologie entre CK2 $\beta$  de *Drosophila melanogaster* et celle d'*Homo sapiens*) [388]. Sa structure résolue en 1999 (Figure 26) [405] révèle que CK2 $\beta$  est constituée de 6 hélices  $\alpha$  et de 3 feuillets  $\beta$  et qu'elle possède une structure unique. Dans sa partie médiane, un domaine en doigt de zinc (Cystéines 109, 114, 137 et 140) a ainsi été caractérisé. Il est le principal acteur de la formation du dimère  $\beta$ - $\beta$  qui avait été observé en double hybride [406-408]. De son côté, la résolution de la structure de CK2 $\alpha$  (Figure 27) indique qu'elle présente de nombreuses homologies avec les autres sérine/thréonine kinases, notamment CDK2, même si l'homologie de séquence n'excède pas 33 % [388]. De plus, elle a permis de mieux comprendre le caractère constitutivement actif de la sous-unité catalytique [409, 410]. Enfin, la résolution du cristal de l'holoenzyme [411, 412] a confirmé la structure du tétramère : le dimère  $\beta$ - $\beta$  est placé au cœur de l'enzyme et est encadré de part et d'autre par une sous-unité CK2 $\alpha$  (Figure 24).

## (B) CK2 ET LE CONTRÔLE DU CYCLE CELLULAIRE.

Plusieurs études ont montré l'implication de la kinase dans la prolifération cellulaire. En particulier, la micro-injection de CK2 purifiée dans des ovocytes de xénope accélère leur maturation induite par le MPF [413]. D'autre part, chez *Caenorhabditis elegans*, des expériences d'interférence aux ARN (RNAi) sur CK2 $\beta$  induisent la mort des embryons [414]. De plus, sa délétion chez la souris (CK2 $\beta^{-/-}$ ) provoque une mort embryonnaire précoce. Cette mortalité est liée à des problèmes de prolifération cellulaire au stade où l'activité mitotique est



**FIGURE 26 :** Représentation en rubans de la structure du dimère de CK2 $\beta$   
 (Extrait de Chantalat et collègues, The EMBO Journal, 1999)  
 A : Structure latérale ; B : vue à 90°.



**FIGURE 27 :** Structure en rubans de CK2 $\alpha$  recombinante de maïs  
 (Extrait de Guerra et collègues, Pharmacologic Therapy, 1999)

la plus élevée [415]. De plus, CK2 $\beta$  est requise pour la prolifération et/ou la survie des neurones pendant le développement du cerveau chez *Drosophila melanogaster* [416]. Mais surtout, des travaux de plus en plus nombreux rapportent des altérations de l'activité CK2 dans les tumeurs et un lien possible avec la transformation cellulaire. En effet, dans différents cancers, il y a une augmentation de l'activité CK2 par rapport au tissu sain [397, 417-423] (revues : [424, 425]). Mais cette augmentation d'activité n'est pas directement reliée à l'augmentation de la prolifération de la tumeur car, même si l'activité CK2 est élevée dans les cellules qui se multiplient [426], une co-immuno-détection de CK2 avec le marqueur de prolifération Ki-67 révèle des profils différents pour les deux protéines [427]. Ces données ont conduit certains auteurs à considérer CK2 comme un oncogène potentiel [428]. De plus, CK2 $\alpha$  coopère avec c-MYC [429] et p53 [422] dans le développement de lymphomes chez la souris et est synergique avec Ha-Ras pour l'induction de la transformation cellulaire [430]. Enfin, la surexpression ciblée et localisée de CK2 $\alpha$  induit l'apparition de tumeurs au niveau de la glande mammaire chez la souris [431, 432].

Vu les implications de CK2 dans la prolifération cellulaire et surtout dans la transformation cellulaire, l'étude de son rôle précis au cours du cycle cellulaire s'est avérée nécessaire.

#### ◆ Études chez la levure.

Les premières démonstrations de l'implication de CK2 dans le contrôle du cycle cellulaire ont été faites chez la levure à bourgeonnement, *Saccharomyces cerevisiae*, puis furent confirmées chez la levure à fission, *Schizosaccharomyces pombe*. Padmanabha et collègues ont montré que la délétion des deux gènes CK2a1 et CK2a2 qui permettent l'expression des sous-unités catalytiques, est létale avec notamment apparition de pseudo-mycélia identiques à ceux qui sont observés pour les mutants CDC [433]. La création d'un mutant thermosensible du gène CK2a2 par Hanna et collègues [434] permet d'avancer une première explication à cette mort cellulaire. A température non-permissive, les cellules s'arrêtent très rapidement (dans le premier cycle) avec 50 % de la population en phase G1 (pas de bourgeon et un seul noyau) et 50 % à la transition G2/M avec des cellules présentant un bourgeon et un seul noyau (cellules en fin de phase G2 ou en début de mitose) ou deux (fin de mitose). Par contre la mutation thermosensible du gène CK2a1 provoque une perte de polarité de la cellule [435]. Ces deux expériences indiquent un rôle de CK2 à la fois dans la prolifération et dans le contrôle de la croissance polarisée. Les mêmes études, menées chez *S. pombe*, montrent que l'homologue de CK2 $\alpha$  est lui aussi impliqué dans le contrôle de la



polarité [436]. Par contre, quel que soit le type de levure, la délétion de CK2 $\beta$  n'est pas létale [437, 438] et ne semble pas être requise pour le rôle de CK2 dans le contrôle du cycle cellulaire ou de la polarité dans la mesure où le seul phénotype observé chez *S. cerevisiae* est une sensibilité accrue aux sels de Na<sup>+</sup> et Li<sup>+</sup> [439].

◆ **CK2 chez les eucaryotes supérieurs.**

Les premiers travaux concernant CK2 et le contrôle du cycle cellulaire chez les eucaryotes supérieurs, révélèrent son implication dans les transitions G0/G1 et G1/S. En effet, les auteurs [440] montrèrent que l'activité CK2 augmente lors de ces transitions dans des cellules qui rentrent dans le cycle cellulaire en réponse aux facteurs de croissance mitogènes. Même si cette augmentation d'activité est contestée [441], il est clair que CK2 participe au contrôle de ces transitions notamment suite à des modifications de sa localisation [442]. Depuis, des études par micro-injection d'anticorps dirigés contre CK2 $\beta$  [443, 444] ou contre CK2 $\alpha$  [445] ainsi qu'une stratégie anti-sens dirigée contre les deux sous-unités [446] ont démontré que l'absence de CK2 est délétère pour les transitions G0/G1 et G1/S en réponse aux signaux mitogènes.

En parallèle à ces travaux, le rôle de CK2 dans le contrôle de la transition G2/M était étudié. Même si son implication n'a pas été clairement démontrée, il existe de nombreuses pistes allant dans ce sens :

1. La surexpression de CK2 $\beta$  dans les cellules 3T3L1 provoque leur accumulation à la transition G2/M laissant entendre un rôle de CK2 dans cette phase [447].
2. Des substrats de CK2 pour lesquels le site de phosphorylation a été identifié sont phosphorylés sur ce site à la transition G2/M. C'est le cas notamment de la Nucléophosmine/B23 [448, 449], de la PTP-S2 [450], de la protéine à homéo-domaine SIX1 [451], mais surtout de la DNA-Topoisomérase II $\alpha$  [452, 453]. Dans le cas de la DNA-Topoisomérase II $\alpha$ , sa phosphorylation par CK2 crée un site épitope pour l'anticorps MPM-2 qui est dirigé contre des protéines phosphorylées en mitose dans les cellules HeLa [454].
3. CK2 est phosphorylée en mitose par CDK1/cycline B sur les sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$  [455-458] et CDK1 est capable d'activer *in vitro* CK2 de manière indépendante de la phosphorylation [458, 459].
4. Le fait que sa micro-injection accélère la maturation des ovocytes de xénope [413] ainsi que les résultats des études génétiques menées chez la levure

*S. cerevisiae* [434] sont des arguments forts pour un rôle de CK2 à la transition G2/M.

## 2/ Résultats : article.

Lorsque nous nous sommes intéressés à l'étude de la régulation de CDC25B par phosphorylation, nous avons recherché les protéines kinases pour lesquelles CDC25B présentait des sites putatifs de phosphorylation. CK2 faisait partie de ces kinases. La présence de plus de 10 sites putatifs de phosphorylation par CK2 sur CDC25B ainsi que l'implication de CK2 dans le contrôle du cycle cellulaire (notamment dans la transition G2/M) nous ont poussé à étudier la phosphorylation de CDC25B par CK2 et ses conséquences. Nous avons montré que CK2 phosphoryle *in vitro* les trois variants de CDC25B mais pas CDC25C, une autre phosphatase impliquée dans le contrôle de la transition G2/M. Cette phosphorylation est augmentée par la présence de la sous-unité régulatrice  $\beta$  de CK2. L'analyse par spectrométrie de masse de CDC25B a révélée qu'elle est phosphorylée par CK2 sur deux résidus, les sérines 186 et 187. D'autre part, les deux enzymes forment un complexe *in vitro* comme *in vivo* et cette interaction est médiée par CK2 $\beta$ . Enfin, la phosphorylation de CDC25B par CK2 est associée *in vitro* et *in vivo* à une augmentation de son activité phosphatase. Cette étude nous a donc permis d'identifier CK2 comme un régulateur positif de l'activité phosphatase de CDC25B.

### 3/ *Conclusion, discussion, modèle.*

Dans cette étude, nous avons montré que la protéine kinase CK2 phosphoryle *in vitro* CDC25B. CDC25C, une phosphatase de la même famille que CDC25B et impliquée également dans le contrôle de la transition G2/M, présente, elle aussi, plusieurs sites putatifs de phosphorylation par CK2. Pourtant, *in vitro*, elle n'est pas phosphorylée par la kinase. Il s'agit donc d'une régulation spécifique de CDC25B par rapport à CDC25C. Quant à la troisième phosphatase humaine de la famille, CDC25A, elle est également phosphorylée par CK2. Vu son implication dans les transitions G1/S et G2/M, ce résultat laisse supposer une possible régulation de sa fonction par CK2 en ces points du cycle cellulaire.

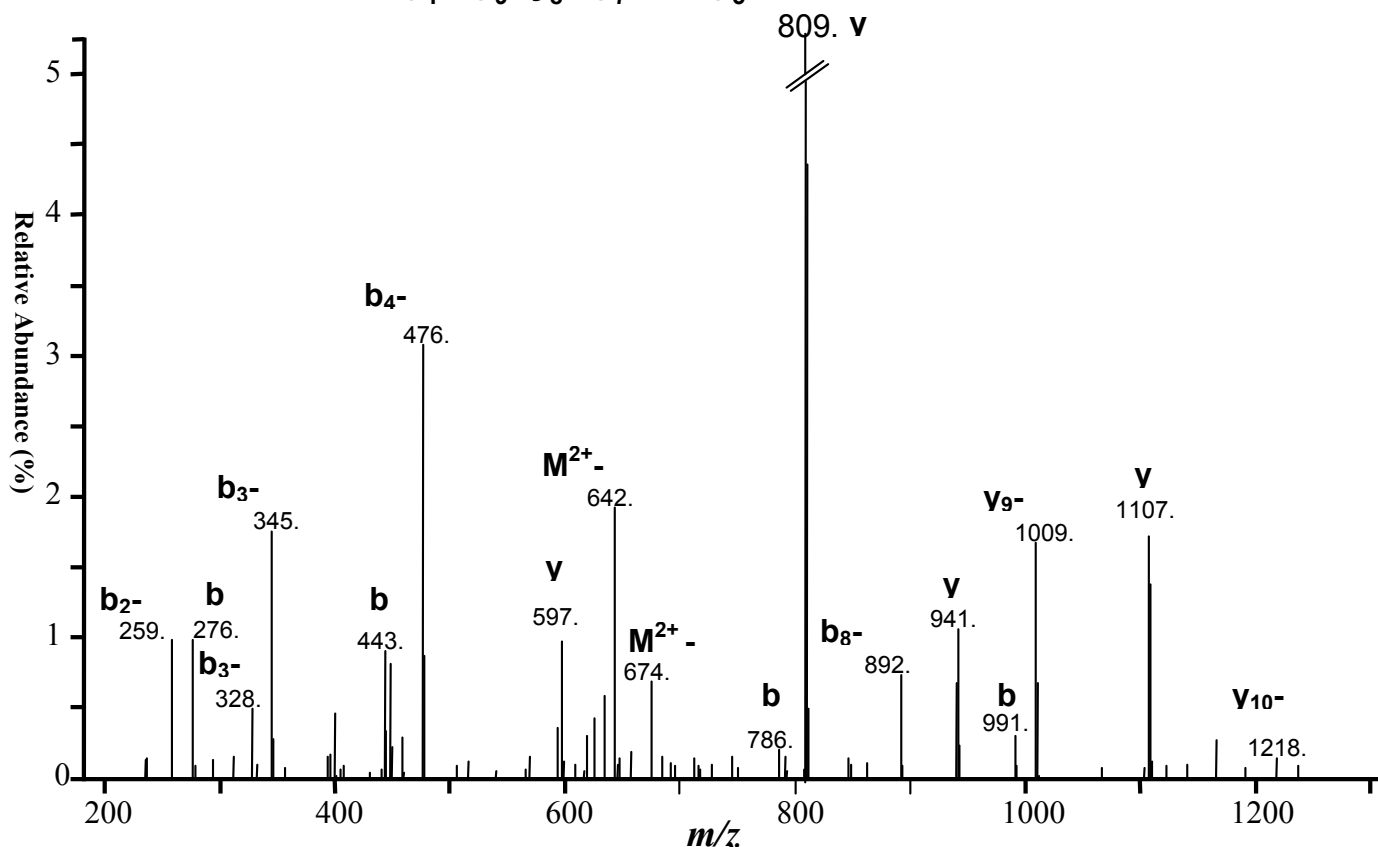
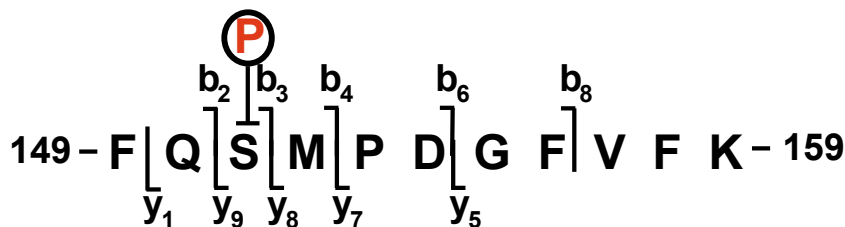
Les sites que nous avons identifiés par spectrométrie de masse sur CDC25B3 sont les sérines 186 et 187 localisées au niveau du domaine B de la protéine. Ce résultat fut surprenant car les trois variants de CDC25B présentent le même niveau de phosphorylation par CK2 alors que le variant B2 ne possède pas le domaine B, ce qui laisse supposer l'existence de sites alternatifs de phosphorylation. Une analyse soignée de la séquence de CDC25B2 révèle que l'épissage du domaine B crée un nouveau site potentiel de phosphorylation par CK2 : la sérine 151 (nomenclature B2) (Figure 28-A) qui est phosphorylée lorsque la protéine est exprimée dans les cellules *Sf9* en présence de CK2 (Figure 28-B). En plus, l'analyse par spectrométrie de masse nous a révélé l'existence d'un deuxième site : la sérine 189 (nomenclature B2). Quant au variant CDC25B1, puisqu'il possède le domaine B, il devrait présenter le même profil de phosphorylation que CDC25B3. Pourtant la phosphorylation sur les résidus équivalant aux sérines 186 et 187 de CDC25B3 n'a jamais été retrouvée sur CDC25B1 lors d'analyses par spectrométrie de masse faites dans le cadre d'un autre projet (Figure 28-C). L'analyse par spectrométrie de masse de la protéine CDC25B1 co-exprimée dans les cellules *Sf9* en présence de CK2 nous permettrait d'identifier ces sites. Par ailleurs, une analyse de la structure en trois dimensions du domaine régulateur des trois CDC25B nous permettrait peut-être de comprendre ces différences. Mais pour le moment cette information n'est pas disponible car seul le domaine catalytique a été cristallisé et sa structure résolue [169]. Enfin, il est intéressant de noter que même si les sites de phosphorylation et d'interaction sont localisés dans le domaine régulateur de CDC25B, CK2 est incapable de le phosphoryler en absence du domaine catalytique. Il est donc probable que des éléments du domaine catalytique sont importants pour médier cette régulation et pour assurer une conformation correcte de la phosphatase.

A

Domaine B



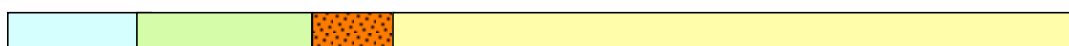
B



C

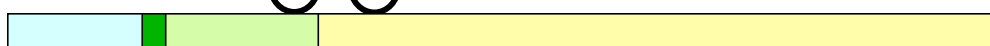
CDC25B1

(P) ?



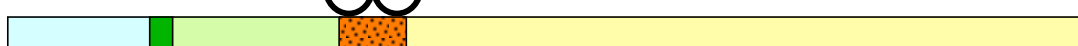
CDC25B2

(P) (P) S151 et S189



CDC25B3

(P) (P) S186 et S187



A

B

FIGURE 28 : Sites de phosphorylation par CK2 sur CDC25B2.

A : Représentation de l'épissage du domaine B qui conduit à la création d'un nouveau site (souligné) de phosphorylation par CK2.

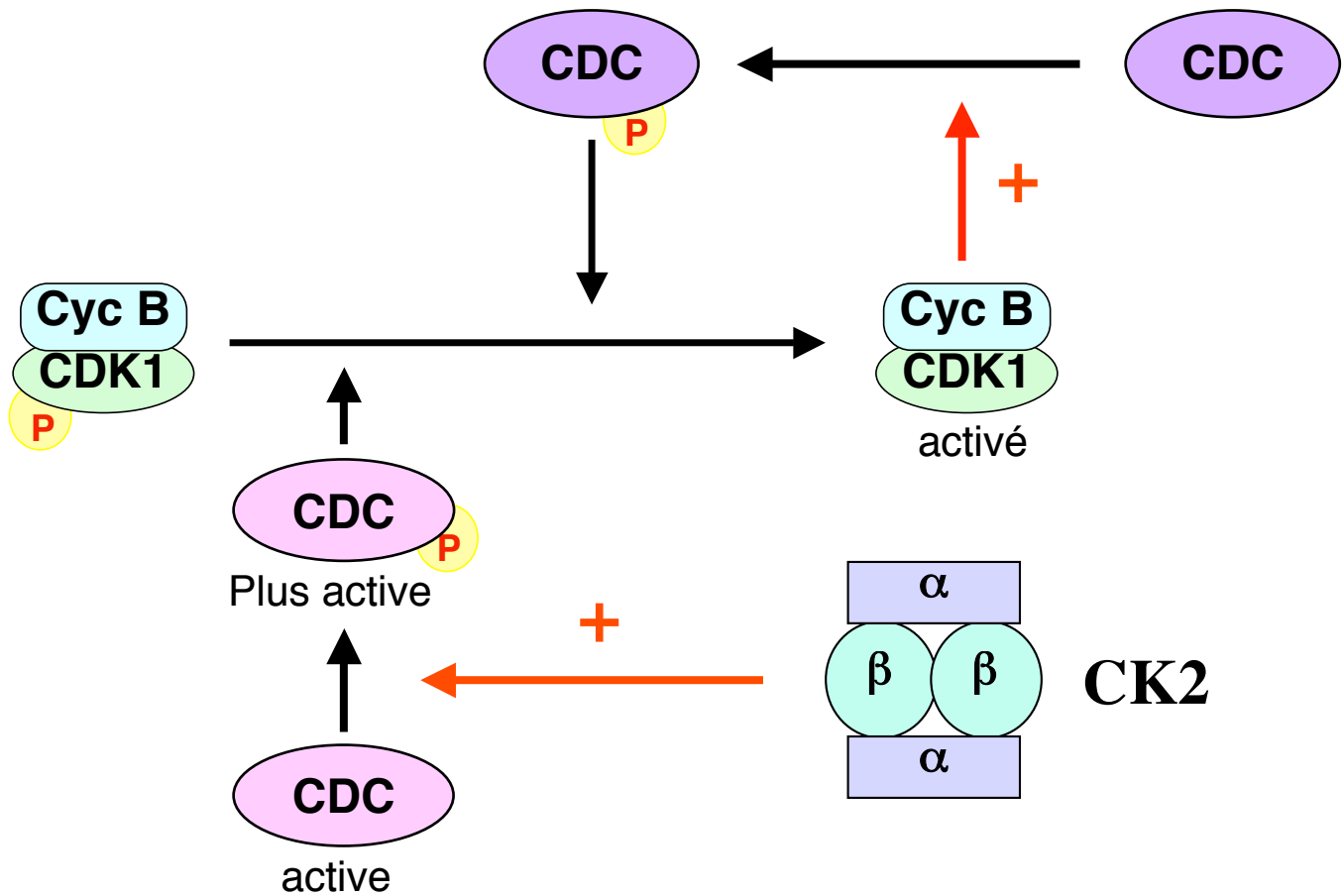
B : Spectre MS/MS du peptide correspondant à ce site et montrant sa phosphorylation dans les cellules Sf9 lorsque CDC25B2 est exprimée en même temps que CK2α<sub>2</sub>β<sub>2</sub>.

C : Bilan des sites phosphorylés par CK2 sur les trois isoformes de CDC25B.

Nous avons également mis en évidence une interaction *in vitro* entre CDC25B et la sous-unité CK2 $\beta$ , mais pas avec CK2 $\alpha$ , comme cela a été démontré pour d'autres substrats de CK2 tels que p53 [460] ou la DNA-topoisomérase II $\alpha$  [461, 462]. De plus, la présence de CK2 $\beta$  augmente l'efficacité de la phosphorylation sans doute par son effet activateur général de l'activité de CK2 $\alpha$  ainsi qu'en favorisant l'interaction entre l'holoenzyme et CDC25B. Mais il est également possible que la régulation de l'activité phosphatase de CDC25B par CK2 soit liée principalement à la liaison de CK2 $\beta$  à CDC25B et non à sa phosphorylation. En effet, cette interaction peut être suffisante pour induire des changements de conformation capables de modifier l'activité catalytique de la phosphatase. La phosphorylation par CK2 $\alpha$  serait alors un événement secondaire qui permettrait par exemple de stabiliser le complexe et/ou la nouvelle conformation de CDC25B.

*In vivo*, l'interaction a également pu être mise en évidence, aussi bien dans les cellules *Sf9* que dans les cellules U-2 OS-HA-CDC25B qui ne surexpriment que CDC25B. Par contre, même si, *in vitro*, aucune interaction n'a pu être mise en évidence entre CDC25B et CK2 $\alpha$ , nous ne pouvons pas exclure son existence *in vivo*. Nous avons également cherché à montrer cette interaction entre CDC25B et CK2 au niveau endogène dans les cellules HeLa. Malheureusement les quantités de CDC25B disponibles ainsi que la présence de plusieurs niveaux de phosphorylation de la protéine qui créent des retards dans sa mobilité électrophorétique ne nous ont pas permis de la visualiser.

Une fois la phosphorylation et l'interaction caractérisées, nous avons étudié l'effet de CK2 sur l'activité phosphatase de CDC25B. L'utilisation de la Fluorescéine Di-Phosphate (FDP) comme substrat [463] permet d'analyser l'activité intrinsèque de CDC25B alors que l'utilisation du complexe CDK1/cycline B tient compte à la fois de l'activité catalytique et de l'affinité de CDC25B pour ce substrat, affinité qui peut être affectée par la phosphorylation. C'est pourquoi il n'est pas étonnant que dans le premier cas nous trouvions une augmentation de 30 % alors que dans le deuxième test nous avons une activation supérieure à 200 %. Ce deuxième test nous a également permis de montrer que lorsque les deux sites de phosphorylation par CK2 sont abolis sur CDC25B3, il n'y a plus ou presque plus d'activation par CK2. Ce résultat indique que la phosphorylation est l'événement crucial pour l'activation même si nous ne pouvons pas exclure un rôle de l'interaction. Enfin il est important de signaler que l'activité phosphatase basale de CDC25B est largement supérieure à celle de CDC25C et identique à celle de CDC25C après activation par CDK1/cycline B1



**FIGURE 29** : Modèle de travail.

Dans ce modèle, une sous-population de CDC25B interagit avec CK2, est phosphorylée par la kinase et donc est plus active. Cette population de CDC25B activée va alors participer à l'activation des complexes CDK1/cycline B en déphosphorylant CDK1 sur Thr14 et Tyr15 . Les complexes CDK1/cycline B activés vont en retour phosphoryler la phosphatase CDC25C, ce qui permet la mise en place de la boucle de rétrocontrôle positif entre CDK1 et CDC25C, boucle nécessaire pour l'entrée en mitose.

[236]. De ce fait, une simple augmentation d'activité d'un facteur 2 peut suffire pour déplacer un équilibre de phosphorylation et permettre le contrôle des événements régulés par CDC25B.

L'ensemble des effets de CK2 sur CDC25B est visualisé par la mesure de l'activité phosphatase de CDC25B3 sur la FDP après expression dans les cellules *Sf9* en présence ou non de CK2. Dans ces conditions, lorsque CDC25B3 est incubée en présence de CK2 $\alpha$  et de CK2 $\beta$ , une augmentation d'un facteur 2 de son activité phosphatase est observée. Cette augmentation est probablement sous-estimée car comme nous l'a montrée l'analyse en spectrométrie de masse de CDC25B seule dans les cellules *Sf9*, la phosphatase est déjà phosphorylée par CK2 endogène et donc déjà potentiellement activée. Ainsi l'activité qui nous sert de référence pour le calcul de l'activation est certainement supérieure à ce qu'elle devrait être.

Ces différents résultats ainsi que nos connaissances sur ces deux protéines nous permettent de proposer un modèle de travail pour intégrer cette régulation de CDC25B par CK2 dans le contrôle du cycle cellulaire (Figure 29). Nous pensons que seule une sous-population de CDC25B s'associe à CK2 et est phosphorylée par la kinase. Cette phosphorylation provoque alors une augmentation de son activité phosphatase. Cette population de CDC25B activée par CK2 peut à son tour activer par déphosphorylation les complexes CDK1/cycline B présents. Ces complexes actifs vont ensuite permettre la mise en place de la boucle d'auto-amplification entre CDK1/cycline B et CDC25C nécessaire pour l'entrée en mitose. Ainsi CK2 participerait à l'initiation de l'entrée en mitose par son action sur CDC25B considérée comme le « Starter » de l'activation de CDK1/cycline B.

## **II) RÉGULATION DE LA LOCALISATION DE CDC25B PAR AKT/PKB.**

### *1/ Introduction : présentation d'AKT/PKB.*

#### **(A) AKT/PKB EST UNE SÉRINE/THRÉONINE KINASE.**

AKT/PKB fut identifiée en 1991 par trois études indépendantes. Deux portaient sur l'identification d'une sérine/thréonine kinase présentant de l'homologie avec les protéines kinases PKA (kinase dépendante de l'AMPc) et PKC (kinase dépendante du Ca<sup>2+</sup>) [464, 465]. D'autre part, Bellacosa et collègues clonèrent v-AKT, une protéine virale correspondant à la fusion entre la protéine virale Gag et la protéine cellulaire c-AKT (Figure 30-A) [466]. Depuis, trois isoformes d'AKT/PKB ont été identifiées dans les cellules de mammifères : AKT1/PKB $\alpha$ , AKT2/PKB $\beta$  et AKT3/PKB $\gamma$  (Figure 30-A) [464, 467-470]. Ces protéines sont codées par trois gènes différents et présentent plus de 80 % d'homologie de séquence.

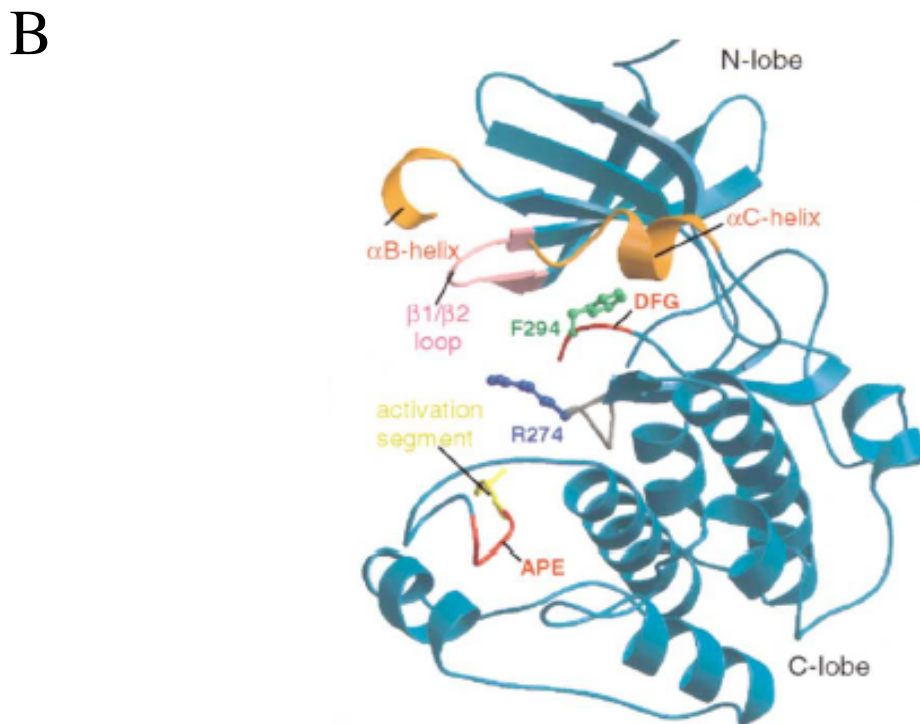
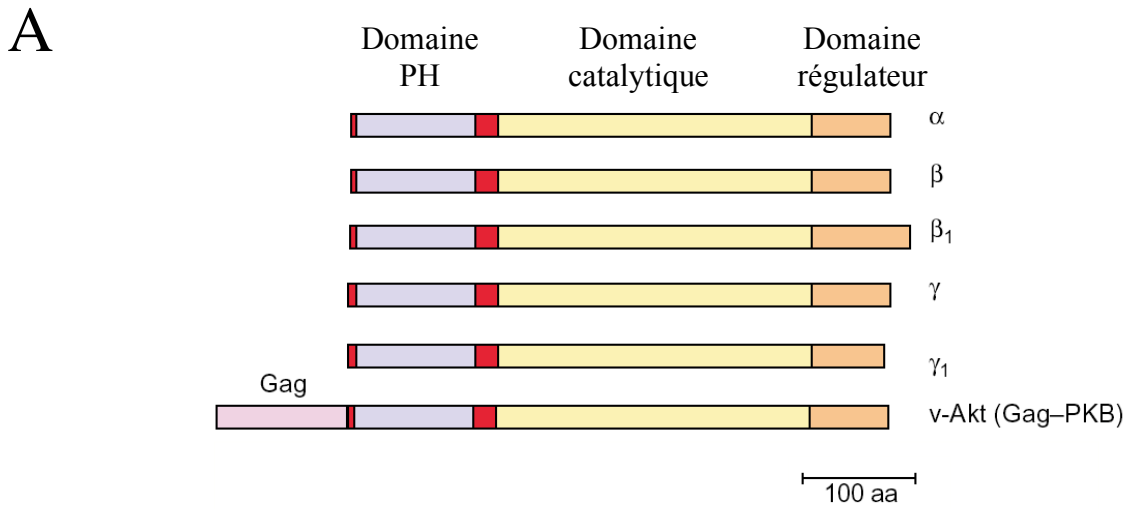
AKT/PKB est une sérine/thréonine kinase de 57-60 kDa dont la structure générale a été confirmée par cristallographie (Figure 30-B) [471, 472]. Le domaine kinase présent au centre de la protéine est homologue à celui de PKA et PKC (Figure 30-A) [465, 466]. Sa partie carboxy-terminale comprend un domaine hydrophobe et riche en prolines qui participe à la régulation de l'activité de la kinase [473]. Enfin, elle possède dans sa partie amino-terminale un domaine d'homologie aux Pleckstrins ou domaine PH [474, 475]. Ce module d'une centaine d'acides aminés favoriserait des interactions protéine-protéine [475, 476], mais il se lie surtout aux phospholipides membranaires et plus particulièrement aux phosphatidylinositol-phosphates ou PIP [473, 476-480].

#### **(B) RÉGULATION D'AKT/PKB.**

Le modèle actuel de régulation d'AKT/PKB est illustré par la Figure 31-B.

Suite à l'activation d'un récepteur aux facteurs de croissance, le recrutement à la membrane de la PI3K (revue : [481]) permet notamment la production de phosphatidylinositol-3,4,5 triphosphate (PI3,4,5P<sub>3</sub>) par phosphorylation de la position 3'-OH de l'anneau inositol du PI4,5P<sub>2</sub> (Figure 31-A). Les PIP<sub>3</sub> servent alors de point d'ancrage pour AKT/PKB, via son domaine PH. La kinase cytosolique est alors recrutée au niveau de la membrane plasmique [482] (revues : [483, 484]) où elle va subir des modifications de





**FIGURE 30 : Structure d'AKT/PKB.**

A : Structure des différentes isoformes d'AKT/PKB (extrait de Brazil et Hemmings, *TRENDS in Biochemical Sciences*, 2001). PKB $\beta_1$  présente une extension de 40 acides aminés à la fin du domaine carboxy-terminal. PKB $\gamma_1$  présente une séquence carboxy-terminale de 14 acides aminés différente de celle PKB $\gamma$  et v-AKT correspond à la forme virale d'AKT/PKB.

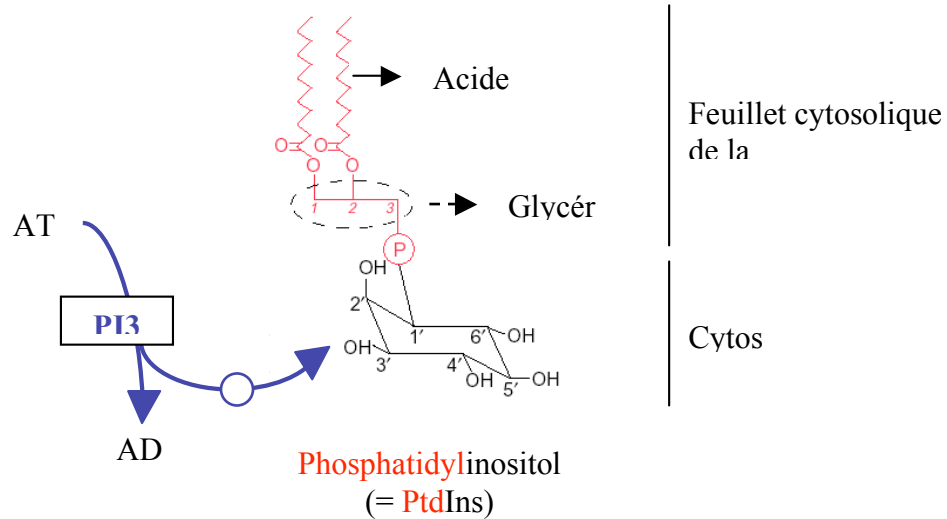
B : Structure en rubans d'AKT/PKB (extrait de Yang et collègues, *Nature Structural Biology*, 2002).

conformation indispensables pour les étapes suivantes [485-487]. Le recrutement d'AKT/PKB à la membrane la place à proximité de kinases régulatrices nécessaires pour son activation maximale. Comme la plupart des kinases de la famille des AGC kinases (« protein kinase A, protein kinase G and protein kinase C-like » [488]), l'activité d'AKT/PKB est régulée par des phosphorylations sur deux résidus hautement conservés, la thréonine 308 et la sérine 473 (Figure 32) [486, 489].

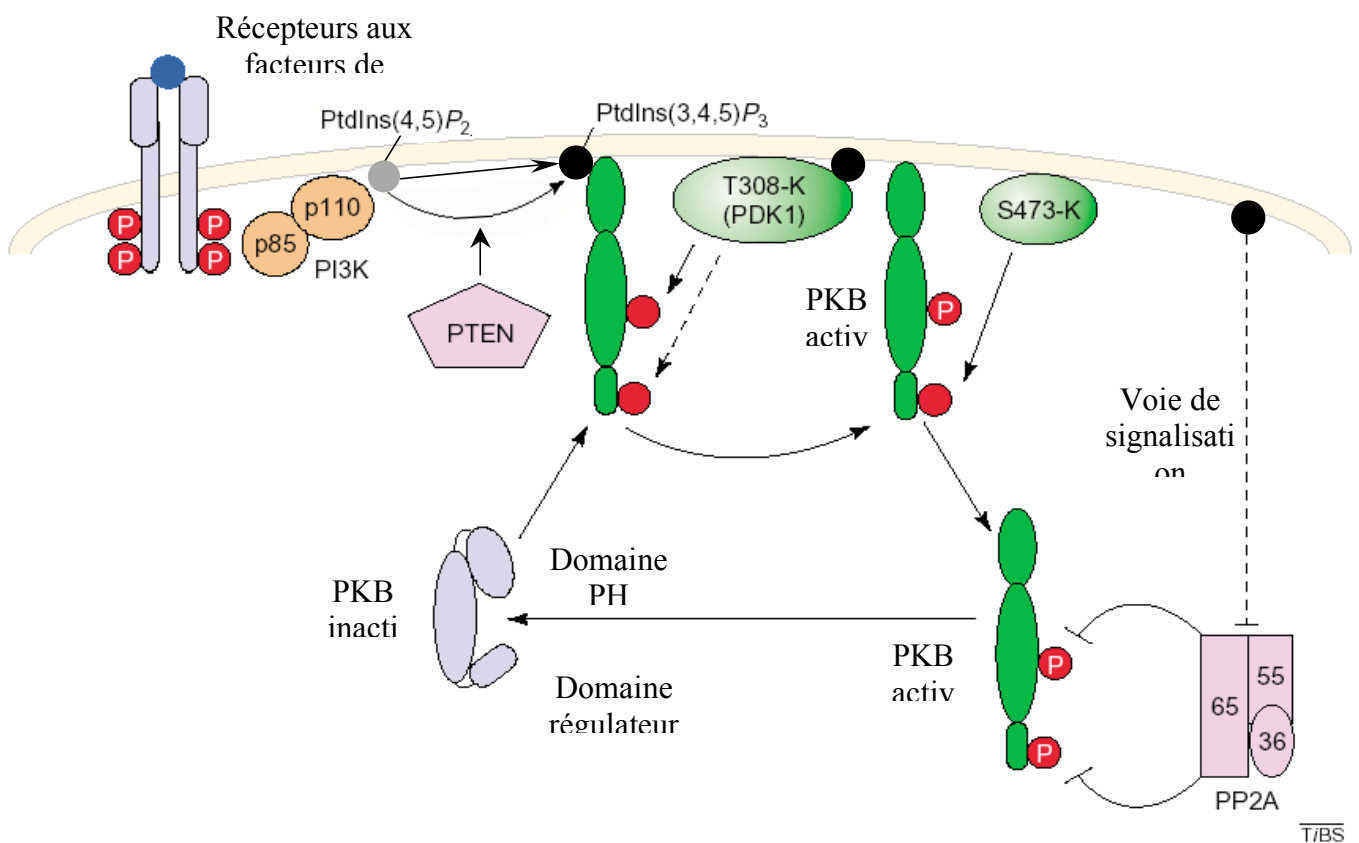
La kinase qui phosphoryle AKT/PKB sur la Thr308 est PDK1, la « Phosphatidylinositol 3 Phosphate Dependant Kinase 1 » [490-492]. PDK1 est une sérine/thréonine kinase ubiquitaire de 63 kDa qui appartient également à la famille des AGC kinases (Figure 32) [493] et qui est essentielle puisque des cellules embryonnaires de souris invalidées pour PDK1 (cellules PDK1<sup>-/-</sup>) ont une protéine kinase AKT/PKB qui n'est plus activable par des stimuli comme l'IGF1 [494, 495]. Ensuite, AKT/PKB est phosphorylée sur la Ser473 (pour AKT1) au niveau de sa région carboxy-terminale hydrophobe [488]. Pour le moment, la kinase qui phosphoryle Ser473, appelée PDK2 par homologie avec la Thr308-kinase, reste un sujet de controverse [496, 497] et plusieurs candidates ont été proposées. AKT/PKB pourrait s'autophosphoryler après une activation partielle par phosphorylation sur la Thr308 et sa multimérisation [489]. PDK1 pourrait également être une Ser473 kinase [498]. Enfin, ILK, « Integrine Linked Kinase », est également capable de phosphoryler AKT/PKB sur la Ser473 *in vitro* et sa surexpression dans les cellules augmente la phosphorylation de la Ser473 par une voie PI3K dépendante [499]. En fait, il est fortement probable que la phosphorylation d'AKT/PKB sur la Ser473 soit dépendante de différentes PDK2, y compris AKT/PKB elle-même [488]. Phosphorylée et activée [486, 500], AKT/PKB se détache alors de la membrane plasmique (Figure 31-B) par un mécanisme encore indéterminé et se re-localise dans le cytoplasme et le noyau. Cette translocation est nécessaire pour la phosphorylation de substrats identifiés au niveau nucléaire [501-506].

L'activité d'AKT/PKB est contrecarrée par différents mécanismes. La lipide-phosphatase PTEN (« Phosphatase and TENsin homolog deleted in chromosome TEN ») déphosphoryle les PIP<sub>3</sub> (Figure 31-B) contrecarrant ainsi l'action de la PI3K, ce qui prévient indirectement l'activation d'AKT/PKB [507] (revues : [508-510]). D'autre part, la sérine/thréonine phosphatase PP2A est capable de déphosphoryler AKT/PKB sur Thr308 et Ser473 et donc de l'inhiber directement (Figure 31-B) [511-514].

A



B



**FIGURE 31** : Mode de régulation d'AKT/PKB par les récepteurs à activité tyrosine kinase.

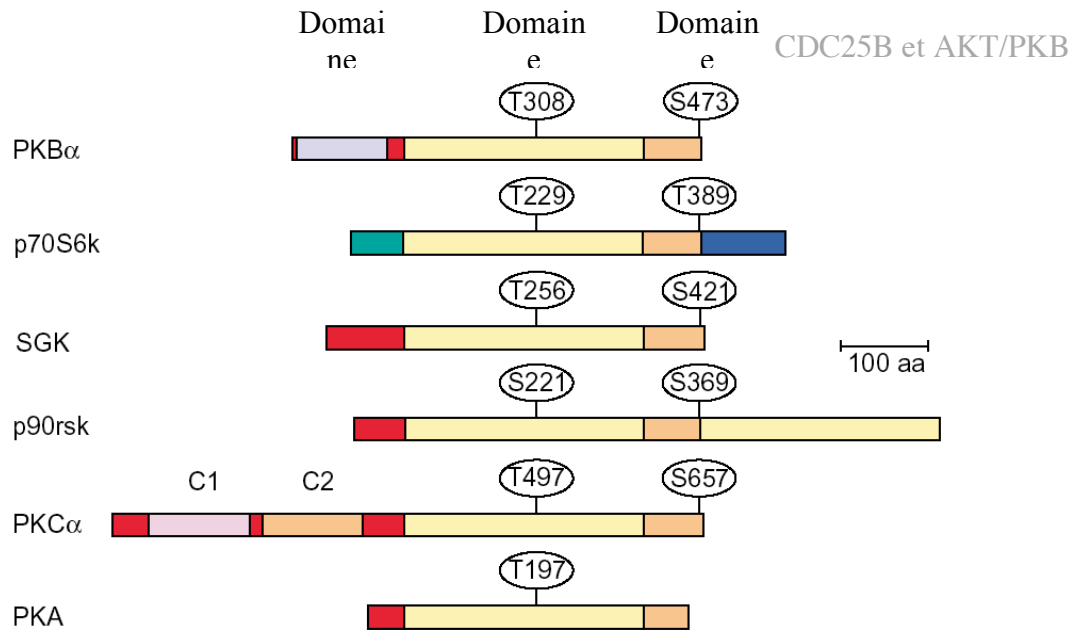
A : Structure des phosphatidylinositides (d'après Vanhaesebroeck et collègues, Biochemistry Journal, 2000)  
 B : Voie de régulation d'AKT/PKB (Extrait de Brazil et Hemmings, TRENDS in Biochemical Sciences, 2001). Abréviations : PDK1, 3'-phosphoinositide-dependent kinase ; PH, pleckstrin homology ; PKB, protein kinase B ; PtdIns(3,4)P<sub>2</sub>, phosphatidylinositol 3,4-bisphosphate ; PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub>, phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate ; S473-K, kinase qui phosphoryle Ser473; T308-K, kinase qui phosphoryle Thr308.

## (C) RÔLES D'AKT/PKB ET DÉRÉGULATIONS.

### (i) Rôles d'AKT/PKB.

Une fois la régulation d'AKT/PKB connue, le challenge fut d'identifier ses substrats. Des études réalisées avec des peptides ont permis de déterminer le consensus minimal de phosphorylation : R-X-R-X-X-S/T-Hyd (où Hyd correspond à un acide aminé hydrophobe comme la phénylalanine ou la leucine) [515, 516], avec la coopération d'acides aminés en dehors du consensus [517]. L'ensemble de ces données furent utilisées par Yaffe et Cantley qui estimèrent que dans le génome des Vertébrés, il y aurait environ 9500 protéines présentant au moins un site putatif de phosphorylation par la kinase [518]. L'ensemble des substrats connus pour AKT/PKB peuvent être regroupés au sein de trois grandes fonctions (Figure 33) : inhibition de l'apoptose, promotion du cycle cellulaire et transmission du signal insuline. Ainsi des souris invalidées pour AKT1 (AKT1<sup>-/-</sup>) présentent un retard de croissance et une augmentation de l'apoptose [519, 520] alors que celles AKT2<sup>-/-</sup> présentent des symptômes d'insulino-résistance similaires à ceux du diabète [521]. Ces expériences indiquent en plus une spécialisation des isoformes, AKT2 étant plus dévolue au contrôle de la glycémie.

Une des cibles d'AKT/PKB est la famille des facteurs de transcription Forkhead, qui est requise pour la transcription de différents gènes comme le Fas-ligand, un pro-apoptotique (revues : [522, 523]) ou le CKI p27<sup>KIP1</sup> (Figure 34) [524-529], et qui participe au contrôle de la voie de signalisation de l'insuline [530-532]. Or la phosphorylation des Forkhead AFX, FKHR et FKHL1 par AKT/PKB induit leur séquestration dans le cytoplasme par liaison aux protéines 14-3-3 (Figure 34), ce qui les inhibe [531-537]. AKT/PKB phosphoryle également la protéine MDM2 (« Murine Double Minute »). C'est une onco-protéine à activité E3-ubiquitine-ligase qui se lie à p53 au niveau nucléaire et provoque son export ainsi que son ubiquitination et donc sa dégradation par le protéasome (revue : [538]). La phosphorylation de MDM2 par AKT/PKB augmente son activité ubiquitine-ligase [539], favorise sa translocation au niveau nucléaire et donc la dégradation de p53 (Figure 36) [540, 541]. Ainsi AKT/PKB empêche la transmission par p53 des signaux de stress à la machinerie apoptotique et donc permet la survie cellulaire et la progression du cycle [542, 543]. Les CKI p21<sup>CIP1</sup> et p27<sup>KIP1</sup> sont également des substrats d'AKT/PKB. Leur phosphorylation induit leur relocalisation au niveau cytoplasmique (Figure 34), ce qui les éloigne de leur cible, les complexes CDK/cycline nucléaires (pour p21 : [544, 545] ; pour p27 : [546-548]).

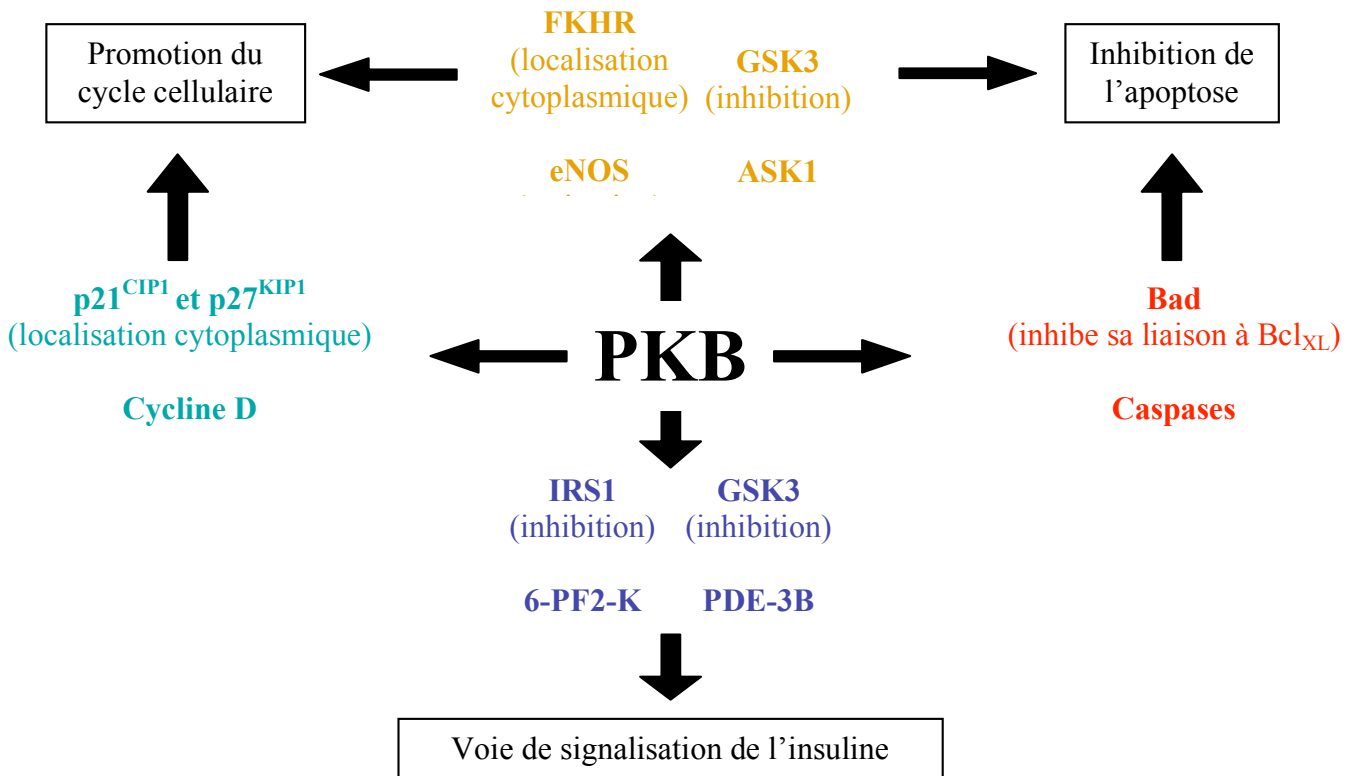


**FIGURE 32** : Homologies entre les AGC kinases

(Extrait de Brazil et Hemmings, TRENDS in Biochemical Sciences, 2001)

Toutes les AGC kinases possèdent une sérine ou thréonine phosphorylée dans la boucle d'activation du domaine catalytique (correspond à la Thr380 d'AKT1) et une autre dans leur domaine régulateur (correspond à Ser473 d'AKT1). Seule PKA ne possède pas ce deuxième résidu.

En bleu, domaine à fonction inconnue ; en vert, domaine acide responsable de la sensibilité à la rapamycine ; domaines C1 et C2, liaison au diacylglycérol et au Ca<sup>2+</sup> ; domaine PH (pleckstrin homology), liaison aux lipides.



**FIGURE 33** : Effets cellulaires d'AKT/PKB en fonction des substrats impliqués.

(D'après Lawlor et Alessi, Journal of Cell Science, 2001)

Abréviations : FKHR, Forkhead transcription factor ; 6-PF2-K, cardiac isoform of heart 6-phosphofructo-2-kinase ; GSK3, Glycogen Synthase Kinase 3 ; eNOS, endothelial Nitric Oxide Synthase ; PDE-3B, Phosphodiesterase 3B ; ASK1, Apoptosis Signal-regulating Kinase 1.

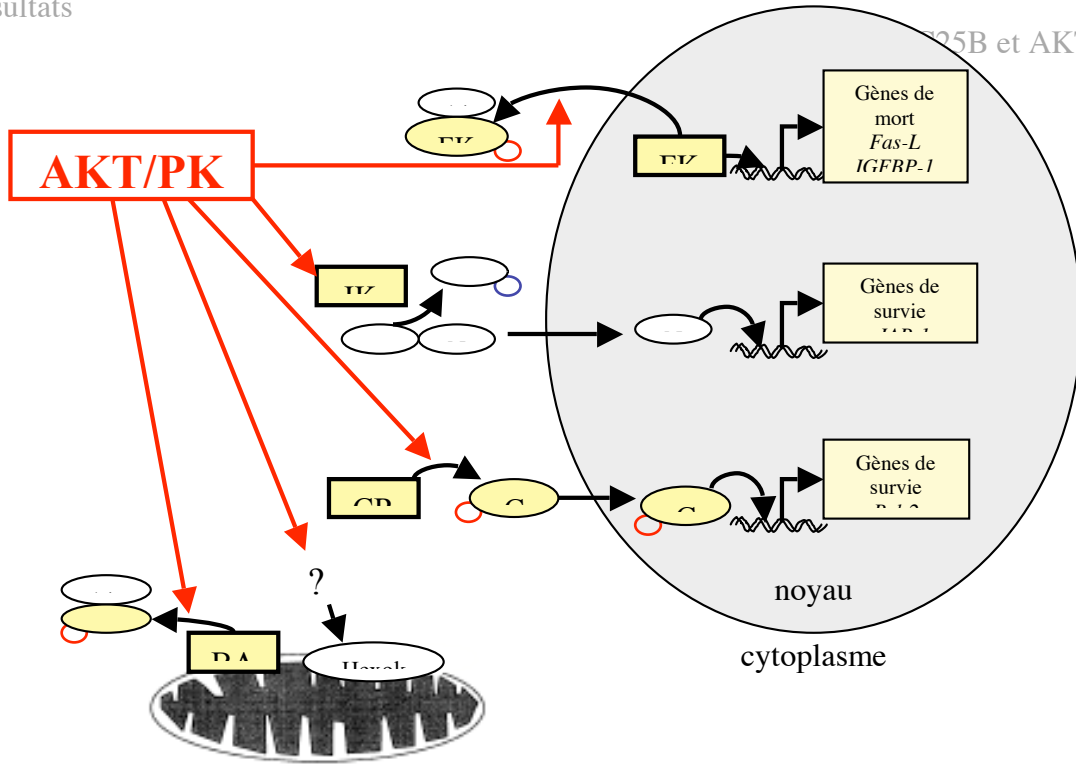
Enfin AKT/PKB participe au contrôle du taux de cycline D intracellulaire et donc favorise la progression des cellules dans le cycle (Figure 34) [549-554].

Plus récemment, il a été montré qu'AKT/PKB participe au contrôle de la transition G2/M. En effet, Okumura et collègues ont montré qu'AKT/PKB phosphoryle et inhibe la kinase MYT1 lors de la méiose ce qui favorise la division cellulaire [555]. Peu après, un deuxième travail a confirmé ce rôle d'AKT/PKB dans la transition G2/M. Les auteurs démontrent que l'activité AKT/PKB est élevée à la fin du cycle cellulaire et qu'elle est nécessaire pour l'entrée en mitose. Elle participerait notamment à l'inhibition de la kinase CHK1 [556] ce qui concorde avec le fait que la présence d'une activité AKT/PKB élevée lève le blocage des cellules en phase G2 après endommagement de l'ADN [557]. Ainsi ces travaux laissent entrevoir des implications de plus en plus nombreuses d'AKT/PKB dans le contrôle du cycle cellulaire et indiquent qu'elle est un régulateur positif de l'entrée en mitose [555-558].

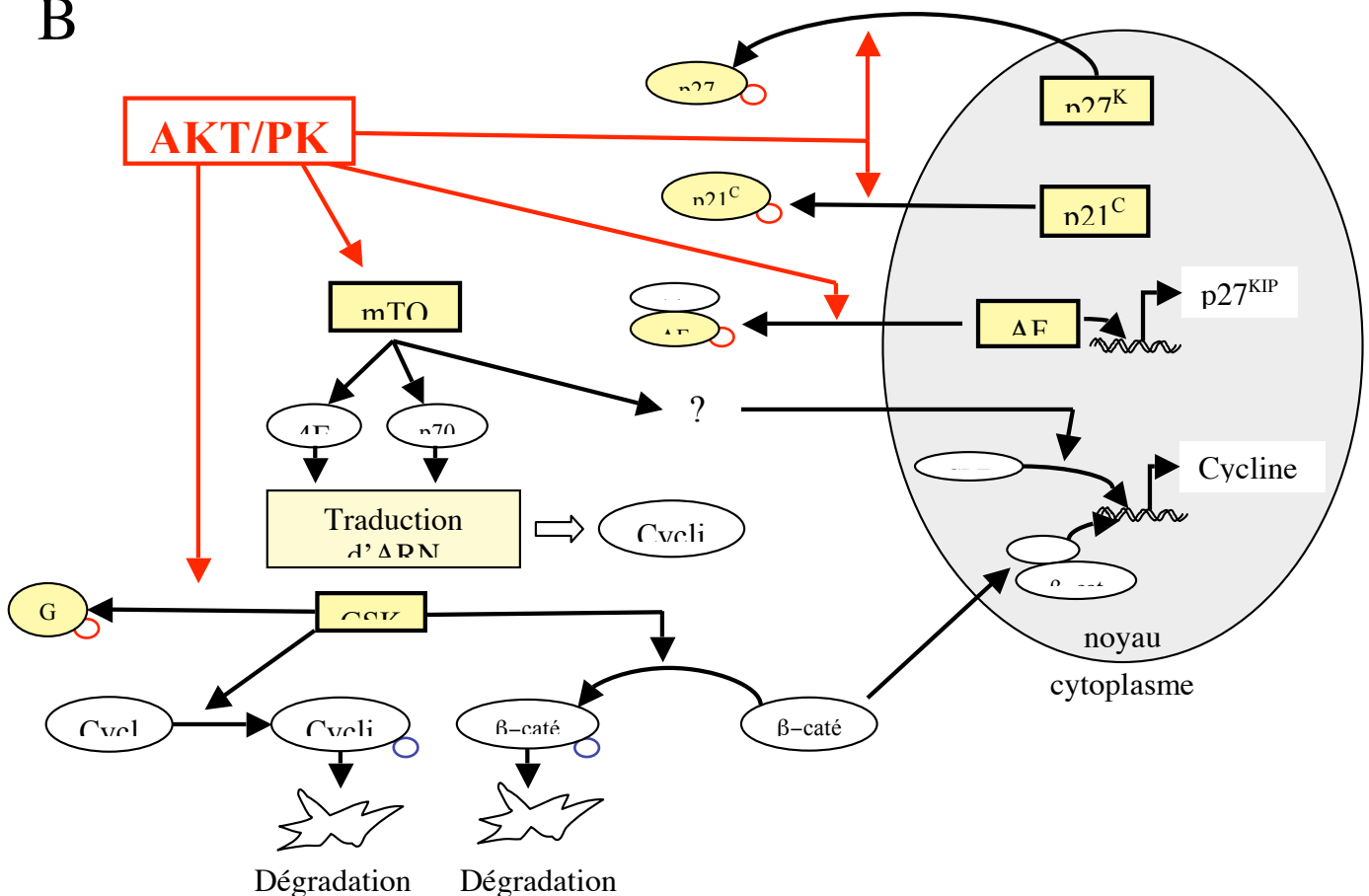
**(ii) Dérégulations d'AKT/PKB.**

Derrière ces rôles d'AKT/PKB, apparaît en filigrane une autre implication de la kinase : la tumorigenèse. En effet AKT/PKB a été identifiée initialement comme un oncogène viral [466, 468]. Depuis, son implication dans la tumorigenèse fut largement analysée. Si dans certains cas ce sont des modifications qui touchent les régulateurs en amont d'AKT (PTEN : [508, 509] ; PI3K : [484]), il fut également observé des surexpressions des différentes isoformes d'AKT/PKB. Ce sont des cancers qui touchent par exemple les ovaires [467, 559-561] et les seins [560-564] et qui sont souvent corrélés avec un mauvais pronostic [559, 561] et une augmentation du risque métastatique [564]. De plus, la surexpression d'une forme constitutivement membranaire d'AKT/PKB dans des cellules en culture peut induire leur transformation oncogénique [565]. Mais les travaux les plus récents indiquent que la kinase participerait plus à la progression qu'à l'apparition des tumeurs par deux mécanismes distincts : d'une part en permettant la prolifération des cellules dans des conditions où elle devrait être inhibée et d'autre part en inhibant l'apoptose [553, 566]. Par exemple, chez la souris, la surexpression d'AKT1 constitutivement active au niveau de la glande mammaire n'induit pas la transformation tumorale [488, 567]. Par contre elle coopère avec la protéine K-Ras activée et conduit à l'apparition de glioblastomes agressifs [488, 568]. Enfin, une étude sur les cancers du côlon révèle que l'activation d'AKT/PKB est nécessaire pour la progression tumorale [569].

A



B



**FIGURE 34 : Implications d'AKT/PKB dans le contrôle de l'apoptose et de la prolifération cellulaire.**

(D'après Nicholson et collègues, Cellular Signaling, 2002)

A : AKT/PKB et l'apoptose.

B : AKT/PKB et le contrôle de la prolifération.

Les substrats directs d'AKT/PKB sont représentés dans les boites noires. Même s'ils sont représentés avec une certaine localisation, l'emplacement où se fait leur phosphorylation par AKT/PKB reste pour la plupart incertaine.

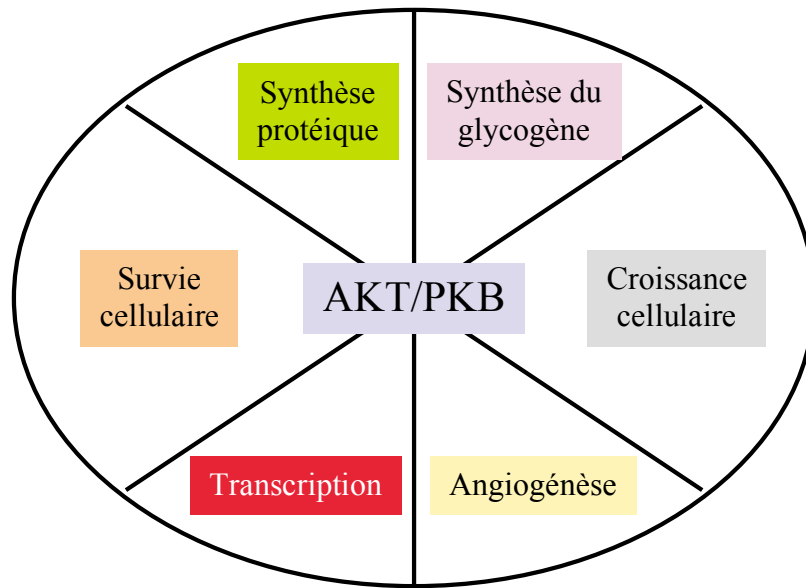
Vu l'ensemble de ces données, AKT/PKB est une kinase au centre de multiples réponses cellulaires (Figure 35). Son étude est en pleine expansion et ses multiples implications, notamment dans des pathologies comme le cancer et le diabète, conduisent les laboratoires à rechercher de nouvelles molécules chimiques pouvant la réguler. Le challenge sera de trouver des molécules capables d'une part de l'activer pour compenser l'insulino-résistance chez les diabétiques mais sans induire de cancers subséquents, et d'autre part de l'inhiber au niveau des tumeurs mais sans provoquer un diabète [570].

## 2/ Résultats : article.

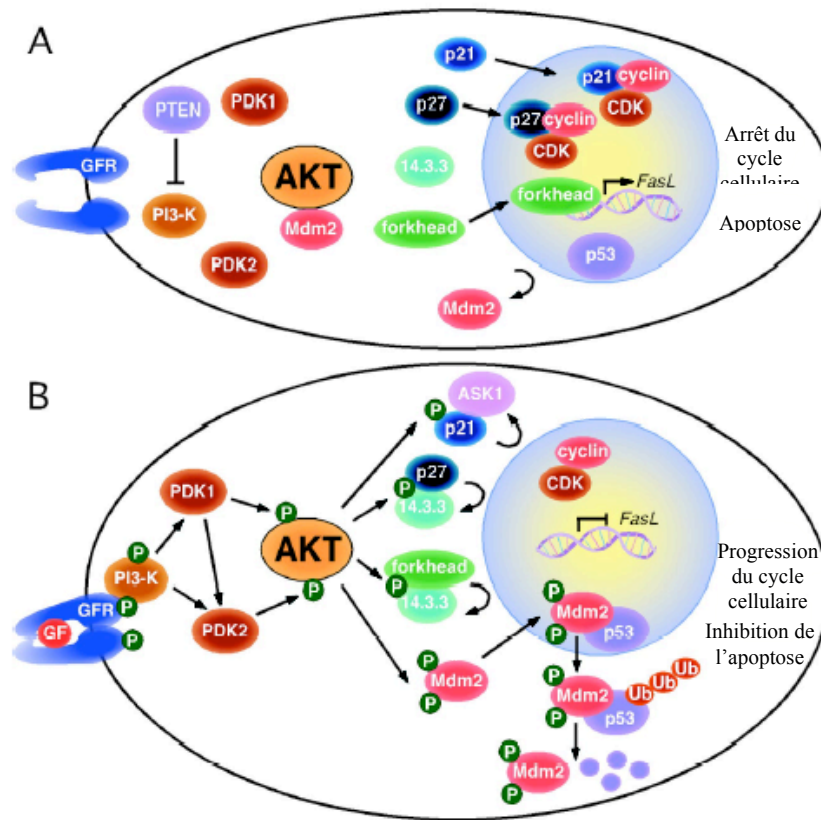
Le point de départ de ce travail est la publication par Zhou et collègues du contrôle de la localisation intra-cellulaire de p21<sup>CIP1</sup> par AKT/PKB [545]. En effet ils démontraient que lorsque p21<sup>CIP1</sup> est phosphorylée par AKT/PKB, elle présente une localisation cytoplasmique plus importante. Comme le site de phosphorylation identifié est à proximité de la séquence d'import nucléaire (NLS) de p21<sup>CIP1</sup>, les auteurs émettaient l'hypothèse que la localisation cytoplasmique observée soit due à l'inhibition de sa NLS par la phosphorylation par AKT/PKB. A la même époque au laboratoire, une NLS était identifiée sur CDC25B [294] et nous recherchions des partenaires qui pourraient agir sur la localisation de la phosphatase. Par comparaison avec la protéine p21<sup>CIP1</sup>, nous avons alors constaté que CDC25B présentait également des sites putatifs de phosphorylation par AKT/PKB, et que ces sites étaient à proximité de sa NLS. Donc leur phosphorylation par AKT/PKB pourrait, comme dans le cas de p21<sup>CIP1</sup>, avoir des répercussions sur la localisation de CDC25B. Pour ces différentes raisons ainsi que l'implication grandissante d'AKT/PKB dans la régulation de la transition G2/M [555, 556, 558] et dans la réponse aux points de contrôles [556, 557], nous avons étudié la phosphorylation et la régulation de la localisation de CDC25B par la protéine kinase AKT/PKB. Depuis, des travaux de plus en plus nombreux rapportent que l'effet principal d'AKT/PKB sur ses substrats passe par des modifications de leur localisation subcellulaire. C'est notamment le cas des protéines p21<sup>CIP1</sup>, p27<sup>KIP1</sup>, MDM2 et les membres de la famille des Forkhead impliquées dans le contrôle de la prolifération (Figure 36) [571] auxquelles nous pouvons rajouter le suppresseur de tumeurs BRCA-1 [572] et la protéine AHNAK [573].

Nous avons ainsi montré que la co-expression de CDC25B avec une forme constitutivement active d'AKT/PKB induit sa localisation au niveau cytoplasmique contrairement à une forme inactive de la kinase. D'autre part, AKT/PKB phosphoryle CDC25B *in vitro* sur un des deux sites putatifs identifiés, la Ser353 (nomenclature





**Figure 35** : Rôle central d'AKT/PKB dans différentes réponses cellulaires. (D'après Brazil et Hemmings, TRENDS in Biochemical Sciences, 2001)



**FIGURE 36** : Effets d'AKT/PKB sur la localisation de certains de ces substrats.

(Extrait de Testa et Bellacosa, PNAS, 2001)

A : Situation dans des cellules privées de sérum.

B : Effets de la stimulation par un facteur de croissance sur la localisation de certains substrats d'AKT/PKB.

CDC25B3). Identifiée par spectrométrie de masse, cette phosphorylation a été confirmée par l'utilisation d'un anticorps spécifique de ce résidu phosphorylé. L'activation d'AKT/PKB endogène suite à un traitement des cellules par du peroxyde d'oxygène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) entraîne, en parallèle, une relocalisation massive de CDC25B dans le cytoplasme. L'utilisation d'inhibiteurs chimiques et de formes d'AKT/PKB à activité négative dominante ont confirmé l'implication de la kinase dans cette translocation. Cependant nos résultats montrent clairement que la kinase AKT/PKB n'est pas la seule et que d'autres voies interviennent dans cette modification de la localisation de CDC25B. En effet, la kinase p38 et une troisième voie non identifiée participent à cette relocalisation de la phosphatase. Enfin, si le traitement des cellules avec le peroxyde d'hydrogène provoque une augmentation de la phosphorylation sur la Ser353 de CDC25B, une forme de la phosphatase qui n'est plus phosphorylable sur cette sérine est toujours relocalisée dans le cytoplasme après un traitement à l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ou sa co-expression avec AKT/PKB activée. Mais elle perd sa localisation nucléaire plus lentement que la protéine sauvage. L'ensemble de ces résultats indiquent que la protéine kinase AKT/PKB participe à la régulation de la localisation de CDC25B.

**PKB/Akt phosphorylates the CDC25B phosphatase and regulates its intracellular localisation**

Véronique BALDIN<sup>§,£</sup>, Nathalie THEIS-FEBVRE<sup>§</sup>, Clarisse BENNE, Carine FROMENT\*, Martine CAZALES, Odile BURLET-SCHILTZ\* and Bernard DUCOMMUN

Running title: Akt regulates CDC25B localisation

LBCMCP-CNRS UMR5088- IFR109 "Institut d'Exploration Fonctionnelle des Génomes"

Université Paul Sabatier, 118 route de Narbonne, 31062 TOULOUSE, FRANCE

Tel: (33) 5 61 55 81 10

Fax: (33) 5 61 55 81 09

\*IPBS – CNRS UMR5089 205 route de Narbonne, 31077 TOULOUSE

£ Present address: CRBM – FRE 2593, 1919 Route de Mende, 34293 MONTPELLIER

§ These authors equally contributed to the work.

Corresponding author : Bernard DUCOMMUN

Number of pages : 21

Number of figures : 5

Tables : 1

**SUMMARY**

Regulation of the intracellular localisation of its actors is one of the key mechanisms underlying cell cycle control. CDC25 phosphatases are activators of Cyclin-Dependent Kinases (CDK) that undergo nucleo-cytoplasmic shuttling during the cell cycle and in response to checkpoint activation. Here we report that the protein kinase PKB/Akt phosphorylates CDC25B on serine 353, resulting in a nuclear export-dependent cytoplasmic accumulation of the phosphatase. Oxidative stress activates PKB/Akt and reproduces the effect on CDC25B phosphorylation and localisation. However, inhibition of PKB/Akt activity only partially reverted the effect of oxidative stress on CDC25B localisation and mutation of serine 353 abolishes phosphorylation but only delays nuclear exclusion. These results indicate that additional mechanisms are also involved in preventing nuclear import of CDC25B. Our findings identify CDC25B as a target of PKB/Akt and provide new insight into the regulation of its localisation in response to stress-activated signalling pathways.

**Keywords :**

Cell cycle, CDC25B, PKB/Akt, Nuclear export, Oxidative stress, mass spectrometry

**INTRODUCTION**

The CDC25B protein is one of the three human members of a family of dual-specificity phosphatases that play an essential role in the control of the activity of key cell cycle regulators, the cyclin-dependent kinases (CDKs). CDC25B is proposed to act as a starter of mitosis, that triggers the initial steps leading to the activation of the CDK1-cyclin B complex (Nilsson & Hoffmann, 2000). The mitosis-inducing activity of CDC25B is thought to be tightly linked to its intracellular localisation, which, in turn, has been shown to be regulated by nuclear import and export sequences (Davezac et al., 2000), interaction with partners of the 14.3.3 family (Davezac et al., 2000; Forrest & Gabrielli, 2001) and phosphorylation (Baldin et al., 2002; Bulavin et al., 2001). Although several regulatory processes have already been unravelled, a number of mechanisms that connect CDC25B function to the major signal transduction pathways probably still remain to be deciphered. Protein kinase PKB/Akt, a member of the second messenger-regulated subfamily of protein kinases, is a key mediator of signal transduction processes and is involved in the control of insulin signalling, cell proliferation and survival (ref (Brazil & Hemmings, 2001; Datta et al., 1999) and references therein). It has been proposed to participate in cell cycle control through its interaction with several factors such as the Forkhead family of transcription factors, GSK3 kinase (Lawlor & Alessi, 2001), the p21Cip1/Waf1 cyclin-dependent kinase inhibitor (Zhou et al., 2001) and, more recently, the mitotic inhibitor Myt1 kinase (Okumura et al., 2002). Phosphorylation by PKB/Akt has also been shown to modulate the intracellular localisation of several of its substrates such as BRCA-1 (Altiok et al., 1999), p27Kip1 (Collado et al., 2000), p21cip1 (Zhou et al., 2001), AHNAK (Sussman et al., 2001), FKHRL1 (Brunet et al., 1999) and MDM2 (Mayo & Donner, 2001).

In this study, we show that CDC25B is a direct target of PKB/Akt phosphorylation *in vitro* and *in vivo*, and that phosphorylation of CDC25B by PKB/Akt contributes to nuclear exclusion of CDC25B.

## **MATERIALS AND METHODS**

## **DNA CONSTRUCTS**

pcDNA<sub>3</sub> derived plasmids expressing CDC25B and mutants are described elsewhere (Davezac et al., 2000). Mutation of serine 353 was generated by PCR mutagenesis on pcDNA<sub>3</sub>-HA-CDC25B3 plasmid. pMAL-CDC25B3 was constructed by insertion of human CDC25B3 cDNA in the pMAL-C2 vector (Biolabs). The construction of pEGFP-CDC25B will be described elsewhere (Mils et al., In press). pcDNA<sub>3</sub>-AKT-CA, pcDNA<sub>3</sub>-HA-AKT-CA, pcDNA<sub>3</sub>-HA-AKT-KD and pcDNA<sub>3</sub>-HA-AKT-DN were a generous gift from Dr. T. Franke (Columbia University, New York). pcDNA3 constructs encoding PI3K constitutively activated forms p110 (CAAX membrane targeting sequence at the C-terminus) and p110\* (a K227E point mutation in the catalytic domain) were generous gift from Dr. A. Eychene (Institut Curie, Paris).

**CELL CULTURE CONDITIONS**

HeLa cells and U2OS cells were grown as previously described (Davezac et al., 2000). The U2OS cell line conditionally expressing HA-tagged CDC25B1 (under the control of the tet-promoter) is described in reference (Theis-Febvre et al., 2003). HeLa and U2OS cells were transfected using Exgen-500 (Euromedex) following the manufacturer's instructions. Hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, Sigma) was used at the concentration of 400 μM. When protein kinase inhibitors were used, cells were treated with either 200 nM Wortmanin (Calbiochem), 10 μM Akt inhibitor (Calbiochem) or 10 μM SB 202190 (Calbiochem) 1 hour prior to the addition of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.



**IMMUNOFLUORESCENCE**

HeLa and U2OS cells seeded on glass coverslips were transfected and /or induced for CDC25B expression by tetracycline removal, then were fixed and permeabilised after 18 or 24 hours (Baldin et al., 1993). HA-tagged proteins were detected using 12CA5 mouse monoclonal antibody (Roche) and Alexa-594 conjugated goat anti-mouse antibody (Molecular Probes Inc.). CDC25B and AKT-CA were detected with anti-CDC25B (sc-20, Santa Cruz) and anti-AKT (#9272, Cell Signalling) respectively. DNA was visualised using Hoechst 33258 at 1µg/ml (Sigma). Polyclonal antibody against phosphorylated serine 353 (SE96) was raised against the QNKRRRS(p)VTPPEEQ peptide then affinity-purified on phosphorylated and unphosphorylated peptide columns.

## **CELL LYSATES**

Cells were lysed in buffer A (20 mM Tris, pH7.5, 137 mM NaCl, 20 mM NaF, 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 1% NP40, 10% Glycerol) in the presence of protease inhibitors: leupeptin (5µg/ml), aprotinin (5µg/ml), trypsin inhibitor (10µg /ml), TPCK (20µg /ml), TLCK (20µg /ml), PMSF (17µg /ml) and calpain inhibitor I (20µg /ml), during 30 min. on ice, and centrifuged at 14,000 rpm for 10 min. at 4°C. Western blot analyses were performed with anti-CDC25B (anti C-terminal peptide antibody), anti-AKT (#9272), anti-P-AKT (#9271) (Cell Signaling) and anti S353phospho CDC25B (this work). Immunoprecipitation with anti-HA monoclonal antibodies (Roche) were performed as described (Theis-Febvre et al., 2003).

### ***Production of recombinant proteins, in vitro kinase assays and mass spectrometry analyses***

MBP-CDC25B3 et MBP-CDC25B3-S353A were produced in JM109 bacteria and purified by affinity on amylose beads following the manufacturer's instructions. Recombinant proteins (100 ng) were incubated in 20 µl of kinase buffer (20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 18.75 mM MgCl<sub>2</sub>, 25 mM β-glycerophosphate, 5 mM EGTA, 1 mM DTT and 50 µM ATP) with 160 ng of purified recombinant AKT (Euromedex) and 5 µCi of <sup>32</sup>P-γ-ATP (NEN) at 30°C for 30 min. The reaction was stopped by addition of 5 µl of 5X Laemmli sample buffer, separated by SDS-PAGE and analysed by autoradiography. In-gel digestion and on line Nano-LC-MS/MS analyses were performed using capillary HPLC (LC Packings) coupled to an LCQ ion trap mass spectrometer (ThermoFinnigan) as described (Theis-Febvre et al., 2003) except for MS/MS acquisition where MS/MS spectra of precursor ions of interest were continuously acquired over the run with an isolation window of 2 m/z and a relative collision energy of 20%.

## **RESULTS**

### ***PKB/Akt induces CDC25B nuclear export***

We asked whether CDC25B might be regulated by the PKB/Akt kinase. To address this issue, we first examined the consequences of Akt expression on the intracellular localisation of CDC25B. To this end, we used HA-tagged, constitutively activated (Akt-CA) and kinase-dead (Akt-KD) mutants of PKB/Akt that were transiently co-transfected with GFP-tagged CDC25B in HeLa cells. In agreement with previous observations, about 20 % and 25% of control GFP-CDC25B-transfected cells displayed exclusive nuclear and cytoplasmic staining respectively (Baldin et al., 2002; Davezac et al., 2000). The expression of Akt-CA massively induced relocalisation of CDC25B to the cytoplasm, with more than 60% of the cells displaying a total absence of nuclear staining. In contrast, transfection with the kinase-dead Akt mutant had no effect on the subcellular localisation of CDC25B (Fig 1A and 1B). Similar observations were made when HeLa cells were transfected with His-tagged CDC25B together with HA epitope-tagged Akt (data not shown) or when U2OS cells lines, stably and conditionally expressing three CDC25B splice variants (Baldin et al., 1997; Theis-Febvre et al., 2003), were transfected with untagged Akt (Fig. 1C). This issue was further investigated in U2OS cells expressing HA-tagged CDC25B transfected with p110(CAAX) and p110\*(K227E), two constitutively activated forms of PI3K that are known to activate PKB/Akt. As shown in figure 1D, p110(CAAX) and p110\* expression led to the relocalisation of CDC25B to the cytoplasm.

### **PKB/Akt phosphorylates CDC25B on serine 353 in vitro and in vivo**

We next examined the in vitro phosphorylation of CDC25B by recombinant purified Akt. We found that recombinant MBP-CDC25B was readily phosphorylated by Akt, whereas MBP tagged protein was not (Fig. 2A). All three variants of CDC25B were identically phosphorylated by Akt (data not shown). Mass spectrometry analysis of Akt-phosphorylated recombinant MBP-CDC25B indicated a mono-phosphorylation on the peptide sequence  $_{353}\text{SVTPPEEQQEAE}EPK_{367}$  (Fig. 2B). The observed fragment ions confirmed the peptide sequence and the presence of a single phosphate group on serine 353. Furthermore, mass spectrometry analysis of CDC25B protein immuno-purified from baculovirus-infected *Sf9* cells also revealed substantial phosphorylation of the Ser-353 residue (data not shown).

Serine 353 is located in a putative consensus sequence for phosphorylation by Akt (QNKRRRSSVT)(Yaffe et al., 2001); a mutant of this residue (S353A) was therefore

generated and expressed as a fusion with MBP. In vitro phosphorylation of this mutant protein by Akt was abolished, as demonstrated using an affinity-purified polyclonal antibody that was raised against this phosphorylated epitope (Fig. 2C). This antibody recognised Akt-phosphorylated CDC25B, but not S353A-CDC25B, and its labelling was competitively inhibited by the phosphorylated immunogenic peptide. Phosphorylation of CDC25B on serine 353 was next examined *in vivo* in HeLa cells that were transfected to express constitutively activated PKB/Akt (Akt-CA) or a kinase dead mutant (Akt-KD) together with wild type YFP-tagged CDC25B. Phosphorylation of CDC25B was examined in co-transfected cells by immunofluorescence staining using the anti S353 phospho-CDC25B antibody. As summarized in table I, CDC25B phosphorylation was observed on about 33 % of the cells that were transfected with kinase dead PKB/Akt, indicating that this site was probably phosphorylated by endogenous Akt or by another unidentified kinase. However, phosphorylation of CDC25B on serine 353 was significantly increased upon expression of the activated form of PKB/Akt, with about 63 % of the transfected cells that were labelled with the anti phospho CDC25B antibody, indicating that PKB/Akt was able to phosphorylate CDC25B *in vivo*.

***PKB/Akt-induced cytoplasmic accumulation of CDC25B is dependent on Crm1 but not on its NES***

Since CDC25B has been shown to shuttle between cytoplasm and nucleus (Davezac et al., 2000), we next examined whether Akt-induced cytoplasmic accumulation of CDC25B required prior nuclear targeting and was dependent on its NES. As shown in Figure 3A, a CDC25B containing a point mutation of the nuclear export sequence (NES<sup>-</sup>) (Davezac et al., 2000) was mostly located in the nucleus but was fully relocated to the cytoplasm when co-expressed with the Akt-CA kinase. In contrast, when the CRM1 inhibitor, Leptomycine B (LMB) was used, both wild-type CDC25B and mutant NES<sup>-</sup> CDC25B proteins were found mainly in the nucleus and were not relocated to the cytoplasm upon PKB/Akt expression. Taken together, these results indicate that Akt-dependent phosphorylation of CDC25B occurs in the nucleoplasm. Furthermore, they suggest that its cytoplasmic relocation is not dependent on the integrity of the known CDC25B NES sequence, but requires a functional nuclear export machinery since it is inhibited by LMB.

### ***Activation of PKB/Akt by oxidative stress triggers CDC25B phosphorylation and cytoplasmic relocation***

We next decided to investigate the physiological relevance of the above reported observations. We chose to examine the regulation of the localisation of CDC25B during oxidative stress induced by hydrogen peroxide, a condition known to activate PKB/Akt (Wang et al., 1998; Wang et al., 2000). As already reported, addition of 0.4mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> to the HeLa cell culture medium rapidly led to the activation of Akt. The same effect was also obtained in U2OS cells as monitored by phospho-Akt detection or electrophoretic mobility shift (see Fig. 4C)(Wang et al., 2000). Under these conditions, CDC25B was massively relocated to the cytoplasm (Fig. 4A) and was phosphorylated, as indicated by the accumulation of forms displaying slow electrophoretic mobility (Fig. 4C). To confirm phosphorylation of CDC25B on serine 353, cells expressing CDC25B were treated or not with 0.4mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 30 min., CDC25B was immunoprecipitated and its phosphorylation was assessed using the antibody against phosphorylated S353. As shown in figure 4B, although the level of immunoprecipitated CDC25B was lower, phosphorylation of CDC25B was found to be strongly increased in cells treated with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

We next examined whether inhibition of Akt activity could revert the effect of oxidative stress on CDC25B localisation. First, treatment of U2OS-HA-CDC25B1 cells with 200 nM Wortmanin, which blocks PI3K, inhibited Akt activation, as confirmed by western blot (Fig. 4C), partially prevented cytoplasmic relocation of CDC25B after oxidative stress, as did 1L, a more specific inhibitor of Akt (Hu et al., 2000) (Fig 4D). Inhibition of p38 by SB202190 also partially counteracted the cytoplasmic transfer, and use of both Wortmanin and SB202190 was slightly more effective (Fig4C and D). Second, a partial abrogation (about 50% decrease) of exclusive cytoplasmic relocation after hydrogen peroxide-induced oxidative stress was also observed when CDC25B-transfected HeLa cells were co-transfected to express either a dominant-negative (DN) or a kinase-dead (KD) PKB/Akt protein (Fig. 4E).

### **Mutation of Serine 353 delays CDC25B nuclear exclusion**

Finally, the kinetics of relocation of wild-type CDC25B from the nucleus to the cytoplasm after treatment with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> was examined and compared with those of serine 353 to alanine CDC25B mutant. As shown in Figure 5, wild-type CDC25B was significantly and reproducibly more rapidly excluded from the nucleus than the CDC25B-S353A mutant protein. However after 30 minutes exclusive nuclear localisation was abolished in both cases.

## **DISCUSSION**

CDC25B has been proposed to act as an initiator of the early events leading to mitosis (Nilsson & Hoffmann, 2000). The intracellular localisation of this protein is therefore probably a critical factor in the control of its function. It has been shown that CDC25B shuttles from the nucleus to the cytoplasm by a mechanism that is dependent on NES and NLS sequences and on the interaction with 14.3.3 family members (Davezac et al., 2000; Forrest & Gabrielli, 2001). We have shown that it is active as a mitotic inducer when it is retained in the nucleus following CDK1 phosphorylation (Baldin et al., 2002). In relocating CDC25B to the cytoplasm, PKB/Akt therefore down-regulates its function and acts as an inhibitor of entry into mitosis. PKB/Akt is a well characterised survival factor that plays a role in the response to several types of cellular stress and injuries (Datta et al., 1999). It acts through several pathways, including induction of IKK-dependent survival genes, inhibition of forkhead transcription factor-dependent death genes, and direct inhibition of bad and caspase 9. Our study suggests that, for instance in response to oxidative stress, the relocalisation of CDC25B by Akt prevents, in cooperation with other pathways, illegitimate cell cycle progression at any stage involving CDC25B function within the nucleus.

As demonstrated in this study, several pathways probably act synergistically to exclude CDC25B from the nucleus following oxidative stress. Kinetic analysis of CDC25B relocalisation from the nucleus to the cytoplasm reveals that, while the earliest events in the response to oxidative stress are dependent on S353 phosphorylation by Akt, additional mechanisms are involved at latter stages to prevent CDC25B nuclear re-import. Use of inhibitors suggests that the p38 kinase, by phosphorylating serine 323 (an event that contributes to cytoplasmic retention), is one of the choreographers in this response. In a tentative model, we suggest that, phosphorylation of CDC25B by Akt on serine 353 participates to the activation of its export by an active nuclear export process, while, concomitantly, a cytoplasmic machinery is also turned on to retain and sequester CDC25B in the cytosolic compartment. Serine 353 is located nearby the CDC25B NLS as this is also the case for BRCA1 and p21Cip1. One can therefore speculate that phosphorylation of this site by PKB/Akt may also affect the efficiency of this signal.

Phosphorylation and inhibition of the Myt1 kinase has recently been reported to participate in driving the meiotic G2/M transition after progesterone induction (Okumura et al., 2002). Akt-dependent relocalisation of CDC25B to the cytoplasm may well also contribute to the progression towards mitosis by promoting its inactivation or regulating its access to specific substrates, thereby triggering in a timely coordinated way the subsequent steps of this process. Together with previous findings, the identification of an Akt-dependent regulation of CDC25B reveals new aspects of the complex machinery that drives the cell cycle and links it to the major signal transduction pathways.

**ACKNOWLEDGEMENTS**

We gratefully acknowledge J. Hyams and J. Smith for invaluable comments and suggestions, T. Frank, U. Hibner and A. Eychene for the gift plasmids. N. Theis-Febvre was a recipient of a fellowship from the Association pour la Recherche contre le Cancer. This work was supported by the C.N.R.S, l'Université Paul Sabatier, la Région Midi-Pyrénées, le pôle ARECA "Protéomique et Cancer" and la Ligue Nationale Contre le Cancer to BD (Equipe labellisée 2001).

## REFERENCES

- Altiok, S., Batt, D., Altiok, N., Papautsky, A., Downward, J., Roberts, T.M. & Avraham, H. (1999). *J Biol Chem*, **274**, 32274-8.
- Baldin, V., Cans, C., Superti-Furga, G. & Ducommun, B. (1997). *Oncogene*, **14**, 2485-2495.
- Baldin, V., Lukas, J., Marcote, M.J., Pagano, M. & Draetta, G. (1993). *Genes and Development*, **7**, 812-821.
- Baldin, V., Pospelov, K., Cazales, M., Cans, C. & Ducommun, B. (2002). *J Biol Chem*, **277**, 35176-82.
- Biemann, K. (1990). *Methods Enzymol*, **193**, 886-7.
- Brazil, D.P. & Hemmings, B.A. (2001). *Trends Biochem Sci*, **26**, 657-64.
- Brunet, A., Bonni, A., Zigmond, M.J., Lin, M.Z., Juo, P., Hu, L.S., Anderson, M.J., Arden, K.C., Blenis, J. & Greenberg, M.E. (1999). *Cell*, **96**, 857-68.
- Bulavin, D.V., Higashimoto, Y., Popoff, I.J., Gaarde, W.A., Basrur, V., Potapova, O., Appella, E. & Fornace, A.J., Jr. (2001). *Nature*, **411**, 102-7.
- Collado, M., Medema, R.H., Garcia-Cao, I., Dubuisson, M.L., Barradas, M., Glassford, J., Rivas, C., Burgering, B.M., Serrano, M. & Lam, E.W. (2000). *J Biol Chem*, **275**, 21960-8.
- Datta, S.R., Brunet, A. & Greenberg, M.E. (1999). *Genes Dev*, **13**, 2905-27.
- Davezac, N., Baldin, V., Gabrielli, B., Forrest, A., Theis-Febvre, N., Yashida, M. & Ducommun, B. (2000). *Oncogene*, **19**, 2179-85.
- Forrest, A. & Gabrielli, B. (2001). *Oncogene*, **20**, 4393-401.
- Hu, Y., Qiao, L., Wang, S., Rong, S.B., Meuillet, E.J., Berggren, M., Gallegos, A., Powis, G. & Kozikowski, A.P. (2000). *J Med Chem*, **43**, 3045-51.
- Lawlor, M.A. & Alessi, D.R. (2001). *J Cell Sci*, **114**, 2903-10.
- Mayo, L.D. & Donner, D.B. (2001). *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 11598-603.
- Mils, V., Lee, S., Joly, W., Wong, C.H., Baldin, V., Wayne, M., Ducommun, B. & Tsui, S. (In press). *Exp. Cell Research*.
- Nilsson, I. & Hoffmann, I. (2000). *Prog Cell Cycle Res*, **4**, 107-14.
- Okumura, E., Fukuhara, T., Yoshida, H., Hanada Si, S., Kozutsumi, R., Mori, M., Tachibana, K. & Kishimoto, T. (2002). *Nat Cell Biol*, **4**, 111-6.
- Sussman, J., Stokoe, D., Ossina, N. & Shtivelman, E. (2001). *J Cell Biol*, **154**, 1019-30.
- Theis-Febvre, N., Filhol, O., Froment, C., Cazales, M., Cochet, C., Monsarrat, B., Ducommun, B. & Baldin, V. (2003). *Oncogene*, **22**, 220-32.
- Wang, X., Martindale, J.L., Liu, Y. & Holbrook, N.J. (1998). *Biochem J*, **333**, 291-300.
- Wang, X., McCullough, K.D., Franke, T.F. & Holbrook, N.J. (2000). *J Biol Chem*, **275**, 14624-31.
- Yaffe, M.B., Leparo, G.G., Lai, J., Obata, T., Volinia, S. & Cantley, L.C. (2001). *Nat Biotechnol*, **19**, 348-53.
- Zhou, B.P., Liao, Y., Xia, W., Spohn, B., Lee, M.H. & Hung, M.C. (2001). *Nat Cell Biol*, **3**, 245-52.



**FIGURES LEGENDS:****Figure 1 : Expression of PKB/Akt targets CDC25B to the cytoplasm**

(A,B) Asynchronous HeLa cells were transiently transfected with pcDNA<sub>3</sub> plasmids encoding GFP-tagged CDC25B, constitutively active HA-PKB/Akt (Akt-CA) and kinase-dead HA-PKB/Akt (Akt-KD). Cells were fixed 18 hours after transfection and immunofluorescence staining was performed with anti-HA antibodies. Photomicrographs of cells displaying representative patterns observed in each condition are shown in (A). The percentages of cells displaying exclusively nuclear and cytoplasmic localisation in each experimental treatment are shown in (B). Data were obtained from 5 independent experiments, with at least 200 transfected cells examined per experiment. The S.E. is indicated.

(C) U2OS cell lines conditionally expressing HA-epitope tagged CDC25B1-3 splicing variants under the control of the tetracycline regulatable promoter were or were not transiently transfected with pcDNA plasmids encoding untagged PKB/Akt (Akt-CA). Cells were fixed after 18 hours and immunofluorescence staining was performed with anti-HA and anti-Akt antibodies. The percentages of cells displaying nuclear and cytoplasmic staining were obtained from 3 independent experiments with at least 200 transfected cells examined per experiment. The S.E. is indicated.

(D) U2OS cell lines conditionally expressing HA-epitope tagged CDC25B2 as in (A) were or not transiently transfected with pcDNA plasmids encoding p110 (CAAX) or p110 (K227E), two constitutively activated forms of PI3K. Cells were fixed after 18 hours and immunofluorescence staining was performed with anti-HA antibodies. The percentages of cells displaying nuclear and cytoplasmic staining were obtained from 3 independent experiments with at least 200 cells (transfected or not) examined per experiment. The S.E. is indicated.

**Figure 2 : PKB/Akt phosphorylates CDC25B on serine 353**

(A) Recombinant MBP-CDC25B or MBP proteins (100 ng) were incubated with or without purified recombinant Akt (160 ng) in the presence of <sup>32</sup>P-γ-ATP for 30 min. at 30°C. The samples were analysed on 8% SDS-PAGE then autoradiographed.

(B) MS/MS spectrum of the monophosphorylated peptide, 353-SVTPPEEQEAEK-367 (doubly charged precursor ion, MH<sub>2</sub><sup>2+</sup>, at m/z 889.9) displays series of b- and y-ions (according to Biemann's nomenclature (Biemann, 1990)), indicating that the serine 353 residue is phosphorylated.

(C) Recombinant MBP-tagged CDC25B or S353A-CDC25B proteins were incubated with or without purified recombinant Akt as described in (A) in the presence of cold ATP for 30 min. at 30°C. The samples were analysed by Western blot with monoclonal anti-CDC25B (C20) or affinity-purified polyclonal anti-serine 353 phosphorylated epitope (SE96), in the presence or absence of phosphorylated competing peptide QNKRRRS(p)VTPPEEQ. Despite affinity purification, the residual presence of Ig against unphosphorylated epitopes is responsible for the faint labelling observed with unphosphorylated wild-type CDC25B.

**Figure 3 : Akt –dependent relocalisation of CDC25B depends on the CRM1 pathway but not on CDC25B NES**

Asynchronous HeLa cells were transiently transfected with pcDNA<sub>3</sub> plasmids encoding HA-tagged wild-type or NES mutant CDC25B protein, and constitutively active PKB/Akt (Akt-CA). Cells were either untreated or treated with 20 ng/ml LMB for 2 hours prior to fixation. Cells were fixed after 18 hours and immunofluorescence staining was performed with anti-HA and anti-Akt antibodies. The percentages of cells displaying nuclear and cytoplasmic localisation were obtained from 4 independent experiments with at least 200 transfected cells examined per experiment. The S.E. is indicated

**Figure 4 : Hydrogen peroxide activates Akt and triggers phosphorylation and cytoplasmic relocalisation of CDC25B.**

(A) HeLa cells were transiently transfected with pcDNA<sub>3</sub> plasmid encoding HA-tagged CDC25B1 wild-type protein and were then either untreated or treated with 0.4mM hydrogen peroxide for 30 min. prior to fixation. Cells were fixed 24 hours after transfection and immunofluorescence staining was performed with anti-HA antibodies. Photomicrographs of cells displaying a representative pattern observed after H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatment are shown.

(B) U2OS cells expressing HA-tagged CDC25B1 under the control of the tetracycline regulatable promoter were induced (-tet) or not(+tet) during 24hours and treated or not with 0.4mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 30 minutes. CDC25B was immunoprecipitated with anti-HA monoclonal antibodies, split in two samples and subjected to western blot analysis with anti-S353 phospho CDC25B antibodies (top panel) and with anti-CDC25B antibodies (lower panel).

(C, D) U2OS-HA cells expressing CDC25B1 were processed as in (A). Treatment with 200 nM Wortmanin, 10µM Akt inhibitor 1L (1L-6 hydroxymethyl-chiro-inositol2(R)-2-O-methyl-2-O-octade cylcarbonate) and 10µM SB202190 was performed 1 hour prior to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> addition.

A Western blot (C) of the samples (100 µg) was probed with anti-CDC25B and anti-AKT antibodies. The percentage of cells (D) displaying nuclear and cytoplasmic localisation was obtained from 4 independent experiments with at least 400 cells examined per experiment.

(E) HeLa cells were co-transfected with pcDNA<sub>3</sub>-CDC25B (untagged) and as indicated with plasmids encoding HA-epitope tagged Akt wild-type (WT), dominant-negative (DN) and kinase-dead (KD). The cells were treated 18 hours after transfection with 0.4 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 30 min. and were then fixed and processed for CDC25B and Akt immunodetection. The percentage of cells displaying nuclear and cytoplasmic localisation after H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatment was obtained from 3 independent experiments with a total of 600 to 800 transfected cells examined.

**Figure 5 : Kinetics of nuclear exclusion of CDC25B after hydrogen peroxide treatment.**

HeLa cells were transfected with pcDNA<sub>3</sub>-CDC25B wild-type or S353A mutant (HA-tagged). The cells were treated 18 hours after transfection with 0.4 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for the indicated time, then fixed and processed for CDC25B immunodetection. The percentage of cells displaying an exclusive nuclear localisation after H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatment

was determined. This experiment is representative of highly reproducible observations that were made with 3 independent experiments.

**Table I**

In vivo phosphorylation of CDC25B on S353 in cells expressing PKB/Akt

	<i>CDC25B S353 phosphorylation</i>		<i>Number of cells</i>
	<i>Positive</i>	<i>Negative</i>	
<i>Akt CA + CDC25B</i>	63 %	37 %	308
<i>Akt KD + CDC25B</i>	33 %	67 %	308

HeLa cells were co-transfected to express HA-tagged PKB/Akt constitutively activated (CA) or kinase dead mutant (KD) together with YFP-CDC25B. Immunofluorescence staining with the affinity purified antibody against phosphorylated serine 353 was performed. Cells were examined and doubly transfected cells (HA and YFP positives) were scored as positive or negative for S353 phosphorylation. The total number of cells examined in each of the experiments is indicated. Note that a 1/100,000 dilution of the antibody against phosphorylated CDC25B was used to lowered the strong unspecific staining that is observed at a lower dilution because of the very high level of CDC25B expression.

### 3/ *Conclusion, discussion, modèle.*

Dans ce deuxième travail, nous avons montré que la surexpression d'une forme activée de la kinase AKT/PKB induit une relocalisation cytoplasmique de CDC25B. Ce phénomène n'est pas observé avec une forme catalytiquement inactive ou avec un dominant négatif d'AKT/PKB. Ces expériences ont été reproduites à la fois dans les cellules HeLa (co-transfection des deux protéines) et dans les cellules U-2 OS (transfection d'AKT/PKB et induction de CDC25B présente de manière stable), avec différentes étiquettes (HA-CDC25B/AKT non étiquetée, HA-AKT/GFP-CDC25B ou 6His-CDC25B). Cet effet est obtenu pour chacun des trois variants de CDC25B ce qui atteste d'un mécanisme général de régulation pour les différentes isoformes de la phosphatase. L'implication d'AKT/PKB dans le contrôle de la localisation de CDC25B est confortée par le fait que la surexpression de la protéine PI3K qui est en amont d'AKT/PKB et qui l'active, induit également une localisation cytoplasmique de CDC25B.

Nous avons ensuite étudié la phosphorylation *in vitro* de CDC25B par AKT/PKB et avons démontré que les trois variants de la phosphatase sont des substrats *in vitro* d'AKT/PKB. L'analyse en spectrométrie de masse de CDC25B phosphorylée *in vitro* par AKT/PKB, nous a permis d'identifier la sérine 353 (nomenclature CDC25B3). Ceci conforte notre hypothèse de départ selon laquelle AKT/PKB pourrait intervenir dans la régulation de la localisation de CDC25B. En effet, la phosphorylation de Ser353 pourrait être impliquée dans la relocalisation de CDC25B par AKT/PKB suite à une altération de l'environnement de la NLS qui la rendrait inefficace et conduirait à cette modification de la répartition de CDC25B. Lors des analyses par spectrométrie de masse réalisées sur CDC25B purifiée à partir des cellules *Sf9*, la sérine 353 ainsi que la thréonine 355 adjacente ont été retrouvées phosphorylées. La phosphorylation de ce deuxième résidu n'a pas été retrouvée lors de nos analyses de CDC25B3 phosphorylée *in vitro* par AKT/PKB, cependant nous ne pouvons pas l'exclure complètement. En effet, la faible efficacité d'incorporation de phosphate sur CDC25B (<1 mole de phosphate/mole de protéine) obtenue dans nos conditions d'essai kinase, a rendu délicate l'analyse par spectrométrie de masse. Une recherche de phosphorylations sur toute la protéine ne permet de révéler leur présence qu'en réalisant un appel sur le peptide issu de la digestion tryptique qui porte la Ser353, afin d'enrichir l'analyse et observer cette phosphorylation. Il est possible qu'*in vivo* la phosphorylation observée sur la Thr355 par AKT/PKB ou par une autre kinase nécessite au préalable la phosphorylation de la Ser353 ou d'un autre résidu, et qu'*in vitro* ce phénomène ne soit pas reproduit dans nos

conditions. D'autre part, nous avons généré une protéine MBP-CDC25B recombinante et mutée sur la sérine 353 pour qu'elle ne soit plus phosphorylable. Or les essais kinase réalisés révèlent que cette protéine est toujours phosphorylée par AKT/PKB. Même la mutation additionnelle de la thréonine 355 ne permet pas d'abolir la phosphorylation par AKT/PKB, ce qui soulève la question de l'existence de sites supplémentaires que nous devons localiser. Seule la définition de conditions optimales d'essai kinase qui conduiraient à une meilleure efficacité de phosphorylation de CDC25B par AKT/PKB *in vitro*, nous permettrait de déterminer l'existence ou non de sites additionnels de phosphorylation par AKT/PKB sur la phosphatase.

La sérine 353 ayant été clairement identifiée comme site phosphorylé par AKT/PKB, nous avons généré des anticorps polyclonaux spécifiques de ce résidu phosphorylé. Les expériences réalisées en Western Blot confirment qu'ils reconnaissent spécifiquement CDC25B phosphorylée sur ce résidu. De plus les expériences de co-expression de CDC25B avec AKT/PKB révèlent *in vivo* une augmentation de la phosphorylation sur la Ser353 en présence de la forme constitutivement active de la kinase par rapport à la co-expression de la forme kinase morte d'AKT/PKB. Ce résultat est un indicateur fort de la capacité d'AKT/PKB à phosphoryler CDC25B sur cette sérine *in vivo*. Ces anticorps sont donc des outils précieux qui vont nous permettre de suivre la phosphorylation de ce résidu au cours du cycle cellulaire ou lors de stress. Ainsi ils nous permettront d'aborder la question du contrôle dans le temps et au niveau subcellulaire de la phosphorylation sur la Ser353 de CDC25B.

L'ensemble de ces données nous indiquent clairement qu'AKT/PKB phosphoryle *in vitro* et *in vivo* CDC25B sur la sérine 353 ainsi que sur d'autres résidus non identifiés.

Ensuite, l'utilisation d'un mutant de CDC25B qui n'est plus exporté du noyau (CDC25B-NES<sup>-</sup>) ainsi qu'une drogue, la leptomyicine B, indique que la modification de localisation de CDC25B est indépendante de sa séquence d'export nucléaire (NES) mais dépendante en partie du système d'export par la protéine CRM1. Or il a été démontré au laboratoire que l'export nucléaire de CDC25B est dépendant et de sa NES et de CRM1. Ces résultats suggèrent donc qu'un autre système d'export serait impliqué dans cette relocalisation mais soulèvent également de nombreuses questions. AKT/PKB pourrait-elle servir de cargo pour l'export de CDC25B ? Ou bien favorise-t-elle l'interaction entre la phosphatase et d'autres protéines d'export ? Une étude plus détaillée de l'export nucléaire de CDC25B doit être envisagée afin de clarifier cette relocalisation de CDC25B induite par AKT/PKB.

Afin de nous rapprocher des conditions physiologiques, nous avons cherché à activer la protéine AKT/PKB endogène. Parmi les différents stress ou signaux que nous avons testé

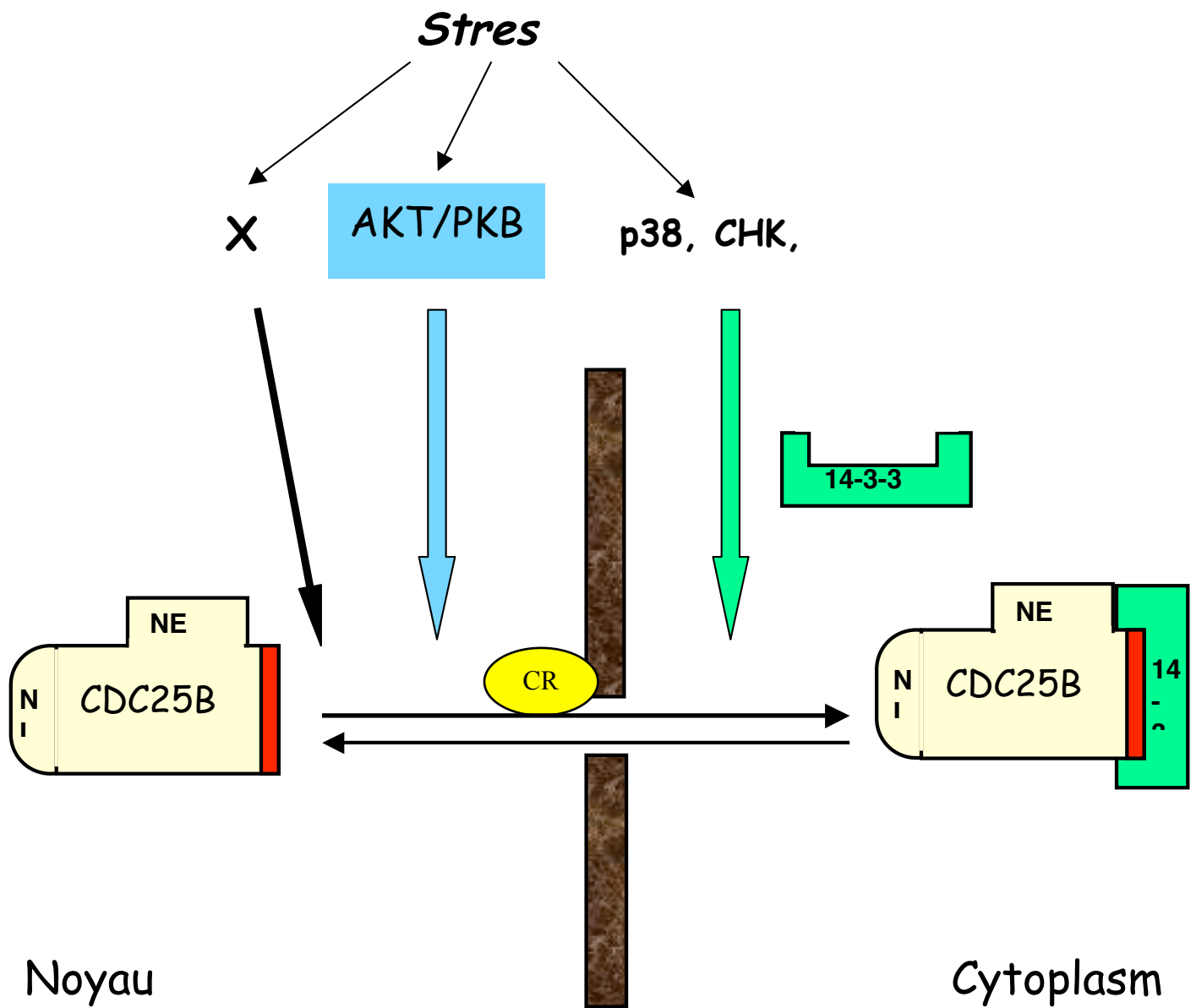
(insuline, dommages à l'ADN par l'étoposide ou les UV), seul un traitement par l' $H_2O_2$  nous a permis d'obtenir une activation significative et détectable d'AKT/PKB sur nos cellules. Nos conditions expérimentales s'inspirent des travaux de Wang et collègues [574] qui montrent que, en présence d' $H_2O_2$ , une augmentation de l'activité AKT/PKB est détectable dès 5 minutes et maximale à 30 minutes. Que ce soit sur les cellules U-2 OS après induction ou sur les cellules HeLa après transfection, l' $H_2O_2$  induit une relocalisation massive et rapide de CDC25B au niveau du cytoplasme après 30 minutes de traitement. Cette relocalisation de CDC25B est détectable de manière très précoce après l'ajout de l' $H_2O_2$ . En effet, lorsqu'une cinétique de l'export nucléaire de CDC25B après un traitement à l' $H_2O_2$  est réalisée, elle révèle qu'à 5 minutes de traitement, seules 5 % des cellules (contre 20 % au départ) présentent un marquage nucléaire et qu'en parallèle le pourcentage de cellules ne présentant qu'un marquage cytoplasmique augmente. En parallèle à cette modification de la répartition, un changement dans le profil de mobilité électrophorétique de CDC25B est observé ce qui indique une probable phosphorylation de la protéine suite au stress oxydatif. La confirmation de la phosphorylation de CDC25B après traitement à l' $H_2O_2$  est apportée par l'analyse en Western Blot de la phosphatase. En effet, l'utilisation de l'anticorps dirigé contre la Ser353 révèle une augmentation de la phosphorylation sur ce résidu en réponse au stress oxydatif. Par ailleurs, l'implication d'AKT/PKB dans ce phénomène a été confirmée d'une part par l'utilisation d'inhibiteurs chimiques de la kinase mais également de son régulateur en amont, la PI3K, et d'autre part par la co-expression de forme mutante d'AKT/PKB soit catalytiquement inactive (KD) soit à effet négatif dominant (DN). Dans tous les cas, une réversion de la localisation cytoplasmique de CDC25B induite par le traitement des cellules à l' $H_2O_2$  a été obtenue. Mais cette réversion n'étant pas totale, nous avons envisagé la participation à cette régulation de kinases autres qu'AKT/PKB. Une des protéines kinases activées par le stress oxydatif est la kinase p38 [575-575, 576]. De plus, elle participe à la régulation de CDC25B, puisqu'il a été démontré que la phosphorylation de CDC25B par p38 augmente sa liaison aux protéines 14-3-3 et est nécessaire pour l'arrêt en phase G2 des cellules après endommagement de l'ADN par des rayons UV [319]. Comme avec les inhibiteurs d'AKT/PKB et de la PI3K, l'utilisation d'un inhibiteur chimique de p38 reverse partiellement la relocalisation de CDC25B après un traitement à l' $H_2O_2$ . Et l'utilisation synergique de cet inhibiteur avec la Wortmannin, l'inhibiteur de la PI3K, ne permet pas une inhibition totale de la localisation et de la phosphorylation de CDC25B après le traitement à l' $H_2O_2$ . Ce résultat indique qu'en plus d'AKT/PKB et de la kinase p38, d'autres voies

activées par le peroxyde d'hydrogène participent au contrôle de la relocalisation cytoplasmique de CDC25B.

L'implication de ces voies additionnelles de régulation de la localisation de CDC25B induite par le stress oxydatif est confirmée par l'étude de la localisation du mutant de CDC25B non phosphorylable par AKT/PKB sur la sérine 353. Utilisé en transfection transitoire, ce mutant présente la même répartition subcellulaire que la protéine sauvage. Il est également relocalisé en présence des formes activées d'AKT/PKB ou lors de traitements de 30 minutes à l' $H_2O_2$ . Le fait qu'AKT/PKB ne puisse plus agir sur ce mutant est donc suppléé par l'action des voies activées en parallèle et qui sont alors suffisantes pour permettre la relocalisation de la protéine mutante. Par contre, lorsqu'une cinétique plus courte est réalisée, le mutant non phosphorylable sur la sérine 353 présente une perte de la localisation nucléaire qui est retardée par rapport à la protéine sauvage. Même si cette différence n'est pas très élevée (au maximum, un facteur 2 à 5 minutes de traitement), elle est reproductible. Cette différence indique qu'AKT/PKB serait plutôt impliquée dans les événements très précoces de cette relocalisation et notamment dans la sortie du noyau de la protéine juste après le traitement à l' $H_2O_2$ . D'autre part, il est probable que le fait de ne pas avoir identifié tous les sites phosphorylés par AKT/PKB peut expliquer cet effet relativement modeste. Une meilleure compréhension de ce mécanisme de relocalisation viendra peut-être de l'utilisation des anticorps spécifiques de la forme phosphorylée de la Ser353 qui permettra le suivi spécifique de la phosphorylation sur la sérine 353 et donc de faire la distinction entre les événements liés à la phosphorylation par AKT/PKB et ceux liés à l'activation d'autres kinases comme p38.

Parmi les différents travaux envisagés sur cette régulation de CDC25B par AKT/PKB, la mise en évidence d'une interaction *in vivo* entre les deux enzymes est un de nos objectifs. Les premières expériences de co-immunoprécipitations semblent indiquer l'existence d'une interaction entre les deux protéines, mais elle doit être confirmée. Nous envisageons également d'utiliser l'anticorps dirigé contre la sérine 353 phosphorylée pour étudier sa phosphorylation au cours d'un cycle cellulaire normal. Dans la mesure où AKT/PKB est impliquée dans la régulation de la transition G2/M, cette hypothèse doit être soigneusement étudiée. Il nous faudra identifier les sites additionnels de phosphorylation par AKT/PKB en identifiant des conditions expérimentales plus favorables à la phosphorylation *in vitro* de CDC25B par AKT/PKB, mais également décortiquer le mécanisme responsable du





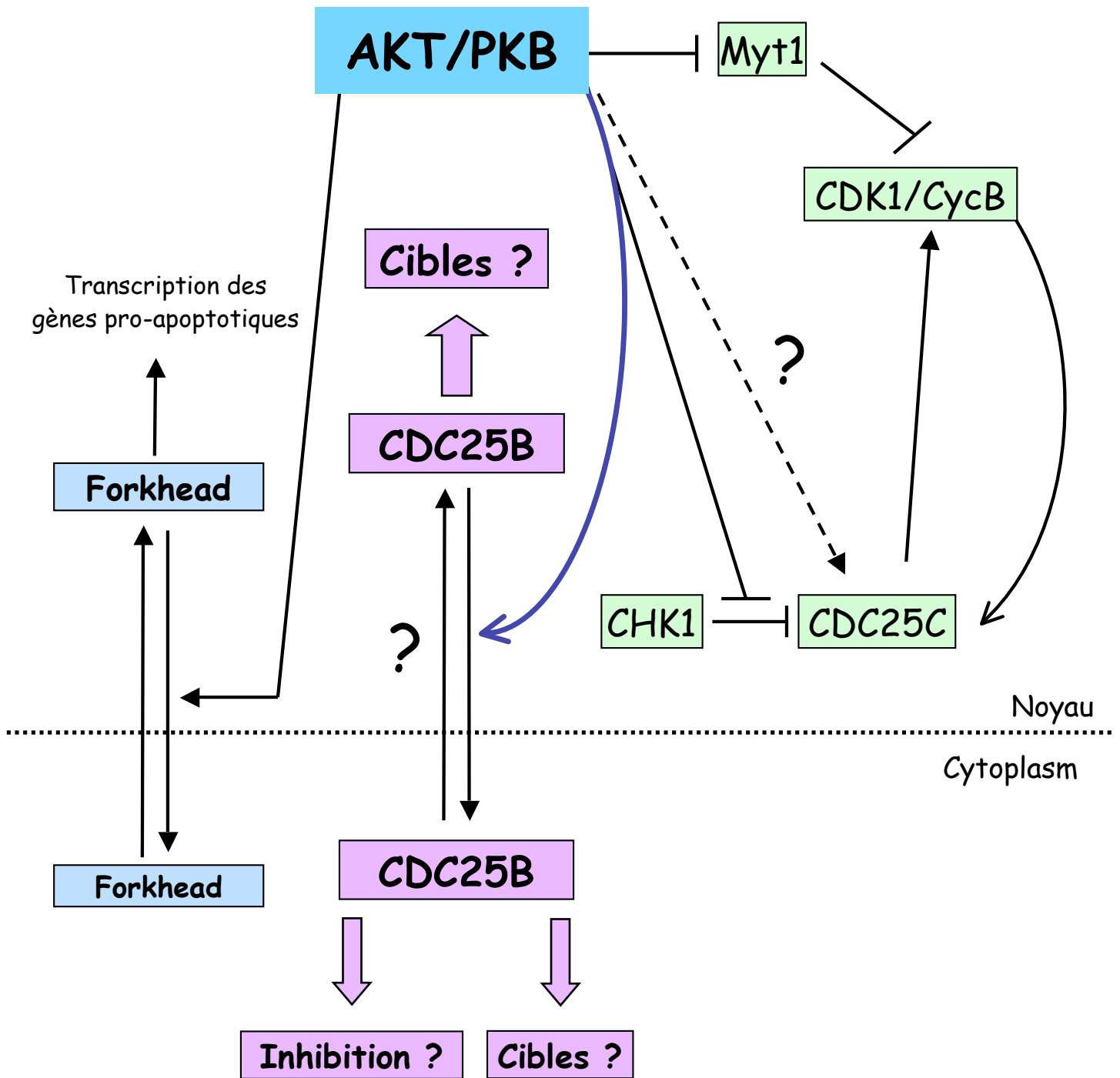
**FIGURE 37 : Modèle de travail**

En phosphorylant CDC25B, AKT/PKB induit la relocalisation de la phosphatase vers le cytoplasme. Dans le cas de stress, l'activation en parallèle de kinases additionnelles comme p38 qui phosphoryle CDC25B et favorise sa liaison aux protéines 14-3-3 et donc sa rétention au niveau cytoplasmique, permet de séquestrer toutes les molécules de CDC25B hors du noyau.

changement de localisation de CDC25B en présence d'AKT/PKB notamment grâce à l'utilisation des anticorps spécifiques de la Ser353 phosphorylée.

Parmi les kinases qui pourraient participer à la relocalisation de CDC25B induite par le stress oxydatif, la kinase SGK (« Serum and Glucocorticoid-induced Kinase ») serait un bon candidat. Elle présente le même consensus de phosphorylation qu'AKT/PKB et est activée par les mêmes stimuli qu'elle puisque son activité est également contrôlée par PDK1. En effet, PDK1 ne régule pas uniquement AKT/PKB [577], mais différentes protéines de la famille AGC dont SGK [495], ce qui lui vaut le surnom de « Master Regulator » par certains auteurs [495, 578]. De plus, ils pensent que, dans les premiers travaux sur AKT/PKB, des effets attribués à AKT/PKB pourraient en réalité être liés à l'activité de SGK [483, 488]. L'utilisation d'inhibiteurs spécifiques de SGK devrait permettre d'explorer son implication potentielle dans le contrôle de la localisation subcellulaire de CDC25B.

En conclusion, ce travail a permis de montrer qu'AKT/PKB régule la répartition subcellulaire de CDC25B et est capable d'induire sa relocalisation au niveau cytoplasmique. Cette relocalisation est certainement un moyen d'inhiber la phosphatase puisque son activité d'inducteur de la mitose est liée à sa localisation nucléaire [236]. Ainsi lorsqu'elle est activée, AKT/PKB exclue CDC25B du noyau et dans le cas du stress oxydatif, elle est relayée par d'autres voies de signalisation dont la p38. Ces résultats nous permettent d'élaborer le modèle de travail suivant (Figure 37) : lors de ce stress, la phosphorylation de CDC25B par AKT/PKB va permettre son exclusion du noyau, puis de manière concomitante elle va être phosphorylée par d'autres kinases dont p38 qui vont participer à son export et permettre sa séquestration cytoplasmique et peut-être sa dégradation comme cela fut montré pour CDC25C [231]. La régulation de CDC25B par AKT/PKB serait donc un moyen d'arrêter le cycle cellulaire et donc de protéger les cellules d'une progression dans le cycle cellulaire illégitime ce qui pourrait conduire à la mort par apoptose (Figure 38). Mais des travaux de plus en plus nombreux indiquent qu'AKT/PKB participe au contrôle de la transition G2/M [558]. En effet, il a été démontré qu'elle phosphoryle et inhibe la kinase MYT1, un inhibiteur de CDK1/cycline B [555]. Elle phosphoryle et inhiberait également CHK1 [556] et elle pourrait réguler CDC25C (Figure 38) [555]. Dans ces conditions, AKT/PKB serait un régulateur positif de l'entrée en mitose. En effet, sa surexpression est inductrice de l'entrée en mitose [557] et nous avons constaté que la surexpression de la forme constitutivement active d'AKT/PKB conduit à l'apparition de cellules rondes avec une chromatine condensée semblables à des cellules en mitose. Pourtant la régulation de CDC25B que nous décrivons, c'est-à-dire une relocalisation cytoplasmique de la phosphatase, est un événement plutôt



**FIGURE 38 : AKT/PKB et CDC25B**

Représentation schématique de deux des grandes voies où AKT/PKB intervient et dans lesquelles la régulation de CDC25B par la kinase peut être intégrée. Deux hypothèses peuvent être avancées :

- L'exclusion nucléaire de CDC25B induite par AKT/PKB pourrait permettre d'éviter une progression dans le cycle cellulaire illégitime et donc favoriser la survie cellulaire.
- La régulation de la localisation de CDC25B par AKT/PKB pourrait faire partie du contrôle normal de l'entrée en mitose et/ou participer à la progression des cellules en phase M.

négatif pour l'action de la phosphatase comme inducteur de l'entrée en phase M [236]. En fait deux hypothèses peuvent être envisagées et l'étude de la cinétique exacte de la phosphorylation de CDC25B au cours du cycle cellulaire devrait nous permettre de trancher. La première hypothèse est que cette relocalisation induite par AKT/PKB est effectivement un moyen d'inhiber CDC25B mais après le déclenchement de la transition G2/M. Ainsi, une fois qu'elle a fini de jouer son rôle de « Starter » de l'entrée en mitose au niveau nucléaire, elle en serait exclue pour laisser la place aux autres régulateurs de la mitose. L'activation concomitante de CDC25C par AKT/PKB (si elle est démontrée) permettrait de poursuivre l'entrée en mitose. L'autre hypothèse est que dans le cas d'un cycle cellulaire normal, cette relocalisation de CDC25B par AKT/PKB ne serait pas un événement négatif mais au contraire un événement nécessaire pour l'entrée en mitose. En effet, la protéine pourrait également être impliquée dans des processus au niveau du cytoplasme et y jouer un rôle qui reste à déterminer, ce qui rejoindrait certains travaux publiés [180]. L'utilisation d'outils comme les anticorps spécifiques d'épitopes phosphorylés devrait nous permettre de mieux comprendre cette régulation de la localisation de CDC25B par AKT/PKB et de déterminer quelles sont ses implications pour la prolifération cellulaire.

# *Conclusion et perspectives*

L'étude des mécanismes de la transformation cellulaire a révélé une forte implication des protéines qui participent au contrôle du cycle cellulaire. En effet, la dérégulation de la prolifération est une des étapes de la progression tumorale. Parmi les molécules du contrôle du cycle cellulaire, les phosphatases CDC25B participent à la tumorigenèse puisqu'elles sont surexprimées dans un certain nombre de cas et sont un facteur de mauvais pronostic pour les malades. Membre de la famille des phosphatases à double spécificité, trois CDC25 dont CDC25B ont été identifiées dans les cellules humaines et participent au contrôle de l'activité de complexes CDK/cycline en des points précis du cycle. Si les régulations de CDC25A et CDC25C sont assez bien documentées, il n'en est pas de même pour CDC25B. Comme les événements de phosphorylation sont très présents dans la régulation du cycle cellulaire par leur rapidité d'exécution et leur aspect transitoire, nous nous sommes intéressés à la régulation des CDC25B par des protéines kinases. Nous avons pu ainsi identifier deux nouveaux régulateurs de cette phosphatase : les protéines kinases CK2 et AKT/PKB.

Dans le cas de CK2, nous avons montré qu'elle phosphoryle les trois variants d'épissage de CDC25B. Une interaction physique entre les deux enzymes a également été caractérisée, interaction médiée par la sous-unité régulatrice de la kinase, CK2 $\beta$ . Et, *in vitro* et *in vivo*, CK2 augmente l'activité catalytique de CDC25B vis-à-vis d'un substrat physiologique, le complexe CDK1/cycline B ou d'un substrat exogène, la FDP. Nos travaux ont donc permis de mettre en évidence que CK2 est un activateur de la phosphatase CDC25B.

AKT/PKB, elle, n'a aucun effet sur l'activité enzymatique de CDC25B. Par contre, elle participe à la régulation de sa localisation intracellulaire. En effet, lorsqu'AKT/PKB est active (transfection d'une forme constitutivement active ou activation de la protéine endogène par un stress oxydatif), elle induit l'accumulation de CDC25B au niveau du cytoplasme. Cet effet semble direct dans la mesure où AKT/PKB phosphoryle CDC25B *in vitro*. Un des résidus phosphorylés a été identifié par une analyse en spectrométrie de masse et sa phosphorylation a ensuite été confirmée par l'utilisation d'un anticorps spécifique de la forme phosphorylée de cet acide aminé. Mais surtout le stress oxydatif provoque une augmentation de la phosphorylation sur Ser353 de CDC25B et une relocalisation de la phosphatase qui sont dépendantes notamment d'AKT/PKB. Donc AKT/PKB participe au contrôle de la localisation intracellulaire de CDC25B notamment lors de stress.

Ainsi l'activité des phosphatases CDC25B est contrôlée par plusieurs mécanismes dont les deux premiers ont fait l'objet de ce travail :

- Régulation de son activité catalytique ici par la protéine kinase CK2
- Régulation de sa localisation intracellulaire en particulier par la kinase AKT/PKB
- Régulation de sa stabilité

Dans les trois cas, un événement de phosphorylation peut être le point de départ de ces mécanismes, ce qui souligne l'importance de ces modifications post-traductionnelles. Or lorsque nous avons réalisé les analyses par spectrométrie de masse sur la protéine CDC25B exprimée dans les cellules *Sf9*, des phosphorylations qui n'avaient jamais été décrites ont été caractérisées. Nous avons alors généré des anticorps spécifiques de la forme phosphorylée de ces différents résidus. Nous espérons que leur utilisation nous permettra d'identifier de nouveaux mécanismes de régulation des phosphatases CDC25B, spécifiques d'un compartiment cellulaire, d'une phase du cycle ou d'un stress, ou bien restreintes à un des variants d'épissage de la phosphatase, et nous permettra également de remonter jusqu'à la (les) kinase(s) qui les contrôlent.

Parmi les kinases candidates qui pourraient réguler CDC25B, les premières qui seront étudiées sont celles qui phosphorylent les deux autres CDC25 humaines. Par exemple nous avons actuellement des indications sur une phosphorylation des CDC25B par les kinases Plk1 et CHK2, même si les implications de ces phosphorylations ne sont pas encore connues. Les CDC25B pourraient être aussi régulées par d'autres modifications post-traductionnelles. En particulier, il serait intéressant d'étudier l'action de Pin-1 sur CDC25B pour savoir si, comme CDC25C, elle est régulée par isomérisation. Cette régulation pourrait ainsi participer au contrôle de l'activité de la phosphatase au cours du cycle cellulaire. Mais elle pourrait avoir d'autres implications. En effet, des travaux récents sur la maladie neuro-dégénérative d'Alzheimer indiquent qu'un certain nombre de protéines du cycle cellulaire sont réactivées dans les neurones des patients atteints de cette maladie dont CDK1, CDC25B, CDC25A et Pin-1 [579-581] (revue : [582]), mais que ces protéines restent au niveau cytoplasmique. Comme les neurones sont des cellules qui ne cyclent plus, ce signal mitotique pourrait être à l'origine de leur dégénérescence. D'ailleurs, un des modèles de travail sur la maladie d'Alzheimer est que, à un moment donné, il y a réactivation des voies de contrôle de l'entrée en mitose via l'apparition d'une activité CDC25 et donc une déphosphorylation des complexes CDK1/cycline B. Cette réactivation serait responsable ensuite de la dégénérescence et de la mort des neurones [580]. Ces événements sont précoces puisqu'ils

sont observables avant l'apparition des anomalies morphologiques de la maladie. Mais leur déclenchement et le pourquoi de leur maintien au niveau cytoplasmique ne sont pas encore connus. Pin-1 pourrait être un de ces événements déclencheur et la régulation potentielle de CDC25B par cette enzyme participerait à la réactivation des voies de contrôle de l'entrée en mitose.

Un autre volet de l'étude des CDC25B concerne l'identification de ses substrats. En effet, si CDC25B est capable de déphosphoryler un certain nombre de complexes CDK/cycline, le ou les complexes sur lesquels elle agit au cours du cycle cellulaire n'a toujours pas été clairement déterminé. De plus, CDC25B a la particularité d'avoir des rôles indépendants de son activité phosphatase, puisqu'il a été démontré qu'elle est un co-facteur des récepteurs aux stéroïdes [198, 199]. Ce rôle de CDC25B a été, pour le moment, uniquement décrit au niveau de la glande mammaire et de la prostate. Cette régulation est-elle spécifique à ces tissus ? Ou bien est-ce un mécanisme d'action plus général des CDC25B ? Et dans ce cas, quels sont les facteurs de transcription qui ont CDC25B comme co-facteur ? D'autre part, le fait que CDC25B ait des rôles dépendants et indépendants de son activité catalytique pose bien sur le problème de son ciblage à ses substrats. Est-ce que la reconnaissance de son substrat est favorisée par des interactions entre les deux protéines ou avec des partenaires ? Ou bien est-ce le contrôle de la localisation subcellulaire de la phosphatase qui joue un rôle prépondérant dans cette reconnaissance ?

Enfin derrière toutes ces questions sur les rôles précis des CDC25B, se profile la question plus générale de leur nécessité pour le développement et le cycle cellulaire. Une première série d'indications nous est apportée par des travaux par invalidation de gènes chez la souris. La première lignée créée fut celle délétée de CDC25C, le régulateur-clé de l'entrée en mitose par son effet activateur sur le complexe CDK1/cycline B. Or les souris CDC25C<sup>-/-</sup> sont parfaitement viables, ne présentent aucune anomalie ni de défauts de croissance ou de fertilité. Des cellules fibroblastiques issues de ces souris ont également été étudiées. Elles ont une répartition normale dans le cycle cellulaire et répondent correctement aux points de contrôle après endommagement de l'ADN [583]. Donc contrairement aux cellules en culture, un organisme est tout à fait capable de se développer en absence d'un des régulateurs de l'entrée en mitose soit parce que cette protéine n'est pas essentielle ou soit parce que la plasticité cellulaire est suffisante pour se contenter des deux autres phosphatases pour assurer tous les stades du développement. Peu de temps après cette étude, un deuxième travail fut publié et présentait les effets de la perte de l'autre régulateur de l'entrée en mitose, CDC25B. Une fois de plus, les souris sont tout à fait normales que ce soit au niveau développement,



taille ou croissance. De même, les cellules issues de ces souris *CDC25B*<sup>-/-</sup> ont un cycle normal et une réponse correcte aux dommages à l'ADN. Par contre, les femelles sont stériles. L'étude des ovocytes révèle un arrêt en prophase de la deuxième division de méiose avec une activité MPF basse et ils sont incapables de terminer cette division. Ce blocage est levé par la micro-injection d'ARN messenger *cdc25B* ce qui confirme que seule la présence de *CDC25B* est limitante pour terminer la méiose de ces ovocytes [584]. Ce résultat est à mettre en relation avec le profil d'expression de l'ARN messenger *cdc25B* (Figure 22). Ainsi, si *CDC25C* n'est essentielle à aucun niveau du développement, *CDC25B* est requise pour la méiose et ensuite pour les premières divisions de l'embryon. Pour le moment, l'invalidation du gène *cdc25A* n'est pas publiée, mais les premiers échos sur ces travaux laissent supposer une mortalité embryonnaire. Elle est probablement en relation avec le large profil d'expression de cette phosphatase pendant l'embryogenèse ou avec le fait que si les trois phosphatases sont actives à l'entrée en mitose, seule *CDC25A* est active à la transition G1/S et ne peut donc pas être remplacée. Seule l'étude plus approfondie de ces différentes lignées de souris permettra de comprendre ces phénotypes et nous donnera peut-être plus d'indications sur les rôles de chacune de ces protéines au cours du développement et du cycle cellulaire. Un autre moyen d'étudier l'implication des *CDC25* au cours du cycle cellulaire sont les expériences par interférence aux ARN (RNAi). Pour le moment, seul le profil du RNAi de *CDC25A* a été publié [178]. Il serait fortement intéressant de réaliser les mêmes expériences sur *CDC25B* car elles pourraient nous donner des indications précises sur les moments du cycle cellulaire où la phosphatase est requise.

Pour conclure, les perspectives sur l'étude des phosphatases *CDC25B* s'échelonnent sur plusieurs niveaux. Un premier niveau est de décrypter le mécanisme de sa régulation et de ses interactions avec différentes protéines cellulaires, soit en identifiant de nouveaux partenaires soit en clarifiant les régulations connues pour lesquelles il subsiste des zones d'ombre. Ensuite ces régulations devront être intégrées et leur enchaînement *in vivo* déterminé. Mais seule une vue exhaustive des régulateurs, des substrats et du rôle des *CDC25B* dans le contrôle de la prolifération cellulaire nous permettra de le faire. D'autre part, nous savons que la localisation subcellulaire des *CDC25B* est sous le contrôle de différents partenaires, dont certains ne sont pas encore identifiés. Il serait intéressant de connaître la localisation précise de *CDC25B* au cours du cycle cellulaire et surtout de déterminer à chaque fois son activité et quels sont les régulateurs impliqués. Un de ces aspects concerne les centrosomes et l'entrée en mitose. En effet, il a été démontré récemment que l'activation des

complexes CDK1/cycline B est initiée au niveau des centrosomes [585]. Il serait donc intéressant d'examiner si une activité CDC25B n'est pas présente en ce point et serait impliquée dans cette activation des CDK. Enfin, derrière tous ces travaux se profilent les enjeux thérapeutiques de l'étude de la prolifération cellulaire. En effet, CDC25B est un régulateur du cycle cellulaire qui est surexprimé dans de nombreuses tumeurs avec souvent un impact négatif sur la survie des patients. D'autre part, CDC25B fait partie des acteurs de la transition G2/M qui sont réactivés dans les neurones des patients atteints de la maladie d'Alzheimer. Or ces deux pathologies touchent de plus en plus de personnes dans le monde occidental car elles sont liées au vieillissement de la population. La recherche de molécules inhibitrices de CDC25B est donc un enjeu important car ils constituent une piste thérapeutique intéressante pour le traitement de ces deux maladies.

Au cours de ces dernières années, les avancées sur la compréhension de la régulation des phosphatases CDC25 ont été nombreuses avec des modifications de schémas établis depuis de nombreuses années, comme l'implication de CDC25A à la transition G2/M ou bien l'activité de cofacteur des récepteurs aux stéroïdes de CDC25B. Mais un chemin au moins aussi important reste encore à parcourir avant que nous puissions avoir une vue exhaustive des événements qui contrôlent la division des cellules et comprendre les mécanismes qui sont à l'origine de la transformation tumorale des cellules ou bien de leur dégénérescence.

# *Matériels et méthodes*

# I) PRODUCTION ET PURIFICATION DE PROTEINES RECOMBINANTES

## *2/ Protéines étiquetées MBP et purifiées à partir d'Escherichia coli*

### (A) EXPRESSION

La veille de l'induction, une pré-culture de 50 ml dans du milieu LB, complété par 100 µg/ml d'ampicilline et 0,2 % glucose, est incubée pendant la nuit à 37°C sous agitation. Le matin, elle est diluée dans le même milieu pour avoir une densité optique (DO) à 600 nm voisine de 0,1. La culture est ensuite remise à 37°C jusqu'à ce qu'elle atteigne une DO de 0,5-0,6. Après ajout d'IPTG à 400 µM final, elle est incubée pendant 3 à 5 heures à 25°C sous agitation pour permettre l'expression de la protéine recombinante. La culture est ensuite centrifugée à 2500 g pendant 10 min, puis le culot obtenu est lavé au PBS avant d'être de nouveau centrifugé. Il peut alors être congelé à -80°C.

**Milieu LB** (Luria-Bertani) : milieu de culture classique pour les bactéries = 1 % tryptone, 0,5 % extrait de levures, 1 % NaCl, pH 7,0. Le milieu est ensuite autoclavé 20 min à 120°C. Pour le milieu LB + Agar, il suffit de rajouter 20 g/l de Bacto-agar avant l'autoclave. Les antibiotiques doivent toujours être ajoutés après l'autoclave.

### (B) PURIFICATION

Le culot bactérien est remis en suspension dans le tampon de lyse à raison de 4-5 ml de tampon pour 50 ml de culture, puis incubé pendant 30 min sur la glace en présence de 10 µg/ml de lysosyme. Le lysat est ensuite soniqué avant d'être centrifugé (soit à 45000 rpm, soit à 14000 rpm pendant 35 min à 4°C). Le surnageant obtenu est ensuite incubé avec la matrice d'amylose à raison de 100 µl de résine par ml de surnageant (au préalable la résine est lavée par 60 volumes de tampon de lyse). Cette incubation dure 2 à 18 h à 4°C sous rotation. Le mélange est ensuite centrifugé à 800 g pendant 3 min à 4°C. Les billes sont alors lavées par 30 volumes de tampon de lavage à 1 M NaCl puis par 30 autres volumes du même tampon mais à 0,25 M NaCl. Lors du dernier lavage, les billes sont remises en suspension pour être transférées sur une colonne. Les étapes doivent si possible se faire à 4°C. Après écoulement du tampon, 10 volumes de tampon d'élution sont déposés sur la colonne et récoltés par

fractions équivalentes à 0,5 ou 1 volume de résine. Un échantillon de chaque fraction est ensuite analysé par gel SDS-PAGE (voir §II pour les gels SDS-PAGE et la coloration au bleu de Coomassie) pour déterminer les fractions les plus riches. Un deuxième gel en présence d'une gamme de BSA permet de déterminer la concentration de la protéine. Les fractions sont ensuite conservées à  $-80^{\circ}\text{C}$ . Les protéines peuvent également être conservées, fixées sur la matrice à  $4^{\circ}\text{C}$  en présence de 0,2 % d'azide de sodium.

**Tampon de lyse** : 20 mM Tris-HCl pH 7,4, 250 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, cocktail d'inhibiteurs de protéases (Complete®, Roche), 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$  inhibiteur I de calpaïne, 1 mM PMSF.

**Tampon de lavage** : 20 mM Tris-HCl pH 7,4, 1 mM EDTA, 1mM DTT.

**Tampon d'élution** : Tampon de lavage + 250 mM NaCl, 10 mM Maltose.

### *3/ Protéines étiquetées GST et purifiées à partir d'Escherichia coli*

#### **(A) EXPRESSION**

La veille de l'induction, une pré-culture de 50 ml dans du milieu LB, complété par 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  d'ampicilline, est incubée pendant la nuit à  $37^{\circ}\text{C}$  sous agitation. Le matin, elle est diluée dans le même milieu pour avoir une DO à 600 nm proche de 0,1. La culture est ensuite remise à pousser à  $37^{\circ}\text{C}$  jusqu'à ce qu'elle atteigne une DO de 0,8-1. Après ajout de l'IPTG à 200 $\mu\text{M}$  final, elle est incubée à pendant 3 à 5 heures à  $25^{\circ}\text{C}$ . sous agitation pour permettre l'expression de la protéine d'intérêt. La culture est alors centrifugée à 2500 g pendant 10 min, puis le culot est lavé au PBS avant d'être de nouveau centrifugé. Il peut alors être congelé à  $-80^{\circ}\text{C}$ .

#### **(B) PURIFICATION**

Le culot bactérien est remis en suspension dans le tampon de lyse à raison de 4-5 ml de tampon pour 50 ml de culture bactérienne, puis est incubé pendant 30 min sur la glace en présence 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de lysosyme et en vortexant toutes les 5 min. L'échantillon est ensuite soniqué, incubé 15 min à  $4^{\circ}\text{C}$  avec 1 % de Triton X-100 avant d'être centrifugé (10000rpm, 20 min,  $4^{\circ}\text{C}$ ). Le surnageant obtenu est ensuite incubé avec les billes de glutathione-sépharose à raison de 100  $\mu\text{l}$  de résine par ml de surnageant clarifié (au préalable la résine est lavée par 30 volumes de tampon de lyse avec 1 % Triton X-100). Après une incubation de 30 min à  $4^{\circ}\text{C}$  sous rotation, le mélange est centrifugé à 800 g pendant 3 min à  $4^{\circ}\text{C}$ . Les billes sont alors lavées par 40 volumes de tampon de lyse avec 1 % Triton X-100, puis par 20 volumes de tampon sans Triton. Après le dernier lavage, les billes sont remises en suspension dans un

tampon 50 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 8, pour les transférer sur une colonne. Les étapes suivantes doivent se faire si possible à 4°C. Après écoulement du tampon, 10 volumes de tampon d'élution sont déposés sur la colonne et récoltés par fractions équivalentes à 0,5 ou 1 volume de résine. Un échantillon de chaque fraction est ensuite analysé sur gel SDS-PAGE (Voir §II) pour identifier les fractions les plus riches et un deuxième gel en présence d'une gamme de BSA permet de déterminer la concentration de la protéine d'intérêt. La glutathione qui a servi pour l'élution peut ensuite être éliminée grâce à une colonne de type PD10 et les échantillons peuvent être concentrés par des colonnes Amicon avec des cuts à différents poids moléculaires. Les fractions sont ensuite conservées à -80°C. Les protéines peuvent également être gardées à 4°C fixées sur la résine en présence de 0,2 % d'azide de sodium.

**Tampon de lyse** : PBS, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, cocktail d'inhibiteur (Complete®, Roche), 20 µg/ml Inhibiteur I de calpaïne, 1 mM PMSF.

**Tampon d'élution** : 50 mM Tris-HCl pH 8, 50 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 10 mM glutathione.

#### *4/Le lysat de réticulocytes de lapin*

Les ADN complémentaires des différentes isoformes de CDC25B ainsi que les mutants sont clonés dans le vecteur pET14b (Novagene) ou dans le vecteur pcDNA3 sous le contrôle d'un promoteur du phage T7. Le lysat de réticulocytes de lapin permet leur transcription et leur traduction grâce à la présence de l'ARN-polymérase T7 (TNT7® quick coupled transcription/translation system, Promega). Le kit est utilisé en suivant les recommandations du fabricant.

Pour 20 µl de lysat, il faut 0,5 µg d'ADN, 1 µl de méthionine radiomarquée au <sup>35</sup>S (1000 Ci/mmol à 10 mCi/ml, NEN) ou non et de l'eau RNase free fournie avec le kit pour un volume final de 25 µl. Le tout est incubé pendant 75 min à 30°C.

## **II) ANALYSE DES PROTEINES**

### *2/ Electrophorèse SDS-PAGE*

La quantité de protéines est déterminée par un test colorimétrique en utilisant le kit de dosage Biorad basé sur la méthode de Bradford [586]. Les échantillons sont alors repris dans le tampon Laemmli (LSB) 1X final puis dénaturés 5 min à 95°C.

Les protéines sont alors analysées par électrophorèse en présence de SDS grâce à un système à cuve verticale, sur des gels de polyacrylamide de concentration uniforme dans un tampon de migration à base de glycine. Le gel est composé d'une zone de séparation dont la concentration en acrylamide est déterminée en fonction du poids moléculaire des protéines à analyser (7,5 à 20 % final). Cette zone de séparation est précédée d'une zone de concentration de l'échantillon. L'électrophorèse est réalisée à 80 V pour permettre l'entrée des échantillons dans le gel puis peut être augmentée jusqu'à 150 V lorsqu'ils sont dans la partie séparatrice du gel.

**Tampon de migration TGS** : 25 mM Tris-HCl, 192 mM glycine, 0,1 % SDS.

**LSB** (Laemmli Sample Buffer) : 50 mM Tris-HCl pH 6,8, 2 % SDS, 5 M β-mercapto-éthanol, 10 % glycérol, traces de bleu de bromophénol.

**Séparatif** : 7,5 à 20 % d'une solution Acrylamide/Bisacrylamide de rapport 37,5 : 1, 0,375 mM Tris-HCl pH 8,8, 0,1 % SDS, 0,1 % APS, 1 % Temed.

**Stacking** : 0,125 mM Tris-HCl pH 6,8, 4 % Acrylamide/Bisacrylamide de rapport 37,5 : 1, 0,1 % SDS, 0,1% APS, 1% Temed.

**Marqueurs de poids moléculaires** : LMW® et Rainbow®, Amersham ; marqueurs colorés, Biolabs.

### *3/ Transfert des protéines sur membrane de nitrocellulose*

Les protéines séparées par gel SDS-PAGE sont transférées sur une membrane de nitrocellulose en milieu liquide.

Le gel est rincé dans le tampon de transfert puis pris en sandwich entre 6 feuilles de papier (3MM, Whatman) avec une membrane de nitrocellulose à son contact (Hybond C, Amersham ou Protan de Schleicher & Schuell), le tout ayant été pré-incubé dans le tampon de transfert. Le transfert est effectué dans le tampon de transfert pendant une heure à 60 V. La membrane est ensuite rincée à l'eau puis colorée au rouge ponceau pour vérifier l'homogénéité des dépôts et l'efficacité du transfert. La couleur est éliminée par rinçages dans

du TBS complété avec du Tween20 (Polyoxyéthylène sorbitan monolaurate, Sigma) à 0,05 jusqu'à 0,2 % suivant l'anticorps utilisé ensuite pour l'immunodétection.

**Tampon de transfert** : pour un litre de tampon 25 X, mélanger 72,5 g de glycine, 145 g de Tris-base, 46,25 ml de SDS 20 %. Ce tampon s'utilise ensuite 1 X additionné de 20% de méthanol.

**Rouge Ponceau** : 0,5 % rouge ponceau (Sigma), 3 % acide tri-chloro-acétique (TCA).

**TBS** : 20 mM Tris-base, 137 mM NaCl, pH 7,6.

#### *4/ Immunodétection (Western Blot)*

La membrane est saturée pendant 15 à 60 min dans une solution TBS-Tween 20 plus 5 % de lait écrémé ou de BSA. Elle est ensuite incubée toute la nuit à 4°C ou pour 2 heures à température ambiante (selon les conditions optimales de l'anticorps) sous agitation, dans la solution de saturation avec l'anticorps primaire. La membrane est alors rincée 3 fois 5 min dans du TBS-Tween20, puis incubée dans la solution de saturation avec l'anticorps secondaire couplé à la peroxydase de radis noir (HRP – anticorps de chez Biolabs). Elle est de nouveau lavée 3 fois 5 min dans le TBS-Tween20 puis recouverte par le substrat de la peroxydase (kit ECL, Perkin Elmer-NEN) et révélée avec des films Kodak (X-Omat blue).

Si besoin est, la membrane peut être déshybridée : une incubation de 10 à 30 min (suivant l'anticorps et le signal résiduel de la première révélation) à température ambiante sous agitation dans le tampon de déshybridation suffit. 3 à 5 lavages de quelques minutes dans du TBS-Tween20 permettent ensuite de l'éliminer. L'immunodétection recommence alors à la saturation.

Dans le cas d'anticorps dirigés contre des épitopes phosphorylés, le tampon de saturation est complété avec des inhibiteurs de phosphatases (50 mM NaF, 10 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>) et se fait obligatoirement avec de la BSA.

**Tampon de déshybridation** : pour 1 litre 7,5 g de glycine, 1 ml de NP40, 10 g de SDS, pH 2,2.

#### *5/ Coloration des protéines au bleu de Coomassie*

Après migration, le gel est déposé dans la solution de coloration pendant 5 à 15 min puis plongé dans un bain de décoloration. Ce bain est renouvelé plusieurs fois jusqu'à ce que les protéines ressortent nettement du fond du gel. Le gel est alors soit séché 1 heure à 72°C sous vide sur une feuille de papier Whatman (le rincer à l'eau avant pour éviter que trop d'acide acétique aille dans le sécheur), soit hydraté dans des bains à 3 % de glycérol et séché entre deux feuilles de cellophane imbibées de glycérol.



Lorsqu'il s'agit d'un gel pour une analyse par spectrométrie de masse, une fois la coloration voulue atteinte, il doit être conservé dans 1 % d'acide acétique. Ensuite si des sels de manganèse sont présents au cours de la préparation de l'échantillon, une interférence avec la coloration peut être observée. Il faut alors décolorer au maximum le gel pour espérer les voir apparaître ou bien utiliser une autre technique de coloration comme le bleu colloïdal.

**Solution de coloration** : 0,3 % bleu de Coomassie, 50 % méthanol, 10 % acide acétique glacial.

**Solution de décoloration** : 10 % acide acétique glacial, 30 % éthanol.

### *6/ Détection et quantification de protéines radiomarquées*

Après coloration au bleu de Coomassie, décoloration et séchage sur papier Whatman, le gel avec les échantillons radioactifs est placé dans une cassette pour Western Blot avec un film à son contact. Dans le cas d'échantillons avec de l'ATP $\gamma$ <sup>32</sup>P, des écrans placés sous le gel et après le film permettent d'augmenter le signal en réfléchissant les rayonnements émis. De même, faire l'exposition à -80°C permet de raccourcir le temps d'exposition pour le <sup>35</sup>S et le <sup>32</sup>P.

Pour quantifier, les bandes radioactives sont découpées et placées dans des tubes à scintillation. Pour le <sup>35</sup>S, du liquide à scintillation doit être rajouté pour permettre la détection de la radioactivité. Pour le <sup>32</sup>P, ce n'est pas nécessaire, mais il faut multiplier par 2 le nombre de coups obtenus pour compenser. Les tubes sont alors analysés par un compteur à scintillation.

Un autre système de quantification utilisable est le PhosphorImager : le gel séché est placé en présence d'un film pour PhosphorImager puis analysé par un système informatique. Type de PhosphorImager : STROM 840 Imager (Molecular Dynamics).

### *7/ Gel SDS-PAGE en tampon Tricine pour la détection de peptides radiomarqués*

Comme pour l'électrophorèse SDS-PAGE, le principe est une migration verticale en conditions dénaturantes grâce à la présence de SDS. La différence principale est le remplacement de la Glycine par la Tricine. Le gel comprend une zone de séparation où le rapport Acrylamide/Bisacrylamide est modifié pour permettre la séparation de peptides de 12 à 45 acides aminés. La partie concentration des peptides est la même que pour un gel SDS-PAGE classique (Attention : il faut la couler au dernier moment sinon elle se rétracte par

rapport au séparatif !). Les échantillons à analyser sont repris dans le tampon TSB à 1 X final puis dénaturés 5 min à 95°C avant dépôt. La migration se fait à 60 V dans le tampon Tricine 1 X.

Après migration, le gel est d'abord incubé 3 fois 15 min dans 5 % TCA sous agitation. Puis il est fixé par un bain de 15 min dans du décolorant pour Coomassie et enfin rincé à l'eau pour arrêter la réaction. Le gel est alors placé dans une pochette plastique pour être exposé mouillé (détection de la radioactivité incorporée). Il peut également être séché sous-vide, mais il a tendance à se fendre.

**TSB 2X** (Tricine Sample Buffer) : 200 mM Tris-HCl pH 6,8, 2 % SDS, 50 % Glycérol, 0,04 % Coomassie (quelques paillettes).

**Tampon de migration Tricine 5X** : 500 mM Tris-base, 500 mM Tricine, 0,5 % SDS, pH 8,3.

**Séparatif** : 0,375 mM Tris-HCl pH 8,8, 0,1 % SDS, 0,1 % APS, 1 % Temed, 16,5 % Acrylamide (4,125 ml d'une solution à 40 % pour 10ml final), 0,568 % Bisacrylamide (2,84 ml d'une solution à 2 % pour 10 ml final). La quantité de Bisacrylamide est calculée pour avoir un rapport Acrylamide/Bisacrylamide de 29 : 1.

### **III) MESURE DE L'ACTIVITE PHOSPHATASE**

#### *2/ Utilisation d'un substrat exogène*

Le substrat exogène utilisé est la fluorescéine diphosphate (FDP- [463]) dont la déphosphorylation en FMP (fluorescéine monophosphate) permet l'émission d'une fluorescence à 518 nm après excitation à 485 nm. Cette émission est suivie dans le cadre d'une cinétique grâce à un spectro-fluorimètre à microplaques (Labsystem). La pente de la droite ainsi obtenue est le reflet de l'activité phosphatase de l'échantillon analysé.

La protéine CDC25B (immunoprécipitation ou protéine recombinante fixée sur billes) est lavée avec 1 ml de tampon FDP puis reprise dans 200 µl de tampon FDP avant d'être déposée sur une microplaque de 96 puits (compatible avec la lecture de fluorescence). Pour les protéines recombinantes en solution, elles peuvent être directement diluées dans les 200 µl de tampon FDP. La cinétique commence à l'ajout de 20 µM de FDP (Molecular Probes). Elle dure 30 min avec lecture de la fluorescence toutes les 3 min et agitation avant chaque lecture. La pente de la droite obtenue est normalisée par la quantité de protéines dans l'échantillon.

**Tampon FDP** : 30 mM Tris-HCl pH 8,2, 75 mM NaCl, 0,67 mM EDTA, 0,033 % BSA, 1 mM DTT.

#### *3/ Utilisation d'un substrat physiologique : CDK1/Cycline B*

Ce système a été mis au point à partir de [587] après modifications. Il repose sur la déphosphorylation de CDK1/Cycline B sur les résidus Y15 et T14 par CDC25B. Lorsqu'il est déphosphorylé, le complexe est alors plus actif. Son activité est visualisée par la phosphorylation de l'histone H1 en présence d'ATP $\gamma$ <sup>32</sup>P. Ce système indirect permet donc de mesurer l'activité de CDC25B reflétée par l'activité du complexe CDK1/Cycline B sur l'histone H1.

#### **(A) PREPARATION DU SUBSTRAT**

Le complexe CDK1/Cycline B est purifié à partir de cellule HeLa traitées avec 40 µM d'étoposide, un agent endommageant l'ADN et qui provoque l'arrêt des cellules en phase G2 tardives dans les 24 h suivant le traitement. Les cellules sont alors récoltées, reprises dans un tampon de lyse à raison de 150 µl pour une boîte de 100 mm de diamètre. La lyse est réalisée à 4°C pendant 35 min en vortexant régulièrement. Après une centrifugation à 14000 rpm pour

éliminer le matériel insoluble, un dosage Bradford est réalisé sur le surnageant. Par point, l'équivalent de 120 µg de protéines totales est ensuite incubé avec pendant 3 h à 4°C sur une roue avec un mélange de 25 µl billes de sépharose et 25 µl billes p13Suc1-Sépharose, mélange qui a été lavé avec 1 ml de tampon de lyse. Après cette incubation, les billes sont lavées 4 fois dans 1 ml de tampon de lyse sans inhibiteurs de phosphatases puis 1 fois dans le tampon FDP. Le substrat est alors prêt à être incubé avec CDC25B.

**Tampon de lyse** : 50 mM Tris-HCl pH 7,5, 250 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0,1 % Triton, Complete, 1 mM PMSF, 20 µg/ml Inhibiteur I de Calpaïne + inhibiteurs de phosphatases : 50 mM NaF, 0,1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 10 mM β-glycérophosphate.

**Tampon FDP** : 30 mM Tris-HCl pH 8,2, 75 mM NaCl, 0,67 mM EDTA, 0,033 % BSA, 1 mM DTT.

## **(B) PREPARATION DE CDC25B**

10 ng de MBP-CDC25B3 sauvage ou mutée (S186A S187A S188G) est pré-incubée avec la protéine –kinase CK2 (26 ou 65 ng) dans 20 µl de mélange réactionnel pendant 30 min à 30°C. Elle est ensuite diluée dans du tampon FDP pour un volume final de 100 µl avant d'être déposée sur les billes de substrat.

**Essai kinase CK2 froid** : 10 mM Tris-HCl pH 8, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM β-mercaptoéthanol, 75 mM KCl, 50 µM ATP, 10 µg/ml de créatine kinase, 10 mM créatine phosphate.

## **(C) ESSAI PHOSPHATASE ET MESURE DE L'ACTIVITE CDK**

Le mélange billes + CDC25B est incubé pendant 1 h à 30°C en agitant régulièrement. Il est ensuite lavé 2 fois avec du tampon de lyse sans inhibiteurs de phosphatases puis une fois avec 1 ml de tampon kinase pour Histone H1. Seules 1/5<sup>ème</sup> des billes sont utilisées pour l'essai kinase sur l'histone H1. Le reste est analysé par Western Blot après un gel SDS-PAGE pour vérifier les quantités de CDK1, de Cycline B ainsi que le statut de CDK1 en phosphorylation sur Y15 (anticorps anti-cdk1 polyclonal de chez Oncogene ; anti cycline B1 polyclonal du laboratoire ; anti-cdk1 phosphorylé sur Y15, polyclonal de chez Cell Signaling Technology).

Pour l'essai kinase Histone H1, les billes sont incubées pendant 5 min à 30°C avec 20 µl de mélange radioactif. La réaction est arrêtée par la glace et 7 µl de LSB 5X. Après dénaturation, les échantillons sont analysés sur un gel SDS-PAGE à 12,5 % puis autoradiographiés (Voir § II). En général, 2 à 4 h d'exposition à température ambiante suffisent.

**Tampon kinase Histone H1** : 10 mM Tris-HCl pH 7,5, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT, 100 μM ATP, 20 μg/ml Inhibiteur I de Calpaïne.

**Essai kinase Histone H1** : 10 mM Tris-HCl pH 7,5, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT, 100 μM ATP, 20 μg/ml Inhibiteur I de Calpaïne, 2,5 μCi ATPγ32P, 0,5 mg/ml d'histone H1.

## **IV) CULTURE CELLULAIRE**

### *2/ Cellules humaines*

#### **(A) PRESENTATION DES DIFFERENTES LIGNEES**

##### **◆ Cellules HeLa**

Issues d'un adénocarcinome du col de l'utérus, ce sont des cellules adhérentes de type épithélial. Elles sont cultivées en milieu DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) complété par 10 % de sérum de veau fœtal (Eurobio) inactivé par la chaleur (35 min à 55°C), 2 mM glutamine, 100 U/ml pénicilline et 100 µg/ml de streptomycine. Elles sont maintenues à 37°C dans une atmosphère humide contenant 5 % de CO<sub>2</sub>.

##### **◆ Cellules U-2 OS**

Issues d'un ostéosarcome, ce sont également des cellules adhérentes de type épithélial. Elles sont cultivées dans les mêmes conditions que les cellules HeLa. Nous disposons de cellules U-2 OS mais également de la lignée transfectée de manière stable avec le système Tétracycline : U-2 OS-tTA. Le milieu est alors complété par 100 µg/ml de G418. À partir des cellules U-2 OS-tTA, ont été obtenues différentes lignées transfectées de manière stable et qui permettent l'expression inductible des différents variants de CDC25B étiquetés HA : U-2 OS-HA-CDC25B1, B2 et B3. Dans ce cas, les cellules sont cultivées en présence de G418 plus 200 µg/ml d'Hygromycine B et de 2 µg/ml de tétracycline.

Pour permettre l'expression de la protéine CDC25B, 24 h après passage, les cellules sont lavées plusieurs fois avec du PBS pour éliminer la tétracycline. L'expression de la protéine peut être détectée dès 8 à 12h et est maximale à 24 – 36 h.

#### **(B) TRANSFECTION TRANSITOIRE**

##### **◆ Exgen**

L'Exgen500 est une polyéthylène-imine linéaire commercialisée par Euromedex. Afin d'assurer la meilleure efficacité de transfection, plusieurs précautions sont à prendre. Tout d'abord les cellules doivent être en pleine phase de croissance exponentielle avec une densité comprise entre 40 et 75% de confluence. Ensuite le rapport ADN/Exgen doit être entre 1/2 et

1/5 suivant les types cellulaires. Enfin le volume final de mélange de transfection déposé sur les cellules ne doit pas dépasser 1/20 du volume de milieu de culture (pour une Boite de 100 mm de diamètre, le volume de milieu classiquement utilisé est de 10 ml donc le mélange réactionnel qui sera déposé sur les cellules ne doit pas dépasser 500  $\mu$ l).

Avant la transfection, le milieu de culture doit être changé, mais seule la moitié du volume est déposée sur les cellules. Ensuite dans un premier tube, l'ADN (en  $\mu$ g) est mélangé à une solution stérile de NaCl à 150 mM. Dans un deuxième tube, l'Exgen ( $\mu$ g d'ADN x Rapport Exgen/ADN) est lui aussi mélangé à la solution de NaCl. Ensuite le mélange Exgen/NaCl est ajouté à la solution ADN/NaCl (Attention surtout ne pas intervertir !), et la solution obtenue est mélangée et laissée incubée 10 min à température ambiante. Enfin, le mélange est déposé de manière homogène sur les cellules qui sont alors remises à 37°C pendant 2 h. Au bout des 2 h, la deuxième moitié du milieu de culture est ajoutée ou bien le milieu de culture est entièrement changé suivant la sensibilité des cellules à l'Exgen500. Les cellules sont alors incubées le temps voulu pour permettre l'expression des protéines d'intérêt.

#### ◆ *CaCl<sub>2</sub> (Technique du BBS)*

Attention, cette méthode est incompatible avec les milieux de culture de type RPMI ! Les quantités indiquées sont pour une boîte de 100 mm de diamètre. Les cellules doivent être passées quelques heures avant la transfection (le matin pour l'après-midi).

Dans un tube, mélanger l'ADN (20  $\mu$ g) dans 40  $\mu$ l volume d'eau stérile. Ajouter ensuite une solution de CaCl<sub>2</sub> (50  $\mu$ l) diluée dans 410  $\mu$ l d'eau stérile. Mélanger par retournement avant de rajouter 500  $\mu$ l de tampon BBS 2X. Mélanger de nouveau par retournement puis centrifuger brièvement avant de laisser incuber 10 à 20 min à température ambiante. Le mélange est alors déposé goutte-à-goutte sur les cellules (le milieu devient transparent suite au changement de pH) puis les cellules sont remises à 37°C jusqu'au lendemain matin. Elles sont alors lavées 2 – 3 fois par du milieu avec antibiotiques mais sans sérum, puis elles sont replacées dans du milieu complet pour 24 heures additionnelles.

**CaCl<sub>2</sub>** : 73,51 g de CaCl<sub>2</sub>.2 H<sub>2</sub>O pour 200 ml d'eau. La solution doit être stérile.

**BBS 2X** : 50 mM BES pH 6,95 ; 280 mM NaCl ; 1,5 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (pour 1l : 16,36 g NaCl ; 0,716 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> ; 10,66 g BES). Le pH doit être ajusté à 6,95 avec de la soude (NaOH), puis la solution doit être stérilisée par filtration, aliquotée et conservée à -20°C.

**(C) MARQUAGES METABOLIQUES IN VIVO AU <sup>35</sup>S**

Les cellules sont lavées au PBS afin d'éliminer toute trace de milieu de culture, puis elles sont incubées au moins 30 min dans du milieu dépourvu de méthionine et de cystéine. Le marquage métabolique est ensuite réalisé pendant 2 h à 37°C, en rajoutant au milieu 200 µCi/ml de méthionine/cystéine radiomarquées au <sup>35</sup>S. L'excès de radioactivité est éliminé avant de récupérer les cellules par 2 – 3 lavages au PBS.

**(D) IMMUNOFLUORESCENCE INDIRECTE**

Les cellulesensemencées sur des lamelles de verre sont lavées doucement avec du PBS pour éliminer le milieu, puis fixées par 3,7 % de formaldéhyde dans du PBS pendant 20 à 40 min à 4°C. Après 3 lavages au PBS de quelques minutes, les cellules sont perméabilisées par 0,25 % TritonX100 à température ambiante puis par du méthanol à 20 % à -20°C pendant 10 min. Les lamelles sont ensuite réhydratées par 3 lavages au PBS de 3 min chacun. Après une saturation d'au moins 30 min à température ambiante dans du PBS + 1 % sérum de veau fœtal, les lamelles sont incubées avec l'anticorps primaire dilué dans le tampon de saturation. Pour cela les lamelles sont retournées sur une goutte (20µl minimum) de solution d'anticorps primaire déposée sur du parafilm puis elles sont placées à 37°C dans une chambre humide (ou 2 h à température ambiante ou sur la nuit à 4°C). Après quelques lavages au PBS pour éliminer l'anticorps primaire, les lamelles sont incubées de la même manière avec l'anticorps secondaire dilué dans la solution de saturation pendant 35 à 55 min à température ambiante. Si une deuxième immunodétection doit être réalisée, après quelques lavages au PBS pour éliminer l'anticorps secondaire, il faut recommencer au niveau de la saturation. Sinon, les lamelles sont incubées avec un intercalant de l'ADN (Dapi ou Hoescht à 0,1 µg/ml) pendant 10 min à température ambiante. Après quelques rinçages au PBS puis à l'eau milliQ, les lamelles sont séchées puis montées sur une lame de verre dégraissée grâce à une goutte de Mowiol.

Dans le cas d'anticorps dirigés contre des épitopes phosphorylés, les incubations se font en présence d'inhibiteurs de phosphatases (50 mM NaF et 10 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>).



### 3/ Cellules Sf9

#### (A) PRESENTATION ET CULTURE

Les cellules *Sf9* proviennent du papillon *Spodoptera frugiperda*. Elles sont cultivées à 27°C en atmosphère non contrôlée, dans du milieu InsectXpress® (Biowhittaker), complémenté avec 5 % de sérum de veau fœtal, 250 µg/ml de Gentamycine, 2,5 µg/ml d'amphotéricine, 100 U/ml de pénicilline, 100 µg/ml de streptomycine et 2 mM glutamine.

Pour la congélation et la conservation des cellules dans l'azote liquide, les cellules en phase exponentielles de croissance sont reprises à  $5.10^7$  cellules/ml dans un mélange de 85 % de milieu de culture complet et 15 % de DMSO.

#### (B) INFECTIONS PAR LE BACULOVIRUS

Les ADN complémentaires des trois CDC25B (B1, B2 et B3) ont été sous-clonés dans le vecteur pVL/His afin d'obtenir des baculovirus recombinants grâce au kit BaculoGold® (Pharmingene). Les ADN complémentaires de CK2 $\alpha$  et CK2 $\beta$  de poulet ont été sous-clonés dans le vecteur pEV55 et les virus nous ont été fournis par O. Filhol-Cochet (Grenoble).

24 heures avant infection, les cellules sontensemencées à  $1,5.10^6$  cellules pour 25 cm<sup>2</sup>. Au moment de l'infection, le milieu de culture est remplacé par la suspension virale diluée dans un petit volume de milieu de culture (2 ml pour une boîte de 25 cm<sup>2</sup>) et les cellules sont ensuite incubées pendant une heure à température ambiante sous agitation douce. Après avoir rajouté du milieu de culture pour compléter le volume, les cellules sont remises en culture à 27°C pendant 30 à 72 heures. Elles sont ensuite récupérées, centrifugées 10 min à 2000 rpm et le culot peut alors être conservé à -80°C (sauf pour une mesure d'activité phosphatase ou pour la recherche de protéines phosphorylées : il vaut mieux travailler sur des culots frais).

#### (C) AMPLIFICATION DES BACULOVIRUS

Pour entretenir les suspensions virales, des amplifications doivent être régulièrement réalisées. Pour cela, 12 ml de suspension cellulaire à  $10^6$  cellules/ml sontensemencées dans un flacon de 75 cm<sup>2</sup>. Le lendemain, les cellules sont infectées avec le virus à amplifier, à une MOI (« Multiplicity Of Infection ») de 1 ou 2 (c'est-à-dire que chaque cellule doit recevoir au maximum 1 à 2 virus). La culture est laissée à 27°C pendant 10 à 12 jours afin de permettre la multiplication des virus. La suspension virale est alors récupérée par une centrifugation douce

(10 min à 2500 rpm) et filtrée sur ? La suspension est ensuite conservée à 4°C (suspension utilisée) et à -80°C (stock).

## **V) EXTRACTION DE PROTEINES ET IMMUNOPRECIPITATION**

### *2/ Protocole classique*

Dans tous les cas le protocole général reste le même, les variations étant surtout au niveau de la composition des tampons. Le culot cellulaire est repris dans un volume de tampon de lyse et il est incubé sur la glace pendant 35 min en vortexant régulièrement. Une centrifugation à 14.000 rpm pendant 10 min à 4°C permet de clarifier le lysat. Le surnageant est soumis à un dosage protéique suivant la technique de Bradford (voir § analyse des protéines). Une quantité équivalente en protéines pour chaque lysat est utilisée pour réaliser un Western Blot contrôle sur les extraits directs. Le reste peut être utilisé pour effectuer une immunoprécipitation.

Pour cela, les extraits sont tout d'abord dilués dans le tampon de lyse (qsp 0,8 – 1 ml) puis incubés pendant au moins 30 min à 4°C sous agitation en présence de billes de protéine A – Sépharose, ce qui permet d'éliminer les protéines qui se fixent de façon non-spécifique à cette matrice. Le surnageant est ensuite incubé en présence de l'anticorps immunoprécipitant pendant au moins 2 heures à 4°C sous agitation avant d'être transféré sur les billes de protéine A – Sépharose et incubé pendant 45 min au moins de nouveau à 4°C sous agitation. Dans certains cas, l'anticorps et les billes de protéine A – Sépharose peuvent être ajoutés en même temps. Dans ces conditions, l'incubation est alors de au moins 3 heures, mais elle peut également être réalisée sur la nuit si la protéine d'intérêt est suffisamment stable.

L'immunoprécipité est ensuite lavé abondamment avec le tampon de lyse (au moins 30 fois le volume de billes présentes) avant d'être repris dans du tampon LSB 1X final ou d'être utilisé pour d'autres essais additionnels (essai kinase, essai phosphatase...).

**Tampon de lyse classique** : 50 mM Tris-HCl pH7,5 ; 250 mM NaCl ; 5 mM EDTA ; 0,1 % TritonX100 ; 1 mM DTT ; 50 mM NaF ; 0,1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> ; 20 µg/ml Inhibiteur I de Calpaïne ; cocktail d'inhibiteurs de protéases (Roche).

**Tampon de lyse plus stringent** (pour les U-2 OS) : tampon précédent auquel est rajouté 1 % de NP40 pendant la lyse des cellules. Le NP40 est ensuite éliminé des étapes suivantes.

### *2/ Pour analyse en spectrométrie de masse.*

Les cellules *Sf9* sont récupérées à 36 h d'infection et centrifugées. Le culot est alors repris dans un tampon de lyse un peu modifié (1 ml de tampon 8 boîtes de 25cm<sup>2</sup>). La lyse est

réalisée sur la glace en vortexant régulièrement pendant 35 min puis elle est arrêtée par une centrifugation de 10 min à 4°C à 14.000 rpm. Un dosage Bradford est réalisé sur le surnageant, pour quantifier la quantité de protéines totales. Un échantillon équivalant à 50 µg maximum est conservé pour réaliser un Western Blot contrôle. Le reste est incubé avec les billes de protéine A – Sépharose dans le tampon de lavage, pendant 1 h à 4°C sous agitation. L'immunoprécipitation est ensuite réalisée soit sur la nuit soit sur la journée comme décrit au-dessus. Le culot de billes obtenu est ensuite lavé 3 – 4 fois avec le tampon de lavage puis il est repris avec du tampon LSB 1X final avant d'être dénaturé et analysé sur gel SDS-PAGE et coloration Coomassie.

Lorsqu'il s'agit d'échantillon pour la spectrométrie de masse, il faut travailler autant que possible avec des solutions neuves et filtrées et porter tout le temps des gants afin d'éviter les contaminations par les kératines.

## VI) ESSAIS KINASE

### *2/ Essai kinase avec CK2*

Si la protéine substrat est fixée sur billes, elle doit tout d'abord être lavée par 1 ml de tampon kinase CK2. Puis elle est reprise dans 20 µl de mélange réactionnel pour une incubation de 30 min à 30°C. La réaction est arrêtée par un lavage avec 500 µl de tampon de lavage qui permet en même temps d'éliminer la radioactivité en excès. Les billes sont ensuite reprises dans le tampon LSB 1X final avant d'être dénaturées et analysées par gel SDS-PAGE et autoradiographie (voir § Analyse des protéines). Par contre, si le substrat est en solution, il peut être dilué directement dans le mélange réactionnel. Dans ce cas, la réaction est arrêtée par l'ajout direct du tampon LSB à une concentration 1X finale.

**Tampon Kinase CK2** : 10 mM Tris-HCl pH8 ; 5 mM MgCl<sub>2</sub> ; 100 mM KCl ; 10 mM β-mercaptoéthanol ; 50 µM ATP.

**Mélange réactionnel** : Tampon kinase CK2 ; 5 µCi ATPγ<sup>32</sup>P ; CK2 purifiée (en général 65 ou 130 ng).

**Tampon de lavage** : 50 mM Tris-HCl pH 7,5 ; 250 mM NaCl ; 5 mM EDTA ; 0,1 % TritonX100 ; 1 mM DTT ; 50 mM NaF ; 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>.

### *3/ Mesure de l'activité CK2*

Ce système permet de comparer rapidement l'activité kinase de différentes préparations de CK2 ou de comparer l'holoenzyme avec la sous-unité α. Pour cela le mélange réactionnel est incubé pendant 5 à 20 min à température ambiante. La réaction est arrêtée par l'ajout de 6 µl de caséine (Ci = 30 mg/ml) et de 60 µl de TCA à 4 % qui permet de précipiter la kinase. Le mélange est laissé 15 min sur la glace avant d'être centrifugé (15 min, 12000 rpm, 4°C). Le surnageant (≈ 60 µl) est déposé sur un carré de phosphocellulose (Whatman 81). Les carrés sont alors lavés 3 fois 15 min à 4°C dans 0,5 % acide phosphorique. Une fois secs, ils sont comptés dans un compteur à scintillation.

**Mélange réactionnel** : 165 µM peptide CK2, 10 µM ATP, 20 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 µCi ATPγ<sup>32</sup>P, 150 mM NaCl, 100 mM Tris-HCl pH 8,2.

**Peptide spécifique de CK2** : 12 acides aminés = RRREDRRSDDEE, Km : 15 µM. Il est conservé à 2 mM dans 100 mM Tris-HCl pH 8,2.

#### 4/ *Essai kinase avec AKT/PKB*

La procédure est la même que pour les essais kinase avec CK2. Il faut juste changer la composition des tampons kinases et mélange réactionnel.

**Tampon kinase de première génération** : 20 mM Tris-HCl pH 7,5 ; 18 mM MgCl<sub>2</sub> ; 25 mM β-glycérophosphate ; 5 mM EDTA ; 1 mM DTT ; 50 μM ATP.

**Tampon kinase de deuxième génération** : 25 mM Tris-HCl pH7,5 ; 10 mM MgCl<sub>2</sub> ; 2 mM DTT ; 5 mM β-glycérophosphate ; 50 μM ATP ; 0,1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> ; 15 mM MnCl<sub>2</sub>.

**Mélange réactionnel** : tampon kinase ; 160 ng d'AKT/PKB purifiée (Upstate Biotechnology) ; 5 μCi d'ATPγ<sup>32</sup>P ; 100ng de MBP-CDC25B pour les essais sur protéine purifiée.

#### 5/ *Essai kinase sur peptides*

Les différents peptides utilisés pour cette analyse sont à une concentration de 1,5 mM en général dans du DMSO (sauf si précisé autrement). La réaction se fait à ;30°C pendant 30 min dans 15 μl de mélange réactionnel avec le peptide à une concentration finale de 0,1 mM. Elle est arrêtée par la glace et l'ajout de TSB à 1 X final. Les échantillons sont ensuite dénaturés puis analysés sur un gel Tricine (voir § II-6).

**Mélange réactionnel pour une phosphorylation par CK2** : 10 mM Tris-HCl pH 8, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM β-mercapto-éthanol, 0,5 mM ATP, 75 mM KCl, 130 μg CK2 (α<sub>2</sub>β<sub>2</sub> purifiée), 1 μCi ATPγ<sup>32</sup>P, 0,1 mM peptide.

**Peptides utilisés :**

- Peptide de 41 acides aminés (= domaine B de CDC25B) : VRLLGHSPVLRNITNSQAPDGRRKSEAGSGAASSSGEDKEN
- Peptide de 14 acides aminés (= partie du domaine B) : TNSQAPDGRRKSEA
- Peptide de 14 acides aminés (= domaine A de CDC25B) : ETPKSQVGTLLFRS
- Peptide de 12 acides aminés spécifique pour CK2 : RRREDEESDDEE (conservé dans 100 mM Tris-HCl pH 8,2).

# ***Bibliographie***

1. Flemming, W., *Zellsubstanz, Kern und zelltheilung*. F. C. W. Vogel. 1882, Leipzig.
2. McCully, E.K. and C.F. Robinow, *Mitosis in the fission yeast Schizosaccharomyces pombe: a comparative study with light and electron microscopy*. J Cell Sci, 1971. **9**(2): p. 475-507.
3. Mitchison, T.J. and E.D. Salmon, *Mitosis: a history of division*. Nat Cell Biol, 2001. **3**(1): p. E17-21.
4. Murray, A.W., *Cell cycle. Sunburnt fission yeast*. Nature, 1993. **363**(6427): p. 302.
5. Hartwell, L.H. and T.A. Weinert, *Checkpoints: controls that ensure the order of cell cycle events*. Science, 1989. **246**(4930): p. 629-34.
6. Rao, P.N. and R.T. Johnson, *Mammalian cell fusion: studies on the regulation of DNA synthesis and mitosis*. Nature, 1970. **225**(228): p. 159-64.
7. Johnson, R.T. and P.N. Rao, *Mammalian cell fusion: induction of premature chromosome condensation in interphase nuclei*. Nature, 1970. **226**(247): p. 717-22.
8. Johnson, R.T. and P.N. Rao, *Nucleo-cytoplasmic interactions in the achievement of nuclear synchrony in DNA synthesis and mitosis in multinucleate cells*. Biol Rev Camb Philos Soc, 1971. **46**(1): p. 97-155.
9. Ecker, R.E. and L.D. Smith, *The nature and fate of Rana pipiens proteins synthesized during maturation and early cleavage*. Dev Biol, 1971. **24**(4): p. 559-76.
10. Masui, Y. and C.L. Markert, *Cytoplasmic control of nuclear behavior during meiotic maturation of frog oocytes*. J Exp Zool, 1971. **177**(2): p. 129-45.
11. Reynhout, J.K. and L.D. Smith, *Studies on the appearance and nature of a maturation-inducing factor in the cytoplasm of amphibian oocytes exposed to progesterone*. Dev Biol, 1974. **38**(2): p. 394-400.
12. Kishimoto, T., et al., *Generality of the action of various maturation-promoting factors*. Exp Cell Res, 1982. **137**(1): p. 121-6.
13. Kishimoto, T. and H. Kanatani, *Cytoplasmic factor responsible for germinal vesicle breakdown and meiotic maturation in starfish oocyte*. Nature, 1976. **260**(5549): p. 321-2.
14. Gerhart, J., M. Wu, and M. Kirschner, *Cell cycle dynamics of an M-phase-specific cytoplasmic factor in Xenopus laevis oocytes and eggs*. J Cell Biol, 1984. **98**(4): p. 1247-55.
15. Wasserman, W.J. and L.D. Smith, *The cyclic behavior of a cytoplasmic factor controlling nuclear membrane breakdown*. J Cell Biol, 1978. **78**(1): p. R15-22.
16. Sunkara, P.S., D.A. Wright, and P.N. Rao, *Mitotic factors from mammalian cells induce germinal vesicle breakdown and chromosome condensation in amphibian oocytes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1979. **76**(6): p. 2799-802.
17. Weintraub, H., et al., *[Demonstration of maturation promoting factor activity in Saccharomyces cerevisiae]*. C R Seances Acad Sci III, 1982. **295**(13): p. 787-90.
18. Lohka, M.J., *Mitotic control by metaphase-promoting factor and cdc proteins*. J Cell Sci, 1989. **92** ( Pt 2): p. 131-5.
19. Doree, M., *Control of M-phase by maturation-promoting factor*. Curr Opin Cell Biol, 1990. **2**(2): p. 269-73.
20. Maller, J., M. Wu, and J.C. Gerhart, *Changes in protein phosphorylation accompanying maturation of Xenopus laevis oocytes*. Dev Biol, 1977. **58**(2): p. 295-312.
21. Picard, A., et al., *Role of protein synthesis and proteases in production and inactivation of maturation-promoting activity during meiotic maturation of starfish oocytes*. Dev Biol, 1985. **109**(2): p. 311-20.
22. Labbe, J.C., et al., *An M-phase-specific protein kinase of Xenopus oocytes: partial purification and possible mechanism of its periodic activation*. Dev Biol, 1988. **127**(1): p. 157-69.



23. Hartwell, L.H., et al., *Genetic control of the cell division cycle in yeast*. Science, 1974. **183**(120): p. 46-51.
24. Hartwell, L.H., J. Culotti, and B. Reid, *Genetic control of the cell-division cycle in yeast. I. Detection of mutants*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1970. **66**(2): p. 352-9.
25. Nasmyth, K.A. and S.I. Reed, *Isolation of genes by complementation in yeast: molecular cloning of a cell-cycle gene*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1980. **77**(4): p. 2119-23.
26. Lorincz, A.T. and S.I. Reed, *Primary structure homology between the product of yeast cell division control gene CDC28 and vertebrate oncogenes*. Nature, 1984. **307**(5947): p. 183-5.
27. Reed, S.I., J.A. Hadwiger, and A.T. Lorincz, *Protein kinase activity associated with the product of the yeast cell division cycle gene CDC28*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1985. **82**(12): p. 4055-9.
28. Nurse, P., *Genetic control of cell size at cell division in yeast*. Nature, 1975. **256**(5518): p. 547-51.
29. Nurse, P., *Universal control mechanism regulating onset of M-phase*. Nature, 1990. **344**(6266): p. 503-8.
30. Nasmyth, K., *A prize for proliferation*. Cell, 2001. **107**(6): p. 689-701.
31. Beach, D., B. Durkacz, and P. Nurse, *Functionally homologous cell cycle control genes in budding and fission yeast*. Nature, 1982. **300**(5894): p. 706-9.
32. Nurse, P. and P. Thuriaux, *Regulatory genes controlling mitosis in the fission yeast Schizosaccharomyces pombe*. Genetics, 1980. **96**(3): p. 627-37.
33. Lohka, M.J., M.K. Hayes, and J.L. Maller, *Purification of maturation-promoting factor, an intracellular regulator of early mitotic events*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1988. **85**(9): p. 3009-13.
34. Hayles, J., et al., *The fission yeast cell cycle control gene cdc2: isolation of a sequence suc1 that suppresses cdc2 mutant function*. Mol Gen Genet, 1986. **202**(2): p. 291-3.
35. Brizuela, L., G. Draetta, and D. Beach, *p13suc1 acts in the fission yeast cell division cycle as a component of the p34cdc2 protein kinase*. Embo J, 1987. **6**(11): p. 3507-14.
36. Gautier, J., et al., *Purified maturation-promoting factor contains the product of a Xenopus homolog of the fission yeast cell cycle control gene cdc2+*. Cell, 1988. **54**(3): p. 433-9.
37. Dunphy, W.G., et al., *The Xenopus cdc2 protein is a component of MPF, a cytoplasmic regulator of mitosis*. Cell, 1988. **54**(3): p. 423-31.
38. Labbe, J.C., et al., *Activation at M-phase of a protein kinase encoded by a starfish homologue of the cell cycle control gene cdc2+*. Nature, 1988. **335**(6187): p. 251-4.
39. Labbe, J.C., et al., *MPF from starfish oocytes at first meiotic metaphase is a heterodimer containing one molecule of cdc2 and one molecule of cyclin B*. Embo J, 1989. **8**(10): p. 3053-8.
40. Meijer, L., et al., *Cyclin is a component of the sea urchin egg M-phase specific histone H1 kinase*. Embo J, 1989. **8**(8): p. 2275-82.
41. Evans, T., et al., *Cyclin: a protein specified by maternal mRNA in sea urchin eggs that is destroyed at each cleavage division*. Cell, 1983. **33**(2): p. 389-96.
42. Pines, J. and T. Hunt, *Molecular cloning and characterization of the mRNA for cyclin from sea urchin eggs*. Embo J, 1987. **6**(10): p. 2987-95.
43. Murray, A.W., M.J. Solomon, and M.W. Kirschner, *The role of cyclin synthesis and degradation in the control of maturation promoting factor activity*. Nature, 1989. **339**(6222): p. 280-6.
44. Murray, A.W. and M.W. Kirschner, *Cyclin synthesis drives the early embryonic cell cycle*. Nature, 1989. **339**(6222): p. 275-80.

45. Minshull, J., J.J. Blow, and T. Hunt, *Translation of cyclin mRNA is necessary for extracts of activated xenopus eggs to enter mitosis*. Cell, 1989. **56**(6): p. 947-56.
46. Draetta, G., et al., *Cdc2 protein kinase is complexed with both cyclin A and B: evidence for proteolytic inactivation of MPF*. Cell, 1989. **56**(5): p. 829-38.
47. Doree, M. and T. Hunt, *From Cdc2 to Cdk1: when did the cell cycle kinase join its cyclin partner?* J Cell Sci, 2002. **115**(Pt 12): p. 2461-4.
48. Minshull, J., et al., *The role of cyclin synthesis, modification and destruction in the control of cell division*. J Cell Sci Suppl, 1989. **12**: p. 77-97.
49. Draetta, G. and D. Beach, *The mammalian cdc2 protein kinase: mechanisms of regulation during the cell cycle*. J Cell Sci Suppl, 1989. **12**: p. 21-7.
50. Hunt, T., *Maturation promoting factor, cyclin and the control of M-phase*. Curr Opin Cell Biol, 1989. **1**(2): p. 268-74.
51. Pines, J. and T. Hunter, *Isolation of a human cyclin cDNA: evidence for cyclin mRNA and protein regulation in the cell cycle and for interaction with p34cdc2*. Cell, 1989. **58**(5): p. 833-46.
52. Gautier, J. and J.L. Maller, *Cyclin B in Xenopus oocytes: implications for the mechanism of pre-MPF activation*. Embo J, 1991. **10**(1): p. 177-82.
53. Lehner, C.F. and P.H. O'Farrell, *Drosophila cdc2 homologs: a functional homolog is coexpressed with a cognate variant*. Embo J, 1990. **9**(11): p. 3573-81.
54. Lee, M.G. and P. Nurse, *Complementation used to clone a human homologue of the fission yeast cell cycle control gene cdc2*. Nature, 1987. **327**(6117): p. 31-5.
55. Paris, J., et al., *Cloning by differential screening of a Xenopus cDNA coding for a protein highly homologous to cdc2*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**(3): p. 1039-43.
56. Elledge, S.J. and M.R. Spottswood, *A new human p34 protein kinase, CDK2, identified by complementation of a cdc28 mutation in Saccharomyces cerevisiae, is a homolog of Xenopus Egl*. Embo J, 1991. **10**(9): p. 2653-9.
57. Meyerson, M., et al., *A family of human cdc2-related protein kinases*. Embo J, 1992. **11**(8): p. 2909-17.
58. Knockaert, M., P. Greengard, and L. Meijer, *Pharmacological inhibitors of cyclin-dependent kinases*. Trends Pharmacol Sci, 2002. **23**(9): p. 417-25.
59. Pines, J., *Four-dimensional control of the cell cycle*. Nat Cell Biol, 1999. **1**(3): p. E73-9.
60. Meyerson, M. and E. Harlow, *Identification of G1 kinase activity for cdk6, a novel cyclin D partner*. Mol Cell Biol, 1994. **14**(3): p. 2077-86.
61. Matsushime, H., et al., *D-type cyclin-dependent kinase activity in mammalian cells*. Mol Cell Biol, 1994. **14**(3): p. 2066-76.
62. Tsutsui, T., et al., *Targeted disruption of CDK4 delays cell cycle entry with enhanced p27(Kip1) activity*. Mol Cell Biol, 1999. **19**(10): p. 7011-9.
63. Pagano, M., et al., *Regulation of the cell cycle by the cdk2 protein kinase in cultured human fibroblasts*. J Cell Biol, 1993. **121**(1): p. 101-11.
64. D'Angiolella, V., et al., *Role for cyclin-dependent kinase 2 in mitosis exit*. Curr Biol, 2001. **11**(15): p. 1221-6.
65. Fisher, R.P., *CDKs and cyclins in transition(s)*. Curr Opin Genet Dev, 1997. **7**(1): p. 32-8.
66. Lew, D.J. and S. Kornbluth, *Regulatory roles of cyclin dependent kinase phosphorylation in cell cycle control*. Curr Opin Cell Biol, 1996. **8**(6): p. 795-804.
67. Tang, D. and J.H. Wang, *Cyclin-dependent kinase 5 (Cdk5) and neuron-specific Cdk5 activators*. Prog Cell Cycle Res, 1996. **2**: p. 205-16.
68. Dhavan, R. and L.H. Tsai, *A decade of CDK5*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2001. **2**(10): p. 749-59.

69. Smith, D.S. and L.H. Tsai, *Cdk5 behind the wheel: a role in trafficking and transport?* Trends Cell Biol, 2002. **12**(1): p. 28-36.
70. Harper, J.W. and S.J. Elledge, *The role of Cdk7 in CAK function, a retro-retrospective.* Genes Dev, 1998. **12**(3): p. 285-9.
71. Murray, A.W. and D. Marks, *Can sequencing shed light on cell cycling?* Nature, 2001. **409**(6822): p. 844-6.
72. Pines, J., *Cyclins and cyclin-dependent kinases: a biochemical view.* Biochem J, 1995. **308 ( Pt 3)**: p. 697-711.
73. Wittenberg, C. and S.I. Reed, *Control of the yeast cell cycle is associated with assembly/disassembly of the Cdc28 protein kinase complex.* Cell, 1988. **54**(7): p. 1061-72.
74. Draetta, G. and D. Beach, *Activation of cdc2 protein kinase during mitosis in human cells: cell cycle-dependent phosphorylation and subunit rearrangement.* Cell, 1988. **54**(1): p. 17-26.
75. Simanis, V. and P. Nurse, *The cell cycle control gene cdc2+ of fission yeast encodes a protein kinase potentially regulated by phosphorylation.* Cell, 1986. **45**(2): p. 261-8.
76. Morgan, D.O., *Principles of CDK regulation.* Nature, 1995. **374**(6518): p. 131-4.
77. De Bondt, H.L., et al., *Crystal structure of cyclin-dependent kinase 2.* Nature, 1993. **363**(6430): p. 595-602.
78. Pavletich, N.P., *Mechanisms of cyclin-dependent kinase regulation: structures of Cdks, their cyclin activators, and Cip and INK4 inhibitors.* J Mol Biol, 1999. **287**(5): p. 821-8.
79. Coleman, T.R. and W.G. Dunphy, *Cdc2 regulatory factors.* Curr Opin Cell Biol, 1994. **6**(6): p. 877-82.
80. Breeden, L.L., *Cyclin transcription: Timing is everything.* Curr Biol, 2000. **10**(16): p. R586-8.
81. Jeffrey, P.D., et al., *Mechanism of CDK activation revealed by the structure of a cyclinA-CDK2 complex.* Nature, 1995. **376**(6538): p. 313-20.
82. Schulman, B.A., D.L. Lindstrom, and E. Harlow, *Substrate recruitment to cyclin-dependent kinase 2 by a multipurpose docking site on cyclin A.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(18): p. 10453-8.
83. Cross, F.R., et al., *Specialization and targeting of B-type cyclins.* Mol Cell, 1999. **4**(1): p. 11-9.
84. Diehl, J.A. and C.J. Sherr, *A dominant-negative cyclin D1 mutant prevents nuclear import of cyclin-dependent kinase 4 (CDK4) and its phosphorylation by CDK-activating kinase.* Mol Cell Biol, 1997. **17**(12): p. 7362-74.
85. Yang, J. and S. Kornbluth, *All aboard the cyclin train: subcellular trafficking of cyclins and their CDK partners.* Trends Cell Biol, 1999. **9**(6): p. 207-10.
86. Hagting, A., et al., *Translocation of cyclin B1 to the nucleus at prophase requires a phosphorylation-dependent nuclear import signal.* Curr Biol, 1999. **9**(13): p. 680-9.
87. Elledge, S.J. and J.W. Harper, *Cdk inhibitors: on the threshold of checkpoints and development.* Curr Opin Cell Biol, 1994. **6**(6): p. 847-52.
88. Hall, M., S. Bates, and G. Peters, *Evidence for different modes of action of cyclin-dependent kinase inhibitors: p15 and p16 bind to kinases, p21 and p27 bind to cyclins.* Oncogene, 1995. **11**(8): p. 1581-8.
89. Aprelikova, O., Y. Xiong, and E.T. Liu, *Both p16 and p21 families of cyclin-dependent kinase (CDK) inhibitors block the phosphorylation of cyclin-dependent kinases by the CDK-activating kinase.* J Biol Chem, 1995. **270**(31): p. 18195-7.
90. Serrano, M., G.J. Hannon, and D. Beach, *A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4.* Nature, 1993. **366**(6456): p. 704-7.

91. Hannon, G.J. and D. Beach, *p15INK4B is a potential effector of TGF-beta-induced cell cycle arrest*. Nature, 1994. **371**(6494): p. 257-61.
92. Guan, K.L., et al., *Growth suppression by p18, a p16INK4/MTS1- and p14INK4B/MTS2-related CDK6 inhibitor, correlates with wild-type pRb function*. Genes Dev, 1994. **8**(24): p. 2939-52.
93. Hirai, H., et al., *Novel INK4 proteins, p19 and p18, are specific inhibitors of the cyclin D-dependent kinases CDK4 and CDK6*. Mol Cell Biol, 1995. **15**(5): p. 2672-81.
94. Brotherton, D.H., et al., *Crystal structure of the complex of the cyclin D-dependent kinase Cdk6 bound to the cell-cycle inhibitor p19INK4d*. Nature, 1998. **395**(6699): p. 244-50.
95. Russo, A.A., et al., *Structural basis for inhibition of the cyclin-dependent kinase Cdk6 by the tumour suppressor p16INK4a*. Nature, 1998. **395**(6699): p. 237-43.
96. el-Deiry, W.S., et al., *WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression*. Cell, 1993. **75**(4): p. 817-25.
97. Harper, J.W., et al., *The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases*. Cell, 1993. **75**(4): p. 805-16.
98. Harper, J.W., et al., *Inhibition of cyclin-dependent kinases by p21*. Mol Biol Cell, 1995. **6**(4): p. 387-400.
99. Boulaire, J., A. Fotedar, and R. Fotedar, *The functions of the cdk-cyclin kinase inhibitor p21WAF1*. Pathol Biol (Paris), 2000. **48**(3): p. 190-202.
100. Polyak, K., et al., *Cloning of p27Kip1, a cyclin-dependent kinase inhibitor and a potential mediator of extracellular antimitogenic signals*. Cell, 1994. **78**(1): p. 59-66.
101. Polyak, K., et al., *p27Kip1, a cyclin-Cdk inhibitor, links transforming growth factor-beta and contact inhibition to cell cycle arrest*. Genes Dev, 1994. **8**(1): p. 9-22.
102. Toyoshima, H. and T. Hunter, *p27, a novel inhibitor of G1 cyclin-Cdk protein kinase activity, is related to p21*. Cell, 1994. **78**(1): p. 67-74.
103. Lee, M.H., I. Reynisdottir, and J. Massague, *Cloning of p57KIP2, a cyclin-dependent kinase inhibitor with unique domain structure and tissue distribution*. Genes Dev, 1995. **9**(6): p. 639-49.
104. Matsuoka, S., et al., *p57KIP2, a structurally distinct member of the p21CIP1 Cdk inhibitor family, is a candidate tumor suppressor gene*. Genes Dev, 1995. **9**(6): p. 650-62.
105. Cayrol, C., M. Knibiehler, and B. Ducommun, *p21 binding to PCNA causes G1 and G2 cell cycle arrest in p53-deficient cells*. Oncogene, 1998. **16**(3): p. 311-20.
106. Niculescu, A.B., 3rd, et al., *Effects of p21(Cip1/Waf1) at both the G1/S and the G2/M cell cycle transitions: pRb is a critical determinant in blocking DNA replication and in preventing endoreduplication*. Mol Cell Biol, 1998. **18**(1): p. 629-43.
107. Medema, R.H., et al., *p21waf1 can block cells at two points in the cell cycle, but does not interfere with processive DNA-replication or stress-activated kinases*. Oncogene, 1998. **16**(4): p. 431-41.
108. Goubin, F. and B. Ducommun, *Identification of binding domains on the p21Cip1 cyclin-dependent kinase inhibitor*. Oncogene, 1995. **10**(12): p. 2281-7.
109. Fotedar, R., et al., *p21 contains independent binding sites for cyclin and cdk2: both sites are required to inhibit cdk2 kinase activity*. Oncogene, 1996. **12**(10): p. 2155-64.
110. Chen, J., et al., *Cyclin-binding motifs are essential for the function of p21CIP1*. Mol Cell Biol, 1996. **16**(9): p. 4673-82.
111. Lin, J., et al., *Analysis of wild-type and mutant p21WAF-1 gene activities*. Mol Cell Biol, 1996. **16**(4): p. 1786-93.
112. Russo, A.A., et al., *Crystal structure of the p27Kip1 cyclin-dependent-kinase inhibitor bound to the cyclin A-Cdk2 complex*. Nature, 1996. **382**(6589): p. 325-31.

113. Cheng, M., et al., *The p21(Cip1) and p27(Kip1) CDK 'inhibitors' are essential activators of cyclin D-dependent kinases in murine fibroblasts*. *Embo J*, 1999. **18**(6): p. 1571-83.
114. LaBaer, J., et al., *New functional activities for the p21 family of CDK inhibitors*. *Genes Dev*, 1997. **11**(7): p. 847-62.
115. Hadwiger, J.A., et al., *The Saccharomyces cerevisiae CKS1 gene, a homolog of the Schizosaccharomyces pombe suc1+ gene, encodes a subunit of the Cdc28 protein kinase complex*. *Mol Cell Biol*, 1989. **9**(5): p. 2034-41.
116. Richardson, H.E., et al., *Human cDNAs encoding homologs of the small p34Cdc28/Cdc2-associated protein of Saccharomyces cerevisiae and Schizosaccharomyces pombe*. *Genes Dev*, 1990. **4**(8): p. 1332-44.
117. Arvai, A.S., et al., *Crystallization and preliminary crystallographic study of human CksHs1: a cell cycle regulatory protein*. *Proteins*, 1995. **21**(1): p. 70-3.
118. Vogel, L. and B. Baratte, *Suc1: cdc2 affinity reagent or essential cdk adaptor protein?* *Prog Cell Cycle Res*, 1996. **2**: p. 129-35.
119. Lenormand, J.L., et al., *Speedy: a novel cell cycle regulator of the G2/M transition*. *Embo J*, 1999. **18**(7): p. 1869-77.
120. Ferby, I., et al., *A novel p34(cdc2)-binding and activating protein that is necessary and sufficient to trigger G(2)/M progression in Xenopus oocytes*. *Genes Dev*, 1999. **13**(16): p. 2177-89.
121. Gu, Y., J. Rosenblatt, and D.O. Morgan, *Cell cycle regulation of CDK2 activity by phosphorylation of Thr160 and Tyr15*. *Embo J*, 1992. **11**(11): p. 3995-4005.
122. Solomon, M.J., T. Lee, and M.W. Kirschner, *Role of phosphorylation in p34cdc2 activation: identification of an activating kinase*. *Mol Biol Cell*, 1992. **3**(1): p. 13-27.
123. Matsuoka, M., et al., *Activation of cyclin-dependent kinase 4 (cdk4) by mouse MO15-associated kinase*. *Mol Cell Biol*, 1994. **14**(11): p. 7265-75.
124. Kato, J.Y., et al., *Regulation of cyclin D-dependent kinase 4 (cdk4) by cdk4-activating kinase*. *Mol Cell Biol*, 1994. **14**(4): p. 2713-21.
125. Marcote, M.J., et al., *A three-dimensional model of the Cdc2 protein kinase: localization of cyclin- and Suc1-binding regions and phosphorylation sites*. *Mol Cell Biol*, 1993. **13**(8): p. 5122-31.
126. Cheng, A., P. Kaldis, and M.J. Solomon, *Dephosphorylation of human cyclin-dependent kinases by protein phosphatase type 2C alpha and beta 2 isoforms*. *J Biol Chem*, 2000. **275**(44): p. 34744-9.
127. Lee, T.H., C. Turck, and M.W. Kirschner, *Inhibition of cdc2 activation by INH/PP2A*. *Mol Biol Cell*, 1994. **5**(3): p. 323-38.
128. De Smedt, V., et al., *Thr-161 phosphorylation of monomeric Cdc2. Regulation by protein phosphatase 2C in Xenopus oocytes*. *J Biol Chem*, 2002. **277**(32): p. 28592-600.
129. Desai, D., et al., *Effects of phosphorylation by CAK on cyclin binding by CDC2 and CDK2*. *Mol Cell Biol*, 1995. **15**(1): p. 345-50.
130. Ducommun, B., et al., *cdc2 phosphorylation is required for its interaction with cyclin*. *Embo J*, 1991. **10**(11): p. 3311-9.
131. Kaldis, P., *The cdk-activating kinase (CAK): from yeast to mammals*. *Cell Mol Life Sci*, 1999. **55**(2): p. 284-96.
132. Tassan, J.P., et al., *In vitro assembly of a functional human CDK7-cyclin H complex requires MAT1, a novel 36 kDa RING finger protein*. *Embo J*, 1995. **14**(22): p. 5608-17.
133. Devault, A., et al., *MAT1 ('menage a trois') a new RING finger protein subunit stabilizing cyclin H-cdk7 complexes in starfish and Xenopus CAK*. *Embo J*, 1995. **14**(20): p. 5027-36.
134. Yankulov, K.Y. and D.L. Bentley, *Regulation of CDK7 substrate specificity by MAT1 and TFIIH*. *Embo J*, 1997. **16**(7): p. 1638-46.

135. Krek, W. and E.A. Nigg, *Differential phosphorylation of vertebrate p34cdc2 kinase at the G1/S and G2/M transitions of the cell cycle: identification of major phosphorylation sites*. Embo J, 1991. **10**(2): p. 305-16.
136. Krek, W. and E.A. Nigg, *Mutations of p34cdc2 phosphorylation sites induce premature mitotic events in HeLa cells: evidence for a double block to p34cdc2 kinase activation in vertebrates*. Embo J, 1991. **10**(11): p. 3331-41.
137. Norbury, C., J. Blow, and P. Nurse, *Regulatory phosphorylation of the p34cdc2 protein kinase in vertebrates*. Embo J, 1991. **10**(11): p. 3321-9.
138. McGowan, C.H. and P. Russell, *Human Wee1 kinase inhibits cell division by phosphorylating p34cdc2 exclusively on Tyr15*. Embo J, 1993. **12**(1): p. 75-85.
139. Parker, L.L., et al., *Cyclin promotes the tyrosine phosphorylation of p34cdc2 in a wee1+ dependent manner*. Embo J, 1991. **10**(5): p. 1255-63.
140. Russell, P. and P. Nurse, *Negative regulation of mitosis by wee1+, a gene encoding a protein kinase homolog*. Cell, 1987. **49**(4): p. 559-67.
141. Gould, K.L. and P. Nurse, *Tyrosine phosphorylation of the fission yeast cdc2+ protein kinase regulates entry into mitosis*. Nature, 1989. **342**(6245): p. 39-45.
142. Lee, M.S., T. Enoch, and H. Piwnicka-Worms, *mik1+ encodes a tyrosine kinase that phosphorylates p34cdc2 on tyrosine 15*. J Biol Chem, 1994. **269**(48): p. 30530-7.
143. Lundgren, K., et al., *mik1 and wee1 cooperate in the inhibitory tyrosine phosphorylation of cdc2*. Cell, 1991. **64**(6): p. 1111-22.
144. Kornbluth, S., et al., *Membrane localization of the kinase which phosphorylates p34cdc2 on threonine 14*. Mol Biol Cell, 1994. **5**(3): p. 273-82.
145. Liu, F., et al., *The human Myt1 kinase preferentially phosphorylates Cdc2 on threonine 14 and localizes to the endoplasmic reticulum and Golgi complex*. Mol Cell Biol, 1997. **17**(2): p. 571-83.
146. Mueller, P.R., et al., *Myt1: a membrane-associated inhibitory kinase that phosphorylates Cdc2 on both threonine-14 and tyrosine-15*. Science, 1995. **270**(5233): p. 86-90.
147. Wells, N.J., et al., *The C-terminal domain of the Cdc2 inhibitory kinase Myt1 interacts with Cdc2 complexes and is required for inhibition of G(2)/M progression*. J Cell Sci, 1999. **112** ( Pt 19): p. 3361-71.
148. Liu, F., et al., *Overproduction of human Myt1 kinase induces a G2 cell cycle delay by interfering with the intracellular trafficking of Cdc2-cyclin B1 complexes*. Mol Cell Biol, 1999. **19**(7): p. 5113-23.
149. Terada, Y., et al., *Requirement for tyrosine phosphorylation of Cdk4 in G1 arrest induced by ultraviolet irradiation*. Nature, 1995. **376**(6538): p. 358-62.
150. Damiens, E. and L. Meijer, *[Chemical inhibitors of cyclic-dependent kinases: preclinical and clinical study]*. Pathol Biol (Paris), 2000. **48**(3): p. 340-51.
151. Russell, P. and P. Nurse, *cdc25+ functions as an inducer in the mitotic control of fission yeast*. Cell, 1986. **45**(1): p. 145-53.
152. Edgar, B.A. and P.H. O'Farrell, *Genetic control of cell division patterns in the Drosophila embryo*. Cell, 1989. **57**(1): p. 177-87.
153. Ducommun, B., et al., *Fission yeast cdc25 is a cell-cycle regulated protein*. Biochem Biophys Res Commun, 1990. **167**(1): p. 301-9.
154. Kumagai, A. and W.G. Dunphy, *The cdc25 protein controls tyrosine dephosphorylation of the cdc2 protein in a cell-free system*. Cell, 1991. **64**(5): p. 903-14.
155. Jessus, C. and D. Beach, *Oscillation of MPF is accompanied by periodic association between cdc25 and cdc2-cyclin B*. Cell, 1992. **68**(2): p. 323-32.
156. Strausfeld, U., et al., *Dephosphorylation and activation of a p34cdc2/cyclin B complex in vitro by human CDC25 protein*. Nature, 1991. **351**(6323): p. 242-5.

157. Gautier, J., et al., *cdc25 is a specific tyrosine phosphatase that directly activates p34cdc2*. Cell, 1991. **67**(1): p. 197-211.
158. Millar, J.B., et al., *p80cdc25 mitotic inducer is the tyrosine phosphatase that activates p34cdc2 kinase in fission yeast*. Embo J, 1991. **10**(13): p. 4301-9.
159. Dunphy, W.G. and A. Kumagai, *The cdc25 protein contains an intrinsic phosphatase activity*. Cell, 1991. **67**(1): p. 189-96.
160. Lee, M.S., et al., *cdc25+ encodes a protein phosphatase that dephosphorylates p34cdc2*. Mol Biol Cell, 1992. **3**(1): p. 73-84.
161. Moreno, S. and P. Nurse, *Clues to action of cdc25 protein*. Nature, 1991. **351**(6323): p. 194.
162. Guan, K.L., S.S. Broyles, and J.E. Dixon, *A Tyr/Ser protein phosphatase encoded by vaccinia virus*. Nature, 1991. **350**(6316): p. 359-62.
163. Millar, J.B. and P. Russell, *The cdc25 M-phase inducer: an unconventional protein phosphatase*. Cell, 1992. **68**(3): p. 407-10.
164. Honda, R., et al., *Dephosphorylation of human p34cdc2 kinase on both Thr-14 and Tyr-15 by human cdc25B phosphatase*. FEBS Lett, 1993. **318**(3): p. 331-4.
165. Sebastian, B., A. Kakizuka, and T. Hunter, *Cdc25M2 activation of cyclin-dependent kinases by dephosphorylation of threonine-14 and tyrosine-15*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(8): p. 3521-4.
166. Xu, X. and S.P. Burke, *Roles of active site residues and the NH2-terminal domain in the catalysis and substrate binding of human Cdc25*. J Biol Chem, 1996. **271**(9): p. 5118-24.
167. Gabrielli, B.G., et al., *Cdc25 regulates the phosphorylation and activity of the Xenopus cdk2 protein kinase complex*. J Biol Chem, 1992. **267**(25): p. 18040-6.
168. Fauman, E.B., et al., *Crystal structure of the catalytic domain of the human cell cycle control phosphatase, Cdc25A*. Cell, 1998. **93**(4): p. 617-25.
169. Reynolds, R.A., et al., *Crystal structure of the catalytic subunit of Cdc25B required for G2/M phase transition of the cell cycle*. J Mol Biol, 1999. **293**(3): p. 559-68.
170. Chen, W., M. Wilborn, and J. Rudolph, *Dual-specific Cdc25B phosphatase: in search of the catalytic acid*. Biochemistry, 2000. **39**(35): p. 10781-9.
171. McCain, D.F., et al., *The catalytic mechanism of Cdc25A phosphatase*. J Biol Chem, 2002. **277**(13): p. 11190-200.
172. Sadhu, K., et al., *Human homolog of fission yeast cdc25 mitotic inducer is predominantly expressed in G2*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1990. **87**(13): p. 5139-43.
173. Galaktionov, K. and D. Beach, *Specific activation of cdc25 tyrosine phosphatases by B-type cyclins: evidence for multiple roles of mitotic cyclins*. Cell, 1991. **67**(6): p. 1181-94.
174. Nagata, A., et al., *An additional homolog of the fission yeast cdc25+ gene occurs in humans and is highly expressed in some cancer cells*. New Biol, 1991. **3**(10): p. 959-68.
175. Jinno, S., et al., *Cdc25A is a novel phosphatase functioning early in the cell cycle*. Embo J, 1994. **13**(7): p. 1549-56.
176. Hoffmann, I., G. Draetta, and E. Karsenti, *Activation of the phosphatase activity of human cdc25A by a cdk2-cyclin E dependent phosphorylation at the G1/S transition*. Embo J, 1994. **13**(18): p. 4302-10.
177. Blomberg, I. and I. Hoffmann, *Ectopic expression of Cdc25A accelerates the G(1)/S transition and leads to premature activation of cyclin E- and cyclin A-dependent kinases*. Mol Cell Biol, 1999. **19**(9): p. 6183-94.
178. Mailand, N., et al., *Regulation of G(2)/M events by Cdc25A through phosphorylation-dependent modulation of its stability*. Embo J, 2002. **21**(21): p. 5911-20.
179. Lammer, C., et al., *The cdc25B phosphatase is essential for the G2/M phase transition in human cells*. J Cell Sci, 1998. **111 ( Pt 16)**: p. 2445-53.

180. Gabrielli, B.G., et al., *Cytoplasmic accumulation of cdc25B phosphatase in mitosis triggers centrosomal microtubule nucleation in HeLa cells*. J Cell Sci, 1996. **109**(Pt 5): p. 1081-93.
181. Forrest, A.R., et al., *Multiple splicing variants of cdc25B regulate G2/M progression*. Biochem Biophys Res Commun, 1999. **260**(2): p. 510-5.
182. Karlsson, C., et al., *Cdc25B and Cdc25C differ markedly in their properties as initiators of mitosis*. J Cell Biol, 1999. **146**(3): p. 573-84.
183. Garner-Hamrick, P.A. and C. Fisher, *Antisense phosphorothioate oligonucleotides specifically down-regulate cdc25B causing S-phase delay and persistent antiproliferative effects*. Int J Cancer, 1998. **76**(5): p. 720-8.
184. Millar, J.B., et al., *p55CDC25 is a nuclear protein required for the initiation of mitosis in human cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**(23): p. 10500-4.
185. Hoffmann, I., et al., *Phosphorylation and activation of human cdc25-C by cdc2--cyclin B and its involvement in the self-amplification of MPF at mitosis*. Embo J, 1993. **12**(1): p. 53-63.
186. Donzelli, M., et al., *Dual mode of degradation of Cdc25 A phosphatase*. Embo J, 2002. **21**(18): p. 4875-84.
187. Bernardi, R., D.A. Liebermann, and B. Hoffman, *Cdc25A stability is controlled by the ubiquitin-proteasome pathway during cell cycle progression and terminal differentiation*. Oncogene, 2000. **19**(20): p. 2447-54.
188. Molinari, M., et al., *Human Cdc25 A inactivation in response to S phase inhibition and its role in preventing premature mitosis*. EMBO Rep, 2000. **1**(1): p. 71-9.
189. Sexl, V., et al., *A rate limiting function of cdc25A for S phase entry inversely correlates with tyrosine dephosphorylation of Cdk2*. Oncogene, 1999. **18**(3): p. 573-82.
190. Goldstone, S., et al., *Cdc25-dependent activation of cyclin A/cdk2 is blocked in G2 phase arrested cells independently of ATM/ATR*. Oncogene, 2001. **20**(8): p. 921-32.
191. Gabrielli, B.G., et al., *Hyperphosphorylation of the N-terminal domain of Cdc25 regulates activity toward cyclin B1/Cdc2 but not cyclin A/Cdk2*. J Biol Chem, 1997. **272**(45): p. 28607-14.
192. Deshimaru, S., et al., *Heterologous expression and catalytic properties of the C-terminal domain of starfish cdc25 dual-specificity phosphatase, a cell cycle regulator*. J Biochem (Tokyo), 2002. **131**(5): p. 705-12.
193. Wilborn, M., et al., *The C-terminal tail of the dual-specificity Cdc25B phosphatase mediates modular substrate recognition*. Biochemistry, 2001. **40**(47): p. 14200-6.
194. Coqueret, O., G. Berube, and A. Nepveu, *The mammalian Cut homeodomain protein functions as a cell-cycle-dependent transcriptional repressor which downmodulates p21WAF1/CIP1/SDI1 in S phase*. Embo J, 1998. **17**(16): p. 4680-94.
195. Saha, P., et al., *p21CIP1 and Cdc25A: competition between an inhibitor and an activator of cyclin-dependent kinases*. Mol Cell Biol, 1997. **17**(8): p. 4338-45.
196. Zou, X., et al., *The cell cycle-regulatory CDC25A phosphatase inhibits apoptosis signal-regulating kinase 1*. Mol Cell Biol, 2001. **21**(14): p. 4818-28.
197. Xia, K., et al., *Tyrosine phosphorylation of the proto-oncoprotein Raf-1 is regulated by Raf-1 itself and the phosphatase Cdc25A*. Mol Cell Biol, 1999. **19**(7): p. 4819-24.
198. Ma, Z.Q., et al., *Cdc25B functions as a novel coactivator for the steroid receptors*. Mol Cell Biol, 2001. **21**(23): p. 8056-67.
199. Ngan, E.S., et al., *Overexpression of Cdc25B, an androgen receptor coactivator, in prostate cancer*. Oncogene, 2003. **22**(5): p. 734-9.
200. Kawabe, T., et al., *Cdc25C interacts with PCNA at G2/M transition*. Oncogene, 2002. **21**(11): p. 1717-26.



201. Liu, N., et al., *CDF-1, a novel E2F-unrelated factor, interacts with cell cycle-regulated repressor elements in multiple promoters*. Nucleic Acids Res, 1997. **25**(24): p. 4915-20.
202. Zwicker, J., et al., *Cell cycle regulation of cdc25C transcription is mediated by the periodic repression of the glutamine-rich activators NF-Y and Sp1*. Nucleic Acids Res, 1995. **23**(19): p. 3822-30.
203. Zwicker, J., et al., *Cell cycle regulation of the cyclin A, cdc25C and cdc2 genes is based on a common mechanism of transcriptional repression*. Embo J, 1995. **14**(18): p. 4514-22.
204. Lucibello, F.C., et al., *Periodic cdc25C transcription is mediated by a novel cell cycle-regulated repressor element (CDE)*. Embo J, 1995. **14**(1): p. 132-42.
205. Korner, K. and R. Muller, *In vivo structure of the cell cycle-regulated human cdc25C promoter*. J Biol Chem, 2000. **275**(25): p. 18676-81.
206. Haugwitz, U., et al., *A single cell cycle genes homology region (CHR) controls cell cycle-dependent transcription of the cdc25C phosphatase gene and is able to cooperate with E2F or Sp1/3 sites*. Nucleic Acids Res, 2002. **30**(9): p. 1967-76.
207. Krause, K., et al., *Expression of the cell cycle phosphatase cdc25C is down-regulated by the tumor suppressor protein p53 but not by p73*. Biochem Biophys Res Commun, 2001. **284**(3): p. 743-50.
208. Resnick-Silverman, L., et al., *Identification of a novel class of genomic DNA-binding sites suggests a mechanism for selectivity in target gene activation by the tumor suppressor protein p53*. Genes Dev, 1998. **12**(14): p. 2102-7.
209. Galaktionov, K., X. Chen, and D. Beach, *Cdc25 cell-cycle phosphatase as a target of c-myc*. Nature, 1996. **382**(6591): p. 511-7.
210. Iavarone, A. and J. Massague, *Repression of the CDK activator Cdc25A and cell-cycle arrest by cytokine TGF-beta in cells lacking the CDK inhibitor p15*. Nature, 1997. **387**(6631): p. 417-22.
211. Tiefenbrun, N., et al., *Alpha interferon suppresses the cyclin D3 and cdc25A genes, leading to a reversible G0-like arrest*. Mol Cell Biol, 1996. **16**(7): p. 3934-44.
212. Chen, X. and R. Prywes, *Serum-induced expression of the cdc25A gene by relief of E2F-mediated repression*. Mol Cell Biol, 1999. **19**(7): p. 4695-702.
213. Wu, L., et al., *E2F-Rb complexes assemble and inhibit cdc25A transcription in cervical carcinoma cells following repression of human papillomavirus oncogene expression*. Mol Cell Biol, 2000. **20**(19): p. 7059-67.
214. Spitkovsky, D., et al., *S-phase induction by adenovirus E1A requires activation of cdc25a tyrosine phosphatase*. Oncogene, 1996. **12**(12): p. 2549-54.
215. Katich, S.C., K. Zerfass-Thome, and I. Hoffmann, *Regulation of the Cdc25A gene by the human papillomavirus Type 16 E7 oncogene*. Oncogene, 2001. **20**(5): p. 543-50.
216. Nguyen, D.X., T.F. Westbrook, and D.J. McCance, *Human papillomavirus type 16 E7 maintains elevated levels of the cdc25A tyrosine phosphatase during deregulation of cell cycle arrest*. J Virol, 2002. **76**(2): p. 619-32.
217. Um, M., et al., *Heterozygous disruption of the TATA-binding protein gene in DT40 cells causes reduced cdc25B phosphatase expression and delayed mitosis*. Mol Cell Biol, 2001. **21**(7): p. 2435-48.
218. Korner, K., et al., *Cell cycle regulation of the murine cdc25B promoter: essential role for nuclear factor-Y and a proximal repressor element*. J Biol Chem, 2001. **276**(13): p. 9662-9.
219. Baldin, V., et al., *Alternative splicing of the human CDC25B tyrosine phosphatase. Possible implications for growth control?* Oncogene, 1997. **14**(20): p. 2485-95.
220. Wegener, S., et al., *Alternative splicing in the regulatory region of the human phosphatases CDC25A and CDC25C*. Eur J Cell Biol, 2000. **79**(11): p. 810-5.

221. Daga, R.R. and J. Jimenez, *Translational control of the cdc25 cell cycle phosphatase: a molecular mechanism coupling mitosis to cell growth*. J Cell Sci, 1999. **112 Pt 18**: p. 3137-46.
222. Nefsky, B. and D. Beach, *Pub1 acts as an E6-AP-like protein ubiquitin ligase in the degradation of cdc25*. Embo J, 1996. **15(6)**: p. 1301-12.
223. Nishijima, H., et al., *A dual-specificity phosphatase Cdc25B is an unstable protein and triggers p34(cdc2)/cyclin B activation in hamster BHK21 cells arrested with hydroxyurea*. J Cell Biol, 1997. **138(5)**: p. 1105-16.
224. Baldin, V., et al., *Phosphorylation of human CDC25B phosphatase by CDK1-cyclin A triggers its proteasome-dependent degradation*. J Biol Chem, 1997. **272(52)**: p. 32731-4.
225. Cans, C., B. Ducommun, and V. Baldin, *Proteasome-dependent degradation of human CDC25B phosphatase*. Mol Biol Rep, 1999. **26(1-2)**: p. 53-7.
226. Mailand, N., et al., *Rapid destruction of human Cdc25A in response to DNA damage*. Science, 2000. **288(5470)**: p. 1425-9.
227. Falck, J., et al., *The ATM-Chk2-Cdc25A checkpoint pathway guards against radioresistant DNA synthesis*. Nature, 2001. **410(6830)**: p. 842-7.
228. Bartek, J. *DNA damage checkpoints and cancer*. in *Cell and Molecular Biology of Cancer*. 2003. Lausanne.
229. Shimuta, K., et al., *Chk1 is activated transiently and targets Cdc25A for degradation at the Xenopus midblastula transition*. Embo J, 2002. **21(14)**: p. 3694-703.
230. Chen, F., et al., *Arsenite-induced Cdc25C degradation is through the KEN-box and ubiquitin-proteasome pathway*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99(4)**: p. 1990-5.
231. Savitsky, P.A. and T. Finkel, *Redox Regulation of Cdc25C*. J Biol Chem, 2002. **277(23)**: p. 20535-40.
232. Kumagai, A. and W.G. Dunphy, *Regulation of the cdc25 protein during the cell cycle in Xenopus extracts*. Cell, 1992. **70(1)**: p. 139-51.
233. Strausfeld, U., et al., *Activation of p34cdc2 protein kinase by microinjection of human cdc25C into mammalian cells. Requirement for prior phosphorylation of cdc25C by p34cdc2 on sites phosphorylated at mitosis*. J Biol Chem, 1994. **269(8)**: p. 5989-6000.
234. Izumi, T. and J.L. Maller, *Elimination of cdc2 phosphorylation sites in the cdc25 phosphatase blocks initiation of M-phase*. Mol Biol Cell, 1993. **4(12)**: p. 1337-50.
235. Zheng, X.F. and J.V. Ruderman, *Functional analysis of the P box, a domain in cyclin B required for the activation of Cdc25*. Cell, 1993. **75(1)**: p. 155-64.
236. Baldin, V., et al., *Nuclear localization of CDC25B1 and serine 146 integrity are required for induction of mitosis*. J Biol Chem, 2002. **277(38)**: p. 35176-82.
237. Patra, D., et al., *The xenopus Suc1/Cks protein promotes the phosphorylation of G(2)/M regulators*. J Biol Chem, 1999. **274(52)**: p. 36839-42.
238. Karaiskou, A., et al., *Phosphatase 2A and polo kinase, two antagonistic regulators of cdc25 activation and MPF auto-amplification*. J Cell Sci, 1999. **112 ( Pt 21)**: p. 3747-56.
239. Liu, X. and R.L. Erikson, *Activation of Cdc2/cyclin B and inhibition of centrosome amplification in cells depleted of Plk1 by siRNA*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99(13)**: p. 8672-6.
240. Golsteyn, R.M., et al., *The family of polo-like kinases*. Prog Cell Cycle Res, 1996. **2**: p. 107-14.
241. Nigg, E.A., *Polo-like kinases: positive regulators of cell division from start to finish*. Curr Opin Cell Biol, 1998. **10(6)**: p. 776-83.
242. Dai, W., Q. Wang, and F. Traganos, *Polo-like kinases and centrosome regulation*. Oncogene, 2002. **21(40)**: p. 6195-200.

243. Kitada, K., et al., *A multicopy suppressor gene of the Saccharomyces cerevisiae G1 cell cycle mutant gene dbf4 encodes a protein kinase and is identified as CDC5*. Mol Cell Biol, 1993. **13**(7): p. 4445-57.
244. Ohkura, H., I.M. Hagan, and D.M. Glover, *The conserved Schizosaccharomyces pombe kinase plo1, required to form a bipolar spindle, the actin ring, and septum, can drive septum formation in G1 and G2 cells*. Genes Dev, 1995. **9**(9): p. 1059-73.
245. Ouyang, B., Y. Wang, and D. Wei, *Caenorhabditis elegans contains structural homologs of human prk and plk*. DNA Seq, 1999. **10**(2): p. 109-13.
246. Chase, D., et al., *The polo-like kinase PLK-1 is required for nuclear envelope breakdown and the completion of meiosis in Caenorhabditis elegans*. Genesis, 2000. **26**(1): p. 26-41.
247. Chase, D., et al., *Caenorhabditis elegans contains a third polo-like kinase gene*. DNA Seq, 2000. **11**(3-4): p. 327-34.
248. Sunkel, C.E. and D.M. Glover, *polo, a mitotic mutant of Drosophila displaying abnormal spindle poles*. J Cell Sci, 1988. **89** ( Pt 1): p. 25-38.
249. Kumagai, A. and W.G. Dunphy, *Purification and molecular cloning of Plx1, a Cdc25-regulatory kinase from Xenopus egg extracts*. Science, 1996. **273**(5280): p. 1377-80.
250. Duncan, P.I., et al., *Cloning and characterization of Plx2 and Plx3, two additional Polo-like kinases from Xenopus laevis*. Exp Cell Res, 2001. **270**(1): p. 78-87.
251. Golsteyn, R.M., et al., *Cell cycle analysis and chromosomal localization of human Plk1, a putative homologue of the mitotic kinases Drosophila polo and Saccharomyces cerevisiae Cdc5*. J Cell Sci, 1994. **107** ( Pt 6): p. 1509-17.
252. Hamanaka, R., et al., *Polo-like kinase is a cell cycle-regulated kinase activated during mitosis*. J Biol Chem, 1995. **270**(36): p. 21086-91.
253. Li, B., et al., *Prk, a cytokine-inducible human protein serine/threonine kinase whose expression appears to be down-regulated in lung carcinomas*. J Biol Chem, 1996. **271**(32): p. 19402-8.
254. Qian, Y.W., et al., *The polo-like kinase Plx1 is required for activation of the phosphatase Cdc25C and cyclin B-Cdc2 in Xenopus oocytes*. Mol Biol Cell, 2001. **12**(6): p. 1791-9.
255. Roshak, A.K., et al., *The human polo-like kinase, PLK, regulates cdc2/cyclin B through phosphorylation and activation of the cdc25C phosphatase*. Cell Signal, 2000. **12**(6): p. 405-11.
256. Abrieu, A., et al., *The Polo-like kinase Plx1 is a component of the MPF amplification loop at the G2/M-phase transition of the cell cycle in Xenopus eggs*. J Cell Sci, 1998. **111** ( Pt 12): p. 1751-7.
257. Kelm, O., et al., *Cell cycle-regulated phosphorylation of the Xenopus polo-like kinase Plx1*. J Biol Chem, 2002. **277**(28): p. 25247-56.
258. Karaiskou, A., et al., *MPF amplification in Xenopus oocyte extracts depends on a two-step activation of cdc25 phosphatase*. Exp Cell Res, 1998. **244**(2): p. 491-500.
259. Millward, T.A., S. Zolnierowicz, and B.A. Hemmings, *Regulation of protein kinase cascades by protein phosphatase 2A*. Trends Biochem Sci, 1999. **24**(5): p. 186-91.
260. Janssens, V. and J. Goris, *Protein phosphatase 2A: a highly regulated family of serine/threonine phosphatases implicated in cell growth and signalling*. Biochem J, 2001. **353**(Pt 3): p. 417-39.
261. Clarke, P.R., et al., *Dephosphorylation of cdc25-C by a type-2A protein phosphatase: specific regulation during the cell cycle in Xenopus egg extracts*. Mol Biol Cell, 1993. **4**(4): p. 397-411.
262. Gothel, S.F. and M.A. Marahiel, *Peptidyl-prolyl cis-trans isomerases, a superfamily of ubiquitous folding catalysts*. Cell Mol Life Sci, 1999. **55**(3): p. 423-36.
263. Zhou, X.Z., et al., *Phosphorylation-dependent prolyl isomerization: a novel signaling regulatory mechanism*. Cell Mol Life Sci, 1999. **56**(9-10): p. 788-806.

264. Yaffe, M.B., et al., *Sequence-specific and phosphorylation-dependent proline isomerization: a potential mitotic regulatory mechanism*. Science, 1997. **278**(5345): p. 1957-60.
265. Lu, K.P., S.D. Hanes, and T. Hunter, *A human peptidyl-prolyl isomerase essential for regulation of mitosis*. Nature, 1996. **380**(6574): p. 544-7.
266. Crenshaw, D.G., et al., *The mitotic peptidyl-prolyl isomerase, Pin1, interacts with Cdc25 and Plx1*. Embo J, 1998. **17**(5): p. 1315-27.
267. Shen, M., et al., *The essential mitotic peptidyl-prolyl isomerase Pin1 binds and regulates mitosis-specific phosphoproteins*. Genes Dev, 1998. **12**(5): p. 706-20.
268. Zhou, X.Z., et al., *Pin1-dependent prolyl isomerization regulates dephosphorylation of Cdc25C and tau proteins*. Mol Cell, 2000. **6**(4): p. 873-83.
269. Stukenberg, P.T. and M.W. Kirschner, *Pin1 acts catalytically to promote a conformational change in Cdc25*. Mol Cell, 2001. **7**(5): p. 1071-83.
270. Landrieu, I., et al., *p13(SUC1) and the WW domain of PIN1 bind to the same phosphothreonine-proline epitope*. J Biol Chem, 2001. **276**(2): p. 1434-8.
271. Schulman, H., *The multifunctional Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinases*. Curr Opin Cell Biol, 1993. **5**(2): p. 247-53.
272. Torok, K., et al., *Imaging the spatial dynamics of calmodulin activation during mitosis*. Curr Biol, 1998. **8**(12): p. 692-9.
273. Patel, R., et al., *Calcium/calmodulin-dependent phosphorylation and activation of human Cdc25-C at the G2/M phase transition in HeLa cells*. J Biol Chem, 1999. **274**(12): p. 7958-68.
274. Mochizuki, T., et al., *Physical and functional interactions between Pim-1 kinase and Cdc25A phosphatase. Implications for the Pim-1-mediated activation of the c-Myc signaling pathway*. J Biol Chem, 1999. **274**(26): p. 18659-66.
275. Wang, Z., et al., *Phosphorylation of the cell cycle inhibitor p21Cip1/WAF1 by Pim-1 kinase*. Biochim Biophys Acta, 2002. **1593**(1): p. 45-55.
276. Kerkhoff, E. and U.R. Rapp, *Cell cycle targets of Ras/Raf signalling*. Oncogene, 1998. **17**(11 Reviews): p. 1457-62.
277. Rommel, C. and E. Hafen, *Ras--a versatile cellular switch*. Curr Opin Genet Dev, 1998. **8**(4): p. 412-8.
278. Chang, F., et al., *Regulation of cell cycle progression and apoptosis by the Ras/Raf/MEK/ERK pathway (Review)*. Int J Oncol, 2003. **22**(3): p. 469-80.
279. Galaktionov, K., C. Jessus, and D. Beach, *Raf1 interaction with Cdc25 phosphatase ties mitogenic signal transduction to cell cycle activation*. Genes Dev, 1995. **9**(9): p. 1046-58.
280. Thorson, J.A., et al., *14-3-3 proteins are required for maintenance of Raf-1 phosphorylation and kinase activity*. Mol Cell Biol, 1998. **18**(9): p. 5229-38.
281. Conklin, D.S., K. Galaktionov, and D. Beach, *14-3-3 proteins associate with cdc25 phosphatases*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(17): p. 7892-6.
282. Jessus, C. and R. Ozon, *Function and regulation of cdc25 protein phosphate through mitosis and meiosis*. Prog Cell Cycle Res, 1995. **1**: p. 215-28.
283. Misaki, K., et al., *PKN delays mitotic timing by inhibition of Cdc25C: possible involvement of PKN in the regulation of cell division*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(1): p. 125-9.
284. Mukai, H., et al., *Translocation of PKN from the cytosol to the nucleus induced by stresses*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(19): p. 10195-9.
285. Blot, J., et al., *Cell cycle regulation of pEg3, a new Xenopus protein kinase of the KINI/PAR-1/MARK family*. Dev Biol, 2002. **241**(2): p. 327-38.

286. Davezac, N., et al., *Human pEg3 kinase associates with and phosphorylates CDC25B phosphatase: a potential role for pEg3 in cell cycle regulation*. *Oncogene*, 2002. **21**(50): p. 7630-41.
287. Seki, T., et al., *Chromosome condensation caused by loss of RCC1 function requires the cdc25C protein that is located in the cytoplasm*. *Mol Biol Cell*, 1992. **3**(12): p. 1373-88.
288. Girard, F., et al., *cdc25 is a nuclear protein expressed constitutively throughout the cell cycle in nontransformed mammalian cells*. *J Cell Biol*, 1992. **118**(4): p. 785-94.
289. Heald, R., M. McLoughlin, and F. McKeon, *Human wee1 maintains mitotic timing by protecting the nucleus from cytoplasmically activated Cdc2 kinase*. *Cell*, 1993. **74**(3): p. 463-74.
290. Kumagai, A. and W.G. Dunphy, *Binding of 14-3-3 proteins and nuclear export control the intracellular localization of the mitotic inducer Cdc25*. *Genes Dev*, 1999. **13**(9): p. 1067-72.
291. Dalal, S.N., et al., *Cytoplasmic localization of human cdc25C during interphase requires an intact 14-3-3 binding site*. *Mol Cell Biol*, 1999. **19**(6): p. 4465-79.
292. Graves, P.R., et al., *Localization of human Cdc25C is regulated both by nuclear export and 14-3-3 protein binding*. *Oncogene*, 2001. **20**(15): p. 1839-51.
293. Yang, J., et al., *Maintenance of G2 arrest in the Xenopus oocyte: a role for 14-3-3-mediated inhibition of Cdc25 nuclear import*. *Embo J*, 1999. **18**(8): p. 2174-83.
294. Davezac, N., et al., *Regulation of CDC25B phosphatases subcellular localization*. *Oncogene*, 2000. **19**(18): p. 2179-85.
295. Yaffe, M.B., *How do 14-3-3 proteins work?-- Gatekeeper phosphorylation and the molecular anvil hypothesis*. *FEBS Lett*, 2002. **513**(1): p. 53-7.
296. Tzivion, G., Y.H. Shen, and J. Zhu, *14-3-3 proteins; bringing new definitions to scaffolding*. *Oncogene*, 2001. **20**(44): p. 6331-8.
297. Muslin, A.J. and H. Xing, *14-3-3 proteins: regulation of subcellular localization by molecular interference*. *Cell Signal*, 2000. **12**(11-12): p. 703-9.
298. Baldin, V., *14-3-3 proteins and growth control*. *Prog Cell Cycle Res*, 2000. **4**: p. 49-60.
299. Peng, C.Y., et al., *Mitotic and G2 checkpoint control: regulation of 14-3-3 protein binding by phosphorylation of Cdc25C on serine-216*. *Science*, 1997. **277**(5331): p. 1501-5.
300. Honda, R., Y. Ohba, and H. Yasuda, *14-3-3 zeta protein binds to the carboxyl half of mouse wee1 kinase*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1997. **230**(2): p. 262-5.
301. Chan, T.A., et al., *14-3-3Sigma is required to prevent mitotic catastrophe after DNA damage*. *Nature*, 1999. **401**(6753): p. 616-20.
302. Peng, C.Y., et al., *C-TAK1 protein kinase phosphorylates human Cdc25C on serine 216 and promotes 14-3-3 protein binding*. *Cell Growth Differ*, 1998. **9**(3): p. 197-208.
303. Kumagai, A., P.S. Yakowec, and W.G. Dunphy, *14-3-3 proteins act as negative regulators of the mitotic inducer Cdc25 in Xenopus egg extracts*. *Mol Biol Cell*, 1998. **9**(2): p. 345-54.
304. Morris, M.C., et al., *An essential phosphorylation-site domain of human cdc25C interacts with both 14-3-3 and cyclins*. *J Biol Chem*, 2000. **275**(37): p. 28849-57.
305. Mills, V., et al., *Specific interaction between 14-3-3 isoforms and the human CDC25B phosphatase*. *Oncogene*, 2000. **19**(10): p. 1257-65.
306. Forrest, A. and B. Gabrielli, *Cdc25B activity is regulated by 14-3-3*. *Oncogene*, 2001. **20**(32): p. 4393-401.
307. Hutchins, J.R., D. Dikovskaya, and P.R. Clarke, *Dephosphorylation of the inhibitory phosphorylation site S287 in Xenopus Cdc25C by protein phosphatase-2A is inhibited by 14-3-3 binding*. *FEBS Lett*, 2002. **528**(1-3): p. 267-71.

308. Graves, P.R., et al., *The Chk1 protein kinase and the Cdc25C regulatory pathways are targets of the anticancer agent UCN-01*. J Biol Chem, 2000. **275**(8): p. 5600-5.
309. Ogg, S., B. Gabrielli, and H. Piwnica-Worms, *Purification of a serine kinase that associates with and phosphorylates human Cdc25C on serine 216*. J Biol Chem, 1994. **269**(48): p. 30461-9.
310. Zeng, Y. and H. Piwnica-Worms, *DNA damage and replication checkpoints in fission yeast require nuclear exclusion of the Cdc25 phosphatase via 14-3-3 binding*. Mol Cell Biol, 1999. **19**(11): p. 7410-9.
311. Furnari, B., N. Rhind, and P. Russell, *Cdc25 mitotic inducer targeted by chk1 DNA damage checkpoint kinase*. Science, 1997. **277**(5331): p. 1495-7.
312. Sanchez, Y., et al., *Conservation of the Chk1 checkpoint pathway in mammals: linkage of DNA damage to Cdk regulation through Cdc25*. Science, 1997. **277**(5331): p. 1497-501.
313. Zeng, Y., et al., *Replication checkpoint requires phosphorylation of the phosphatase Cdc25 by Cds1 or Chk1*. Nature, 1998. **395**(6701): p. 507-10.
314. Blasina, A., et al., *A human homologue of the checkpoint kinase Cds1 directly inhibits Cdc25 phosphatase*. Curr Biol, 1999. **9**(1): p. 1-10.
315. Furnari, B., et al., *Cdc25 inhibited in vivo and in vitro by checkpoint kinases Cds1 and Chk1*. Mol Biol Cell, 1999. **10**(4): p. 833-45.
316. Lopez-Girona, A., et al., *Nuclear localization of Cdc25 is regulated by DNA damage and a 14-3-3 protein*. Nature, 1999. **397**(6715): p. 172-5.
317. Nebreda, A.R. and A. Porras, *p38 MAP kinases: beyond the stress response*. Trends Biochem Sci, 2000. **25**(6): p. 257-60.
318. Johnson, G.L. and R. Lapadat, *Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases*. Science, 2002. **298**(5600): p. 1911-2.
319. Bulavin, D.V., et al., *Initiation of a G2/M checkpoint after ultraviolet radiation requires p38 kinase*. Nature, 2001. **411**(6833): p. 102-7.
320. Duckworth, B.C., J.S. Weaver, and J.V. Ruderman, *G2 arrest in Xenopus oocytes depends on phosphorylation of cdc25 by protein kinase A*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(26): p. 16794-9.
321. Takai, H., et al., *Aberrant cell cycle checkpoint function and early embryonic death in Chk1(-/-) mice*. Genes Dev, 2000. **14**(12): p. 1439-47.
322. Liu, Q., et al., *Chk1 is an essential kinase that is regulated by Atr and required for the G(2)/M DNA damage checkpoint*. Genes Dev, 2000. **14**(12): p. 1448-59.
323. Smits, V.A. and R.H. Medema, *Checking out the G(2)/M transition*. Biochim Biophys Acta, 2001. **1519**(1-2): p. 1-12.
324. Bulavin, D.V., S.A. Amundson, and A.J. Fornace, *p38 and Chk1 kinases: different conductors for the G(2)/M checkpoint symphony*. Curr Opin Genet Dev, 2002. **12**(1): p. 92-7.
325. Bartek, J. and J. Lukas, *Mammalian G1- and S-phase checkpoints in response to DNA damage*. Curr Opin Cell Biol, 2001. **13**(6): p. 738-47.
326. Bartek, J. and J. Lukas, *Pathways governing G1/S transition and their response to DNA damage*. FEBS Lett, 2001. **490**(3): p. 117-22.
327. Pearce, A.K. and T.C. Humphrey, *Integrating stress-response and cell-cycle checkpoint pathways*. Trends Cell Biol, 2001. **11**(10): p. 426-33.
328. McGowan, C.H., *Checking in on Cds1 (Chk2): A checkpoint kinase and tumor suppressor*. Bioessays, 2002. **24**(6): p. 502-11.
329. Costanzo, V., et al., *Reconstitution of an ATM-dependent checkpoint that inhibits chromosomal DNA replication following DNA damage*. Mol Cell, 2000. **6**(3): p. 649-59.
330. Vogelstein, B., D. Lane, and A.J. Levine, *Surfing the p53 network*. Nature, 2000. **408**(6810): p. 307-10.

331. Rhind, N., B. Furnari, and P. Russell, *Cdc2 tyrosine phosphorylation is required for the DNA damage checkpoint in fission yeast*. Genes Dev, 1997. **11**(4): p. 504-11.
332. Rhind, N. and P. Russell, *Tyrosine phosphorylation of cdc2 is required for the replication checkpoint in Schizosaccharomyces pombe*. Mol Cell Biol, 1998. **18**(7): p. 3782-7.
333. Poon, R.Y., et al., *The role of Cdc2 feedback loop control in the DNA damage checkpoint in mammalian cells*. Cancer Res, 1997. **57**(22): p. 5168-78.
334. Jin, P., Y. Gu, and D.O. Morgan, *Role of inhibitory CDC2 phosphorylation in radiation-induced G2 arrest in human cells*. J Cell Biol, 1996. **134**(4): p. 963-70.
335. Raleigh, J.M. and M.J. O'Connell, *The G(2) DNA damage checkpoint targets both Wee1 and Cdc25*. J Cell Sci, 2000. **113**(Pt 10): p. 1727-36.
336. Walworth, N.C., *DNA damage: Chk1 and Cdc25, more than meets the eye*. Curr Opin Genet Dev, 2001. **11**(1): p. 78-82.
337. O'Connell, M.J., et al., *Chk1 is a wee1 kinase in the G2 DNA damage checkpoint inhibiting cdc2 by Y15 phosphorylation*. Embo J, 1997. **16**(3): p. 545-54.
338. Manni, I., et al., *NF-Y mediates the transcriptional inhibition of the cyclin B1, cyclin B2, and cdc25C promoters upon induced G2 arrest*. J Biol Chem, 2001. **276**(8): p. 5570-6.
339. Smits, V.A., et al., *Polo-like kinase-1 is a target of the DNA damage checkpoint*. Nat Cell Biol, 2000. **2**(9): p. 672-6.
340. van Vugt, M.A., et al., *Inhibition of Polo-like kinase-1 by DNA damage occurs in an ATM- or ATR-dependent fashion*. J Biol Chem, 2001. **276**(45): p. 41656-60.
341. Baber-Furnari, B.A., et al., *Regulation of mitotic inhibitor Mik1 helps to enforce the DNA damage checkpoint*. Mol Biol Cell, 2000. **11**(1): p. 1-11.
342. Maity, A., W.G. McKenna, and R.J. Muschel, *Evidence for post-transcriptional regulation of cyclin B1 mRNA in the cell cycle and following irradiation in HeLa cells*. Embo J, 1995. **14**(3): p. 603-9.
343. Laronga, C., et al., *Association of the cyclin-dependent kinases and 14-3-3 sigma negatively regulates cell cycle progression*. J Biol Chem, 2000. **275**(30): p. 23106-12.
344. Jin, P., S. Hardy, and D.O. Morgan, *Nuclear localization of cyclin B1 controls mitotic entry after DNA damage*. J Cell Biol, 1998. **141**(4): p. 875-85.
345. Toyoshima, F., et al., *Nuclear export of cyclin B1 and its possible role in the DNA damage-induced G2 checkpoint*. Embo J, 1998. **17**(10): p. 2728-35.
346. Hermeking, H., et al., *14-3-3 sigma is a p53-regulated inhibitor of G2/M progression*. Mol Cell, 1997. **1**(1): p. 3-11.
347. Piwnicka-Worms, H., *Cell cycle. Fools rush in*. Nature, 1999. **401**(6753): p. 535, 537.
348. Bunz, F., et al., *Requirement for p53 and p21 to sustain G2 arrest after DNA damage*. Science, 1998. **282**(5393): p. 1497-501.
349. Chan, T.A., et al., *Cooperative effects of genes controlling the G(2)/M checkpoint*. Genes Dev, 2000. **14**(13): p. 1584-8.
350. Wickramasinghe, D., et al., *Two CDC25 homologues are differentially expressed during mouse development*. Development, 1995. **121**(7): p. 2047-56.
351. White-Cooper, H., L. Alphey, and D.M. Glover, *The cdc25 homologue twine is required for only some aspects of the entry into meiosis in Drosophila*. J Cell Sci, 1993. **106** ( Pt 4): p. 1035-44.
352. Alphey, L., et al., *twine, a cdc25 homolog that functions in the male and female germline of Drosophila*. Cell, 1992. **69**(6): p. 977-88.
353. Courtot, C., et al., *The Drosophila cdc25 homolog twine is required for meiosis*. Development, 1992. **116**(2): p. 405-16.
354. Maines, J.Z. and S.A. Wasserman, *Post-transcriptional regulation of the meiotic Cdc25 protein Twine by the Dazl orthologue Boule*. Nat Cell Biol, 1999. **1**(3): p. 171-4.

355. Edgar, B.A. and P.H. O'Farrell, *The three postblastoderm cell cycles of Drosophila embryogenesis are regulated in G2 by string*. Cell, 1990. **62**(3): p. 469-80.
356. Milan, M., S. Campuzano, and A. Garcia-Bellido, *Cell cycling and patterned cell proliferation in the Drosophila wing during metamorphosis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(21): p. 11687-92.
357. Milan, M., S. Campuzano, and A. Garcia-Bellido, *Cell cycling and patterned cell proliferation in the wing primordium of Drosophila*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(2): p. 640-5.
358. Neufeld, T.P., et al., *Coordination of growth and cell division in the Drosophila wing*. Cell, 1998. **93**(7): p. 1183-93.
359. Johnston, L.A. and B.A. Edgar, *Wingless and Notch regulate cell-cycle arrest in the developing Drosophila wing*. Nature, 1998. **394**(6688): p. 82-4.
360. Baonza, A., et al., *Pointed and Tramtrack69 establish an EGFR-dependent transcriptional switch to regulate mitosis*. Nat Cell Biol, 2002. **4**(12): p. 976-80.
361. Lehman, D.A., et al., *Cis-regulatory elements of the mitotic regulator, string/Cdc25*. Development, 1999. **126**(9): p. 1793-803.
362. Reed, B.H., *Drosophila development pulls the strings of the cell cycle*. Bioessays, 1995. **17**(6): p. 553-6.
363. Seher, T.C. and M. Leptin, *Tribbles, a cell-cycle brake that coordinates proliferation and morphogenesis during Drosophila gastrulation*. Curr Biol, 2000. **10**(11): p. 623-9.
364. Mata, J., et al., *Tribbles coordinates mitosis and morphogenesis in Drosophila by regulating string/CDC25 proteolysis*. Cell, 2000. **101**(5): p. 511-22.
365. Grosshans, J. and E. Wieschaus, *A genetic link between morphogenesis and cell division during formation of the ventral furrow in Drosophila*. Cell, 2000. **101**(5): p. 523-31.
366. Johnston, L.A., *The trouble with tribbles*. Curr Biol, 2000. **10**(13): p. R502-4.
367. Ashcroft, N.R., et al., *The four cdc25 genes from the nematode Caenorhabditis elegans*. Gene, 1998. **214**(1-2): p. 59-66.
368. Ashcroft, N.R., et al., *RNA-Mediated interference of a cdc25 homolog in Caenorhabditis elegans results in defects in the embryonic cortical membrane, meiosis, and mitosis*. Dev Biol, 1999. **206**(1): p. 15-32.
369. Ashcroft, N. and A. Golden, *CDC-25.1 regulates germline proliferation in Caenorhabditis elegans*. Genesis, 2002. **33**(1): p. 1-7.
370. Clucas, C., et al., *Oncogenic potential of a C.elegans cdc25 gene is demonstrated by a gain-of-function allele*. Embo J, 2002. **21**(4): p. 665-74.
371. Carnero, A., *Targeting the cell cycle for cancer therapy*. Br J Cancer, 2002. **87**(2): p. 129-33.
372. Broggini, M., et al., *Cell cycle-related phosphatases CDC25A and B expression correlates with survival in ovarian cancer patients*. Anticancer Res, 2000. **20**(6C): p. 4835-40.
373. Hernandez, S., et al., *Differential expression of cdc25 cell-cycle-activating phosphatases in human colorectal carcinoma*. Lab Invest, 2001. **81**(4): p. 465-73.
374. Cangi, M.G., et al., *Role of the Cdc25A phosphatase in human breast cancer*. J Clin Invest, 2000. **106**(6): p. 753-61.
375. Takemasa, I., et al., *Overexpression of CDC25B phosphatase as a novel marker of poor prognosis of human colorectal carcinoma*. Cancer Res, 2000. **60**(11): p. 3043-50.
376. Miyata, H., et al., *CDC25B and p53 are independently implicated in radiation sensitivity for human esophageal cancers*. Clin Cancer Res, 2000. **6**(12): p. 4859-65.
377. Miyata, H., et al., *Overexpression of CDC25B overrides radiation-induced G2-M arrest and results in increased apoptosis in esophageal cancer cells*. Cancer Res, 2001. **61**(7): p. 3188-93.



378. Hernandez, S., et al., *cdc25a and the splicing variant cdc25b2, but not cdc25B1, -B3 or -C, are over-expressed in aggressive human non-Hodgkin's lymphomas*. Int J Cancer, 2000. **89**(2): p. 148-52.
379. Vogt, A., et al., *Spatial analysis of key signaling proteins by high-content solid-phase cytometry in Hep3B cells treated with an inhibitor of Cdc25 dual-specificity phosphatases*. J Biol Chem, 2001. **276**(23): p. 20544-50.
380. Ma, Z.Q., et al., *Induction of mammary gland hyperplasia in transgenic mice over-expressing human Cdc25B*. Oncogene, 1999. **18**(32): p. 4564-76.
381. Yao, Y., et al., *Increased susceptibility to carcinogen-induced mammary tumors in MMTV- Cdc25B transgenic mice*. Oncogene, 1999. **18**(37): p. 5159-66.
382. Lyon, M.A., et al., *Dual-specificity phosphatases as targets for antineoplastic agents*. Nat Rev Drug Discov, 2002. **1**(12): p. 961-76.
383. Ahmed, K., D.A. Gerber, and C. Cochet, *Joining the cell survival squad: an emerging role for protein kinase CK2*. Trends Cell Biol, 2002. **12**(5): p. 226-30.
384. Burnett, G. and E.P. Kennedy, *The enzymatic phosphorylation of proteins*. J Biol Chem, 1954. **211**: p. 969-80.
385. Blanquet, P.R., *Casein kinase 2 as a potentially important enzyme in the nervous system*. Prog Neurobiol, 2000. **60**(3): p. 211-46.
386. Allende, J.E. and C.C. Allende, *Protein kinases. 4. Protein kinase CK2: an enzyme with multiple substrates and a puzzling regulation*. Faseb J, 1995. **9**(5): p. 313-23.
387. Meggio, F. and L.A. Pinna, *One-thousand-and-one substrates of protein kinase CK2?* Faseb J, 2003. **17**(3): p. 349-68.
388. Pinna, L.A. and F. Meggio, *Protein kinase CK2 ("casein kinase-2") and its implication in cell division and proliferation*. Prog Cell Cycle Res, 1997. **3**: p. 77-97.
389. Tuazon, P.T. and J.A. Traugh, *Casein kinase I and II--multipotential serine protein kinases: structure, function, and regulation*. Adv Second Messenger Phosphoprotein Res, 1991. **23**: p. 123-64.
390. Guerra, B., et al., *CK2: a protein kinase in need of control*. Pharmacol Ther, 1999. **82**(2-3): p. 303-13.
391. Chardot, T., H. Shen, and J.C. Meunier, *Dual specificity of casein kinase II from the yeast Yarrowia lipolytica*. C R Acad Sci III, 1995. **318**(9): p. 937-42.
392. Wilson, L.K., et al., *Casein kinase II catalyzes tyrosine phosphorylation of the yeast nucleolar immunophilin Fpr3*. J Biol Chem, 1997. **272**(20): p. 12961-7.
393. Marin, O., et al., *Tyrosine versus serine/threonine phosphorylation by protein kinase casein kinase-2. A study with peptide substrates derived from immunophilin Fpr3*. J Biol Chem, 1999. **274**(41): p. 29260-5.
394. Donella-Deana, A., et al., *Autocatalytic tyrosine-phosphorylation of protein kinase CK2 alpha and alpha' subunits: implication of Tyr182*. Biochem J, 2001. **357**(Pt 2): p. 563-7.
395. Boldyreff, B., et al., *Protein kinase CK2 structure-function relationship: effects of the beta subunit on reconstitution and activity*. Cell Mol Biol Res, 1994. **40**(5-6): p. 391-9.
396. Stigare, J., et al., *A majority of casein kinase II alpha subunit is tightly bound to intranuclear components but not to the beta subunit*. Mol Cell Biochem, 1993. **129**(1): p. 77-85.
397. Stalter, G., et al., *Asymmetric expression of protein kinase CK2 subunits in human kidney tumors*. Biochem Biophys Res Commun, 1994. **202**(1): p. 141-7.
398. Chester, N., I.J. Yu, and D.R. Marshak, *Identification and characterization of protein kinase CKII isoforms in HeLa cells. Isoform-specific differences in rates of assembly from catalytic and regulatory subunits*. J Biol Chem, 1995. **270**(13): p. 7501-14.

399. Guerra, B., et al., *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. **462**(3): p. 353-7.
400. Filhol, O., et al., *Live-cell fluorescence imaging reveals the dynamics of protein kinase CK2 individual subunits*. Mol Cell Biol, 2003. **23**(3): p. 975-87.
401. Chen, M., et al., *The casein kinase II beta subunit binds to Mos and inhibits Mos activity*. Mol Cell Biol, 1997. **17**(4): p. 1904-12.
402. Boldyreff, B. and O.G. Issinger, *A-Raf kinase is a new interacting partner of protein kinase CK2 beta subunit*. FEBS Lett, 1997. **403**(2): p. 197-9.
403. Hagemann, C., et al., *The regulatory subunit of protein kinase CK2 is a specific A-Raf activator*. FEBS Lett, 1997. **403**(2): p. 200-2.
404. Heriche, J.K., et al., *Regulation of protein phosphatase 2A by direct interaction with casein kinase 2alpha*. Science, 1997. **276**(5314): p. 952-5.
405. Chantalat, L., et al., *Crystal structure of the human protein kinase CK2 regulatory subunit reveals its zinc finger-mediated dimerization*. Embo J, 1999. **18**(11): p. 2930-40.
406. Gietz, R.D., K.C. Graham, and D.W. Litchfield, *Interactions between the subunits of casein kinase II*. J Biol Chem, 1995. **270**(22): p. 13017-21.
407. Boldyreff, B., U. Mietens, and O.G. Issinger, *Structure of protein kinase CK2: dimerization of the human beta-subunit*. FEBS Lett, 1996. **379**(2): p. 153-6.
408. Kusk, M., et al., *Interactions of protein kinase CK2beta subunit within the holoenzyme and with other proteins*. Mol Cell Biochem, 1999. **191**(1-2): p. 51-8.
409. Guerra, B., et al., *Expression, purification and crystallization of the catalytic subunit of protein kinase CK2 from Zea mays*. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr, 1998. **54 ( Pt 1)**: p. 143-5.
410. Niefind, K., et al., *Crystal structure of the catalytic subunit of protein kinase CK2 from Zea mays at 2.1 Å resolution*. Embo J, 1998. **17**(9): p. 2451-62.
411. Guerra, B., et al., *Characterization of CK2 holoenzyme variants with regard to crystallization*. Mol Cell Biochem, 2001. **227**(1-2): p. 3-11.
412. Niefind, K., et al., *Crystal structure of human protein kinase CK2: insights into basic properties of the CK2 holoenzyme*. Embo J, 2001. **20**(19): p. 5320-31.
413. Mulner-Lorillon, O., et al., *Purification and characterization of a casein-kinase-II-type enzyme from Xenopus laevis ovary. Biological effects on the meiotic cell division of full-grown oocyte*. Eur J Biochem, 1988. **171**(1-2): p. 107-17.
414. Fraser, A.G., et al., *Functional genomic analysis of C. elegans chromosome I by systematic RNA interference*. Nature, 2000. **408**(6810): p. 325-30.
415. Buchou, T., et al., *Disruption of the regulatory beta subunit of protein kinase CK2 in mice leads to a cell-autonomous defect and early embryonic lethality*. Mol Cell Biol, 2003. **23**(3): p. 908-15.
416. Jauch, E., et al., *In vivo functional analysis of Drosophila protein kinase casein kinase 2 (CK2) beta-subunit*. Gene, 2002. **298**(1): p. 29-39.
417. Daya-Makin, M., et al., *Activation of a tumor-associated protein kinase (p40TAK) and casein kinase 2 in human squamous cell carcinomas and adenocarcinomas of the lung*. Cancer Res, 1994. **54**(8): p. 2262-8.
418. Yaylim, I. and T. Isbir, *Enhanced casein kinase II (CK II) activity in human lung tumours*. Anticancer Res, 2002. **22**(1A): p. 215-8.
419. Yenice, S., et al., *Nuclear casein kinase 2 (CK-2) activity in human normal, benign hyperplastic, and cancerous prostate*. Prostate, 1994. **24**(1): p. 11-6.
420. Gapany, M., et al., *Association of elevated protein kinase CK2 activity with aggressive behavior of squamous cell carcinoma of the head and neck*. Mol Med, 1995. **1**(6): p. 659-66.

421. Faust, R.A., et al., *Elevated protein kinase CK2 activity in chromatin of head and neck tumors: association with malignant transformation*. *Cancer Lett*, 1996. **101**(1): p. 31-5.
422. Landesman-Bollag, E., et al., *p53 deficiency and misexpression of protein kinase CK2alpha collaborate in the development of thymic lymphomas in mice*. *Oncogene*, 1998. **16**(23): p. 2965-74.
423. Romieu-Mourez, R., et al., *Protein kinase CK2 promotes aberrant activation of nuclear factor-kappaB, transformed phenotype, and survival of breast cancer cells*. *Cancer Res*, 2002. **62**(22): p. 6770-8.
424. Tawfic, S., et al., *Protein kinase CK2 signal in neoplasia*. *Histol Histopathol*, 2001. **16**(2): p. 573-82.
425. Filhol, O. and C. Cochet, *[Protein kinase CK2 and cancer: further clues are accumulating]*. *Bull Cancer*, 2002. **89**(3): p. 261-5.
426. Issinger, O.G., *Casein kinases: pleiotropic mediators of cellular regulation*. *Pharmacol Ther*, 1993. **59**(1): p. 1-30.
427. Faust, R.A., et al., *Subcellular immunolocalization of protein kinase CK2 in normal and carcinoma cells*. *Int J Biochem Cell Biol*, 1999. **31**(9): p. 941-9.
428. Xu, X., et al., *Murine protein kinase CK2: gene and oncogene*. *Mol Cell Biochem*, 1999. **191**(1-2): p. 65-74.
429. Seldin, D.C. and P. Leder, *Casein kinase II alpha transgene-induced murine lymphoma: relation to theileriosis in cattle*. *Science*, 1995. **267**(5199): p. 894-7.
430. Orlandini, M., et al., *Protein kinase CK2alpha' is induced by serum as a delayed early gene and cooperates with Ha-ras in fibroblast transformation*. *J Biol Chem*, 1998. **273**(33): p. 21291-7.
431. Landesman-Bollag, E., et al., *Protein kinase CK2 in mammary gland tumorigenesis*. *Oncogene*, 2001. **20**(25): p. 3247-57.
432. Landesman-Bollag, E., et al., *Protein kinase CK2: signaling and tumorigenesis in the mammary gland*. *Mol Cell Biochem*, 2001. **227**(1-2): p. 153-65.
433. Padmanabha, R., et al., *Isolation, sequencing, and disruption of the yeast CKA2 gene: casein kinase II is essential for viability in Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*, 1990. **10**(8): p. 4089-99.
434. Hanna, D.E., A. Rethinaswamy, and C.V. Glover, *Casein kinase II is required for cell cycle progression during G1 and G2/M in Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*, 1995. **270**(43): p. 25905-14.
435. Rethinaswamy, A., M.J. Birnbaum, and C.V. Glover, *Temperature-sensitive mutations of the CKA1 gene reveal a role for casein kinase II in maintenance of cell polarity in Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*, 1998. **273**(10): p. 5869-77.
436. Snell, V. and P. Nurse, *Genetic analysis of cell morphogenesis in fission yeast--a role for casein kinase II in the establishment of polarized growth*. *Embo J*, 1994. **13**(9): p. 2066-74.
437. Reed, J.C., A.P. Bidwai, and C.V. Glover, *Cloning and disruption of CKB2, the gene encoding the 32-kDa regulatory beta'-subunit of Saccharomyces cerevisiae casein kinase II*. *J Biol Chem*, 1994. **269**(27): p. 18192-200.
438. Roussou, I. and G. Draetta, *The Schizosaccharomyces pombe casein kinase II alpha and beta subunits: evolutionary conservation and positive role of the beta subunit*. *Mol Cell Biol*, 1994. **14**(1): p. 576-86.
439. de Nadal, E., et al., *Biochemical and genetic analyses of the role of yeast casein kinase 2 in salt tolerance*. *J Bacteriol*, 1999. **181**(20): p. 6456-62.
440. Carroll, D. and D.R. Marshak, *Serum-stimulated cell growth causes oscillations in casein kinase II activity*. *J Biol Chem*, 1989. **264**(13): p. 7345-8.

441. Litchfield, D.W., G. Dobrowolska, and E.G. Krebs, *Regulation of casein kinase II by growth factors: a reevaluation*. Cell Mol Biol Res, 1994. **40**(5-6): p. 373-81.
442. Filhol, O., C. Cochet, and E.M. Chambaz, *Cytoplasmic and nuclear distribution of casein kinase II: characterization of the enzyme uptake by bovine adrenocortical nuclear preparation*. Biochemistry, 1990. **29**(42): p. 9928-36.
443. Lorenz, P., et al., *Cell biological studies with monoclonal and polyclonal antibodies against human casein kinase II subunit beta demonstrate participation of the kinase in mitogenic signaling*. J Biol Chem, 1993. **268**(4): p. 2733-9.
444. Pepperkok, R., et al., *Casein kinase II is required for transition of G0/G1, early G1, and G1/S phases of the cell cycle*. J Biol Chem, 1994. **269**(9): p. 6986-91.
445. Lorenz, P., et al., *Serum-stimulated cell cycle entry of fibroblasts requires undisturbed phosphorylation and non-phosphorylation interactions of the catalytic subunits of protein kinase CK2*. FEBS Lett, 1999. **448**(2-3): p. 283-8.
446. Lorenz, P., R. Pepperkok, and W. Pyerin, *Requirement of casein kinase 2 for entry into and progression through early phases of the cell cycle*. Cell Mol Biol Res, 1994. **40**(5-6): p. 519-27.
447. Li, D., et al., *Expression of the casein kinase 2 subunits in Chinese hamster ovary and 3T3 L1 cells provides information on the role of the enzyme in cell proliferation and the cell cycle*. J Biol Chem, 1999. **274**(46): p. 32988-96.
448. Jiang, P.S., J.H. Chang, and B.Y. Yung, *Different kinases phosphorylate nucleophosmin/B23 at different sites during G(2) and M phases of the cell cycle*. Cancer Lett, 2000. **153**(1-2): p. 151-60.
449. Jiang, P.S. and B.Y. Yung, *Down-regulation of nucleophosmin/B23 mRNA delays the entry of cells into mitosis*. Biochem Biophys Res Commun, 1999. **257**(3): p. 865-70.
450. Nambirajan, S., et al., *PTP-S2, a nuclear tyrosine phosphatase, is phosphorylated and excluded from condensed chromosomes during mitosis*. J Biosci, 2000. **25**(1): p. 33-40.
451. Ford, H.L., et al., *Cell cycle-regulated phosphorylation of the human SIX1 homeodomain protein*. J Biol Chem, 2000. **275**(29): p. 22245-54.
452. Cardenas, M.E., et al., *Casein kinase II phosphorylates the eukaryote-specific C-terminal domain of topoisomerase II in vivo*. Embo J, 1992. **11**(5): p. 1785-96.
453. Daum, J.R. and G.J. Gorbsky, *Casein kinase II catalyzes a mitotic phosphorylation on threonine 1342 of human DNA topoisomerase IIalpha, which is recognized by the 3F3/2 phosphoepitope antibody*. J Biol Chem, 1998. **273**(46): p. 30622-9.
454. Escargueil, A.E., et al., *Mitotic phosphorylation of DNA topoisomerase II alpha by protein kinase CK2 creates the MPM-2 phosphoepitope on Ser-1469*. J Biol Chem, 2000. **275**(44): p. 34710-8.
455. Litchfield, D.W., et al., *Phosphorylation of the beta subunit of casein kinase II in human A431 cells. Identification of the autophosphorylation site and a site phosphorylated by p34cdc2*. J Biol Chem, 1991. **266**(30): p. 20380-9.
456. Litchfield, D.W., et al., *Phosphorylation of casein kinase II by p34cdc2 in vitro and at mitosis*. J Biol Chem, 1992. **267**(20): p. 13943-51.
457. Bosc, D.G., et al., *Phosphorylation of casein kinase II by p34cdc2. Identification of phosphorylation sites using phosphorylation site mutants in vitro*. J Biol Chem, 1995. **270**(43): p. 25872-8.
458. Bosc, D.G., B. Luscher, and D.W. Litchfield, *Expression and regulation of protein kinase CK2 during the cell cycle*. Mol Cell Biochem, 1999. **191**(1-2): p. 213-22.
459. Meggio, F., et al., *Phosphorylation and activation of protein kinase CK2 by p34cdc2 are independent events*. Eur J Biochem, 1995. **230**(3): p. 1025-31.

460. Filhol, O., et al., *Casein kinase II and the tumor suppressor protein P53 associate in a molecular complex that is negatively regulated upon P53 phosphorylation*. J Biol Chem, 1992. **267**(29): p. 20577-83.
461. Bojanowski, K., et al., *DNA topoisomerase II and casein kinase II associate in a molecular complex that is catalytically active*. J Biol Chem, 1993. **268**(30): p. 22920-6.
462. Leroy, D., et al., *Mutations in the C-terminal domain of topoisomerase II affect meiotic function and interaction with the casein kinase 2 beta subunit*. Mol Cell Biochem, 1999. **191**(1-2): p. 85-95.
463. Rice, R.L., et al., *A targeted library of small-molecule, tyrosine, and dual-specificity phosphatase inhibitors derived from a rational core design and random side chain variation*. Biochemistry, 1997. **36**(50): p. 15965-74.
464. Jones, P.F., et al., *Molecular cloning and identification of a serine/threonine protein kinase of the second-messenger subfamily*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**(10): p. 4171-5.
465. Coffey, P.J. and J.R. Woodgett, *Molecular cloning and characterisation of a novel putative protein-serine kinase related to the cAMP-dependent and protein kinase C families*. Eur J Biochem, 1991. **201**(2): p. 475-81.
466. Bellacosa, A., et al., *A retroviral oncogene, akt, encoding a serine-threonine kinase containing an SH2-like region*. Science, 1991. **254**(5029): p. 274-7.
467. Cheng, J.Q., et al., *AKT2, a putative oncogene encoding a member of a subfamily of protein-serine/threonine kinases, is amplified in human ovarian carcinomas*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(19): p. 9267-71.
468. Staal, S.P., *Molecular cloning of the akt oncogene and its human homologues AKT1 and AKT2: amplification of AKT1 in a primary human gastric adenocarcinoma*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1987. **84**(14): p. 5034-7.
469. Konishi, H., et al., *Molecular cloning and characterization of a new member of the RAC protein kinase family: association of the pleckstrin homology domain of three types of RAC protein kinase with protein kinase C subspecies and beta gamma subunits of G proteins*. Biochem Biophys Res Commun, 1995. **216**(2): p. 526-34.
470. Brodbeck, D., P. Cron, and B.A. Hemmings, *A human protein kinase Bgamma with regulatory phosphorylation sites in the activation loop and in the C-terminal hydrophobic domain*. J Biol Chem, 1999. **274**(14): p. 9133-6.
471. Yang, J., et al., *Crystal structure of an activated Akt/protein kinase B ternary complex with GSK3-peptide and AMP-PNP*. Nat Struct Biol, 2002. **9**(12): p. 940-4.
472. Yang, J., et al., *Molecular mechanism for the regulation of protein kinase B/Akt by hydrophobic motif phosphorylation*. Mol Cell, 2002. **9**(6): p. 1227-40.
473. Datta, S.R., A. Brunet, and M.E. Greenberg, *Cellular survival: a play in three Akts*. Genes Dev, 1999. **13**(22): p. 2905-27.
474. Haslam, R.J., H.B. Koide, and B.A. Hemmings, *Pleckstrin domain homology*. Nature, 1993. **363**(6427): p. 309-10.
475. Mayer, B.J., et al., *A putative modular domain present in diverse signaling proteins*. Cell, 1993. **73**(4): p. 629-30.
476. Datta, K., et al., *AH/PH domain-mediated interaction between Akt molecules and its potential role in Akt regulation*. Mol Cell Biol, 1995. **15**(4): p. 2304-10.
477. Harlan, J.E., et al., *Pleckstrin homology domains bind to phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate*. Nature, 1994. **371**(6493): p. 168-70.
478. Harlan, J.E., et al., *Structural characterization of the interaction between a pleckstrin homology domain and phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate*. Biochemistry, 1995. **34**(31): p. 9859-64.

479. Franke, T.F., et al., *The protein kinase encoded by the Akt proto-oncogene is a target of the PDGF-activated phosphatidylinositol 3-kinase*. Cell, 1995. **81**(5): p. 727-36.
480. Franke, T.F., et al., *Direct regulation of the Akt proto-oncogene product by phosphatidylinositol-3,4-bisphosphate*. Science, 1997. **275**(5300): p. 665-8.
481. Cantrell, D.A., *Phosphoinositide 3-kinase signalling pathways*. J Cell Sci, 2001. **114**(Pt 8): p. 1439-45.
482. James, S.R., et al., *Specific binding of the Akt-1 protein kinase to phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate without subsequent activation*. Biochem J, 1996. **315** ( Pt 3): p. 709-13.
483. Vanhaesebroeck, B. and D.R. Alessi, *The PI3K-PDK1 connection: more than just a road to PKB*. Biochem J, 2000. **346** Pt 3: p. 561-76.
484. Krasilnikov, M.A., *Phosphatidylinositol-3 kinase dependent pathways: the role in control of cell growth, survival, and malignant transformation*. Biochemistry (Mosc), 2000. **65**(1): p. 59-67.
485. Frech, M., et al., *High affinity binding of inositol phosphates and phosphoinositides to the pleckstrin homology domain of RAC/protein kinase B and their influence on kinase activity*. J Biol Chem, 1997. **272**(13): p. 8474-81.
486. Bellacosa, A., et al., *Akt activation by growth factors is a multiple-step process: the role of the PH domain*. Oncogene, 1998. **17**(3): p. 313-25.
487. Hemmings, B.A., *Akt signaling: linking membrane events to life and death decisions*. Science, 1997. **275**(5300): p. 628-30.
488. Scheid, M.P. and J.R. Woodgett, *PKB/AKT: functional insights from genetic models*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2001. **2**(10): p. 760-8.
489. Alessi, D.R., et al., *Mechanism of activation of protein kinase B by insulin and IGF-1*. Embo J, 1996. **15**(23): p. 6541-51.
490. Alessi, D.R., et al., *3-Phosphoinositide-dependent protein kinase-1 (PDK1): structural and functional homology with the Drosophila DSTPK61 kinase*. Curr Biol, 1997. **7**(10): p. 776-89.
491. Alessi, D.R., et al., *Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase Balpha*. Curr Biol, 1997. **7**(4): p. 261-9.
492. Stokoe, D., et al., *Dual role of phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate in the activation of protein kinase B*. Science, 1997. **277**(5325): p. 567-70.
493. Biondi, R.M., et al., *The PIF-binding pocket in PDK1 is essential for activation of S6K and SGK, but not PKB*. Embo J, 2001. **20**(16): p. 4380-90.
494. Williams, M.R., et al., *The role of 3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1 in activating AGC kinases defined in embryonic stem cells*. Curr Biol, 2000. **10**(8): p. 439-48.
495. Brazil, D.P. and B.A. Hemmings, *Ten years of protein kinase B signalling: a hard Akt to follow*. Trends Biochem Sci, 2001. **26**(11): p. 657-64.
496. Hill, M.M., et al., *Insulin-stimulated protein kinase B phosphorylation on Ser-473 is independent of its activity and occurs through a staurosporine-insensitive kinase*. J Biol Chem, 2001. **276**(28): p. 25643-6.
497. Hill, M.M., J. Feng, and B.A. Hemmings, *Identification of a plasma membrane Raft-associated PKB Ser473 kinase activity that is distinct from ILK and PDK1*. Curr Biol, 2002. **12**(14): p. 1251-5.
498. Balendran, A., et al., *PDK1 acquires PDK2 activity in the presence of a synthetic peptide derived from the carboxyl terminus of PRK2*. Curr Biol, 1999. **9**(8): p. 393-404.

499. Delcommenne, M., et al., *Phosphoinositide-3-OH kinase-dependent regulation of glycogen synthase kinase 3 and protein kinase B/AKT by the integrin-linked kinase*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(19): p. 11211-6.
500. Scheid, M.P., P.A. Marignani, and J.R. Woodgett, *Multiple phosphoinositide 3-kinase-dependent steps in activation of protein kinase B*. Mol Cell Biol, 2002. **22**(17): p. 6247-60.
501. Andjelkovic, M., et al., *Role of translocation in the activation and function of protein kinase B*. J Biol Chem, 1997. **272**(50): p. 31515-24.
502. Meier, R., et al., *Mitogenic activation, phosphorylation, and nuclear translocation of protein kinase Bbeta*. J Biol Chem, 1997. **272**(48): p. 30491-7.
503. Galetic, I., et al., *Mechanism of protein kinase B activation by insulin/insulin-like growth factor-1 revealed by specific inhibitors of phosphoinositide 3-kinase--significance for diabetes and cancer*. Pharmacol Ther, 1999. **82**(2-3): p. 409-25.
504. Dufner, A., et al., *Protein kinase B localization and activation differentially affect S6 kinase 1 activity and eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1 phosphorylation*. Mol Cell Biol, 1999. **19**(6): p. 4525-34.
505. Filippa, N., et al., *Effect of phosphoinositide-dependent kinase 1 on protein kinase B translocation and its subsequent activation*. Mol Cell Biol, 2000. **20**(15): p. 5712-21.
506. Borgatti, P., et al., *Translocation of Akt/PKB to the nucleus of osteoblast-like MC3T3-E1 cells exposed to proliferative growth factors*. FEBS Lett, 2000. **477**(1-2): p. 27-32.
507. Stambolic, V., et al., *Negative regulation of PKB/Akt-dependent cell survival by the tumor suppressor PTEN*. Cell, 1998. **95**(1): p. 29-39.
508. Yamada, K.M. and M. Araki, *Tumor suppressor PTEN: modulator of cell signaling, growth, migration and apoptosis*. J Cell Sci, 2001. **114**(Pt 13): p. 2375-82.
509. Simpson, L. and R. Parsons, *PTEN: life as a tumor suppressor*. Exp Cell Res, 2001. **264**(1): p. 29-41.
510. Cantley, L.C. and B.G. Neel, *New insights into tumor suppression: PTEN suppresses tumor formation by restraining the phosphoinositide 3-kinase/AKT pathway*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(8): p. 4240-5.
511. Andjelkovic, M., et al., *Activation and phosphorylation of a pleckstrin homology domain containing protein kinase (RAC-PK/PKB) promoted by serum and protein phosphatase inhibitors*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(12): p. 5699-704.
512. Meier, R., M. Thelen, and B.A. Hemmings, *Inactivation and dephosphorylation of protein kinase Balpha (PKBalpha) promoted by hyperosmotic stress*. Embo J, 1998. **17**(24): p. 7294-303.
513. Sato, S., N. Fujita, and T. Tsuruo, *Modulation of Akt kinase activity by binding to Hsp90*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(20): p. 10832-7.
514. Cazzolli, R., et al., *A role for protein phosphatase 2A-like activity, but not atypical protein kinase Czeta, in the inhibition of protein kinase B/Akt and glycogen synthesis by palmitate*. Diabetes, 2001. **50**(10): p. 2210-8.
515. Alessi, D.R., et al., *Molecular basis for the substrate specificity of protein kinase B; comparison with MAPKAP kinase-1 and p70 S6 kinase*. FEBS Lett, 1996. **399**(3): p. 333-8.
516. Walker, K.S., et al., *Activation of protein kinase B beta and gamma isoforms by insulin in vivo and by 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 in vitro: comparison with protein kinase B alpha*. Biochem J, 1998. **331** ( Pt 1): p. 299-308.
517. Obata, T., et al., *Peptide and protein library screening defines optimal substrate motifs for AKT/PKB*. J Biol Chem, 2000. **275**(46): p. 36108-15.
518. Yaffe, M.B., et al., *A motif-based profile scanning approach for genome-wide prediction of signaling pathways*. Nat Biotechnol, 2001. **19**(4): p. 348-53.

519. Chen, W.S., et al., *Growth retardation and increased apoptosis in mice with homozygous disruption of the Akt1 gene*. Genes Dev, 2001. **15**(17): p. 2203-8.
520. Cho, H., et al., *Akt1/PKBalpha is required for normal growth but dispensable for maintenance of glucose homeostasis in mice*. J Biol Chem, 2001. **276**(42): p. 38349-52.
521. Cho, H., et al., *Insulin resistance and a diabetes mellitus-like syndrome in mice lacking the protein kinase Akt2 (PKB beta)*. Science, 2001. **292**(5522): p. 1728-31.
522. Kops, G.J. and B.M. Burgering, *Forkhead transcription factors: new insights into protein kinase B (c- akt) signaling*. J Mol Med, 1999. **77**(9): p. 656-65.
523. Burgering, B.M. and G.J. Kops, *Cell cycle and death control: long live Forkheads*. Trends Biochem Sci, 2002. **27**(7): p. 352-60.
524. Gesbert, F., et al., *BCR/ABL regulates expression of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27Kip1 through the phosphatidylinositol 3-Kinase/AKT pathway*. J Biol Chem, 2000. **275**(50): p. 39223-30.
525. Graff, J.R., et al., *Increased AKT activity contributes to prostate cancer progression by dramatically accelerating prostate tumor growth and diminishing p27Kip1 expression*. J Biol Chem, 2000. **275**(32): p. 24500-5.
526. Sun, H., et al., *PTEN modulates cell cycle progression and cell survival by regulating phosphatidylinositol 3,4,5,-trisphosphate and Akt/protein kinase B signaling pathway*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(11): p. 6199-204.
527. Collado, M., et al., *Inhibition of the phosphoinositide 3-kinase pathway induces a senescence-like arrest mediated by p27Kip1*. J Biol Chem, 2000. **275**(29): p. 21960-8.
528. Medema, R.H., et al., *AFX-like Forkhead transcription factors mediate cell-cycle regulation by Ras and PKB through p27kip1*. Nature, 2000. **404**(6779): p. 782-7.
529. Dijkers, P.F., et al., *Forkhead transcription factor FKHR-L1 modulates cytokine-dependent transcriptional regulation of p27(KIP1)*. Mol Cell Biol, 2000. **20**(24): p. 9138-48.
530. Nakae, J., B.C. Park, and D. Accili, *Insulin stimulates phosphorylation of the forkhead transcription factor FKHR on serine 253 through a Wortmannin-sensitive pathway*. J Biol Chem, 1999. **274**(23): p. 15982-5.
531. Rena, G., et al., *Phosphorylation of the transcription factor forkhead family member FKHR by protein kinase B*. J Biol Chem, 1999. **274**(24): p. 17179-83.
532. Guo, S., et al., *Phosphorylation of serine 256 by protein kinase B disrupts transactivation by FKHR and mediates effects of insulin on insulin-like growth factor-binding protein-1 promoter activity through a conserved insulin response sequence*. J Biol Chem, 1999. **274**(24): p. 17184-92.
533. Brunet, A., et al., *Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor*. Cell, 1999. **96**(6): p. 857-68.
534. Biggs, W.H., 3rd, et al., *Protein kinase B/Akt-mediated phosphorylation promotes nuclear exclusion of the winged helix transcription factor FKHR1*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(13): p. 7421-6.
535. del Peso, L., et al., *Regulation of the forkhead transcription factor FKHR, but not the PAX3- FKHR fusion protein, by the serine/threonine kinase Akt*. Oncogene, 1999. **18**(51): p. 7328-33.
536. Shin, I., et al., *Transforming growth factor beta enhances epithelial cell survival via Akt-dependent regulation of FKHR1*. Mol Biol Cell, 2001. **12**(11): p. 3328-39.
537. Kops, G.J., et al., *Direct control of the Forkhead transcription factor AFX by protein kinase B*. Nature, 1999. **398**(6728): p. 630-4.
538. Sherr, C.J. and J.D. Weber, *The ARF/p53 pathway*. Curr Opin Genet Dev, 2000. **10**(1): p. 94-9.



539. Ogawara, Y., et al., *Akt enhances Mdm2-mediated ubiquitination and degradation of p53*. J Biol Chem, 2002. **277**(24): p. 21843-50.
540. Mayo, L.D. and D.B. Donner, *A phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway promotes translocation of Mdm2 from the cytoplasm to the nucleus*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(20): p. 11598-603.
541. Zhou, B.P., et al., *HER-2/neu induces p53 ubiquitination via Akt-mediated MDM2 phosphorylation*. Nat Cell Biol, 2001. **3**(11): p. 973-82.
542. Mayo, L.D. and D.B. Donner, *The PTEN, Mdm2, p53 tumor suppressor-oncoprotein network*. Trends Biochem Sci, 2002. **27**(9): p. 462-7.
543. Gottlieb, T.M., et al., *Cross-talk between Akt, p53 and Mdm2: possible implications for the regulation of apoptosis*. Oncogene, 2002. **21**(8): p. 1299-303.
544. Rossig, L., et al., *Akt-dependent phosphorylation of p21(Cip1) regulates PCNA binding and proliferation of endothelial cells*. Mol Cell Biol, 2001. **21**(16): p. 5644-57.
545. Zhou, B.P., et al., *Cytoplasmic localization of p21Cip1/WAF1 by Akt-induced phosphorylation in HER-2/neu-overexpressing cells*. Nat Cell Biol, 2001. **3**(3): p. 245-52. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC112111/>
546. Viglietto, G., et al., *Cytoplasmic relocation and inhibition of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27(Kip1) by PKB/Akt-mediated phosphorylation in breast cancer*. Nat Med, 2002. **8**(10): p. 1136-44.
547. Liang, J., et al., *PKB/Akt phosphorylates p27, impairs nuclear import of p27 and opposes p27-mediated G1 arrest*. Nat Med, 2002. **8**(10): p. 1153-60.
548. Shin, I., et al., *PKB/Akt mediates cell-cycle progression by phosphorylation of p27(Kip1) at threonine 157 and modulation of its cellular localization*. Nat Med, 2002. **8**(10): p. 1145-52.
549. Diehl, J.A., et al., *Glycogen synthase kinase-3beta regulates cyclin D1 proteolysis and subcellular localization*. Genes Dev, 1998. **12**(22): p. 3499-511.
550. Aberle, H., et al., *beta-catenin is a target for the ubiquitin-proteasome pathway*. Embo J, 1997. **16**(13): p. 3797-804.
551. Blume-Jensen, P. and T. Hunter, *Oncogenic kinase signalling*. Nature, 2001. **411**(6835): p. 355-65.
552. Shtutman, M., et al., *The cyclin D1 gene is a target of the beta-catenin/LEF-1 pathway*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(10): p. 5522-7.
553. Nicholson, K.M. and N.G. Anderson, *The protein kinase B/Akt signalling pathway in human malignancy*. Cell Signal, 2002. **14**(5): p. 381-95.
554. Muise-Helmericks, R.C., et al., *Cyclin D expression is controlled post-transcriptionally via a phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-dependent pathway*. J Biol Chem, 1998. **273**(45): p. 29864-72.
555. Okumura, E., et al., *Akt inhibits Myt1 in the signalling pathway that leads to meiotic G2/M-phase transition*. Nat Cell Biol, 2002. **4**(2): p. 111-6.
556. Shtivelman, E., J. Sussman, and D. Stokoe, *A Role for PI 3-Kinase and PKB Activity in the G2/M Phase of the Cell Cycle*. Curr Biol, 2002. **12**(11): p. 919-24.
557. Kandel, E.S., et al., *Activation of Akt/protein kinase B overcomes a G(2)/m cell cycle checkpoint induced by DNA damage*. Mol Cell Biol, 2002. **22**(22): p. 7831-41.
558. Roberts, E.C., et al., *Distinct cell cycle timing requirements for extracellular signal-regulated kinase and phosphoinositide 3-kinase signaling pathways in somatic cell mitosis*. Mol Cell Biol, 2002. **22**(20): p. 7226-41.
559. Yuan, Z.Q., et al., *Frequent activation of AKT2 and induction of apoptosis by inhibition of phosphoinositide-3-OH kinase/Akt pathway in human ovarian cancer*. Oncogene, 2000. **19**(19): p. 2324-30.

560. Bellacosa, A., et al., *Molecular alterations of the AKT2 oncogene in ovarian and breast carcinomas*. Int J Cancer, 1995. **64**(4): p. 280-5.
561. Sun, M., et al., *AKT1/PKB $\alpha$  kinase is frequently elevated in human cancers and its constitutive activation is required for oncogenic transformation in NIH3T3 cells*. Am J Pathol, 2001. **159**(2): p. 431-7.
562. Nakatani, K., et al., *Up-regulation of Akt3 in estrogen receptor-deficient breast cancers and androgen-independent prostate cancer lines*. J Biol Chem, 1999. **274**(31): p. 21528-32.
563. Tanno, S., et al., *AKT activation up-regulates insulin-like growth factor I receptor expression and promotes invasiveness of human pancreatic cancer cells*. Cancer Res, 2001. **61**(2): p. 589-93.
564. Perez-Tenorio, G. and O. Stal, *Activation of AKT/PKB in breast cancer predicts a worse outcome among endocrine treated patients*. Br J Cancer, 2002. **86**(4): p. 540-5.
565. Mende, I., et al., *Oncogenic transformation induced by membrane-targeted Akt2 and Akt3*. Oncogene, 2001. **20**(32): p. 4419-23.
566. Hill, M.M. and B.A. Hemmings, *Inhibition of protein kinase B/Akt. implications for cancer therapy*. Pharmacol Ther, 2002. **93**(2-3): p. 243-51.
567. Hutchinson, J., et al., *Activation of Akt (protein kinase B) in mammary epithelium provides a critical cell survival signal required for tumor progression*. Mol Cell Biol, 2001. **21**(6): p. 2203-12.
568. Holland, E.C., et al., *Combined activation of Ras and Akt in neural progenitors induces glioblastoma formation in mice*. Nat Genet, 2000. **25**(1): p. 55-7.
569. Itoh, N., et al., *Phosphorylation of Akt/PKB is required for suppression of cancer cell apoptosis and tumor progression in human colorectal carcinoma*. Cancer, 2002. **94**(12): p. 3127-34.
570. Lawlor, M.A. and D.R. Alessi, *PKB/Akt: a key mediator of cell proliferation, survival and insulin responses?* J Cell Sci, 2001. **114**(Pt 16): p. 2903-10.
571. Testa, J.R. and A. Bellacosa, *AKT plays a central role in tumorigenesis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(20): p. 10983-5.
572. Altioek, S., et al., *Heregulin induces phosphorylation of BRCA1 through phosphatidylinositol 3-Kinase/AKT in breast cancer cells*. J Biol Chem, 1999. **274**(45): p. 32274-8.
573. Sussman, J., et al., *Protein kinase B phosphorylates AHNAK and regulates its subcellular localization*. J Cell Biol, 2001. **154**(5): p. 1019-30.
574. Wang, X., et al., *Epidermal growth factor receptor-dependent Akt activation by oxidative stress enhances cell survival*. J Biol Chem, 2000. **275**(19): p. 14624-31.
575. Wang, X., et al., *The cellular response to oxidative stress: influences of mitogen-activated protein kinase signalling pathways on cell survival*. Biochem J, 1998. **333** ( Pt 2): p. 291-300.
576. Naderi, J., M. Hung, and S. Pandey, *Oxidative stress-induced apoptosis in dividing fibroblasts involves activation of p38 MAP kinase and over-expression of Bax: resistance of quiescent cells to oxidative stress*. Apoptosis, 2003. **8**(1): p. 91-100.
577. Rintelen, F., et al., *PDK1 regulates growth through Akt and S6K in Drosophila*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(26): p. 15020-5.
578. Lawlor, M.A. and P. Rotwein, *Insulin-like growth factor-mediated muscle cell survival: central roles for Akt and cyclin-dependent kinase inhibitor p21*. Mol Cell Biol, 2000. **20**(23): p. 8983-95.
579. Dranovsky, A., et al., *Cdc2 phosphorylation of nucleolin demarcates mitotic stages and Alzheimer's disease pathology*. Neurobiol Aging, 2001. **22**(4): p. 517-28.

580. Vincent, I., et al., *Constitutive Cdc25B tyrosine phosphatase activity in adult brain neurons with M phase-type alterations in Alzheimer's disease*. Neuroscience, 2001. **105**(3): p. 639-50.
581. Ding, X.L., et al., *The cell cycle Cdc25A tyrosine phosphatase is activated in degenerating postmitotic neurons in Alzheimer's disease*. Am J Pathol, 2000. **157**(6): p. 1983-90.
582. Vincent, I., C. Pae, and J. Hallows, *The cell cycle and human neurodegenerative disease*. Prog Cell cycle Res, 2002. **5**: p. 31-42.
583. Chen, M.S., et al., *Absence of apparent phenotype in mice lacking Cdc25C protein phosphatase*. Mol Cell Biol, 2001. **21**(12): p. 3853-61.
584. Lincoln, A.J., et al., *Cdc25b phosphatase is required for resumption of meiosis during oocyte maturation*. Nat Genet, 2002. **30**(4): p. 446-9.
585. Jackman, M., et al., *Active cyclin B1-Cdk1 first appears on centrosomes in prophase*. Nat Cell Biol, 2003. **5**(2): p. 143-8.
586. Bradford, M.M., *A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye binding*. Anal Biochem, 1976. **72**: p. 248-54.
587. Cans, C., et al., *Use of CDC2 from etoposide-treated cells as substrate to assay CDC25 phosphatase activity*. Anticancer Res, 1999. **19**(2A): p. 1241-4.

# **Annexes**

## Protein kinase CK2 regulates CDC25B phosphatase activity

Nathalie Theis-Febyre<sup>1</sup>, Odile Filhol<sup>2</sup>, Carine Froment<sup>3</sup>, Martine Cazales<sup>1</sup>, Claude Cochet<sup>2</sup>, Bernard Monsarrat<sup>3</sup>, Bernard Ducommun<sup>1</sup> and Véronique Baldin<sup>\*1</sup>

<sup>1</sup>LBCMCP-CNRS UMR 5088, Institut d'Exploration Fonctionnelle des Génomes-IFR 109, Université Paul Sabatier, 118, Route de Narbonne, 31062 Toulouse, France; <sup>2</sup>INSERM EMI 0104, CEA DBMS, 17, Rue des Martyrs, 38054 Grenoble, cedex 9, France; <sup>3</sup>IPBS, UMR 5089, 205 Route de Narbonne, 31070 Toulouse, France

**Human dual-specificity phosphatases CDC25 (A, B and C) play an important role in the control of cell cycle progression by activating the cyclin-dependent kinases (CDKs). Regulation of these phosphatases during the cell cycle involves post-translational modifications such as phosphorylation and protein–protein interactions. Given the suspected involvement of the protein kinase CK2 at the G2/M transition, we have investigated its effects on the CDC25B phosphatase. We show that *in vitro* CK2 phosphorylates CDC25B, but not CDC25C. Mass spectrometry analysis demonstrates that at least two serine residues, Ser-186 and Ser-187, are phosphorylated *in vivo*. We also report that CDC25B interacts with CK2, and this interaction, mediated by the CK2 $\beta$  regulatory subunit, involves domains that are located within the first 55 amino acids of CK2 $\beta$  and between amino acids 122 and 200 on CDC25B. This association was confirmed *in vivo*, in *Sf9* insect cells and in U<sub>2</sub>OS human cells expressing an HA epitope-tagged CDC25B. Finally, we demonstrate that phosphorylation of CDC25B by protein kinase CK2 increases the catalytic activity of the phosphatase *in vitro* as well as *in vivo*. We discuss the possibility that CDC25B phosphorylation by CK2 could play a role in the regulation of the activity of CDC25B as a starter of mitosis.**

*Oncogene* (2003) 22, 220–232. doi:10.1038/sj.onc.1206107

**Keywords:** cell cycle; CDC25B phosphatase; CK2 kinase; phosphorylation

### Introduction

In human cells, three different *Cdc25* genes have been identified to date, coding for CDC25A, B and C proteins (Sadhu *et al.*, 1990; Galaktionov and Beach, 1991; Nagata *et al.*, 1991). These proteins share a high degree of identity in their carboxy-terminal catalytic domain (65%), but are more divergent in their amino-terminal

moiety, which is thought to be a regulatory domain. CDC25A is present in G1 phase and appears to play a role in the initiation of DNA replication by controlling the dephosphorylation, and therefore, the activation of CDK2/Cyclin E and CDK2/Cyclin A complexes (Hoffmann *et al.*, 1994; Jinno *et al.*, 1994; Blomberg and Hoffmann, 1999). It is also well established that CDC25C regulates entry into mitosis by upregulating the activity of CDK1/Cyclin B at the G2/M transition (Hoffmann *et al.*, 1993). The precise role of CDC25B is less clear. Its phosphatase activity is detectable from S phase to mitosis, and controversial sets of results suggest a role for CDC25B in the progression into S phase (Garner-Hamrick and Fisher, 1998), in G2 phase or at the G2/M transition (Gabrielli *et al.*, 1996; Lammer *et al.*, 1998; Karlsson *et al.*, 1999). This apparent controversy may reflect the existence of subpopulations of CDC25B, which act at different stages of the cell cycle, in specific subcellular compartments. Alternatively, various CDC25B isoforms, resulting from alternative splicing (Baldin *et al.*, 1997b; Forrest *et al.*, 1999), could target different sets of substrates.

The activity of all CDC25 is tightly regulated and several post-translational modifications are implicated. It has been demonstrated that the activity of CDC25C is upregulated by CDK1/Cyclin B phosphorylation, thus creating an autoamplification loop that drives the cell into mitosis (Hoffmann *et al.*, 1993). Other kinases, such as polo kinase family members, may also activate CDC25C at mitosis (Roshak *et al.*, 2000). A similar mechanism of autoamplification of its activity has been described for CDC25A with the CDK2/Cyclin E complex at the G1/S transition (Hoffmann *et al.*, 1994). Phosphorylation can also negatively control CDC25 activity, either by regulating its subcellular localization or its stability. During interphase or following various DNA injuries, C-TAK1 (Cdc Twenty-five Associated kinase) (Peng *et al.*, 1998) and checkpoint kinases, CHK1 and CHK2 (Sanchez *et al.*, 1997; Matsuoka *et al.*, 1998), respectively, phosphorylate serine 216 on CDC25C, thus preventing its inappropriate activation. This phosphoserine acts as a docking site for members of 14–3–3 family (Baldin, 2000; Muslin *et al.*, 1996), which play a critical role in the cytoplasmic localization of CDC25C (Dalal *et al.*, 1999; Graves *et al.*, 2001). Recently, we have also shown

\*Correspondence: V Baldin, LBCMCP-CNRS UMR 5088, Institut d'Exploration Fonctionnelle des Génomes-IFR 109, Université Paul Sabatier, 118, Route de Narbonne, 31062 Toulouse, France; E-mail: baldin@cict.fr

Received 26 March 2002; revised 30 September 2002; accepted 4 October 2002

that the cytoplasmic retention of CDC25B requires its interaction with 14-3-3 proteins (Davezac *et al.*, 2000) and that the integrity of the serine 323 is necessary to allow the interaction with 14-3-3 proteins (Mils *et al.*, 2000). Phosphorylation of CDC25 is also an important event that controls its stability: we have shown that phosphorylation of CDC25B by CDK1/Cyclin A complex triggers its proteasome-dependent degradation (Baldin *et al.*, 1997a). More recently, Falck *et al.* demonstrated that, following exposure to ionizing radiation, CHK2 mediated the phosphorylation of CDC25A on serine 123, leading to its degradation (Falck *et al.*, 2001).

Protein kinase CK2 (formerly casein kinase II) is a serine/threonine protein kinase that is messenger-independent, highly conserved and ubiquitously expressed. CK2 is a heterotetramer composed of two catalytic ( $\alpha$  and  $\alpha'$ ) and two regulatory  $\beta$  subunits combined to form  $\alpha_2\beta_2$ ,  $\alpha'\alpha\beta_2$  and  $\alpha_2\beta_2$  (Pinna and Meggio, 1997). CK2 phosphorylates a great number of substrates (Pinna and Meggio, 1997) involved in essential processes, including cell cycle regulation and cell growth (Allende and Allende, 1995). Genetic studies in *Saccharomyces cerevisiae* and in *Schizosaccharomyces pombe* showed that CK2 is essential for cell viability (Padmanabha *et al.*, 1990; Snell and Nurse, 1994); for instance, the simultaneous disruption of the genes encoding the catalytic subunits, *cka1* and *cka2* in *S. cerevisiae* is lethal (Padmanabha *et al.*, 1990). A set of other results also suggested an essential role of CK2 in the control of cell cycle progression in the budding yeast (Hanna *et al.*, 1995). It was demonstrated that, at nonpermissive temperature, mutant CK2 strains displayed a dual-arrest phenotype consisting of 50% of cells in G1 and 50% in G2/M. Analysis of hydroxyurea-synchronized cells also confirmed that CK2 is needed for cell cycle progression in the G2/M phases (Mulner-Lorillon *et al.*, 1988; Hanna *et al.*, 1995). In mammalian cells, a possible role for CK2 at G2/M has been suggested from results of various experimental approaches. In 3T3 L1 fibroblast cells, the increased expression of CK2 $\beta$  was shown to cause accumulation in G2/M, suggesting a role of CK2 at this point of the cell cycle (Li *et al.*, 1999). Furthermore, both types of CK2 subunits can be phosphorylated by CDK1 *in vitro* and in intact cells during mitosis (Litchfield *et al.*, 1992; Bosc *et al.*, 1995). In addition, CDK1 itself can be phosphorylated by CK2 (Russo *et al.*, 1992) and CK2 has been implicated in the phosphorylation of cyclin B, which regulates its nuclear translocation (Li *et al.*, 1997b). More recently, several proteins including the phosphatase PTP-S2 (Nambirajan *et al.*, 2000), the SIX1 homeodomain (Ford *et al.*, 2000) and the Topoisomerase II (Escargueil *et al.*, 2000), were found to be phosphorylated by CK2 during mitosis. All these data suggest that CK2 plays a role in the control of the cell cycle and, particularly, at the G2/M transition.

In the present study, we report that protein kinase CK2 phosphorylates CDC25B, but not CDC25C. We identify serines 186 and 187 as two phosphorylation sites (by mass spectrometry analysis of phosphorylated

proteins (Mann *et al.*, 2001; McLachlin and Chait, 2001)), located in the N-terminal regulating domain of the protein. Both enzymes interact physically *in vitro* as well as *in vivo*, and this interaction is mediated by the  $\beta$  subunit of CK2. Finally, we demonstrate that the CK2 kinase upregulates the catalytic activity of CDC25B, both *in vitro* and *in vivo*. We suggest that, *in vivo*, post-translational modifications of CDC25B by CK2 could play a role in the regulation of the activity of CDC25B as a starter of mitosis.

## Materials and methods

### DNA constructs

Human cDNA encoding the full-length CDC25B1, B2, B3 and N-terminal deletion mutants were cloned in pET14b (Novagen) as described previously (Mils *et al.*, 2000).

HA-CDC25B cDNA in pUHD10 was created as follows: a haemagglutinin A (HA) (3X)-Tag cDNA was amplified by PCR with the primers 5'-gatagaattcatgtaccatcacgatgttctctg-3' (HA forward) and 5'-ctagatttctagagcggcg-3' (HA reverse), cut with *EcoRI-XbaI* and inserted at the same sites into pUHD10-3 to create pUHD10-HA. Human CDC25B cDNA cloned in pET14b was digested by *NdeI*-partial *NcoI*, filled with Klenow and inserted into pUHD10-HA, digested by *XbaI* and treated by Klenow.

A 2.1 kb *SmaI* fragment of full-length human CDC25B3 encoding amino acids 30-600 was subcloned into *SmaI*-digested pGEX-KG (Pharmacia) to create GST-CDC25B3. pGEX-2T containing the entire open reading frame of human CDC25C (Hoffmann *et al.*, 1993) was a gift from Dr G Draetta.

Mutation of serines 186 and 188 (A/G) and triple mutant serines 186/187 and 188 (A/A/G) were generated by PCR mutagenesis on pcDNA<sub>3</sub>-HA-CDC25B3 plasmid (Davezac *et al.*, 2000) using the following primers: 5'-gccggcagcgtggg-gaagacaaggagaat-3' (sense), 5'-gctgccggcggcgtggggaagaaca-3' (sense) and their corresponding antiparallel, respectively, and Kit GC (Clontech).

### Cell culture and cell extracts

*Spodoptera frugiperda* (*Sf9*) cells were maintained at 27°C in Insect Xpress medium (Biowhittaker) supplemented with 5% heat-inactivated fetal calf serum (Eurobio), gentamycin (250 µg/ml), amphotericin B (2.5 µg/ml), penicillin (100 U/ml) and streptomycin (100 µg/ml). For protein expression, *Sf9* cells were plated at a density of  $6 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup> 1 day prior to infection, and then coinfecting with recombinant baculoviruses coding for human CDC25B3 (C Cans and V Baldin, unpublished data), chicken CK2 $\alpha$  and CK2 $\beta$  (Filhol *et al.*, 1991). At the indicated time post-infection, the cells were harvested and homogenized in lysis buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 100 mM NaCl, 0.5% Triton X-100, 1% NP40) in the presence of protease inhibitors: leupeptin (5 µg/ml), aprotinin (5 µg/ml), trypsin inhibitor (10 µg/ml), TPCK (20 µg/ml), TLCK (20 µg/ml), PMSF (17 µg/ml), calpain inhibitor I (20 µg/ml), and phosphatase inhibitors: 50 mM NaF and 0.1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> (except for phosphatase assays) for 35 min on ice, and centrifuged at 14000 rpm for 10 min at 4°C.

U<sub>2</sub>OS-tTA cells, stably transfected with pUHD-15.1-neo expressing the tTA tetracycline repressor chimera, can express genes cloned into pUHD10 vectors in the absence of tetracycline. Cells were grown in Dulbecco's modified Eagle's

medium supplemented with 10% heat-inactivated fetal calf serum, 250 µg/ml G418, 2 mM glutamine, penicillin (100 U/ml), and streptomycin (100 µg/ml) in a humidified atmosphere containing 5% CO<sub>2</sub> at 37°C. U<sub>2</sub>OS-tTA cells were cotransfected by pREP-Hygro and pUHD10-HA-CDC25B in a ratio of 1:10. Stably transfected cells and clones expressing CDC25B in the absence of tetracycline were selected in the presence of hygromycin (200 µg/ml). For experiments, cells were seeded at 10<sup>6</sup> cells per 10-cm-diameter plate in the presence of 1 µg/ml of tetracycline. At 24 h after seeding, cells were washed extensively with PBS to remove tetracycline and grown for 30 h before being harvested. Whole-cell extracts were obtained by lysing the cells in lysis buffer, supplemented with a cocktail of protease inhibitors (Baldin *et al.*, 1997b) for 30 min on ice, and centrifuged at 14 000 rpm for 10 min to sediment the insoluble material.

#### Expression-purification of recombinant human CDC25B and CDC25C

PGEX-KG-CDC25B3 and pGEX-2T-CDC25C plasmids were transformed into *Escherichia coli* DH5α cells. The expression of both GST-fusion proteins was induced by 0.4 mM IPTG (isopropyl β-D-thiogalactoside) for 5 h at 25°C. The fusion proteins were recovered as described by Smith and Johnson (1988) on glutathione-Sepharose beads and eluted by 20 mM glutathione in 50 mM Tris-HCl, pH 8, 50 mM NaCl, 1 mM EDTA, 2 mM DTT. The construction of the plasmid allowing the expression of MBP-CDC25B3 and the recombinant protein production will be described elsewhere.

#### In vitro kinase and phosphatase assays

We used purified CDC25B proteins immobilized on GST-beads or immunoprecipitated with antibodies against a C-terminal peptide of CDC25B, from an *in vitro* transcription/translation assay (TnT7 Quick, Promega) carried out in the presence or absence of 10 µCi of <sup>35</sup>S-Methionine (NEN). Proteins were incubated in 20 µl of kinase buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 mM KCl, 10 mM β-mercaptoethanol, and 50 µM ATP) with purified recombinant CK2 (Filhol *et al.*, 1991) and 2.5 µCi of <sup>32</sup>P-γ-ATP (NEN) at 30°C for the indicated times. The reaction was stopped by addition of 0.5 ml lysis buffer, and samples were centrifuged and resuspended in Laemmli sample buffer before being separated by SDS-PAGE and analysed by autoradiography or Western blot.

Peptide phosphorylation was performed in the above-described kinase buffer: each peptide (200 µM) was incubated with 1 µCi of <sup>32</sup>P-γ-ATP in the presence of purified CK2 (100 ng) at 30°C for 30 min. The reaction was stopped by the addition of Tricine sample buffer and samples were analysed on 16.5% Tris-Tricine gel followed by autoradiography.

For phosphatase assay, samples were treated as described before, except that 1 mM ATP, 10 µg/ml of creatine kinase and 10 mM creatine phosphate were used for the kinase assay. The precipitates were washed twice with lysis buffer without NP40 in the absence of phosphatase inhibitors (NaF and Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>) and once with phosphatase buffer (30 mM Tris-HCl, pH 8.2, 75 mM NaCl, 0.67 mM EDTA, 0.033% bovine serum albumin, 1 mM DTT). CDC25B phosphatase activity was monitored using fluorescein diphosphate, FDP (Molecular Probes, Inc.), as substrate at a final concentration of 20 µM for 30 min at room temperature, as described by Rice *et al.* (1997). Fluorescence emission from the reaction product was measured with a multiwell plate reader (Fluoroskan Ascent, Labsystems, excitation filter 485 nm; emission filter 538 nm).

For phosphatase assay using CDK1/Cyclin B as substrate, 10 ng of purified recombinant MBP-CDC25B3 wild type or mutant 2 (S186A/S187A/S188G) were used per assay in the same conditions as previously described (Cans *et al.*, 1999).

#### Mapping of the interaction between CDC25B and CK2β

Procedures for the expression and purification of GST-CK2α-HA (Heriche *et al.*, 1997) MBP-CK2β (Chantalat *et al.*, 1999) and GST-CK2β (Leroy *et al.*, 1999) fusion proteins have been previously described. Purified proteins were separated on a 12% polyacrylamide gel and transferred to PVDF membranes. Membranes were blocked in BLOTTO (PBS with 0.05% Tween 20 and 3% W/V dried milk) overnight and incubated with the same amount of *in vitro* translated lysates for 1 h at 22°C in PBS containing 0.05% Tween 20. Membranes were washed 4 times with the same buffer, dried and radioactivity was visualized using a PhosphorImager system (Molecular Dynamics).

Pull-down experiments were performed as follows: 100 ng of MBP or MBP-CK2β bound to amylose beads or 10 µg of GST, GST-CK2α-HA, GST-CK2β were incubated with *in vitro*-translated CDC25B3 (wild type or amino-terminal deletion mutants) in interaction buffer (50 mM Tris pH 7.5, 100 mM NaCl, 50 mM NaF, 0.5% Triton X-100, 1 mM DTT) for 2 h at 4°C. The beads were washed 5 times with 1 ml of interaction buffer, resuspended in Laemmli sample buffer before being separated by SDS-PAGE and analysed by autoradiography.

#### CDC25B3 in-gel digestion, Nano-LC-MS/MS analysis and database search

CDC25B3 was produced in *Sf9* cells producing or not CK2 kinase, immunoprecipitated, separated by SDS-PAGE and detected using Coomassie blue staining. The CDC25B3 band was excised from the gel, cut into small pieces, and in-gel digestion was performed as described (Wilm *et al.*, 1996) with minor modifications. After several washing steps to eliminate stain, the pieces of gel were dried under vacuum. Proteins were reduced with 10 mM DTT in 100 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> for 35 min at 56°C, and alkylated with 55 mM iodoacetamide in 100 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> for 30 min at room temperature in the dark. The gel fragments were swollen in a covering volume of modified trypsin (Promega, Madison, WI, USA) solution (25 ng/µl in 50 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>) for 15 min in an ice bath. Trypsin digestion was performed overnight at 37°C with shaking. The supernatant was pooled with two peptide extracts performed at 37°C for 30 min with shaking in 5% formic acid in 50% acetonitrile. The peptide mixture was dried under vacuum and redissolved in 10 µl of 0.1% formic acid in 1% acetonitrile for nano-LC-MS/MS analysis.

The tryptic digest was analysed by on-line capillary HPLC (LC Packings) coupled to a nanospray LCQ ion trap mass spectrometer (ThermoFinnigan, San Jose, CA, USA). Peptides were separated on a 75 µm ID × 15 cm C18 PepMap™ column (LC Packings). The flow rate was set at 150 nl/min. Peptides were eluted using a 0–40% linear gradient of solvent B in 40 min (solvent A was 0.1% formic acid in 1% acetonitrile, and solvent B was 0.1% formic acid in 90% acetonitrile). The mass spectrometer was operated in positive ion mode at a 2.2 kV needle voltage and a 30 V capillary voltage. Data acquisition was performed in a data-dependent mode consisting of, alternatively in a single run, a full scan MS over the range *m/z* 370–2000, and a full scan MS/MS in an exclusion dynamic mode. MS/MS data were acquired using a 3 *m/z* units ion isolation window, a relative collision energy of 35%, and a dynamic exclusion duration of 0.5 min. The SEQUEST search

engine (Eng *et al.*, 1994) was used for protein identification by searching against a nonredundant human database with MS/MS spectra. The identification of phosphorylation sites resulting from a SEQUEST search was confirmed by manual interpretation of corresponding MS/MS data.

#### Antibodies and immunological methods

Monoclonal antibody 12CA5 against haemagglutinin (HA)-Tag was obtained from Roche Molecular Biochemicals. Polyclonal rabbit antibodies directed against human CDC25B (raised against a C-terminal peptide or N-terminal part of the protein) were obtained in our laboratory. Rabbit anti-chicken CK2 $\alpha$  and  $\beta$  polyclonal antibodies, used for the immunoprecipitation, were produced as described (Filhol *et al.*, 1994; Filhol-Cochet *et al.*, 1994). Monoclonal antibodies against CK2 $\alpha$  (Calbiochem) and CK2 $\beta$  (Nastainczyk *et al.*, 1995) were used for Western blot. Immunoblotting and immunoprecipitation were performed as described previously (Baldin *et al.*, 1993).

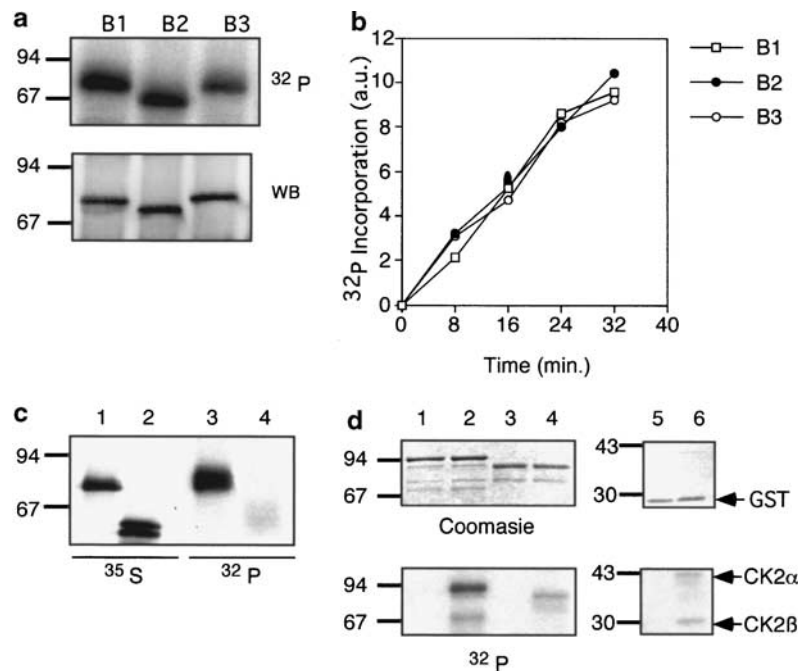
## Results

### CDC25B, but not CDC25C is a specific substrate for CK2 kinase *in vitro*

We investigated the possible phosphorylation of CDC25B by protein kinase CK2. We produced the

three CDC25B splice variants (B1, B2 and B3), by *in vitro* transcription/translation in rabbit reticulocyte lysate, and used recombinant purified holoenzyme CK2, produced in *Sf9* insect cells. Kinase assays were performed in the presence of  $^{32}\text{P}$ - $\gamma$ -ATP, and subsequent autoradiography (Figure 1a) revealed that the three variants of CDC25B were readily phosphorylated by purified CK2. A kinetic analysis of  $^{32}\text{P}$  incorporation by each CDC25B variant was performed and, as shown in Figure 1b, all three were phosphorylated to the same extent, suggesting that CK2 phosphorylated each CDC25B variant with similar efficiency. In the light of this result, we decided to use only CDC25B3 for subsequent experiments.

To rule out the possibility that this phosphorylation was a nonspecific *in vitro* event, we next examined the ability of CK2 to phosphorylate CDC25C (a highly related protein containing several putative CK2 phosphorylation sites). Both proteins were translated *in vitro* (Figure 1c, lanes 1 and 2) and incubated with CK2 (lanes 3 and 4). As shown, CK2 efficiently phosphorylated CDC25B (lane 3), but phosphorylated CDC25C very poorly (lane 4), suggesting that CDC25B was a specific substrate for CK2. To eliminate the possibility that post-translational modifications occurring in reticulocyte lysate were preventing CK2 phosphorylation of



**Figure 1** Phosphatase CDC25B, but not C, is a substrate of protein kinase CK2. (a) *In vitro*-translated CDC25B1, B2 and B3 were immunoprecipitated using an antipeptide antibody raised against the carboxy terminus of CDC25B. The immunoprecipitates were incubated in kinase buffer with  $^{32}\text{P}$ - $\gamma$ -ATP in the presence of 100 ng of recombinant-purified CK2 for 30 min at 30°C, followed by autoradiography (upper panel) or Western-blot analysis with the same antibody (lower panel). (b) Phosphorylation kinetics of the three variants were followed for 32 min under the same conditions as described above.  $^{32}\text{P}$  quantification was performed using a STORM 840 imager (Molecular Dynamics) and is expressed in arbitrary units. The data are the average of three independent experiments. (c)  $^{35}\text{S}$ -Methionine-labelled (1, 2) or unlabelled (3, 4) *in vitro*-translated CDC25B3 (1, 3) and CDC25C (2, 4) were immunoprecipitated with their respective antibodies, incubated with purified CK2 in the presence (3, 4) or absence (1, 2) of  $^{32}\text{P}$ - $\gamma$ -ATP for 30 min at 30°C. Samples were separated on 8% SDS-PAGE and subjected to autoradiography. (d) GST-CDC25B3 (1, 2), GST-CDC25C (3, 4) or GST (5, 6) were purified and subjected to phosphorylation using (2, 4, 6) or not (1, 3, 5) CK2 kinase in the presence of  $^{32}\text{P}$ - $\gamma$ -ATP for 30 min at 30°. Proteins were separated on 10% SDS-PAGE, stained with Coomassie Blue (upper panels) and subjected to autoradiography (lower panels)



CDC25C, we produced and purified recombinant fusion proteins GST-CDC25B3 and GST-CDC25C. These proteins were subjected to kinase assays in the presence or absence of purified CK2 (Figure 1d). The autoradiography (lower panel) confirmed that CDC25C (lane 4) was a weak substrate for CK2 *in vitro*, as its phosphorylation was sixfold lower than that of CDC25B (lane 2). Thus, both results argue in favour of a specific phosphorylation of CDC25B by CK2. To ensure that no contaminating kinase copurified with either *in vitro* translated CDC25B or recombinant CK2, kinase assays were performed in the presence of two CK2 inhibitors: heparin and DRB (5,6-dichloro-1- $\beta$ -D-ribofuranosyl benzimidazole) (Zandomeni *et al.*, 1986). Increasing concentration of heparin abolished CDC25B phosphorylation (Figure 2a) and addition of DRB considerably reduced its phosphorylation (Figure 2b).

Finally, we confirmed that CDC25B is a specific substrate for CK2 by comparing the ability of the holoenzyme ( $\alpha_2\beta_2$ ) (Figure 2c, lane 1) and the monomeric CK2 $\alpha$  (Figure 2c, lane 2) to phosphorylate CDC25B. We found that CDC25B was more efficiently phosphorylated by the heterotetramer ( $\alpha_2\beta_2$ ) than by the monomer  $\alpha$  (compare lanes 2 and 1). A kinetic analysis of  $^{32}\text{P}$  incorporation into CDC25B (Figure 2c, right panel) indicates that CDC25B phosphorylation with monomeric CK2 was weak and reached its maximal level very rapidly. The relative  $^{32}\text{P}$  incorporation in CDC25B, after 24–32 min incubation with monomeric CK2, represented only 33% of the phosphorylation level with heterotetrameric CK2. These results indicate that the presence of the  $\beta$  subunit of CK2 probably stimulates the kinase activity of the monomeric  $\alpha$  subunit towards CDC25B, as it has previously been described for many CK2 substrates (Lin *et al.*, 1991; Bidwai *et al.*, 1992). They also support the hypothesis that  $\beta$  subunit is required to recognize CDC25B as a substrate. Together, these data clearly show that CDC25B is a specific substrate of CK2 *in vitro*.

#### Identification of serines 186 and 187 of CDC25B as targets of CK2

The identification of sites phosphorylated *in vivo* by CK2 was first examined by nano-LC-MS/MS. CDC25B3, produced in *Sf9* insect cells coexpressing or not the CK2 kinase, was immunoprecipitated by anti-CDC25B antibodies, separated on SDS-PAGE and the corresponding bands were in-gel digested with trypsin. Nano-LC-MS/MS data confirmed the identification of CDC25B (data not shown) and indicated a diphosphorylation on the peptide sequence 178-SEAGS-GAASSSGEDKENDGFVFK-200 (obtained from CDC25B3 coexpressed with CK2). The MS/MS spectrum of this diphosphorylated peptide is presented in Figure 3a. The observed fragment ions confirm the peptide sequence and the presence of two phosphate groups on serine residues (intense successive losses of two  $\text{H}_3\text{PO}_4$  groups from the precursor peptide,  $\text{M}^{2+}$ ).

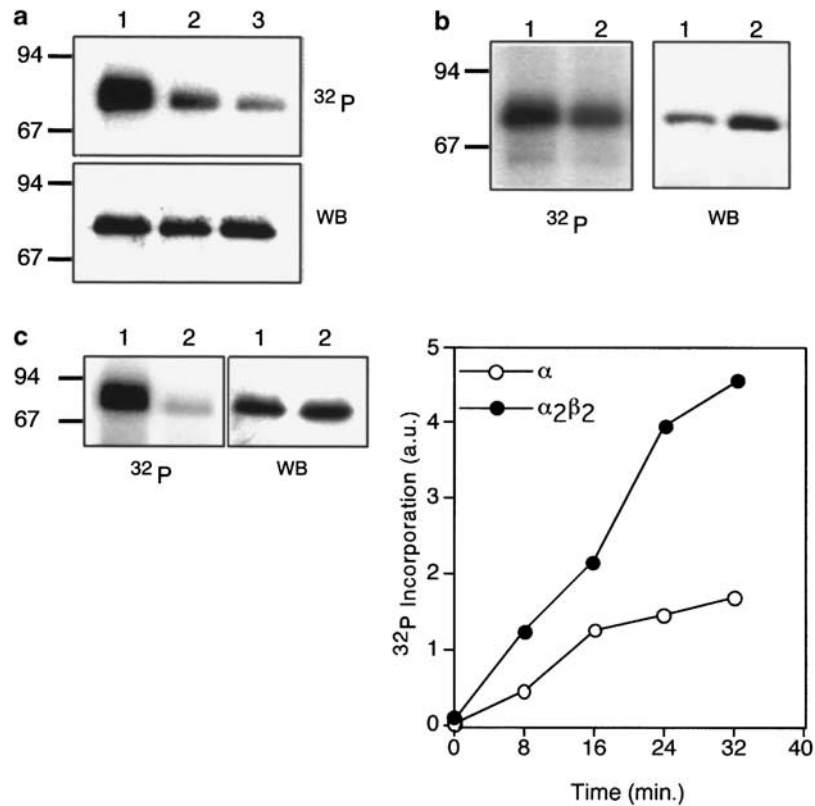
The ion at  $m/z$  876.1 corresponding to the  $y_{17}^{2+}$  ion bears two phosphate groups and thus indicates that the phosphorylation sites are located on two of the three underlined serine residues, 186–188. The presence of a weak  $y_{14}$  ion suggests that a first phosphorylation is located on serine residue 186 and a second on Ser-187 or Ser-188. The precise localization of the phosphate group cannot be unambiguously established. However, when CDC25B3 was produced alone in *Sf9* cells, a monophosphorylation of this peptide (AA 178–200) was recovered (data not shown), and the phosphorylation of the Ser-188 residue appeared less probable. These results are consistent with a putative phosphorylation site for CK2 according to the consensus sequence.

The two serine residues identified *in vivo* are located in the B domain of CDC25B (Figure 3b). In order to confirm the data obtained *in vivo*, we used three peptides in kinase assays (Figure 3c). One corresponded to the B domain of CDC25B, the second to a dodecapeptide (RRREDEESDDEE) classically used as CK2 substrate (Escargueil *et al.*, 2000), and the third one to the middle part of the B domain of CDC25B, excluding the putative phosphorylation site (dotted line in Figure 3b). The ability of CK2 to phosphorylate these three peptides was evaluated by autoradiography after incubation with radiolabelled ATP in the presence of recombinant CK2 kinase. The results presented in Figure 3c show that the B domain of CDC25B was a good substrate for CK2 (lane 1) and was even more efficiently phosphorylated than the CK2-specific peptide (lane 2). In contrast, the third peptide (middle part of the B domain) was not phosphorylated (Figure 3c, lane 3). The determination of  $^{32}\text{P}$  incorporation into the B peptide (1.6 mol of phosphate/mol of peptide) argues in favour of the presence of two phosphorylated residues.

We then generated two full-length point mutants of CDC25B3, mutant 1 contained the substitution of Ser-186/Ser-188 to Ala-186/Gly-188 and mutant 2 had a triple mutation converting Ser-186/Ser-187/Ser-188 to Ala/Ala/Gly, respectively. We tested the ability of CK2 to phosphorylate both wild type and mutant proteins. Comparison of the relative level of phosphorylation, presented in the histogram in Figure 3d, shows that both mutant proteins were phosphorylated to a lesser extent than wild-type CDC25B: a decrease of 20 and 50% was observed. Thus, these results demonstrate that *in vitro* CK2 phosphorylation of CDC25B occurs on Ser-186 and Ser-187, which are the sites phosphorylated *in vivo*, as well as on additional unidentified other sites.

#### *In vitro*, CDC25B interacts with the $\beta$ subunit of CK2

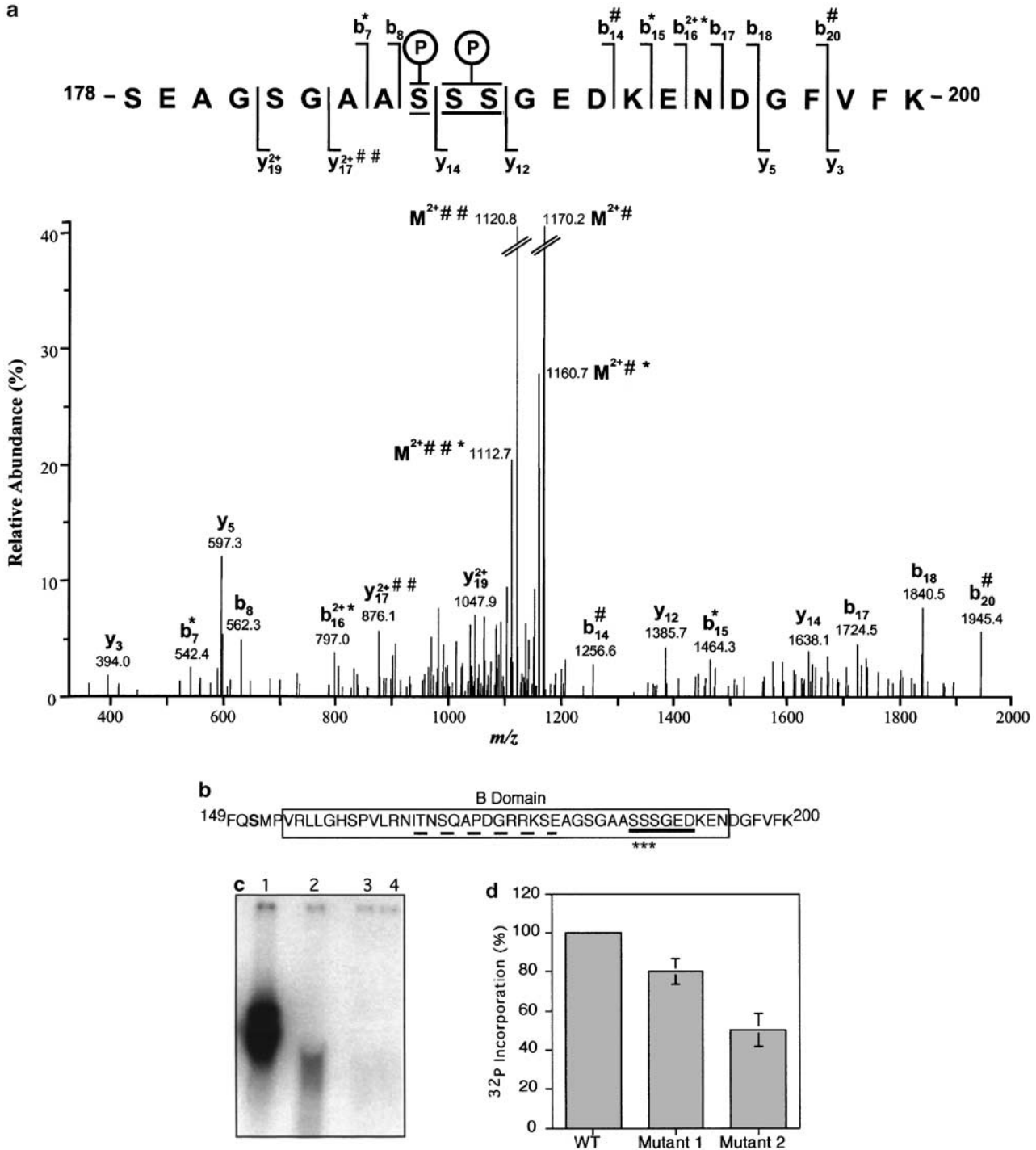
Although the data presented above demonstrated that CDC25B is phosphorylated by CK2, they did not indicate whether the two proteins are able to interact physically. We therefore assessed the ability of recombinant GST-CK2 $\alpha$  and GST-CK2 $\beta$  to form a



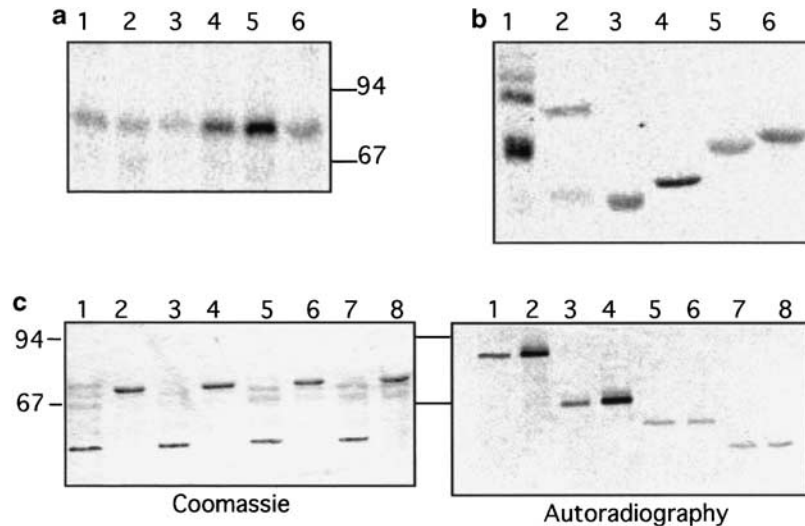
**Figure 2** Specific phosphorylation of CDC25B by CK2 holoenzyme. (a) *Upper panel* ( $^{32}\text{P}$ ): *In vitro*-translated CDC25B3 was immunoprecipitated with anti-CDC25B antibody and then incubated 30 min at 30°C with purified CK2 and  $^{32}\text{P}$ - $\gamma$ -ATP in the absence (lane 1) or in the presence of increasing amounts of heparin (0.3  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , lane 2; 0.6  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , lane 3). *Lower panel* (WB), Western-blot analysis of the immunoprecipitation realized with the anti-CDC25B antibody. (b) same as in (a) except that the kinase assay was performed in kinase buffer containing either 20  $\mu\text{M}$  ATP in the presence of  $^{32}\text{P}$ - $\gamma$ -ATP (lane 1) and 50  $\mu\text{M}$  DRB (lane 2). (c) *Left panel*, immunoprecipitated IVT-CDC25B3 was incubated with recombinant purified  $\alpha_2\beta_2$  holoenzyme (lane 1) and the monomeric  $\alpha$  subunit (lane 2) as described above. Autoradiography ( $^{32}\text{P}$ ) and Western-blot analysis (WB) are presented. *Right panel*, kinetics of CDC25B3 phosphorylation by  $\alpha_2\beta_2$  holoenzyme and monomeric  $\alpha$  subunit. Proteins were separated on SDS-PAGE and analysed by Western-blot or autoradiography.  $^{32}\text{P}$  quantification was performed using a STORM 840 imager (Molecular Dynamics) and is expressed in arbitrary units. These results are representative of three independent experiments

complex with  $^{35}\text{S}$ -methionine-labelled *in vitro*-translated CDC25B3, using a pull-down experiment (Figure 4a) and a Far-Western approach (Figure 4b). As shown in Figure 4a, a specific interaction was detected between CDC25B3 and GST-CK2 $\beta$  (1–150) (lane 4) and more strongly with GST-CK2 $\beta$  (1–55) (lane 5). In contrast, an unspecific interaction was observed with GST-CK2 $\alpha$  (lane 2), GST-CK2 $\beta$  (55–150) (lane 6), and with control GST protein (lane 3). Similar results were obtained using purified recombinant fusion proteins, transferred to a PVDF membrane, and incubated with the *in vitro* translated CDC25B3 (Figure 4b). CDC25B interacted strongly with GST-CK2 $\beta$  (1–55) (lane 4), as well as with GST-CK2 $\beta$  (1–150) (lane 6) but weakly. The interaction detected with GST-CK2 $\alpha$  (lane 2) and GST-CK2 $\beta$  (51–150) (lane 5) was comparable to the nonspecific interaction observed in this experimental condition with the GST protein (lane 3). Thus, from these two experiments we can conclude that CDC25B3 forms a complex with CK2, mediated by the  $\beta$  subunit and implicating the region containing amino acids 1–55.

We were next interested in determining the domains on the CDC25B3 protein that are involved in this interaction. To this aim, MBP pull-down experiments were performed. We used  $^{35}\text{S}$ -methionine-labelled N-terminal CDC25B3 deletion mutants and recombinant purified MBP or MBP-CK2 $\beta$  loaded on amylose beads. As shown in Figure 4c, a CDC25B3 mutant, deleted from the 122 first amino acids (lane 4) was able to interact with MBP-CK2 $\beta$ . By contrast, no specific binding with MBP-CK2 $\beta$  was observed with a CDC25B mutant deleted from the 200 or 242 first amino acids (lanes 6 and 8, respectively). We conclude that the region of CDC25B3, including amino acid 123 up to amino acid 200, is required for the interaction with the  $\beta$  subunit of CK2. We therefore examined the interaction between each variant of CDC25B and the GST-CK2 $\beta$  (1–55) recombinant fusion protein using a Far-Western approach. The interactions of the three CDC25B with GST-CK2 $\beta$  (1–55) were similar (data not shown), indicating that there is no difference between CDC25B1, B2 and B3.



**Figure 3** Identification of Ser-186 and Ser-187 as targets of CK2. (a) Analysis of phosphorylation sites of CDC25B3 co-expressed with CK2 kinase by nano-LC-MS/MS. The MS/MS spectrum of the diphosphorylated peptide, 178-SEAGSGAASSSGEDKENDGFVFK-200 (doubly charged precursor ion,  $M^{2+}$ , at  $m/z$  1219.26) displays series of b- and y-ions (according to Biemann's nomenclature (Biemann, 1990)), indicating that the three underlined serine residues are putative phosphorylation sites. \* and # correspond to the loss of  $H_2O$  and  $H_3PO_4$  from precursor and sequence ions, respectively. (b) Amino-acid sequence of CDC25B3 between amino acids 149 and 200. Peptide corresponding to the variable domain B in the different CDC25B proteins is boxed. The putative CK2 consensus domain is underlined. (c) Peptide phosphorylation. Three different peptides were used in this assay: lane 1: full-length domain B of CDC25B (41 AA); lane 2, classical dodecapeptide used as CK2 substrate (RRREDEESDDEE); lane 3, middle part of B domain (NSQAPDGRRKSEA, this sequence is punctuated underlined in b); lane 4, without peptide. Peptides (same amount of moles) were incubated with radiolabelled ATP in the presence of purified CK2 for 30 min at 30°C, followed by electrophoresis and autoradiography. (d) *In vitro*-translated CDC25B3 wild-type and two point mutation mutants (S186A/S188G = mutant 1), (S186A/S187A/S188G = mutant 2) were immunoprecipitated and incubated with radiolabelled ATP in the presence of CK2 for 30 min at 30°C. Samples were subjected to electrophoresis prior to autoradiography.  $^{32}\text{P}$  incorporation was quantified and normalized to the number of moles of each CDC25B protein and expressed as a percentage of the incorporation in the wild-type CDC25B3



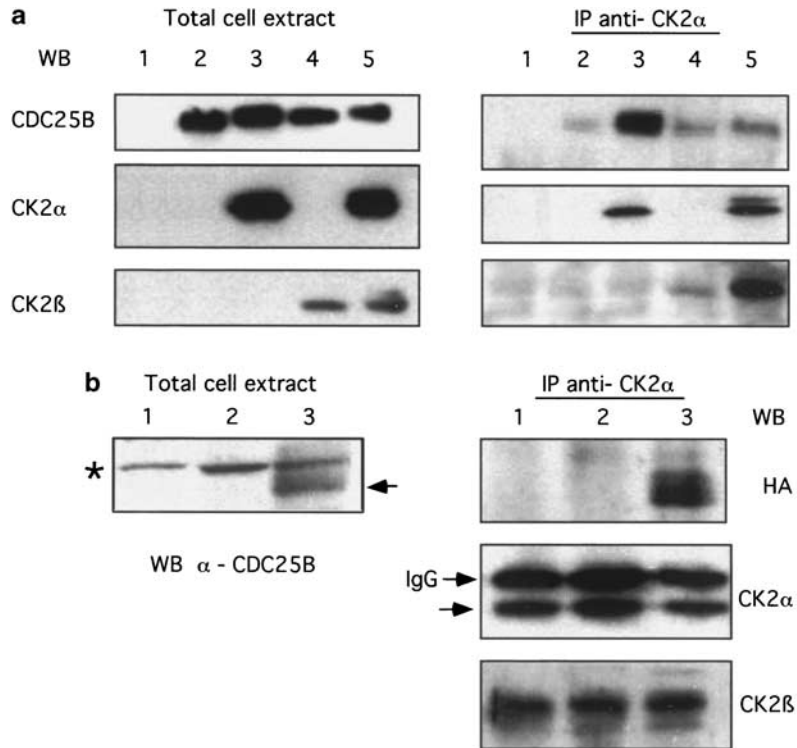
**Figure 4** Mapping of the CK2 and CDC25B interaction domains. (a) CK2 $\beta$  subunit is involved in the interaction with CDC25B3.  $^{35}$ S-Methionine-labelled *in vitro*-translated CDC25B3 was incubated during 2 h with Glutathione beads (lane 1), or with 10  $\mu$ g of recombinant purified proteins GST-CK2 $\alpha$ -HA (lane 2), GST (lane 3), GST-CK2 $\beta$  (1–150) (lane 4), GST-CK2 $\beta$  (1–55) (lane 5) and GST-CK2 $\beta$  (51–150) (lane 6) fixed to Glutathione beads. Samples were separated on 12.5% SDS-PAGE and subjected to an autoradiography. (b) Purified proteins 5  $\mu$ g GST-CK2 $\alpha$ -HA (lane 2), GST (lane 3), GST-CK2 $\beta$  (1–55) (lane 4), GST-CK2 $\beta$  (51–155) (lane 5) and GST-CK2 $\beta$  (1–150) (lane 6) were separated by SDS-PAGE, transferred onto PDVF membrane that was incubated with  $^{35}$ S-methionine-labelled *in vitro*-translated CDC25B3, as described in the materials and methods section. Bound CDC25B3 was revealed by autoradiography (lane 1: molecular weight markers). (c) CDC25B3 region involved in the interaction with MBP-CK2 $\beta$  protein. Purified MBP (100 ng) (lanes 1, 3, 5 and 7) or MBP-CK2 $\beta$  (lanes 2, 4, 6 and 8) proteins, bounded to amylose beads, were incubated with  $^{35}$ S-methionine-labelled *in vitro*-translated wild-type or N-terminal truncated forms of CDC25B3 (1–2: full-length CDC25B3; 3–4:  $\Delta$ N122; 5–6:  $\Delta$ N200; 7–8:  $\Delta$ N242). Samples were then subjected to SDS-PAGE, left panel: Coomassie staining, right panel: autoradiography

#### CDC25B and CK2 associate *in vivo*

We next investigated whether both proteins were associated *in vivo*. For this purpose, we first co-infected *Sf9* insect cells with recombinant baculoviruses coding for CDC25B3, CK2  $\alpha$  and  $\beta$  subunits. At 36 h post-infection, cell extracts from various infection combinations were subjected either to direct Western blot with indicated antibodies (Figure 5a, left panel) or to immunoprecipitation with anti-CK2 $\alpha$  antibodies (Figure 5a, right panel). Western-blots on total cell extract (left panel) confirmed that all proteins were produced. However, it is important to note that the expression level of CDC25B in cells that were coinfecting with CK2 $\beta$  and CK2 $\alpha/\beta$  is twofold weaker than in cells coinfecting only with CK2 $\alpha$  (compare lanes 4 and 5 to lane 3). When the immunoprecipitation was performed with antibodies against CK2 $\alpha$  (Figure 5a, right panel), CDC25B was detected after CK2 immunoprecipitation in cells expressing CDC25B/CK2 $\alpha$  (lane 3), CDC25B/CK2 $\beta$  (lane 4) and CDC25B/CK2 $\alpha$ /CK2 $\beta$  (lane 5), but not in uninfected cells (lane 1). The weaker CDC25B signal obtained in the triple infection could result from the lower expression of CDC25B observed in the total cell extract (left panel, lane 5). As immunoprecipitations were performed with a polyclonal anti-CK2 $\alpha$  antibody, which recognizes CK2 $\alpha$  from different species, it was not surprising to detect CDC25B in cells infected only with CDC25B3 (lane 2) or with CDC25B3/CK2 $\beta$  (lane 4). The endogenous CK2 $\alpha$  subunit was not

detected by Western-blot, as the monoclonal antibody used does not crossreact with *Sf9* insect protein. For the same reason, the presence of CK2 $\beta$  subunit was only detected in the immunoprecipitations performed on cell extracts from insect cells infected with CDC25B3 and CK2 $\beta$  as well as CDC25B3/CK2 $\alpha$ /CK2 $\beta$  (Figure 5a, right panel, lanes 4 and 5). These results confirm the existence of an *in vivo* interaction between CDC25B and CK2.

Next, we demonstrate that this interaction also exists in mammalian cells. For this purpose, we used U<sub>2</sub>OS cells engineered to express ectopic HA-tagged CDC25B3 in a tetracycline-repressible manner. CDC25B3 was efficiently produced and detectable with anti-CDC25B antibodies 30 h after tetracycline removal (Figure 5b, left panel, lane 3). We noticed that anti-CDC25 antibodies cross-reacted with a cellular protein in total cell extracts (Figure 5b, left panel, indicated by a star). When cell lysates were subjected to immunoprecipitation using CK2 $\alpha$  antibodies, ectopically expressed HA-tagged CDC25B3 protein was found associated with CK2 $\alpha$  as well as the CK2 $\beta$  subunit (Figure 5b, right panel, lane 3). Similar results were obtained when we examined *in vivo* the interaction of CK2 with HA-tagged CDC25B1 and B2 (data not shown). Thus, the results obtained either in *Sf9* insect cells or in mammalian U<sub>2</sub>OS cells demonstrate unambiguously that *in vivo* CDC25B phosphatase and CK2 kinase ( $\alpha_2\beta_2$ ) are able to form a complex.



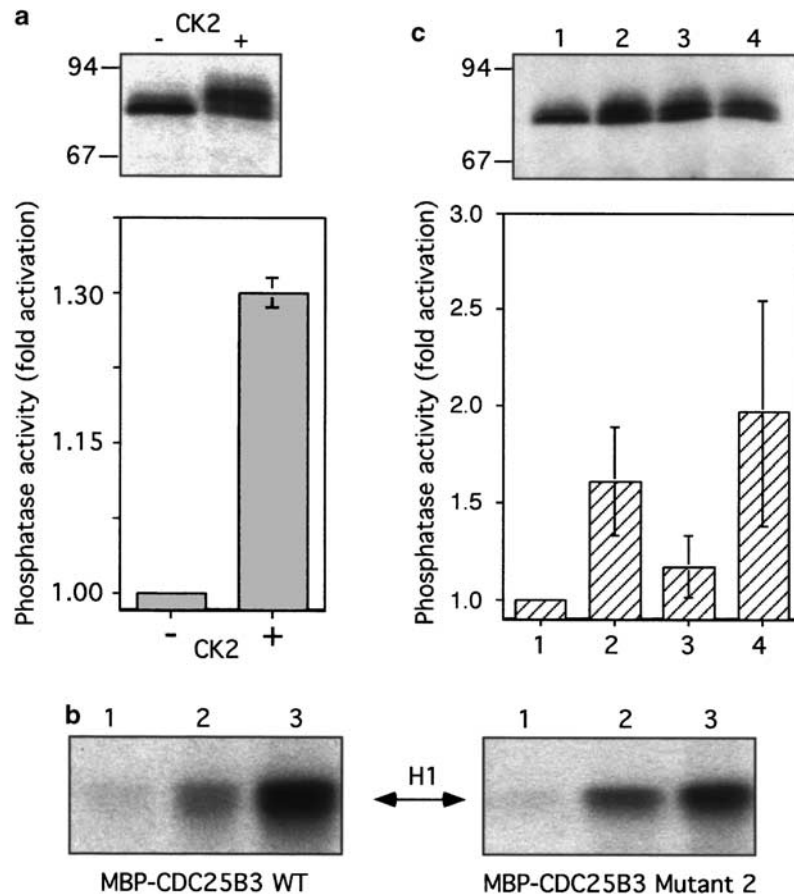
**Figure 5** CDC25B and CK2 co-immunoprecipitate *in vivo*. **(a)** Interaction in *Sf9* insect cells. Left panel: Total cellular extract (30  $\mu$ g) of noninfected cells (1) or cells infected with recombinant baculoviruses coding for CDC25B3 (2), CDC25B3 and CK2 $\alpha$  (3), CDC25B3 and CK2 $\beta$  (4), CDC25B3 and CK2 $\alpha/\beta$  (5). Right panel: 2.5 mg of total protein lysate were subjected to an immunoprecipitation with a polyclonal antibody raised against CK2 $\alpha$ . In both panels, samples were separated by electrophoresis, transferred to nitrocellulose and analysed by Western-blot with a polyclonal antibody anti-CDC25B (upper part), monoclonal antibody anti-CK2 $\alpha$  (middle part) and monoclonal antibody anti-CK2 $\beta$  (lower part). **(b)** Exponentially growing U<sub>2</sub>OS tTA cells, stably transfected with HA-CDC25B3 (2,3) or not (1), were maintained in the presence of tetracycline (2) or not (3) for 30 h. Cells were lysed, 100  $\mu$ g of total proteins (left panel) or immunoprecipitates with an anti-CK2 $\alpha$  (4 mg) were separated by electrophoresis and analysed by Western-blot using anti-HA antibodies (right part) or anti-CK2 $\alpha$  and  $\beta$  antibodies. The asterisk indicates a nonspecific protein recognized by the anti-C-terminus CDC25B antibody in U<sub>2</sub>OS tTA cells

### CK2 upregulates CDC25B phosphatase activity *in vitro*, and *in vivo*

The final question we addressed was obviously to investigate the consequences of this phosphorylation/association. We therefore examined whether CK2 modulated the intrinsic phosphatase activity of CDC25B *in vitro*. <sup>35</sup>S-methionine-labelled *in vitro*-translated CDC25B3 was immunoprecipitated with an anti-CDC25B antibody, incubated or not with purified recombinant CK2, and then subjected to a phosphatase assay in the presence of an exogenous substrate, fluorescein diphosphate (FDP) (Rice *et al.*, 1997). As shown in Figure 6a, CDC25B phosphatase activity was moderately but reproducibly upregulated (average of 1.3-fold of activation) after incubation with recombinant CK2, and this increase in activity paralleled the phosphorylation level of CDC25B (Figure 6a). The activation of CDC25B after phosphorylation by CK2 was also measured on a more physiological substrate: CDK1/Cyclin B by monitoring the variation of the histone H1 kinase activity. As shown in Figure 6b, when CDK1/Cyclin B was incubated together with MBP-CDC25B3 phosphorylated by CK2 (lane 3), a 2.4-fold increase in the histone H1 kinase activity was

observed, in comparison to its incubation with unphosphorylated MBP-CDC25B3 (lane 2). These results confirmed the activation of CDC25B3 after its phosphorylation by CK2 kinase and validated the data obtained with FDP as substrate. By contrast, no or a weak increase (1.4-fold) in CDK1/Cyc B kinase activity was observed when it was incubated together with MBP-CDC25B3 mutant 2 pretreated by CK2 (Figure 6b, right panel, lane 3). These results demonstrate that the phosphorylation of Ser-186 and Ser-187 residues by CK2 kinase on CDC25B is required to fully activate the phosphatase.

We then examined, *in vivo*, the activity of CDC25B phosphatase expressed together with CK2 kinase in *Sf9* insect cells (Figure 6c). Comparison of the phosphatase activity of CDC25B3, immunoprecipitated from simple (Figure 6c, lane 1) or double (Figure 6c, lanes 2 and 3) infections, demonstrated that the coexpression of either  $\alpha$  or  $\beta$  subunit with CDC25B increased its phosphatase activity by 1.61- and 1.17-fold, respectively. This increase correlated with the phosphorylation level of CDC25B, as shown by electrophoretic mobility shift observed in Western-blot analysis (upper panel of Figure 6c). The greater activation of CDC25B phosphatase activity observed in



**Figure 6** CK2 phosphorylation increases CDC25B phosphatase activity *in vitro* as well as *in vivo*. (a) *In vitro* phosphatase activity of CDC25B. <sup>35</sup>S-methionine *in vitro*-translated CDC25B3 was immunoprecipitated using an antipeptide antibody raised against the carboxy-terminus of CDC25B. The immunoprecipitates were incubated in kinase buffer with cold ATP in the absence (–) or presence (+) of recombinant purified CK2 for 30 min at 30°C. The samples were then subjected to phosphatase assay using FDP as substrate, as described in the materials and methods section. An aliquot of each sample was run on 8% SDS–PAGE and the autoradiography is presented. The phosphatase activity was quantified, normalized to CDC25B3 protein, and expressed as a fold of activation compared to the activity of CDC25B3 without CK2 kinase incubation. These results are representative of several independent experiments ( $m = 1.3 \pm 0.053$ ;  $P < 0.02$ ). (b) Phosphatase assay performed using CDK1/Cyclin B as substrate. Inactivated CDK1/Cyclin B, produced in etoposide-treated HeLa cells, was recovered on p13 beads and incubated with 10 ng of purified MBP-CDC25B3, wild type or mutant 2 (S186A/S187A/S188G), phosphorylated or not by CK2. The activity of CDC25B was monitored by determination of the histone H1 kinase activity. Lane 1: CDK1/Cyclin B, lane 2: CDK1/Cyclin B + MBP-CDC25B3, lane 3: CDK1/Cyclin B + MBP-CDC25B3 treated with 26 ng of CK2 kinase. (c) *Sf9* cells were infected with baculoviruses expressing CDC25B3 alone (1), CDC25B3 and CK2 $\alpha$  (2), CDC25B3 and CK2 $\beta$  (3) or CDC25B3, CK2 $\alpha$  and CK2 $\beta$  (4). Cells were collected and lysates were subjected to an immunoprecipitation 30 h after infection using CDC25B antibodies. An aliquot of each sample was run on 8% SDS–PAGE then processed for CDC25B immunodetection. Phosphatase assay was performed using FDP as exogenous substrate. The activity was normalized to CDC25B3 quantity detected in Western-blot and expressed as a fold activation compared to CDC25B3 activity detected in the simple infection. These results are representative of four independent experiments

*Sf9* cells coinfecting with CDC25B and CK2 $\alpha$  in comparison to CDC25B/CK2 $\beta$  infection, could at first glance appear surprising. However, it has been shown that the  $\alpha$  subunit binds to the promoter of the CK2 $\beta$  subunit gene, thereby positively regulating it (Robitzki *et al.*, 1993). When  $\alpha$  and  $\beta$  subunits were expressed simultaneously with CDC25B3 a two-fold increase was observed (Figure 6c, lane 4). These results, combined with the *in vitro* results, clearly demonstrate that phosphorylation/association of CK2 kinase on CDC25B protein activates its phosphatase activity.

## Discussion

Unlike that of other members of the CDC25 phosphatase family, the role of CDC25B in G2/M progression has not yet been fully defined. It is generally accepted that CDC25B plays the role of a starter at the entry into mitosis (Karlsson *et al.*, 1999). On the other hand, the exact physiological role of CK2 kinase in cell cycle control is not clear. Most studies have demonstrated a requirement in the early stages of the cell cycle (Pepperkok *et al.*, 1994; Lorenz *et al.*, 1999), but it has also been shown that CK2 plays a role later in G2 and

M phases (Mulner-Lorillon *et al.*, 1988; Padmanabha *et al.*, 1990; Hanna *et al.*, 1995; Rethinaswamy *et al.*, 1998).

In this study, we have shown that, *in vitro*, CK2 kinase phosphorylates specifically one of the two CDC25 phosphatases implicated in the regulation of the G2/M transition. Despite the fact that multiple potential phosphorylation sites for CK2 are present in both proteins, only CDC25B is phosphorylated. Two CK2 phosphorylation site residues, Ser-186 and Ser-187, were identified by mass spectrometry analysis on CDC25B3 protein coexpressed or not *in vivo* with CK2 kinase. Both sites are located in the B domain, in the N-terminal regulatory moiety of the phosphatase. In the present work, we could not detect any differences in the phosphorylation rate of the three CDC25B variants by CK2, despite the fact that the B domain was missing in CDC25B2. A careful examination of the CDC25B2 sequence indicates that a new potential phosphorylation site for CK2 kinase is created (S<sup>151</sup>MPD) when the B domain is absent. To confirm this hypothesis, we also analysed by mass spectrometry the phosphorylation sites on CDC25B2 coexpressed with CK2. This analysis identified two phospho-serine residues, located in CK2 consensus sequence: Ser151 and Ser189 (in B2 nomenclature) (data not shown). Thus, the deletion of the B domain reconstitutes one phosphorylation site (S<sup>151</sup>MPD) and probably induces a conformational change in the structure of the N-terminal part of CDC25B that unmask an alternative phosphorylation site for the CK2 kinase (S<sup>189</sup>APD). To date, only the 3D structure of CDC25B catalytic domain is known (Reynolds *et al.*, 1999); thus, the clarification of this issue will have to await the resolution of the complete structure of the enzyme. Furthermore, the N-terminal regulating domain of CDC25B alone (including interaction and phosphorylation sites) is not phosphorylated by CK2, which confirms once again that the overall conformation of the protein is important for the regulation of its phosphorylation.

We then demonstrated, *in vitro* as well as *in vivo*, the existence of an interaction between CDC25B phosphatase and CK2 kinase. This interaction is mediated by the  $\beta$  regulatory subunit of CK2. Similar interactions with the  $\beta$  subunit have been reported for CK2-specific substrates: p53 (Filhol *et al.*, 1992), FGF2 (Bonnet *et al.*, 1996), DNA Topoisomerase II $\alpha$  (Leroy *et al.*, 1999), CD5 (Raman *et al.*, 1998), Nopp 140 (Li *et al.*, 1997a) and the p21 protein (a CDK inhibitor) (Gotz *et al.*, 2000; Romero-Oliva and Allende, 2001). It is clearly established that on binding to CK2 $\beta$ , CK2 $\alpha$  changes activity and substrate specificity. With respect to CDC25B phosphorylation, our results are in perfect agreement with this concept. The level of CDC25B phosphorylation increased threefold when the holoenzyme ( $\alpha_2\beta_2$ ) was used. Thus, the binding of CDC25B to CK2 $\beta$  is a strong element, which demonstrates that CDC25B is a specific substrate for CK2 kinase. Using truncated constructs of CK2 $\beta$ , a region corresponding to the N-terminal part of the  $\beta$  subunit (amino acids 1–55) was defined as being responsible for CDC25B

binding. It is interesting to note that different regions of the CK2 $\beta$  molecule are involved in substrate interactions. For p53, the binding region includes the sequence between amino acids 71–149, in the case of DNA Topoisomerase II $\alpha$  a central region (amino acids 51–110) was implicated and for Nopp 140, the first N-terminal 20 amino acids. This diversity of docking sites on CK2 $\beta$ , which differ from the catalytic centre of the enzyme, may represent a mechanism by means of which the enzyme increases its selectivity for protein substrates (Schulman *et al.*, 1998; Chantalat *et al.*, 1999). We also demonstrated that the region encompassing amino acids 123–200 of CDC25B contains the binding site for CK2 $\beta$ . Moreover, we can speculate that the interacting domain is restricted to the region between amino acids 123 and 153, a common region in the three CDC25B variants. We cannot exclude that a direct, but weak and transient, interaction with CK2 $\alpha$  occurs, even if, *in vitro*, no interaction between CDC25B and CK2 $\alpha$  was detected.

Finally, we have shown that when CDC25B is phosphorylated by CK2, its intrinsic phosphatase activity is increased *in vitro* as well as *in vivo*, when both enzymes are coexpressed. This result is important, as this is the first identification of a positive regulator of CDC25B phosphatase activity. The activation level of CDC25B may appear weak, with approximately twofold increase, but it could be sufficient to modulate correctly the CDC25B activity towards specific substrates. Indeed, using human recombinant CDC25B and CDC25C, we have shown that CDC25B phosphatase activity is already very high compared to the native CDC25C phosphatase activity, and similar to the maximal level that is reached upon CDC25C activation by CDK1/Cyclin B (Baldin *et al.*, 2002). We can also speculate that the phosphorylation of CDC25B by CK2 and/or the interaction between the two proteins may affect other properties of CDC25B such as the interaction with a particular substrate or its subcellular distribution.

In the light of the results presented here, we propose a working model in which a subpopulation of CDC25B associates with CK2 kinase and is phosphorylated, resulting in the upregulation of its catalytic activity. In turn, this pool of activated CDC25B may catalyse the activation of CDK1/Cyclin B. However, it is important to bear in mind that CDC25B could be implicated in other mechanisms controlling the entrance into mitosis and which still remain to be identified.

#### Acknowledgments

We thank JM Blanchard, JM Darbon and J Smith for comments on the manuscript and Euralis Génétique for technical assistance. This work was supported by the CNRS, l'Université Paul Sabatier, la Fondation pour la Recherche Médicale (FRM), le pôle ARECA-Protéomique Cancer et la Ligue Nationale contre le Cancer. NT-F was supported by a MENRT fellowship.

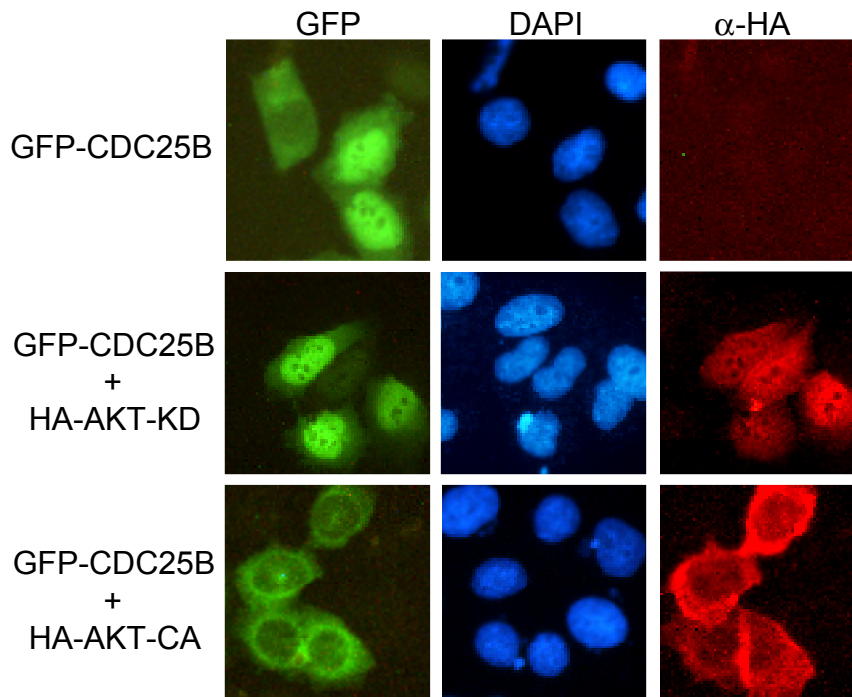
References

- Allende JE and Allende CC. (1995). *FASEB J.*, **9**, 313–323.
- Baldin V. (2000). *Progress in Cell Cycle Research*. Meijer L, Jézéquel A, Ducommun B. (ed). Plenum Press: New York, USA, pp. 49–60.
- Baldin V, Cans C, Knibiehler M and Ducommun B. (1997a). *J. Biol. Chem.*, **272**, 32731–32735.
- Baldin V, Cans C, Superti-Furga G and Ducommun B. (1997b). *Oncogene*, **14**, 2485–2495.
- Baldin V, Lukas J, Marcote MJ, Pagano M and Draetta G. (1993). *Genes & Dev.*, **7**, 812–821.
- Baldin V, Pospelov K, Cazales M, Cans C and Ducommun B. (2002). *J. Biol. Chem.*, **277**, 9.
- Bidwai AP, Hanna DE and Glover CV. (1992). *J. Biol. Chem.*, **267**, 18790–18796.
- Biemann K. (1990). *Methods Enzymol.*, **193**, 886–887.
- Blomberg I and Hoffmann I. (1999). *Mol. Cell. Biol.*, **19**, 6183–6194.
- Bonnet H, Filhol O, Truchet I, Brethenou P, Cochet C, Amalric F and Bouche G. (1996). *J. Biol. Chem.*, **271**, 24781–24787.
- Bosc DG, Slominski E, Sichler C and Litchfield DW. (1995). *J. Biol. Chem.*, **270**, 25872–25878.
- Cans C, Sert V, Derycke J, Baldin V and Ducommun B. (1999). *AntiCancer Research*, **19**, 1241–1244.
- Chantalat L, Leroy D, Filhol O, Nueda A, Benitez MJ, Chambaz EM, Cochet C and Dideberg O. (1999). *Embo J.*, **18**, 2930–2940.
- Dalal SN, Schweitzer CM and DeCaprio JA. (1999). *Mol. Cell. Biol.*, **19**, 4465–4479.
- Davezac N, Ducommun B and Baldin V. (2000). *Pathol. Biol.*, **48**, 182–189.
- Eng J, McCormack AL and Yates JR. (1994). *Am. Soc. Mass Spectrom.*, **5**, 976–989.
- Escargueil AE, Plisov SY, Filhol O, Cochet C and Larsen AK. (2000). *J. Biol. Chem.*, **275**, 34710–34718.
- Falck J, Mailand N, Syljuasen RG, Bartek J and Lukas J. (2001). *Nature*, **410**, 842–847.
- Filhol O, Baudier J, Delphin C, Loue-Mackenbach P, Chambaz EM and Cochet C. (1992). *J. Biol. Chem.*, **267**, 20577–20583.
- Filhol O, Cochet C, Loue-Mackenbach P and Chambaz EM. (1994). *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **198**, 660–665.
- Filhol O, Cochet C, Wedegaertner P, Gill GN and Chambaz EM. (1991). *Biochemistry*, **30**, 11133–11140.
- Filhol-Cochet O, Loue-Mackenbach P, Cochet C and Chambaz EM. (1994). *Cell. Mol. Biol. Res.*, **40**, 529–537.
- Ford HL, Landesman-Bollag E, Dacwag CS, Stukenberg PT, Pardee AB and Seldin DC. (2000). *J. Biol. Chem.*, **275**, 22245–22254.
- Forrest AR, McCormack AK, DeSouza CP, Sinnamon JM, Tonks ID, Hayward NK, Ellem KA and Gabrielli BG. (1999). *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **260**, 510–515.
- Gabrielli BG, De Souza CPC, Tonks ID, Clarck JM, Hatward NK and Ellem KAO. (1996). *J. Cell. Sci.*, **109**, 1081–1093.
- Galaktionov K and Beach D. (1991). *Cell*, **67**, 1181–1194.
- Garner-Hamrick PA and Fisher C. (1998). *Int. J. Cancer*, **76**, 720–728.
- Gotz C, Kartarius S, Scholtes P and Montenarh M. (2000). *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **268**, 882–885.
- Graves PR, Lovly CM, Uy GL and Piwnica-Worms H. (2001). *Oncogene*, **20**, 1839–1851.
- Hanna DE, Rethinaswamy A and Glover CVC. (1995). *J. Biol. Chem.*, **270**, 25905–25914.
- Heriche JK, Lebrin F, Rabilloud T, Leroy D, Chambaz EM and Golberg Y. (1997). *Science*, **276**, 952–955.
- Hoffmann I, Clarke P, Marcote MJ, Karsenti E and Draetta G. (1993). *EMBO J.*, **12**, 53–63.
- Hoffmann I, Draetta GF and Karsenti E. (1994). *EMBO J.*, **13**, 4302–4310.
- Jinno S, Suto K, Nagata A, Igashari M, Kanaoka Y, Nojima H and Okayama H. (1994). *EMBO J.*, **13**, 1549–1556.
- Karlsson C, Katich S, Hagting A, Hoffmann I and Pines J. (1999). *J. Cell. Biol.*, **146**, 573–584.
- Lammer C, Wagerer S, Saffrich R, Mertens D, Ansorge W and Hoffman I. (1998). *J. Cell Sci.*, **111**, 2445–2453.
- Leroy D, Alghisi GC, Roberts E, Filhol-Cochet O and Gasser SM. (1999). *Mol. Cell. Biochem.*, **191**, 85–95.
- Li D, Dobrowolska G, Aicher LD, Chen M, Wright JH, Druceckes P, Dunphy EL and Munar ES. (1999). *J. Biol. Chem.*, **274**, 32988–32996.
- Li D, Meier UT, Dobrowolska G and Krebs EG. (1997a). *J. Biol. Chem.*, **272**, 3773–3779.
- Li J, Meyer AN and Donoghue DJ. (1997b). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 502–507.
- Lin WJ, Tuazon PT and Traugh JA. (1991). *J. Biol. Chem.*, **266**, 5664–5669.
- Litchfield DW, Luscher B, Lozeman FJ, Eisenman RN and Krebs EG. (1992). *J. Biol. Chem.*, **267**, 13943–13951.
- Lorenz P, Ackermann K, Simoes-Wuest P and Pyerin W. (1999). *FEBS Lett.*, **448**, 283–288.
- Mann M, Hendrickson RC and Pandey A. (2001). *Annu. Rev. Biochem.*, **70**, 437–473.
- Matsuoka S, Huang M and Elledge SJ. (1998). *Science*, **282**, 1893–1897.
- McLachlin DT and Chait BT. (2001). *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **5**, 591–602.
- Mils V, Baldin V, Goubin F, Pinta I, Papin C, Waye M, Eychene A and Ducommun B. (2000). *Oncogene*, **19**, 1257–1265.
- Mulner-Lorillon O, Marot J, Cayla X, Pouhle R and Belle R. (1988). *Eur. J. Biochem.*, **171**, 107–117.
- Muslin AJ, Tanner JW, Allen PM and Shaw AS. (1996). *Cell*, **84**, 889–897.
- Nagata A, Igarashi M, Jinno S, Suto K and Okayama H. (1991). *New Biologist*, **3**, 959–968.
- Nambirajan S, Radha V, Kamatkar S and Swarup G. (2000). *J. Biosci.*, **25**, 33–40.
- Nastainczyk W, Schmidt-Spaniol I, Boldyreff B and Issinger OG. (1995). *Hybridoma*, **14**, 335–339.
- Padmanabha R, Chen-Wu JL, Hanna DE and Glover CV. (1990). *Mol. Cell. Biol.*, **10**, 4089–4099.
- Peng CY, Graves PR, Ogg S, Thoma RS, Byrnes 3rd MJ, Wu Z, Stephenson MT and Piwnica-Worms H. (1998). *Cell Growth Differ.*, **9**, 197–208.
- Pepperkok R, Lorenz P, Ansorge W and Pyerin W. (1994). *J. Biol. Chem.*, **269**, 6986–6991.
- Pinna LA, Meggio F. (1997). *Progress in Cell Cycle Research*. Meijer, L., Guidet, S. and Philippe, M. (eds). Plenum Press: New York, USA, pp. 77–98.
- Raman C, Kuo A, Deshane J, Litchfield DW and Kimberly RP. (1998). *J. Biol. Chem.*, **273**, 19183–19189.
- Rethinaswamy A, Birnbaum M and Glover CVC. (1998). *J. Biol. Chem.*, **273**, 5869–5877.
- Reynolds RA, Yem AW, Wolfe CL, Deibel Jr MR, Chidester CG and Watenpaugh KD. (1999). *J. Mol. Biol.*, **293**, 559–568.

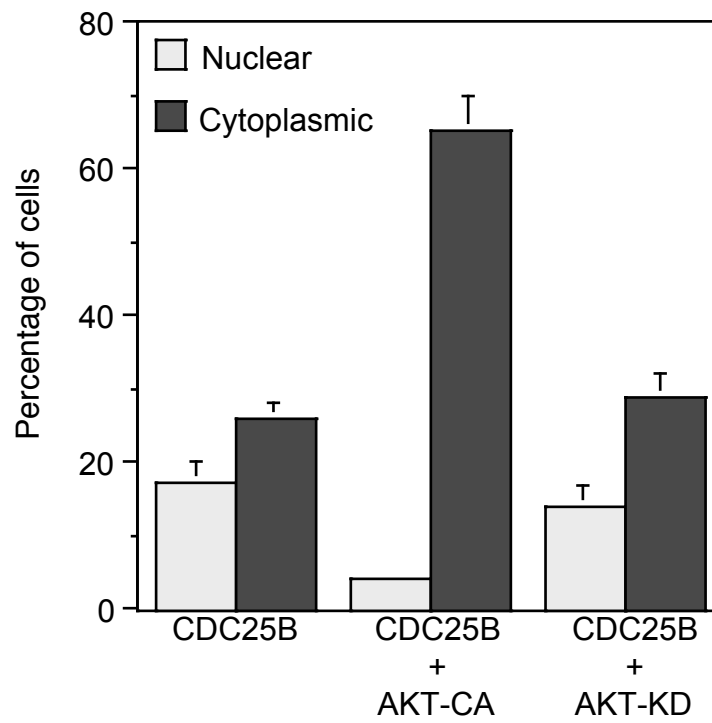


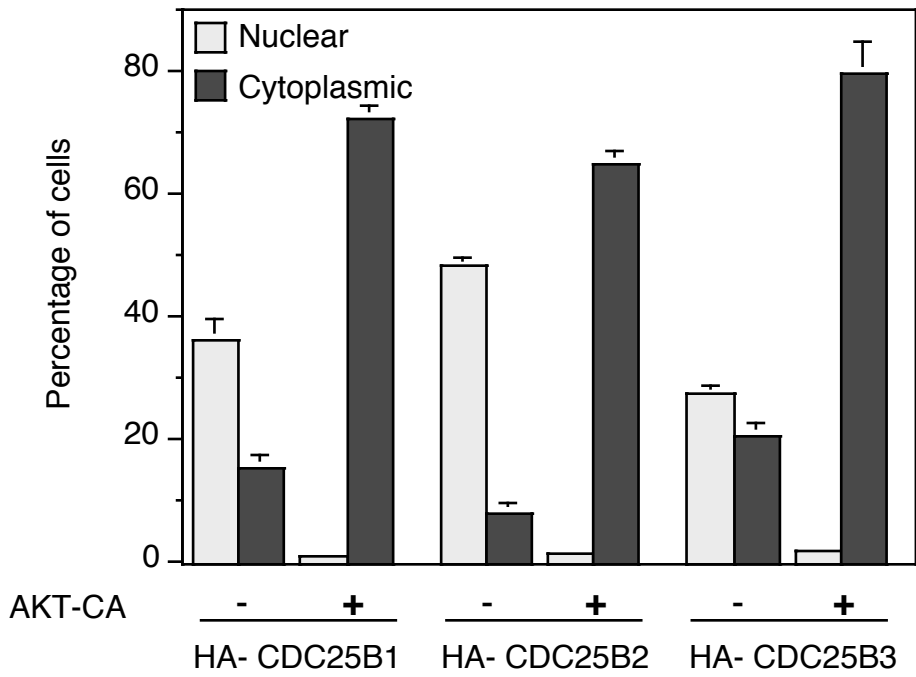
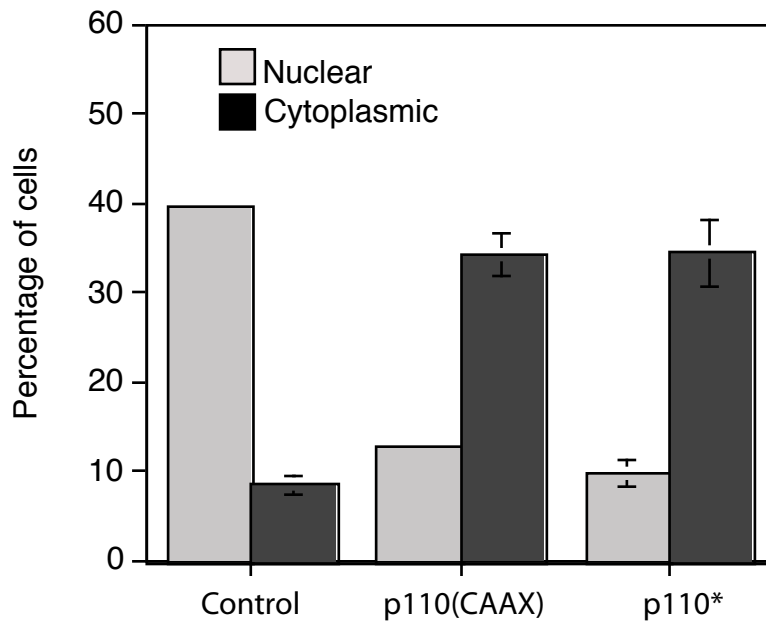
- Rice R, Rusnak JM, Yokokawa F, Yokokawa S, Messner DJ, Boynton AL, Wipf P and Lazo JS. (1997). *Biochemistry*, **36**, 15965–15974.
- Robitzki A, Bodenbach L, Voss H and Pyerin W. (1993). *J. Biol. Chem.*, **268**, 5694–5702.
- Romero-Oliva F and Allende JE. (2001). *J. Cell. Biochem.*, **81**, 445–452.
- Roshak AK, Capper EA, Imburgia C, Fornwald J, Scott G and Marshall LA. (2000). *Cell. Signal*, **12**, 405–411.
- Russo GL, Vandenberg MT, Yu IJ, Bae YS, Franza Jr BR and Marshak DR. (1992). *J. Biol. Chem.*, **267**, 20317–20325.
- Sadhu K, Reed SI, Richardson H and Russell P. (1990). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**, 5139–5143.
- Sanchez Y, Wong C, Thoma RS, Richman R, Wu Z, Piwnicka-Worms H and Elledge SJ. (1997). *Science*, **277**, 1497–1501.
- Schulman BA, Lindstrom DL and Harlow E. (1998). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 10453–10458.
- Smith D and Johnson K. (1988). *Gene*, **67**, 31–40.
- Snell V and Nurse P. (1994). *EMBO J.*, **13**, 2066–2074.
- Wilm M, Shevchenko A, Houthaeve T, Breit S, Schweigerer L, Fotsis T and Mann M. (1996). *Nature*, **379**, 466–469.
- Zandomeni R, Carrera-Zandomeni M, Shugar D and Weinmann R. (1986). *J. Biol. Chem.*, **261**, 3414–3419.

A

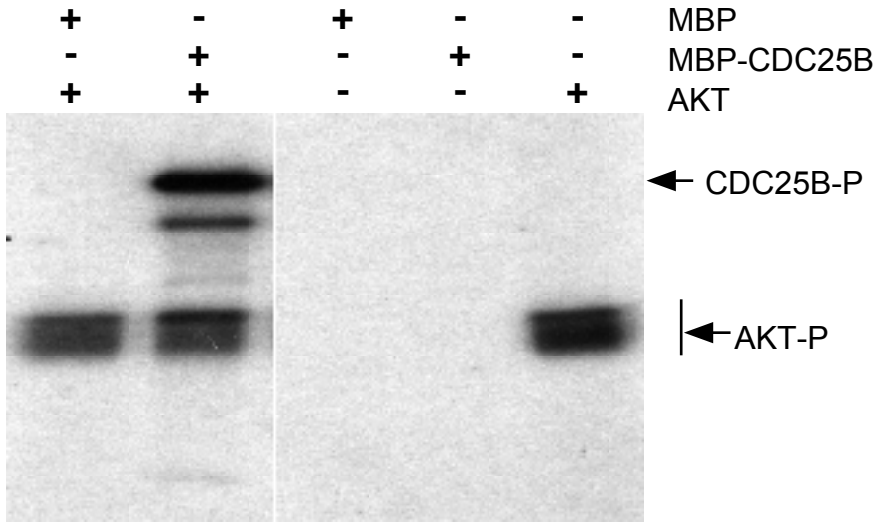


B

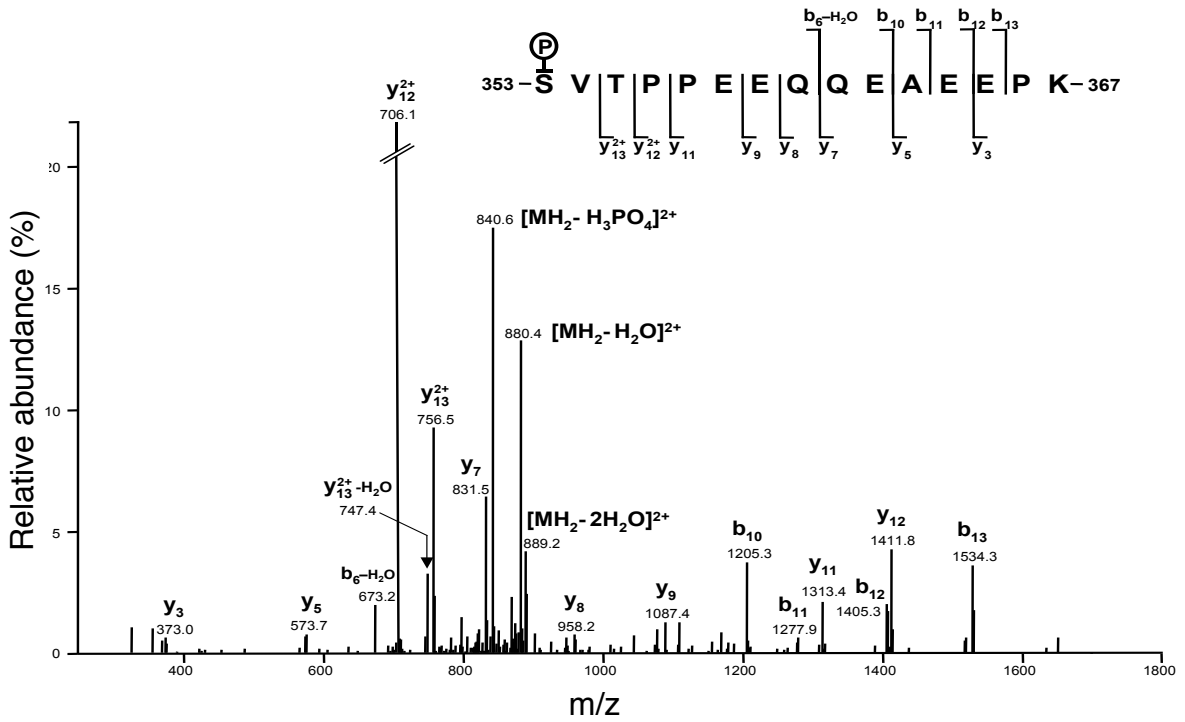


**C****D**

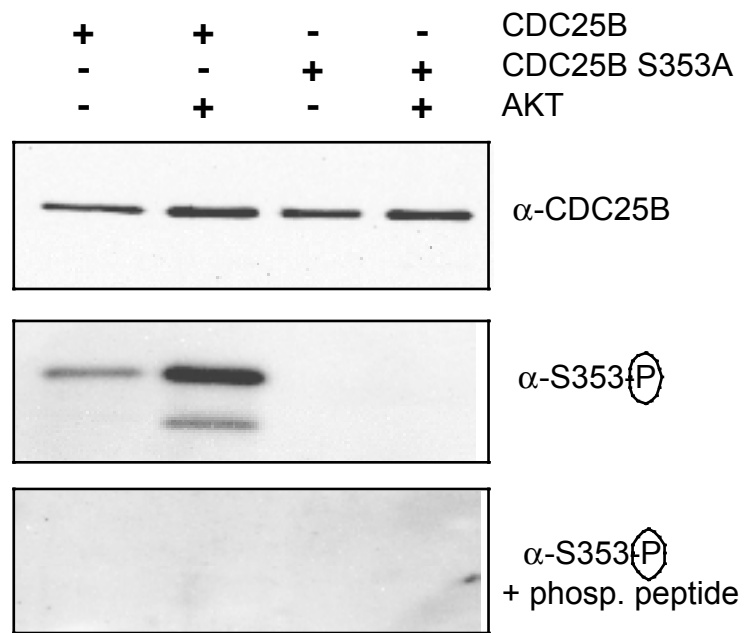
**A**



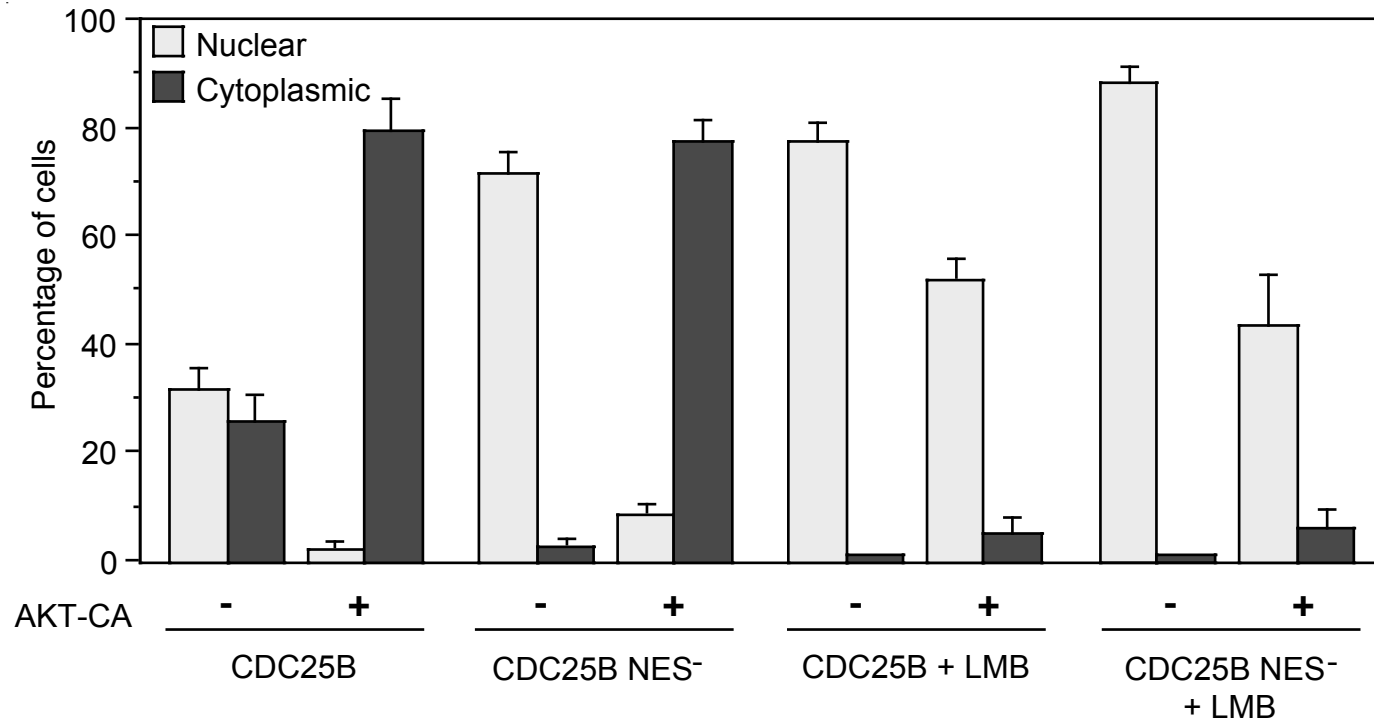
**B**



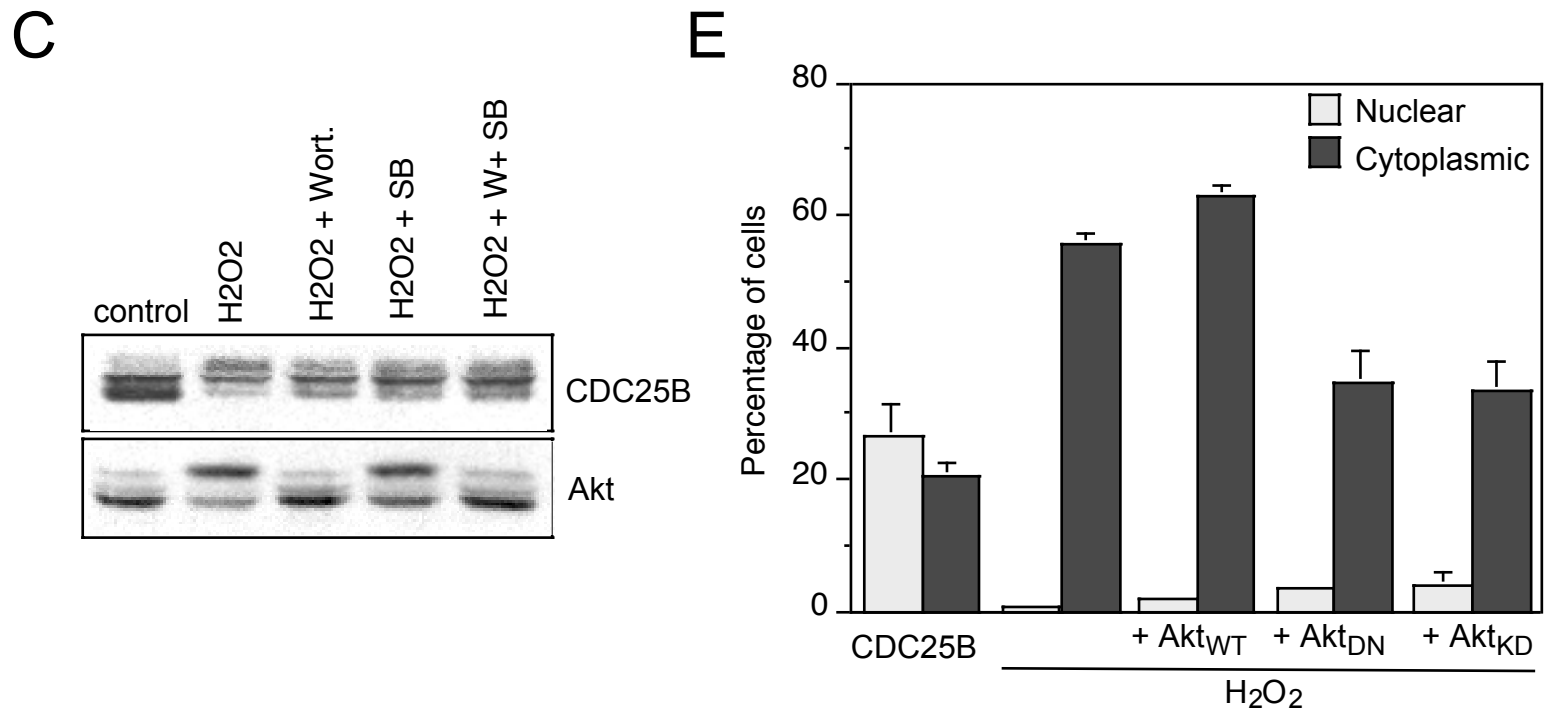
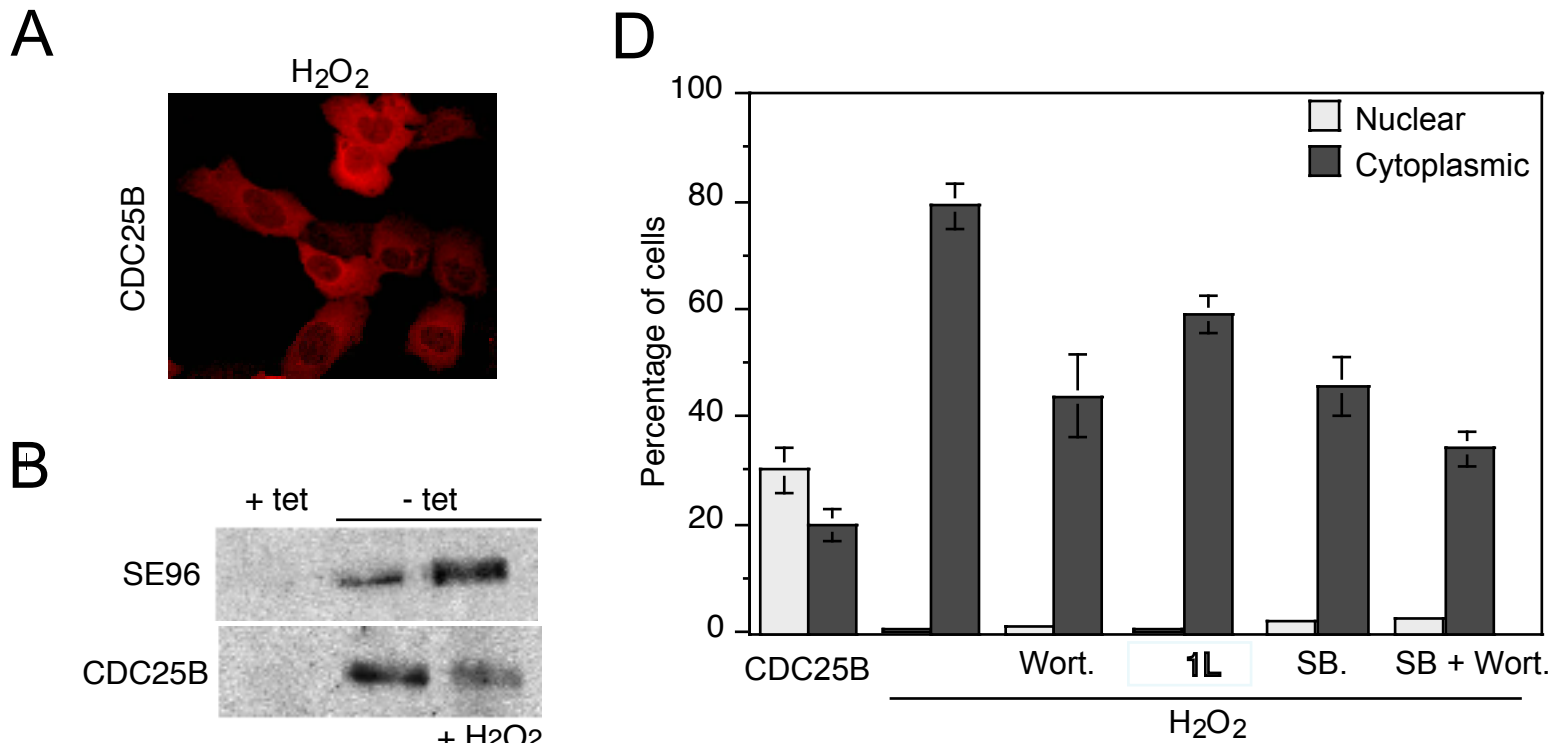
C

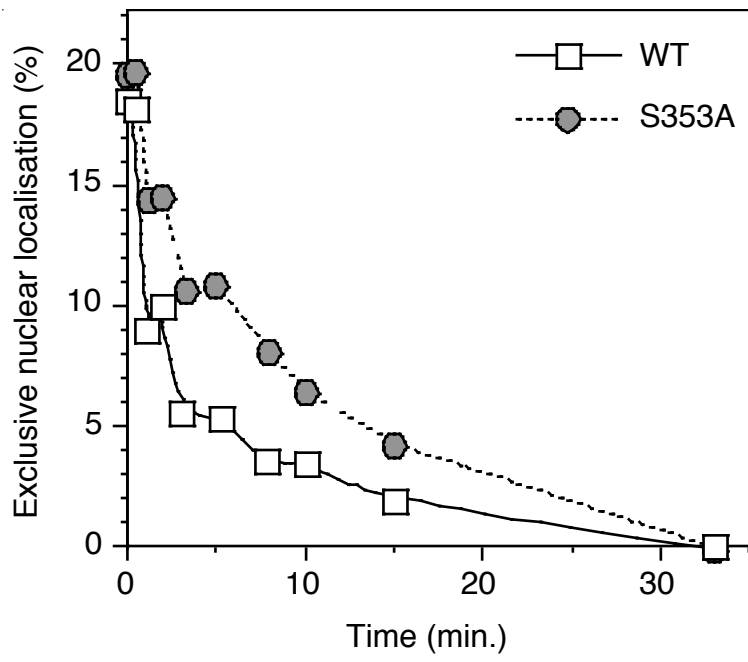


Baldin et al. Fig. 2C



*Baldin et al. Fig.3*





*Baldin et al. Fig. 5*