



Mise en evidence et caractérisation d'une interaction fonctionnelle entre la kinase Aurora-A et la phosphatase PP2A

Virginie Horn

► To cite this version:

Virginie Horn. Mise en evidence et caractérisation d'une interaction fonctionnelle entre la kinase Aurora-A et la phosphatase PP2A. Biologie cellulaire. Université Joseph-Fourier - Grenoble I, 2005. Français. NNT: . tel-00138435

HAL Id: tel-00138435

<https://theses.hal.science/tel-00138435>

Submitted on 26 Mar 2007

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.

THESE PRESENTEE PAR

Virginie HORN

EN VUE DE L'OBTENTION DU TITRE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITE
JOSEPH FOURIER-GRENOBLE 1

(arrêtés ministériels du 5 juillet 1984 et du 30 mars 1992)

Spécialité : BIOLOGIE

**MISE EN EVIDENCE ET CARACTERISATION D'UNE
INTERACTION FONCTIONNELLE ENTRE LA KINASE
AURORA-A ET LA PHOSPHATASE PP2A**

MEMBRES du jury :

Madame Danielle Dhouailly, Professeur	Présidente
Monsieur Alphonse Garcia, Directeur de recherche	Rapporteur
Monsieur Claude Prigent, Directeur de recherche	Rapporteur
Monsieur Stefan Dimitrov, Directeur de recherche	Examinateur
Monsieur Jérôme Lacoste, maître de conférence	Examinateur
Monsieur Jean Viallet, maître de conférence	Codirecteur de thèse
Monsieur Marc Block, Professeur	Directeur de thèse

Thèse préparée au sein du Laboratoire d'Etude de la Différenciation et de l'Adhérence Cellulaire, UMR 5538, Institut Albert Bonniot.

REMERCIEMENTS

Je remercie très chaleureusement le Professeur Marc Block et le Docteur Jean Viallet de m'avoir accueillie dans leurs laboratoire et équipe. Merci à vous de m'avoir fait confiance et offert la possibilité de réaliser ce travail. Merci pour vos enseignements, pour nos discussions. Je vous remercie d'avoir partager avec moi vos qualités humaines et scientifiques pendant ces quelques années. Grâce à vous, mon attrait pour la recherche s'est affirmé au cours du temps.

Je remercie très cordialement le Professeur Danielle Dhouailly d'avoir examiné mon travail et présidé le jury de cette thèse.

Je remercie chaleureusement le Docteur Alphonse Garcia d'avoir accepté d'être rapporteur de cette thèse. Merci pour votre lecture attentive et concernée de ce travail, pour nos discussions très instructives et constructives. Je vous remercie enfin pour votre sympathie lors de nos conversations.

Je remercie très cordialement le Docteur Claude Prigent de m'avoir fait l'honneur d'être rapporteur de ce travail. Merci pour le temps et le travail que vous y avez consacré et pour toutes les suggestions que vous m'avez faites.

Je remercie très respectueusement le Docteur Stefan Dimitrov qui a accepté d'examiner ce travail. Merci pour vos remarques, vos conseils et la bienveillance que vous avez manifesté à cette occasion.

Je remercie avec émotion le Docteur Jérôme Lacoste d'avoir toujours été là depuis mes premiers pas dans le recherche jusqu'à ce jour. Merci pour le temps consacré l'examen de ce travail et pour la qualité de ses enseignements depuis des années.

Je remercie tous les membres du laboratoire pour leur gentillesse, leur gaieté, leur dynamisme et pour m'avoir aidée lorsque j'en avais besoin. Les goûters d'anniversaires et autres festivités vont eux aussi me manquer !

Je remercie mes camarades de paillasse et de bureau: Frédéric (mon L.), Dave, Ying, Daniel, Patricia, Geneviève, Nicolas et Cédric. Je mesure toute la chance que j'ai eue de pouvoir partager ces quelques années avec vous tous. Je regretterais nos moments de complicité et nos rires, nos discussions, le café gentiment offert avec un délicieux accent anglais, mon quart d'heure d'astrologie hebdomadaire et la bibliothèque ! Vous allez tous beaucoup me manquer.

Je te remercie ma Lulu pour m'avoir fait partager tant de choses de ta vie et offert le meilleur de toi-même depuis presque six ans maintenant. Je te souhaite le meilleur et plus encore pour la suite ... une belle vie en mauve !!!

Merci à toi MK. Ton plus grand enseignement et celui-ci : « Vouloir Pouvoir Oser se Taire pour ... » : acceptes ces mots comme de longs silences. Tu m'as fait découvrir tant de choses dont je ne pouvais même pas imaginer l'existence. Tu m'as offert les choses les plus précieuses et montrer tant de merveilles. Merci d'être MK, merci d'être toujours un peu avec moi, où que je sois ...

Merci à mes adorables et aimants Grands-Parents qui prenaient toujours le temps pour une ballade « éducative » : cueillette de champignons, observations de la faune et de la flore etc. Grâce à vous, la nature et son étude m'évoquent toujours un doux parfum d'enfance.

Merci à mes chers parents, Pierre et Evelyne, sans qui je ne pourrais pas écrire ces remerciements aujourd'hui ! Vous avez toujours respecté et encouragé mes choix. Avec toute votre tendresse et votre affection, vous m'avez toujours fait confiance. Vous avez su être présents et discrets, comprendre et partager mes joies et mes peines. J'ai réalisé bien des rêves grâce à vous, dont celui-ci. Le métier de parent est bien long et difficile : parfois ingrat. Vous excellez tous deux dans ce domaine depuis 29 ans.

à Evelyne et Pierre

à MK

RESUME

Le déroulement de la mitose est très étroitement contrôlé par une succession de réactions enzymatiques en particulier, celles catalysées par de nombreuses protéines kinases et phosphatases. Plus précisément, la sérine/thréonine kinase mitotique Aurora-A est essentielle à ces processus car elle participe à la régulation de la transition G2/M, du cycle des centrosomes, du fuseau mitotique et de la ségrégation des centrosomes. Aurora-A est activée grâce à son interaction avec d'autres protéines telles que TPX2 et AJUBA et son activité kinase est modulée par la phosphorylation de sites spécifiques. Par ailleurs, il a été récemment montré *in vitro* que la dégradation de Aurora-A par la voie du protéasome est induite par la déphosphorylation d'un résidu très conservé : la sérine 51. Ceci suggère qu'une phosphatase induit la protéolyse de Aurora-A par déphosphorylation du résidu S51. Dans cette étude, nous avons montré que la phosphatase PP2A et la kinase Aurora-A sont co-localisées dans les centrosomes des cellules mammifères et interagissent au sein d'un même complexe. De plus, l'inhibition pharmacologique de l'activité de PP2A ou l'inhibition de son expression conduisent à stabiliser Aurora-A *in vivo*. Ces résultats indiquent que PP2A contrôle la dégradation de Aurora-A *in vivo*. Enfin, Nous avons confirmé *in vivo* dans des cellules mammifères que la phosphorylation du résidu S51 protège Aurora-A de la dégradation.

Mitosis progression is tightly controlled by a succession of enzymatic reactions, including those catalyzed by numerous protein kinases and phosphatases. More specifically, the mitotic serine/threonine kinase Aurora-A is required in these processes as it is involved in the regulation of the G2/M transition, centrosome cycle, mitotic spindle and chromosomes segregation. Aurora-A is activated by interacting with other proteins such as TPX2 or AJUBA and its kinase activity is modulated by the phosphorylation at specific sites. Besides, it has been recently shown *in vitro* that Aurora-A degradation by the proteasome pathway is induced by the dephosphorylation of a highly conserved residue: serine 51. In this study, we have shown that the phosphatase PP2A and the kinase Aurora-A are co-localized in centrosomes and are interacting within the same complex. Moreover, the pharmacological inhibition of PP2A activity or the inhibition of its expression both led to Aurora-A stabilization *in vivo*. These results indicate that PP2A controls Aurora-A degradation *in vivo*. Finally, we confirmed *in vivo* in mammalian cells that phosphorylation of the S51 residue prevents the degradation of Aurora-A.

SOMMAIRE

INTRODUCTION _____ iv

Chapitre 1 : Le cycle cellulaire, la mitose et leurs régulateurs majeurs	1
I Le renouvellement et la prolifération cellulaire chez les eucaryotes	1
II Les différentes étapes du cycle cellulaire	2
II.1 Les phases du cycle :	2
III Les régulateurs majeurs du cycle cellulaires	3
III.1 Les Cyclines :	3
III.2 Les Kinases Dépendantes des Cyclines :	5
III.3 La famille des protéines du rétinoblastome :	6
III.4 La famille des inhibiteurs KIP/CIP :	7
III. 5 La famille des inhibiteurs INK4 :	8
III. 6 La protéolyse et la régulation du cycle cellulaire :	9
IV Les transitions de l'interphase et les points de contrôle du cycle	11
IV.1 La transition G0/G1 :	11
IV.2 La progression en G1 et la transition G1/S:	12
IV. 3 La transition G2/M :	14
IV.4 Les points de contrôle du cycle cellulaire :	16
V La mitose	17
V.1 Caractéristiques générales :	17
V.2 Les protéine kinases de type polo (Plks) :	20
V.3 Les protéine kinases NIMA :	22
V.4 Les protéine kinases Aurora :	25
V.5 Aurora-B :	27
V.6 Aurora-C :	29
Chapitre 2 : La protéine kinase Aurora-A : Nature et fonction d'un oncogène	30
I Régulation de l'expression Aurora-A	30
II Profil d'expression et localisation subcellulaire :	31
III Régulation de Aurora-A :	32
III.1 Activation de la protéine par TPX2 :	32
III.2 Inhibition de Aurora-A par PP1 et activation par l'inhibiteur de phosphatase I-2:	34
III.3 Inhibition de Aurora-A par p53 :	34
III.4 Aurora-A et Ajuba :	35
III.5 Régulation de la dégradation Aurora-A :	36
IV Fonctions de Aurora-A au cours de la mitose	37
IV.1 Aurora-A et le cycle des centrosomes :	37

IV.2 Régulation de l'activité de Aurora-A et assemblage du fuseau :	39
IV.3 Aurora-A et la transition G2/M :	40
IV.4 Aurora-A et le déroulement de la mitose :	40
Chapitre 3 : Les protéine phosphatases PP2A	42
I Les familles de protéine phosphatases :	42
II Structure des protéine phosphatases de la famille PP2A	42
II.1 La sous unité catalytique de PP2A :	43
II.2 La sous unité structurale PR65/A :	44
II.3 Les sous unités régulatrices :	45
III Régulation de l'activité de PP2A : relation entre structure et fonction	49
III.1 Régulation par les composants de l'enzyme :	49
III.2 Régulation par des modifications post-traductionnelles :	49
III.3 Régulation par des inhibiteurs cellulaires :	50
III.4 Inhibition de PP2A par des toxines:	51
III.5 Inhibition de PP2A par ARN interférentiel:	53
IV PP2A et la regulation du cycle cellulaire	53
IV.1 PP2A et la transition G1/S :	54
IV.2 PP2A et la transition G2/M :	54
IV.3 Rôles de PP2A au cours de la mitose :	57
Chapitre 4 : Rôles des protéines aurora-a et pp2a dans l'oncogenèse	59
I Aurora-A une protéine oncogénique	59
II PP2A : un « supresseur de tumeur »	60
OBJECTIFS	62
RESULTATS	63
INTRODUCTION ET PROBLEMATIQUE DES RESULTATS PRESENTES	64
CONCLUSION GENERALE ET DISCUSSION	65
RESULTATS COMPLEMENTAIRES ET PERSPECTIVES	67
L'interaction de PP2A avec Aurora-A ne semble pas être requise pour la maturation des centrosomes	67
PP2A et la formation d'une plaque métaphasique fonctionnelle	68
Relocalisation de PP2AC dans le corps intermédiaire	70
La surexpression de Aurora-A dans les cellules IEC induit l'apparition d'une morphologie originale	71
ANNEXE 1	75
Test de prolifération cellulaire	75
ANNEXE 2	76
Première publication de thèse :	76
BIBLIOGRAPHIE	77

TABLES DES FIGURES

<i>Figure 1 : Première étapes de l'actiavtion des Cyclines Dépendantes des Kinase .</i>	6
<i>Figure 2 : Mode d'action des substrats et ligands des CDKs.</i>	9
<i>Figure 3 : Voies d'activation du protéasome et protéolyse dépendante de l' ubiquitine au cours du cycle cellulaire.</i>	10
<i>Figure 4 : La transition G0/G1 assure l'activation de la transcription des gènes essentiels au cycle cellulaire</i>	11
<i>Figure 5 : La transition G1/S assure la formation du complexe CDK2/Cycline A</i>	13
<i>Figure 6 : La transition G2/M et les mécanismes conduisant à l'activation du complexe régulateur majeur de la mitose CDK1/CyclineB.</i>	15
<i>Figure 7: Machinerie de contrôle de l'état de l'ADN au cours du cycle cellulaire.</i>	16
<i>Figure 8 : Correspondance entre les évènements moléculaires et les changements morphologiques survenant au cours de la mitose.</i>	18
<i>Figure 9 : Rôles de la protéine kinase Plk1 au cours de la transition G2/M et pendant la mitose.</i>	22
<i>Figure 10 : Régulation de la dissociation des centrioles par la protéine kinase Nek2A.</i>	24
<i>Figure 11: Structures primaires des protéine kinases Aurora.</i>	26
<i>Figure 12: Modélisation des rôles de Aurora-B, PP1 et MCAK dans l'orientation des chromosomes métaphasique.</i>	28
<i>Figure 13: Modélisation de l'activation allostérique de Aurora-A par TPX2.</i>	33
<i>Figure 14 : Modélisation de l'activation de Aurora-A sur le fuseau.</i>	39
<i>Figure 15 : Modélisation des sites de liaison des différentes sous unités des holoenzymes PP2A.</i>	44
<i>Figure 16: Modélisation de la structure de PP2A</i>	48
<i>Figure 17 : Points de contrôle du cycle cellulaire impliquant les protéine phosphatases de la famille PP2A</i>	53
<i>Figure 18: Rôle de la protéine phosphatase PP2A dans la transition G2/M.</i>	56
<i>Figure 19 : Induction de l'oncogenèse par small-t via PP2A</i>	61
<i>Figure 20: Modélisation de la dégradation de Aurora-A.</i>	66
<i>Figure 21: Détection par immunofluorescence de la γ-Tubuline (vert) dans les cellules PP2A RNAi et HeLa au cours de la mitose.</i>	67
<i>Figure 22: Détection par immunofluorescence de Aurora-A et de la β-Tubuline (rouge) dans les cellules PP2A RNAi et HeLa au cours de la mitose.</i>	69
<i>Figure 23: Détection par immunofluorescence de Aurora-A (rouge) et de PP2AC (vert) dans les cellules PP2A RNAi et HeLa au cours de l'anaphase et la cytokinèse.</i>	70
<i>Figure 24 : Surexpression de Aurora-A humaine dans les cellules IEC.</i>	72
<i>Figure 25 : Apparition d'une morphologie caractéristique dans les cellules IECAur.</i>	73
<i>Tableau 1: Molécules inhibitrices et spécificités relatives vis-à-vis des protéines ser/thr phosphatases.</i>	52

INTRODUCTION

CHAPITRE 1 :

Le cycle cellulaire, la mitose et leurs régulateurs majeurs

CHAPITRE 2 :

La protéine kinase Aurora-A

CHAPITRE 3 :

Les protéine phosphatases PP2A

CHAPITRE 4 :

Rôle des protéines Aurora-A et PP2A dans l'oncogenèse

CHAPITRE 1 :

LE CYCLE CELLULAIRE, LA MITOSE ET LEURS REGULATEURS MAJEURS

I Le renouvellement et la prolifération cellulaire chez les eucaryotes

La compréhension des mécanismes à l'origine de l'édification et de l'organisation de la matière vivante a connu une prodigieuse avancée au XIX^{ème} siècle avec la « théorie cellulaire » du botaniste Mathias Schleiden et du zoologiste Théodor Schwann qui proposèrent la cellule comme unité de base de tout organisme vivant. Quelques décennies plus tard, Rudolf Virchow proposa un axiome selon lequel « toute cellule provient d'une cellule » (Klein, 1936). La simplicité de cet énoncé est aussi grande que la complexité des phénomènes qui le sous-tendent et qui constituent un centre d'intérêt majeur de la biologie cellulaire depuis près de deux siècles. Cette théorie a conduit à l'idée de multiplication cellulaire par division.

En traversant le cycle cellulaire, les cellules reçoivent des informations qui vont leur permettre de s'organiser entre elles, dans l'espace et le temps et ce, durant toute la vie de l'individu. Au cours de l'embryogenèse par exemple, la cellule œuf se divise, génère de plus en plus de cellules qui vont s'organiser, former des feuillets et tissus pendant la morphogenèse puis des organes fonctionnels lors de l'organogenèse. Mais ces deux processus requièrent plus que l'accroissement du nombre des cellules. Elles doivent aussi se spécialiser en faisant l'acquisition de caractéristiques structurales et fonctionnelles au cours de la différenciation. Plus tard et durant toute la vie de l'organisme pluricellulaire adulte, le cycle cellulaire assure le renouvellement cellulaire de la plupart des cellules pour compenser la mort cellulaire ou réparer une lésion. La variété des processus dans lesquels s'engagent les cellules qui traversent le cycle cellulaire suggère d'une part qu'il se compose de plusieurs phases distinctes par leurs natures et leurs fonctions et d'autre part qu'il doit être extrêmement finement régulé.

II Les différentes étapes du cycle cellulaire

Le cycle cellulaire est une succession de 5 phases : G0, G1, S, G2 et M qui peuvent se regrouper en deux grandes étapes principales. La première de ces deux étapes, l'interphase, est le siège de la réPLICATION de l'ADN. Ceci permet au matériel génétique, dans une deuxième étape, de se répartir de façon parfaitement égale entre les pôles de la cellule en division, générant ainsi deux cellules filles parfaitement identiques à la cellule mère.

II.1 Les phases du cycle :

La phase G0 peut être considérée comme étant en dehors du cycle cellulaire. Les cellules sont quiescentes et attendent des signaux leur permettant de reprendre leur progression en G1. Cette première phase du cycle cellulaire tire son nom de l'anglais « gap » qui signifie intervalle ou pause car aucun phénomène lié au cycle cellulaire n'est observable au microscope. G1 est une phase de décision : soit les cellules vont progresser dans le cycle cellulaire et se diviser, soit elles se différencient (Zavitz and Zipursky, 1997) (Cooper, 2001). Le choix des cellules pour l'une ou l'autre de ces possibilités se fait en fonction du point de restriction R (Pardee, 1974). Il correspond au moment de la phase G1 après lequel un type cellulaire donné est irréversiblement amené à poursuivre son cycle en phase S, indépendamment des facteurs mitogènes. Au contraire, les cellules privées de ces facteurs avant le point de restriction deviennent quiescentes de manière réversible (Zetterberg *et al.*, 1995). La phase G1 prépare essentiellement la phase de réPLICATION de l'ADN (S) en permettant notamment la synthèse de la machinerie de réPLICATION. La duplication de l'ADN est un mécanisme semi conservatif associant à chaque brin parental un brin néo-formé afin d'assurer la pérennité de la transmission de l'information génétique.

La phase G2 de l'interphase prépare les cellules à la mitose. La plupart des protéines essentielles à la division cellulaire sont en effet synthétisées lors de cette phase. Elle permet notamment la synthèse des protéines histones et la duplication des centrosomes, véritables chefs d'orchestre de la mitose. En plus de la synthèse protéique, bon nombre d'enzymes, notamment des protéine kinases, sont activées lors de cette phase en vue de la réalisation de la transition G2/M. Le déroulement et le contrôle de la mitose (phase M) seront explicités dans un prochain paragraphe .

III Les régulateurs majeurs du cycle cellulaires

La succession ordonnée des différentes phases du cycle cellulaire est contrôlée par une grande variété de protéines dont quatre familles majeures : les Cyclines (Pines, 1993a; Pines, 1993b), les Kinases Dépendantes des Cyclines (CDK) (Pines, 1994), les Protéines du Rétinoblastome et les Inhibiteurs des Kinases Dépendantes des Cyclines (CKI) (Denicourt and Dowdy, 2004). Ces protéines garantissent le déroulement correct du cycle cellulaire. Elles participent à la constitution des points de contrôle qui autorisent ou non la cellule à continuer sa progression dans le cycle cellulaire.

III.1 Les Cyclines :

Les Cyclines constituent une famille de protéines présentes à des taux variables selon les phases du cycle cellulaire et comportant un domaine commun d'une centaine d'acides aminés, la *cyclin box*, servant à lier les CDKs pour les activer (Kobayashi *et al.*, 1992) (Lees and Harlow, 1993). Les Cyclines peuvent être classées en deux sous-familles : les Cyclines « START » ou G1 (Cyclines C, D et E) et les Cyclines mitotiques (A et B).

L'expression des Cyclines START C et D (D1, D2, D3) est maximale lors de la phase G1 alors que la Cycline E a son pic d'expression lors de la transition G1/S. Le taux d'expression des Cyclines mitotiques A et B quant à lui croît progressivement lors des phases S et G2 pour atteindre finalement un pic au cours de la transition G2/M (Pines, 1993b). Chaque Cycline a une fonction bien définie dans le temps concernant la régulation du cycle cellulaire. Ainsi, les Cyclines D assurent la progression des cellules dans la première partie de la phase G1 (passage ou non du point R). Elles sont synthétisées en réponse à la présence de facteurs mitogènes et, inversement, sont rapidement dégradées en leur absence (Sherr, 1994a). Cette sensibilité aux facteurs mitogènes permet aux cellules qui en sont privées et qui n'ont pas passé le point de restriction de ne pas poursuivre leur cycle cellulaire. Les Cyclines D interagissent majoritairement avec les sous unités catalytiques CDK4 et CDK6 décrites au paragraphe suivant (Bates *et al.*, 1994) (Meyerson and Harlow, 1994).

La Cycline E, dont le pic d'expression se produit après celui des Cyclines D, forme un complexe avec CDK2 (Koff *et al.*, 1991). Ce complexe agit seulement à la fin de la phase G1, après le passage du point R et est nécessaire à la transition G1/S. La Cycline E est ensuite progressivement dégradée en phase S par le protéasome (Hatakeyama *et al.*, 1994).

Enfin le rôle de la Cycline C dans le contrôle du cycle était encore mal compris jusqu'à présent. Cette Cycline était connue pour s'associer avec CDK8 en un complexe liant PCNA (Proliferativ Cell Nuclear Antigen), une sous unité de la polymérase δ impliquée dans la réparation et la réPLICATION de l'ADN (Akoulitchev *et al.*, 2000). Cependant, de récents travaux ont mis en évidence que la Cycline C interagit également avec CDK3 et que l'activité kinase de ce complexe régule la transition Go/G1 (Ren and Rollins, 2004).

Les rôle et mode d'action des Cyclines mitotiques sont quant à eux bien caractérisés. Les Cyclines A et B peuvent toutes deux s'associer à CDK1 lors de la transition G2/M pour activer l'entrée en mitose. Inversement, leur dégradation est requise par les cellules pour sortir de la mitose (Minshull *et al.*, 1989). Cette dégradation est contrôlée par une séquence appelée « boite de destruction » commune à de nombreuses protéines mitotiques. Cette séquence est reconnue par le complexe APC/C (Anaphase Promoting Complex/Cyclosome) qui l'ubiquitinyle et entraîne ainsi une protéolyse rapide et soudaine par le protéasome (Sudakin *et al.*, 1995).

La Cycline A peut également s'associer à CDK2 en fin de G1 pour promouvoir la transition G1/S et activer la réPLICATION de l'ADN (Rosenblatt *et al.*, 1992) (Cardoso *et al.*, 1993).

Les Cyclines B sont au nombre de trois : B1, B2 et B3. Cependant, la Cycline B1 est la mieux caractérisée et la plus importante dans le déclenchement de la mitose. Elle est soumise à une régulation originale qui est à la fois spatiale et temporelle. En effet, durant l'interphase, la Cycline B1 s'associe avec CDK1 et va continuellement du cytoplasme vers le noyau, et inversement, grâce à une Séquence de Rétention Cytoplasmique (CRS) (Hagting *et al.*, 1999) (Hagting *et al.*, 1998). Cependant, le flux net entre l'import et l'export nucléaire se fait en faveur du cytoplasme durant cette phase (Pines and Hunter, 1994). La séquence CRS peut être phosphorylée par les MAP kinases (notamment Erk2) en synergie avec Plk1 (polo-like kinase 1) (Margolis *et al.*, 2003; Walsh *et al.*, 2003) (Yuan *et al.*, 2002). Cette phosphorylation empêche la reconnaissance de la séquence CRS par l'exportine, un facteur d'exportation nucléaire et provoque ainsi sa rétention dans le noyau lors de la transition G2/M. Le complexe cycline1/CDK1 participe alors à l'entrée en mitose (Glotzer *et al.*, 1991; Holloway *et al.*, 1993).

Toutes ces Cyclines exercent leurs rôles de régulateurs du cycle cellulaire par l'intermédiaire de leur association aux Kinases Dépendantes des Cyclines (CDK).

III.2 Les Kinases Dépendantes des Cyclines :

Ces protéine kinases appartiennent à une famille de Sérine/Thréonine kinases comptant au moins huit membres numérotés de 1 à 11 (CDK1 à CDK11) (Pines, 1994). Chaque membre se présente sous la forme d'un hétérodimère associant une sous unité catalytique CDK et une Cycline activatrice. Le monomère CDK isolé n'a pas d'activité détectable. L'activation de cette sous-unité s'effectue selon au moins trois niveaux de régulation : l'association à une Cycline, des modifications post-traductionnelles, l'association à une protéine inhibitrice.

La liaison de la Cycline est une étape nécessaire mais non suffisante à l'activation de la kinase CDK. Elle modifie la conformation de la CDK et l'active (Espinoza *et al.*, 1996; Morgan *et al.*, 1998). Chaque sous unité kinase possède une séquence xGxPxxxxREx conservée à laquelle se lient les Cyclines de façon exclusive (Ducommun *et al.*, 1991) (Endicott *et al.*, 1994). La liaison de la Cycline permet d'une part d'orienter correctement l'ATP lié au monomère CDK lors de sa catalyse, d'autre part de rendre le site catalytique plus accessible au substrat par un changement de conformation (Jeffrey *et al.*, 1995). Cependant, la liaison de la Cycline n'est pas suffisante à l'activation mais permet sa phosphorylation.

Le complexe CAK (Cyclin Activated Kinase : CDK7, Cycline H et Mat1) phosphoryle le dimère Cycline/CDK sur une Thréonine (160 ou 161 selon les CDKs) et le stabilise. Après dissociation de la Cycline, cette thréonine pourra être déphosphorylée par la KAP (CDK Associated Phosphatase). Seule la phosphorylation sur Thréonine 160 ou 161 est activatrice. En revanche, la phosphorylation des résidus Thr14 et Tyr15 par les protéine kinases de la famille Wee1/Myt1/Mik1 sont inhibitrices mais cette inhibition peut être levée par les phosphatases CDC25 A, B et C. Ces phosphatases activent les complexes Cyclines/CDKs pour permettre la progression du cycle cellulaire.

Ces deux premiers niveaux d'activation par les Cyclines et les phosphorylations sont résumés dans la figure 1.

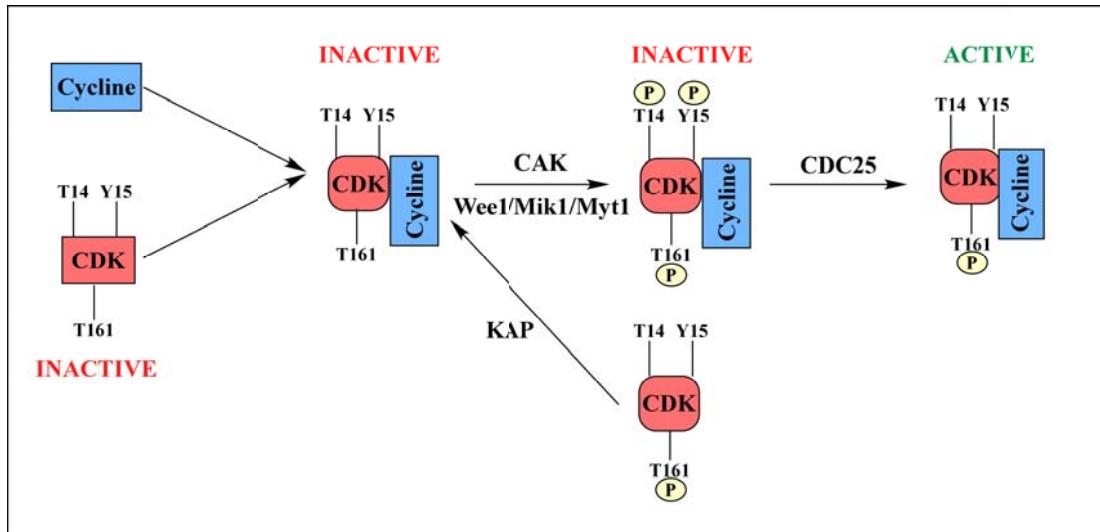


Figure 1 : Première étapes de l'actiavtion des Cyclines Dépendantes des Kinase .

Un troisième niveau de régulation implique l’interaction des complexes Cycline/CDK principalement avec trois familles de protéines inhibitrices : les protéines du rétinoblastome, les INK4 (INhibitor of CDK4) et les CIP/KIP (CDK Inhibiting Protein).

III.3 La famille des protéines du rétinoblastome :

Les protéines pRB, p107 et p130 de la famille du rétinoblastome sont connues pour réguler négativement la croissance cellulaire (Grana *et al.*, 1998) (Sherr, 1994b). Les complexes Cyclines/CDKs peuvent interagir avec les protéines du rétinoblastome via un domaine appelé « Pocket Domain », d'où leur nom de protéines de la poche. Les complexes Cyclines/CDKs actifs phosphorylent les protéines du rétinoblastome, modulant ainsi leur interaction avec un grand nombre de protéines cellulaires (Calbo *et al.*, 2002) (Garriga *et al.*, 2004). En effet, seules les formes non phosphorylées ou hypophosphorylées de ces protéines peuvent lier leurs ligands et régulent négativement la progression du cycle cellulaire. Ces ligands sont principalement de trois types : des régulateurs de la transcription, les complexes Cyclines/CDKS et des composants de la machinerie de réplication.

Pour réguler la transcription, les protéines de la poche interagissent avec des enzymes telles que les histones déacétylases et surtout avec des facteurs de transcription, en particulier les membres de la famille E2F (Stevens and La Thangue, 2003). Lorsqu'ils sont associés aux protéines de la poche, ces facteurs répriment l'expression de nombreux régulateurs du cycle cellulaire (par exemple les Cyclines E et A (Coqueret, 2002) (Lees *et al.*, 1992), CDK1 (Strobeck *et al.*, 2000), CDC25C (Vigo *et al.*, 1999)) ainsi que des protéines du métabolisme

de l'ADN et des complexes de réPLICATION (Thymidine Kinase (Hengstschlager *et al.*, 1994; Ogris *et al.*, 1993), Thymidilate Synthase (Johnson, 1992), Orc1 (Ohtani *et al.*, 1996), CDC6 (Ohtani *et al.*, 1998) et MCM (Tsuruga *et al.*, 1997)). L'action inhibitrice des protéines de la poche sur la prolifération s'exerce donc largement par le contrôle des facteurs E2F. Inversement, la phosphorylation des protéines de la poche par les complexes Cyclines/CDKS lève la répression de ces gènes en libérant les facteurs E2Fs et relance la progression dans le cycle cellulaire (Chow *et al.*, 1996).

III.4 La famille des inhibiteurs KIP/CIP :

Cette famille de protéines nucléaires compte trois membres connus comme répresseurs universels de l'activité de toutes les CDKs (Pavletich, 1999). Il s'agit des protéines p21^{WAF1/CIP1} (p21), p27^{KIP1/ICK1/PIC2} (p27), p57^{KIP2} qui dirigent toutes trois les complexes Cycline D/CDK vers le noyau. Les KIP/CIP ne sont pas spécifiques d'une phase en particulier et ne dissocient pas le complexe Cycline/CDK pour l'inhiber (Sherr and Roberts, 1999). Des études structurales montrent que p21 et p27 agissent stoechiométriquement sur les complexes Cyclin/CDK en modifiant la structure du site actif de la sous unité CDK (Russo *et al.*, 1996). Leur liaison mime la fixation de l'ATP et empêche sa catalyse. Cependant, l'inhibition des complexes Cycline/CDK dépend de la nature de la Cycline. Ainsi, il semble que la plupart des complexes contenant une Cycline D soient associés à p21 ou p27 sans pour autant se trouver inhibés (Sherr and Roberts, 1999). De plus, de faibles concentrations de CIP/KIP suffisent à inhiber CDK2 alors qu'une forte surexpression de p27 est nécessaire pour inactiver CDK4 (Olashaw and Pledger, 2002). L'ensemble de ces données a conduit à l'élaboration du modèle suivant : les protéines p21 et p27 sont titrées par les complexes CyclineD/CDK au fur et à mesure de leur formation. Ainsi, le complexe CyclineE/CDK2 inhibé par les KIP/CIP va être progressivement activé (Bouchard *et al.*, 1999). D'une certaine manière ce complexe va s'activer lui même en phosphorylant p27 qui va alors être dégradé (Sheaff *et al.*, 1997). Ce processus participe à la transition G1/S.

III. 5 La famille des inhibiteurs INK4 :

Cette famille de protéines très conservées comporte quatre membres partageant près de quarante pourcents d'homologies entre eux et codés respectivement par un gène unique. Il s'agit de p16^{INK4a/MTS1/CDNK2/CDK4I} (p16), p15^{INK4b/MTS2}, p18^{INK4c/INK6A} et p19^{INK4d/INK6B}. Contrairement aux KIP/CIP, ces protéines lient les protéine kinases CDK4 et CDK6 de manière spécifique et inhibent leurs activités (Jeffrey *et al.*, 2000). Les protéines INK4 sont en conséquence les principales régulatrices de la phosphorylation de pRb. Leurs structures révèlent des répétitions de motifs ankyrine impliqués dans l'interaction avec d'autres protéines (Seto *et al.*, 1992) (Serrano *et al.*, 1993). Ces protéine kinases CDK4 et CDK6 peuvent se retrouver dans divers complexes dans les cellules (Mahony *et al.*, 1998) : avec HSP90/CDC37 dans les cellules quiescentes, avec la Cycline D et p21 ou p27, enfin avec une molécule INK4 en G1. Dans les cellules en G0 (quiescentes), CDK4 ou CDK6 sont complexées à HSP90/CDC37 (Lamphere *et al.*, 1997) ;(Stepanova *et al.*, 1996). Puis, comme évoqué précédemment, CDK4 va s'associer en G1 aux Cyclines D dont l'expression augmente et aux KIP/CIP p21 ou p27. Ces derniers qui étaient associés stoechiométriquement aux complexes CyclineE/CDK2 et CyclineA/CDK2 sont alors relâchés et les complexes sont activés. Le complexe CyclineE/CDK2 actif permet aux cellules d'entrer en phase S en phosphorylant d'une part pRb et d'autre part p27, qui sera consécutivement dégradé (Parry *et al.*, 1999). Il existe donc une compétition entre les inhibiteurs INK4 et les KIP/CIP.

Les différents niveaux de régulation des CDKs peuvent être schématisés de manière simplifiée comme dans la figure 2.

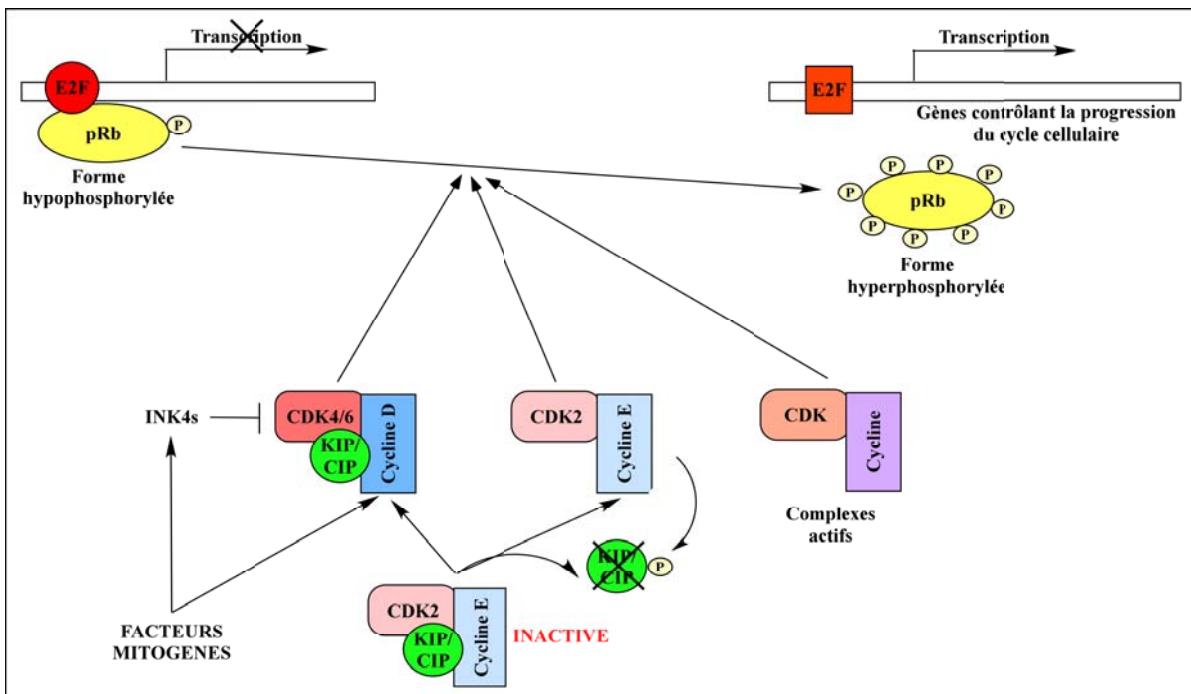


Figure 2 : Mode d'action des substrats et ligands des CDKs.

Ces quatre familles de protéines agissent en synergie pour orchestrer les transitions irréversibles entre les différentes phases du cycle cellulaire. Une nouvelle phase ne débute que si la précédente est correctement achevée.

III. 6 La protéolyse et la régulation du cycle cellulaire :

Les acteurs du cycle cellulaire sont régulés tant au niveau de leur synthèse et de leur activation que de leur dégradation (Peters, 2002). Ainsi, dans les cellules proliférantes, ces molécules sont cycliquement synthétisées, activées et désactivées puis protéolysées. Cette dégradation est prise en charge par un énorme complexe de plus d'une quarantaine de sous unités appelé le Protéasome 26s (Hendil and Hartmann-Petersen, 2004). Ce complexe reconnaît et dégrade des protéines ubiquitinylées par l'action successive de trois enzymes : E1 (Ubiquitin-activating enzyme), E2 (Ubiquitin-conjugating enzyme) et E3 (Ubiquitin Ligase). Deux complexes ubiquitine ligase différents interviennent dans la régulation du cycle cellulaire : le complexe SCF (Skip-cullin-F-Box) et le complexe APC/C (Anaphase Promoting Complex/Cyclosome) (Page and Hieter, 1997; Vodermaier, 2004).

Le complexe SCF est activé par les protéines contenant un motif dégénéré de quarante acides aminés : la F-box (Craig and Tyers, 1999). Les protéines à F-box du complexe servent

d'adaptateurs spécifiques du substrat. Il en existe au moins une centaine chez les mammifères dont Skp2. Ce complexe est actif du milieu de la phase G1 au début de la phase G2. Son activité est indispensable à la transition G1/S durant laquelle ses substrats sont les protéines p27 et la Cycline E.

Le complexe APC/C est quant à lui actif de la fin de la phase G2 au début de la phase G1 suivante (Rape and Kirschner, 2004). Il a donc principalement pour substrats des protéines mitotiques. Son activité est nécessaire à la transition métaphase/anaphase et à la cytokinèse. Ce complexe peut être activé séquentiellement par deux protéines: Cdc20 et Cdh1. APC/C activé par Cdc20 correspond à la forme mitotique du complexe. Les substrats du complexe APC/C/Cdc20 contiennent un motif R-X-X-L-X-X-X-X-N appelé D-box (Destruction Box) (Prinz *et al.*, 1998). Toutes les Cyclines mitotiques ont une D-box. A la fin de la mitose, APC/C est activé par Cdh1 déphosphorylée qui reconnaît les protéines contenant une D-box et/ou un motif de trois résidus : la KEN-box (Pfleger and Kirschner, 2000). Cdc20 comporte elle-même cette séquence. Elle est donc un substrat de APC/C/Cdh1 en fin de mitose. D'autres protéines telles que Nek2 ou les protéine kinases Aurora possèdent une KEN-box, une D-box et sont reconnues par APC/C/Cdh1 comme nous le verrons plus tard. Les voies d'activation de la protéolyse au cours du cycle cellulaire sont schématisées dans la figure 3.

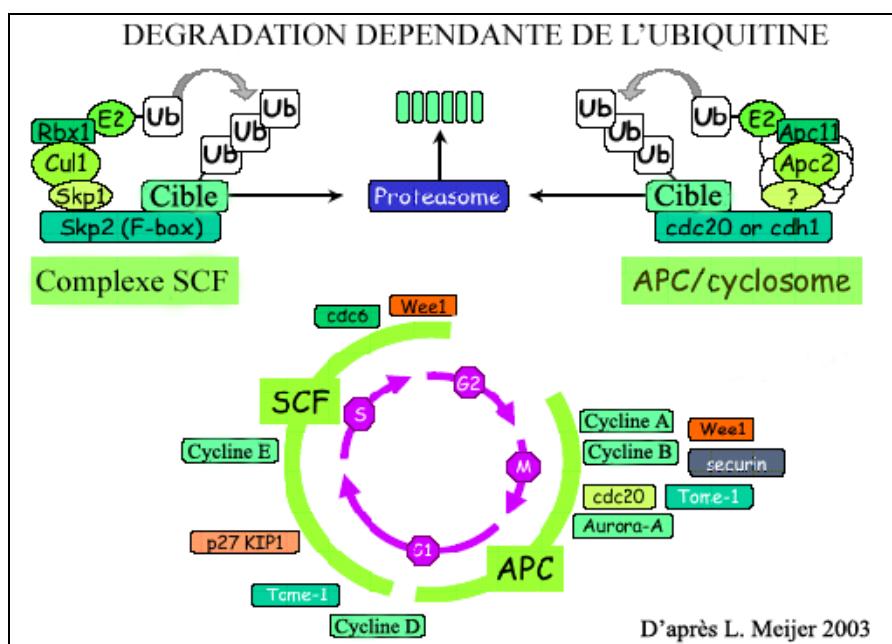


Figure 3 : Voies d'activation du protéasome et protéolyse dépendante de l' ubiquitine au cours du cycle cellulaire.

IV Les transitions de l'interphase et les points de contrôle du cycle

IV.1 La transition G0/G1 :

Cette transition essentielle à l'entrée des cellules dans le cycle cellulaire obéit principalement à deux voies de régulation (Jones and Kazlauskas, 2001a; Jones and Kazlauskas, 2001b). La première voie met en jeu la stimulation de récepteurs tyrosine kinase transmembranaires par des facteurs mitogènes. Ces récepteurs vont activer différentes cascades de signalisation dépendantes de protéines kinases. Cette activation est médiée par la famille des protéines G monomériques Rho ou Ras prénylées en C-terminal. Différentes cascades de kinase de type MAPKKK/MAPKK/MAPK vont alors pouvoir activer la transcription de gènes requis pour la poursuite du cycle cellulaire tels que les Cyclines D et les CDKS. Cette transcription peut être activée par une autre voie contrôlée par le produit du proto oncogène Myc (Wanzel *et al.*, 2003). Ce dernier peut en effet former avec la protéine Max un complexe hétérodimérique activant la transcription des gènes des Cyclines D et E, CDC25A, CDK4 et E2F nécessaires en phase G1. Enfin, de récents travaux ont montré que la Cycline C pouvait s'associer à CDK3 pour stimuler la phosphorylation de pRb sur S807/811 et que cette phosphorylation serait nécessaire aux cellules pour sortir de la phase G0 (Ren and Rollins, 2004). Cette transition est schématisée figure 4.

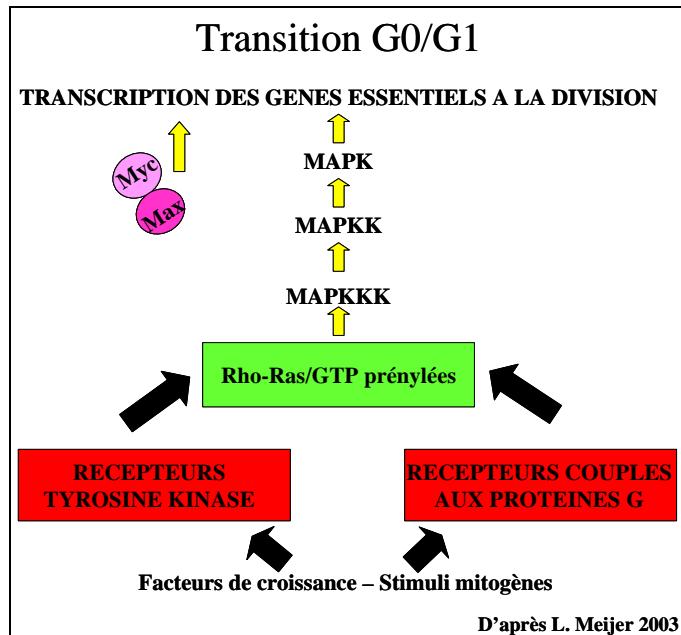


Figure 4: La transition G0/G1 assure l'activation de la transcription des gènes essentiels au cycle cellulaire.

IV.2 La progression en G1 et la transition G1/S:

Au début de G1, la Cycline D est synthétisée en réponse aux facteurs mitogènes. Les cellules sont retenues en phase G1 par les protéines du rétinoblastome qui s'associent aux facteurs E2F (Jones and Kazlauskas, 2001a). L'expression des gènes nécessaires à la progression dans le cycle cellulaire est ainsi réprimée. Au milieu de la phase G1, la Cycline E est synthétisée en réponse à la phosphorylation partielle de pRb par les complexes CyclineD/CDK4-6. La Cycline E se trouve alors soit libre soit associée à CDK2. Ce complexe phosphoryle pRb qui libère totalement les facteurs E2F et les gènes qu'ils contrôlent sont transcrits (Lees et al., 1992). Lorsque la concentration de Cycline E libre excède la concentration de p27, la Cycline E phosphoryle p27 qui est alors ciblée par une protéine (Skp2) du complexe SCF et dégradée. L'activité de la Cycline E augmente donc fortement et conduit à un état de phosphorylation maximale de pRb. Ceci permet l'expression de la Cycline A à la fin de la phase G1. La Cycline A s'accumule et capture CDK2 qui est associée à la Cycline E. La concentration de la Cycline E libre augmente. Elle est à son tour ciblée par Skp2 et protéolysée (Won and Reed, 1996).

Cette transition sert à préparer la réPLICATION de l'ADN. En effet, la transition G1/S est amorcée par l'assemblage d'un complexe pré-réPLICATIF nécessaire à la réPLICATION. Dans ce complexe, l'ORC (Origin Recognition Complex), qui s'est lié aux origines de réPLICATION, recrute CDC6, une ATPase et Cdt1, un facteur de transcription (Madine et al., 2000). Après fixation de la protéine MCM10 (Mini Chromosome Maintenance 10), la kinase Cdc7 active le complexe pré réPLICATIF (Masai and Arai, 2002). La kinase CDK2/CyclineE est activée par CDC25A. L'activité kinase CDK2 permet alors de fixer CDC45 sur la chromatine. Ce dernier recrute l'ADN polymérase α pour réPLiquer l'ADN. Le contrôle de la phase S est ensuite principalement assuré par le complexe CyclineA/CDK2 activé par CDC25B comme indiqué sur la figure 5 (Wilborn et al., 2001).

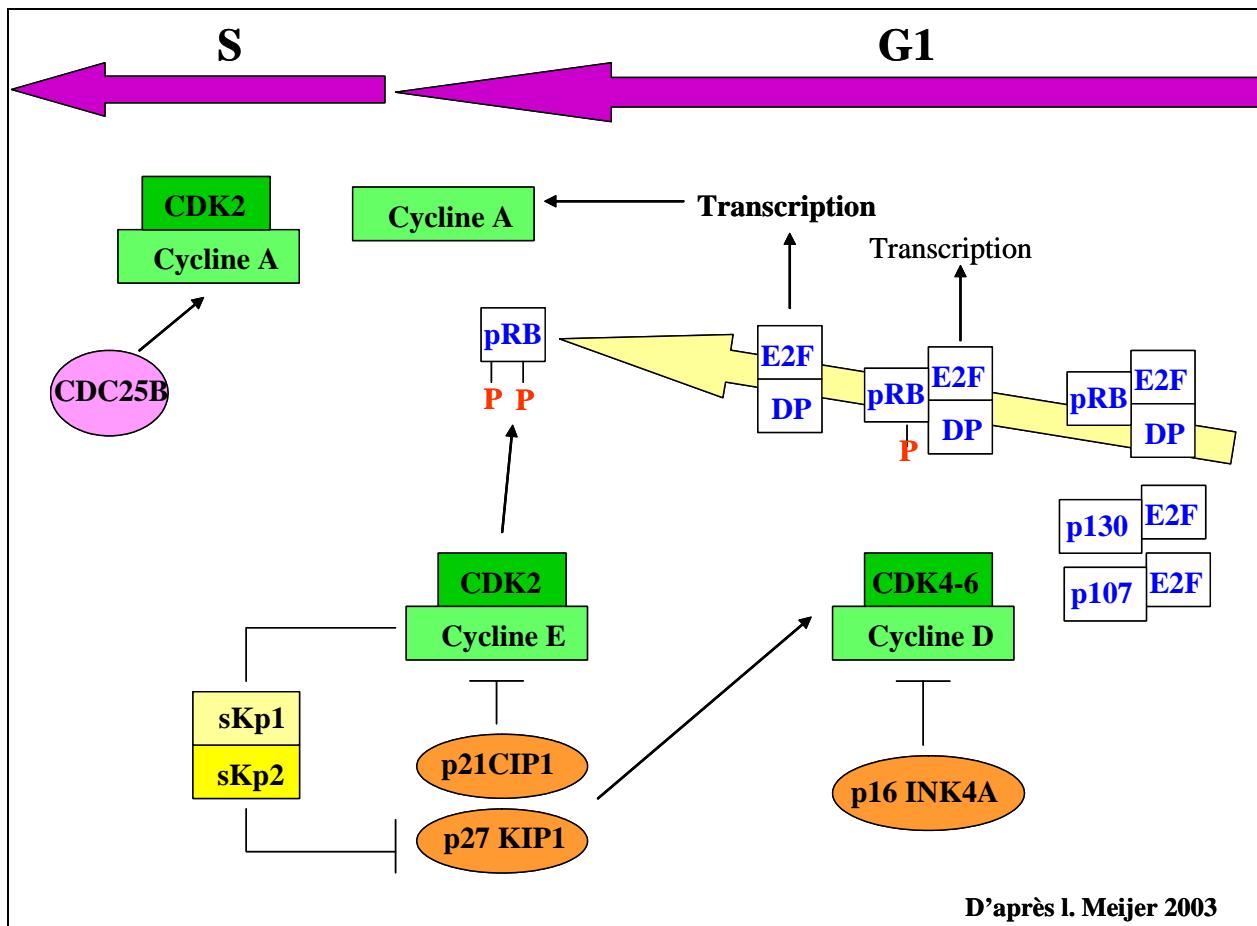


Figure 5: La transition G1/S assure la formation du complexe CDK2/Cycline A.

IV. 3 La transition G2/M :

Cette transition s'étend de la phase G2 au début de la condensation des chromosomes. De nombreuses protéines, principalement des protéine kinases et des phosphatases, interviennent lors de cette transition pour réguler et activer CDK1, l'une des principales protéine kinases régulatrices de la mitose (Meszaros *et al.*, 2000; Nilsson and Hoffmann, 2000; Pines, 1998; Taylor and Stark, 2001). Au cours de la phase G2, la kinase CDK1 est active et associée à la CyclineA (Jackman and Pines, 1997). Cependant les fonctions de ce complexe demeurent peu connues bien qu'une hypothèse veuille qu'il participe à l'activation du complexe CDK1/CyclineB. Les mécanismes moléculaires conduisant à l'activation du complexe sont schématisés figure 6. La synthèse de la Cycline B augmente progressivement en fin de G2 et atteint un maximum en prophase. Elle s'associe au fur et à mesure de sa synthèse à CDK1 qui est alors monomérique et inactive. La cellule accumule ainsi une quantité maximale de complexe CDK1/CyclineB en prophase. Cependant, ce complexe est maintenu inactif par les protéine kinases Wee1 et Myt1 qui phosphorylent les résidus T14 et Y15 de CDK1 (Booher *et al.*, 1997; Fattaey and Booher, 1997; Wells *et al.*, 1999). La phosphorylation de la thréonine 161 nécessaire à l'activation est quant à elle réalisée par CDK7/Cycline H/Mat1 (Kaldis *et al.*, 1998). Quatre événements vont conduire à l'activation du complexe pour l'entrée en mitose : l'inactivation des protéine kinases inhibitrices Wee1 et Myt1, la déphosphorylation des résidus T14 et Y15, la phosphorylation de la CyclineB et enfin la translocation du complexe actif dans le noyau.

Les protéine kinases PKB et p90RSK phosphorylent et inactivent Wee1 et Myt1. De plus, grâce à TOME1, Wee1 va être dégradée par le protéasome en fin de G2 (Lim and Surana, 2003). Ce sont ensuite les phosphatases CDC25 qui prennent le relais pour déphosphoryler les résidus T14 et Y15. CDK1 serait en premier lieu déphosphorylée et activée par CDC25B. Le complexe CDK1/CyclineB activé phosphorylerait en retour les CDC25, générant ainsi une boucle d'auto-amplification de son activation. Par ailleurs, la kinase de type Polo Plk1 participe à l'activation du complexe via ces phosphatases CDC25. Elle phosphoryle aussi la Cycline B, permettant ainsi l'interaction de CDK1 avec les CDC25 (Qian *et al.*, 2001; Roshak *et al.*, 2000; Toyoshima-Morimoto *et al.*, 2002). Enfin, la Cycline F et l'importine β régulent la translocation du complexe CDK1/CyclineB dans le noyau où se trouvent ses substrats (Toyoshima-Morimoto *et al.*, 2002; Yuan *et al.*, 2002): de protéines centrosomales, des lamines nucléaires, des protéines nucléolaires et Eg5 (une protéine motrice de type kinésine) (Blangy *et al.*, 1995). L'activité de CDK1 vis-à-vis de ces substrats et corrélée avec

les changements morphologiques de la mitose. Une représentation de cette transition est proposée figure 6. La description faite ici des mécanismes moléculaires conduisant à cette transition n'est pas exhaustive. Les protéines kinase Aurora-A et phosphatase PP2A qui sont l'objet de notre étude participent également à ces régulations. Leurs rôles dans cette transition seront développés dans les chapitres qui les concernent respectivement.

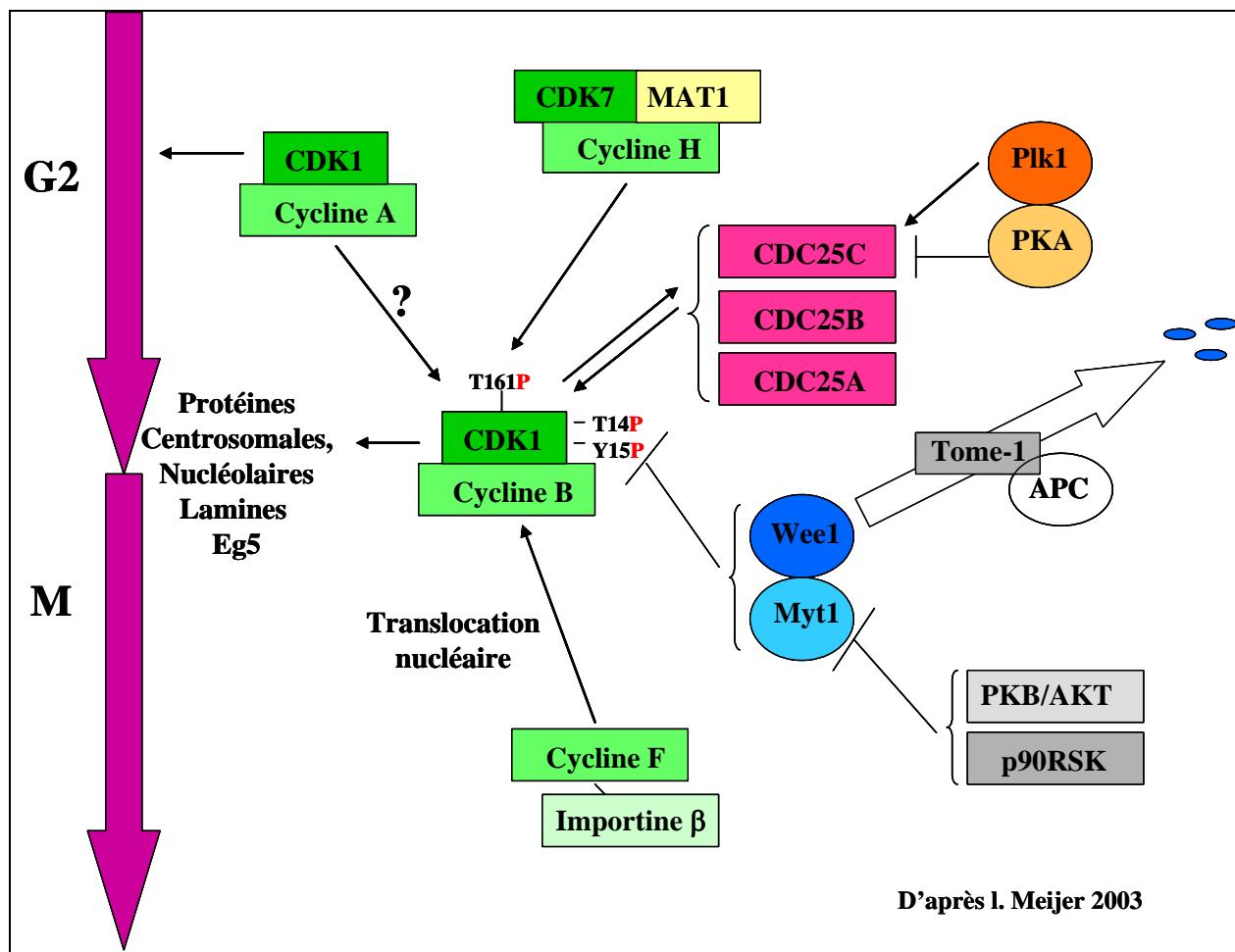


Figure 6: La transition G2/M et les mécanismes conduisant à l'activation du complexe régulateur majeur de la mitose CDK1/CyclineB.

IV.4 Les points de contrôle du cycle cellulaire :

Outre les mécanismes régulant les transitions G1/S et G2/M précédemment évoqués, les cellules ne progressent dans le cycle cellulaire qu'à la condition qu'elles puissent se diviser. Ceci nécessite que leur matériel génétique soit en état d'être dupliqué en phase S et transmis aux cellules filles lors de la mitose. Les cellules disposent de deux machineries enzymatiques surveillant l'intégrité de l'ADN et permettant de bloquer respectivement les cellules avant la phase S ou avant la mitose. Ces machineries impliquent les protéine kinases ATM (Ataxia Telangiectasia Mutated) et ATR (ATM and Rad3-related) de la famille des PIKKs (PhosphatidylInositol 3-Kinase-like Kinases) (Hammond and Giaccia, 2004; Koundrioukoff *et al.*, 2004). Chacune de ces protéine kinases est spécifique d'un type particulier de dommages de l'ADN : ATM est engagée en cas de radiations ionisantes et de coupures double-brin alors que ATR agit en réponse aux UV ou aux erreurs de réPLICATION. Pour bloquer le cycle cellulaire, ces protéine kinases phosphorylent et activent Chk1 et Chk2 qui à leur tour phosphorylent et inactivent CDC25A et CDC25B, empêchant ainsi l'activation de CDK1 et CDK2. Leur mode d'action est présenté figure 7.

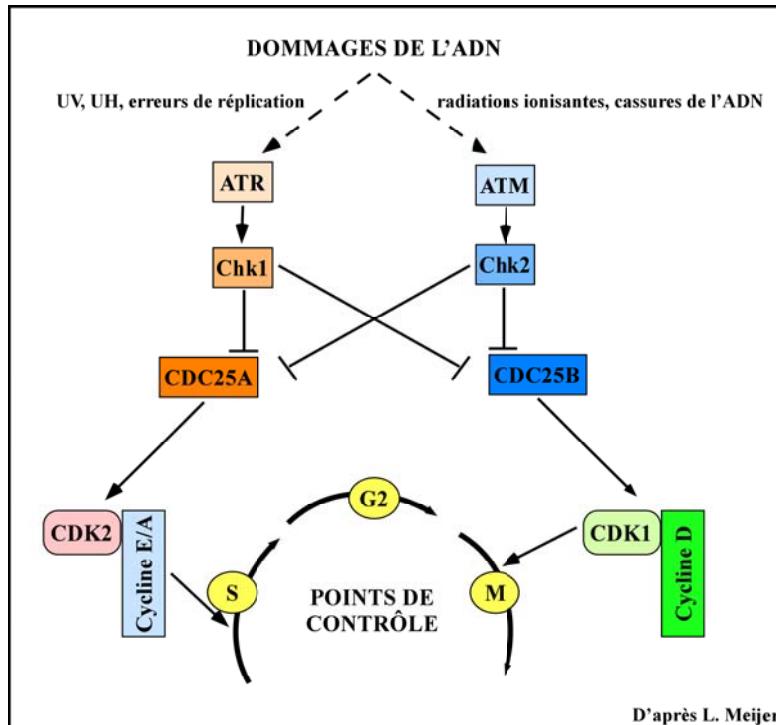


Figure 7: Machinerie de contrôle de l'état de l'ADN au cours du cycle cellulaire.

V La mitose

V.1 Caractéristiques générales :

Lorsque les cellules ont dupliqué leur ADN ainsi que bon nombre de leurs composants cytoplasmiques, elles sont prêtes à se diviser lors de la mitose. Le déroulement de la mitose peut être décrit de deux manières au moins:

La plus connue consiste en une succession de six phases reposant sur des changements de morphologie des chromosomes et de l'enveloppe nucléaire : prophase, prométaphase, métaphase, anaphase, télophase et cytokinèse. En prophase, les chromosomes finissent de se condenser et l'enveloppe nucléaire se fractionne en petites vésicules. Le fuseau mitotique se forme en prométaphase de telle sorte que les chromosomes puissent s'y aligner à équidistance des pôles en métaphase. Les chromatides sœurs migrent ensuite de manière opposée en direction des pôles lors de l'anaphase. La chromatine se décondense progressivement en télophase, le fuseau se désagrège et les cellules filles sont finalement séparées suite à la division du cytoplasme au cours de la cytokinèse.

Récemment, Pines et Rieder ont proposé une seconde manière de définir la mitose non plus selon des critères morphologiques mais comme une succession de transitions caractérisées au niveau moléculaire par l'activité de protéine kinases spécifiques et une succession de protéolyse par le complexe APC/C (Pines and Rieder, 2001). Cette définition originale de la mitose a pour avantages de s'affranchir des aspects morphologiques (condensation des chromosomes, état de l'enveloppe) qui peuvent varier selon les espèces. Par exemple, l'enveloppe nucléaire ne se rompt jamais chez *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe* et *Aspergillus nidulans* (Kubai, 1975). En revanche, cette définition repose sur des mécanismes moléculaires très conservés de la levure aux vertébrés. Pines et Rieder décrivent ainsi cinq transitions :

La Transition 1 s'étend de G2 à la prophase avant que la condensation des chromosomes ne devienne visible. La progression des cellules vers la mitose peut être retardée réversiblement lors de cette phase par différents stress. Les protéine kinases CDK1/CyclineA, Plk1 et Aurora-A sont alors actives.

La Transition 2 correspondant à l'engagement irréversible des cellules en mitose. Elle est caractérisée par l'activation du complexe CDK1/CyclineB et sa translocation nucléaire.

La Transition 3 se confond parfaitement avec la prométaphase. C'est une phase de contrôle des événements avant que les cellules n'achèvent la division. Des machineries enzymatiques veillent à ce que les kinétochores soient attachés au fuseau mitotique et à

l'activation du complexe APC/C-Cdc20. L'attachement du dernier kinétochore constitue un signal qui parachève l'activation de APC/C.

Il s'ensuit, lors de la transition 4, la protéolyse par APC/C/cdc20 de la sécurine requise pour la séparation des chromatides sœurs. La Cycline B par APC/C/Cdh1 est à son tour dégradée pour l'entrée en télophase.

Par conséquent, lors de la Transition 5, CDK1 se retrouve inactivée. L'enveloppe nucléaire se reforme et la cytokinèse se produit. APC/C va lier Cdh1 consécutivement à la dégradation de Cdc20. D'autres protéines telles que Aurora-A subissent alors une protéolyse.

La correspondance entre ces transitions et les phases de la mitose est schématisée figure 8.

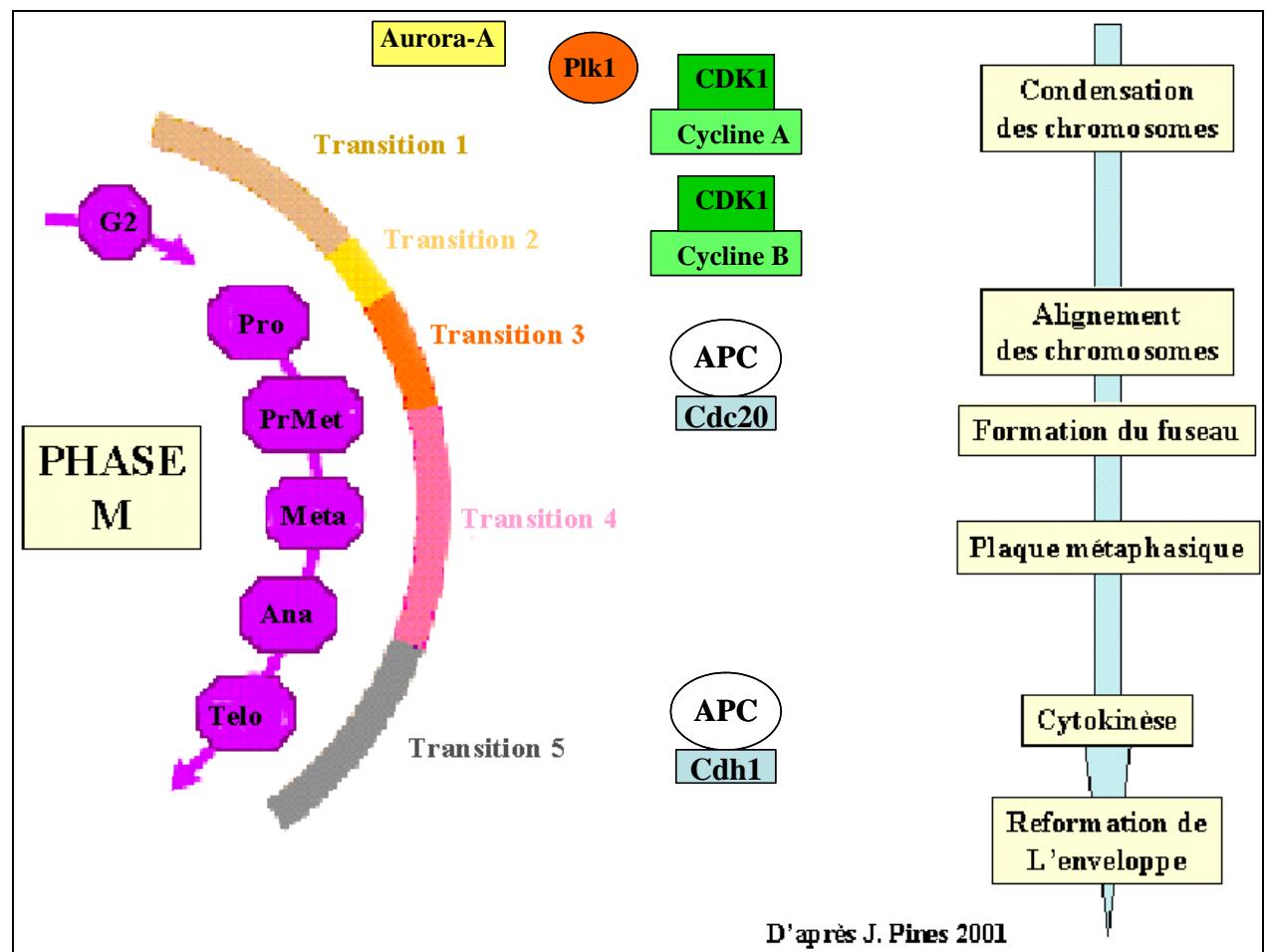


Figure 8: Correspondance entre les événements moléculaires et les changements morphologiques survenant au cours de la mitose.

A l'issue de la mitose, les deux cellules filles peuvent avoir des contenus cytoplasmiques parfaitement identiques ou au contraire différent par la nature et/ou la concentration des molécules qu'ils contiennent. Il s'agit alors d'une division asymétrique : les cytoplasmes des deux cellules filles sont pourvus de déterminants morphogénétiques différents à l'origine de devenirs cellulaires différents.

La division asymétrique se trouve ainsi à l'origine de certains processus de différenciation ou de détermination (Knoblich, 2001; Roegiers and Jan, 2004). Ce type de division est souvent caractéristique des cellules souches ou pluripotentes comme celles des cryptes de l'intestin grêle ou de la moelle osseuse par exemple (Gordon *et al.*, 1992; Schena and Abbattista, 2003). Elle permet de produire par division une cellule assurant le renouvellement du stock de cellules souches et une cellule de type progénitrice à l'origine de différents types cellulaires différenciés.

Les cinq transitions mitotiques sont contrôlées par un grand nombre de familles de protéines dont les activités sont interdépendantes. Le déroulement de la mitose est associé en premier lieu spécifiquement à l'activité kinase CDK1 du complexe CyclineB/CDK1. Par ailleurs trois grandes familles de protéine kinases se retrouvent dans le contrôle et la régulation des modifications morphologiques et des points de contrôle de la mitose : les protéine kinases de type Polo (Polo-like Kinases Plks), les protéine kinases de type NIMA « NIMA-related » et enfin les protéine kinases Aurora.

V.2 Les protéine kinases de type polo (Plks) :

Cette famille de ser/thr protéine kinases a été mise en évidence dans des mutants inaptes à réaliser une mitose correcte chez *Drosophila melanogaster* (polo) et *Saccharomyces cerevisiae* (cdc5) (Glover *et al.*, 1991; Kitada *et al.*, 1993; Sunkel and Glover, 1988). Les protéine kinases de cette famille possèdent un domaine kinase dans leur région N-terminale et un domaine appelé PBD (Polo Box Domain) en C-terminal. Ce dernier contient deux motifs nommés polo Box (sauf pour la kinase plk4 qui n'en a qu'un), véritables signatures de cette famille. Le domaine polo contient également une petite région Pc (Polo-box cap), un site conservé d'activation de la phosphorylation appelé boucle T (Thr210 chez l'homme) et une D-box. Par ailleurs, trois résidus du domaine polo sont impliqués dans la liaison aux phosphopeptides : Trp414, His538 et Lys540 (Cheng *et al.*, 2003; Elia *et al.*, 2003) L'activité de protéine kinases plks est régulée à différents niveaux : par phosphorylation, par régulation de la synthèse et de la dégradation et par le domaine PBD. La boucle d'activation T peut être phosphorylée *in vitro* chez le Xénope par la protéine kinase A et la plkk1 (polo-like kinase kinase 1). D'autres sites de phosphorylations ont été identifiés mais leur signification *in vivo* reste à déterminer. D'autre part, la régulation de la transcription de plks, notamment par les facteurs de transcription Forkhead et la dégradation des protéines par APC/C en fin de mitose constituent un deuxième niveau de régulation. Enfin, le domaine PBD interagit avec le domaine kinase en absence de phosphopeptides. Il empêche ainsi la liaison du substrat et l'activation du domaine kinase. La liaison de phosphopeptides au domaine PBD libère le domaine kinase, permet la phosphorylation de la boucle T et donc l'activation de la kinase.

Chez les mammifères, la kinase Plk1 (nommée aussi Plk), est la mieux caractérisée. Le rôle des autres protéine kinases Plks (Plk2, Plk3 et Plk4) reste comparativement peu connu (Barr *et al.*, 2004; Glover *et al.*, 1998; Tong *et al.*, 2002). Nous développerons donc principalement les connaissances relatives à Plk1.

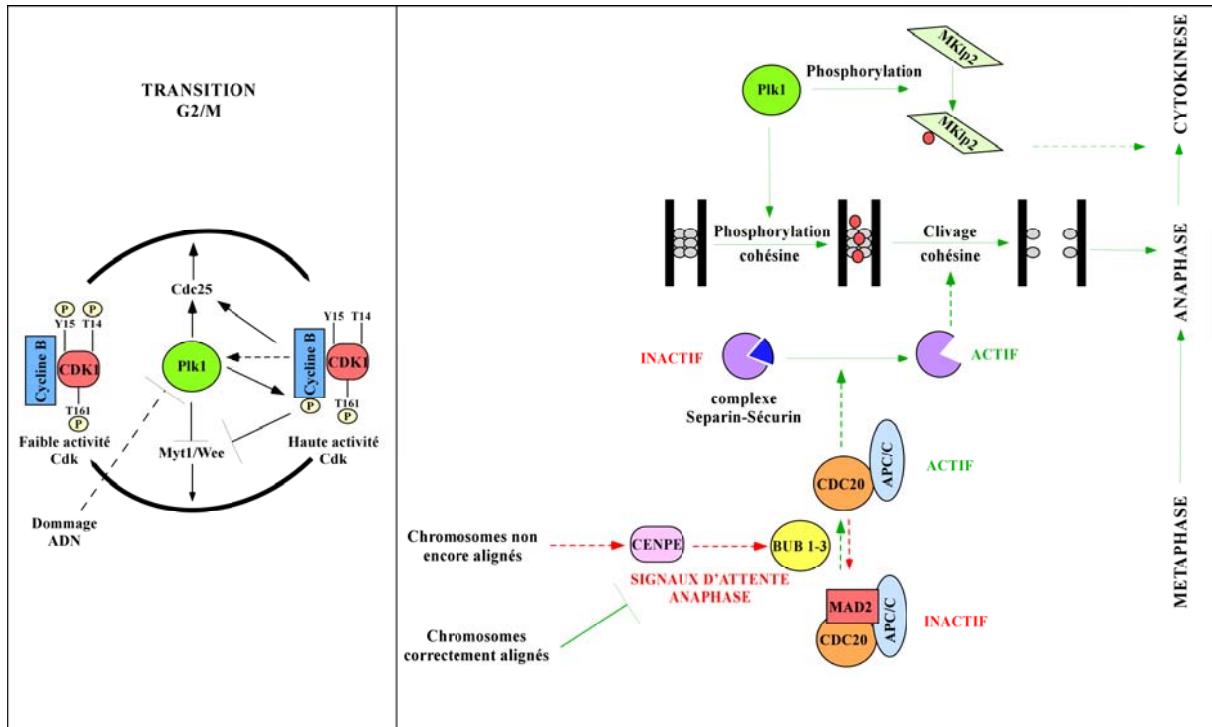
Lors de la transition G2/M, Plk1 contribue à l'activation du complexe CDK1/CyclinB. Plk1 a pour substrats les phosphatases CDC25, qu'elle active et les protéine kinases Myt1 et Wee1 qu'elle inhibe. Il existe deux hypothèses quant aux rôles des Plks à cette étape du cycle cellulaire. Des études proposent les plks comme les protéine kinases à l'origine de l'activation de CDK1. Mais d'autres résultats suggèrent que l'activation des Plks dépend de l'activation de CDK1 et se produit donc postérieurement à celle-ci. Il semblerait au total, que la fonction des Plks en amont ou en aval de l'activation de CDK1 dépende des espèces. Par ailleurs, Plk1 peut phosphoryler la Cycline B1 sur la sérine 133 et la sérine 147. Cette dernière est engagée

dans l'accumulation nucléaire de la Cycline. En revanche, la fonction de la phosphorylation de la sérine 133 demeure inconnue.

De nombreuses études ont identifié différentes fonctions associées à l'activité de Plk1 : l'entrée en mitose (Roshak *et al.*, 2000), l'activation de points de contrôle mitotiques (Smits *et al.*, 2000), la régulation du complexe APC/C (Golan *et al.*, 2002) ; (Kotani *et al.*, 1998), la phosphorylation du protéasome (Feng *et al.*, 2001) ainsi que le cycle des centrosomes (Golsteyn *et al.*, 1995). Plk1 est localisée dans les centrosomes en interphase et s'associe avec les pôles du fuseau mitotique (Golsteyn *et al.*, 1995). Elle contribue à la maturation des centrosomes en participant au recrutement de la γ -Tubuline permettant ainsi, à l'activité de nucléation des centrosomes nécessaire à la formation du fuseau d'augmenter (Lane and Nigg, 1996). De même Plk1 permet de recruter différentes protéines associées aux centrosomes telles que Nlp (Ninein-like protein). Lorsque les cellules entrent en mitose, Plk1 phosphoryle Nlp et permet ainsi la séparation des centrosomes dupliqués (Casenghi *et al.*, 2003). De plus, les Plks pourraient coopérer avec les protéine kinases NIMA dans les centrosomes. En effet l'extrapolation de mécanismes décrits chez *S. Pombe* laisse penser que la kinase Nek2 pourrait phosphoryler diverses protéines cibles dans les centrosomes de mammifères. Ces protéines serviraient d'ancrage aux Plks (Fry *et al.*, 1998; Grallert and Hagan, 2002).

La kinase Plk2 joue elle aussi un rôle important dans le cycle des centrosomes. De récents travaux ont montré que la surexpression de dominants négatifs ou de mutants déficients pour l'activité kinase ainsi que l'utilisation d'ARN interférentiels spécifiques de Plk2 interfère avec la duplication des centrioles (Warnke *et al.*, 2004).

En métaphase, un signal inactive le complexe APC/C tant que tous les chromosomes ne sont pas attachés au fuseau mitotique. Ce signal est transduit notamment par les protéines CENPE et BUB/MAD. Lorsque le dernier chromosome est attaché au fuseau, le signal s'arrête et le complexe APC/C-CDC20 est activé. Il permet l'ubiquitinylation de la séurine qui va être dégradée par le protéasome. La protéase séparase clive alors les cohésines qui maintiennent les chromatides sœurs appariées. Cette protéolyse est facilitée par Plk1 qui phosphoryle les cohésines. L'anaphase peut avoir lieu. L'activité de Plk1 est encore requise en fin de mitose. Elle réalise la phosphorylation de MKlp2 (Mitotic Kinesin-like protein 2) nécessaire à la cytokinèse (Neef *et al.*, 2003). Les fonctions de Plk1 au cours de la mitose sont schématisées dans la figure 9.



F igure 9: Rôles de la protéine kinase Plk1 au cours de la transition G2/M et pendant la mitose.

V.3 Les protéine kinases NIMA :

Des trois familles de protéine kinases mitotiques introduites dans cette partie, la famille des protéine kinases Nrk (NIMA Related Kinases ou protéine kinases de type NIMA) est la moins bien connue. La kinase NIMA a été identifiée la première fois chez *Aspergillus nidulans* en criblant des mutants thermosensibles (Fry and Nigg, 1995; Osmani and Ye, 1996). Certains de ces mutants restaient bloqués en G2 à température restrictive et n'entraient jamais en mitose. Ils furent nommés nim pour « Never In Mitosis ». Le clonage du gène permit d'identifier la protéine sérine/thréonine kinase NIMA dont l'activité est essentielle à l'entrée en mitose. Chez les vertébrés, sept protéine kinases s'apparentant à NIMA ont été identifiées mais les protéines Nek2 sont ses plus proches homologues (Holland *et al.*, 2002; Kandli *et al.*, 2000; Letwin *et al.*, 1992; Levedakou *et al.*, 1994; Schultz *et al.*, 1994; Schultz and Nigg, 1993; Tanaka and Nigg, 1999). Deux isoformes existent grâce à un épissage alternatif : Nek2A et Nek2B. La région N-terminale de ces protéines comprend un domaine kinase dont les motifs sont typiques des Sérine/Thrénine protéine kinases (Hanks and Hunter, 1995). La région C-terminale non catalytique contient un domaine « agrafe à leucine » permettant l'homodimérisation des Nek2 et impliquée dans leur trans-autophosphorylation (Fry *et al.*, 1999). L'activité Nek2 tout au long du cycle cellulaire résulte

des activités cumulées des deux isoformes. Les deux variants sont quasiment indétectables en G1. La présence des deux produits d'épissage augmente pendant la transition G1/S de trois à quatre fois et reste stable durant les phases S et G2. Nek2A disparaît ensuite rapidement au début de la mitose alors que Nek2B est maintenue et ne diminue que lors de la phase G1 suivante. Au total, l'activité Nek2 est faible en G1, augmente en S et G2 et diminue en mitose. La destruction soudaine de Nek2A en mitose est le fait de sa dégradation par le complexe APC/C. Nek2A est en effet une cible pour ce complexe activé soit par Cdc20, soit par Cdh1 car elle possède une D-Box et une KEN-box (Fry *et al.*, 1995; Hames *et al.*, 2001). En outre ces motifs dédiés au contrôle de la protéolyse, le domaine C-terminal de Nek2A contient le motif canonique (KVHF) de liaison à la sous unité catalytique de PP1 (Phosphatase Protein 1) (Cohen, 2002; Garcia *et al.*, 2004; Helps *et al.*, 2000) (voir pp1signature.pasteur.fr réalisé par A. Garcia).

Comme Plk1, Nek2 régule le cycle des centrosomes en permettant leur séparation. Ce rôle est assumé grâce à des interactions avec la phosphatase PP1 et la protéine C-Nap1 (Centrosomal Nek2-Associated Protein 1). Nek2 et C-Nap1 sont co-localisées dans les centrosomes, aux extrémités proximales des centrioles (Fry *et al.*, 1998). Par ailleurs, l'isoforme α de la sous-unité catalytique de PP1 (PP1c) possède également une localisation centrosomale (Andreassen *et al.*, 1998). Ces trois protéines forment un complexe ternaire dans les centrosomes qui s'autorégule : Nek2A peut phosphoryler C-Nap1 et PP1c. Inversement, PP1c peut déphosphoryler C-Nap1 et Nek2A après leur phosphorylation par Nek2A. Récemment, Faragher et Fry ont apporté la première preuve directe que la fonction de Nek2A est nécessaire à la mitose, notamment en permettant la séparation des centrosomes et la formation d'un fuseau bipolaire (Faragher and Fry, 2003). Ils proposent que cette séparation se déroule en deux temps. Dans un premier temps, l'activité de PP1c vis-à-vis de Nek2A serait inhibée suite à la phosphorylation de la phosphatase ou à sa liaison à un inhibiteur. Nek2A ainsi activée conduirait à la perte de cohésion entre les centrioles mère et fille, induite notamment par phosphorylation de C-Nap1. Cette dernière serait dans un deuxième temps déplacée des centrosomes, en partie suite à sa phosphorylation par Nek2A. Cependant, ce modèle n'exclut pas que Nek2A ait d'autres substrats entre les centrioles et que le déplacement total de C-Nap1 ne fasse intervenir d'autres protéine kinases mitotiques. Ce mécanisme est schématisé dans la figure 10.

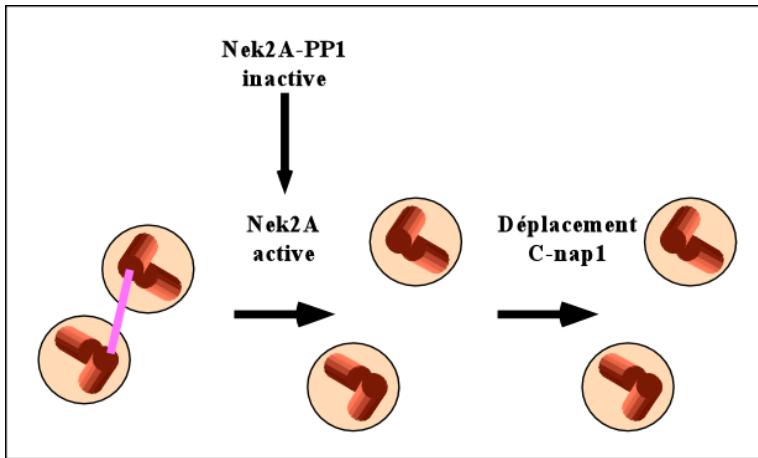


Figure 10: Régulation de la dissociation des centrioles par la protéine kinase Nek2A.

Nek2 est également impliquée indirectement dans la ségrégation de chromosomes. En effet, Nek2 a pour substrat la protéine Hec1 (Highly Expressed in Cancer) (Zheng *et al.*, 1999). Dans les cellules humaines, Hec1 participe au recrutement de protéines telles que Mad1 et Mad2 au niveau des kinétochores (Martin-Lluesma *et al.*, 2002). Au cours de la transition G2/M, Nek2 réalise la phosphorylation de Hec1 qui est essentielle par la suite pour la ségrégation des chromosomes (Chen *et al.*, 2002b). Dans les cellules humaines, une autre kinase de la famille NIMA, Nek6, est requise pour la ségrégation des chromosomes et la progression de la mitose. Contrairement à Nek2, son activité n'est pas indispensable à la transition G2/M. En revanche elle est nécessaire lors de la transition métaphase/anaphase, probablement pour phosphoryler et/ou recruter des constituants des points de contrôle mitotiques (Yin *et al.*, 2003).

V.4 Les protéine kinases Aurora :

Les protéines Aurora-A appartiennent à une famille de Sérine/Thréonine protéine kinases mitotiques découvertes chez *S. cerevisiae* et nommée alors IPL1 pour « Increase In Ploidy 1 » (Francisco and Chan, 1994; Francisco *et al.*, 1994). Des mutants conditionnels *ipl1* thermosensibles présentaient de sévères défauts de ségrégation des chromosomes à 37°C et par conséquent une ploïdie anormale. Si le génome de la levure ne code que pour une kinase (*Ipl1p*) (Goffeau *et al.*, 1996; Hunter and Plowman, 1997), trois membres de cette famille ont d'ores et déjà été identifiés chez les mammifères Aurora-A, B et C (Bischoff and Plowman, 1999; Descamps and Prigent, 2001; Giet and Prigent, 1999; Ke *et al.*, 2003). Chez l'homme, elles sont codées par trois gènes différents : STK6 (appelé aussi STK15) code pour Aurora-A, STK12 pour Aurora-B et STK13 pour Aurora-C. Il existe également un pseudo gène (STK6P). Ces trois protéine kinases sont surexprimées dans de nombreux cancer, en particulier Aurora-A, comme nous le verrons dans le dernier chapitre. De nombreuses nomenclatures sont utilisées pour désigner ces protéine kinases. Par soucis de clarté, nous utiliserons la désignation proposée par Erich Nigg : Aurora-A, B et C (Nigg, 2001). De plus, Aurora-A étant le sujet de notre étude, elle sera présentée de manière détaillée par la suite.

Ces trois protéine kinases observent des localisations différentes et assurent des fonctions cellulaires différentes mais partagent des caractéristiques structurales (figure 11) (Bischoff and Plowman, 1999; Descamps and Prigent, 2001; Giet and Prigent, 1999; Ke *et al.*, 2003). Les protéine kinases Aurora-A, B et C sont de taille différentes mais leurs régions C-terminales comportent un domaine catalytique similaire. Deux motifs très conservés se trouvent dans ce domaine. Le premier est une boucle d'activation dont la séquence est la signature des protéine kinases Aurora. Cette boucle peut être phosphorylée sur la thréonine du motif RxT. Ceci conduit à l'activation de la kinase. Le deuxième motif correspond à une boîte de dégradation putative de type D-Box reconnue par le complexe APC/C/Cdh1. Comme pour la plupart des protéines régulatrices du cycle cellulaire, la dégradation des protéine kinases Aurora constitue un niveau essentiel de la régulation de l'activité kinase. Les régions N-terminale des trois protéine kinases sont de taille variable et ne présentent que peu ou pas de similitudes entre elles. Cependant, trois boîtes conservées ont été identifiées dans cette région : A-boxI, A-boxII, A-boxIII. Bien que la fonction de ces trois boîtes demeure mal comprise, elles semblent être engagées dans la localisation subcellulaire des trois protéine kinases et/ou dans la reconnaissance des substrats. Le rôle de la A-boxII de Aurora-A est

quant à lui l'objet de cette thèse. Nous montrerons que la sérine 51 sur la protéine humaine est engagée dans le contrôle de la dégradation de la kinase.

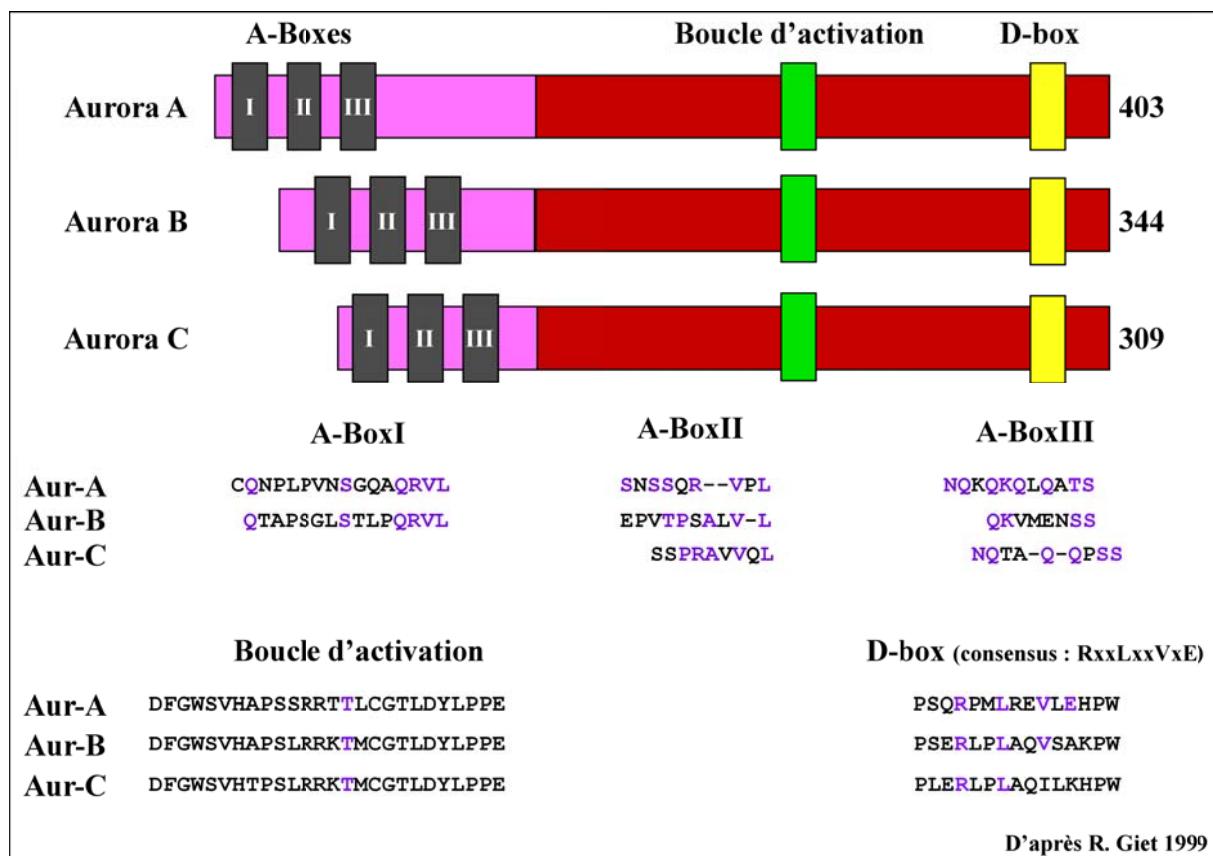
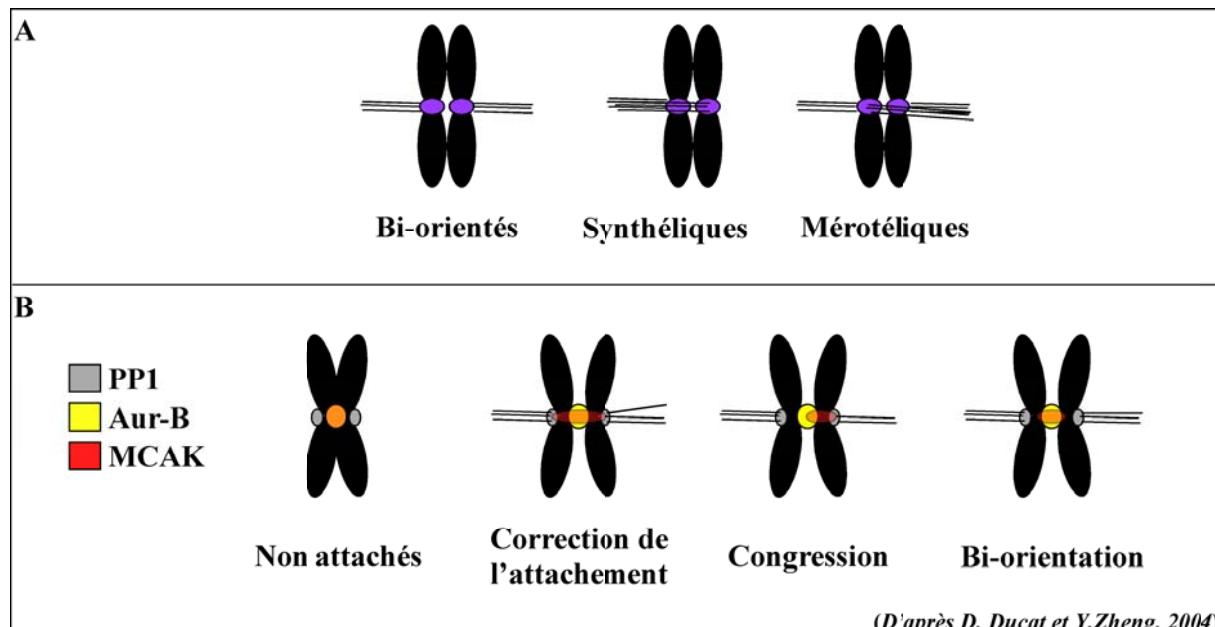


Figure 11: Structures primaires des protéines kinases Aurora.

V.5 Aurora-B :

Les taux de transcrits et de protéines Aurora-B atteignent un pic lors de la transition G2/M. En revanche, l'activité de la kinase augmente plus tard, entre la métaphase et la fin de la mitose (Bischoff *et al.*, 1998; Terada *et al.*, 1998). A la fin de la division cellulaire, la protéine est dégradée par le complexe APC/C/Cdh1. La localisation de Aurora-B est dynamique pendant la mitose. Elle appartient en effet à la famille des protéines passagères qui compte également les protéines INCENP (Inner Centromere Protein) et Survivine (Terada *et al.*, 1998). Aurora-B forme un complexe avec ces protéines. L'activité kinase de Aurora-B est stimulée dans le complexe par INCENP et probablement aussi par Survivine (Adams *et al.*, 2000; Bolton *et al.*, 2002). La localisation du complexe dépend de l'activité de tous ces composants. De récents travaux ont montré qu'une courte séquence C-terminale de Aurora-B était importante pour sa localisation et sa fonction lors de la mitose (Scrittori *et al.*, 2005). Aurora-B se trouve d'abord le long des chromosomes en prophase. Son activité est alors nécessaire à la phosphorylation la sérine 10 de l'histone H3, contrairement à celle de Aurora-A (Adams *et al.*, 2001b; Giet and Glover, 2001; Hsu *et al.*, 2000). Cette phosphorylation est corrélée à la condensation des chromosomes à laquelle elle ne participe que indirectement, par des mécanismes de remodelage de la chromatine (Adams *et al.*, 2001b; de la Barre *et al.*, 2001; MacCallum *et al.*, 2002). Par la suite Aurora-B va se concentrer dans la région des centromères en métaphase. A cette étape, la localisation dépend également de la phosphorylation d'un variant de l'histone H3 requis pour l'assemblage du kinétochore : CENP-A. La kinase Aurora-A phosphoryle CENP-A et permet ainsi le recrutement de Aurora-B au niveau des centromères (Kunitoku *et al.*, 2003). Une fois en place, Aurora-B maintient la phosphorylation de CENP-A sur la sérine 7. En anaphase, Aurora-B gagne la partie centrale du fuseau mitotique pour finalement se retrouver au niveau de l'anneau de division en télophase et cytokinèse (Gruneberg *et al.*, 2004). Cette relocalisation des centromères au fuseau central est caractéristique des protéines passagères et leur permet de coordonner des fonctions dans la condensation, l'alignement et la séparation des chromosomes. Pour cela Aurora-B régule la bi-orientation des chromosomes en empêchant la formation d'attachements mérotéliques (un kinétochore est attaché aux microtubules des deux pôles) ou synthétiques (les deux kinétochères sont attachés aux microtubules d'un même pôle). Cette fonction est assurée en association avec MCAK (Mitotic Centromere Associated Kinesin), un membre de la sous-famille des kinésines KinI qui dépolymérise les microtubules (Andrews *et al.*, 2004; Ducat and Zheng, 2004; Lan *et al.*, 2004). Aurora-B lie et recrute MCAK au centre des centromères non attachés aux microtubules. Aurora-B peut alors

phosphoryler MCAK et inhiber son activité de dépolymérisation. Lorsque les microtubules s'attachent, des forces de tension apparaissent dans les kinétochores et déplacent MCAK par rapport à Aurora-B. MCAK se retrouve alors dans une zone où elle peut être déphosphorylée par PP1 et dépolymériser les microtubules. Ces mécanismes sont schématisés figure 12.



(D'après D. Ducat et Y.Zheng, 2004)

Figure 12: Modélisation des rôles de Aurora-B, PP1 et MCAK dans l'orientation des chromosomes métaphasique. A : Possibilités d'attachement correct et incorrect des kinétochores au fuseau. B : Régulation spatiale de l'activité de MCAK par Aurora-B et PP1 dans l'orientation des chromosomes métaphasiques.

Aurora-B joue également un rôle dans le point de contrôle sur fuseau. En effet de récents travaux ont montré que le maintien de l'association de Mad2 et BubR1 avec les kinétochores nécessitait l'activité de Aurora-B (Ditchfield *et al.*, 2003).

Enfin, le complexe des protéines passagères est nécessaire à la cytokinèse. Lorsque ce complexe se trouve au niveau du corps intermédiaire, Aurora-B phosphoryle deux substrats : La vimentine et MgcRacGap (Male Germ Cell Rac GTPase Activating Protein). En phosphorylant respectivement ces deux substrats, Aurora-B réalise deux modifications nécessaire à la réalisation de la cytokinèse : elle module le réseau de filaments de vimentine et convertit MgcRacGAP en RhoGAP (Minoshima *et al.*, 2003).

V.6 Aurora-C :

Aurora-C est le troisième membre de la famille des protéine kinases Aurora et aussi le moins bien connu (Adams *et al.*, 2001a; Giet and Prigent, 1999). Ses taux d'ARN messagers et de protéines présentent aussi un pic lors de la transition G2/M. Elle se localise dans les centrosomes de l'anaphase lors de la cytokinèse. Son expression est très faible et même parfois indétectable dans certaines lignées. Elle est au contraire très abondante dans le testicule, en particulier lors de la formation des fuseaux de pendant la gaméto-génèse. Une étude récente a montré que lorsque Aurora-C est surexprimée, elle s'apparente à la famille des protéines passagères et que ses fonctions sont redondantes et complémentaires de celles de Aurora-B (Sasai *et al.*, 2004).

CHAPITRE 2 :

LA PROTEINE KINASE AURORA-A : NATURE ET FONCTION D'UN ONCOGENE

I Régulation de l'expression Aurora-A

Les protéine kinases Aurora-A sont des Sérol-Tréonine kinases qui contrôlent de nombreux évènements mitotiques. Paradoxalement, le premier membre, Eg2, a été identifié en criblant une banque d'ADN complémentaires d'œufs de Xénope pour y trouver des ARN messagers déadenylés après la fertilisation (Paris and Philippe, 1990). Par la suite, différents groupes ont permis de comprendre que Eg2 contrôlait la transition G2/méiose I dans les oocytes et régulait le fuseau mitotique dans les œufs chez le xénope (Andresson and Ruderman, 1998; Roghi *et al.*, 1998). Les orthologues de Aurora-A furent découverts chez de nombreuses espèces, dont l'homme. En effet, la kinase fut identifiée comme le produit d'un gène amplifié dans les tumeurs du sein et occupant le locus 20q13. Le nom de BTAK (Breast Tumor Activated Kinase) lui fut alors attribué (Sen *et al.*, 1997).

Ce gène code pour une protéine de 403 acides aminés pour un poids moléculaire de 45.8 kDa chez l'homme. Les cellules mitotiques, embryonnaires ou germinales actives sont riches en transcrits de ce gène (Bischoff *et al.*, 1998; Kimura *et al.*, 1997). Par ailleurs, l'expression de Aurora-A est régulée au cours du cycle cellulaire : les concentrations d'ARN messagers et de protéines ainsi que l'activité kinase sont faibles en G1 et S, atteignent un pic en G2 et M puis diminuent après la mitose (Bischoff *et al.*, 1998; Kimura *et al.*, 1997). La variation du taux de messagers au cours du cycle cellulaire est due, au moins, à la présence de deux éléments cis régulateurs antagonistes dans la partie 5' du promoteur du gène. Le premier contient un motif *ets* reconnu spécifiquement par E4TF1. E4TF1 est un complexe tétramérique nucléaire de la famille des régulateurs transcriptionnels séquence-spécifiques : les protéines ETS. La fixation de E4TF1 augmente l'activité du promoteur et régule positivement la transcription. Le deuxième élément cis-régulateur se trouve en aval du site de liaison *ets*. Il comprend deux éléments répresseurs en tandem connus pour réguler la transcription de nombreux gènes spécifiquement en G2 et M (par exemple la Cycline A). Ces

deux éléments répriment spécifiquement l'expression de Aurora-A en G1/S et sont essentiels pour le contrôle de l'expression en fonction du cycle cellulaire (Tanaka *et al.*, 2002).

II Profil d'expression et localisation subcellulaire :

La protéine kinase Aurora-A appartient au matériel péricentriolaire et sa co-localisation avec la γ -tubuline confirme son appartenance aux centrosomes (Gopalan *et al.*, 1997; Kimura *et al.*, 1999; Roghi *et al.*, 1998). La détection de la protéine fusionnée à la GFP ou par immunofluorescence révèle sa présence en fin de phase S/G2 au niveau des centrosomes dupliqués. Elle reste associée aux centrosomes qui cheminent aux pôles opposés du fuseau mitotique. Le signal dans les centrosomes augmente quand l'enveloppe nucléaire se fragmente et que le fuseau bipolaire se forme. Le signal est maintenu jusqu'au début de la phase G1 suivante lors de laquelle Aurora-A est dégradée (Dutertre *et al.*, 2002; Sugimoto *et al.*, 2002). Il est intéressant de noter que cette localisation ne dépend pas de l'activité kinase (Giet and Prigent, 1998). En revanche, ces auteurs montrèrent plus tard que les domaines N-terminal ou catalytique fusionnés à la GFP pouvaient tous les deux se localiser dans les centrosomes de cellules de Xénope grâce à des mécanismes différents (Giet and Prigent, 2001) : la localisation centrosomale du domaine N-terminal obéit à un mécanisme actif qui dépend de la présence des microtubules. Au contraire, la localisation du domaine C-terminal est indépendante des microtubules mais probablement guidée par l'affinité pour des substrats. La localisation de la protéine entière semble elle aussi indépendante des microtubules. Elle est en effet maintenue dans les centrosomes même en présence de nocodazole qui dépolymérise les microtubules (Roghi *et al.*, 1998). En conclusion, la localisation d'Aurora-A et les fonctions qui lui sont associées reposent probablement en grande partie sur les interactions de la kinase avec ses régulateurs ou ses substrats.

III Régulation de Aurora-A :

L'équipe de Ruderman a mis en évidence que l'activation de Aurora-A nécessitait une ou plusieurs phosphorylations de la protéine (Andresson and Ruderman, 1998). Quelques années plus tard, ce même groupe cartographia trois sites de phosphorylation de Aurora-A : les résidus Ser-51, Thr-288 et Ser-342 de la protéine humaine (soit Ser-53, Thr-295 et Ser-349 de l'orthologue du Xénope) (Littlepage *et al.*, 2002). Chacun de ces acides aminés a ensuite été muté respectivement en alanine ou en acide aspartique. Les mutants ont été exprimés dans des cellules sf9 et leurs activités kinases testées. Les mutations T295A, T295D chez le Xénope abolissent complètement l'activité kinase suggérant que la phosphorylation de cette thréonine est requise pour l'activité de la protéine (Littlepage *et al.*, 2002). Deux autres groupes ont montré que le résidu correspondant de Aurora-A humaine, T288, est également impliqué dans l'activité kinase (Bischoff *et al.*, 1998; Walter *et al.*, 2000). Cette thréonine se situe dans la boucle d'activation de Aurora-A dans une région désordonnée d'un point de vue structural. Des études cristallographiques ont montré que cette phosphorylation pourrait structurer la boucle d'activation et participer ainsi à générer une conformation active (Nowakowski *et al.*, 2002). Le groupe de Conti confirma ceci peu après grâce à l'étude de la structure tridimensionnelle de la protéine humaine phosphorylée sur la thréonine 288, en absence ou en présence de la protéine TPX2 (Bayliss *et al.*, 2003).

III.1 Activation de la protéine par TPX2 :

TPX2 est une protéine associée aux microtubules qui interagit avec Aurora-A pour la localiser au niveau du fuseau. Elle lie et active Aurora-A via sa région N-terminale (Kufer *et al.*, 2002). L'étude structurale révéla qu'en absence de TPX2, la boucle d'activation et le site de liaison du substrat se chevauchent et empêchent la fixation optimale du substrat. De plus, cette conformation facilite la déphosphorylation par PP1 de la thréonine 288 en l'exposant au solvant. Au contraire, La liaison de TPX2 constraint la conformation de la boucle d'activation de telle sorte que la thréonine 288 se trouve protégée de la déphosphorylation (Figure I-9). Cette interaction active donc l'autophosphorylation de Aurora-A sur T288 et verrouille la protéine dans sa conformation active (Bayliss *et al.*, 2003). TPX2 semble être spécifique de l'activation de Aurora-A en dépit de la grande homologie avec la boucle d'activation de Aurora-B. Récemment, le même groupe a montré que la discrimination entre Aurora-A et

Aurora-B par TPX2 repose sur la différence d'un seul acide aminé conservé de la boucle d'activation (Bayliss *et al.*, 2004). L'ensemble de ces données est résumé sur la figure 13.

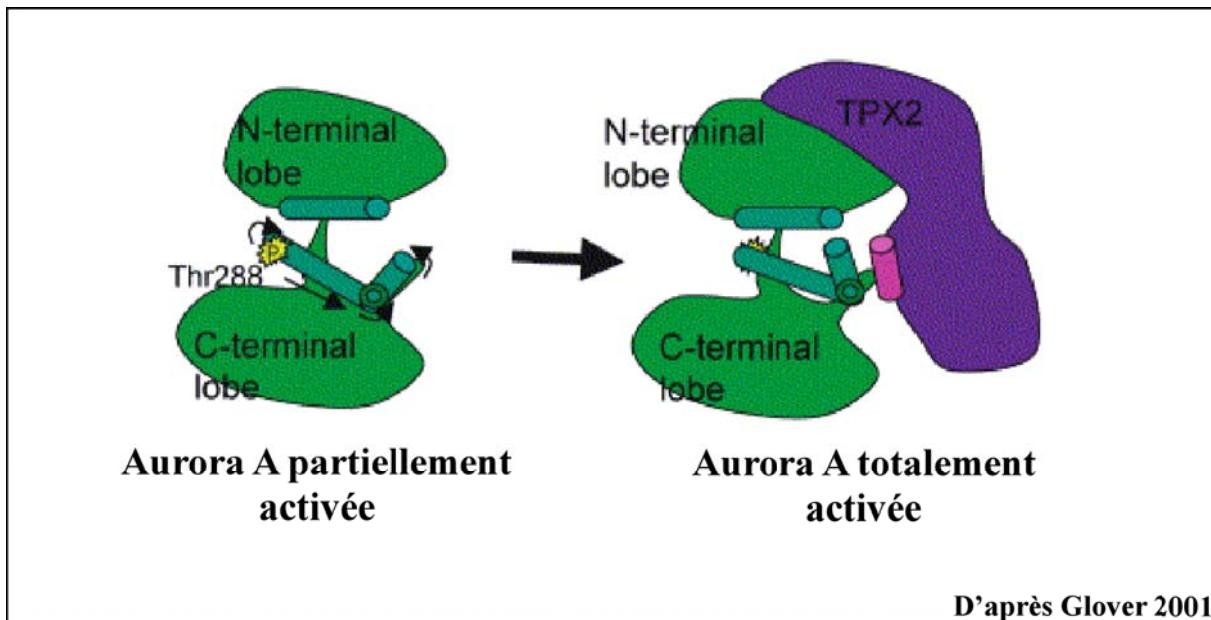


Figure 13: Modélisation de l'activation allostérique de Aurora-A par TPX2.

La mutation de la sérine 349 en acide aspartique inactive complètement la kinase dans les cellules sf9 suggérant que la phosphorylation de cette sérine pourrait réguler négativement l'activité de la kinase. Par ailleurs, elle se trouve immédiatement en amont d'un des sites de liaison à PP1, K³⁵⁰VEF. La phosphorylation de Ser-349 pourrait donc affecter le recrutement ou moduler la force de liaison à PP1 (Littlepage *et al.*, 2002).

III.2 Inhibition de Aurora-A par PP1 et activation par l'inhibiteur de phosphatase I-2:

La protéine phosphatase 1 (PP1) est une Sérine/Theonine phosphatase cellulaire majeure. Elle a un rôle important dans la mitose. PP1 et la kinase Aurora-A sont toutes deux enrichies dans les centrosomes. Une étude *in vitro* a montré que ces deux protéines pouvaient se réguler négativement l'une et l'autre (Katayama *et al.*, 2001). Ce travail a mis en évidence que la structure primaire de Aurora-A présente deux domaines de liaisons à PP1 dans le domaine catalytique : K¹⁶⁹VLF et K³⁵⁰VEF pour la protéine de Xénope. Lorsque ces sites sont mutés, Aurora-A se trouve hyperphosphorylée. PP1 pourrait donc réguler négativement la kinase en déphosphorylant au moins l'un des résidus essentiels à l'activation. Ceci est cohérent avec l'hypothèse suivante : la phosphorylation de la sérine 349 de Aurora-A *in vivo* affecterait la liaison de PP1 et empêcherait donc la déphosphorylation de la thréonine 295. Inversement, Aurora-A phosphoryle et inhibe PP1 *in vitro*. Par ailleurs, nous montrerons dans cette thèse que Aurora-A interagit avec une autre protéine phosphatase, elle aussi localisée dans les centrosomes : PP2A.

La protéine phosphatase PP1 peut être inhibée spécifiquement par une protéine hautement conservée : l'Inhibiteur-2 (I-2) (Huang and Glinsmann, 1976). Cet inhibiteur peut lier stoechiométriquement PP1 et l'inhibe sous sa forme monomérique ou associée à des protéines régulatrices. La forme phosphorylée de I-2 restaure l'activité phosphatase (Ballou *et al.*, 1983; Hemmings *et al.*, 1982; Terry-Lorenzo *et al.*, 2002; Wang and Brautigan, 2002). Dans les cellules HeLa, cette forme est prédominante en mitose et concentrée dans les centrosomes, suggérant une fonction spécifique dans la division (Brautigan *et al.*, 1990; Leach *et al.*, 2003). Il est intéressant de noter que les protéines humaines I-2 et Aurora-A interagissent *in vitro* et *in vivo* (Satinover *et al.*, 2004). Comme TPX2, I-2 peut stimuler allostériquement l'activité de Aurora-A sans augmenter la phosphorylation de la T288 de manière indépendante de la liaison à PP1. La bifonctionnalité de I-2 pourrait permettre de modifier rapidement l'état de phosphorylation de la kinase au cours de la mitose (Satinover *et al.*, 2004).

III.3 Inhibition de Aurora-A par p53 :

P53 est une protéine suppresseur de tumeur qui empêche les cellules mammifères de devenir néoplasiques, notamment en induisant l'apoptose. En réponse à certains stress, elle peut agir en activant la transcription et permettre le déclenchement de mécanismes tels que la réparation de l'ADN ou l'arrêt du cycle cellulaire en G1 ou G2. Elle est impliquée dans les

points de contrôle de la mitose (Hoffseth *et al.*, 2004). Durant cette phase, p53 est en partie associée aux centrosomes où se trouve Aurora-A. Un criblage en double hybride a d'ailleurs montré que ces deux protéines peuvent s'associer chez l'humain (Chen *et al.*, 2002a). Ce travail mit en évidence l'interaction directe de p53 avec le domaine N-terminale de Aurora-A (A-Box III), *in vitro* et *in vivo*. Cette interaction inhibe l'activité kinase de Aurora-A *in vitro*. Les résultats de ce travail suggèrent que p53 régule négativement l'activité transformante de Aurora-A dans les cellules par une interaction directe avec la région N-terminale. Cependant, un travail plus récent réalisé avec les protéines de Xénope montre *in vitro* que p53 peut inhiber le domaine catalytique isolé de Aurora-A. L'inhibition serait donc indépendante de la liaison à la région N-terminale de la kinase. Par ailleurs, l'inhibition de Aurora-A par p53 est levée en présence de TPX2. Ceci suggère que TPX2 et P53 sont en compétition pour la liaison à Aurora-A et vont donc pourvoir induire des fonctions différentes de la kinase selon leurs concentrations respectives et les étapes du cycle cellulaire. Nous discuterons ce point dans le chapitre consacré au cancer.

III.4 Aurora-A et Ajuba :

Récemment, un nouvel activateur essentiel de Aurora-A a été découvert : la protéine AJUBA. Cette protéine contient trois domaines LIM et il a été suggérée qu'elle puisse promouvoir la maturation méiotiques des oocytes de Xénope (Goyal *et al.*, 1999). Les protéines pourvues de domaines LIM sont présentes dans les sites de contact entre les cellules mais peuvent aussi être transportées dans le noyau où elles peuvent activer des processus de différenciation et de croissance cellulaire. Cependant il a été suggéré récemment que les protéines à domaines LIM soient des régulateurs mitotiques. En effet, ces protéines phosphorylées peuvent interagir avec des protéine kinases mitotiques et ainsi participer au contrôle de la mitose (Hirota *et al.*, 2000). Ce dernier groupe a identifié par double hybride Ajuba comme partenaire de Aurora-A. Ajuba interagit avec la région N-terminale de Aurora-A via les domaines LIM-2 et LIM-3 et l'active spécifiquement (Hirota *et al.*, 2003). Cette activation est remarquable par deux aspects : elle correspond à l'activation initiale de Aurora-A et permet le recrutement du complexe CyclineB1/Cdk1 dans les centrosomes où il sera activé. Cette dernière étape permet l'entrée en mitose. Deux hypothèses existent concernant l'activation de Aurora-A par Ajuba : soit Ajuba active allostériquement Aurora-A, soit sa liaison stabilise Aurora-A en participant au maintien la phosphorylation de la Thréonine 288 (Hirota *et al.*, 2003; Walter *et al.*, 2000).

III.5 Régulation de la dégradation Aurora-A :

En plus des mécanismes de régulation de la transcription et du contrôle de l'activité de la protéine, la destruction de la kinase émerge de plus en plus clairement comme un troisième niveau de régulation complexe et finement contrôlé.

La protéine AIP (Aurora-A Interacting Protein) a été identifiée chez la levure comme un régulateur négatif de la kinase Aurora-A. Cette protéine nucléaire exprimée de façon ubiquitaire interagit avec Aurora-A via son domaine C-terminal et active la dégradation de la kinase par la voie du protéasome. Cependant, il semble difficile de montrer l'interaction entre la protéine AIP transfectée et Aurora-A endogène dans des cellules mammifères (Kiat *et al.*, 2002).

Les membres de la famille Aurora-A possèdent des séquences spécifiques requises pour la dégradation en fin de mitose : le motif KEN, la A box et la D box (Glotzer *et al.*, 1991; King *et al.*, 1996; Littlepage and Ruderman, 2002; Pfleger and Kirschner, 2000). La A box a été récemment découverte par le groupe de Ruderman (Littlepage and Ruderman, 2002). Le fait que cette protéine possède à la fois un motif KEN et une D box (en fait trois séquences de dégradation potentielles) est inhabituel. Avant la mise en évidence de la A box, plusieurs groupes apportaient déjà des arguments qui suggéraient une succession d'événements aboutissant à la destruction de la kinase. Tout d'abord la suppression de la séquence KEN ne bloque pas la destruction et aucune des D box n'est requise pour l'ubiquitination *in vitro* (Arlot-Bonnemains *et al.*, 2001; Honda *et al.*, 2000). De plus, pour stabiliser totalement la protéine, il faut supprimer au moins deux D-box, dont la D box C-terminale (Arlot-Bonnemains *et al.*, 2001). Au contraire, il suffit de muter seulement la D-box de la région C-terminale pour empêcher complètement la dégradation, ce qui suggère un processus ordonné (Castro *et al.*, 2002). Le travail de l'équipe de Ruderman sur la protéine de Xénope confirma la nécessité de la D-box C-terminale pour la destruction de la kinase en fin de mitose/début de G1 (Littlepage and Ruderman, 2002). Le résidu R378 de cette boîte fonctionne comme un signal de reconnaissance spécifique de APC/C activé par Cdh1. Par ailleurs, ils identifièrent un autre signal de reconnaissance de APC/C/Cdh1, conservé chez les vertébrés sur Aurora-A mais pas Aurora-B et C : la A box (ainsi nommée car spécifique de Aurora-A). Cette séquence n'est pas présente sur Aurora-B et C. Elle inclut une sérine phosphorylée pendant la mitose (S53 chez le Xénope, S51 chez l'homme) (Littlepage and Ruderman, 2002). Ils proposèrent alors un modèle de dégradation ordonnée de Aurora-A dans lequel la phosphorylation de cette sérine conservée régulerait négativement la dégradation de la kinase jusqu'aux dernières étapes de la mitose. Ce même groupe confirma récemment que la A box

et la D box étaient nécessaires à la destruction de Aurora-A humaine *in vitro*. Leurs résultats semblent indiquer que la dégradation d'Aurora-A est spécifique de APC/C activé par Cdh1. La reconnaissance de la protéine humaine par ce complexe dans des extraits d'œufs de Xénope dépend de quatre résidus de la A box : Q⁴⁵RVL. Enfin, la mutation S51D et non S51A de la protéine Aurora-A recombinante bloque complètement la dégradation dans des extraits d'œufs de Xénope mis en présence de Cdh1. Ceci semble confirmer l'hypothèse que la phosphorylation de la sérine 51 de la A box empêche la dégradation de la protéine. Nous verrons dans cette thèse que la mutation S51D stabilise la protéine *in vivo* dans des cellules de mammifères.

IV Fonctions de Aurora-A au cours de la mitose

IV.1 Aurora-A et le cycle des centrosomes :

De nombreux travaux réalisés chez différentes espèces ont permis de montrer que la kinase Aurora-A est essentielle pour le cycle des centrosomes. Elle participe en effet à chaque étape de ce cycle : la duplication puis la séparation des centrioles et enfin la maturation des centrosomes. Nous avons vu précédemment que Aurora-A apparaît dans les centrosomes après la duplication des centrioles. Son rôle n'affecte donc probablement pas le mécanisme duplicitif en lui-même. En revanche, la surexpression de la protéine sauvage ou déficiente pour l'activité kinase conduit à une augmentation du nombre des centrosomes dans des cellules en culture (Meraldi *et al.*, 2002; Zhou *et al.*, 1998). Ceci suggère que la kinase pourrait contrôler un inhibiteur de la duplication de telle sorte que cet évènement ne se produise qu'une fois par cycle cellulaire.

Les centrioles dupliqués doivent ensuite se séparer pour former un fuseau bipolaire fonctionnel. Or, la mutation de Aurora-A chez la drosophile ou l'inhibition de la kinase dans des extraits d'œufs de Xénope conduit à la formation d'un fuseau monopolaire (Glover *et al.*, 1995; Roghi *et al.*, 1998). La formation de ce type de fuseau résulte de l'incapacité des centrioles à se séparer après leur duplication (Giet *et al.*, 2002). En effet certains substrats de Aurora-A sont nécessaires à l'étape de séparation. Chez le Xénope, Aurora-A phosphoryle Eg5, une protéine apparentée à la famille des kinésines et impliquée dans la séparation des centrosomes (Blangy *et al.*, 1995; Whitehead and Rattner, 1998; Whitehead *et al.*, 1996). L'inhibition de Eg5 ou de Aurora-A chez le Xénope et la drosophile empêche la séparation

des centrosomes (Glover *et al.*, 1995; Roghi *et al.*, 1998). Il est donc probable que la phosphorylation de Eg5 par Aurora-A soit nécessaire à cette étape. Par ailleurs, un travail récent réalisé dans les cellules HeLa a permis de formuler une hypothèse intéressante concernant le rôle de Aurora-A dans la séparation des centrioles. La réduction de l'activité kinase en fin de G2 soit par siRNA, soit par microinjection d'anticorps anti Aurora-A, altère la séparation des centrioles (Marumoto *et al.*, 2003). Les auteurs proposent que Aurora-A coopère avec la kinase Nek2 pour activer la protéine C-Nap1, responsable de la dissociation des centrioles. En effet, Aurora-A activée par Ajuba permet le recrutement et l'activation initiale du complexe CyclinB1/Cdk1 dans les centrosomes (Hirota *et al.*, 2003). L'activation de ce complexe permet notamment d'activer la kinase Nek2 en inhibant la protéine phosphatase PP1 (Fry *et al.*, 1998; Mayor *et al.*, 2000). Nek2 peut alors promouvoir la séparation des centrioles via C-Nap1.

En outre ses fonctions dans la duplication et la dissociation des centrosomes, Aurora-A est impliquée dans la maturation des centrosomes. La maturation est une étape cruciale de recrutement de protéines qui vont contribuer à la structure et la fonction des centrosomes. De nombreuses études réalisées chez divers organismes prouvent que Aurora-A est nécessaire au recrutement de la γ -tubuline. Chez *Caenorhabditis elegans*, Aurora-A permet le recrutement de la γ -tubuline et de deux composants du matériel péri centriolaire : ZYG9 et CeGrip (Hannak *et al.*, 2001). De même, des mutants de Aurora-A chez la drosophile présentent des défauts de maturation des centrosomes et sont inaptes au recrutement de la γ -tubuline et de la centrosomin (CNN) qui est indispensable à l'assemblage du fuseau mitotique et de ses pôles (Berdnik and Knoblich, 2002). Aurora-A lie également le complexe D-TACC/MSPS (Drosophila Acidic Coiled coil/Minispindles (Giet *et al.*, 2002). Ces résultats ont été confirmés dans les cellules mammifères et suggèrent que l'un des rôles de Aurora-A dans les centrosomes est de réguler leur maturation (Terada *et al.*, 2003). En effet, grâce à son interaction avec CNN, elle peut cibler le recrutement de la γ -tubuline et organiser des sites de nucléation des microtubules.

IV.2 Régulation de l'activité de Aurora-A et assemblage du fuseau :

Comme beaucoup d'évènements cellulaires, la formation du fuseau mitotique est régulée par des phosphorylations et déphosphorylations. La voie de signalisation Ran est extrêmement importante dans ce processus et contribue notamment à réguler la balance entre Aurora-A et son inhibiteur PP1 (Kufer *et al.*, 2003; Trieselmann *et al.*, 2003; Tsai *et al.*, 2003). La GTPase Ran essentielle dans le transport nucléocytoplasmique. Elle est liée au GDP dans le cytoplasme et celui-ci est échangé en GTP dans le noyau par RCCI, un facteur d'échange de guanine (GEF). Ce facteur d'échange est associé aux chromosomes. Ceci va permettre de maintenir un gradient de RanGTP, même après rupture de l'enveloppe nucléaire. RanGTP a une forte affinité pour l'importine β , un récepteur impliqué dans l'import nucléaire. En liant l'importine β , RanGTP va entraîner la dissociation des protéines liées à l'importine α/β qui se retrouvent alors libres dans le noyau. C'est le cas en particulier de TPX2 et de NuMa, deux protéines impliquées dans la formation du fuseau et des asters. TPX2 va alors pourvoir inhiber PP1 et activer Aurora-A. En retour, la kinase va alors pouvoir phosphoryler ses substrats dont Eg5 qui forme et maintient le fuseau bipolaire. Ce mécanisme, schématisé figure 14, existe dans les extraits d'œufs de xénope et reste à confirmer dans les cellules somatiques.

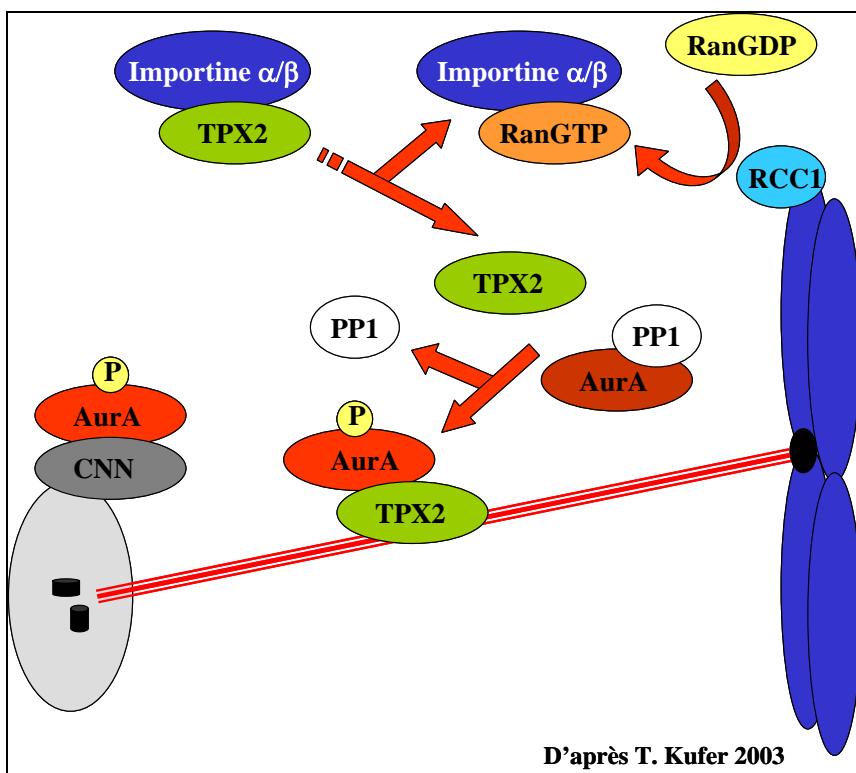


Figure 14 : Modélisation de l'activation de Aurora-A sur le fuseau.

IV.3 Aurora-A et la transition G2/M :

Différentes études indiquent que l'activité de Aurora-A est l'un des éléments de contrôle de la transition G2/M. La kinase semble participer à l'activation du complexe CyclineB/Cdk1 et à la régulation du point de contrôle G2/M. En effet, l'inhibition de l'activité de Aurora-A par injection d'anticorps ou par l'utilisation de siRNA retardent significativement l'entrée en mitose (Marumoto *et al.*, 2002; Marumoto *et al.*, 2003). Plusieurs raisons expliquent ce phénomène. En premier lieu, Aurora-A phosphoryle *in vitro* et *in vivo* la protéine phosphatase CDC25B. Nous avons précédemment décrit que CDC25B est responsable de l'activation de Cdk1 nécessaire à l'entrée en mitose. Aussi, lorsque Aurora-A est inhibée ou absente, cette activation ne peut avoir lieu dans les centrosomes et la mitose est retardée (Dutertre *et al.*, 2004). Aurora-A, CDC25B et Plk1 pourraient coopérer pour activer le complexe CyclineB/Cdk1 et amorcer la mitose.

Par ailleurs, Aurora-A a aussi pour substrat dans les centrosomes le suppresseur de tumeur BRCA1 (Breast Cancer 1) (Ouchi *et al.*, 2004). La phosphorylation de résidus spécifiques de BRCA1 est impliquée dans la survie des cellules dont l'ADN a été endommagé : BRCA1 est le substrat de protéine kinases telle que ATM, ATR et Chk2 impliquées dans la machinerie des points de contrôle de l'ADN lors de la transition G2/M (Cortez *et al.*, 1999; Gatei *et al.*, 2001; Tibbetts *et al.*, 2000). Aurora-A pourrait être un composant de cette machinerie en participant à la phosphorylation de substrats essentiels à la survie cellulaire.

IV.4 Aurora-A et le déroulement de la mitose :

Une récente étude a mis en évidence que la kinase Aurora-A était essentielle dans les cellules de mammifères tout au long de la division cellulaire, jusqu'au début du cycle cellulaire suivant. En utilisant les techniques de micro injection d'anticorps et de siRNA dans des cellules de mammifères , Marumoto et ses collaborateurs ont montré que Aurora-A jouait un rôle tout au long de la division cellulaire, jusqu'au cycle cellulaire suivant. En particulier, la kinase est impliquée dans l'alignement des chromosomes sur la plaque métaphasique. En effet, l'inhibition de la kinase après la séparation des centrosomes conduit à un mauvais alignement des chromosomes (Marumoto *et al.*, 2003). Le rôle de Aurora-A dans l'attachement des kinétochores aux microtubules et la ségrégation des chromosomes avait

déjà été suggéré chez la levure. Il serait donc possible au Aurora-A coopère avec Aurora-B pour réguler l'attachement des kinétochores aux microtubules (Marumoto *et al.*, 2003). Dans ces cellules, le fuseau ne présente pas d'anomalies morphologiques particulières dans sa composition en microtubules. Cependant, il est possible que la dérégulation de la kinase interfère avec la dynamique de formation fuseau via la voie contrôlée par RanGTP.

Enfin, la dérégulation de Aurora-A par injection d'anticorps et siRNA mène à la formation de cellules multinucléées. Ces cellules n'achèvent pas leur cytodierèse (Marumoto *et al.*, 2003). De plus, les centrioles ne sont pas répartis uniment dans les centres organisateurs des microtubules de ces cellules. Or, la centriole mère participe à l'achèvement de la mitose en provoquant le relâchement des microtubules du corps intermédiaire en fin de mitose. (Piel *et al.*, 2000). Ces résultats indiquent que Aurora-A pourrait être impliquée dans la voie de signalisation qui induit l'achèvement de la mitose (Marumoto *et al.*, 2003).

CHAPITRE 3 :

LES PROTEINE PHOSPHATASES PP2A

I Les familles de protéine phosphatases :

Trois familles de protéine phosphatases existent chez les eucaryotes et diffèrent par leurs natures et leurs fonctions. Deux gènes ancestraux ont donné naissance à ces trois familles. Le premier gène ancestral est le prototype des protéine Sérine/Thréonine phosphatases des familles PPP et PPM. Le second a donné les Tyrosine protéine phosphatases de la famille PTP (Barford, 1996; Shenolikar, 1994). Chez les eucaryotes, les protéine phosphatase les plus nombreuses appartiennent à la famille PPP qui comprend PP1, PP2A, PP2B, PP4, PP5, PP6 et PP7. La protéine phosphatase PP2C et les enzymes bactériennes telles que PrpC et SpoII sont quant à elles des membres de la famille PPM (Barford, 1996). Ces deux grands groupes de protéine phosphatases ont des domaines catalytiques conservés au sein d'une même famille mais diffèrent globalement d'un point de vue structurale et enzymatique (Barford, 1996; Shenolikar, 1994; Wera and Hemmings, 1995). Compte tenu de l'importance des informations relatives à chaque famille nous développerons dans cette partie uniquement les connaissances concernant les protéine phosphatases de la famille PP2A, ses fonctions et implications dans le cycle et la division cellulaires.

II Structure des protéine phosphatases de la famille PP2A

Les protéine phosphatases de type 2A (PP2A) sont largement décrites comme des Sérine/Thréonine phosphatases majeures du règne eucaryote. Ces enzymes se retrouvent *in vivo* sous la forme d'un dimère (PP2A_D) ou d'un trimère (PP2A_T) (Cohen, 1997; Zolnierowicz, 2000). Le dimère se compose d'une sous unité catalytique PP2AC de 36 kDa liée à une sous unité structurale de 65 kDa, PR65 (sous unité A). PP2AC peut aussi lier la protéine alpha 4, orthologue de la protéine Tap42 de levure impliquée dans la voie de signalisation TOR (Target Of Rapamycin). Le dimère PR65/A-PP2AC ("core dimer" ou

dimère de cœur) peut interagir avec une troisième sous unité régulatrice dont la nature peut varier (Cohen, 1997; Zolnierowicz, 2000). Il existe différentes isoformes de chacune des sous unités du complexe comme nous le verrons par la suite. Ceci permet de générer un très grand nombre d'holoenzymes différentes en terme de nature, structure et fonction (voir figure 16).

II.1 La sous unité catalytique de PP2A :

La sous unité PP2AC est responsable de l'activité de la famille des protéine phosphatases de type 2A. PP2AC, qui est l'une des enzymes les plus conservées (Cohen *et al.*, 1990b), est une metalloenzyme contenant des ions Fe^{2+} et Zn^{2+} (Nishito *et al.*, 1999a; Nishito *et al.*, 1999b). Deux gènes codent pour deux isoformes PP2AC α et PP2AC β qui partagent 97 % d'homologie chez les mammifères (Arino *et al.*, 1988; Stone *et al.*, 1987). Chez l'homme, le gène situé sur le locus 5q23-q31 code pour l'isoforme α alors que l'isoforme β est codée par un gène localisé en 8p12-p11.2 (Khew-Goodall *et al.*, 1991). L'activité du gène codant pour PP2AC α est 7 à 10 fois plus importante que celle du gène de PP2AC β . Tous deux s'expriment de façon ubiquitaire et très fortement dans le cerveau et le cœur (Khew-Goodall and Hemmings, 1988). L'acuité du contrôle de l'expression de PP2AC permet de maintenir le taux de protéine constant dans les cellules mammifères et impose des contraintes considérables à sa surexpression. Malgré l'existence d'un vecteur permettant la stabilisation de la protéine dans les cellules, il est extrêmement difficile de réaliser des transfections stables de cellules surexprimant la protéine (Wadzinski *et al.*, 1992). Baharians et ses collaborateurs ont en effet montré qu'en dépit d'une augmentation du taux de messagers de PP2AC due à la surexpression, le taux de protéine restait constant. En revanche, l'inhibition de l'activité phosphatase dans les cellules par traitement à l'acide Okadaïque conduit à l'augmentation de la synthèse de PP2AC endogène. Ces travaux montrent l'existence d'un mécanisme d'autorégulation du contrôle de l'expression de PP2AC au niveau traductionnel (Baharians and Schonthal, 1998). Cependant, d'autres études caractérisèrent des variations des taux d'expression de PP2AC au cours de la différenciation des cellules HL-60 (Nishikawa *et al.*, 1994; Tawara *et al.*, 1993) et des adipocytes (Altiok *et al.*, 1997) ainsi que dans les macrophages stimulés par le CSF (colony stimulating factor) (Wilson *et al.*, 1999).

II.2 La sous unité structurale PR65/A :

La sous unité catalytique PP2AC s'associe à une sous unité structurale A ou PR65 et forme un dimère pouvant lier une sous unité régulatrice B. Deux isoformes de PR65/A codées par deux gènes existent dans les cellules mammifères : A α et A β . Elles partagent 86 % d'homologies et sont exprimées de façon ubiquitaire (Hemmings *et al.*, 1990). PR65/A est composée de 15 motifs HEAT (Huntingtin Elongation A subunit Target of rapamycin) riches en leucine. Deux hélices α connectées par une boucle constituent chaque motif HEAT qui est relié au suivant également par une boucle (Groves *et al.*, 1999). Les motifs HEAT sont généralement impliqués dans les interactions protéine/protéine. Ainsi, les sous unités B régulatrices lient les répétitions 1 à 10, les antigènes T s'associent aux répétitions 2 à 8 et les sous unités catalytiques aux motifs 11 à 15 (Ruediger *et al.*, 1994; Ruediger *et al.*, 1992) (Figure 15). Grâce à ses propriétés structurales, la sous unité PR65/A régule l'holoenzyme de deux manières. D'une part elle maintient sa structure (Ruediger *et al.*, 1994; Ruediger *et al.*, 1992), d'autre part elle module la spécificité de la sous unité catalytique vis-à-vis de substrats en absence en sous unité B régulatrices (Price and Mumby, 2000; Yang *et al.*, 1991).

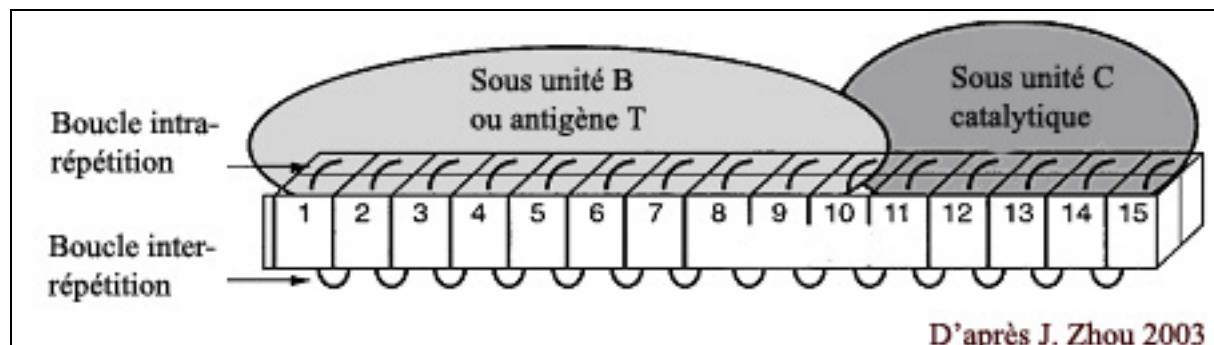


Figure 15: Modélisation des sites de liaison des différentes sous unités des holoenzymes PP2A.

Des différences significatives caractérisent les deux isoformes A α et A β . De récents travaux ont montré que A β présente une extension N-terminale de 12 acides aminés absente dans A α . Ces résidus se retrouvent dans les protéines murines et porcines mais pas chez le Xénope (Zhou *et al.*, 2003). Cette extension semble donc avoir été acquise au cours de l'évolution des mammifères, probablement pour lier des sous unités régulatrices spécifiques. Par ailleurs, cette étude *in vivo* a mis en évidence que les deux isoformes sont exprimées de manière constante au cours du cycle cellulaire mais les niveaux sont différents pour les deux isoformes (Zhou *et al.*, 2003). A α est 10 à 100 fois plus abondante dans les cellules et tissus

testés que A β suggérant que ces isoformes ont des fonctions qualitativement différentes. Notamment, A β est fortement exprimée dans les testicules où elle pourrait jouer un rôle dans la spermatogénèse. Enfin, A α et A β diffèrent dans leurs capacités à lier les sous unités B et C : A β ne peut pas lier B α et s'associe moins facilement que A α à B', B''/PR72, C α et C β . Par ailleurs, la protéine SV40 (Simian Virus 40) small-t (petit t) interagit seulement avec A α mais pas A β . L'activité transformante liée à l'antigène petit t de SV40 serait donc médiée par l'holoenzyme A α /small-t/C (Zhou *et al.*, 2003).

II.3 Les sous unités régulatrices :

Grâce aux motifs HEAT de la sous unité A, le dimère PP2A_D peut lier différentes sous unités régulatrices, apparentées ou non entre elles et générer ainsi près de 70 holoenzymes différentes, au moins en théorie. Comme nous l'avons vu précédemment, ces sous unités lient des sites identiques ou chevauchants rendant ainsi leur interaction mutuellement exclusive (Ruediger *et al.*, 1994; Ruediger *et al.*, 1992). Les sous unités jusqu'alors identifiées peuvent être regroupées en familles.

II.3.a La famille B ou PR55 :

Quatre gènes, *PR55 α* , *PR55 β* , *PR55 γ* et *PR55 δ* codent pour quatre isoformes d'une sous unité de 55 kDa : les sous unités PR55 α et PR55 δ sont exprimés uniformément dans tous les tissus alors que PR55 β et PR55 γ sont enrichies dans le cerveau (Healy *et al.*, 1991; Mayer *et al.*, 1991; Strack *et al.*, 1999; Zolnierowicz *et al.*, 1994). Les protéines PR55 présentent toutes une séquence conservée minimale de 40 acides aminés, appelée WD-40 et connue pour permettre des interactions protéine/protéine (Neer *et al.*, 1994). En particulier PR55 α et PR55 β sont les cibles, via ce domaine, des récepteurs TGF- β (Transforming Growth Factor) de type I à activité kinase (Griswold-Prenner *et al.*, 1998).

Par ailleurs, cette famille PR55 s'est révélée impliquée chez différentes espèces dans différentes étapes de la mitose et la régulation du cytosquelette comme nous le verrons plus tard.

II.3.b La famille B' ou PR56/61 :

Cette famille comporte un nombre considérable de protéines régulatrices différentes. Cinq gènes différents codent pour les membres de cette famille : α , β , γ , δ , et ε (Csorthos *et al.*, 1996; McCright and Virshup, 1995; Zolnierowicz *et al.*, 1996). De plus, chez l'Homme, il existe deux isoformes $\beta 1$ et $\beta 2$ produites à partir du gène $B'\beta$ et au moins trois variants d'épissage $\gamma 1$, $\gamma 2$ et $\gamma 3$ de $B'\gamma$ (Csorthos *et al.*, 1996). Malgré la diversité de la famille B', la région centrale de chaque protéine est hautement conservée, contrairement aux extrémités N et C-terminales, suggérant qu'elle est impliquée dans la liaison au dimère de cœur. Les extrémités seraient elles engagées dans la spécificité de localisation des protéines soit nucléaire (PR61 $\gamma 1$, PR61 $\gamma 2$, PR61 $\gamma 3$, PR61 δ) soit cytoplasmique (PR61 α , PR61 β , PR61 ε , PR61 δ). Par ailleurs, il a été montré par northern blot les différentes sous unités B' s'expriment spécifiquement dans certains tissus : PR61 α , PR61 $\gamma 1$ et PR61 $\gamma 3$ se retrouvent majoritairement dans le cœur (McCright and Virshup, 1995; Tehrani *et al.*, 1996) et le muscle squelettique ; PR61 β et PR61 δ dans le cerveau (Csorthos *et al.*, 1996; McCright and Virshup, 1995).

Les holoenzymes PP2A formées des sous unités de cette famille sont engagées dans la progression en G1 en s'associant avec la Cycline G (Okamoto *et al.*, 1996) et dans la déphosphorylation de composants spécifiques de la voie de signalisation Wnt (Seeling *et al.*, 1999).

II.3.c La famille B'' ou PR48/59/72/130 :

Les membres fondateurs de cette famille, PR72 et PR130 furent clonés respectivement dans des banques de muscle cardiaque et de cerveau humain (Hendrix *et al.*, 1993). Ces protéines diffèrent par leur extrémité N-terminale et pourraient provenir de l'épissage alternatif d'un même gène. PR72 est exprimée exclusivement dans le cœur et le muscle squelettique. L'expression de PR130 y est également très forte mais se retrouve dans tous les autres tissus testés (Hendrix *et al.*, 1993). Des expériences de criblage en double hybride révélèrent par la suite l'existence de deux autres membres de cette famille : PR59 et PR58 (Voorhoeve *et al.*, 1999; Yan *et al.*, 2000). Contrairement à PR72, PR59 n'est pas exprimée dans le muscle squelettique mais dans les reins, le foie, le cerveau, le cœur et le poumon. PR72 s'associe avec la protéine p107 du rétinoblastome et participe ainsi à la progression du cycle cellulaire (Voorhoeve *et al.*, 1999). PR48 se localise quant à elle dans le noyau (Yan *et al.*, 2000). Par ailleurs, les holoenzymes contenant les protéines de la famille B'' sont connues

pour activer la réPLICATION du virus SV40 contrairement aux sous unités de type PR55/B qui l’INHIBE (Cegielska *et al.*, 1994).

II.3.d La famille B''' ou PR93/110 et les protéines virales :

Une nouvelle famille de protéine s’associant à PP2A a été découverte par Moreno et ses collaborateurs. Ils utilisèrent pour cela un anticorps anti pan-B' dirigé contre l’épitope WD-40 conservé et commun aux sous unités B' (Moreno *et al.*, 2000). Grâce à cet anticorps, ils identifièrent à partir de lysats de cellules NIH3T3 deux protéines respectivement de 93 et 110 kDa co-immunoprécipitées avec la sous unité catalytique de PP2A. Il s’agissait des protéines striatine (PR110) et de l’autoantigène nucléaire S/G2 (SG2NA ou PR93) connues toutes deux pour lier la calmoduline de manière dépendante du calcium. PR93 et PR110 pourraient avoir un rôle d’adressage et de maintien de la structure des complexes PP2A dans les voies de signalisation dépendante du calcium (Moreno *et al.*, 2000).

Enfin, certaines protéines virales telles que l’antigène small-t du virus SV40 ou les antigènes small-t et middle T du polyoma virus (PV) peuvent s’associer à PP2A en se substituant aux sous unités régulatrices (Pallas *et al.*, 1990). Il a notamment été montré que cette inhibition participe à promouvoir la transformation et la prolifération cellulaire en activant constitutivement la protéine kinase C ζ (PKC ζ) et NF- κ B (Sontag *et al.*, 1997). D’autres protéines virales s’associent au complexe PP2A et modulent son activité. C’est le cas de E4/orf4 de l’adénovirus (Kleinberger and Shenk, 1993) ou du complexe formé de NCp7 et Vpr toutes deux codées par le virus VIH (Virus de l’Immunodéficience Humaine) (Tung *et al.*, 1997). La protéine phosphatase PP2A est une cible privilégiée des virus en vertu de son rôle majeur dans la transduction du signal chez eucaryotes : PP2A antagonise et/ou contrôle l’activité de nombreuses familles de protéine kinases. La diversité des complexes PP2A pouvant être formés par l’ensemble des sous unités présentées est schématisé figure 16.

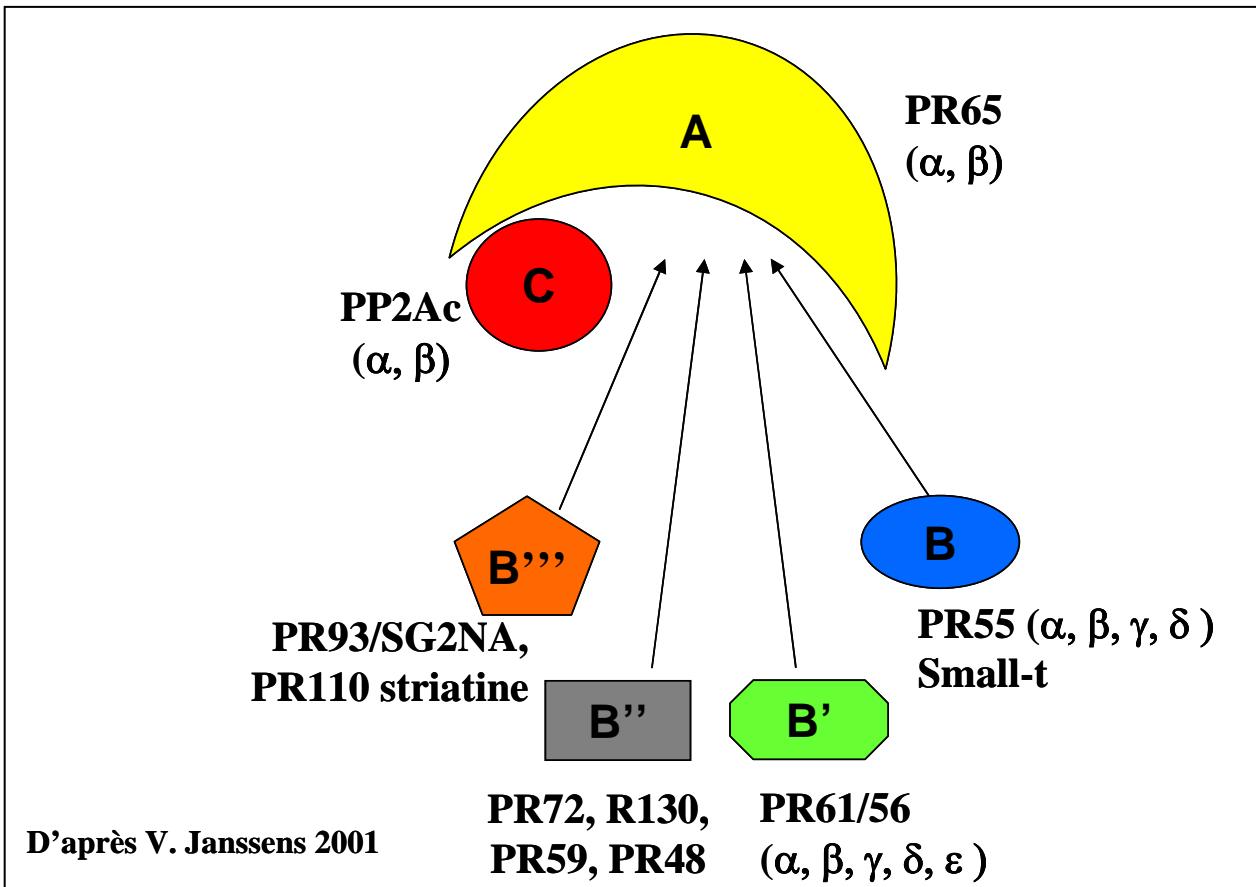


Figure 16: Modélisation de la structure de PP2A

III Régulation de l'activité de PP2A : relation entre structure et fonction

III.1 Régulation par les composants de l'enzyme :

Nous avons vu précédemment que l'expression des différentes sous unités catalytiques, structurales et régulatrices de l'enzyme est très finement régulée et contrôlée. Cette régulation concerne aussi bien le taux et le patron d'expression de ces gènes que les mécanismes d'épissage et de traduction qui les caractérisent. L'ensemble de ces mécanismes constitue donc un premier niveau de régulation de l'holoenzyme.

Un deuxième niveau de régulation résulte des propriétés propres des constituants du complexe enzymatique. Tout d'abord, la spécificité d'expression des sous unités régulatrices (B , B' , B'' et B''') va permettre d'adresser les complexes vers des localisations tissulaires ou subcellulaires spécifiques (Nagase *et al.*, 1997; Strack *et al.*, 1998). Deuxièmement, ces sous unités vont conférer aux complexes qu'elles composent une spécificité de substrats *in vitro* et, au moins pour certaines, *in vivo*. Nous aborderons certaines de ces spécificités dans le cadre de l'étude qui nous intéresse. Néanmoins, des études *in vitro* ont révélé que le monomère PP2AC était plus actif que le dimère PP2AD vis-à-vis de phosphoprotéines et que cette tendance est inversée s'agissant de phosphopeptides (Agostinis *et al.*, 1987; Turowski *et al.*, 1997). De même, la métalloprotéine PR65/A en présence de polycations accroît l'activité de PP2AC et non de PP2AD vis-à-vis des phosphoprotéines (Agostinis *et al.*, 1990; Agostinis *et al.*, 1987).

III.2 Régulation par des modifications post-traductionnelles :

Deux types de modifications peuvent affecter l'activité de PP2A : des phosphorylations réversibles sur des résidus tyrosines et thréonines ainsi qu'une méthylation carboxy terminale. Différentes protéines tyrosines kinase peuvent phosphoryler PP2AC *in vitro* sur la Tyrosine 307 appartenant à la partie conservée C-Terminale (Chen *et al.*, 1992). La présence d'acide Okadaïque, un inhibiteur de PP2A, favorise cette réaction suggérant que PP2A pourrait avoir une activité tyrosine phosphatase et se déphosphoryler elle-même. *In vivo*, la phosphorylation sur Tyrosine de PP2A induite par des facteurs de croissance inactive l'enzyme (Begum and

Ragolia, 1996; Begum and Ragolia, 1999; Chen *et al.*, 1994; Guy *et al.*, 1995; Srinivasan and Begum, 1994).

La phosphorylation sur des résidus thréonines affecte quand à elle non seulement PP2AC sur des résidus non identifiés, mais aussi les sous unité régulatrices, particulièrement la famille B'(Guo and Damuni, 1993; Xu and Williams, 2000). La phosphorylation de PP2AC est inhibitrice contrairement à celle de la famille B' qui augmente l'activité phosphatase pour des substrats phosphorylés par PKC (Protéine Kinase C).

Enfin, l'effet de la méthylation réversible de la sous unité catalytique est très controversé. Différents groupes observèrent des résultats contradictoires indiquant tantôt que l'activité était augmentée ou diminuée, tantôt qu'elle n'était pas affectée (Bryant *et al.*, 1999; De Baere *et al.*, 1999; Favre *et al.*, 1994; Xie and Clarke, 1994; Zhu *et al.*, 1997). Cependant, il semble que cette méthylation puisse faciliter la transition du complexe de l'état de dimère vers celui de trimère et affecter la composition du trimère (Bryant *et al.*, 1999; Favre *et al.*, 1994; Xie and Clarke, 1994). Des travaux plus récents ont confirmé que les cellules peuvent en partie contrôler dynamiquement la formation et la fonction du complexe PP2A par sa méthylation et sa phosphorylation (Ogris *et al.*, 1999; Wei *et al.*, 2001; Yu *et al.*, 2001). La dérégulation de ces modifications a donc de lourdes conséquences pour la cellule et se trouve lier à des pathologies telles que le syndrome d'Alzheimer. En effet, la dérégulation de la méthylation de PP2A, notamment des complexes AB α C, modifie la composition et la spécificité de substrats de l'enzyme (Sontag *et al.*, 2004a; Sontag *et al.*, 2004b). Ceci peut conduire à l'hyperphosphorylation de la protéine Tau et à abolir sa capacité de lier et de promouvoir l'assemblage des microtubules (Lim and Ping Lu, 2005; Liu *et al.*, 2005). Ces évènements précèdent des mécanismes de neurodégénérescence en affectant la plasticité et la survie neuronale et contribue au syndrome d' Alzheimer (Sontag *et al.*, 2004a; Sontag *et al.*, 2004b).

III.3 Régulation par des inhibiteurs cellulaires :

Li et ses collaborateurs ont identifié deux inhibiteurs cellulaires non compétitifs et thermostables de PP2A : I₁^{PP2A} et I₂^{PP2A} (Li *et al.*, 1995). Par la suite, l'efficacité de I₂^{PP2A} pour inhiber PP2A a été confirmée *in vivo* (Al-Murrani *et al.*, 1999). Ces deux molécules inhibent toutes les formes de PP2A, vraisemblablement en liant directement leurs sous unités catalytiques. L'analyse de la séquence de ces inhibiteurs a révélé leur identité. I₁^{PP2A} est la

protéine PHAP-I (Putative Histocompatibility leucocyte Antigen class II-associated protein I) et I_2^{PP2A} est une forme cytoplasmique tronquée de PHAP-II (Putative Histocompatibility leucocyte Antigen class II-associated protein II) ou SET (Suvar3-9, Enhancer of zeste, trithorax) dont la forme complète est également un inhibiteur potentiel de PP2A (Li *et al.*, 1996a; Li *et al.*, 1996b). Outre leur action inhibitrice de PP2A, I_1^{PP2A} et I_2^{PP2A} peuvent également lier et stimuler l'activité de la protéine phosphatase 1 (PP1) en présence de concentrations quasi physiologiques de Mn^{2+} (Katayose *et al.*, 2000).

III.4 Inhibition de PP2A par des toxines:

Un grand nombre de molécules peuvent inhiber la protéine phosphatase PP2A, avec des spécificités relatives. Toutes ne seront pas décrites dans ce paragraphe mais sont répertoriées dans le tableau 1 suivant (Zolnierowicz, 2000). Nous porterons notre attention plus particulièrement sur l'acide okadaïque que nous avons utilisé dans notre étude. L'acide okadaïque (OA) est une petite molécule composée de 38 carbones et isolée à partir d'éponges de mer de l'espèce *Halichondria* mais également produite par différentes espèces de dinoflagellés (Bialojan and Takai, 1988). L'OA inhibe les protéine Sérine/Thrénine phosphatases 1 et 2 avec une efficacité variable (Tableau 1) (Takai *et al.*, 1992). Son efficacité optimale est observée vis-à-vis de PP2A pour laquelle sa constante d'inhibition est très faible ($K_i = 0.2$ nM) (Cohen *et al.*, 1990a). Par ailleurs, l'AO affecte non seulement l'activité ser/thr phosphatase, mais aussi tyrosine phosphatase de PP2A (Takai and Mieskes, 1991). Son action inhibitrice s'exerce en liant directement la sous unité catalytique de PP2A sur laquelle les résidus 267 à 270 déterminent la spécificité de l'interaction (Zhang *et al.*, 1994). L'OA inhibe également PP1, mais avec une efficacité cent fois moins importante et constitue donc un outil extrêmement intéressant pour étudier et discriminer spécifiquement l'activité des protéine phosphatases (Favre *et al.*, 1997).

Inhibiteur	Source	Pouvoir inhibiteur
Acide Okadaïque	<i>Dinoflagellés</i>	PP2A~PP4>PP1~PP5>>>PP2B
Dinophysistoxine 1	<i>Dinoflagellés</i>	PP2A>PP1>>>PP2B
Microcystine	cyanobactéries	PP2A~PP1>>>PP2B
Nodularine/Motuporine	cyanobactéries	PP2A~PP1>>>PP2B
Calyculine A	Eponges marines	PP2A>PP1>>>PP2B
Tautomycine	<i>Streptomyces spiroventricillatus</i>	PP1>PP2A>>>PP2B
Cantharidine	Blatte	PP2A>PP1>>>PP2B
Endothalle	Composé synthétique	PP2A>PP1>>>PP2B
Fostriecine	<i>Sptreptomyces pulveraceus</i> subsp. <i>fostreus</i>	PP2A~PP4
TF-23A	Algue marine rouge	PP2A
Cytostatine	<i>Streptomyces</i> sp. MJ654-NF4	PP2A
I₁^{PP2A}	Inhibiteur cellulaire	PP2A
I₂^{PP2A}	Inhibiteur cellulaire	PP2A

Tableau 1: Molécules inhibitrices et spécificités relatives vis-à-vis des protéines ser/thr phosphatases.

III.5 Inhibition de PP2A par ARN interférentiel:

L'inhibition de l'activité de PP2A par ARN interférentiel (RNAi) a été particulièrement bien caractérisée chez la Drosophile. Li et ses collaborateurs ont inhibé l'expression de chaque sous unité de PP2A chez la Drosophile. Ils montrent ainsi que l'inhibition spécifique de l'expression de la sous unité A, B ou C par RNAi induit une diminution de l'expression de toutes les sous unités. (Li *et al.*, 2002). En revanche, la dérégulation de l'expression de la sous unité A α par RNAi dans des cellules de mammifères affecte l'expression des sous unités C, B et B'' mais pas B''. Par ailleurs ce travail permet de mettre en évidence l'importance du complexe sous sa forme trimérique dans la survie cellulaire (Strack *et al.*, 2004).

IV PP2A et la regulation du cycle cellulaire

La protéine PP2A participe à de très nombreux événements cellulaires grâce à sa diversité de formes et de fonctions. Elle est notamment impliquée dans le contrôle des transitions G1/S, G2/M et la mitose comme schématisé dans la figure 17 :

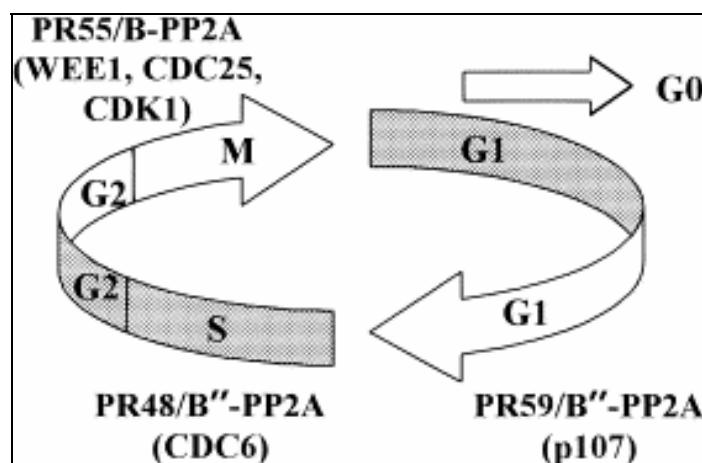


Figure 17: Points de contrôle du cycle cellulaire impliquant les protéine phosphatases de la famille PP2A.

IV.1 PP2A et la transition G1/S :

Comme nous l'avons vu dans la première partie, la progression du cycle cellulaire est inhibée notamment par la famille des protéines du rétinoblastome. Elles constituent une cible des protéine kinases CDK qui abolissent leur pouvoir inhibiteur en les phosphorylant. Il a été démontré que la protéine p107 du rétinoblastome s'associe avec la sous unité régulatrice PR59/B'' de PP2A *in vivo*. Par ailleurs, la surexpression de PR59 conduit à la déphosphorylation de p107 (Voorhoeve *et al.*, 1999). La progression du cycle cellulaire est alors abolie et les cellules se retrouvent bloquées en phase G1. De plus, l'initiation de la réplication chez les eucaryotes met en jeu une autre sous unité régulatrice de la famille B'' : PR48. PR48 observe un localisation nucléaire où, en association avec le dimère PP2A_D elle a pour substrat la protéine Cdc6, un composant majeur du complexe de pré-réplication. La surexpression de PR48, tout comme PR59, conduit à l'accumulation des cellules en G1 (Yan *et al.*, 2000). L'holoenzyme PP2A composée de PR48 participe donc à initialiser la réplication de l'ADN chez les mammifères. Pour cela, il est probable que PP2A_D/PR48 maintienne Cdc6 sous une forme déphosphorylée nécessaire pour sa liaison aux origines de réplication (Yan *et al.*, 2000).

Le rôle de PP2A dans l'initiation de la réplication a été confirmé chez le Xénope. Dans des extraits d'œufs de Xénope, la réplication de l'ADN est fortement inhibée consécutivement à l'immunodéplétion de PP2A (Lin *et al.*, 1998) tandis que les fourches de réplication préalablement établies continuent. Ceci suggère que PP2A régule spécifiquement l'initialisation de la réplication de l'ADN (Lin *et al.*, 1998).

IV.2 PP2A et la transition G2/M :

Le rôle de PP2A de régulateur de la transition G2/M a été mis en évidence chez le Xénope et le poisson Zèbre grâce à l'utilisation de l'OA (Goris *et al.*, 1989; Picard *et al.*, 1989). L'injection d'OA dans des oocytes de ces deux espèces provoquait la maturation méiotique par formation de MPF actif (M Phase Promoting Factor). Le MPF est le complexe CyclinB/CDK1 dont nous avons préalablement détaillé le rôle dans l'initialisation de la mitose. De plus, l'activation de ce complexe, plus particulièrement de CDK1 était obtenue avec L'OA mais pas avec des inhibiteurs spécifiques de PP1 (I-1 et I-2), suggérant que l'activité de PP2A était requise pour maintenir le complexe MPF inactif (Felix *et al.*, 1990). Progressivement, de nombreux travaux de génétique, de biochimie, de traitements par des

inhibiteurs *in vivo* et *in vitro* permirent de reconstituer la séquence complexe d'évènements conduisant à l'activation soudaine du MPF juste avant l'entrée en mitose (Borgne and Meijer, 1996; Gould *et al.*, 1991; Kinoshita *et al.*, 1993; Lee *et al.*, 1994). Karaïskou et ses collaborateurs, notamment, contribuèrent grandement à ceci en apportant des preuves qu'il existait un mécanisme d'autoamplification du MPF organisé en deux étapes (Karaïskou *et al.*, 1998; Karaïskou *et al.*, 1999).

Comme nous l'avons décrit précédemment, CDK1 s'associe en phase G2 avec la Cycline B néosynthétisée. Elle est alors inactive car phosphorylée sur les trois sites T161, Y15 et Y14 par les protéine kinases CAK, Myt1 et Wee1. Cette inactivation est favorisée par PP2A qui active la kinase inhibitrice Wee1 et inhibe la kinase activatrice CAK. Au cours d'une première étape lors de la transition G2/M, les protéine phosphatases CDC25 permettent l'accumulation de CDK1 active. Les CDC25 sont alors maintenues dans un état non phosphorylé.

Au cours d'une seconde étape, la kinase Polo Plk1 hyperphosphoryle les protéine phosphatases CDC25 et PP2A joue alors un rôle antagoniste. Dans le même temps, CDK1 active va phosphoryler et activer en retour les CDC25, conduisant à une boucle d'autoamplification. L'augmentation de MPF actif va alors induire l'entrée soudaine des cellules en mitose et la phosphorylation de nombreux substrats mitotiques impliqués dans la dissociation de l'enveloppe nucléaire, la condensation des chromosomes et la formation du fuseau. Le rôle de PP2A dans la régulation de la transition G2/M est schématisé dans la figure 18.

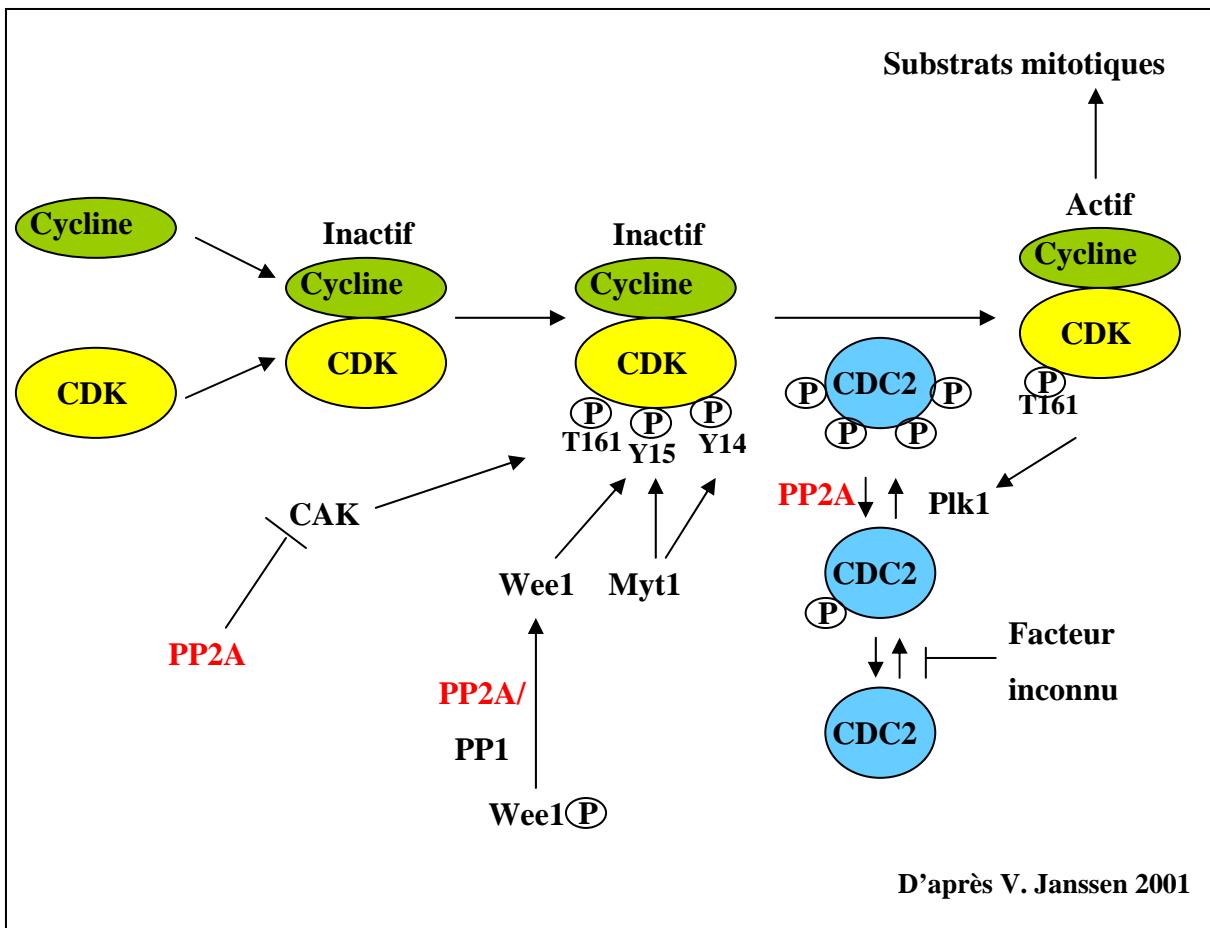


Figure 18: Rôle de la protéine phosphatase PP2A dans la transition G2/M.

IV.3 Rôles de PP2A au cours de la mitose :

Un des évènements caractérisant l'entrée des cellules en mitose est la phosphorylation de l'histone H3 sur les séries 10 et 28 (Goto *et al.*, 1999; Wei *et al.*, 1999). Il a été clairement établi que la kinase Aurora-B catalysait la phosphorylation de ces résidus *in vitro* et *in vivo* et que ce mécanisme était activé par l'OA (Sugiyama *et al.*, 2002). Ces travaux ont montré que Aurora-B interagit avec au moins trois isoformes des sous unités catalytiques de PP1 (PP1ca, PP1cd et PP1g1) mais aussi avec PP2AC. Aurora-B peut donc former des complexes avec ces protéine phosphatases qui participent à moduler négativement son activité, notamment pour l'histone H3 (Sugiyama *et al.*, 2002).

Par la suite, l'activité de PP2A est requise pour maintenir l'état condensé des chromosomes mitotiques. Des expériences de criblage en double hybride utilisant la sous unité régulatrice B/PR55 comme protéine appât permirent d'identifier un nouveau substrat de la protéine phosphatase : la protéine hHCP6 (human HoloCentric Protein 6) (Yeong *et al.*, 2003). Cette protéine humaine est l'homologue de HCP-6 de *C. elegans* qui est requise pour l'organisation et la ségrégation des chromosomes et fait partie du complexe condensine constitué en partie des protéines SMC2 et SMC4 (Structural Maintenance for Chromosome organization and segregation) (Hagstrom *et al.*, 2002). hHCP-6 est phosphorylée en mitose et s'associe aux chromosomes. Par ailleurs, elle est déphosphorylée, au moins *in vitro*, par un complexe PP2A régulé par PR55/B. PP2A semble donc contrôler indirectement l'état de condensation des chromosomes mitotiques via la phosphorylation de hHCP-6 du complexe condensine (Yeong *et al.*, 2003).

Ces résultats sont cohérents avec les observations faites chez la levure et la drosophile. Chez *S. cerevisiae*, la mutation du gène *cdc55* qui code pour l'orthologue de PR55/B résulte en l'apparition de défauts de cytodiérèse (Healy *et al.*, 1991). L'activité de CDC55 participe en effet aux mécanismes de surveillance de l'attachement des kinétochores au fuseau (Wang and Burke, 1997). Selon une hypothèse, CDC55 inhiberait PP2A jusqu'à ce que les chromosomes soient correctement alignés sur le fuseau. Si cette étape est correctement achevée, PP2A affecterait l'activité des protéines qui inhibent la transition vers l'anaphase, permettant ainsi la séparation des chromatides et l'achèvement de la cytodiérèse (Wang and Burke, 1997). Récemment, il a été montré chez la levure, que même une activité résiduelle de CDC55, en association avec la sous unité catalytique, est suffisante pour maintenir l'activité de ce point de contrôle du fuseau et ce même en absence de l'orthologue de la sous unité PR65/A (Koren *et al.*, 2004).

Les travaux menés chez la Drosophile corroborent ces résultats. Les mutants du gène codant pour PR55 appelés *aar1* (abnormal anaphase resolution) présentent des défauts de ségrégation des chromosomes et ce phénotype peut être aboli par la réintroduction de PR55 (Gomes *et al.*, 1993). De même, dans des embryons mutants pour la sous unité PP2AC, les cellules se retrouvent bloquées lors de la mitose entre la prophase et le début de l'anaphase. Par ailleurs ils possèdent une chromatine hypercondensée, de multiples centrosomes et des microtubules désorganisés et irradiant dans toutes les directions ce qui a valu à ces mutants le nom de *microtubule star* (*mts*) (Snaith *et al.*, 1996). En outre, l'activité de PP2A dans des extraits d'œufs de Xénope régule l'activité de la protéine Op18/stathmin (Oncoprotéine 18) qui forme un complexe avec deux dimères de Tubuline. L'interaction entre PP2A et Op18/Stathmin permet de maintenir l'état court des microtubules lors de la mitose (Tournebize *et al.*, 1997). Ces différentes observations confirment que l'activité de PP2A participe aux points de contrôle et à la régulation de la dynamique du fuseau mitotique.

Enfin, les mutants *TwinsP* chez la Drosophile (twin étant le gène codant pour B/PR55) présentent une morphologie anormale du disque imaginal de l'aile et des soies qui sont dupliqués (Deak *et al.*, 2003; Uemura *et al.*, 1993). De plus, comme chez les mutants *aar1*, une diminution de l'activité phosphatase relative aux substrats phosphorylés par l'orthologue de CDK1 apparaît. PP2A régulée par CDC55 a donc une fonction dans la mitose et la spécification du devenir cellulaire.

L'ensemble des résultats chez ces différentes espèces indique que l'activité de PP2A est nécessaire pour réguler l'entrée et la progression de la mitose.

CHAPITRE 4 :

ROLES DES PROTEINES AURORA-A ET PP2A DANS L'ONCOGENESE

I Aurora-A une protéine oncogénique

Il est très clairement établi aujourd’hui que les protéines Aurora-A, B et C appartiennent à une famille de protéines oncogéniques. Comme nous l’avons vu dans les chapitres précédents, elles ne constituent pas quantitativement une fraction très importante des protéines cellulaires totales mais sont indispensables qualitativement. Leurs fonctions cumulées permettent d’assurer bon nombre d’évènements nécessaires à la division cellulaire. Elles se trouvent au cœur des mécanismes assurant le renouvellement et la prolifération des cellules normales. Aussi, toute dérégulation de ces protéines s’avère particulièrement dommageable aux cellules et leur surexpression est d’ailleurs observée dans de nombreux cancers chez l’humain. En particulier, l’amplification et la surexpression du gène codant pour Aurora-A ont été détectées dans le cancer du sein, du colon, de l’ovaire, du pancréas et de la vessie et sont en corrélation avec des caractéristiques de la maladie (Bischoff *et al.*, 1998; Han *et al.*, 2002; Sen *et al.*, 2002; Tanaka *et al.*, 1999; Zhou *et al.*, 1998). Par exemple, le caractère invasif et l’instabilité génomique dans les carcinomes du sein sont en corrélation entre la surexpression de Aurora-A (Miyoshi *et al.*, 2001; Tanaka *et al.*, 1999). L’agressivité clinique et l’aneuploïdie du cancer de la vessie sont en relation avec l’amplification et la surexpression de la kinase (Sen *et al.*, 2002). De manière plus générale, la surexpression de Aurora-A est en corrélation avec l’induction de l’aneuploïdie, les anomalies des centrosomes et le pronostic des tumeurs naturelles ou expérimentales (Goepfert *et al.*, 2002). De manière très intéressante, l’inhibition de Aurora-A par l’utilisation d’antisens dans des cellules tumorales humaines qui la surexpriment permet la réversion de la transformation et l’inhibition de la prolifération.

II PP2A : un « suppresseur de tumeur »

Les protéine phosphatases de la famille PP2A sont des régulateurs clés de la transmission du signal, de la croissance et de la prolifération cellulaire. Les nombreuses holoenzymes de cette famille interagissent avec beaucoup de protéines cellulaires et virales qui peuvent moduler en retour l'activité phosphatase. L'idée que PP2A est un « suppresseur de tumeur » a été longtemps controversée mais de nouveaux arguments sont venus confirmer cette hypothèse depuis peu. En effet, Chen et ses collaborateurs ont montré récemment que la suppression de la sous unité B56 γ , tout comme l'expression de small-t, induit une diminution substantielle de l'activité de PP2A *in vivo* (Chen *et al.*, 2004). De plus, la surexpression de la sous unité B56 γ permet en partie de réverter la formation du tumeur dépendante de small-t. De même, la surexpression de B56 γ induit la réversion du phénotype tumoral dans plusieurs lignées de cancers du poumon où aucune protéine B'/B56/PR61 γ n'est présente. Ces travaux semblent donc confirmer la fonction suppressive de tumeur de PP2A et de proposer un modèle pour expliquer les événements conduisant à la transformation par small-t. Small-t peut se substituer à la sous unité régulatrice B56 γ , abroger son activité pour des substrats spécifiques et promouvoir à la place la l'oncogenèse (Chen *et al.*, 2004). Ce modèle est schématisé dans la figure 19.

L'étude et la caractérisation des mécanismes de régulation de la kinase Aurora-A et de la protéine phosphatase PP2A sont donc au cœur de la compréhension des événements liés aux processus de cancérisation.

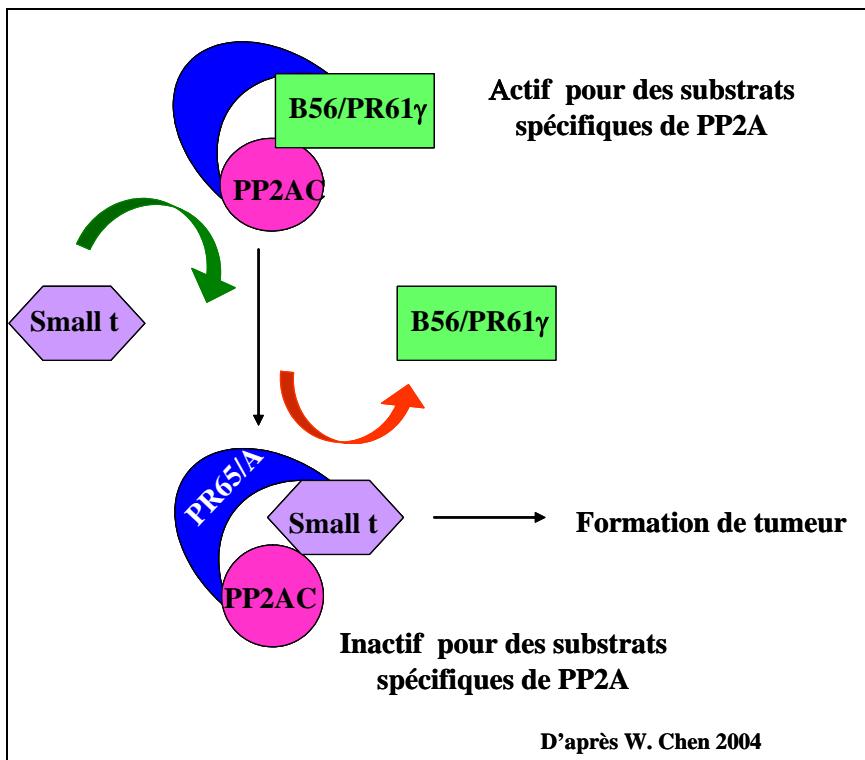


Figure 19 : Induction de l'oncogenèse par small-t via PP2A.

OBJECTIFS

La littérature révèle un grand nombre de similitudes fonctionnelles entre la protéine kinase Aurora-A et la protéine phosphatase PP2A. Elles sont toutes deux impliquées dans la régulation de la transition G2/M et l'activation du complexe essentiel à la mitose composé de la Cycline B et de CDK1. De plus, elles participent à réguler un certain nombre de substrats mitotiques, notamment en relation avec l'organisation, la dynamique et la stabilité du fuseau mitotique. Enfin, une récente étude a proposé que la dégradation de Aurora-A serait induite par la déphosphorylation de la sérine 51 conservée de la A box.

Aussi, l'ensemble des données de la littérature suggérait que PP2A pourrait être la protéine phosphatase contrôlant la protéolyse de Aurora-A. Dès lors, mon objectif premier fut de rechercher l'existence d'une interaction entre ces deux protéines dans des cellules de mammifères. Dans un deuxième temps, il était nécessaire de caractériser cette interaction et de révéler son aspect fonctionnel, particulièrement dans le contexte de la régulation de la dégradation de Aurora-A. Les résultats de ce travail seront exposés sous forme d'une publication à la suite de laquelle je proposerais un modèle des mécanismes qui sous tendent la dégradation de Aurora-A sous forme d'un schéma.

RESULTATS

INTRODUCTION ET PROBLEMATIQUE DES RESULTATS PRESENTES

Le contrôle et de la régulation de la dégradation de Aurora-A est l'objet de nombreuses études depuis quelques années. Ces travaux ont permis de mettre en évidence en grande partie comment Aurora-A est dégradée en identifiant par exemple quels sont les domaines de la kinase, les mécanismes moléculaires et la voie de dégradation du protéasome impliqués. Cependant, le ou les régulateurs à l'origine de ce processus restaient quant à eux inconnus. Nous avons entrepris de découvrir la molécule régulant la protéolyse de Aurora-A. Considérant l'hypothèse de Littlepage et de ses collaborateurs selon laquelle cette molécule est une protéine phosphatase, nous avons démontré que PP2A est co-localisée avec Aurora-A et que ces deux protéines sont associées dans un même complexe. De plus, l'inhibition pharmacodynamique de PP2A et, de manière originale, par ARN interférenciel révèle le caractère fonctionnel de cette interaction : l'inhibition de PP2A par ces deux méthodes a pour conséquence la stabilisation de Aurora-A *in vivo*. Enfin, nous avons démontré par des expériences de mutagenèse dirigée que la phosphorylation de la sérine 51 de Aurora-A humaine induit la stabilisation de la protéine *in vivo*. En conclusion, considérant que l'inhibition de PP2A stabilise Aurora-A *in vivo* et que la sérine 51 est le seul résidus étant à la fois sensible à la déphosphorylation et responsable de la dégradation nous pouvons conclure que PP2A déphosphoryle la sérine 51 de Aurora-A et induit ainsi sa dégradation.

Aurora-A and PP2A: a functional interaction during mitosis

Virginie Horn[◦], Alphonse Garcia [♦], Marc R. Block^{◦*} and Jean Viallet[◦]

[◦]Laboratoire d'Etude de la Différenciation et l'Adhérence Cellulaires, UMR CNRS/UJF 5538.

Institut Albert Bonniot, Faculté de Médecine de Grenoble. F38706 La Tronche cedex. France

♦ Equipe Phosphatase, Unité de chimie organique, Institut Pasteur, 25- 28 rue du Dr Roux,

75724 Paris cedex, France.

* Corresponding Author

Running title: Aurora-A and PP2A interaction in centrosomes

Key words: Aurora-A, PP2A, centrosomes, mitosis, RNAi.

ABSTRACT

Mitosis entry is a highly regulated process, promoted by the activated complex Cyclin B1/Cdk1. This complex activation is in part controlled by the kinase Aurora-A which is a member of a multigenic mitotic serine/threonine kinase family. In normal cells, Aurora-A activity is at least partially regulated by degradation through the APC-ubiquitin-proteasome pathway. Recently, it has been proposed that in *Xenopus*, Aurora-A degradation would be inhibited by phosphorylation until the end of mitosis. This hypothesis means that Aurora-A degradation would rely on a phosphatase activity. Here, we have shown that the protein phosphatase PP2A and Aurora-A are colocalized in centrosomes during mitosis and are interacting within the same complex. Using a pharmacodynamic approach and RNAi strategy, we found that this interaction is functional within the cell and that PP2A presumably controls Aurora-A degradation by dephosphorylating serine 51 on the A box of the human kinase.

INTRODUCTION

Protein phosphorylation is a common feature involved in the regulation of many cellular processes, by modifying protein affinity, conformation and/or recruitment to peculiar cellular localizations. Eukaryotes express a number of protein kinases of narrow specificity but fewer protein phosphatases with a broad spectrum of action (Zolnierowicz and Bollen, 2000). The diversity in phosphatase functions comes from the ability their highly conserved catalytic subunits to combine and give rise to a large repertoire of heteromultimeric holoenzymes (Virshup, 2000).

The protein phosphatase PP2A belongs to the serine/threonine PP2 phosphatases family comprising PP2B (also named calcineurin) and PP2C (Lechward et al., 2001). PP2A is a heterotrimeric complex composed of various isoforms of three subunits. The 36 kDa catalytic C subunit associates with the 65 kDa structural A subunit to form a core dimer. This dimer is able to interact exclusively with one of the several B type regulating proteins (B, B' and B'') that modulate the holoenzyme activity and substrate specificity (Price and Mumby, 2000; Strack et al., 2002). The A and C subunits are ubiquitously expressed in mammalian cells (Hemmings et al., 1990; Khew-Goodall and Hemmings, 1988; Mayer et al., 1990) whereas the expression if the different B subunit isoforms is tissue specific and can target the trimer to different tissues or subcellular compartments (Healy et al., 1991; Mayer et al., 1991; Strack et al., 1999; Zolnierowicz et al., 1994). Numerous functions have been described for the PP2A holoenzyme depending on the B regulatory subunit. For instance this protein phosphatase is involved in morphogenesis, in signal transduction, in apoptosis or in cell cycle progression and control (see for review Janssens and Goris, 2001; Lechward et al., 2001). Indeed, PP2A is a key enzyme for mitosis initiation and completion. For example, the holoenzyme is required for the G2/M transition (Karaïskou et al., 1999; Lee, 1995; Minshull

et al., 1996). Moreover, PP2A is essential during the time course of mitosis. In *Xenopus* eggs extracts, PP2A activity is required for bipolar spindle assembly and maintenance of short microtubules during metaphase (Tournebize et al., 1997). The phosphatase has also been proposed to play a role in the metaphase-anaphase transition both in mitosis and meiosis (Chaudhuri et al., 1997; Mailhes et al., 2003). Finally, mass-spectroscopy based proteomic work has revealed that PP2A is present in human interphasic centrosomes (Andersen et al., 2003) which are crucial components of the cell division and cycle progression (Rieder et al., 2001) as they contain key mitotic kinases such as Nek2 (Helps et al., 2000) and Aurora-A (Blagden and Glover, 2003; Dai et al., 2003; Goepfert and Brinkley, 2000; Gopalan et al., 1997).

The mammalian kinase Aurora-A is a member of a multigenic mitotic serine/threonine kinase family. The founding member Ipl1p of this family has been identified in Yeast through mutations leading to increased chromosome miss segregation (Tung et al., 1995) and in *Drosophila* where *aurora* loss of function causes a monopolar spindle formation due to a centrosome segregation defect (Glover et al., 1995). Aurora-A localizes in centrosomes and its expression is restricted to G2 and M phases (Gopalan et al., 1997) while its kinase activity is required (Hirota et al., 2003; Marumoto et al., 2002). Aurora-A interacts with the phosphatase PP1 which negatively regulates Aurora-A activity by dephosphorylation (Katayama et al., 2001). Before mitosis entry, the complex Cdk1/Cyclin B inactivates PP1, leading indirectly to the activation of Aurora-A. The kinase allows in turn the activation of the complex Cyclin B1/Cdk1 which promotes mitosis entry (Hirota et al., 2003).

Historically, Aurora-A kinase was discovered in Breast Cancer (Chaudhuri et al., 1997) and its activity appeared to be increased in many cancers (breast, ovarian, colon, prostate, neuroblastoma and cervical cancer cell lines) due to both gene mutation (Kallioniemi et al., 1994; Schlegel et al., 1995) and deregulation of transcription (Bischoff et al., 1998). In

normal cells, Aurora-A activity is at least partially controlled by degradation through the APC-ubiquitin-proteasome pathway (Honda et al., 2000). Recently, a degradation model has been proposed in *Xenopus* by Littlepage and Ruderman. According to the authors, Aurora-A degradation is inhibited by phosphorylation of serine 53 (Littlepage and Ruderman, 2002) which would be sustained until the end of mitosis and consequently, Aurora-A degradation would rely on a phosphatase activity. Based on the similarities in the localization and functions of PP2A and Aurora-A especially during mitosis, we hypothesized that the two proteins may interact during mitosis, suggesting a possible role for PP2A in controlling Aurora-A phosphorylation and/or degradation pathway.

In this report, we demonstrated by immunofluorescence that PP2Ac co-localizes with centrosomes during mitosis in human HeLa and in the epithelioid small intestinal rat IEC cells. Furthermore, co-immunoprecipitations indicated that PP2Ac and Aurora-A belong to the same complex. Using a RNAi strategy to knock down independently Aurora-A or PP2Ac expression in HeLa cells, we confirmed that their interaction is likely to be functional *ex vivo* and that PP2Ac dephosphorylated Aurora-A and induced its degradation. Interestingly, these experiments show clearly that this interaction is also required for the centrosomal localization of both proteins during mitosis. Finally, we showed by site directed mutagenesis that the A box serine 51 controls Aurora-A degradation and thereby is the potential target of the phosphatase.

RESULTS

The catalytic subunit PP2Ac is localized on centrosomes during interphase and mitosis.

To examine the subcellular localization of the protein phosphatase PP2A, we performed immunofluorescence experiments by using confocal microscopy on several synchronized IEC, IECAur and HeLa cell lines using a monoclonal antibody directed against the enzyme catalytic subunit PP2Ac (Fig.1, A to C). We observed that PP2Ac was ubiquitously expressed and appeared as a single dot in interphasic cells and as two dots during mitosis in the three cell types. This remarkable distribution was strongly evocative of those of centrosomes. This observation prompted us to determine whether PP2Ac was colocalized with δ -Tubulin, and Aurora-A, two centrosomal proteins.

Indeed, both PP2Ac and δ -Tubulin decorate the centrosomes of HeLa cells during mitosis (Fig. 1G and H), and a similar distribution was found in IECAur in anaphase (Fig. 1, D to F). Overexpression of human Aurora-A kinase into the pluripotent IEC cells (IECAur) resulted in centrosomes amplification as well as the formation of a monopolar spindle (Horn *et al.* unpublished results) (Fig. 1K). Interestingly, in these cells, PP2Ac was also present as a single dot in the unique interphasic centrosome and followed the centrosome distribution modification induced by Aurora-A overexpression.

Centrosomal localization of PP2A was confirmed by the colocalization of PP2Ac and Aurora-A in synchronized HeLa and IECAur cells (Fig. 1, I to O). The catalytic subunit was exactly colocalized with Aurora-A during mitosis. It appeared either as a single dot during interphase (Fig. 1, I and L) or double dot in mitosis (Fig. 1, J, K, M, N, O), corresponding to the centrosome positions as demonstrated by the double labeling of Aurora-A and δ -Tubulin (Fig. 1, P to S).

PP2Ac interacts with Aurora-A in mammalian cells.

Since both PP2Ac and Aurora-A are colocalized in centrosomes and since Aurora-A must be dephosphorylated in order to promote its degradation, it is conceivable that both proteins interact within the same complex. To address this question we immunoprecipitated with specific polyclonal antibodies either Aurora-A, or PP2A using cell lysates from synchronized HeLa or IECAur cell lines. Immunoprecipitated proteins were analyzed by Western blot.

Co immunoprecipitations were carried out in cell lysates performed either in 1% Triton (buffer 1) or in 1% NP40 and 1% SDS (buffer 2). We first performed Aurora-A immunoprecipitation in IECAur cells (Fig. 2A). In this cell line, the interaction between Aurora-A and PP2Ac was detected even under stringent conditions (Fig. 2A, lane d). Two proteins with molecular weights of 46 kDa and 35 kDa respectively appeared after Western blot analysis in the immunoprecipitate, corresponding to those detected in the input (Fig. 2A lane a) and in the supernatant of the immunoprecipitation (Fig. 2A, lane c). These bands corresponded to Aurora-A (46 kDa) and PP2Ac (35kDa) and were not detected with both antibodies after immunoprecipitation by a non relevant immunoglobulin (Fig. 2A, lane b). Since human Aurora-A was overexpressed in these cells and could lead to non physiological interaction, it was important to confirm that the interaction also existed between the endogenous proteins. Thereby, we performed PP2Ac immunoprecipitation in synchronized mitotic HeLa cells. The following Western blot analysis revealed that Aurora-A and PP2Ac were both present in the immunoprecipitated complexes (Fig. 2B, lane d). As described previously, the signals detected by Western blot either with the anti Aurora-A or the PP2Ac antibody (Fig. 2B, lanes a, c and d) were specific. This was confirmed by the control with irrelevant immunoglobulin (Fig. 2B, lane b). Interestingly, Aurora-A was never completely associated with the PP2Ac complex suggesting that only a pool of Aurora-A is associated

with PP2Ac in centrosomes. These reciprocal immunoprecipitation experiments demonstrated that PP2Ac and Aurora-A are interacting directly or indirectly.

Aurora-A has been previously described to interact with some phosphatases (Dutertre et al., 2004; Katayama et al., 2001), in particular PP1. Since we showed that Aurora-A and PP2A belong to the same protein complex, we addressed the functional significance of this interaction. Assuming that Aurora-A degradation relies on its dephosphorylation as proposed by Littlepage and collaborators, we tested the degradation sensitivity to phosphatase inhibition.

Aurora-A degradation is stimulated by serine/threonine phosphatases.

In a preliminary approach, we used the serine/threonine phosphatase inhibitor Okadaic acid (OA) since this drug was described to counteract preferentially PP2A activity (Bialojan and Takai, 1988). In all inhibition experiments, synchronized cells were treated with 1nM OA after the beginning of mitosis in order to avoid any inhibitory effects on mitosis entry due to PP1 blockade and cells were never treated longer than 2 hours. These experimental conditions had three essential advantages: first, they permitted a more specific inhibition *in vitro* of PP2A (IC₅₀ is 1 nM) versus PP1 (IC₅₀ is 10-15 nM), second, they allowed us to specifically target molecular dephosphorylation events occurring during mitosis, and third, they do not induce any cytotoxic effects within the cells that are observed with higher concentrations and longer treatments (Huynh-Delerme et al., 2003). The effects of phosphatase inhibition on Aurora-A were analyzed by Western blot and immunofluorescence microscopy.

IECAur cells were treated with 1nM OA and lysed at different times after mitosis onset indicated as the point 0 (Fig. 3A). Cellular lysates were then analyzed by Western blot. For each time, we compared Aurora-A levels in non treated and treated (T) cells (Fig. 3A). The protein level variation was then quantified by using the Image J software (Fig. 3B) and

normalized relatively to actin. We observed that after 30 minutes, the total amount of Aurora-A increased by 25% in OA treated cells whereas the increase in the control cells did not exceed 5% (Fig. 3B). At the end of mitosis, after 75 minutes, we observed a decrease of 12 % in the amount of Aurora-A in the control cells and a dramatic increase of 51 % in the OA treated cells (Fig. 3B).

These biochemical data were confirmed by immunofluorescence microscopy studies (Fig. 3C). IECAur cells were synchronized and treated as described above. Every 15 minutes and during two hours, cell samples were fixed. Immunostaining indicated that Aurora-A was not only stabilized and its cell level increased from 45 minutes until the end of the experiment (after 2 hours), but was also delocalized from centrosomes and relocalized throughout the cells (Fig. 4C, pictures b, c, d). Conversely, a constant staining of Aurora-A was detected only in centrosomes of control cells until the end of the experiment (Fig. 3C, pictures e to h). Moreover, some chromosome alignment defects were visible at 30 minutes while control cells showed metaphase alignments (Fig. 3C, pictures b DAPI staining and f). These defects were clearly visualized at 45 and 120 minutes (Fig. 3C, pictures b, c DAPI Staining, f, and g) and the treated cells presented abnormal anaphases not observed in the control cells (Fig. 3C, pictures c DAPI staining and g). Finally, OA treated cells could not divide normally and showed “trailing chromosomes” (Fig. 3C, pictures d DAPI staining and h). These results were fairly consistent with previously described phenotypes observed when the Aurora-A gene was amplified or when the protein was overexpressed, especially in some cancer cells (Anand et al., 2003; Bischoff and Plowman, 1999).

These experiments showed that Aurora-A could be stabilized by OA phosphatases inhibition at the end of mitosis. These data nicely fit with the view that Aurora-A degradation is actually regulated and induced by dephosphorylation. However, since OA might also block PP1, even at this low concentration, our pharmacodynamic approach did not give definite

evidence of the implication of PP2A in the control of Aurora-A. Thus, to provide clear cut evidence of the role of PP2A in Aurora-A degradation, we designed a RNAi strategy to specifically knock down either Aurora-A or PP2A in HeLa cells.

PP2Ac is responsible for Aurora-A degradation

Stable knock-down of Aurora-A and PP2Ac gene expression was achieved by transfection in HeLa cells of a pSUPER2 shRNA vector which allows Zeocin selection of the transfected clones. To knock down Aurora-A, we used a sequence previously described to down regulate the kinase upon transitory transfection of HeLa cells (Hirota et al., 2003). As no PP2Ac RNAi experiments have been described to date in mammalian cells, we designed a sequence liable to knock down both the alpha and beta isoforms of PP2Ac by aligning the PP2Ac α and PP2Ac β coding sequences with the RNAi oligonucleotide sequence previously described in Drosophila (Bennin et al., 2002) (Fig. 4A). Finally, we generated two polyclonal stable cell populations named AUR(RNAi) and PP2A(RNAi) respectively silenced for Aurora-A and PP2Ac.

Western blot analysis and further quantification of the cell lysates revealed a decrease of about 50 % in the Aurora-A protein in AUR(RNAi) cells and about 60 % in PP2Ac in PP2A(RNAi) cells (Fig. 4B and C). Moreover, we could observe an increase of about 35 % in Aurora-A in cells lacking PP2Ac consistent with our data with OA. On the other hand, the total amount of PP2Ac was decreased by about 20 % in cells lacking Aurora-A (Fig. 4B). It should be noticed that the given quantification is related to a mean variation of both protein amounts in all the cells since AUR(RNAi) and PP2A(RNAi) are polyclonal cell lines.

Besides, with low amounts of Aurora-A, immunofluorescence experiments clearly showed that PP2Ac was not longer localized in the centrosomes during mitosis. Nevertheless, centrosomes are maintained as indicated by the γ -Tubulin staining and form a monopolar

spindle typical from Aurora-A inhibition or mutation (Fig. 5A). This suggests that in normal cells, PP2Ac is retained in centrosomes during mitosis by Aurora-A where it promotes the kinase degradation. Thus, PP2Ac function in centrosomes would mainly be to dephosphorylate Aurora-A and possibly other partners. This result perfectly fits with the observed stabilization of Aurora-A in PP2A(RNAi) cells (Fig. 5B). Indeed, Aurora-A immunostaining was dramatically increased in these cells and maintained during both interphase and mitosis (Fig. 5B). Thereby, these observations indicated that upon knock down of PP2Ac, Aurora-A degradation was downregulated and no compensation mechanism was subsequently involved. This suggests that Aurora-A stabilization is specifically dependent on PP2A. A high level of Aurora-A persists during the whole cell cycle and the kinase is relocalized throughout the cells, similarly to what was observed after OA treatment. This delocalization was not due to the lost of centrosomes as suggested by the γ -Tubulin detection (Fig. 5B). Finally both silenced cell lines presented defects related to chromosome condensation, alignment and to mitosis completion, confirming the role of both protein in these process.

A box Serine 51 dephosphorylation in human Aurora-A favors its degradation *ex vivo*.

Since we have shown that PP2Ac inhibition counteracts Aurora-A degradation at the end of mitosis, it is likely that this effect is related to the unmasking of the known degradation motif (D box) on Aurora-A by dephosphorylation on a distant motif named the A Box. Indeed, Littlepage and collaborators have shown *in vitro* with the Xenopus protein that the substitution of the serine 53 of the A box by a residue mimicking phosphorylation is necessary and sufficient to lead to the stabilization of Aurora-A as well as a single point mutation in the degradation box (D box : RxxLxxVxE). As the R residue of this D box is involved in the recognition by the APC/Cdh1 complex, its substitution also prevents

degradation. To address this question, we generated by site directed mutagenesis two mutants of human Aurora-A fused with GFP. Serine 51 (human A box) and arginine 371 (human D box) residues were replaced by aspartic acid residues, respectively. The S51D mutation mimics a constitutively phosphorylated state of the A box. These two mutants were transiently transfected into CHO cells. Their ability to impair degradation was then compared with the wild type protein fused to GFP. Consistent with the results with the Xenopus Aurora-A, the S51D and the R371D mutants were both strongly expressed in CHO transfected cells, even during interphase (Fig. 6B and C) whereas the wild type was degraded and barely detected (Fig. 6A). Since the efficiency of cell transfection was about 35 % with each construction, Western blot analysis were carried out directly on the transfected cells population. Consistent with the confocal images, the lysates of cells transfected with the mutant protein constructs showed a higher amount of GFP-Aurora-A than the cells transfected with wild type protein construct (Fig. 6D). Altogether, these results confirmed that the phosphorylation of serine 51 of Aurora-A prevents the kinase degradation similarly to the mutation of the degradation box and strongly suggested the involvement of PP2A in this degradation process.

DISCUSSION

The kinase Aurora-A is a crucial and specific regulator of mitotic events. Its expression and activation are finely regulated. It has been described that the kinase activity can be modulated by some reversible phosphorylation (see for review (Eyers and Maller, 2003)). In particular, Aurora-A is activated at the beginning of mitosis by AJUBA which promotes Aurora-A autophosphorylation (Hirota et al., 2003). Before this activation stage, Aurora-A is maintained in an inactive unphosphorylated state by the phosphatase PP1 (Katayama et al., 2001). In this report, we have shown by immunofluorescence microscopy that the catalytic subunit of PP2A and the kinase Aurora-A are colocalized in centrosomes during mitosis and by immunoprecipitation that both proteins interact in the same complex. These results are consistent with the recent proteomic analysis of interphasic human centrosome components suggesting the presence of PP2A in this organelle in mammalian cells (Andersen et al., 2003). Our data indicate that PP2A is not only present in centrosomes during interphase, but also during mitosis. Moreover, OA treatment at a concentration that preferentially inactivates PP2A, and RNAi silencing of the two PP2Ac subunits in HeLa cells led to identical phenotypes and to the inhibition of Aurora-A degradation at the end of mitosis. Aurora-A stabilization was also obtained *in vivo* by mutating the serine 51 in aspartic acid. This result demonstrates that Aurora-A degradation is promoted by dephosphorylation of the serine 51 of the A box. Considering that the serine 51 is the single amino acid which phosphorylation has been shown to be involved in Aurora-A degradation, and that PP2A inhibition leads to the kinase stabilization, it is very likely that PP2A favors Aurora-A proteolysis by dephosphorylating the serine 51.

Surprisingly, Aurora-A degradation is slowed or even blocked after 30 minutes of treatment with OA (metaphase stage) indicating that degradation takes place all along mitosis. Since Aurora-A expression is down regulated at the end of mitosis, it was expected

that the blockade of the phosphatase would have an effect on degradation only at this stage. Different interpretations are possible. A first explanation would be that Aurora-A transcription and/or translation increase during mitosis and the degradation process would be required before the end of mitosis to maintain constant the amount of the protein. The kinase activity would then be regulated by a balance between synthesis and degradation all along the cell cycle. Alternatively, PP2A and Aurora-A may belong to a larger complex where PP2A activity is inhibited until the end of mitosis. Nevertheless, our experiments show that the phosphorylation state, activation and degradation of Aurora-A are intimately linked, and that PP2A is involved in this process.

Silencing experiments lead to some division defects in both PP2A(RNAi) and AUR(RNAi) cell populations. The PP2A(RNAi) cells presented simultaneously an important decrease in PP2Ac expression and an increase in Aurora-A level together with a relocalization throughout the cell. Since both the kinase and phosphatase are involved in mitosis entry, metaphase alignment and cytokinesis, it is not easy to specifically associate a defect with Aurora-A or PP2Ac. However, our results provide a molecular basis that may explain the phenotypes described in the literature whenever either Aurora-A or PP2Ac expression are unregulated (Chen et al., 2004; Goepfert et al., 2002; Meraldi et al., 2004): If both proteins are segregated within the same complex, overexpression should result in a mislocalization of the highly expressed protein. Whereas the kinase was known to be a crucial regulator of mitosis, the role of PP2A was not so clear. Our data clearly show that PP2A is essential for Aurora-A regulation by controlling the kinase phosphorylation and thereby promoting its degradation presumably by modifying the A box. On the other hand, a lack of PP2A not only stabilizes Aurora-A, but also induces its dispersion throughout the cell. Such mislocalization might impair chromosome segregation or/and kinetochore attachment to microtubules that would result in the trailing chromosomes phenotype. In particular, the mislocalized Aurora-A could

enhance the phosphorylation of some of its substrates such as CENP-A and/or Eg5. Moreover, ectopic phosphorylation of the spindle kinase substrates could upregulate the RanGTP pathway that controls the bipolar spindle formation and stability. Both effects would result in misaligned and segregated chromosomes. Conversely, PP2A mediated centrosomal localization of Aurora-A may be required for kinetochore detachment at telophase. Finally, it is possible that only a small fraction of the cellular pool of PP2A is associated with Aurora-A. Consistent with this idea, the 20% decrease in PP2A observed in AUR(RNAi) cells may reflect this specific pool that is no longer required, and therefore down regulated. Alternatively, PP2A downregulation could be due to some genomic instability resulting from improper mitosis commitment.

Finally, we identified in mammalian cells the phosphatase PP2A as new partner of Aurora-A during mitosis by showing that they belong to the same complex. We gave some evidences that PP2A acts as a degradation activator of the kinase. We demonstrated *ex vivo* that both A Box S51 and C terminal D box are required for Aurora-A degradation in somatic cells, probably in an ordered manner. Thereby, our data confirm *ex vivo* the crucial role of the phosphorylation of the S51 in the degradation process initially proposed and recently characterized *in vitro* by Ruderman group (Crane et al., 2004; Littlepage and Ruderman, 2002) and strongly suggest that this amino acid is a target of PP2A. Altogether, our results generalize to mammals the crucial role of Aurora-A in spindle regulation and chromosomes segregation. They also indicate that PP2A regulates Aurora-A activity by restricting its localization to centrosomes and controlling its level along the cell cycle.

MATERIALS AND METHODS

Cell culture and synchronization

IEC and HeLa cells were grown in Dubelcco's modified Eagles medium with 10% heat-inactivated bovine serum. A final concentration of 1 μ M insulin was added in IEC cells. For synchronization, cells were grown at exponential stage and then blocked in S phase by adding 5 mM thymidine. After 16 hours, cells were washed three times in phosphate-buffered saline (PBS) and released in fresh medium for 3 h, in order to proceed completely through G2. Cells were then incubated with 35 ng/ml nocodazole (Sigma), washed three times with PBS after three hours and re-incubated in fresh medium for the mitosis commitment.

Immunofluorescence

Mitotic synchronized cells were grown on coverslips coated with 0.2 mg/ml poly-D-Lysine (Sigma), washed twice in PBS and fixed in PBS/4% formaldehyde for 4 min at room temperature. After three PBS washes, the cells were fixed by incubation in Methanol for 5 min at -20°C and rewashed three times in PBS. Cells were blocked for 45 min in filtered TBS supplemented with 0.1% Tween 20 and 3% BSA. All the primary antibodies were used at the dilution of 1:500. The primary monoclonal antibody IAK1 (anti Aurora-A) was from BD Transduction Laboratories, the mouse monoclonal and rabbit polyclonal anti PP2Ac from UPSTATE, the polyclonal rabbit anti Delta-Tubulin (H-300) from Santa Cruz. All secondary antibodies were purchased from Molecular Probe and labelled either with Alexa Fluor 546 or Alexa Fluor 488. Cells nuclei were labelled using DAPI. Microscopy images were obtained by using a biphotonic confocal microscope (Zeiss LSM 510) and a Zeiss Plan-neofluar X40 ph3 oil objective NA 1,3.

Electroporation procedure and transfection

Electroporations were performed following the Electroporation Protocol T820 provided For ElectroSquarePorator (BTX Electroporator). HeLa cells were trypsinized, washed twice in PBS and resuspended at $5 \cdot 10^6$ cells/ml. 20 µg of DNA was added to a 400 µl cells sample in a BTX Disposable Cuvette Model 640, 4 mm gap. Electroporation was performed with the following settings : LV Mode (99 msec/500v), voltage 150 V, pulse length 99 msec, 2 pulses, field strength 375V/cm. Rat IEC cells were electroporated following instructions given for Caco-2 human cells. Washed cells were resuspended in complete medium at 1.10^7 cells/ml and electroporated with the following settings: LV mode (99 msec/500V), voltage 165V, pulse length 70 msec, 1 pulse, field strength 412.5 V/cm. Electroporated cells were immediately transferred in a single well of a 24 wells plate and incubated for 24 h at 37 °C with fresh medium. After 48 h, IEC cells transfected with hAurA (IECAur) were selected by Blasticidin at a final concentration of 0.1 mg/ml. Silenced HeLa cell lines (AUR(RNAi) and PP2A(RNAi)) were selected by Zeocin (Invitrogen) at a final concentration of 1 mg/ml. For transient transfections, HeLa cells in 6 well plates were transfected using an ExGen 500 transfection reagent following the manufacturer's instructions (Invitrogen).

Okadaic acid Treatment

OA (Sigma) was dissolved in DMSO to a final concentration of 1µM and added to synchronised cells to a final concentration of 1 nM for at least 15 min but never longer than 2 h. After incubation, the cells were washed three times in PBS and prepared for Western blot analysis or immunofluorescence.

Western blot analysis

Synchronized cells were lysed either in buffer 1 (25 mM HEPES, 150 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 1% Triton X100) or in Buffer 2 (mM HEPES, 150 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 1% SDS, 1% NP40) in the presence of proteases inhibitors. Protein quantification was performed using the micro BCA method. Laemmli denaturing buffer was added and a final volume containing 100µg of proteins was boiled 15 min at 90°C. Proteins were loaded on a 10% SDS gel which was run for 1h at 100V. Proteins were transferred during 1h at 100V on PVDF membrane. Membranes were blocked 45 min in TBS/0.1% Tween 20 and then incubated overnight at 4°C with monoclonal IAK1 antibody diluted at 1:250, polyclonal or monoclonal anti PP2Ac antibodies diluted at 1:1000 in TBS/0.1% Tween 20. Specific signals were detected using a goat anti mouse or goat anti rabbit HRP conjugated antibody and ECL procedure. Western blot quantifications were performed using the Image J software provided by NIH and normalized using actin.

Immunoprecipitation

IECAur or HeLa cells were lysed either in buffer 1 or in Buffer 2. Protein G beads were incubated 2h with 3% BSA in PBS at 4° C. A volume of total lysates containg 500 µg of proteins was pre-cleared by an initial 2 hours incubation with 100 µl of protein G/BSA beads and subsequently by a non relevant rabbit immunoglobulin G (Jackson Laboratories). The mix was centrifuged 2 min at 1600 RPM after each of the previous steps. The cleared supernatant was then incubated 2h with either 8 µg of a polyclonal rabbit anti Aurora-A antibody (Oncogene) or 4 µg of a rabbit polyclonal anti PP2Ac monoclonal antibody (UPSTATE). 100 µl of protein G/BSA beads were then added and the mix gently rocked overnight at 4°C. The mix was then centrifuged 2 min at 1600 RPM and the specific immunoprecipitated complex

was then washed three times in the lysis buffer. For Western blot analysis, 100 µg of the initial total lysate and of the immunoprecipitation supernatant were boiled in the denaturing buffer and loaded on the gel (lanes 1 and 3 respectively). The whole non specific and specific Immunoprecipitations were resuspended in a 20 µl final volume of denaturing buffer, boiled and loaded on the gel (lanes 2 and 4 respectively).

Vector constructions

Human Aurora-A cDNA was a generous gift from Dr F. Hans (Grenoble, France). It was cloned into the pEF6/V5-His TOPO TA (Invitrogen) which contains the Blasticidine resistance and expressed in IEC cells. For site directed mutagenesis, hAurA was amplified by PCR and cloned in the peGFP-N1 vector (Invitrogen). Then, site directed mutations were generated on the fusion protein by using the QuickChangeTM Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene) with the following primers :

For the S51D mutant: 5'GGTCTTGTGTCCTGATAATTCTTCCCAGCGC3' and 5'GCGCTGGAAAGAATTATCAGGACACAAGACC3'

For the R371D mutant: 5'GCATAATCCCAGCCAGGACCCAATGCTCAGAGAAG3' and 5'CTTCTCTGAGCATTGGGTCTGGCTGGATTATGC3'

For RNAi experiments, 59 pb primers were cloned into the pSUPER 2 vector as described by the provider (Oligoengine). We used pSUPER2 vector contains Zeocin resistance for stable cell line selection. To knock down Aurora-A, we used a sequence described before for dsRNAi experiments in HeLa cells (Hirota et al., 2003). The primers were thus designed as following:

-Forward primer hAurA :

GATCCCCATTCTTCCCAGCGCGTTCCTCAAGAGAGGAACGCGCTGGGAAGAATT

TTTTGGAAA

-Reverse primer hAurA :

AGCTTTCCAAAAAATTCTTCCCAGCGCGTTCCTCTCTGAAGGAACGCGCTGGG

AAGAATGGG

To design the primers for PP2Ac in HeLa cells, we used a sequence described previously in to knock down the protein Drosophila (Bennin et al., 2002) and we aligned it with the sequence of both human PP2Ac isoforms. We chose a sequence that matches with both PP2Ac α and PP2Ac β isoforms as described in figure 1. This allowed us to design the following primers

-Forward primer hPP2Ac :

GATCCCCTCTGTGGAGATGTGCATGGTCAAGAGACCATGCACATCTCACAGA

TTTTGGAAA

-Reverse primer hPP2Ac :

AGCTTTCCAAAAATCTGTGGAGATGTGCATGGTCTCTGAACCATGCACATCT

CCACAGAGGG

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Drs Jérôme Lacoste, Stefan Dimitrov and Winship Herr for helpful comments on the manuscript of this article. VH was the recipient of the fellowship from the ministère de la recherche et de l'enseignement supérieur. We are grateful to the Fondation de la Recherche Médicale (FRM) for supporting the end of this work.

FIGURE LEGENDS

Figure 1: PP2Ac is co localized with Aurora-A in centrosomes

A to C: Immunofluorescence detection with a confocal microscope of the catalytic subunit of PP2A (PP2Ac) (red labeling) in synchronized IEC (A), IECAur (B), and HeLa cells (C). **D to F:** Co detection of PP2Ac (red) and δ-Tubulin (green) in synchronized IEC Aur cells. **G and H:** Co detection of PP2Ac (red) and δ-Tubulin (green) in synchronized HeLa cells. **I to K:** colocalization of PP2Ac (green) with Aurora-A (red) in synchronized IEC Aur cells. **L to O:** colocalization of PP2Ac (green) with Aurora-A (red) in synchronized HeLa cells. **P and Q:** co detection of Aurora-A (red) and δ-Tubulin (green) in synchronized IEC Aur cells. **R and S:** co detection of Aurora-A (red) and δ-Tubulin (green) in synchronized HeLa cells. Bar is 20 μm.

Figure 2: PP2Ac co immunoprecipitates with Aurora-A in mammalian cells

Reciprocal immunoprecipitation of Aurora-A and PP2Ac were performed in IEC Aur and HeLa cells. **A:** Immunoprecipitation (IP) of Aurora-A with a polyclonal antibody from a IEC Aur cells lysate performed under stringent conditions (buffer 2). Western blot analysis revealed the presence of both Aurora-A and PP2Ac in the precipitated complex (lane d). Both proteins were detected in the input (lane a) and in the IP supernatant (lane c). Conversely, no signal either specific or non specific was detected after immunoprecipitation under same conditions with a non relevant immunoglobulin (lane b). **B:** PP2Ac IP with a polyclonal antibody from HeLa cells lyzed in buffer 1. Western blot analysis of the precipitated complex reveals the presence of both endogenous Aurora-A and PP2Ac (lane d). As described previously, the proteins were contained in the input (lane a), the IP supernatant (lane c) but not in the non specific IP performed with a non relevant immunoglobulin (lane b).

Figure 3: PP2A pharmacological inhibition prevented Aurora-A degradation

Synchronized IECAur cells were treated with 1 nM Okadaic acid (OA) after the mitosis entry.

A: The treated and non treated cells were lysed at different time of mitosis: 0, 15, 30 and 75 minutes. Treated cells are indicated by the “T”. The amount of Aurora-A in these cells lysates was analyzed by Western blot analysis. In treated cells, Aurora-A level increases from 30 minutes to 75 minutes whereas it decreases at this time in control cells. **B:** Western blot quantification confirms that Aurora-A expression is constant in control cells and decreases of 12 percent at 75 minutes. In treated cells, the percentage of Aurora-A is significantly increased of 25 % after 30 minutes and 51 % after 70 minutes. **C:** As described for Western blot analysis, IECAur cells were treated by 1 nM OA and fixed at different time after mitosis entry. Aurora-A was detected by immunofluorescence using a monoclonal antibody. In treated cells the kinase was in centrosomes at the mitosis onset (a) and its level is increased at 30 min to 120 min and localized throughout the cell (b to d). Moreover, we can observe some chromosomes alignment, segregation (b and c, DAPI staining) and cytokinesis defects (d, DAPI staining). Conversely, in the non treated cells (NT), microscopy reveals that the kinase (red) observes a centrosomal localization and that its level is constant in prometaphase (e), metaphase (f), anaphase (g) and cytokinesis (h). Bar is 20 μ m.

Figure 4: PP2Ac silencing stabilizes Aurora-A

Stable knock down of either Aur A or PP2Ac was achieved by transfecting pSUPER2 vector in HeLa cells. **A:** Sequences alignment between the drosophila PP2Ac RNAi sequence, our sequence for shRNAi and PP2Ac α and PP2Ac β sequences. **B:** Western blot analysis of the polyclonal stable cell line reveals that Aur A is stabilized in the PP2Ac silenced cells. **C:**

Quantification of the western blot show that Aur A level is increased of 33 percents in cells as PP2Ac is decreased of 60 percents. A 20 percents diminution of PP2Ac is observed in cells where 48 percents of Aur A is knocked down.

Figure 5: Aur A and PP2Ac silencing affect their partner localization

Immunofluorescence using monoclonal antibodies were performed in both stable cell lines. **A:** PP2Ac (green) immunostaining in Aur A silenced cells. **B:** Aur A (red) immunodetection in PP2Ac silenced cells. Bar is 20 µm.

Figure 6: A box phosphorylation prevents Aurora-A degradation

CHO cells were transitory transfected either with the wild type human Aur A in fusion with GFP (A) or with a mutated protein on the A Box (S51D) (B) or the D Box (R371D) (C) in fusion with GFP. Transfections with both mutants reveal a high expression of the protein even during interphase (B and C) compared to the wild type (A). **D:** Western blot analysis of the transfected cells shows that both GFP mutant proteins are significantly stabilized in the transfected cells compared to the GFP wild type protein. Bar is 20 µm.

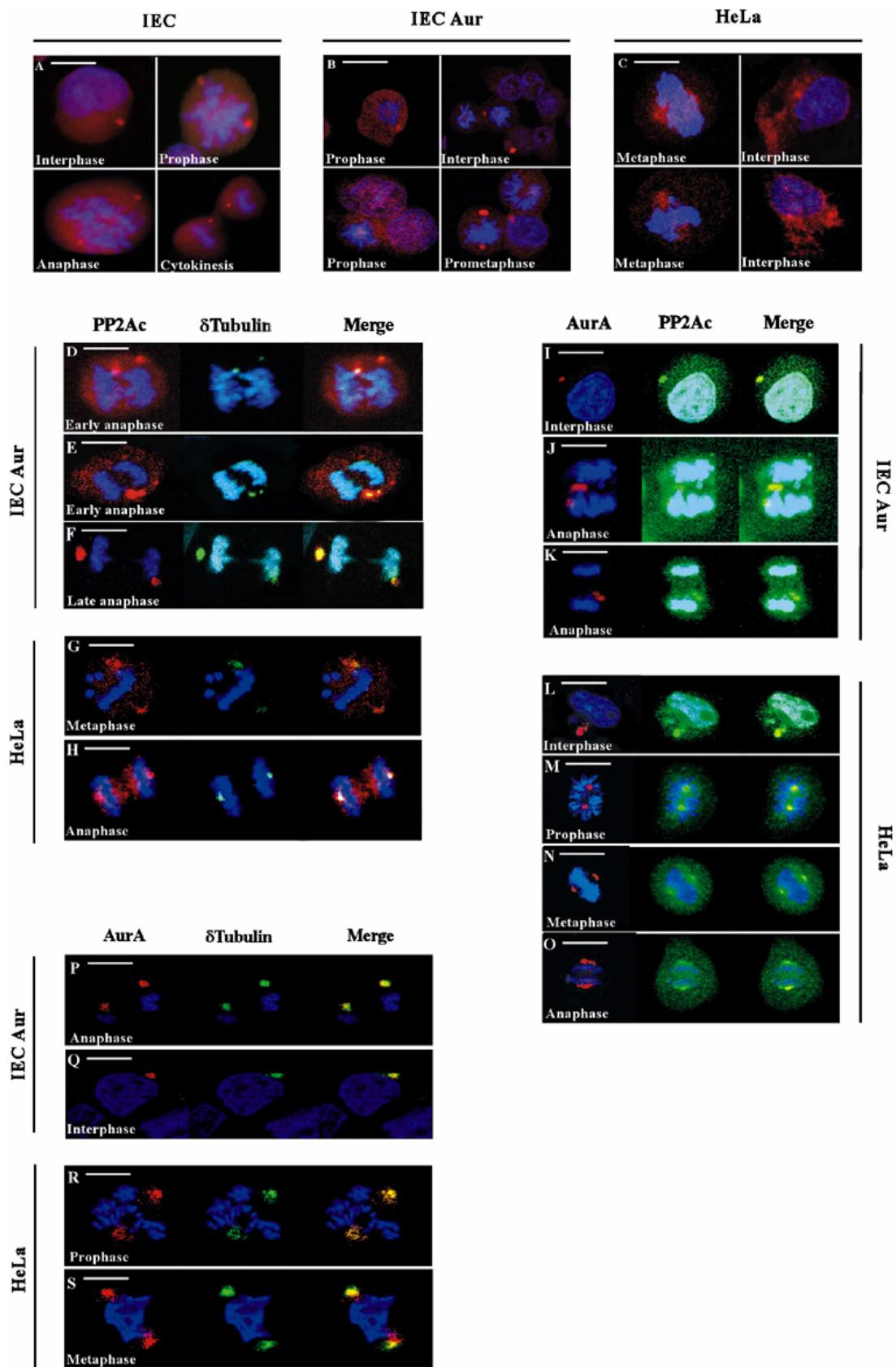


Figure 1 Horn *et al.*

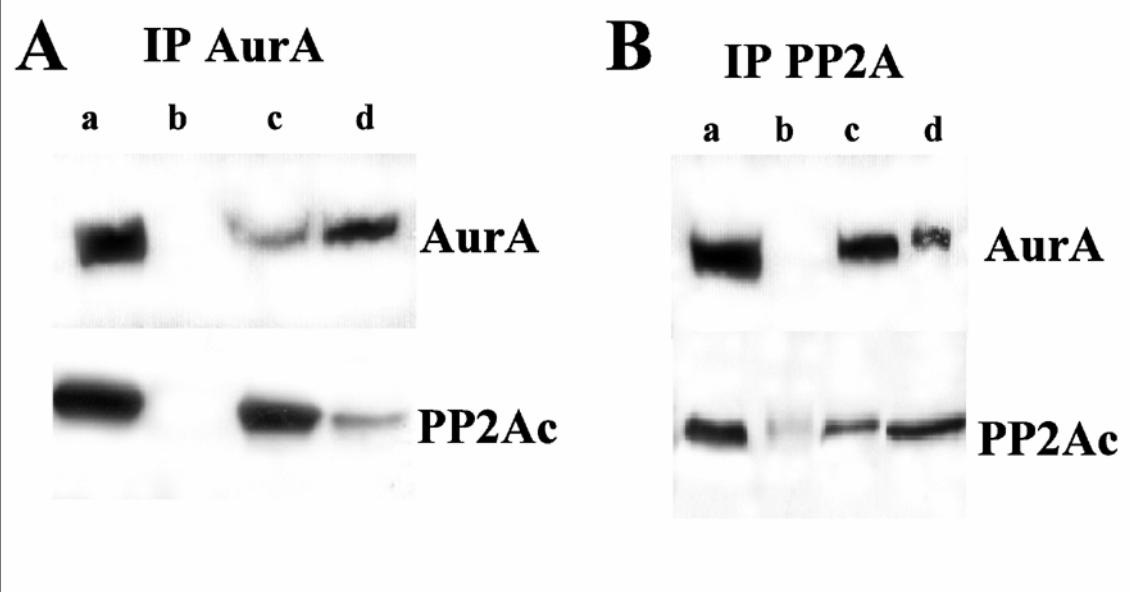


Figure 2 Horn *et al.*

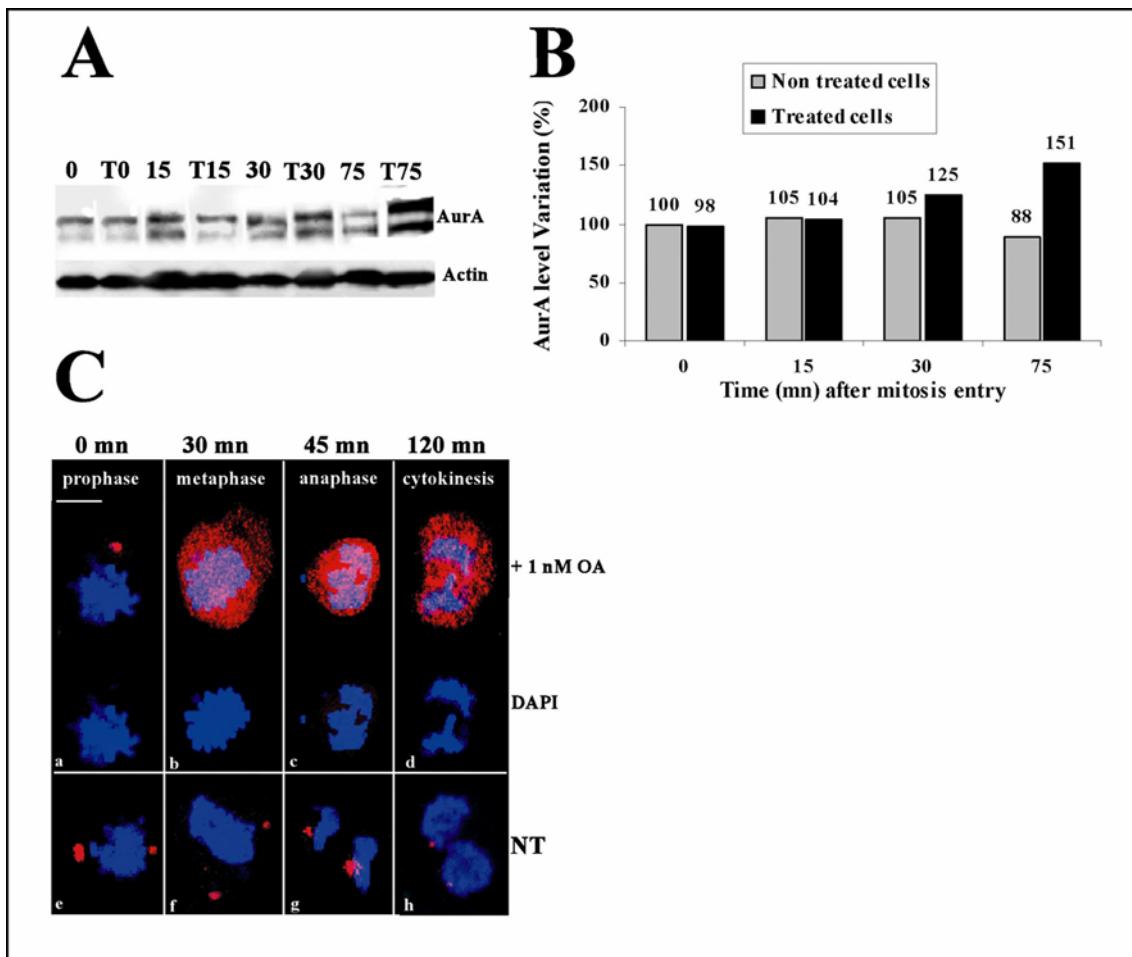


Figure 3 Horn *et al.*

A

RNAi droso -----TGC GGAGATGTCCACGGTCAG---
RNAi PP2Ac -----TCT GTGGAGATGTGCATGG-----
PP2Ac α TTACTGTCTGTGGAGATGTGCATGGCAATT
PP2Ac β TTACTGTCTGTGGAGATGTGCATGGTCAATT

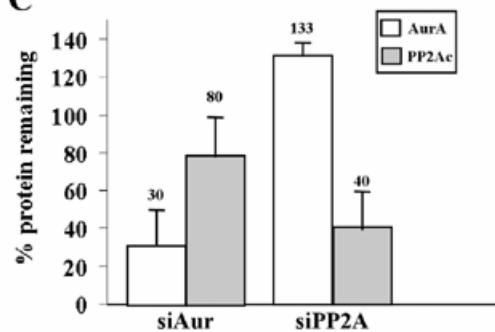
B**C**

Figure 4 Horn *et al.*

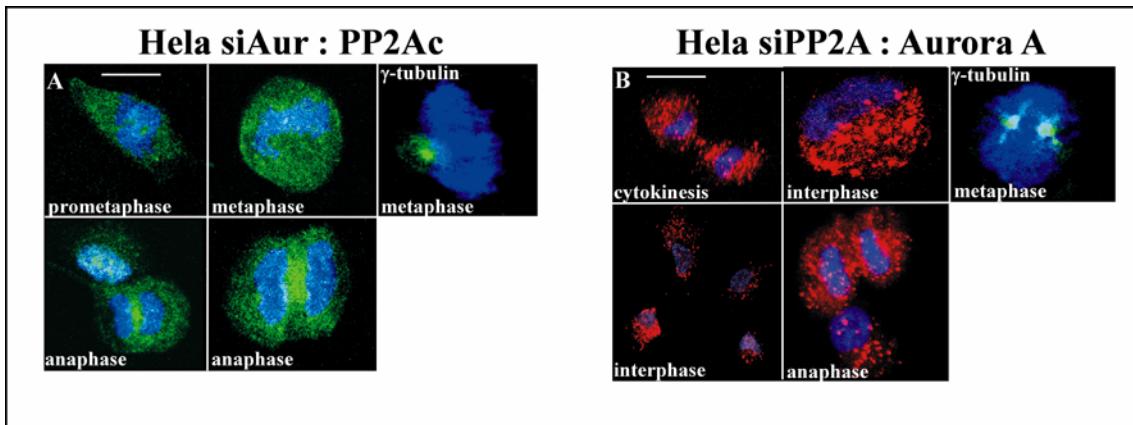


Figure 5 Horn *et al.*

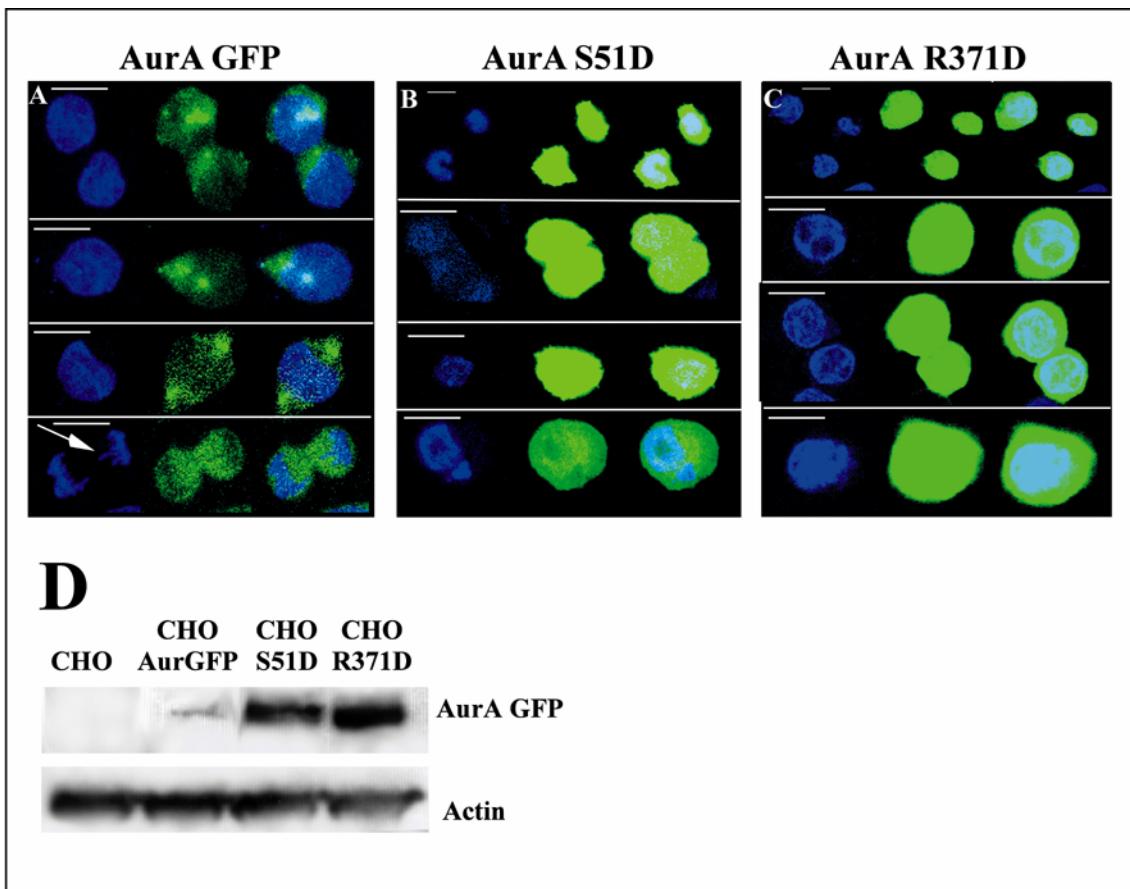


Figure 6 *Horn et al.*

REFERENCES

- Anand, S., Penrhyn-Lowe, S. and Venkitaraman, A.R. (2003) AURORA-A amplification overrides the mitotic spindle assembly checkpoint, inducing resistance to Taxol. *Cancer Cell*, **3**, 51-62.
- Andersen, J.S., Wilkinson, C.J., Mayor, T., Mortensen, P., Nigg, E.A. and Mann, M. (2003) Proteomic characterization of the human centrosome by protein correlation profiling. *Nature*, **426**, 570-574.
- Bennin, D.A., Don, A.S., Brake, T., McKenzie, J.L., Rosenbaum, H., Ortiz, L., DePaoli-Roach, A.A. and Horne, M.C. (2002) Cyclin G2 associates with protein phosphatase 2A catalytic and regulatory B' subunits in active complexes and induces nuclear aberrations and a G1/S phase cell cycle arrest. *J Biol Chem*, **277**, 27449-27467.
- Bialojan, C. and Takai, A. (1988) Inhibitory effect of a marine-sponge toxin, okadaic acid, on protein phosphatases. Specificity and kinetics. *Biochem J*, **256**, 283-290.
- Bischoff, J.R., Anderson, L., Zhu, Y., Mossie, K., Ng, L., Souza, B., Schryver, B., Flanagan, P., Clairvoyant, F., Ginther, C., Chan, C.S., Novotny, M., Slamon, D.J. and Plowman, G.D. (1998) A homologue of Drosophila aurora kinase is oncogenic and amplified in human colorectal cancers. *Embo J*, **17**, 3052-3065.
- Bischoff, J.R. and Plowman, G.D. (1999) The Aurora/Ipl1p kinase family: regulators of chromosome segregation and cytokinesis. *Trends Cell Biol*, **9**, 454-459.
- Blagden, S.P. and Glover, D.M. (2003) Polar expeditions--provisioning the centrosome for mitosis. *Nat Cell Biol*, **5**, 505-511.
- Chaudhuri, S.K., Ghosh, S., Paweletz, N. and Schroeter, D. (1997) Effects of low concentrations of okadaic acid in HeLa cells. *Indian J Exp Biol*, **35**, 1044-1054.
- Chen, W., Possemato, R., Campbell, K.T., Plattner, C.A., Pallas, D.C. and Hahn, W.C. (2004) Identification of specific PP2A complexes involved in human cell transformation. *Cancer Cell*, **5**, 127-136.
- Crane, R., Kloepfer, A. and Ruderman, J.V. (2004) Requirements for the destruction of human Aurora-A. *J Cell Sci*, **117**, 5975-5983.
- Dai, W., Huang, X. and Ruan, Q. (2003) Polo-like kinases in cell cycle checkpoint control. *Front Biosci*, **8**, d1128-1133.
- Dutertre, S., Cazales, M., Quaranta, M., Froment, C., Trabut, V., Dozier, C., Mirey, G., Bouche, J.P., Theis-Febvre, N., Schmitt, E., Monsarrat, B., Prigent, C. and Ducommun, B. (2004) Phosphorylation of CDC25B by Aurora-A at the centrosome contributes to the G2-M transition. *J Cell Sci*, **Pt**.
- Eyers, P.A. and Maller, J.L. (2003) Regulating the regulators: Aurora A activation and mitosis. *Cell Cycle*, **2**, 287-289.
- Glover, D.M., Leibowitz, M.H., McLean, D.A. and Parry, H. (1995) Mutations in aurora prevent centrosome separation leading to the formation of monopolar spindles. *Cell*, **81**, 95-105.
- Goepfert, T.M., Adigun, Y.E., Zhong, L., Gay, J., Medina, D. and Brinkley, W.R. (2002) Centrosome amplification and overexpression of aurora A are early events in rat mammary carcinogenesis. *Cancer Res*, **62**, 4115-4122.
- Goepfert, T.M. and Brinkley, B.R. (2000) The centrosome-associated Aurora/Ipl-like kinase family. *Curr Top Dev Biol*, **49**, 331-342.

- Gopalan, G., Chan, C.S. and Donovan, P.J. (1997) A novel mammalian, mitotic spindle-associated kinase is related to yeast and fly chromosome segregation regulators. *J Cell Biol*, **138**, 643-656.
- Healy, A.M., Zolnierowicz, S., Stapleton, A.E., Goebel, M., DePaoli-Roach, A.A. and Pringle, J.R. (1991) CDC55, a *Saccharomyces cerevisiae* gene involved in cellular morphogenesis: identification, characterization, and homology to the B subunit of mammalian type 2A protein phosphatase. *Mol Cell Biol*, **11**, 5767-5780.
- Helps, N.R., Luo, X., Barker, H.M. and Cohen, P.T. (2000) NIMA-related kinase 2 (Nek2), a cell-cycle-regulated protein kinase localized to centrosomes, is complexed to protein phosphatase 1. *Biochem J*, **349**, 509-518.
- Hemmings, B.A., Adams-Pearson, C., Maurer, F., Muller, P., Goris, J., Merlevede, W., Hofsteenge, J. and Stone, S.R. (1990) alpha- and beta-forms of the 65-kDa subunit of protein phosphatase 2A have a similar 39 amino acid repeating structure. *Biochemistry*, **29**, 3166-3173.
- Hirota, T., Kunitoku, N., Sasayama, T., Marumoto, T., Zhang, D., Nitta, M., Hatakeyama, K. and Saya, H. (2003) Aurora-A and an interacting activator, the LIM protein Ajuba, are required for mitotic commitment in human cells. *Cell*, **114**, 585-598.
- Honda, K., Mihara, H., Kato, Y., Yamaguchi, A., Tanaka, H., Yasuda, H., Furukawa, K. and Urano, T. (2000) Degradation of human Aurora2 protein kinase by the anaphase-promoting complex-ubiquitin-proteasome pathway. *Oncogene*, **19**, 2812-2819.
- Huynh-Delerme, C., Fessard, V., Kiefer-Biasizzo, H. and Puiseux-Dao, S. (2003) Characteristics of okadaic acid-induced cytotoxic effects in CHO K1 cells. *Environ Toxicol*, **18**, 383-394.
- Janssens, V. and Goris, J. (2001) Protein phosphatase 2A: a highly regulated family of serine/threonine phosphatases implicated in cell growth and signalling. *Biochem J*, **353**, 417-439.
- Kallioniemi, A., Kallioniemi, O.P., Piper, J., Tanner, M., Stokke, T., Chen, L., Smith, H.S., Pinkel, D., Gray, J.W. and Waldman, F.M. (1994) Detection and mapping of amplified DNA sequences in breast cancer by comparative genomic hybridization. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**, 2156-2160.
- Karaiskou, A., Jessus, C., Brassac, T. and Ozon, R. (1999) Phosphatase 2A and polo kinase, two antagonistic regulators of cdc25 activation and MPF auto-amplification. *J Cell Sci*, **112 (Pt 21)**, 3747-3756.
- Katayama, H., Zhou, H., Li, Q., Tatsuka, M. and Sen, S. (2001) Interaction and feedback regulation between STK15/BTAK/Aurora-A kinase and protein phosphatase 1 through mitotic cell division cycle. *J Biol Chem*, **276**, 46219-46224.
- Khew-Goodall, Y. and Hemmings, B.A. (1988) Tissue-specific expression of mRNAs encoding alpha- and beta-catalytic subunits of protein phosphatase 2A. *FEBS Lett*, **238**, 265-268.
- Lechward, K., Awotunde, O.S., Swiatek, W. and Muszynska, G. (2001) Protein phosphatase 2A: variety of forms and diversity of functions. *Acta Biochim Pol*, **48**, 921-933.
- Lee, T.H. (1995) The role of protein phosphatase type-2A in the Xenopus cell cycle: initiation of the G2/M transition. *Semin Cancer Biol*, **6**, 203-209.
- Littlepage, L.E. and Ruderman, J.V. (2002) Identification of a new APC/C recognition domain, the A box, which is required for the Cdh1-dependent destruction of the kinase Aurora-A during mitotic exit. *Genes Dev*, **16**, 2274-2285.
- Mailhes, J.B., Hilliard, C., Fuseler, J.W. and London, S.N. (2003) Okadaic acid, an inhibitor of protein phosphatase 1 and 2A, induces premature separation of sister chromatids during meiosis I and aneuploidy in mouse oocytes in vitro. *Chromosome Res*, **11**, 619-631.

- Marumoto, T., Hirota, T., Morisaki, T., Kunitoku, N., Zhang, D., Ichikawa, Y., Sasayama, T., Kuninaka, S., Mimori, T., Tamaki, N., Kimura, M., Okano, Y. and Saya, H. (2002) Roles of aurora-A kinase in mitotic entry and G2 checkpoint in mammalian cells. *Genes Cells*, **7**, 1173-1182.
- Mayer, R.E., Hendrix, P., Cron, P., Matthies, R., Stone, S.R., Goris, J., Merlevede, W., Hofsteenge, J. and Hemmings, B.A. (1991) Structure of the 55-kDa regulatory subunit of protein phosphatase 2A: evidence for a neuronal-specific isoform. *Biochemistry*, **30**, 3589-3597.
- Mayer, R.E., Khew-Goodall, Y., Stone, S.R. and Hemmings, B.A. (1990) Expression and organization of protein phosphatase 2A catalytic subunit genes. *Adv Second Messenger Phosphoprotein Res*, **24**, 236-241.
- Meraldi, P., Honda, R. and Nigg, E.A. (2004) Aurora kinases link chromosome segregation and cell division to cancer susceptibility. *Curr Opin Genet Dev*, **14**, 29-36.
- Minshull, J., Straight, A., Rudner, A.D., Dernburg, A.F., Belmont, A. and Murray, A.W. (1996) Protein phosphatase 2A regulates MPF activity and sister chromatid cohesion in budding yeast. *Curr Biol*, **6**, 1609-1620.
- Price, N.E. and Mumby, M.C. (2000) Effects of regulatory subunits on the kinetics of protein phosphatase 2A. *Biochemistry*, **39**, 11312-11318.
- Rieder, C.L., Faruki, S. and Khodjakov, A. (2001) The centrosome in vertebrates: more than a microtubule-organizing center. *Trends Cell Biol*, **11**, 413-419.
- Schlegel, J., Stumm, G., Scherthan, H., Bocker, T., Zirngibl, H., Ruschoff, J. and Hofstadter, F. (1995) Comparative genomic in situ hybridization of colon carcinomas with replication error. *Cancer Res*, **55**, 6002-6005.
- Strack, S., Chang, D., Zaucha, J.A., Colbran, R.J. and Wadzinski, B.E. (1999) Cloning and characterization of B delta, a novel regulatory subunit of protein phosphatase 2A. *FEBS Lett*, **460**, 462-466.
- Strack, S., Ruediger, R., Walter, G., Dagda, R.K., Barwacz, C.A. and Cribbs, J.T. (2002) Protein phosphatase 2A holoenzyme assembly: identification of contacts between B-family regulatory and scaffolding A subunits. *J Biol Chem*, **277**, 20750-20755.
- Tournebize, R., Andersen, S.S., Verde, F., Doree, M., Karsenti, E. and Hyman, A.A. (1997) Distinct roles of PP1 and PP2A-like phosphatases in control of microtubule dynamics during mitosis. *Embo J*, **16**, 5537-5549.
- Tung, H.Y., Wang, W. and Chan, C.S. (1995) Regulation of chromosome segregation by Glc8p, a structural homolog of mammalian inhibitor 2 that functions as both an activator and an inhibitor of yeast protein phosphatase 1. *Mol Cell Biol*, **15**, 6064-6074.
- Virshup, D.M. (2000) Protein phosphatase 2A: a panoply of enzymes. *Curr Opin Cell Biol*, **12**, 180-185.
- Zolnierowicz, S. and Bollen, M. (2000) Protein phosphorylation and protein phosphatases. De Panne, Belgium, September 19-24, 1999. *Embo J*, **19**, 483-488.
- Zolnierowicz, S., Csortos, C., Bondor, J., Verin, A., Mumby, M.C. and DePaoli-Roach, A.A. (1994) Diversity in the regulatory B-subunits of protein phosphatase 2A: identification of a novel isoform highly expressed in brain. *Biochemistry*, **33**, 11858-11867.

CONCLUSION GENERALE ET DISCUSSION

En conclusion de ce travail, nous avons montré que la kinase Aurora-A et la protéine phosphatase PP2A sont co-localisées dans les centrosomes de cellules somatiques de mammifères au cours de la mitose et que ces deux protéines interagissent au sein du même complexe dans ces cellules. De plus, nous avons mis en évidence que l'inhibition de l'activité de PP2A soit par un inhibiteur spécifique, l'acide okadaïque, soit par extinction de l'expression de la sous unité catalytique de la protéine phosphatase permet la stabilisation de Aurora-A *in vivo*. De même, la substitution de sérine 51 de Aurora-A en acide aspartique mime la phosphorylation de la kinase et inhibe sa dégradation *in vivo*. L'ensemble de ces résultats nous amène à conclure que PP2A et Aurora-A forment un complexe fonctionnel dans les cellules de mammifères et que le rôle de PP2A dans ce complexe est de déphosphoryler la sérine 51 de Aurora-A, réalisant ainsi l'évènement responsable de la dégradation de la kinase par le complexe du protéasome.

En se basant sur l'hypothèse formulée par Littlepage et ses collaborateurs ainsi que nos propres résultats expérimentaux nous pouvons proposer une modélisation des mécanismes moléculaires aboutissant à la dégradation de Aurora-A. Ce modèle est schématisé dans la figure 20.

Dans ce modèle, Aurora-A est associée à PP2A au sein du même complexe au cours de la mitose. À la fin de la mitose, PP2A déphosphoryle la sérine 51 de la A-box. Cette déphosphorylation induit alors un premier changement de conformation de la protéine. La D-box de la région C-terminale est alors accessible au complexe APC/C qui va pouvoir l'ubiquitinylérer. La fixation de l'ubiquitine sur la D-box engendre alors un changement de conformation permettant cette fois au complexe APC/C d'ubiquitinylérer la KEN-box et la A-box. Suite à ces dernières modifications, Aurora-A est protéolysée. À la vue des résultats de nos expériences avec l'acide okadaïque, il est très probable que la dégradation puisse survenir suivant le même mécanisme pendant de la mitose afin de maintenir constant le taux de Aurora-A. Sachant que le complexe APC/C n'est activé par Cdh1 qu'en fin de mitose, il serait intéressant de déterminer quelle voie d'activation du protéasome est mise en jeu dans ces conditions.

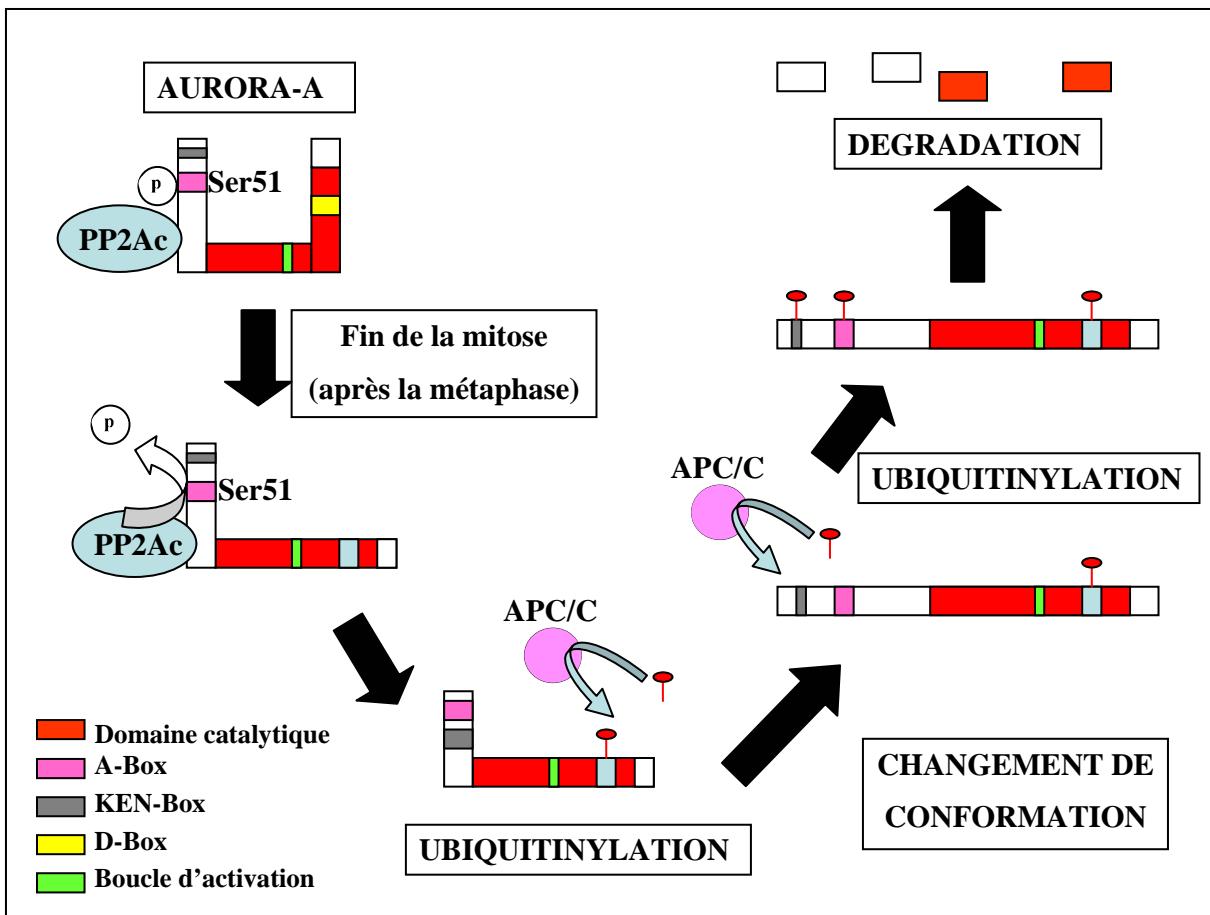


Figure 20: Modélisation de la dégradation de Aurora-A. La dégradation de Aurora-A est induite par la déphosphorylation de la sérine 51 de la A-box catalysée par PP2A. Il s'ensuit une succession de modifications de la conformation de la protéine permettant son ubiquitinylatation par le complexe APC/C et finalement sa dégradation.

RESULTATS COMPLEMENTAIRES ET PERSPECTIVES

Afin de mener à bien l'étude et la caractérisation du complexe entre Aurora-A et PP2A, nous avons généré un certain nombre d'outils moléculaires et cellulaires, notamment les lignées cellulaires stables IECAur, AUR(RNAi) et PP2A(RNAi). L'analyse de ces lignées nous permet d'ouvrir de nouveaux champs d'investigations et pose de nombreuses questions quant aux rôles de PP2A dans le cycle des centrosomes, la mise en place de la plaque métaphasique, et la cytokinèse ainsi que le rôle du complexe Aurora-A/PP2A dans la division asymétrique et la différenciation.

L'interaction de PP2A avec Aurora-A ne semble pas être requise pour la maturation des centrosomes :

Nous avons vu dans l'introduction que la kinase Aurora-A est impliquée non seulement dans la duplication et la séparation des centrosomes mais aussi dans leur maturation en participant au recrutement de la γ -tubuline. Ce processus est-il maintenu dans les cellules PP2A(RNAi) lorsque Aurora-A est stabilisée et re-localisée dans toute la cellule ? La détection par immunofluorescence de la γ -Tubuline révèle un marquage similaire dans les cellules HeLa et PP2A(RNAi) (Fig. 21). Ce résultat suggère fortement que la maturation des centrosomes dans ces cellules peut se faire indépendamment de l'activité de PP2Ac et que son interaction avec Aurora-A n'est pas nécessaire au recrutement de la γ -Tubuline.

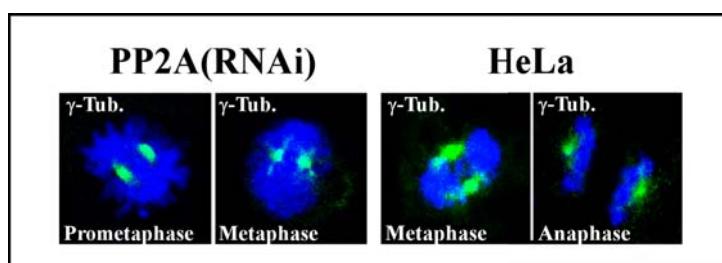


Figure 21: Détection par immunofluorescence de la γ -Tubuline (vert) dans les cellules PP2A RNAi et HeLa au cours de la mitose.

Au contraire, il a été décrit que Aurora-A est impliquée, directement ou non, dans toutes les étapes du cycle des centrosomes, comme nous l'avons vu en introduction. Cependant, il est envisageable que PP2A participe aux étapes de duplication et de dissociation des centrioles, au moins en assurant la localisation centrosomale de Aurora-A. Cette hypothèse est étayée par le fait que les mutants *mts* (*microtubule star*) de la sous-unité PP2Ac chez la Drosophile possèdent de multiples centrosomes (Snaith *et al.*, 1996). Ceci suggère que PP2A pourrait jouer un rôle inhibiteur de la duplication des centrioles, tout comme Aurora-A. Cette fonction pourrait donc être assurée, au moins en partie, via la formation du complexe Aurora-A/PP2A. PP2A permettrait d'ancrer la kinase à proximité de ses substrats mis en jeu dans l'étape de duplication.

PP2A et la formation d'une plaque métaphasique fonctionnelle

Les cellules PP2A(RNAi) présentent deux types plaque métaphasiques, ou à défaut de cette appellation, d'une structure apparentée (Fig. 22). Dans un cas, la kinase Aurora-A est stabilisée et redistribuée dans toute la cellule en division, sans localisation subcellulaire spécifique. Dans ce cas, les chromosomes s'alignent sur une plaque métaphasique, comme dans les cellules contrôle HeLa, et un seul fuseau de tubuline s'organise de part et d'autre de cette plaque (Fig. 22 A). Dans un second cas, les cellules PP2A(RNAi) présentent parfois deux alignements de chromosomes apparentés à des plaques métaphasiques et disposés orthogonalement l'un par rapport à l'autre (Fig. 22 B). Aurora-A n'est alors pas seulement stabilisée mais aussi concentrée dans quatre centrosomes aux intersections des pseudo plaques métaphasiques. Deux réseaux de tubuline s'organisent eux aussi orthogonalement aux chromosomes, comme orientés dans les plans définis par les centrosomes ou, au moins, les concentrations de Aurora-A. Cette disposition n'est jamais observée dans les cellules contrôle (Fig. 22 C). Il semble donc que les chromosomes des cellules PP2A(RNAi) se présentent parfois en deux structures apparentées à des plaques métaphasiques autour desquelles s'organisent deux réseaux de tubuline et deux paires de centrosomes.

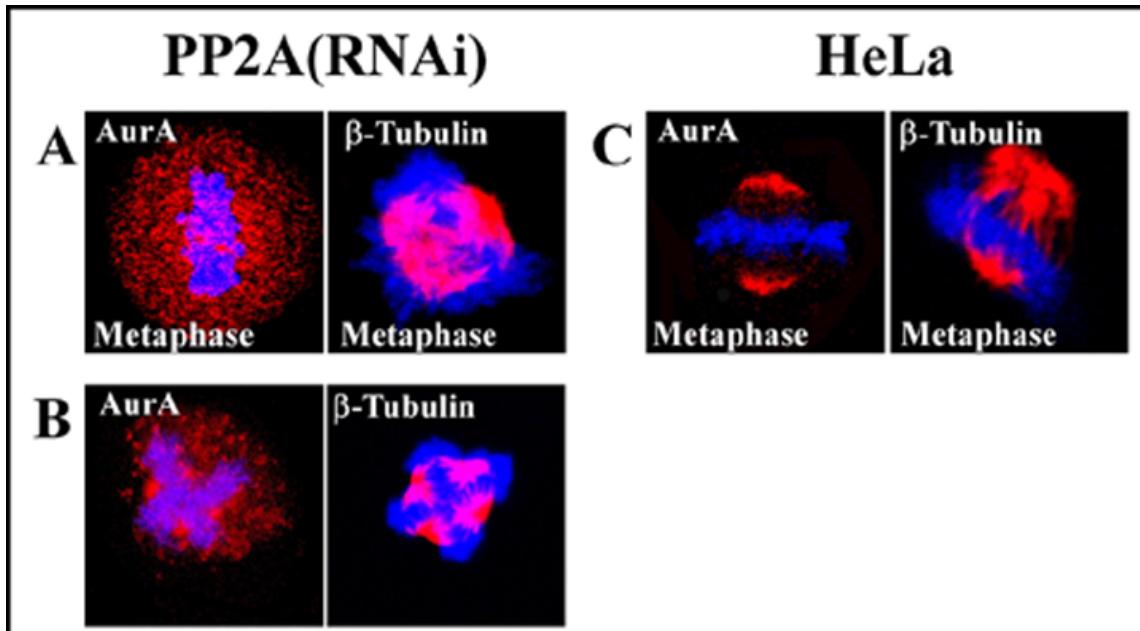


Figure 22: Détection par immunofluorescence de Aurora-A et de la β -Tubuline (rouge) dans les cellules PP2A RNAi et HeLa au cours de la mitose.

Ce résultat inattendu ouvre de larges perspectives. Afin de mieux comprendre la signification de ce phénomène, il faut tout d'abord répondre à un certain nombre de questions : Est-ce que ces cellules meurent, restent bloquées à cette étape ou se divisent ? Si elles se divisent, la division conduit-elle à la formation de deux cellules ou est-elle multipartite ? Existe-t-il une corrélation entre la fréquence d'apparition de ces cellules et l'apparition de cellules polynucléées ou aneuploïdes ? Quel est le taux d'extinction de l'expression de PP2AC dans ces cellules ? Pour répondre à ces questions, il serait intéressant tout d'abord d'étudier la fréquence d'apparition de ces pseudo plaques métaphasiques orthogonales parmi la population de cellules polyclonales et de suivre cette population en immunofluorescence pour trouver des phases mitotiques antérieures et surtout postérieures à cette pseudo métaphase. Afin d'étudier la ploïdie de ces cellules et leur taux de PP2AC, il pourrait être utile d'isoler des clones indépendants pour générer des lignées monoclonales, dans l'hypothèse où ces cellules se divisent. Enfin, pour discriminer l'effet de la stabilisation de Aurora-A et de l'extinction de l'expression de PP2AC dans l'apparition de ce phénomène, nous pourrions réaliser une expérience de sauvetage en réintroduisant PP2AC. Ainsi, l'étude de la fréquence de formation de ces plaques indiquerait si seule l'activité de PP2AC est impliquée ou non.

Relocalisation de PP2AC dans le corps intermédiaire

Nous avons décrit dans la publication précédente que l'utilisation du vecteur pSUPER2(PP2AC) dans les cellules HeLa ne permettait pas d'éteindre complètement l'expression de PP2AC dans toutes les cellules transfectées et sélectionnées. Nous avons observé que la quantité résiduelle de protéine PP2AC qui s'exprime dans certaines cellules PP2A(RNAi) se re-localise au niveau du corps intermédiaire (Fig. 23 A). Ce phénomène est particulièrement net lors de la cytokinèse. Ce phénomène est également observé dans les cellules AUR(RNAi). Dans ce cas, PP2AC est détectée dans toute la cellule mais apparaît particulièrement concentrée dans la future région du corps intermédiaire dès l'anaphase (Fig. 23 B). Cette localisation est maintenue lors de la cytokinèse. En revanche, la région du corps intermédiaire n'apparaît pas particulièrement enrichie en PP2AC dans les cellules contrôle (Fig. 23 C).

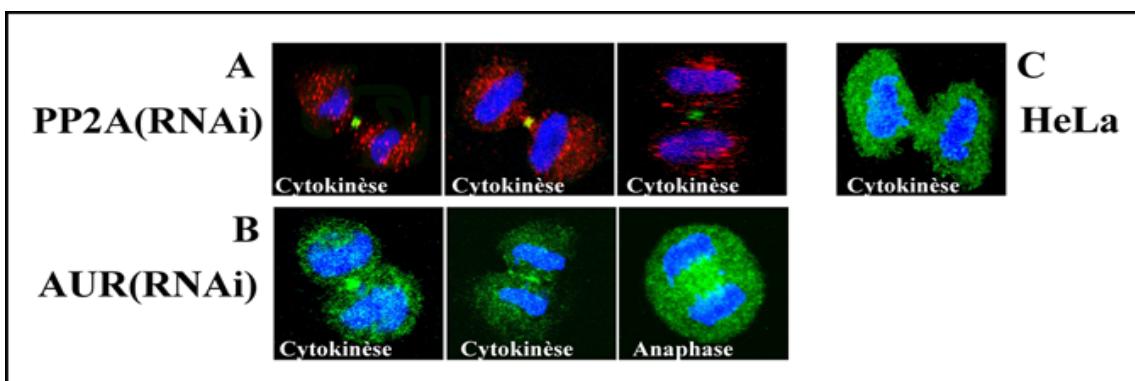


Figure 23: Détection par immunofluorescence de Aurora-A (rouge) et de PP2AC (vert) dans les cellules PP2A RNAi et HeLa au cours de l'anaphase et la cytokinèse.

La re-localisation de PP2A dans la région du corps intermédiaire pourrait conforter de précédents résultats indiquant son rôle dans la cytokinèse. Notamment, PP2A interagit et régule l'orthologue de MOB1 de la levure qui est un régulateur critique de la réorganisation du cytosquelette pendant la cytokinèse et de la sortie de la mitose (Moreno *et al.*, 2001). Les expériences d'immunofluorescence que nous avons réalisées semblent indiquer que la re-localisation de PP2Ac est un phénomène assez générale dans les deux lignées PP2A(RNAi) et AUR(RNAi) car observé dans la majorité des cellules. Cette observation suggère plusieurs questions. Cette re-localisation vient-elle favoriser ou au contraire empêcher la cytokinèse ? En effet, le caractère suppresseur de tumeur de PP2A laisse penser que l'activité de la

phosphatase puisse être mise en jeu pour empêcher ou retarder la division des cellules où Aurora-A, qui est le produit d'un oncogène, est stabilisée. Cette stabilisation peut en effet mener à de nombreux défauts cellulaires dont l'aneuploïdie. De même, dans les cellules PP2A(RNAi), la concentration de protéine résiduelle pourrait participer à éviter au retard ou à l'inhibition de la division cellulaire. Ces deux lignées peuvent être maintenues en culture, une partie de la population doit continuer de se diviser. Il est donc nécessaire de quantifier le pourcentage de cellules multinucléées dans ces deux lignées et d'essayer de caractériser si de l'aneuploïdie affecte plus particulièrement un chromosome ou si la structure ou le nombre de copie d'un gène en particulier sont modifiés. Pour cela, nous envisageons de réaliser des expériences de FISH et le caryotype de ces cellules.

La surexpression de Aurora-A dans les cellules IEC induit l'apparition d'une morphologie originale

Les cellules IEC de rat présentent en culture les caractéristiques de cellules indifférenciées des cryptes de l'intestin grêle. En effet, elles ont été décrites par Quaroni comme des cellules épithélioïdes, c'est-à-dire qui ressemblent à de l'épithélium mais qui n'en sont pas. Ces cellules forment en culture des monocouches de cellules polygonales contenant de larges noyaux ovales. Elles se caractérisent par un temps de doublement d'une vingtaine d'heures et un caryotype de rat diploïde normal (Quaroni *et al.*, 1979). Placées dans les conditions de cultures adéquates ces cellules peuvent se différencier (Carroll *et al.*, 1988; Wood *et al.*, 2003). Les cellules IEC présentent donc des caractéristiques spécifiques qui diffèrent des cellules immortalisées telles que les HeLa par exemple.

Pour mener à bien ce travail, nous avons transfecté de façon stable les cellules IEC avec l'ADNc de la kinase Aurora-A humaine (Fig. 24 A). La quantification des lysats de ces cellules montre une augmentation de 42% du taux de Aurora-A par rapport aux cellules non transfectées. De manière intéressante, la surexpression de Aurora-A dans ces cellules conduit aussi bien à la formation de fuseaux monopolaires (Fig. 24 C, e, f, g) que de fuseaux contenant de multiples centrosomes (Fig. 24 C, d). Par ailleurs, les fuseaux monopolaires ont soit un centrosome (Fig. 24 C, d) ou deux centrosomes non dissociés (Fig. 24 C, e, f). En revanche les cellules contrôle IEC non transfectées sont dotées d'un fuseau bipolaire avec un centrosome à chaque pôle en mitose (Fig. 24 C, a, b, c) et un centrosome unique en interphase

(Fig. 24 C, c). Les centrosomes sont détectés en immunofluorescence à l'aide d'anticorps spécifiques dirigés contre Aurora-A et PP2AC. Nous avons en effet montré dans la publication précédente que ces protéines étaient co-localisées dans les centrosomes avec la δ -Tubuline dans les cellules IEC et IECAur. Par ailleurs nous avons également décrit que ces protéines interagissaient dans le même complexe au cours de la mitose et que la localisation centrosomale de Aurora-A et PP2A dépendait mutuellement de leurs présences dans cette organelle. Ainsi, PP2Ac est co-localisée avec Aurora-A dans les cellules IEC (Fig. 24 C, a, b, c) et dans les cellules IECAur, même dans les centrosomes surnuméraires ou non dissociés (Fig. 24 C, d, e, f, g, h).

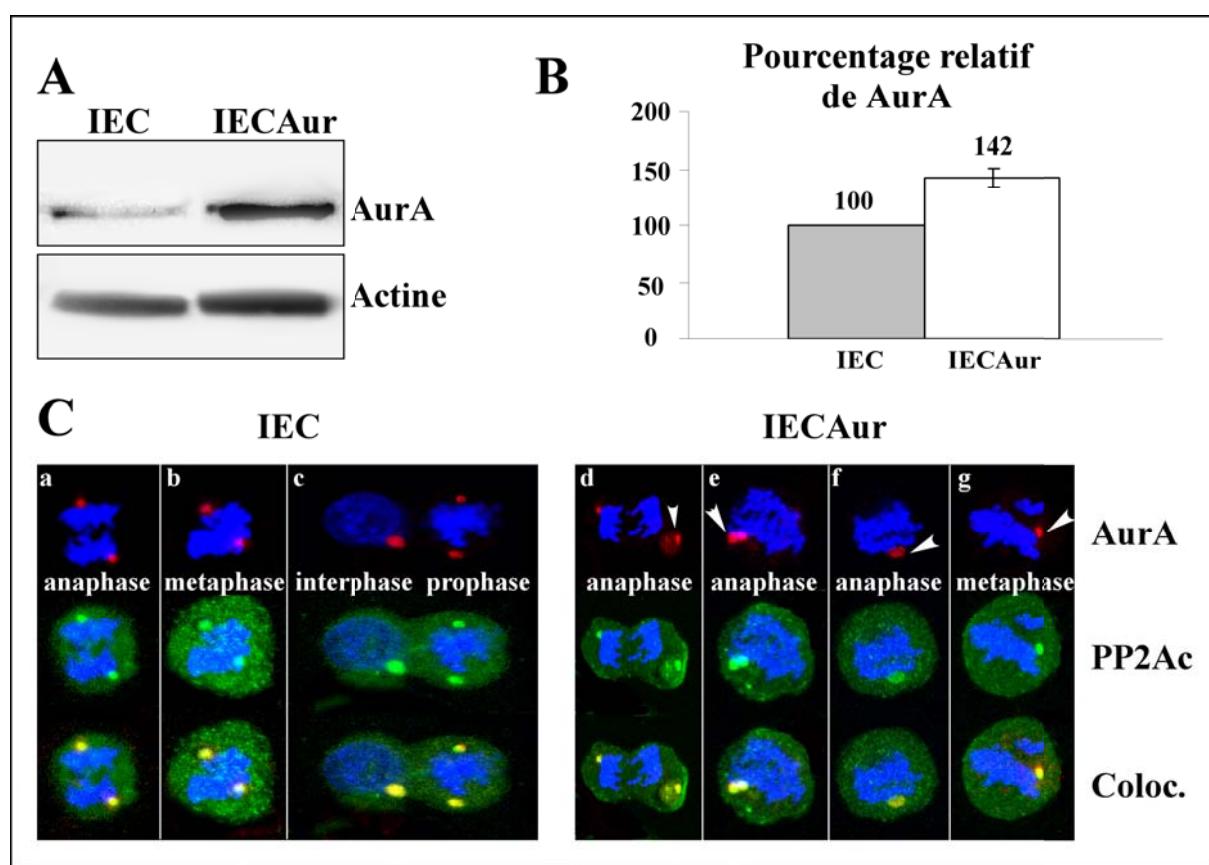


Figure 24 : Surexpression de Aurora-A humaine dans les cellules IEC. A : Détection de Aurora-A par Western blot des lysats de cellules IEC et IECAur. B : Quantification le protéine Aurora-A dans les lysats précédemment analysés par western blot. C : Détection par immunofluorescence de Aurora-A (rouge), de PP2Ac (vert) et de leur co-localisation (jaune) dans les cellules IEC et IECAur.

La surexpression de Aurora-A dans les cellules IEC conduit également l'apparition d'une morphologie particulière. En effet, l'observation de ces cellules en microscopie à

transmission révèle qu'elles peuvent former en culture des structures discoïdales caractéristiques et non observées dans les cellules contrôle (Fig. 25 A). Il est possible de distinguer dans cette structure un anneau périphérique de cellules à l'aspect relativement identiques renfermant en leur centre d'autres cellules, plus aplatis et ne présentant pas de disposition particulière les une par rapport aux autres. Des tests de prolifération cellulaire indiquent que le temps de doublement de ces cellules est environ deux fois supérieur à celui des cellules contrôles (Fig. 25 B). Ceci suggère que l'apparition de cette morphologie pourrait être corrélée avec un ralentissement de la croissance cellulaire.

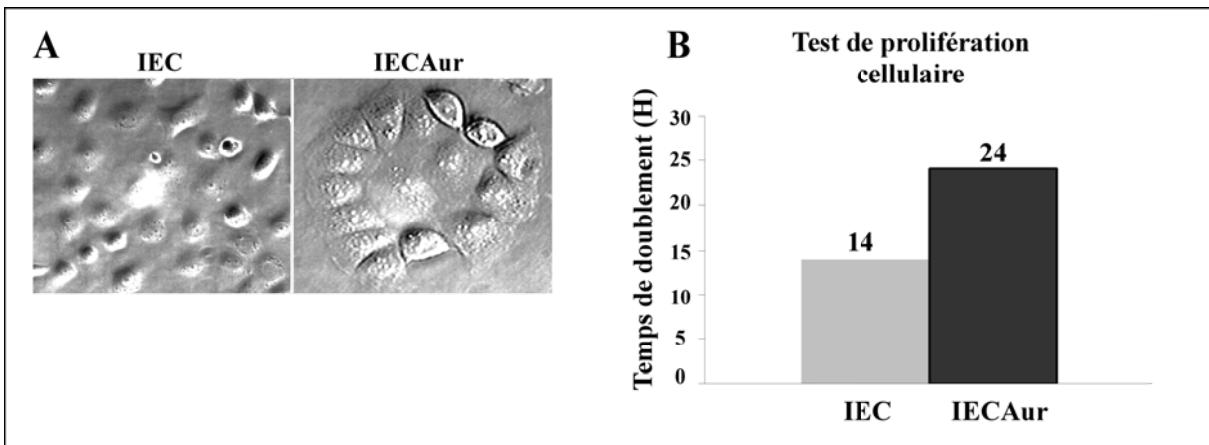


Figure 25 : Apparition d'une morphologie caractéristique dans les cellules IECAur. A : Observation des cellules IEC et IECAur au microscope conventionnel à transmission. B : Evaluation du temps de doublement des cellules IEC et IECAur grâce à un test de prolifération cellulaire.

Le fait que la surexpression de Aurora-A dans les cellules IEC mène aussi bien à la formation de fuseaux monopolaires qu'à la multiplication des centrosomes est assez surprenant. En effet, la littérature indique que les fuseaux monopolaires sont la conséquence de l'inhibition de l'activité kinase ou de sa mutation alors que l'augmentation du nombre des centrosomes est liée à la surexpression comme nous l'avons décrit dans l'introduction. Ce résultat surprenant pourrait être lié aux caractéristiques de pluripotence et de stabilité génétique des cellules IEC conduisant à des modes divers de régulation de l'activité de la kinase et du cycle des centrosomes en fonction de l'état de différenciation. Il serait utile d'étudier statistiquement la fréquence de fuseaux monopolaires et le nombre de centrosomes dans les cas où leur nombre croît. Par ailleurs ce phénomène pourrait conduire à des divisions asymétriques dans les cellules IECAur. En effet, il a été décrit chez la Drosophile que Aurora-A est requise pour la localisation asymétrique de NUMB elle-même nécessaire pour former le

système nerveux (Berdnik and Knoblich, 2002). Les cellules souches des cryptes intestinales réalisent elles aussi des division asymétriques pour générer des cellules progénitrices qui vont donner par la suite tous les types cellulaires différenciés de l'épithélium intestinal (Gordon *et al.*, 1992). Il n'est donc pas impossible que la répartition asymétrique du complexe Aurora-A/PP2A dans ces cellules permette de localiser asymétriquement des déterminants du devenir cellulaire ou que le complexe joue lui-même ce rôle de déterminant. Cette hypothèse permettrait d'expliquer l'apparition de la morphologie particulière de ces cellules et le ralentissement de la prolifération. Cependant, il n'est possible de dire si ces modifications morphologiques traduisent les prémisses d'un processus de différenciation ou pas : Est-ce la prolifération ou la viabilité cellulaire qui diminue ? Des marqueurs de différenciation apparaissent-ils dans les cellules organisées en couronne ? Les cellules présentant des fuseaux monopolaires se divisent-elles ? Est-il possible d'identifier des déterminants asymétriques dans ces cellules ? Pour répondre à ces questions, nous devrons procéder à des tests de viabilité cellulaire en détectant par exemple des antigènes de la prolifération tels que le Ki67. De plus, nous devrons cibler des marqueurs de la différenciation intestinale et de la division asymétrique par exemple par immunofluorescence, par RT-PCR et éventuellement PCR quantitative.

Notre travail ouvre différents champs d'investigation quant aux fonctions de Aurora-A, de PP2A et du complexe que ces protéines forment au cours de la mitose. L'ensemble de nos résultats laisse entrevoir que le rôle de ce complexe ne se limite pas à la régulation de la mitose mais puisse intervenir plus généralement dans la régulation du devenir des cellules issues de la division.

ANNEXE 1

Test de prolifération cellulaire

Les cellules sont lavées deux fois au PBS, décoller à la trypsine et remise en suspension afin d'être comptées. Elles ont ensuite ensemencées dans leur milieu de culture dans des boites de 96 puits aux densités suivantes (en cellules/ml) : 50, 100, 200, 400, 800, 1600, 3200, 6400. Après 24, 48 et 72 heures, 20 µl de réactif NBT sont ajoutés aux cellules préalablement ensemencées ainsi qu'à des cellules ensemencées aux même densités à 24, 48 et 72 heures et qui vont constituer le point de référence. L'accroissement du nombre de cellules par rapport à la référence est ensuite évalué par la lecture de la densité optique à 490 nm.

ANNEXE 2

Première publication de thèse :

Triple Helix Formation with *Drosophila* Satellite Repeats. Unexpected Stabilization by Copper Ions

Virginie Horn, Laurent Lacroix, Thierry Gautier, Masashi Takasugi, Jean-Louis Mergny, and Jérôme Lacoste. (2004)

Biochemistry, Vol. 43, No. 35, 11196-11205.

Triple Helix Formation with *Drosophila* Satellite Repeats. Unexpected Stabilization by Copper Ions^{†,‡}

Virginie Horn,^{§,||} Laurent Lacroix,[⊥] Thierry Gautier,[§] Masashi Takasugi,[⊥] Jean-Louis Mergny,[⊥] and Jérôme Lacoste*,^{*,#}

Laboratoire de Biologie Moléculaire et Cellulaire de la Différenciation, INSERM UR 309, Institut Albert Bonniot, Rond-point de la Chantourne, 38700 Grenoble, France, Laboratoire de Biophysique, Muséum National d'Histoire Naturelle, USM 0503, INSERM UR 565, CNRS UMR 5153, 43 rue Cuvier, 75231 Paris Cedex 05, France, Laboratoire d'Etudes de la Différenciation et de l'Adhérence Cellulaire, CNRS UMR 5538, Institut Albert Bonniot, Rond-point de la Chantourne, 38700 Grenoble, France, and Laboratoire des Radiopharmaceutiques Biocliniques, INSERM 0340, Faculté de Médecine de Grenoble, 38700 La Tronche, France

Received April 9, 2004; Revised Manuscript Received June 21, 2004

ABSTRACT: The *Drosophila melanogaster* (AAGAGAG)_n satellite repeat represents up to 1.5% of the entire fly genome and may adopt non-B DNA structures such as pyrimidine triple helices. UV melting and electrophoretic mobility shift assay experiments were used to monitor the stability of intermolecular triple helices as a function of size, pH, and backbone or base modification. Three to four repeats of the heptanucleotide motif were sufficient to allow the formation of a stable complex, especially when modified TFOs were used. Unexpectedly, low concentrations (40–100 μM) of Cu²⁺ were found to favor strongly pyrimidine triplex formation under near-physiological conditions. In contrast, a much higher magnesium concentration was required to stabilize these triplets significantly, suggesting that copper may be an essential stabilizing factor for pyrimidine triplets.

A notable feature of higher eukaryotic genomes is that certain portions show remarkably different properties from the bulk of the DNA. These were first distinguished from euchromatin cytologically, on the basis of differential staining properties, and named heterochromatin by Heitz (1). Molecular and genetic properties that further distinguish heterochromatin from euchromatin include DNA sequence composition, replication timing, condensation throughout the cell cycle, and the ability to silence gene expression (see refs 2–4 for a review). Heterochromatin is especially abundant at the centromeres and telomeres and is composed of highly reiterated sequences characterized by their unusual base composition and nature and called satellite DNAs. For example, in *Drosophila melanogaster*, heterochromatin accounts for an estimated 33.5% of the female genome with satellite repeats representing 21% of the genome (4, 5). Progress has been made in the understanding of the sequence and molecular organization of *Drosophila* (5–7) and human (8) centromeres, yet our understanding of their higher structural organization and function is still very limited.

Centromere function may be achieved by formation of a specific higher order structure (7, 9–11), an overall three-dimensional organization that results from special DNA architectures (bending, triplex or quadruplex DNA) and/or DNA–protein interaction in the centromere [GAGA factor (GAF) in *Drosophila* (12), Ikaros in mice (13), HP1 in human (14)]. For example, the AG-rich satellite DNAs found in the four *D. melanogaster* centromeres may be examples of sequences that could participate in or even promote a centromere-specific structure by adopting non-B DNA conformations. As a matter of fact, (AAGAG)_n and (AA-GAGAG)_n *Drosophila* centromeric satellites (4) are poly-purine–polypyrimidine tracts that can potentially adopt non-B DNA structures such as triple-stranded H-DNA or *H-DNA (15). Consistent with this hypothesis is the fact that the GAGA factor (GAF), a sequence-specific DNA-binding protein which specifically recognizes the (AAGAG)_n and (AAGAGAG)_n satellites (12, 16), may also bind to triple-stranded DNA (17) or promote a link between two separate DNA molecules (18).

* This work was supported by ARC Grants 4321 and 3365 to J.-L.M.

† This paper is dedicated to the memory of Professor Claude Hélène (1938–2003).

‡ Corresponding author. E-mail: jerl@ccr.jussieu.fr. Fax: (33-1) (0)4 76 63 71 42. Phone: (33-1) (0)4 76 63 71 33.

§ Laboratoire de Biologie Moléculaire et Cellulaire de la Différenciation.

|| Current address: Laboratoire d'Etudes de la Différenciation et de l'Adhérence Cellulaire, CNRS UMR 5538, Institut Albert Bonniot, Rond-point de la Chantourne, 38700 Grenoble, France.

⊥ Muséum National d'Histoire Naturelle.

Laboratoire des Radiopharmaceutiques Biocliniques.

A DNA triplex is formed upon binding of a pyrimidine or a purine single-stranded DNA to the major groove of a double helix, forming Hoogsteen or reverse-Hoogsteen hydrogen bonds with the purine strand of the duplex. Triplex DNA comes in three structural classes that differ in the base composition of the third strand, the relative orientation of the phosphate–deoxyribose backbones, the sensitivity to pH and cations (19, 20), and thermodynamic parameters (21). They have been described as the (C,T) or pyrimidine motif, the (G,A) or purine motif, and the (G,T) motif. These motifs can form both intramolecularly, giving H-DNA, and inter-

molecularly with triple helix-forming oligonucleotides (TFOs).¹ In the pyrimidine motif, the third strand is composed of cytosines and thymines and binds parallel to the purine strand of the duplex by Hoogsteen hydrogen bonds, leading to the formation of T·A*T and C·G*C⁺ triplets (22, 23). Formation of this motif requires slightly acidic conditions (22, 23). In the purine motif, the third strand is composed of guanines and adenines and binds antiparallel to the purine strand of the duplex by reverse-Hoogsteen hydrogen bonds, leading to the formation of T·A*A and C·G*G triplets (22–24). This motif contains no protonated bases, and its stability is therefore pH-independent. In the case of oligonucleotides, it generally requires divalent (Mg^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} , ...) (19) or multivalent cations (spermine, spermidine) (22) for its formation. It has also been shown that unimolecular folded purine triplexes can exist without any divalent cation and that the poly(dT)·2poly(dA) triplex can exist in the absence of divalent cation if high concentrations of monovalent cations are present (>1 M) (25, 26). In the (G,T) motif the third strand is composed of guanines and thymines and binds parallel or antiparallel to the purine strand of the duplex (27, 28).

Two main problems arise concerning the possibility of forming and stabilizing DNA triplexes *in vivo*. As noted above, the pyrimidine motif requires a slightly acidic pH, while the purine motif requires millimolar or higher concentrations of divalent cations (15). As a consequence, most studies have been oriented toward the formation and stabilization of DNA triplexes under near-physiological conditions, using base- or backbone-modified TFOs [i.e., 5-methyl-dC (29), 5-propynyl-dU (30), and 2'-*O*-methyl (31)].

In this report we address for the first time the possibility of forming triple helical structures with the *D. melanogaster* satellite sequence (AAGAGAG)_{1–4} *in vitro*. We limited our analysis to the formation of intermolecular pyrimidine triplexes. UV melting experiments were used to monitor the stability of the triple helix as a function of size, pH, and backbone or base modification. EMSA experiments were used to confirm triplex formation, to determine their apparent dissociation constants (K_D), and to study the effect of divalent cations such as Mg^{2+} and Cu^{2+} . Several articles deal with the formation of triple helices with 5-methylcytosine and 2'-*O*-methyl TFOs (31–33), but few report this formation with morpholino TFOs (34, 35), and to our knowledge, none study the effect of Cu^{2+} . We demonstrate that low concentrations (40–100 μ M) of Cu^{2+} favor pyrimidine triplex formation under near-physiological conditions.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Oligonucleotides and Chemicals. Most oligonucleotides were synthesized by Eurogentec (Seraing, Belgium). Morpholino oligonucleotides (21TCmo) were synthesized by GeneTools, LLC (Philomath, OR). Concentrations of all oligonucleotides were estimated by UV absorption in water at 20 °C, using a nearest-neighbor approximation for the absorption coefficients of the unfolded species (36). All concentrations were expressed in strand molarity.

Nomenclature. Oligonucleotides used in this study are listed in Table 1. We adopted the following convention for all of the oligonucleotides: the first number refers to the length of the oligonucleotide followed by the strand composition (R, purine-rich strand of the duplex; Y, pyrimidine-rich strand of the duplex; TC, pyrimidine TFO), followed by the modification (e.g., OMe for 2'-*O*-methyl sugar, mC for methyl-substituted cytosine). Duplexes are referred to as 19 RY, 26 RY, 33 RY, and 40 RY; they contain 1, 2, 3, or 4 copies of the heptanucleotide motif, respectively. Concerning the base triplets, as an example, a T·A*T triplet is obtained when base T in the third strand recognizes the Watson–Crick T·A base pair and forms specific hydrogen bonds, “*”, with the adenine of the duplex.

UV Absorption Spectrophotometry. Absorbance versus temperature heating and cooling curves were obtained using a KONTRON-UVIKON 940 spectrophotometer as previously described (37). The temperature of the bath was increased or decreased at a rate of 0.2 °C/min, thus allowing complete thermal equilibrium of the cuvettes. At each temperature, absorbance measurements were done at 245, 260, 295, and 405 nm (control wavelength). Most data were extracted from the profiles recorded at 245 nm, as the amplitude of the triplex transition was the largest at this wavelength (34). Unless otherwise specified, all experiments were performed in 10 mM sodium cacodylate buffer (pH 6.0 or 7.2) containing 100 mM KCl and various concentrations of $MgCl_2$ (0–10 mM). For triplex experiments strand concentrations ranged from 1.5 to 2.5 μ M for the duplexes and from 1.8 to 3 μ M for the third strand. Self-association of a TFO alone was checked in the same concentration range as for triplex analysis. At near-neutral pH, the thermal dissociation (heating) curves of most triplexes were shifted toward higher temperatures as compared to the association (cooling) curves (see Figure 1B–D for an example). Such behavior, which is the result of slow association and dissociation kinetics, has already been described for triple helix formation. These profiles were not fully consistent with a simple two-state model, therefore excluding a quantitative analysis of the kinetic parameters of triplex formation as previously described (38). We therefore restricted our analysis to the simple determination of the temperature of half-dissociation “ $T_{1/2}$ ” (upon heating), which slightly overestimates the true melting temperature (T_m). When profiles were consistent with a two-state model (TFOs alone and duplexes), T_m was determined as described in ref 38. Duplex melting occurred at high temperature in a reversible fashion, which helps to distinguish this transition from triplex melting.

Electrophoretic Mobility Shift Assays (EMSA). Oligonucleotides were labeled at the 5'-end with [γ -³²P]ATP (Amersham) using a T4 polynucleotide kinase (Invitrogen) according to the manufacturer's protocol. Duplexes were formed by annealing the 5'-end-labeled purine-rich strand with the unlabeled complementary strand in 10% molar excess in 50 mM NaCl. Binding reactions were performed as follows: Duplex at 10 nM (40 RY) was incubated with increasing concentrations of TFOs for 72 h at 20 °C in binding buffer (2.5 mM NaCl, 140 mM KCl, 0.5 mg/mL tRNA, and 10% sucrose with either 50 mM HEPES or 50 mM MES) with or without $MgCl_2$ or with increasing concentrations of $CuCl_2$. The mixture was then loaded on a 10% native acrylamide gel in 50 mM MES, pH 6.0, or in

¹ Abbreviations: EMSA, electrophoretic mobility shift assay; TFO, triplex-forming oligonucleotide; mC, 5-methylcytosine; mo, morpholino.

Table 1: List, Sequences, and Characteristics of the Oligonucleotides Used in This Study^a

name	sequence	backbone/sugar	base
19 R	5'-ctgccAAGAGAGCgtgc-3'		
19 Y	3'-gaacggTTCTCTCgtacag-5'		
7TC	5'-TTCTCTC-3'		
7TmC	5'-TTMTMTC-3'		mC
26 R	5'-ctgccAAGAGAGAAGAGAGCgtgc-3'		
26 Y	3'-gaacggTTCTCTCTCTCgtacag-5'		
14TC	5'-TTCTCTCTCTCTC-3'		
14TmC	5'-TTMTMTMTMTMTMC-3'		mC
33 R	5'-ctgccAAGAGAGAAGAGAGAAGAGAGCgtgc-3'		
33 Y	3'-gaacggTTCTCTCTCTCTCTCgtacag-5'		
21TC	5'-TTCTCTCTCTCTCTC-3'		
21TmC	5'-TTMTMTMTMTMTMTMTMC-3'		mC
21TCOMe	5'-UUCUCUCUUCUCUUCUCU-3'	OMe	U
21Cmo	5'-TTCTCTCTCTCTCTCTC-3'	PPN/mo	
40 R	5'-ctgccAAGAGAGAAGAGAGAAGAGAGAGCgtgc-3'		
40 Y	3'-gaacggTTCTCTCTCTCTCTCTCgtacag-5'		
28TC	5'-TTCTCTCTCTCTCTCTCTCTC-3'		
28TmC	5'-TTMTMTMTMTMTMTMTMTMC-3'		mC

^a Column 1 lists the abbreviated names of the oligonucleotides, column 2 lists the primary sequences of the oligonucleotides, and columns 3 and 4 list the DNA backbone, sugar, and base chemistry. The following convention is used for the abbreviated names: the length of the oligomer in nucleotides is followed by the nature of the strand involved in the Watson–Crick duplex (R or Y) or the nature of the third strand (TC, TmC, TCOMe, and TCmo). The *Drosophila* satellite target duplexes contain one to four satellite repeats [the main repeat comprises seven base pairs (AAGAGAG/CTCTCTT)] surrounded by six base pairs at both ends in order to stabilize duplex formation and prevent partial slipped duplexes. Except where otherwise stated, oligonucleotide backbones are phosphodiester, sugar is 2'-H, and bases are natural. Abbreviations: R = adenine and guanine; Y = thymine and cytosine; M = mC = 5-methyldeoxycytosine; OMe = 2'-O-methyl RNA; U = deoxyuracyl; PPN/mo = phosphorodiamidate morpholino.

50 mM HEPES, pH 7.2, with or without MgCl₂. Gels were dried for analysis. In all cases, migration of the triple helical complexes was compared with that of the duplex (40 RY) and that of the single-stranded component of the duplex (40 R). All gels were analyzed on a phosphorimager instrument (Molecular Dynamics). The apparent dissociation constant (K_D) was calculated by plotting the remaining fraction of the duplex against TFO concentrations (8–32 determinations for each set of experimental conditions) and fitting the data with a Kaleidagraph fitting function assuming a 1:1 stoichiometry, one TFO per duplex, and an unknown K_D and using a simple mass action law ($K_D = [TFO][D^*]/[T^*]$, where [D*] and [T*] represent respectively the concentration of the radiolabeled duplex and triplex species). Taking into account the fact that the TFO is in large excess as compared to the radiolabeled duplex, we can assume that the concentration of the TFO corresponds to its initial concentration C_0 . The equation used for the fitting procedure is then % D* = 100/(1 + C_0/K_D).

RESULTS

Targets and Oligonucleotides. A repeated sequence (4) of seven base pairs (5'-AAGAGAG/5'-CTCTCTT)_n was used to investigate triplex formation with natural and modified pyrimidine oligonucleotides. This AG-rich repeat is a satellite sequence present in each *D. melanogaster* centromere and represents up to 1.5% of the whole genome (4, 39). Target duplexes included one to four repeats of the satellite sequence surrounded by six base pairs (Table 1).

All TFOs were designed to form pyrimidine-parallel triple helices. 7TC, 14TC, 21TC, and 28TC were unmodified oligodeoxynucleotides. The 7TmC through 28TmC were 5-methyldeoxycytosine-containing oligodeoxynucleotides (29). The 21TCOMe was modified with 2'-O-methyl on its sugar (31) whereas in the 21Cmo the phosphodiester backbone

was replaced by phosphorodiamidate and the sugar replaced by a morpholino subunit (40) (Table 1).

Triple Helices with Natural and Modified Oligonucleotides: UV Melting Curve Analysis. Formation of pyrimidine triple helices can be monitored by following UV absorbance. To avoid experimental artifacts, we first analyzed the behavior of the individual strands as a function of temperature. Self-association of a TFO may lead to a transition that could be inappropriately attributed to triplex formation (41). No transition was obtained with the TFOs alone in the absence of Mg²⁺ at pH 7.2. A very unstable structure was observed at pH 6.0 with 10 mM MgCl₂ for the 14TC and 21TC and a more stable structure (with a $T_m = 22$ °C) was observed with the 28TC (Figure 1A). 5-Methyl-C-containing TFOs exhibited the same behavior as the phosphodiester TFOs (data not shown). We then analyzed the behavior of the duplexes. A single transition was obtained by mixing the 19 R and 19 Y strands, 26 R and 26 Y strands, 33 R and 33 Y strands, and 40 R and 40 Y strands (data not shown; $T_m = 64, 69, 73$, and 74 °C for 19 RY, 26 RY, 33 RY, and 40 RY duplexes, respectively). When the duplexes were mixed with a TFO, two transitions were generally observed: the one occurring at high temperature corresponds to the dissociation of the duplex, while the other transition corresponds to the dissociation of the third strand (illustrated in Figure 1B).

At pH 6.0 with 5 mM MgCl₂ a transition due to the dissociation of the TFO from the duplex was observed with the 28TC, 21TC, and 14TC with $T_{1/2}$ values of 60, 52, and 38 °C, respectively. No transition was observed with the 7TC (see Table 2 and Figure 1B, open circles). Therefore, triple helix stability appeared to be dependent on TFO length. A similar effect was observed with the 14–28 TmC TFOs (see Table 2) except that all $T_{1/2}$ values were higher, reflecting an increase in triplex stability due to cytosine methylation. As the 28TmC triplex and the duplex transitions appeared

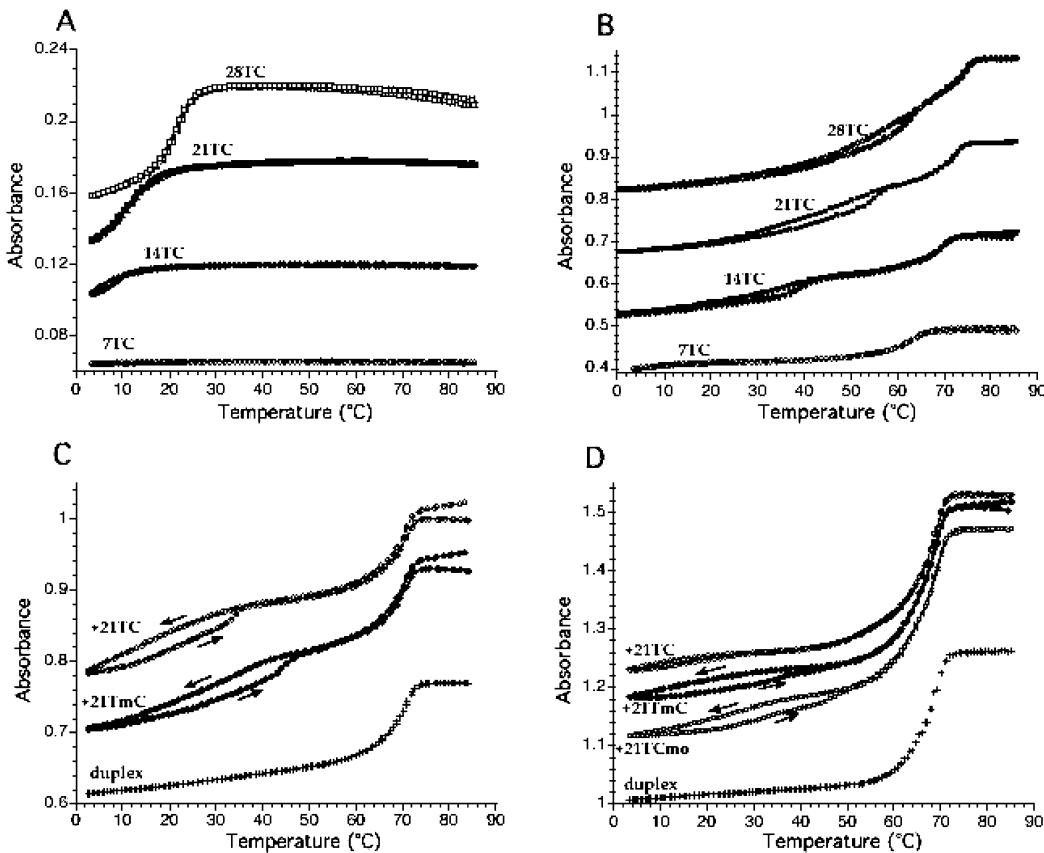


FIGURE 1: UV melting curves. (A) Self-association of the TFOs. For purposes of clarity, only the melting profiles of the unmodified TFOs (7TC, 14TC, 21TC, and 28TC) are shown. Experimental conditions: 10 mM sodium cacodylate, pH 6.0, 0.1 M KCl, 5 mM MgCl₂, and 2.5 μ M strand concentration. (B) Triplex formation at acidic pH. Slight hysteresis is observed. Experimental conditions: 10 mM sodium cacodylate, pH 6.0, 0.1 M KCl, 5 mM MgCl₂, 1.5 μ M duplex strand concentration, and 1.8 μ M third strand. The name of the TFO is indicated for each curve. (C) Triplex formation at neutral pH. Strong hysteresis is observed. Directions of temperature changes are shown with arrows. Experimental conditions: 10 mM sodium cacodylate, pH 7.0, 0.1 M KCl, 5 mM MgCl₂, 1.5 μ M duplex strand concentration, and 1.8 μ M third strand. (D) Triplex formation in the absence of magnesium. Strong hysteresis is observed. Directions of temperature changes are shown with arrows. Experimental conditions: 10 mM sodium cacodylate, pH 7.2, 0.14 M KCl, 2.5 μ M duplex strand concentration, and 3 μ M third strand.

Table 2: $T_{1/2}$ Values for the Triplex-Forming Oligonucleotides Used in This Study^a

	$T_{1/2}$ (°C)				
	pH 6.0, 100 mM KCl, 5 mM MgCl ₂ ^b	pH 6.5, 100 mM KCl, 10 mM MgCl ₂ ^b	pH 7.1, 100 mM KCl, 10 mM MgCl ₂ ^b	pH 7.0, 100 mM KCl, 5 mM MgCl ₂ ^b	pH 7.2, 140 mM KCl, no MgCl ₂ ^c
7TC	<0 ^d (63)	—	—	<0 ^d (63)	<0 ^d (63)
14TC	38 (69)	—	—	—	<10 (69)
21TC	52 (73)	40 (73)	—	25 (73)	15 (73)
28TC	60 (74)	—	—	—	28
7TmC	nd	—	—	—	—
14TmC	48 (69)	—	—	—	—
21TmC	60 (73)	54 (73)	39 (73)	37 (73)	30 (73)
28TmC	>65 ^e (74)	—	—	—	—
21TCOMe	—	54 (73)	35 (73)	—	35 ^f (73)
21TCmo	—	>65 ^e (73)	48 (73)	41 (73)	40 (73)

^a In most cases, hysteresis is present; the values provided here correspond to the heating curve and lead to an overestimation of the equilibrium T_m . All values were determined at 260 or 245 nm. Numbers in parentheses indicate the T_m of the corresponding duplexes (all T_m and $T_{1/2}$ are given with an uncertainty of ± 2 °C). A dash means not determined. ^b 1.5 μ M duplex, 1.8 μ M TFO. ^c 2.5 μ M duplex, 3 μ M TFO. ^d No transition. ^e Transition intermingled with duplex melting. ^f The transition is spread over a large temperature range, making an accurate determination of $T_{1/2}$ difficult.

to be intermingled, it is not possible to determine an accurate $T_{1/2}$ value (Figure S1A). Nevertheless, the amplitude of the transition observed with 28TmC + 40 RY is larger than the amplitude of the 40 RY duplex alone, in agreement with triplex formation. Further evidence that the 28TmC can form a triplex were obtained by EMSA experiments ($K_D = 0.9$ μ M at 4 °C, pH 7.0; Figure S1B) and by melting experiments at neutral pH ($T_{1/2} = 30$ °C; Figure S1A).

All triplexes were strongly pH-dependent. The stability of all triplexes was decreased at near-neutral pH. A variety of experimental conditions were chosen (details provided in Table 2). Increasing the pH from 6.0 to 7.0 in the presence

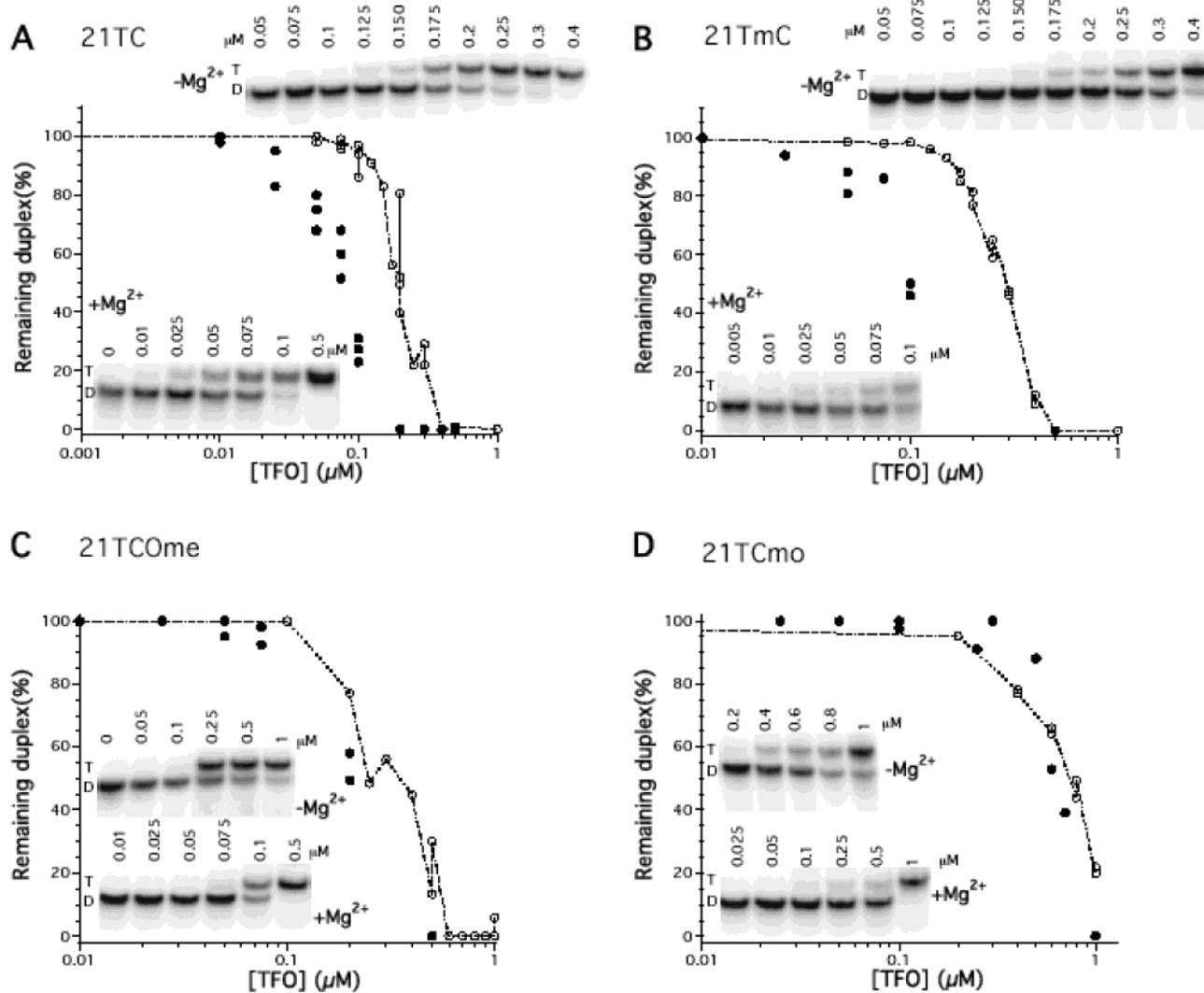


FIGURE 2: EMSA with the *Drosophila* satellite triplex-forming oligonucleotides at pH 6.0. The triplex formation was monitored by EMSA experiments. All gels were quantified using a phosphorimager. Results were analyzed by plotting the fraction of the remaining duplex band against TFO concentrations. No fit was simply applicable because of the strong cooperativity of the third strand binding. (A) 21TC with (filled circles) or without (open circles) $MgCl_2$; (B) 21TmC with (filled circles) or without (open circles) $MgCl_2$; (C) 21TCOMe with (filled circles) or without (open circles) $MgCl_2$; (D) 21TCmo with (filled circles) or without (open circles) $MgCl_2$. For each set of experiments, a representative EMSA is provided as an example. All EMSA experiments were performed as follows: Radiolabeled double-stranded target (40 RY) was incubated with increasing concentrations of TFO in the absence or presence of $MgCl_2$. 10 nM radiolabeled 40 RY was incubated with 21TC, 21TmC, 21TCOMe, or 21TCmo for 72 h in buffer containing 50 mM MES, pH 6.0, 2.5 mM NaCl, 140 mM KCl, 0.5 mg/mL tRNA, and 10% sucrose with or without 10 mM $MgCl_2$ at 20 °C. Samples were separated on a 10% nondenaturing acrylamide gel in 50 mM MES, pH 6.0 at room temperature. All TFO concentrations are given in μM . T = triplex; D = duplex.

of 5 mM $MgCl_2$ led to a concomitant decrease in $T_{1/2}$ for the 21TC and 21TmC oligonucleotides. At neutral pH, the 21TmC was still able to form a stable triplex ($T_{1/2} = 37$ °C) while the 21TC triplex was destabilized but still gave rise to a transition with a $T_{1/2}$ value of 25 °C (Table 2 and Figure 1C). In a similar fashion, in the presence of 10 mM $MgCl_2$, a modest increase in pH (from 6.5 to 7.1) led to a 15–20 °C decrease in $T_{1/2}$ for the 21TmC, 21TCOMe, and 21TCmo oligonucleotides (Table 2).

We next investigated the magnesium contribution to triplex stability. Melting experiments were performed in the absence of $MgCl_2$ in a 10 mM sodium cacodylate and 140 mM potassium chloride buffer (i.e., close to physiological monocation concentrations). The T_m s of the duplexes were marginally affected by these changes (compare crosses on Figure 1C,D). At pH 7.2 without magnesium chloride, the

21TC could not form a stable triplex ($T_{1/2} < 20$ °C) whereas the triplex formed with the 21TmC was still present. Under both conditions, 21TCmo formed a stable triplex with comparable $T_{1/2}$ values (Table 2 and Figure 1D).

These results allowed us to conclude that the *D. melanogaster* (AAGAGAG)_n satellite repeat is able to accommodate a three-stranded structure, exhibiting classical pyrimidine triplex features plus a length dependency.

Triple Helices with Natural and Modified Oligonucleotides: EMSA Analysis. Formation of triple helices was confirmed by EMSA (examples provided in Figures 2–4 and in Figures S2 and S3): binding of a third strand slows down the migration of the target duplex. By varying the TFO concentration and repeating the experiment at least two to five times, it was possible to determine an apparent dissociation constant (K_D). In all experiments, we used the 40

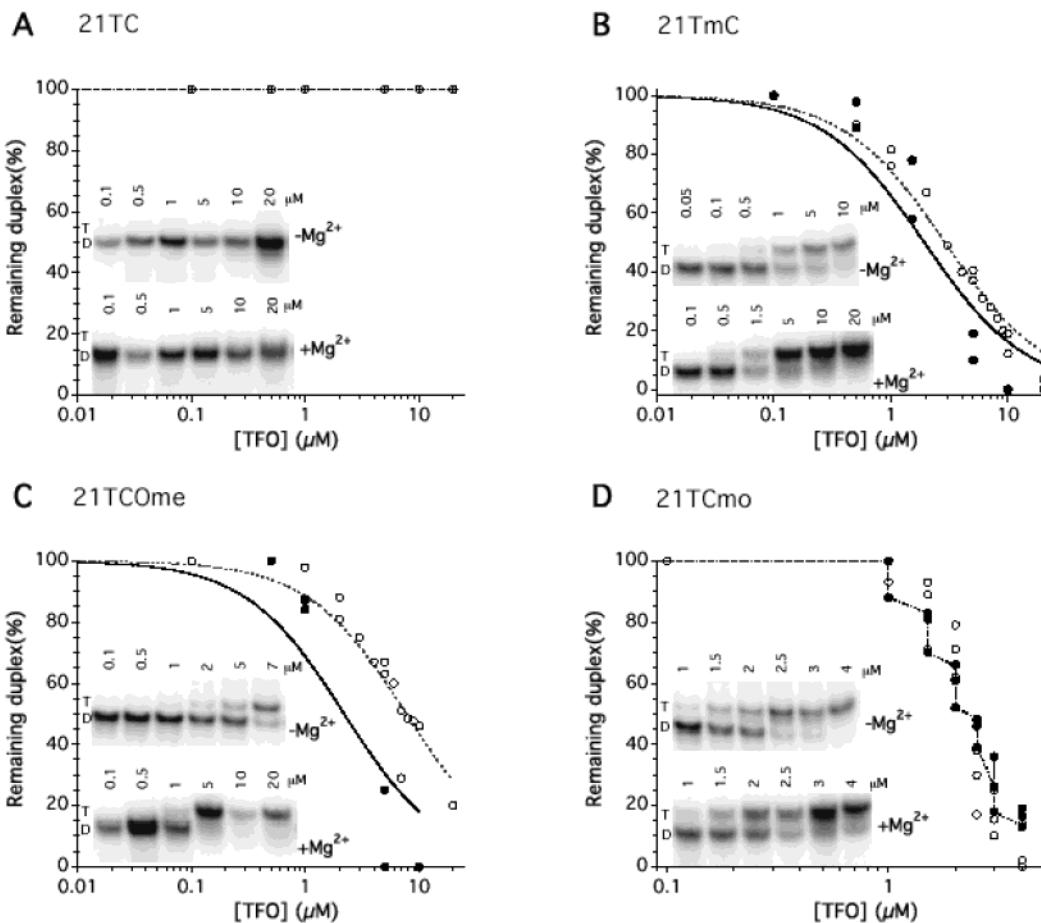


FIGURE 3: EMSA with the *Drosophila* satellite triplex-forming oligonucleotides at pH 7.2. The triplex formation was monitored by EMSA experiments. All gels were quantified using a phosphorimager. Results were analyzed by plotting the fraction of the remaining duplex band against TFO concentrations and fitting the data with a Kaleidagraph fitting function assuming a 1:1 stoichiometry, one TFO per duplex, and an unknown K_D and using a simple mass action law, taking into account the fact that the TFO is in large excess as compared to the radiolabeled duplex. (A) 21TC with (filled circles) or without (open circles) MgCl₂; (B) 21TmC with (filled circles) or without (open circles) MgCl₂; (C) 21TCOMe with (filled circles) or without (open circles) MgCl₂; (D) 21TCmo with (filled circles) or without (open circles) MgCl₂. For each set of experiments, a representative EMSA is provided as an example. All EMSA experiments were performed as follows: Radiolabeled double-stranded target (40 RY) was incubated with increasing concentrations of TFO in the absence or presence of MgCl₂. 10 nM radiolabeled 40 RY was incubated with 21TC, 21TmC, 21TCOMe, or 21TCmo for 72 h in buffer containing 50 mM HEPES, pH 7.2, 2.5 mM NaCl, 140 mM KCl, 0.5 mg/mL tRNA, and 10% sucrose with or without 10 mM MgCl₂ at 20 °C. All TFO concentrations are given in μM. T = triplex; D = duplex.

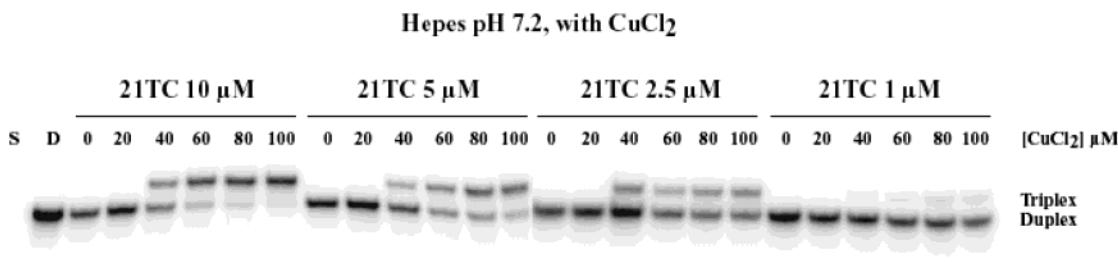


FIGURE 4: EMSA with the *Drosophila* satellite triplex-forming oligonucleotides in the presence of Cu²⁺ at pH 7.2. All incubations were performed as follows: Radiolabeled double-stranded target (40 RY) was incubated in the presence of various concentrations of 21TC (10, 5, 2.5, and 1 μM) for 72 h at 20 °C in a buffer containing 50 mM HEPES, pH 7.2, 2.5 mM NaCl, 140 mM KCl, 0.5 mg/mL tRNA, and 10% sucrose supplemented with increasing concentrations of CuCl₂ (from 0 to 100 μM). Samples were migrated on a 10% nondenaturing acrylamide gel with 50 mM HEPES, pH 7.0 at room temperature. S = radiolabeled purine strand (40 R) of the duplex; D = duplex 40 RY alone.

RY duplex as a target and the 21mers as third strands. This choice was made because the 28mers showed significant self-association in UV melting experiments whereas the 7mers and 14mers gave less stable triplexes (see Figure 1 or Table 2). K_D at 20 °C were determined after a 72 h incubation,

ensuring complete thermodynamic equilibrium (no significant variation in binding was observed with longer incubations; data not shown).

At pH 6.0, in the presence of 140 mM KCl and 2.5 mM NaCl and in the absence of divalent cations, all TFOs were

Table 3: K_D Values (μM) for the Triplex-Forming Oligonucleotides Used in This Study^a

	K_D (μM)					
	pH 6.0, no dication ^b	pH 6.0, 10 mM Mg ²⁺ ^c	pH 7.2, no dication ^d	pH 7.2, 10 mM Mg ²⁺ ^e	pH 7.2, 100 μM Cu ²⁺ ^f	pH 7.2, 40 μM Cu ²⁺ ^g
21TC	0.25 \pm 0.05	0.07 \pm 0.01	—	—	3.0 \pm 0.5	12.4 \pm 0.6
21TmC	0.4 \pm 0.1	0.15 \pm 0.03	3.3 \pm 0.2	1.9 \pm 0.4	1.0 \pm 0.3	1.8 \pm 0.4
21TCOMe	0.26 \pm 0.07	0.23 \pm 0.06	8.7 \pm 1.2	2.2 \pm 0.8	1.7 \pm 0.4	4.6 \pm 0.4
21TCmo ^h	0.8 \pm 0.2	0.8 \pm 0.2	2.2 \pm 0.5	2.4 \pm 0.4	0.9 \pm 0.5	1.9 \pm 1.1

^a All apparent dissociation constants, K_D (μM), were calculated by fitting the percent of the remaining duplex band (duplex fraction) versus the concentration of TFO. All experiments with the 21 base pair long oligomers and the 40 RY duplex were repeated in two to five independent experiments. In each case, K_D values were calculated from 8 to 36 determinations of the fraction of the remaining duplex. Data were fitted assuming a 1:1 stoichiometry between the duplex and the TFO, in agreement with the presence of a single retarded band at the expected position. ^b Incubation was performed in 50 mM MES, pH 6.0, 2.5 mM NaCl, and 140 mM KCl for 72 h at 20 °C. ^c Incubation was performed in 50 mM MES, pH 6.0, 2.5 mM NaCl, 140 mM KCl, and 10 mM MgCl₂ for 72 h at 20 °C. ^d Incubation was performed in 50 mM HEPES, pH 7.2, 2.5 mM NaCl, and 140 mM KCl for 72 h at 20 °C. ^e Incubation was performed in 50 mM HEPES, pH 7.2, 2.5 mM NaCl, 140 mM KCl, and 10 mM MgCl₂ for 72 h at 20 °C. ^f Incubation was performed in 50 mM HEPES, pH 7.2, 2.5 mM NaCl, 140 mM KCl, and 100 μM CuCl₂ for 72 h at 20 °C. ^g Incubation was performed in 50 mM HEPES, pH 7.2, 2.5 mM NaCl, 140 mM KCl, and 40 μM CuCl₂ for 72 h at 20 °C. A dash indicates no triplex formation.^h For this TFO, the concentration dependency of the duplex and triplex species does not obey the simple mathematical model described in Experimental Procedures (see Figures 3D and 5D for examples).

able form triplets (Table 3 and Figure 2). K_D were comparable for the 21TC ($0.25 \pm 0.05 \mu\text{M}$) and 21TCOMe ($0.26 \pm 0.07 \mu\text{M}$) oligonucleotides, whereas the 21TmC showed a slightly higher K_D ($0.4 \pm 0.1 \mu\text{M}$) and the morpholino oligonucleotide and 21TCmo a 3-fold higher K_D ($0.8 \pm 0.2 \mu\text{M}$). Under the same conditions but in the presence of 10 mM MgCl₂ (Table 3 and Figure 2), the K_D were significantly improved (i.e., lowered approximately 3-fold) for the 21TC ($0.07 \pm 0.01 \mu\text{M}$) and 21TmC ($0.15 \pm 0.03 \mu\text{M}$) TFOs. No stabilization was noted for the 21TCOMe ($K_D = 0.23 \pm 0.06 \mu\text{M}$) or for the 21TCmo ($K_D = 0.8 \pm 0.2 \mu\text{M}$).

At pH 7.2 with no magnesium, triple helix formation was abolished for 21TC (Figure 3A). Modified TFOs were still able to form a triple helix with a K_D 3 times higher for the 21TCmo ($2.2 \pm 0.5 \mu\text{M}$), 9 times higher for the 21TmC ($3.3 \pm 0.2 \mu\text{M}$), and 40 times higher for the 21TCOMe ($8.7 \pm 1.2 \mu\text{M}$) than those observed at pH 6.0 (Table 3 and Figure 3B–D). In the presence of 10 mM MgCl₂, K_D were improved from 3.3 to 1.9 μM for the 21TmC and from 8.7 to 2.2 μM for the 21TCOMe. As previously demonstrated at pH 6.0, the 21TCmo hybridization with the target duplex appeared again to be magnesium-independent ($K_D = 2.2 \pm 0.5$ and $2.4 \pm 0.4 \mu\text{M}$ with or without 10 mM MgCl₂, respectively).

Results described here are in general agreement with what was observed with UV melting experiments and confirm that the *D. melanogaster* (AAGAGAG)_n satellite repeat can form a classical pyrimidine triplet in vitro. However, one should note that, in T_m experiments, the 21TCmo oligonucleotide allowed the formation of the most stable triplet under a variety of experimental conditions (see Table 2) whereas this observation was not confirmed for all EMSA experiments (Table 3). Such differences could be the result of kinetic factors and/or illustrate the observation that a higher T_m does not necessarily reflect a higher stability (ΔG°) at a given temperature, depending on the enthalpy of the reaction. Another reason we observe differences between T_m and EMSA experiments could be because they were not performed strictly under the same conditions of pH and salinity.

Triple Helices with Natural and Modified Oligonucleotides in the Presence of Cu²⁺: EMSA Analysis. The effect of Cu²⁺ on triple helix formation was then investigated. No CuCl₂ concentration higher than 100 μM was tested because

precipitation occasionally occurred under these conditions. This precipitation was even more pronounced for UV melting experiments and prevented a reliable analysis of the melting profile in the presence of copper. For these reasons, results concerning the effects of Cu²⁺ on triple helix formation were based solely on EMSA experiments, which are reported in Figures 4 and S3 and their quantification in Figure 5).

At pH 7.2 in 140 mM KCl and 2.5 mM NaCl, the natural phosphodiester TFO 21TC does not form a triple helix, as shown in Figures 3A, 4 (lines 0 μM CuCl₂), and 5A. This inability was overcome in the presence of 40 μM CuCl₂ or higher (Figures 4 and 5A). No triplex formation was observed below 40 μM CuCl₂ even for higher 21TC concentrations (data not shown). For 10 μM 21TC, 100 μM Cu²⁺ allowed 96% triplex formation, and this ability decreased proportionally with 21TC concentration: 64% of the triplex was formed at 5 μM 21TC, 39% at 2.5 μM , and only 15% at 1 μM . No triplex formation was seen with 0.5 μM 21TC. Triple helix formation with modified TFOs was also improved with increasing Cu²⁺ concentrations (see Figures 5B,C,E and S3; those TFOs were already able to form a triplex at pH 7.2, in the absence of divalent cations).

At low oligonucleotide concentration (0.5 μM 21TC, 0.1 μM 21TmC, 0.2 μM 21TCOMe, 0.5 μM 21TCmo) where none of the TFOs can form a triple helix at pH 7.2, the addition of CuCl₂ was unable to promote triplex formation. These observations suggest that Cu²⁺ could shift the reaction equilibrium toward triplex formation by changing the local binding conditions but that the binding limit was still dictated by the TFO concentration. Furthermore, the capacity of CuCl₂ to overcome pH dependency and to allow binding of the 21TC at pH 7.2 is only partial, as the resulting K_D are still higher than at pH 6.0 (see Table 3).

To compare the effect of Cu²⁺ on triple helix formation, K_D were determined by plotting the fraction of the remaining duplex versus the TFO concentration for a given concentration of CuCl₂. For each oligonucleotide, K_D variations were plotted versus the CuCl₂ concentrations (Figure 5E). The presence of Cu²⁺ promoted the binding of the 21TC TFO to the 40 RY duplex, and the related K_D ranged from 12.4 μM (for 40 μM Cu²⁺) to 3.0 μM (for 100 μM Cu²⁺). No binding was observed for Cu²⁺ \leq 20 μM . The K_D of the modified TFOs were lowered (for CuCl₂ concentrations ranging from

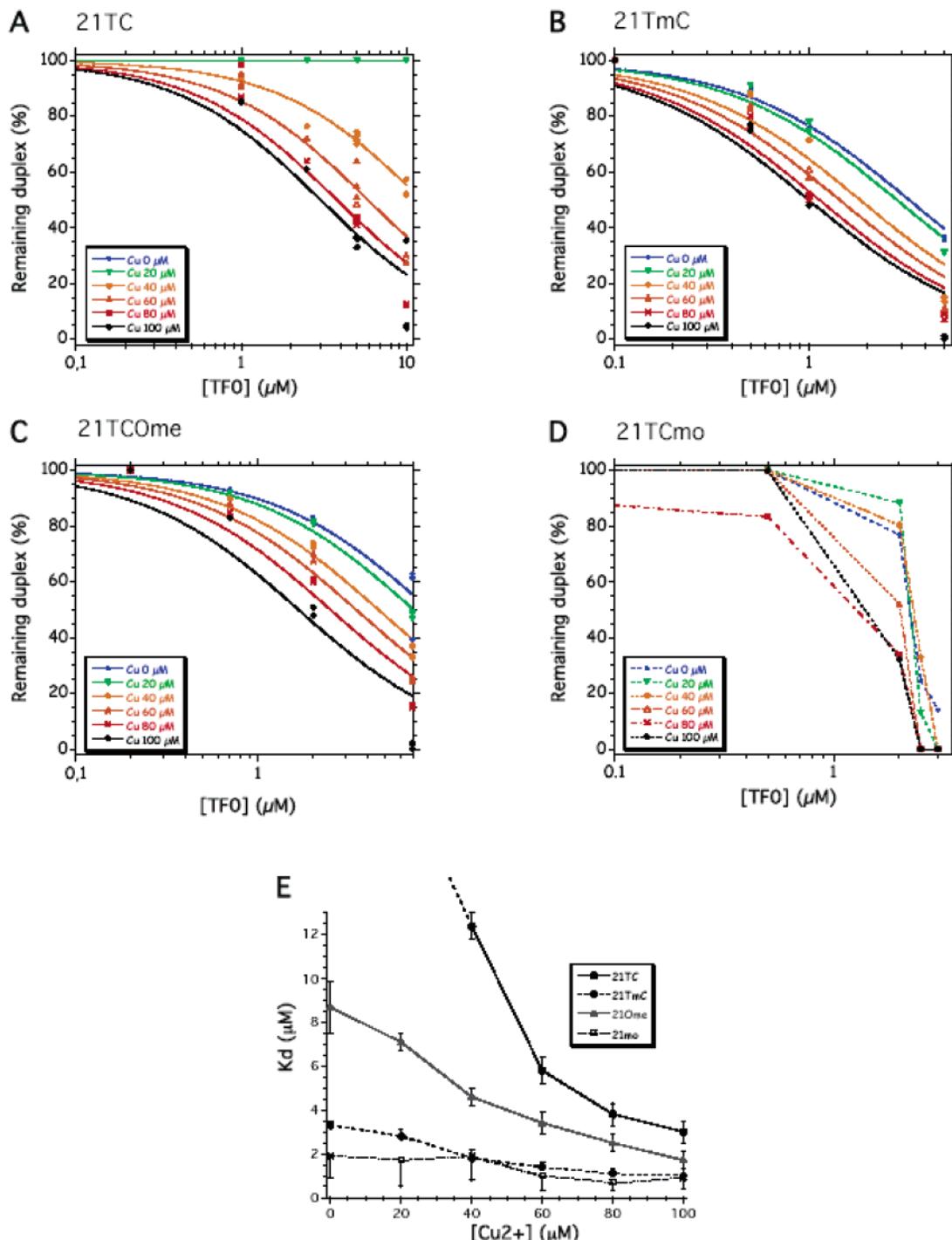


FIGURE 5: Copper concentration dependency of the triplex formation for different TFOs. (A–C) K_D were calculated by plotting and fitting the fraction of remaining duplex determined from EMSA experiments versus TFO concentration for a given concentration of $CuCl_2$. Examples of EMSA are given in Supporting Information. (A) Fit for the 21TC oligonucleotide. 21TC concentrations range from 0 to 10 μM . $CuCl_2$ concentrations range from 0 to 100 μM . (B) Fit for the 21TmC oligonucleotide. 21TmC concentrations range from 0 to 5 μM . $CuCl_2$ concentrations range from 0 to 100 μM . (C) Fit for the 21TCOMe oligonucleotide. 21TCOMe concentrations range from 0 to 7 μM . $CuCl_2$ concentrations range from 0 to 100 μM . (D) Binding of the 21TCmo oligonucleotide. 21TCmo concentrations range from 0 to 3 μM . $CuCl_2$ concentrations range from 0 to 100 μM . No fit was applied here because the triplex formation is not following a simple mass action law. (E) For each TFO, the K_D was plotted against the corresponding $CuCl_2$ concentration: filled circles, 21TC; filled diamonds, 21TmC; filled triangles, 21TCOMe; open squares, 21TCmo. For purposes of clarity, only the upper and lower parts of error bars are presented for 21TmC and 21TCmo, respectively.

0 to 100 μM) from 3.3 ± 0.2 to $1.0 \pm 0.3 \mu M$ for 21TmC and from 8.7 ± 1.2 to $1.7 \pm 0.4 \mu M$ for 21TCOMe (Table 3 and Figure 5). Cu^{2+} was not able to stabilize clearly the 21TCmo triplex (see Figure 5D,E).

At pH 7.2, the stabilizing effects of $CuCl_2$ and $MgCl_2$ appeared to be quite different. First, stabilization of the triple

helix by Cu^{2+} was much more efficient than stabilization by Mg^{2+} . A 100-fold lower copper concentration (100 μM $CuCl_2$ versus 10 mM $MgCl_2$) led to an equal or lower K_D as compared to $MgCl_2$ (Table 3). Second, the stabilization depended on the chemical modification of the TFO. For Cu^{2+} it applied to all TFOs except for the morpholino one and

could be ordered as follows: 21TC > 21TmC > 21TCOMe > 21TCmo = 0, while for Mg²⁺ it only applied to the 21TCOMe and 21TmC oligonucleotides.

DISCUSSION

Triple Helix Formation. We have shown in this study that a *D. melanogaster* AG-rich satellite DNA (AAGAGAG)_n, present in the centromeric heterochromatin of all chromosomes, may form a parallel pyrimidine triplex in vitro. As revealed by UV spectroscopic studies and EMSA experiments, this pyrimidine triple helix exhibited classical features such as pH dependency and stabilization by Mg²⁺ counterions. The use of base-modified TFOs such as 5-methyl-dC and backbone-modified TFOs such as 2'-O-methyl led to the stabilization and reduced pH dependency of triplex formation. Whichever TFO was used, the most stable triplexes were obtained with long TFOs (21mers and 28mers). This length dependency, although not unexpected, has never been reported in the context of a short (seven base) repetitive motif. To our knowledge, this is the first report of triplex formation on a target with a variable number (1–4) of specific oligopurine–oligopyrimidine motifs. The significant difference in $T_{1/2}$ between three and four repeats suggests that this stability could be further increased with longer sequences (five repeats or more). However, two problems should be noted with long oligonucleotides. First, self-association phenomena are more pronounced for longer TFOs (see Figure 1A). Second, melting of the triplex appears to be complex, with a biphasic character (see Figure 1B). At this time, we cannot predict the practical limit of the number of TTCTCTC repeats that can be incorporated in a TFO (dozens/hundreds of consecutive AAGAGAG/CTCTCTT tracts may be found in the *Drosophila* genome).

The Morpholino Case. The triplex formation with the morpholino oligonucleotide, at pH 7.2 without magnesium chloride, gave a K_D consistent with the results obtained with other morpholino TFOs (L. Lacroix et al., in preparation; 34). Surprisingly, the 21TCmo appeared to be the least sensitive to increasing pH from 6.0 to 7.2, as its K_D is only lowered 3-fold (versus 15- and 40-fold for 21TmC and 21TCOMe, respectively) in the absence of MgCl₂. This result confirms what Lacroix et al. have already observed with a 16mer morpholino TFO (34) but is in contradiction with what Basye et al. observed in the Her-2/neu promoter as their morpholino TFOs exhibit poor binding at pH 7.2 (35). Little is known about triplex formation with morpholino TFOs, but it is now clear that the behavior of such TFOs is not canonical. This is in line with the observation that, for all EMSA experiments with 21TCmo, the concentration dependency of the remaining duplex band cannot be properly fitted with a simple model. In addition, the effect of magnesium ions is completely different for the 21TCmo compared to the other TFOs used in this study and to DNA TFOs in general. Magnesium ions are known to stabilize and accelerate the formation of pyrimidine DNA triplexes (38, 42–44). In contrast, we found that the triplex formation with 21TCmo was independent of the presence of Mg²⁺ and Cu²⁺ ions, and Lacroix et al. have even shown that MgCl₂ hinders morpholino triple helix formation (34). As Mg²⁺ ions principally interact with the negative phosphate charges (45), one may propose that this behavior is the result of the uncharged morpholino backbone.

Cu²⁺ versus Mg²⁺. As already elucidated, magnesium strongly favors purine intermolecular triplex formation and can improve stability of both purine and pyrimidine triplexes (38, 42–44, 46). In our experiments, we showed that magnesium ions did favor pyrimidine triple helix formation (both at pH 6.0 and at pH 7.2) but were not an absolute requisite, in contrast to the case of purine triplexes (15, 19).

When copper(II) chloride was added to the hybridization reaction, we observed a rather different effect on triple helix formation. Cu²⁺ appeared to stabilize the triple helix in a more efficient manner than Mg²⁺, as the required copper concentrations were 10–100 times lower. The Cu²⁺ stabilizing effect was very pronounced for the 21TC and 21TCOMe oligonucleotides (see Figure 5). Cu²⁺ also significantly stabilized the 21TmC triplex but to a lesser extent (Figure 5, diamonds; $K_D = 3.3 \pm 0.2 \mu\text{M}$ in the absence of Cu²⁺ and $1.0 \pm 0.3 \mu\text{M}$ with 100 μM Cu²⁺). In contrast, the small decrease in K_D obtained with 21TCmo was not statistically significant (Figure 5, squares): the morpholino oligonucleotide is as insensitive to the presence of Cu²⁺ as it is to the presence of Mg²⁺.

The main difference between Cu²⁺ and Mg²⁺, however, was the capacity of the former to allow formation of a triple helix, at physiological pH, with the 21TC. This is, to our knowledge, the first in vitro demonstration that a modification of the DNA environment, other than lowering pH to below 7.0 and adding spermine or organic cosolvent (22), can promote the formation of a pyrimidine triplex with an unmodified phosphodiester TFO. This effect is clearly not a peculiar feature of the *Drosophila* satellite sequence as we have observed the same effect for other polypurine–polypyrimidine sequences (Lacroix et al., in preparation). This observation suggests that copper may be an important factor for pyrimidine triplex formation and stabilization at pH 7.0 in vitro. However, we cannot presently assess if copper is a general requisite for pyrimidine triplex formation at pH 7.0 as many factors, including a longer DNA chain, other divalent cations, or spermine, may permit it.

Little is known about interactions between divalent cations and pyrimidine DNA triplexes. Since Mg²⁺ association is essentially limited to nonspecific electrostatic (labile) interaction with the anionic oxygen atoms of the phosphodiester backbone (45), it can be assumed that its activity as a counterion is responsible for the triplex stabilization. Obviously, such an interaction with DNA cannot overcome the pH dependency of the pyrimidine triplex formation. Other divalent metal cations and especially copper ions are known to bind to DNA by forming relatively stable bond(s) with specific groups on the nucleoside (45). In such a context, copper ions have a preferential affinity for guanine (especially by coordination with N₇ and N₃, which are accessible in double-stranded DNA) and to a lesser extent for cytosine (by coordination with N₃ and O₂) (45, 47). At the macromolecular level, Cu²⁺ has two types of binding sites as determined by flame atomic absorption spectrophotometry (48) and by electron paramagnetic resonance (EPR) (J. Lacoste, unpublished results), one of which results from an interaction with the bases and the other with the phosphate moiety. We envision that a Cu²⁺ ion could coordinate the N₇ of a guanine in a duplex and the N₃ and/or O₂ of atoms of cytosine in the third strand. This would allow a stabilization of the triplex without protonation of the cytosine N₃.

and, as observed here, a lower pH dependence. Another possibility is that Cu²⁺ could bind without intercalation between bases by coordinating the exocyclic O₂ site of the third strand and the phosphate of the purine strand of the duplex. This would also allow a stabilization of the triplex with little structural modification. These two models are not mutually exclusive.

Biological Relevance of Tripleplexes in Heterochromatin. In this study, we showed that the *Drosophila* AG-rich satellite is able to form a pyrimidine triple helix in vitro. Then we demonstrated that the pH dependence of this specific triple helix formation can be overcome by relatively low Cu²⁺ concentrations. Recent studies have shown that TFOs can be hybridized in situ to nondenatured metaphase spreads and interphase nuclei (49) and that triplex-forming DNAs in the human interphase nucleus can be visualized with DNA probes and anti-triplex antibodies (50). We are now focusing our work on the possibility that this centromeric *Drosophila* region can form triple helices in vivo as the oligonucleotides we tested are good candidates for probing the heterochromatin state during the cell cycle or during stress (heat shock, chemical shock).

ACKNOWLEDGMENT

We thank L. T. Finwit for helpful discussions. Huge thanks and numerous beers are due to Dave Pearton for proofreading. We also thank Marc Block and Cécile Lelong for reading the manuscript and EA and EG for helpful discussion.

SUPPORTING INFORMATION AVAILABLE

Three figures showing 28TmC triplex formation, an example of gel quantification, and EMSA with the *Drosophila* satellite triplex-forming oligonucleotides. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

REFERENCES

- Heitz, E. (1928) *Jahrb. Wiss. Bot.* **69**, 762–818.
- Hennig, W. (1999) *Chromosoma* **108**, 1–9.
- Henikoff, S. (2000) *Biochim. Biophys. Acta* **1470**, O1–O8.
- Verma, R. S. (1988) *Heterochromatin. Molecular and structural aspects*, Cambridge University Press, Cambridge.
- Hoskins, R. A., Smith, C. D., Carlson, J. W., Carvalho, A. B., Halpern, A., Kaminker, J. S., Kennedy, C., Mungall, C. J., Sullivan, B. A., Sutton, G. G., Yasuhara, J. C., Wakimoto, B. T., Myers, E. W., Celniker, S. E., Rubin, G. M., and Karpen, G. H. (2002) *Genome Biol.* **3**, 0085.1–0085.16.
- Sun, X., Le, H. D., Wahlstrom, J. M., and Karpen, G. H. (2003) *Genome Res.* **13**, 182–194.
- Sun, X., Wahlstrom, J., and Karpen, G. (1997) *Cell* **91**, 1007–1019.
- Horvath, J. E., Schwartz, S., and Eichler, E. E. (2000) *Genome Res.* **10**, 839–852.
- Dillon, N., and Festenstein, R. (2002) *Trends Genet.* **18**, 252–258.
- Sunkel, C. E., and Coelho, P. A. (1995) *Curr. Opin. Genet. Dev.* **5**, 756–767.
- Zinkowski, R. P., Meyne, J., and Brinkley, B. R. (1991) *J. Cell Biol.* **113**, 1091–1110.
- Raff, J. W., Kellum, R., and Alberts, B. (1994) *EMBO J.* **13**, 5977–5983.
- Cobb, B. S., Morales-Alcelay, S., Kleiger, G., Brown, K. E., Fisher, A. G., and Smale, S. T. (2000) *Genes Dev.* **14**, 2146–2160.
- Yamada, T., Fukuda, R., Himeno, M., and Sugimoto, K. (1999) *J. Biochem. (Tokyo)* **125**, 832–837.
- Frank-Kamenetskii, M. D., and Mirkin, S. M. (1995) *Annu. Rev. Biochem.* **64**, 65–95.
- Platero, J. S., Csink, A. K., Quintanilla, A., and Henikoff, S. (1998) *J. Cell Biol.* **140**, 1297–1306.
- Jimenez-Garcia, E., Vaquero, A., Espinas, M. L., Soliva, R., Orozco, M., Bernues, J., and Azorin, F. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 24640–24648.
- Mahmoudi, T., Katsani, K. R., and Verrijzer, C. P. (2002) *EMBO J.* **21**, 1775–1781.
- Malkov, V. A., Voloshin, O. N., Soyfer, V. N., and Frank-Kamenetskii, M. D. (1993) *Nucleic Acids Res.* **21**, 585–591.
- Bernues, J., Beltran, R., Casasnovas, J. M., and Azorin, F. (1990) *Nucleic Acids Res.* **18**, 4067–4073.
- Mills, M., Arimondo, P. B., Lacroix, L., Garestier, T., Hélène, C., Klump, H., and Mergny, J. L. (1999) *J. Mol. Biol.* **291**, 1035–1054.
- Moser, H. E., and Dervan, P. B. (1987) *Science* **238**, 645–650.
- Le Doan, T., Perrouault, L., Praseuth, D., Habhou, N., Decout, J. L., Thuong, N. T., Lhomme, J., and Hélène, C. (1987) *Nucleic Acids Res.* **15**, 7749–7760.
- Beal, P. A., and Dervan, P. B. (1991) *Science* **251**, 1360–1363.
- Dittrich, K., Gu, J., Tinder, R., Hogan, M., and Gao, X. (1994) *Biochemistry* **33**, 4111–4120.
- Howard, F. B., Miles, H. T., and Ross, P. D. (1995) *Biochemistry* **34**, 7135–7144.
- Mills, M., Lacroix, L., Arimondo, P. B., Leroy, J. L., Francois, J. C., Klump, H., and Mergny, J. L. (2002) *Curr. Med. Chem.: Anti-Cancer Agents* **2**, 627–644.
- Chan, P. P., and Glazer, P. M. (1997) *J. Mol. Med.* **75**, 267–282.
- Lee, J. S., Woodsworth, M. L., Latimer, L. J., and Morgan, A. R. (1984) *Nucleic Acids Res.* **12**, 6603–6614.
- Froehler, B. C., Wadwani, S., Terhorst, T. J., and Gerrard, S. R. (1992) *Tetrahedron Lett.* **33**, 5307–5310.
- Shimizu, M., Konishi, A., Shimada, Y., Inoue, H., and Ohtsuka, E. (1992) *FEBS Lett.* **302**, 155–158.
- Escudé, C., Sun, J. S., Rougée, M., Garestier, T., and Hélène, C. (1992) *C. R. Acad. Sci., Ser. III* **315**, 521–525.
- Francois, J. C., Lacoste, J., Lacroix, L., and Mergny, J. L. (2000) *Methods Enzymol.* **313**, 74–95.
- Lacroix, L., Arimondo, P. B., Takasugi, M., Hélène, C., and Mergny, J. L. (2000) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **270**, 363–369.
- Basye, J., Trent, J. O., Gao, D., and Ebbinghaus, S. W. (2001) *Nucleic Acids Res.* **29**, 4873–4880.
- Cantor, C. R., Warshaw, M. M., and Shapiro, H. (1970) *Biopolymers* **9**, 1059–1077.
- Mergny, J. L., Lacroix, L., Han, X., Leroy, J. L., and Hélène, C. (1995) *J. Am. Chem. Soc.* **117**, 8887–8898.
- Rougée, M., Faucon, B., Mergny, J. L., Barcelo, F., Giovannangeli, C., Garestier, T., and Hélène, C. (1992) *Biochemistry* **31**, 9269–9278.
- Csink, A. K., and Henikoff, S. (1998) *Trends Genet.* **14**, 200–204.
- Summerton, J., Stein, D., Huang, S. B., Matthews, P., Weller, D., and Partridge, M. (1997) *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* **7**, 63–70.
- Lacroix, L., Mergny, J. L., Leroy, J. L., and Hélène, C. (1996) *Biochemistry* **35**, 8715–8722.
- Maher, L. J., Dervan, P. B., and Wold, B. J. (1990) *Biochemistry* **29**, 8820–8826.
- Singleton, S. F., and Dervan, P. B. (1993) *Biochemistry* **32**, 13171–13179.
- Lacroix, L., and Mergny, J. L. (2000) *Arch. Biochem. Biophys.* **381**, 153–163.
- Saenger, W. (1984) *Principles of Nucleic Acids Structure*, Springer-Verlag, New York.
- Svinarchuk, F., Bertrand, J. R., and Malvy, C. (1994) *Nucleic Acids Res.* **22**, 3742–3747.
- Sigel, A., and Sigel, H. (1996) *Metal ions in biological systems*, Vol. 32, Marcel Dekker, New York.
- Sagripanti, J. L., Goering, P. L., and Lamanna, A. (1991) *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **110**, 477–485.
- Johnson, M. D., III, and Fresco, J. R. (1999) *Chromosoma* **108**, 181–189.
- Ohno, M., Fukagawa, T., Lee, J. S., and Ikemura, T. (2002) *Chromosoma* **111**, 201–213.

BIBLIOGRAPHIE

- Adams, R.R., Carmena, M. and Earnshaw, W.C. (2001a) Chromosomal passengers and the (aurora) ABCs of mitosis. *Trends Cell Biol.*, **11**, 49-54.
- Adams, R.R., Maiato, H., Earnshaw, W.C. and Carmena, M. (2001b) Essential roles of Drosophila inner centromere protein (INCENP) and aurora B in histone H3 phosphorylation, metaphase chromosome alignment, kinetochore disjunction, and chromosome segregation. *J Cell Biol.*, **153**, 865-880.
- Adams, R.R., Wheatley, S.P., Gouldsworth, A.M., Kandels-Lewis, S.E., Carmena, M., Smythe, C., Gerloff, D.L. and Earnshaw, W.C. (2000) INCENP binds the Aurora-related kinase AIRK2 and is required to target it to chromosomes, the central spindle and cleavage furrow. *Curr Biol.*, **10**, 1075-1078.
- Agostinis, P., Goris, J., Pinna, L.A., Marchiori, F., Perich, J.W., Meyer, H.E. and Merlevede, W. (1990) Synthetic peptides as model substrates for the study of the specificity of the polycation-stimulated protein phosphatases. *Eur J Biochem.*, **189**, 235-241.
- Agostinis, P., Goris, J., Waelkens, E., Pinna, L.A., Marchiori, F. and Merlevede, W. (1987) Dephosphorylation of phosphoproteins and synthetic phosphopeptides. Study of the specificity of the polycation-stimulated and MgATP-dependent phosphotyrosyl phosphatases. *J Biol Chem.*, **262**, 1060-1064.
- Akoulitchev, S., Chuikov, S. and Reinberg, D. (2000) TFIID is negatively regulated by cdk8-containing mediator complexes. *Nature*, **407**, 102-106.
- Al-Murrani, S.W., Woodgett, J.R. and Damuni, Z. (1999) Expression of I2PP2A, an inhibitor of protein phosphatase 2A, induces c-Jun and AP-1 activity. *Biochem J.*, **341** (Pt 2), 293-298.
- Altinok, S., Xu, M. and Spiegelman, B.M. (1997) PPARgamma induces cell cycle withdrawal: inhibition of E2F/DP DNA-binding activity via down-regulation of PP2A. *Genes Dev.*, **11**, 1987-1998.
- Andreassen, P.R., Lacroix, F.B., Villa-Moruzzi, E. and Margolis, R.L. (1998) Differential subcellular localization of protein phosphatase-1 alpha, gamma1, and delta isoforms during both interphase and mitosis in mammalian cells. *J Cell Biol.*, **141**, 1207-1215.
- Andresson, T. and Ruderman, J.V. (1998) The kinase Eg2 is a component of the Xenopus oocyte progesterone-activated signaling pathway. *Embo J.*, **17**, 5627-5637.
- Andrews, P.D., Ovechkina, Y., Morrice, N., Wagenbach, M., Duncan, K., Wordeman, L. and Swedlow, J.R. (2004) Aurora B regulates MCAK at the mitotic centromere. *Dev Cell.*, **6**, 253-268.
- Arino, J., Woon, C.W., Brautigan, D.L., Miller, T.B., Jr. and Johnson, G.L. (1988) Human liver phosphatase 2A: cDNA and amino acid sequence of two catalytic subunit isotypes. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, **85**, 4252-4256.
- Arlot-Bonnemains, Y., Klotzbucher, A., Giet, R., Uzbekov, R., Bihan, R. and Prigent, C. (2001) Identification of a functional destruction box in the Xenopus laevis aurora-A kinase pEg2. *FEBS Lett.*, **508**, 149-152.
- Baharians, Z. and Schonthal, A.H. (1998) Autoregulation of protein phosphatase type 2A expression. *J Biol Chem.*, **273**, 19019-19024.

- Ballou, L.M., Brautigan, D.L. and Fischer, E.H. (1983) Subunit structure and activation of inactive phosphorylase phosphatase. *Biochemistry*, **22**, 3393-3399.
- Barford, D. (1996) Molecular mechanisms of the protein serine/threonine phosphatases. *Trends Biochem Sci*, **21**, 407-412.
- Barr, F.A., Sillje, H.H. and Nigg, E.A. (2004) Polo-like kinases and the orchestration of cell division. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **5**, 429-440.
- Bates, S., Bonetta, L., MacAllan, D., Parry, D., Holder, A., Dickson, C. and Peters, G. (1994) CDK6 (PLSTIRE) and CDK4 (PSK-J3) are a distinct subset of the cyclin-dependent kinases that associate with cyclin D1. *Oncogene*, **9**, 71-79.
- Bayliss, R., Sardon, T., Ebert, J., Lindner, D., Vernos, I. and Conti, E. (2004) Determinants for Aurora-A Activation and Aurora-B Discrimination by TPX2. *Cell Cycle*, **3**, 404-407.
- Bayliss, R., Sardon, T., Vernos, I. and Conti, E. (2003) Structural basis of Aurora-A activation by TPX2 at the mitotic spindle. *Mol Cell*, **12**, 851-862.
- Begum, N. and Ragolia, L. (1996) cAMP counter-regulates insulin-mediated protein phosphatase-2A inactivation in rat skeletal muscle cells. *J Biol Chem*, **271**, 31166-31171.
- Begum, N. and Ragolia, L. (1999) Role of janus kinase-2 in insulin-mediated phosphorylation and inactivation of protein phosphatase-2A and its impact on upstream insulin signalling components. *Biochem J*, **344 Pt 3**, 895-901.
- Berdnik, D. and Knoblich, J.A. (2002) Drosophila Aurora-A is required for centrosome maturation and actin-dependent asymmetric protein localization during mitosis. *Curr Biol*, **12**, 640-647.
- Bialojan, C. and Takai, A. (1988) Inhibitory effect of a marine-sponge toxin, okadaic acid, on protein phosphatases. Specificity and kinetics. *Biochem J*, **256**, 283-290.
- Bischoff, J.R., Anderson, L., Zhu, Y., Mossie, K., Ng, L., Souza, B., Schryver, B., Flanagan, P., Clairvoyant, F., Ginther, C., Chan, C.S., Novotny, M., Slamon, D.J. and Plowman, G.D. (1998) A homologue of Drosophila aurora kinase is oncogenic and amplified in human colorectal cancers. *Embo J*, **17**, 3052-3065.
- Bischoff, J.R. and Plowman, G.D. (1999) The Aurora/Ipl1p kinase family: regulators of chromosome segregation and cytokinesis. *Trends Cell Biol*, **9**, 454-459.
- Blangy, A., Lane, H.A., d'Herin, P., Harper, M., Kress, M. and Nigg, E.A. (1995) Phosphorylation by p34cdc2 regulates spindle association of human Eg5, a kinesin-related motor essential for bipolar spindle formation in vivo. *Cell*, **83**, 1159-1169.
- Bolton, M.A., Lan, W., Powers, S.E., McCleland, M.L., Kuang, J. and Stukenberg, P.T. (2002) Aurora B kinase exists in a complex with survivin and INCENP and its kinase activity is stimulated by survivin binding and phosphorylation. *Mol Biol Cell*, **13**, 3064-3077.
- Booher, R.N., Holman, P.S. and Fattaey, A. (1997) Human Myt1 is a cell cycle-regulated kinase that inhibits Cdc2 but not Cdk2 activity. *J Biol Chem*, **272**, 22300-22306.
- Borgne, A. and Meijer, L. (1996) Sequential dephosphorylation of p34(cdc2) on Thr-14 and Tyr-15 at the prophase/metaphase transition. *J Biol Chem*, **271**, 27847-27854.
- Bouchard, C., Thieke, K., Maier, A., Saffrich, R., Hanley-Hyde, J., Ansorge, W., Reed, S., Sicinski, P., Bartek, J. and Eilers, M. (1999) Direct induction of cyclin D2 by Myc contributes to cell cycle progression and sequestration of p27. *Embo J*, **18**, 5321-5333.
- Brautigan, D.L., Sunwoo, J., Labbe, J.C., Fernandez, A. and Lamb, N.J. (1990) Cell cycle oscillation of phosphatase inhibitor-2 in rat fibroblasts coincident with p34cdc2 restriction. *Nature*, **344**, 74-78.

- Bryant, J.C., Westphal, R.S. and Wadzinski, B.E. (1999) Methylated C-terminal leucine residue of PP2A catalytic subunit is important for binding of regulatory Balpha subunit. *Biochem J*, **339** (Pt 2), 241-246.
- Calbo, J., Parreno, M., Sotillo, E., Yong, T., Mazo, A., Garriga, J. and Grana, X. (2002) G1 cyclin/cyclin-dependent kinase-coordinated phosphorylation of endogenous pocket proteins differentially regulates their interactions with E2F4 and E2F1 and gene expression. *J Biol Chem*, **277**, 50263-50274.
- Cardoso, M.C., Leonhardt, H. and Nadal-Ginard, B. (1993) Reversal of terminal differentiation and control of DNA replication: cyclin A and Cdk2 specifically localize at subnuclear sites of DNA replication. *Cell*, **74**, 979-992.
- Carroll, K.M., Wong, T.T., Drabik, D.L. and Chang, E.B. (1988) Differentiation of rat small intestinal epithelial cells by extracellular matrix. *Am J Physiol*, **254**, G355-360.
- Casenghi, M., Meraldì, P., Weinhart, U., Duncan, P.I., Korner, R. and Nigg, E.A. (2003) Polo-like kinase 1 regulates Nlp, a centrosome protein involved in microtubule nucleation. *Dev Cell*, **5**, 113-125.
- Castro, A., Arlot-Bonnemains, Y., Vigneron, S., Labbe, J.C., Prigent, C. and Lorca, T. (2002) APC/Fizzy-Related targets Aurora-A kinase for proteolysis. *EMBO Rep*, **3**, 457-462.
- Cegielska, A., Shaffer, S., Derua, R., Goris, J. and Virshup, D.M. (1994) Different oligomeric forms of protein phosphatase 2A activate and inhibit simian virus 40 DNA replication. *Mol Cell Biol*, **14**, 4616-4623.
- Chen, J., Martin, B.L. and Brautigan, D.L. (1992) Regulation of protein serine-threonine phosphatase type-2A by tyrosine phosphorylation. *Science*, **257**, 1261-1264.
- Chen, J., Parsons, S. and Brautigan, D.L. (1994) Tyrosine phosphorylation of protein phosphatase 2A in response to growth stimulation and v-src transformation of fibroblasts. *J Biol Chem*, **269**, 7957-7962.
- Chen, S.S., Chang, P.C., Cheng, Y.W., Tang, F.M. and Lin, Y.S. (2002a) Suppression of the STK15 oncogenic activity requires a transactivation-independent p53 function. *Embo J*, **21**, 4491-4499.
- Chen, W., Possemato, R., Campbell, K.T., Plattner, C.A., Pallas, D.C. and Hahn, W.C. (2004) Identification of specific PP2A complexes involved in human cell transformation. *Cancer Cell*, **5**, 127-136.
- Chen, Y., Riley, D.J., Zheng, L., Chen, P.L. and Lee, W.H. (2002b) Phosphorylation of the mitotic regulator protein Hec1 by Nek2 kinase is essential for faithful chromosome segregation. *J Biol Chem*, **277**, 49408-49416.
- Cheng, K.Y., Lowe, E.D., Sinclair, J., Nigg, E.A. and Johnson, L.N. (2003) The crystal structure of the human polo-like kinase-1 polo box domain and its phospho-peptide complex. *Embo J*, **22**, 5757-5768.
- Chow, K.N., Starostik, P. and Dean, D.C. (1996) The Rb family contains a conserved cyclin-dependent-kinase-regulated transcriptional repressor motif. *Mol Cell Biol*, **16**, 7173-7181.
- Cohen, P., Holmes, C.F. and Tsukitani, Y. (1990a) Okadaic acid: a new probe for the study of cellular regulation. *Trends Biochem Sci*, **15**, 98-102.
- Cohen, P.T. (1997) Novel protein serine/threonine phosphatases: variety is the spice of life. *Trends Biochem Sci*, **22**, 245-251.
- Cohen, P.T. (2002) Protein phosphatase 1--targeted in many directions. *J Cell Sci*, **115**, 241-256.
- Cohen, P.T., Brewis, N.D., Hughes, V. and Mann, D.J. (1990b) Protein serine/threonine phosphatases; an expanding family. *FEBS Lett*, **268**, 355-359.
- Cooper, S. (2001) Revisiting the relationship of the mammalian G1 phase to cell differentiation. *J Theor Biol*, **208**, 399-402.

- Coqueret, O. (2002) Linking cyclins to transcriptional control. *Gene*, **299**, 35-55.
- Cortez, D., Wang, Y., Qin, J. and Elledge, S.J. (1999) Requirement of ATM-dependent phosphorylation of brca1 in the DNA damage response to double-strand breaks. *Science*, **286**, 1162-1166.
- Craig, K.L. and Tyers, M. (1999) The F-box: a new motif for ubiquitin dependent proteolysis in cell cycle regulation and signal transduction. *Prog Biophys Mol Biol*, **72**, 299-328.
- Csortos, C., Zolnierowicz, S., Bako, E., Durbin, S.D. and DePaoli-Roach, A.A. (1996) High complexity in the expression of the B' subunit of protein phosphatase 2A0. Evidence for the existence of at least seven novel isoforms. *J Biol Chem*, **271**, 2578-2588.
- De Baere, I., Derua, R., Janssens, V., Van Hoof, C., Waelkens, E., Merlevede, W. and Goris, J. (1999) Purification of porcine brain protein phosphatase 2A leucine carboxyl methyltransferase and cloning of the human homologue. *Biochemistry*, **38**, 16539-16547.
- de la Barre, A.E., Angelov, D., Molla, A. and Dimitrov, S. (2001) The N-terminus of histone H2B, but not that of histone H3 or its phosphorylation, is essential for chromosome condensation. *Embo J*, **20**, 6383-6393.
- Deak, P., Donaldson, M. and Glover, D.M. (2003) Mutations in makos, a Drosophila gene encoding the Cdc27 subunit of the anaphase promoting complex, enhance centrosomal defects in polo and are suppressed by mutations in twins/aar, which encodes a regulatory subunit of PP2A. *J Cell Sci*, **116**, 4147-4158.
- Denicourt, C. and Dowdy, S.F. (2004) Cip/Kip proteins: more than just CDKs inhibitors. *Genes Dev*, **18**, 851-855.
- Descamps, S. and Prigent, C. (2001) Two mammalian mitotic aurora kinases: who's who? *Sci STKE*, **2001**, PE1.
- Ditchfield, C., Johnson, V.L., Tighe, A., Ellston, R., Haworth, C., Johnson, T., Mortlock, A., Keen, N. and Taylor, S.S. (2003) Aurora B couples chromosome alignment with anaphase by targeting BubR1, Mad2, and Cenp-E to kinetochores. *J Cell Biol*, **161**, 267-280.
- Ducat, D. and Zheng, Y. (2004) Aurora kinases in spindle assembly and chromosome segregation. *Exp Cell Res*, **301**, 60-67.
- Ducommun, B., Brambilla, P., Felix, M.A., Franzia, B.R., Jr., Karsenti, E. and Draetta, G. (1991) cdc2 phosphorylation is required for its interaction with cyclin. *Embo J*, **10**, 3311-3319.
- Dutertre, S., Cazales, M., Quaranta, M., Froment, C., Trabut, V., Dozier, C., Mirey, G., Bouche, J.P., Theis-Febvre, N., Schmitt, E., Monsarrat, B., Prigent, C. and Ducommun, B. (2004) Phosphorylation of CDC25B by Aurora-A at the centrosome contributes to the G2-M transition. *J Cell Sci*, **Pt**.
- Dutertre, S., Descamps, S. and Prigent, C. (2002) On the role of aurora-A in centrosome function. *Oncogene*, **21**, 6175-6183.
- Elia, A.E., Cantley, L.C. and Yaffe, M.B. (2003) Proteomic screen finds pSer/pThr-binding domain localizing Plk1 to mitotic substrates. *Science*, **299**, 1228-1231.
- Endicott, J.A., Nurse, P. and Johnson, L.N. (1994) Mutational analysis supports a structural model for the cell cycle protein kinase p34. *Protein Eng*, **7**, 243-253.
- Espinosa, F.H., Farrell, A., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P. and Morgan, D.O. (1996) A cyclin-dependent kinase-activating kinase (CAK) in budding yeast unrelated to vertebrate CAK. *Science*, **273**, 1714-1717.
- Faragher, A.J. and Fry, A.M. (2003) Nek2A kinase stimulates centrosome disjunction and is required for formation of bipolar mitotic spindles. *Mol Biol Cell*, **14**, 2876-2889.
- Fattaey, A. and Booher, R.N. (1997) Myt1: a Wee1-type kinase that phosphorylates Cdc2 on residue Thr14. *Prog Cell Cycle Res*, **3**, 233-240.

- Favre, B., Turowski, P. and Hemmings, B.A. (1997) Differential inhibition and posttranslational modification of protein phosphatase 1 and 2A in MCF7 cells treated with calyculin-A, okadaic acid, and tautomycin. *J Biol Chem*, **272**, 13856-13863.
- Favre, B., Zolnierowicz, S., Turowski, P. and Hemmings, B.A. (1994) The catalytic subunit of protein phosphatase 2A is carboxyl-methylated in vivo. *J Biol Chem*, **269**, 16311-16317.
- Felix, M.A., Cohen, P. and Karsenti, E. (1990) Cdc2 H1 kinase is negatively regulated by a type 2A phosphatase in the Xenopus early embryonic cell cycle: evidence from the effects of okadaic acid. *Embo J*, **9**, 675-683.
- Feng, Y., Longo, D.L. and Ferris, D.K. (2001) Polo-like kinase interacts with proteasomes and regulates their activity. *Cell Growth Differ*, **12**, 29-37.
- Francisco, L. and Chan, C.S. (1994) Regulation of yeast chromosome segregation by Ipl1 protein kinase and type 1 protein phosphatase. *Cell Mol Biol Res*, **40**, 207-213.
- Francisco, L., Wang, W. and Chan, C.S. (1994) Type 1 protein phosphatase acts in opposition to Ipl1 protein kinase in regulating yeast chromosome segregation. *Mol Cell Biol*, **14**, 4731-4740.
- Fry, A.M., Arnaud, L. and Nigg, E.A. (1999) Activity of the human centrosomal kinase, Nek2, depends on an unusual leucine zipper dimerization motif. *J Biol Chem*, **274**, 16304-16310.
- Fry, A.M., Mayor, T., Meraldi, P., Stierhof, Y.D., Tanaka, K. and Nigg, E.A. (1998) C-Nap1, a novel centrosomal coiled-coil protein and candidate substrate of the cell cycle-regulated protein kinase Nek2. *J Cell Biol*, **141**, 1563-1574.
- Fry, A.M. and Nigg, E.A. (1995) Cell cycle. The NIMA kinase joins forces with Cdc2. *Curr Biol*, **5**, 1122-1125.
- Fry, A.M., Schultz, S.J., Bartek, J. and Nigg, E.A. (1995) Substrate specificity and cell cycle regulation of the Nek2 protein kinase, a potential human homolog of the mitotic regulator NIMA of Aspergillus nidulans. *J Biol Chem*, **270**, 12899-12905.
- Garcia, A., Cayla, X., Caudron, B., Deveaud, E., Roncal, F. and Rebollo, A. (2004) New insights in protein phosphorylation: a signature for protein phosphatase 1 interacting proteins. *C R Biol*, **327**, 93-97.
- Garriga, J., Jayaraman, A.L., Limon, A., Jayadeva, G., Sotillo, E., Truongcao, M., Patsialou, A., Wadzinski, B.E. and Grana, X. (2004) A Dynamic Equilibrium Between CDKs and PP2A Modulates Phosphorylation of pRB, p107 and p130. *Cell Cycle*, **3**.
- Gatei, M., Zhou, B.B., Hobson, K., Scott, S., Young, D. and Khanna, K.K. (2001) Ataxiatelangiectasia mutated (ATM) kinase and ATM and Rad3 related kinase mediate phosphorylation of Brca1 at distinct and overlapping sites. In vivo assessment using phospho-specific antibodies. *J Biol Chem*, **276**, 17276-17280.
- Giet, R. and Glover, D.M. (2001) Drosophila aurora B kinase is required for histone H3 phosphorylation and condensin recruitment during chromosome condensation and to organize the central spindle during cytokinesis. *J Cell Biol*, **152**, 669-682.
- Giet, R., McLean, D., Descamps, S., Lee, M.J., Raff, J.W., Prigent, C. and Glover, D.M. (2002) Drosophila Aurora A kinase is required to localize D-TACC to centrosomes and to regulate astral microtubules. *J Cell Biol*, **156**, 437-451.
- Giet, R. and Prigent, C. (1998) A method for in situ mitotic spindle binding assay. *Exp Cell Res*, **244**, 470-473.
- Giet, R. and Prigent, C. (1999) Aurora/Ipl1p-related kinases, a new oncogenic family of mitotic serine-threonine kinases. *J Cell Sci*, **112** (Pt 21), 3591-3601.
- Giet, R. and Prigent, C. (2001) The non-catalytic domain of the Xenopus laevis auroraA kinase localises the protein to the centrosome. *J Cell Sci*, **114**, 2095-2104.

- Glotzer, M., Murray, A.W. and Kirschner, M.W. (1991) Cyclin is degraded by the ubiquitin pathway. *Nature*, **349**, 132-138.
- Glover, D.M., Hagan, I.M. and Tavares, A.A. (1998) Polo-like kinases: a team that plays throughout mitosis. *Genes Dev*, **12**, 3777-3787.
- Glover, D.M., Leibowitz, M.H., McLean, D.A. and Parry, H. (1995) Mutations in aurora prevent centrosome separation leading to the formation of monopolar spindles. *Cell*, **81**, 95-105.
- Glover, D.M., Llamazares, S., Girdham, C., Maldonado-Codina, G., Moreira, A., Tavares, A., Sunkel, C.E. and Gonzalez, C. (1991) Cyclical changes in the subcellular distribution of proteins essential for mitosis during embryogenesis in Drosophila. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, **56**, 709-717.
- Goepfert, T.M., Adigun, Y.E., Zhong, L., Gay, J., Medina, D. and Brinkley, W.R. (2002) Centrosome amplification and overexpression of aurora A are early events in rat mammary carcinogenesis. *Cancer Res*, **62**, 4115-4122.
- Goffeau, A., Barrell, B.G., Bussey, H., Davis, R.W., Dujon, B., Feldmann, H., Galibert, F., Hoheisel, J.D., Jacq, C., Johnston, M., Louis, E.J., Mewes, H.W., Murakami, Y., Philippsen, P., Tettelin, H. and Oliver, S.G. (1996) Life with 6000 genes. *Science*, **274**, 546, 563-547.
- Golan, A., Yudkovsky, Y. and Hershko, A. (2002) The cyclin-ubiquitin ligase activity of cyclosome/APC is jointly activated by protein kinases Cdk1-cyclin B and Plk. *J Biol Chem*, **277**, 15552-15557.
- Golsteyn, R.M., Mundt, K.E., Fry, A.M. and Nigg, E.A. (1995) Cell cycle regulation of the activity and subcellular localization of Plk1, a human protein kinase implicated in mitotic spindle function. *J Cell Biol*, **129**, 1617-1628.
- Gomes, R., Karess, R.E., Ohkura, H., Glover, D.M. and Sunkel, C.E. (1993) Abnormal anaphase resolution (aar): a locus required for progression through mitosis in Drosophila. *J Cell Sci*, **104** (Pt 2), 583-593.
- Gopalan, G., Chan, C.S. and Donovan, P.J. (1997) A novel mammalian, mitotic spindle-associated kinase is related to yeast and fly chromosome segregation regulators. *J Cell Biol*, **138**, 643-656.
- Gordon, J.I., Schmidt, G.H. and Roth, K.A. (1992) Studies of intestinal stem cells using normal, chimeric, and transgenic mice. *Faseb J*, **6**, 3039-3050.
- Goris, J., Hermann, J., Hendrix, P., Ozon, R. and Merlevede, W. (1989) Okadaic acid, a specific protein phosphatase inhibitor, induces maturation and MPF formation in Xenopus laevis oocytes. *FEBS Lett*, **245**, 91-94.
- Goto, H., Tomono, Y., Ajiro, K., Kosako, H., Fujita, M., Sakurai, M., Okawa, K., Iwamatsu, A., Okigaki, T., Takahashi, T. and Inagaki, M. (1999) Identification of a novel phosphorylation site on histone H3 coupled with mitotic chromosome condensation. *J Biol Chem*, **274**, 25543-25549.
- Gould, K.L., Moreno, S., Owen, D.J., Sazer, S. and Nurse, P. (1991) Phosphorylation at Thr167 is required for Schizosaccharomyces pombe p34cdc2 function. *Embo J*, **10**, 3297-3309.
- Goyal, R.K., Lin, P., Kanungo, J., Payne, A.S., Muslin, A.J. and Longmore, G.D. (1999) Ajuba, a novel LIM protein, interacts with Grb2, augments mitogen-activated protein kinase activity in fibroblasts, and promotes meiotic maturation of Xenopus oocytes in a Grb2- and Ras-dependent manner. *Mol Cell Biol*, **19**, 4379-4389.
- Grallert, A. and Hagan, I.M. (2002) Schizosaccharomyces pombe NIMA-related kinase, Fin1, regulates spindle formation and an affinity of Polo for the SPB. *Embo J*, **21**, 3096-3107.

- Grana, X., Garriga, J. and Mayol, X. (1998) Role of the retinoblastoma protein family, pRB, p107 and p130 in the negative control of cell growth. *Oncogene*, **17**, 3365-3383.
- Griswold-Prenner, I., Kamibayashi, C., Maruoka, E.M., Mumby, M.C. and Deryck, R. (1998) Physical and functional interactions between type I transforming growth factor beta receptors and Balph, a WD-40 repeat subunit of phosphatase 2A. *Mol Cell Biol*, **18**, 6595-6604.
- Groves, M.R., Hanlon, N., Turowski, P., Hemmings, B.A. and Barford, D. (1999) The structure of the protein phosphatase 2A PR65/A subunit reveals the conformation of its 15 tandemly repeated HEAT motifs. *Cell*, **96**, 99-110.
- Gruneberg, U., Neef, R., Honda, R., Nigg, E.A. and Barr, F.A. (2004) Relocation of Aurora B from centromeres to the central spindle at the metaphase to anaphase transition requires MKlp2. *J Cell Biol*, **166**, 167-172.
- Guo, H. and Damuni, Z. (1993) Autophosphorylation-activated protein kinase phosphorylates and inactivates protein phosphatase 2A. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90**, 2500-2504.
- Guy, G.R., Philp, R. and Tan, Y.H. (1995) Activation of protein kinases and the inactivation of protein phosphatase 2A in tumour necrosis factor and interleukin-1 signal-transduction pathways. *Eur J Biochem*, **229**, 503-511.
- Hagstrom, K.A., Holmes, V.F., Cozzarelli, N.R. and Meyer, B.J. (2002) *C. elegans* condensin promotes mitotic chromosome architecture, centromere organization, and sister chromatid segregation during mitosis and meiosis. *Genes Dev*, **16**, 729-742.
- Hagting, A., Jackman, M., Simpson, K. and Pines, J. (1999) Translocation of cyclin B1 to the nucleus at prophase requires a phosphorylation-dependent nuclear import signal. *Curr Biol*, **9**, 680-689.
- Hagting, A., Karlsson, C., Clute, P., Jackman, M. and Pines, J. (1998) MPF localization is controlled by nuclear export. *Embo J*, **17**, 4127-4138.
- Hames, R.S., Wattam, S.L., Yamano, H., Bacchieri, R. and Fry, A.M. (2001) APC/C-mediated destruction of the centrosomal kinase Nek2A occurs in early mitosis and depends upon a cyclin A-type D-box. *Embo J*, **20**, 7117-7127.
- Hammond, E.M. and Giaccia, A.J. (2004) The role of ATM and ATR in the cellular response to hypoxia and re-oxygenation. *DNA Repair (Amst)*, **3**, 1117-1122.
- Han, H., Bearss, D.J., Browne, L.W., Calaluce, R., Nagle, R.B. and Von Hoff, D.D. (2002) Identification of differentially expressed genes in pancreatic cancer cells using cDNA microarray. *Cancer Res*, **62**, 2890-2896.
- Hanks, S.K. and Hunter, T. (1995) Protein kinases 6. The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification. *Faseb J*, **9**, 576-596.
- Hannak, E., Kirkham, M., Hyman, A.A. and Oegema, K. (2001) Aurora-A kinase is required for centrosome maturation in *Caenorhabditis elegans*. *J Cell Biol*, **155**, 1109-1116.
- Hatakeyama, M., Brill, J.A., Fink, G.R. and Weinberg, R.A. (1994) Collaboration of G1 cyclins in the functional inactivation of the retinoblastoma protein. *Genes Dev*, **8**, 1759-1771.
- Healy, A.M., Zolnierowicz, S., Stapleton, A.E., Goebel, M., DePaoli-Roach, A.A. and Pringle, J.R. (1991) CDC55, a *Saccharomyces cerevisiae* gene involved in cellular morphogenesis: identification, characterization, and homology to the B subunit of mammalian type 2A protein phosphatase. *Mol Cell Biol*, **11**, 5767-5780.
- Helps, N.R., Luo, X., Barker, H.M. and Cohen, P.T. (2000) NIMA-related kinase 2 (Nek2), a cell-cycle-regulated protein kinase localized to centrosomes, is complexed to protein phosphatase 1. *Biochem J*, **349**, 509-518.
- Hemmings, B.A., Adams-Pearson, C., Maurer, F., Muller, P., Goris, J., Merlevede, W., Hofsteenge, J. and Stone, S.R. (1990) alpha- and beta-forms of the 65-kDa subunit of

protein phosphatase 2A have a similar 39 amino acid repeating structure.

Biochemistry, **29**, 3166-3173.

Hemmings, B.A., Resink, T.J. and Cohen, P. (1982) Reconstitution of a Mg-ATP-dependent protein phosphatase and its activation through a phosphorylation mechanism. *FEBS Lett*, **150**, 319-324.

Hendil, K.B. and Hartmann-Petersen, R. (2004) Proteasomes: a complex story. *Curr Protein Pept Sci*, **5**, 135-151.

Hendrix, P., Mayer-Jackel, R.E., Cron, P., Goris, J., Hofsteenge, J., Merlevede, W. and Hemmings, B.A. (1993) Structure and expression of a 72-kDa regulatory subunit of protein phosphatase 2A. Evidence for different size forms produced by alternative splicing. *J Biol Chem*, **268**, 15267-15276.

Hengstschlager, M., Knofler, M., Mullner, E.W., Ogris, E., Wintersberger, E. and Wawra, E. (1994) Different regulation of thymidine kinase during the cell cycle of normal versus DNA tumor virus-transformed cells. *J Biol Chem*, **269**, 13836-13842.

Hirota, T., Kunitoku, N., Sasayama, T., Marumoto, T., Zhang, D., Nitta, M., Hatakeyama, K. and Saya, H. (2003) Aurora-A and an interacting activator, the LIM protein Ajuba, are required for mitotic commitment in human cells. *Cell*, **114**, 585-598.

Hirota, T., Morisaki, T., Nishiyama, Y., Marumoto, T., Tada, K., Hara, T., Masuko, N., Inagaki, M., Hatakeyama, K. and Saya, H. (2000) Zyxin, a regulator of actin filament assembly, targets the mitotic apparatus by interacting with h-warts/LATS1 tumor suppressor. *J Cell Biol*, **149**, 1073-1086.

Hofseth, L.J., Hussain, S.P. and Harris, C.C. (2004) p53: 25 years after its discovery. *Trends Pharmacol Sci*, **25**, 177-181.

Holland, P.M., Milne, A., Garka, K., Johnson, R.S., Willis, C., Sims, J.E., Rauch, C.T., Bird, T.A. and Virca, G.D. (2002) Purification, cloning, and characterization of Nek8, a novel NIMA-related kinase, and its candidate substrate Bicd2. *J Biol Chem*, **277**, 16229-16240.

Holloway, S.L., Glotzer, M., King, R.W. and Murray, A.W. (1993) Anaphase is initiated by proteolysis rather than by the inactivation of maturation-promoting factor. *Cell*, **73**, 1393-1402.

Honda, K., Mihara, H., Kato, Y., Yamaguchi, A., Tanaka, H., Yasuda, H., Furukawa, K. and Urano, T. (2000) Degradation of human Aurora2 protein kinase by the anaphase-promoting complex-ubiquitin-proteasome pathway. *Oncogene*, **19**, 2812-2819.

Hsu, J.Y., Sun, Z.W., Li, X., Reuben, M., Tatchell, K., Bishop, D.K., Grushcow, J.M., Brame, C.J., Caldwell, J.A., Hunt, D.F., Lin, R., Smith, M.M. and Allis, C.D. (2000) Mitotic phosphorylation of histone H3 is governed by Ipl1/aurora kinase and Glc7/PP1 phosphatase in budding yeast and nematodes. *Cell*, **102**, 279-291.

Huang, F.L. and Glinsmann, W.H. (1976) Separation and characterization of two phosphorylase phosphatase inhibitors from rabbit skeletal muscle. *Eur J Biochem*, **70**, 419-426.

Hunter, T. and Plowman, G.D. (1997) The protein kinases of budding yeast: six score and more. *Trends Biochem Sci*, **22**, 18-22.

Jackman, M.R. and Pines, J.N. (1997) Cyclins and the G2/M transition. *Cancer Surv*, **29**, 47-73.

Jeffrey, P.D., Russo, A.A., Polyak, K., Gibbs, E., Hurwitz, J., Massague, J. and Pavletich, N.P. (1995) Mechanism of CDK activation revealed by the structure of a cyclinA-CDK2 complex. *Nature*, **376**, 313-320.

Jeffrey, P.D., Tong, L. and Pavletich, N.P. (2000) Structural basis of inhibition of CDK-cyclin complexes by INK4 inhibitors. *Genes Dev*, **14**, 3115-3125.

- Johnson, L.F. (1992) G1 events and the regulation of genes for S-phase enzymes. *Curr Opin Cell Biol*, **4**, 149-154.
- Jones, S.M. and Kazlauskas, A. (2001a) Growth factor-dependent signaling and cell cycle progression. *FEBS Lett*, **490**, 110-116.
- Jones, S.M. and Kazlauskas, A. (2001b) Growth-factor-dependent mitogenesis requires two distinct phases of signalling. *Nat Cell Biol*, **3**, 165-172.
- Kaldis, P., Russo, A.A., Chou, H.S., Pavletich, N.P. and Solomon, M.J. (1998) Human and yeast cdk-activating kinases (CAKs) display distinct substrate specificities. *Mol Biol Cell*, **9**, 2545-2560.
- Kandli, M., Feige, E., Chen, A., Kilfin, G. and Motro, B. (2000) Isolation and characterization of two evolutionarily conserved murine kinases (Nek6 and nek7) related to the fungal mitotic regulator, NIMA. *Genomics*, **68**, 187-196.
- Karaïskou, A., Cayla, X., Haccard, O., Jessus, C. and Ozon, R. (1998) MPF amplification in Xenopus oocyte extracts depends on a two-step activation of cdc25 phosphatase. *Exp Cell Res*, **244**, 491-500.
- Karaïskou, A., Jessus, C., Brassac, T. and Ozon, R. (1999) Phosphatase 2A and polo kinase, two antagonistic regulators of cdc25 activation and MPF auto-amplification. *J Cell Sci*, **112 (Pt 21)**, 3747-3756.
- Katayama, H., Zhou, H., Li, Q., Tatsuka, M. and Sen, S. (2001) Interaction and feedback regulation between STK15/BTAK/Aurora-A kinase and protein phosphatase 1 through mitotic cell division cycle. *J Biol Chem*, **276**, 46219-46224.
- Katayose, Y., Li, M., Al-Murrani, S.W., Shenolikar, S. and Damuni, Z. (2000) Protein phosphatase 2A inhibitors, I(1)(PP2A) and I(2)(PP2A), associate with and modify the substrate specificity of protein phosphatase 1. *J Biol Chem*, **275**, 9209-9214.
- Ke, Y.W., Dou, Z., Zhang, J. and Yao, X.B. (2003) Function and regulation of Aurora/Ipl1p kinase family in cell division. *Cell Res*, **13**, 69-81.
- Khew-Goodall, Y. and Hemmings, B.A. (1988) Tissue-specific expression of mRNAs encoding alpha- and beta-catalytic subunits of protein phosphatase 2A. *FEBS Lett*, **238**, 265-268.
- Khew-Goodall, Y., Mayer, R.E., Maurer, F., Stone, S.R. and Hemmings, B.A. (1991) Structure and transcriptional regulation of protein phosphatase 2A catalytic subunit genes. *Biochemistry*, **30**, 89-97.
- Kiat, L.S., Hui, K.M. and Gopalan, G. (2002) Aurora-A kinase interacting protein (AIP), a novel negative regulator of human Aurora-A kinase. *J Biol Chem*, **277**, 45558-45565.
- Kimura, M., Kotani, S., Hattori, T., Sumi, N., Yoshioka, T., Todokoro, K. and Okano, Y. (1997) Cell cycle-dependent expression and spindle pole localization of a novel human protein kinase, Aik, related to Aurora of Drosophila and yeast Ipl1. *J Biol Chem*, **272**, 13766-13771.
- Kimura, M., Matsuda, Y., Yoshioka, T. and Okano, Y. (1999) Cell cycle-dependent expression and centrosome localization of a third human aurora/Ipl1-related protein kinase, AIK3. *J Biol Chem*, **274**, 7334-7340.
- King, R.W., Glotzer, M. and Kirschner, M.W. (1996) Mutagenic analysis of the destruction signal of mitotic cyclins and structural characterization of ubiquitinated intermediates. *Mol Biol Cell*, **7**, 1343-1357.
- Kinoshita, N., Yamano, H., Niwa, H., Yoshida, T. and Yanagida, M. (1993) Negative regulation of mitosis by the fission yeast protein phosphatase ppa2. *Genes Dev*, **7**, 1059-1071.
- Kitada, K., Johnson, A.L., Johnston, L.H. and Sugino, A. (1993) 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*, **13**, 4445-4457.

- Klein, M. (1936) *Histoire des Origines de la Théorie cellulaire*.
- Kleinberger, T. and Shenk, T. (1993) Adenovirus E4orf4 protein binds to protein phosphatase 2A, and the complex down regulates E1A-enhanced junB transcription. *J Virol*, **67**, 7556-7560.
- Knoblich, J.A. (2001) Asymmetric cell division during animal development. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **2**, 11-20.
- Kobayashi, H., Stewart, E., Poon, R., Adamczewski, J.P., Gannon, J. and Hunt, T. (1992) Identification of the domains in cyclin A required for binding to, and activation of, p34cdc2 and p32cdk2 protein kinase subunits. *Mol Biol Cell*, **3**, 1279-1294.
- Koff, A., Cross, F., Fisher, A., Schumacher, J., Leguellec, K., Philippe, M. and Roberts, J.M. (1991) Human cyclin E, a new cyclin that interacts with two members of the CDC2 gene family. *Cell*, **66**, 1217-1228.
- Koren, R., Rainis, L. and Kleinberger, T. (2004) The scaffolding A/Tpd3 subunit and high phosphatase activity are dispensable for Cdc55 function in the *Saccharomyces cerevisiae* spindle checkpoint and in cytokinesis. *J Biol Chem*, **279**, 48598-48606.
- Kotani, S., Tugendreich, S., Fujii, M., Jorgensen, P.M., Watanabe, N., Hoog, C., Hieter, P. and Todokoro, K. (1998) PKA and MPF-activated polo-like kinase regulate anaphase-promoting complex activity and mitosis progression. *Mol Cell*, **1**, 371-380.
- Koundrioukoff, S., Polo, S. and Almouzni, G. (2004) Interplay between chromatin and cell cycle checkpoints in the context of ATR/ATM-dependent checkpoints. *DNA Repair (Amst)*, **3**, 969-978.
- Kubai, D.F. (1975) The evolution of the mitotic spindle. *Int Rev Cytol*, **43**, 167-227.
- Kufer, T.A., Nigg, E.A. and Sillje, H.H. (2003) Regulation of Aurora-A kinase on the mitotic spindle. *Chromosoma*, **112**, 159-163.
- Kufer, T.A., Sillje, H.H., Korner, R., Gruss, O.J., Meraldi, P. and Nigg, E.A. (2002) Human TPX2 is required for targeting Aurora-A kinase to the spindle. *J Cell Biol*, **158**, 617-623.
- Kunitoku, N., Sasayama, T., Marumoto, T., Zhang, D., Honda, S., Kobayashi, O., Hatakeyama, K., Ushio, Y., Saya, H. and Hirota, T. (2003) CENP-A phosphorylation by Aurora-A in prophase is required for enrichment of Aurora-B at inner centromeres and for kinetochore function. *Dev Cell*, **5**, 853-864.
- Lamphere, L., Fiore, F., Xu, X., Brizuela, L., Keezer, S., Sardet, C., Draetta, G.F. and Gyuris, J. (1997) Interaction between Cdc37 and Cdk4 in human cells. *Oncogene*, **14**, 1999-2004.
- Lan, W., Zhang, X., Kline-Smith, S.L., Rosasco, S.E., Barrett-Wilt, G.A., Shabanowitz, J., Hunt, D.F., Walczak, C.E. and Stukenberg, P.T. (2004) Aurora B phosphorylates centromeric MCAK and regulates its localization and microtubule depolymerization activity. *Curr Biol*, **14**, 273-286.
- Lane, H.A. and Nigg, E.A. (1996) Antibody microinjection reveals an essential role for human polo-like kinase 1 (Plk1) in the functional maturation of mitotic centrosomes. *J Cell Biol*, **135**, 1701-1713.
- Leach, C., Shenolikar, S. and Brautigan, D.L. (2003) Phosphorylation of phosphatase inhibitor-2 at centrosomes during mitosis. *J Biol Chem*, **278**, 26015-26020.
- Lee, T.H., Turck, C. and Kirschner, M.W. (1994) Inhibition of cdc2 activation by INH/PP2A. *Mol Biol Cell*, **5**, 323-338.
- Lees, E., Faha, B., Dulic, V., Reed, S.I. and Harlow, E. (1992) Cyclin E/cdk2 and cyclin A/cdk2 kinases associate with p107 and E2F in a temporally distinct manner. *Genes Dev*, **6**, 1874-1885.

- Lees, E.M. and Harlow, E. (1993) Sequences within the conserved cyclin box of human cyclin A are sufficient for binding to and activation of cdc2 kinase. *Mol Cell Biol*, **13**, 1194-1201.
- Letwin, K., Mizzen, L., Motro, B., Ben-David, Y., Bernstein, A. and Pawson, T. (1992) A mammalian dual specificity protein kinase, Nek1, is related to the NIMA cell cycle regulator and highly expressed in meiotic germ cells. *Embo J*, **11**, 3521-3531.
- Levedakou, E.N., He, M., Baptist, E.W., Craven, R.J., Cance, W.G., Welcsh, P.L., Simmons, A., Naylor, S.L., Leach, R.J., Lewis, T.B. and et al. (1994) Two novel human serine/threonine kinases with homologies to the cell cycle regulating Xenopus MO15, and NIMA kinases: cloning and characterization of their expression pattern. *Oncogene*, **9**, 1977-1988.
- Li, M., Guo, H. and Damuni, Z. (1995) Purification and characterization of two potent heat-stable protein inhibitors of protein phosphatase 2A from bovine kidney. *Biochemistry*, **34**, 1988-1996.
- Li, M., Makkinje, A. and Damuni, Z. (1996a) Molecular identification of I1PP2A, a novel potent heat-stable inhibitor protein of protein phosphatase 2A. *Biochemistry*, **35**, 6998-7002.
- Li, M., Makkinje, A. and Damuni, Z. (1996b) The myeloid leukemia-associated protein SET is a potent inhibitor of protein phosphatase 2A. *J Biol Chem*, **271**, 11059-11062.
- Li, X., Scuderi, A., Letsou, A. and Virshup, D.M. (2002) B56-associated protein phosphatase 2A is required for survival and protects from apoptosis in *Drosophila melanogaster*. *Mol Cell Biol*, **22**, 3674-3684.
- Lim, H.H. and Surana, U. (2003) Tome-1, wee1, and the onset of mitosis: coupled destruction for timely entry. *Mol Cell*, **11**, 845-846.
- Lim, J. and Ping Lu, K. (2005) Pinning down phosphorylated tau and tauopathies. *Biochim Biophys Acta*, **1739**, 311-322.
- Lin, X.H., Walter, J., Scheidtmann, K., Ohst, K., Newport, J. and Walter, G. (1998) Protein phosphatase 2A is required for the initiation of chromosomal DNA replication. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 14693-14698.
- Littlepage, L.E. and Ruderman, J.V. (2002) Identification of a new APC/C recognition domain, the A box, which is required for the Cdh1-dependent destruction of the kinase Aurora-A during mitotic exit. *Genes Dev*, **16**, 2274-2285.
- Littlepage, L.E., Wu, H., Andresson, T., Deanehan, J.K., Amundadottir, L.T. and Ruderman, J.V. (2002) Identification of phosphorylated residues that affect the activity of the mitotic kinase Aurora-A. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 15440-15445.
- Liu, F., Iqbal, K., Grundke-Iqbali, I., Rossie, S. and Gong, C.X. (2005) Dephosphorylation of tau by protein phosphatase 5: impairment in Alzheimer's disease. *J Biol Chem*, **280**, 1790-1796.
- MacCallum, D.E., Losada, A., Kobayashi, R. and Hirano, T. (2002) ISWI remodeling complexes in Xenopus egg extracts: identification as major chromosomal components that are regulated by INCENP-aurora B. *Mol Biol Cell*, **13**, 25-39.
- Madine, M.A., Swietlik, M., Pelizon, C., Romanowski, P., Mills, A.D. and Laskey, R.A. (2000) The roles of the MCM, ORC, and Cdc6 proteins in determining the replication competence of chromatin in quiescent cells. *J Struct Biol*, **129**, 198-210.
- Mahony, D., Parry, D.A. and Lees, E. (1998) Active cdk6 complexes are predominantly nuclear and represent only a minority of the cdk6 in T cells. *Oncogene*, **16**, 603-611.
- Margolis, S.S., Walsh, S., Weiser, D.C., Yoshida, M., Shenolikar, S. and Kornbluth, S. (2003) PP1 control of M phase entry exerted through 14-3-3-regulated Cdc25 dephosphorylation. *Embo J*, **22**, 5734-5745.

- Martin-Lluesma, S., Stucke, V.M. and Nigg, E.A. (2002) Role of Hec1 in spindle checkpoint signaling and kinetochore recruitment of Mad1/Mad2. *Science*, **297**, 2267-2270.
- Marumoto, T., Hirota, T., Morisaki, T., Kunitoku, N., Zhang, D., Ichikawa, Y., Sasayama, T., Kuninaka, S., Mimori, T., Tamaki, N., Kimura, M., Okano, Y. and Saya, H. (2002) Roles of aurora-A kinase in mitotic entry and G2 checkpoint in mammalian cells. *Genes Cells*, **7**, 1173-1182.
- Marumoto, T., Honda, S., Hara, T., Nitta, M., Hirota, T., Kohmura, E. and Saya, H. (2003) Aurora-A kinase maintains the fidelity of early and late mitotic events in HeLa cells. *J Biol Chem*, **278**, 51786-51795.
- Masai, H. and Arai, K. (2002) Cdc7 kinase complex: a key regulator in the initiation of DNA replication. *J Cell Physiol*, **190**, 287-296.
- Mayer, R.E., Hendrix, P., Cron, P., Matthies, R., Stone, S.R., Goris, J., Merlevede, W., Hofsteenge, J. and Hemmings, B.A. (1991) Structure of the 55-kDa regulatory subunit of protein phosphatase 2A: evidence for a neuronal-specific isoform. *Biochemistry*, **30**, 3589-3597.
- Mayor, T., Stierhof, Y.D., Tanaka, K., Fry, A.M. and Nigg, E.A. (2000) The centrosomal protein C-Nap1 is required for cell cycle-regulated centrosome cohesion. *J Cell Biol*, **151**, 837-846.
- McCright, B. and Virshup, D.M. (1995) Identification of a new family of protein phosphatase 2A regulatory subunits. *J Biol Chem*, **270**, 26123-26128.
- Meraldi, P., Honda, R. and Nigg, E.A. (2002) Aurora-A overexpression reveals tetraploidization as a major route to centrosome amplification in p53-/- cells. *Embo J*, **21**, 483-492.
- Meszaros, T., Miskolczi, P., Ayaydin, F., Pettko-Szandtner, A., Peres, A., Magyar, Z., Horvath, G.V., Bakó, L., Feher, A. and Dudits, D. (2000) Multiple cyclin-dependent kinase complexes and phosphatases control G2/M progression in alfalfa cells. *Plant Mol Biol*, **43**, 595-605.
- Meyerson, M. and Harlow, E. (1994) Identification of G1 kinase activity for cdk6, a novel cyclin D partner. *Mol Cell Biol*, **14**, 2077-2086.
- Minoshima, Y., Kawashima, T., Hirose, K., Tonozuka, Y., Kawajiri, A., Bao, Y.C., Deng, X., Tatsuka, M., Narumiya, S., May, W.S., Jr., Nosaka, T., Semba, K., Inoue, T., Satoh, T., Inagaki, M. and Kitamura, T. (2003) Phosphorylation by aurora B converts MgcRacGAP to a RhoGAP during cytokinesis. *Dev Cell*, **4**, 549-560.
- Minshull, J., Pines, J., Golsteyn, R., Standart, N., Mackie, S., Colman, A., Blow, J., Ruderman, J.V., Wu, M. and Hunt, T. (1989) The role of cyclin synthesis, modification and destruction in the control of cell division. *J Cell Sci Suppl*, **12**, 77-97.
- Miyoshi, Y., Iwao, K., Egawa, C. and Noguchi, S. (2001) Association of centrosomal kinase STK15/BTAK mRNA expression with chromosomal instability in human breast cancers. *Int J Cancer*, **92**, 370-373.
- Moreno, C.S., Lane, W.S. and Pallas, D.C. (2001) A mammalian homolog of yeast MOB1 is both a member and a putative substrate of striatin family-protein phosphatase 2A complexes. *J Biol Chem*, **276**, 24253-24260.
- Moreno, C.S., Park, S., Nelson, K., Ashby, D., Hubalek, F., Lane, W.S. and Pallas, D.C. (2000) WD40 repeat proteins striatin and S/G(2) nuclear autoantigen are members of a novel family of calmodulin-binding proteins that associate with protein phosphatase 2A. *J Biol Chem*, **275**, 5257-5263.
- Morgan, D.O., Fisher, R.P., Espinoza, F.H., Farrell, A., Nourse, J., Chamberlin, H. and Jin, P. (1998) Control of eukaryotic cell cycle progression by phosphorylation of cyclin-dependent kinases. *Cancer J Sci Am*, **4 Suppl 1**, S77-83.

- Nagase, T., Murakami, T., Nozaki, H., Inoue, R., Nishito, Y., Tanabe, O., Usui, H. and Takeda, M. (1997) Tissue and subcellular distributions, and characterization of rat brain protein phosphatase 2A containing a 72-kDa delta/B" subunit. *J Biochem (Tokyo)*, **122**, 178-187.
- Neef, R., Preisinger, C., Sutcliffe, J., Kopajtich, R., Nigg, E.A., Mayer, T.U. and Barr, F.A. (2003) Phosphorylation of mitotic kinesin-like protein 2 by polo-like kinase 1 is required for cytokinesis. *J Cell Biol*, **162**, 863-875.
- Neer, E.J., Schmidt, C.J., Nambudripad, R. and Smith, T.F. (1994) The ancient regulatory-protein family of WD-repeat proteins. *Nature*, **371**, 297-300.
- Nigg, E.A. (2001) Mitotic kinases as regulators of cell division and its checkpoints. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **2**, 21-32.
- Nilsson, I. and Hoffmann, I. (2000) Cell cycle regulation by the Cdc25 phosphatase family. *Prog Cell Cycle Res*, **4**, 107-114.
- Nishikawa, M., Omay, S.B., Toyoda, H., Tawara, I., Shima, H., Nagao, M., Hemmings, B.A., Mumby, M.C. and Deguchi, K. (1994) Expression of the catalytic and regulatory subunits of protein phosphatase type 2A may be differentially modulated during retinoic acid-induced granulocytic differentiation of HL-60 cells. *Cancer Res*, **54**, 4879-4884.
- Nishito, Y., Usui, H., Shinzawa-Itoh, K., Inoue, R., Tanabe, O., Nagase, T., Murakami, T. and Takeda, M. (1999a) Direct metal analyses of Mn²⁺-dependent and -independent protein phosphatase 2A from human erythrocytes detect zinc and iron only in the Mn²⁺-independent one. *FEBS Lett*, **447**, 29-33.
- Nishito, Y., Usui, H., Tanabe, O., Shimizu, M. and Takeda, M. (1999b) Interconversion of Mn(2+)-dependent and -independent protein phosphatase 2A from human erythrocytes: role of Zn(2+) and Fe(2+) in protein phosphatase 2A. *J Biochem (Tokyo)*, **126**, 632-638.
- Nowakowski, J., Cronin, C.N., McRee, D.E., Knuth, M.W., Nelson, C.G., Pavletich, N.P., Rogers, J., Sang, B.C., Scheibe, D.N., Swanson, R.V. and Thompson, D.A. (2002) Structures of the Cancer-Related Aurora-A, FAK, and EphA2 Protein Kinases from Nanovolume Crystallography. *Structure (Camb)*, **10**, 1659-1667.
- Ogris, E., Du, X., Nelson, K.C., Mak, E.K., Yu, X.X., Lane, W.S. and Pallas, D.C. (1999) A protein phosphatase methylesterase (PME-1) is one of several novel proteins stably associating with two inactive mutants of protein phosphatase 2A. *J Biol Chem*, **274**, 14382-14391.
- Ogris, E., Rotheneder, H., Mudrak, I., Pichler, A. and Wintersberger, E. (1993) A binding site for transcription factor E2F is a target for trans activation of murine thymidine kinase by polyomavirus large T antigen and plays an important role in growth regulation of the gene. *J Virol*, **67**, 1765-1771.
- Ohtani, K., DeGregori, J., Leone, G., Herendeen, D.R., Kelly, T.J. and Nevins, J.R. (1996) Expression of the HsOrc1 gene, a human ORC1 homolog, is regulated by cell proliferation via the E2F transcription factor. *Mol Cell Biol*, **16**, 6977-6984.
- Ohtani, K., Tsujimoto, A., Ikeda, M. and Nakamura, M. (1998) Regulation of cell growth-dependent expression of mammalian CDC6 gene by the cell cycle transcription factor E2F. *Oncogene*, **17**, 1777-1785.
- Okamoto, K., Kamibayashi, C., Serrano, M., Prives, C., Mumby, M.C. and Beach, D. (1996) p53-dependent association between cyclin G and the B' subunit of protein phosphatase 2A. *Mol Cell Biol*, **16**, 6593-6602.
- Olashaw, N. and Pledger, W.J. (2002) Paradigms of growth control: relation to Cdk activation. *Sci STKE*, **2002**, RE7.

- Osmani, S.A. and Ye, X.S. (1996) Cell cycle regulation in Aspergillus by two protein kinases. *Biochem J*, **317 (Pt 3)**, 633-641.
- Ouchi, M., Fujiuchi, N., Sasai, K., Katayama, H., Minamishima, Y.A., Ongusaha, P.P., Deng, C., Sen, S., Lee, S.W. and Ouchi, T. (2004) BRCA1 phosphorylation by Aurora-A in the regulation of G2 to M transition. *J Biol Chem*, **279**, 19643-19648.
- Page, A.M. and Hieter, P. (1997) The anaphase promoting complex. *Cancer Surv*, **29**, 133-150.
- Pallas, D.C., Shahrik, L.K., Martin, B.L., Jaspers, S., Miller, T.B., Brautigan, D.L. and Roberts, T.M. (1990) Polyoma small and middle T antigens and SV40 small t antigen form stable complexes with protein phosphatase 2A. *Cell*, **60**, 167-176.
- Pardee, A.B. (1974) A restriction point for control of normal animal cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **71**, 1286-1290.
- Paris, J. and Philippe, M. (1990) Poly(A) metabolism and polysomal recruitment of maternal mRNAs during early Xenopus development. *Dev Biol*, **140**, 221-224.
- Parry, D., Mahony, D., Wills, K. and Lees, E. (1999) Cyclin D-CDK subunit arrangement is dependent on the availability of competing INK4 and p21 class inhibitors. *Mol Cell Biol*, **19**, 1775-1783.
- Pavletich, N.P. (1999) Mechanisms of cyclin-dependent kinase regulation: structures of Cdks, their cyclin activators, and Cip and INK4 inhibitors. *J Mol Biol*, **287**, 821-828.
- Peters, J.M. (2002) The anaphase-promoting complex: proteolysis in mitosis and beyond. *Mol Cell*, **9**, 931-943.
- Pfleger, C.M. and Kirschner, M.W. (2000) The KEN box: an APC recognition signal distinct from the D box targeted by Cdh1. *Genes Dev*, **14**, 655-665.
- Picard, A., Capony, J.P., Brautigan, D.L. and Doree, M. (1989) Involvement of protein phosphatases 1 and 2A in the control of M phase-promoting factor activity in starfish. *J Cell Biol*, **109**, 3347-3354.
- Piel, M., Meyer, P., Khodjakov, A., Rieder, C.L. and Bornens, M. (2000) The respective contributions of the mother and daughter centrioles to centrosome activity and behavior in vertebrate cells. *J Cell Biol*, **149**, 317-330.
- Pines, J. (1993a) Cyclins and cyclin-dependent kinases: take your partners. *Trends Biochem Sci*, **18**, 195-197.
- Pines, J. (1993b) Cyclins and their associated cyclin-dependent kinases in the human cell cycle. *Biochem Soc Trans*, **21**, 921-925.
- Pines, J. (1994) The cell cycle kinases. *Semin Cancer Biol*, **5**, 305-313.
- Pines, J. (1998) Regulation of the G2 to M transition. *Results Probl Cell Differ*, **22**, 57-78.
- Pines, J. and Hunter, T. (1994) The differential localization of human cyclins A and B is due to a cytoplasmic retention signal in cyclin B. *Embo J*, **13**, 3772-3781.
- Pines, J. and Rieder, C.L. (2001) Re-staging mitosis: a contemporary view of mitotic progression. *Nat Cell Biol*, **3**, E3-6.
- Price, N.E. and Mumby, M.C. (2000) Effects of regulatory subunits on the kinetics of protein phosphatase 2A. *Biochemistry*, **39**, 11312-11318.
- Prinz, S., Hwang, E.S., Visintin, R. and Amon, A. (1998) The regulation of Cdc20 proteolysis reveals a role for APC components Cdc23 and Cdc27 during S phase and early mitosis. *Curr Biol*, **8**, 750-760.
- Qian, Y.W., Erikson, E., Taieb, F.E. and Maller, J.L. (2001) The polo-like kinase Plx1 is required for activation of the phosphatase Cdc25C and cyclin B-Cdc2 in Xenopus oocytes. *Mol Biol Cell*, **12**, 1791-1799.
- Quaroni, A., Wands, J., Trelstad, R.L. and Isselbacher, K.J. (1979) Epithelioid cell cultures from rat small intestine. Characterization by morphologic and immunologic criteria. *J Cell Biol*, **80**, 248-265.

- Rape, M. and Kirschner, M.W. (2004) Autonomous regulation of the anaphase-promoting complex couples mitosis to S-phase entry. *Nature*, **432**, 588-595.
- Ren, S. and Rollins, B.J. (2004) Cyclin C/cdk3 promotes Rb-dependent G0 exit. *Cell*, **117**, 239-251.
- Roegiers, F. and Jan, Y.N. (2004) Asymmetric cell division. *Curr Opin Cell Biol*, **16**, 195-205.
- Roghi, C., Giet, R., Uzbekov, R., Morin, N., Chartrain, I., Le Guellec, R., Couturier, A., Doree, M., Philippe, M. and Prigent, C. (1998) The Xenopus protein kinase pEg2 associates with the centrosome in a cell cycle-dependent manner, binds to the spindle microtubules and is involved in bipolar mitotic spindle assembly. *J Cell Sci*, **111** (Pt 5), 557-572.
- Rosenblatt, J., Gu, Y. and Morgan, D.O. (1992) Human cyclin-dependent kinase 2 is activated during the S and G2 phases of the cell cycle and associates with cyclin A. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **89**, 2824-2828.
- Roshak, A.K., Capper, E.A., Imburgia, C., Fornwald, J., Scott, G. and Marshall, L.A. (2000) The human polo-like kinase, PLK, regulates cdc2/cyclin B through phosphorylation and activation of the cdc25C phosphatase. *Cell Signal*, **12**, 405-411.
- Ruediger, R., Hentz, M., Fait, J., Mumby, M. and Walter, G. (1994) Molecular model of the A subunit of protein phosphatase 2A: interaction with other subunits and tumor antigens. *J Virol*, **68**, 123-129.
- Ruediger, R., Roeckel, D., Fait, J., Bergqvist, A., Magnusson, G. and Walter, G. (1992) Identification of binding sites on the regulatory A subunit of protein phosphatase 2A for the catalytic C subunit and for tumor antigens of simian virus 40 and polyomavirus. *Mol Cell Biol*, **12**, 4872-4882.
- Russo, A.A., Jeffrey, P.D., Patten, A.K., Massague, J. and Pavletich, N.P. (1996) Crystal structure of the p27Kip1 cyclin-dependent-kinase inhibitor bound to the cyclin A-Cdk2 complex. *Nature*, **382**, 325-331.
- Sasai, K., Katayama, H., Stenøien, D.L., Fujii, S., Honda, R., Kimura, M., Okano, Y., Tatsuka, M., Suzuki, F., Nigg, E.A., Earnshaw, W.C., Brinkley, W.R. and Sen, S. (2004) Aurora-C kinase is a novel chromosomal passenger protein that can complement Aurora-B kinase function in mitotic cells. *Cell Motil Cytoskeleton*, **59**, 249-263.
- Satinover, D.L., Leach, C.A., Stukenberg, P.T. and Brautigan, D.L. (2004) Activation of Aurora-A kinase by protein phosphatase inhibitor-2, a bifunctional signaling protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 8625-8630.
- Schena, F.P. and Abbattista, M.R. (2003) Stem cells: reparative medicine and nephrology. *J Nephrol*, **16 Suppl 7**, S1-5.
- Schultz, S.J., Fry, A.M., Sutterlin, C., Ried, T. and Nigg, E.A. (1994) Cell cycle-dependent expression of Nek2, a novel human protein kinase related to the NIMA mitotic regulator of *Aspergillus nidulans*. *Cell Growth Differ*, **5**, 625-635.
- Schultz, S.J. and Nigg, E.A. (1993) Identification of 21 novel human protein kinases, including 3 members of a family related to the cell cycle regulator nimA of *Aspergillus nidulans*. *Cell Growth Differ*, **4**, 821-830.
- Scrittori, L., Skoufias, D.A., Hans, F., Gerson, V., Sassone-Corsi, P., Dimitrov, S. and Margolis, R.L. (2005) A small C-terminal sequence of aurora B is responsible for localization and function. *Mol Biol Cell*, **16**, 292-305.
- Seeling, J.M., Miller, J.R., Gil, R., Moon, R.T., White, R. and Virshup, D.M. (1999) Regulation of beta-catenin signaling by the B56 subunit of protein phosphatase 2A. *Science*, **283**, 2089-2091.

- Sen, S., Zhou, H. and White, R.A. (1997) A putative serine/threonine kinase encoding gene BTAK on chromosome 20q13 is amplified and overexpressed in human breast cancer cell lines. *Oncogene*, **14**, 2195-2200.
- Sen, S., Zhou, H., Zhang, R.D., Yoon, D.S., Vakar-Lopez, F., Ito, S., Jiang, F., Johnston, D., Grossman, H.B., Ruifrok, A.C., Katz, R.L., Brinkley, W. and Czerniak, B. (2002) Amplification/overexpression of a mitotic kinase gene in human bladder cancer. *J Natl Cancer Inst*, **94**, 1320-1329.
- Serrano, M., Hannon, G.J. and Beach, D. (1993) A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. *Nature*, **366**, 704-707.
- Seto, M., Yamamoto, K., Iida, S., Akao, Y., Utsumi, K.R., Kubonishi, I., Miyoshi, I., Ohtsuki, T., Yawata, Y. and Namba, M. (1992) Gene rearrangement and overexpression of PRAD1 in lymphoid malignancy with t(11;14)(q13;q32) translocation. *Oncogene*, **7**, 1401-1406.
- Sheaff, R.J., Groudine, M., Gordon, M., Roberts, J.M. and Clurman, B.E. (1997) Cyclin E-CDK2 is a regulator of p27Kip1. *Genes Dev*, **11**, 1464-1478.
- Shenolikar, S. (1994) Protein serine/threonine phosphatases--new avenues for cell regulation. *Annu Rev Cell Biol*, **10**, 55-86.
- Sherr, C.J. (1994a) G1 phase progression: cycling on cue. *Cell*, **79**, 551-555.
- Sherr, C.J. (1994b) The ins and outs of RB: coupling gene expression to the cell cycle clock. *Trends Cell Biol*, **4**, 15-18.
- Sherr, C.J. and Roberts, J.M. (1999) CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev*, **13**, 1501-1512.
- Smits, V.A., Klompmaker, R., Arnaud, L., Rijksen, G., Nigg, E.A. and Medema, R.H. (2000) Polo-like kinase-1 is a target of the DNA damage checkpoint. *Nat Cell Biol*, **2**, 672-676.
- Snaith, H.A., Armstrong, C.G., Guo, Y., Kaiser, K. and Cohen, P.T. (1996) Deficiency of protein phosphatase 2A uncouples the nuclear and centrosome cycles and prevents attachment of microtubules to the kinetochore in Drosophila microtubule star (mts) embryos. *J Cell Sci*, **109** (Pt 13), 3001-3012.
- Sontag, E., Hladik, C., Montgomery, L., Luangpirom, A., Mudrak, I., Ogris, E. and White, C.L., 3rd. (2004a) Downregulation of protein phosphatase 2A carboxyl methylation and methyltransferase may contribute to Alzheimer disease pathogenesis. *J Neuropathol Exp Neurol*, **63**, 1080-1091.
- Sontag, E., Luangpirom, A., Hladik, C., Mudrak, I., Ogris, E., Speciale, S. and White, C.L., 3rd. (2004b) Altered expression levels of the protein phosphatase 2A ABalphaC enzyme are associated with Alzheimer disease pathology. *J Neuropathol Exp Neurol*, **63**, 287-301.
- Sontag, E., Sontag, J.M. and Garcia, A. (1997) Protein phosphatase 2A is a critical regulator of protein kinase C zeta signaling targeted by SV40 small t to promote cell growth and NF-kappaB activation. *Embo J*, **16**, 5662-5671.
- Srinivasan, M. and Begum, N. (1994) Regulation of protein phosphatase 1 and 2A activities by insulin during myogenesis in rat skeletal muscle cells in culture. *J Biol Chem*, **269**, 12514-12520.
- Stepanova, L., Leng, X., Parker, S.B. and Harper, J.W. (1996) Mammalian p50Cdc37 is a protein kinase-targeting subunit of Hsp90 that binds and stabilizes Cdk4. *Genes Dev*, **10**, 1491-1502.
- Stevens, C. and La Thangue, N.B. (2003) E2F and cell cycle control: a double-edged sword. *Arch Biochem Biophys*, **412**, 157-169.

- Stone, S.R., Hofsteenge, J. and Hemmings, B.A. (1987) Molecular cloning of cDNAs encoding two isoforms of the catalytic subunit of protein phosphatase 2A. *Biochemistry*, **26**, 7215-7220.
- Strack, S., Chang, D., Zaucha, J.A., Colbran, R.J. and Wadzinski, B.E. (1999) Cloning and characterization of B delta, a novel regulatory subunit of protein phosphatase 2A. *FEBS Lett*, **460**, 462-466.
- Strack, S., Cribbs, J.T. and Gomez, L. (2004) Critical role for protein phosphatase 2A heterotrimers in mammalian cell survival. *J Biol Chem*, **279**, 47732-47739.
- Strack, S., Zaucha, J.A., Ebner, F.F., Colbran, R.J. and Wadzinski, B.E. (1998) Brain protein phosphatase 2A: developmental regulation and distinct cellular and subcellular localization by B subunits. *J Comp Neurol*, **392**, 515-527.
- Strobeck, M.W., Fribourg, A.F., Puga, A. and Knudsen, E.S. (2000) Restoration of retinoblastoma mediated signaling to Cdk2 results in cell cycle arrest. *Oncogene*, **19**, 1857-1867.
- Sudakin, V., Ganoth, D., Dahan, A., Heller, H., Hershko, J., Luca, F.C., Ruderman, J.V. and Hershko, A. (1995) The cycosome, a large complex containing cyclin-selective ubiquitin ligase activity, targets cyclins for destruction at the end of mitosis. *Mol Biol Cell*, **6**, 185-197.
- Sugimoto, K., Urano, T., Zushi, H., Inoue, K., Tasaka, H., Tachibana, M. and Dotsu, M. (2002) Molecular dynamics of aurora-a kinase in living mitotic cells simultaneously visualized with histone h3 and nuclear membrane protein importinalpha. *Cell Struct Funct*, **27**, 457-467.
- Sugiyama, K., Sugiura, K., Hara, T., Sugimoto, K., Shima, H., Honda, K., Furukawa, K., Yamashita, S. and Urano, T. (2002) Aurora-B associated protein phosphatases as negative regulators of kinase activation. *Oncogene*, **21**, 3103-3111.
- Sunkel, C.E. and Glover, D.M. (1988) polo, a mitotic mutant of Drosophila displaying abnormal spindle poles. *J Cell Sci*, **89 (Pt 1)**, 25-38.
- Takai, A. and Mieskes, G. (1991) Inhibitory effect of okadaic acid on the p-nitrophenyl phosphate phosphatase activity of protein phosphatases. *Biochem J*, **275 (Pt 1)**, 233-239.
- Takai, A., Murata, M., Torigoe, K., Isobe, M., Mieskes, G. and Yasumoto, T. (1992) Inhibitory effect of okadaic acid derivatives on protein phosphatases. A study on structure-affinity relationship. *Biochem J*, **284 (Pt 2)**, 539-544.
- Tanaka, K. and Nigg, E.A. (1999) Cloning and characterization of the murine Nek3 protein kinase, a novel member of the NIMA family of putative cell cycle regulators. *J Biol Chem*, **274**, 13491-13497.
- Tanaka, M., Ueda, A., Kanamori, H., Ideguchi, H., Yang, J., Kitajima, S. and Ishigatubo, Y. (2002) Cell-cycle-dependent regulation of human aurora A transcription is mediated by periodic repression of E4TF1. *J Biol Chem*, **277**, 10719-10726.
- Tanaka, T., Kimura, M., Matsunaga, K., Fukada, D., Mori, H. and Okano, Y. (1999) Centrosomal kinase AIK1 is overexpressed in invasive ductal carcinoma of the breast. *Cancer Res*, **59**, 2041-2044.
- Tawara, I., Nishikawa, M., Morita, K., Kobayashi, K., Toyoda, H., Omay, S.B., Shima, H., Nagao, M., Kuno, T., Tanaka, C. and et al. (1993) Down-regulation by retinoic acid of the catalytic subunit of protein phosphatase type 2A during granulocytic differentiation of HL-60 cells. *FEBS Lett*, **321**, 224-228.
- Taylor, W.R. and Stark, G.R. (2001) Regulation of the G2/M transition by p53. *Oncogene*, **20**, 1803-1815.

- Tehrani, M.A., Mumby, M.C. and Kamibayashi, C. (1996) Identification of a novel protein phosphatase 2A regulatory subunit highly expressed in muscle. *J Biol Chem*, **271**, 5164-5170.
- Terada, Y., Tatsuka, M., Suzuki, F., Yasuda, Y., Fujita, S. and Otsu, M. (1998) AIM-1: a mammalian midbody-associated protein required for cytokinesis. *Embo J*, **17**, 667-676.
- Terada, Y., Uetake, Y. and Kuriyama, R. (2003) Interaction of Aurora-A and centrosomin at the microtubule-nucleating site in Drosophila and mammalian cells. *J Cell Biol*, **162**, 757-763.
- Terry-Lorenzo, R.T., Elliot, E., Weiser, D.C., Prickett, T.D., Brautigan, D.L. and Shenolikar, S. (2002) Neurabins recruit protein phosphatase-1 and inhibitor-2 to the actin cytoskeleton. *J Biol Chem*, **277**, 46535-46543.
- Tibbetts, R.S., Cortez, D., Brumbaugh, K.M., Scully, R., Livingston, D., Elledge, S.J. and Abraham, R.T. (2000) Functional interactions between BRCA1 and the checkpoint kinase ATR during genotoxic stress. *Genes Dev*, **14**, 2989-3002.
- Tong, C., Fan, H.Y. and Li, M.Y. (2002) [Roles of polo like kinases (plks) in cell division]. *Sheng Li Ke Xue Jin Zhan*, **33**, 45-47.
- Tournebize, R., Andersen, S.S., Verde, F., Doree, M., Karsenti, E. and Hyman, A.A. (1997) Distinct roles of PP1 and PP2A-like phosphatases in control of microtubule dynamics during mitosis. *Embo J*, **16**, 5537-5549.
- Toyoshima-Morimoto, F., Taniguchi, E. and Nishida, E. (2002) Plk1 promotes nuclear translocation of human Cdc25C during prophase. *EMBO Rep*, **3**, 341-348.
- Trieselmann, N., Armstrong, S., Rauw, J. and Wilde, A. (2003) Ran modulates spindle assembly by regulating a subset of TPX2 and Kid activities including Aurora A activation. *J Cell Sci*, **116**, 4791-4798.
- Tsai, M.Y., Wiese, C., Cao, K., Martin, O., Donovan, P., Ruderman, J., Prigent, C. and Zheng, Y. (2003) A Ran signalling pathway mediated by the mitotic kinase Aurora A in spindle assembly. *Nat Cell Biol*, **5**, 242-248.
- Tsuruga, H., Yabuta, N., Hashizume, K., Ikeda, M., Endo, Y. and Nojima, H. (1997) Expression, nuclear localization and interactions of human MCM/P1 proteins. *Biochem Biophys Res Commun*, **236**, 118-125.
- Tung, H.Y., De Rocquigny, H., Zhao, L.J., Cayla, X., Roques, B.P. and Ozon, R. (1997) Direct activation of protein phosphatase-2A0 by HIV-1 encoded protein complex NCp7:vpr. *FEBS Lett*, **401**, 197-201.
- Turowski, P., Favre, B., Campbell, K.S., Lamb, N.J. and Hemmings, B.A. (1997) Modulation of the enzymatic properties of protein phosphatase 2A catalytic subunit by the recombinant 65-kDa regulatory subunit PR65alpha. *Eur J Biochem*, **248**, 200-208.
- Uemura, T., Shiomi, K., Togashi, S. and Takeichi, M. (1993) Mutation of twins encoding a regulator of protein phosphatase 2A leads to pattern duplication in Drosophila imaginal discs. *Genes Dev*, **7**, 429-440.
- Vigo, E., Muller, H., Prosperini, E., Hateboer, G., Cartwright, P., Moroni, M.C. and Helin, K. (1999) CDC25A phosphatase is a target of E2F and is required for efficient E2F-induced S phase. *Mol Cell Biol*, **19**, 6379-6395.
- Vodermaier, H.C. (2004) APC/C and SCF: controlling each other and the cell cycle. *Curr Biol*, **14**, R787-796.
- Voorhoeve, P.M., Hijmans, E.M. and Bernards, R. (1999) Functional interaction between a novel protein phosphatase 2A regulatory subunit, PR59, and the retinoblastoma-related p107 protein. *Oncogene*, **18**, 515-524.

- Wadzinski, B.E., Eisfelder, B.J., Peruski, L.F., Jr., Mumby, M.C. and Johnson, G.L. (1992) NH₂-terminal modification of the phosphatase 2A catalytic subunit allows functional expression in mammalian cells. *J Biol Chem*, **267**, 16883-16888.
- Walsh, S., Margolis, S.S. and Kornbluth, S. (2003) Phosphorylation of the cyclin b1 cytoplasmic retention sequence by mitogen-activated protein kinase and Plx. *Mol Cancer Res*, **1**, 280-289.
- Walter, A.O., Seghezzi, W., Korver, W., Sheung, J. and Lees, E. (2000) The mitotic serine/threonine kinase Aurora2/AIK is regulated by phosphorylation and degradation. *Oncogene*, **19**, 4906-4916.
- Wang, H. and Brautigan, D.L. (2002) A novel transmembrane Ser/Thr kinase complexes with protein phosphatase-1 and inhibitor-2. *J Biol Chem*, **277**, 49605-49612.
- Wang, Y. and Burke, D.J. (1997) Cdc55p, the B-type regulatory subunit of protein phosphatase 2A, has multiple functions in mitosis and is required for the kinetochore/spindle checkpoint in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*, **17**, 620-626.
- Wanzel, M., Herold, S. and Eilers, M. (2003) Transcriptional repression by Myc. *Trends Cell Biol*, **13**, 146-150.
- Warnke, S., Kemmler, S., Hames, R.S., Tsai, H.L., Hoffmann-Rohrer, U., Fry, A.M. and Hoffmann, I. (2004) Polo-like kinase-2 is required for centriole duplication in mammalian cells. *Curr Biol*, **14**, 1200-1207.
- Wei, H., Ashby, D.G., Moreno, C.S., Ogris, E., Yeong, F.M., Corbett, A.H. and Pallas, D.C. (2001) Carboxymethylation of the PP2A catalytic subunit in *Saccharomyces cerevisiae* is required for efficient interaction with the B-type subunits Cdc55p and Rts1p. *J Biol Chem*, **276**, 1570-1577.
- Wei, Y., Yu, L., Bowen, J., Gorovsky, M.A. and Allis, C.D. (1999) Phosphorylation of histone H3 is required for proper chromosome condensation and segregation. *Cell*, **97**, 99-109.
- Wells, N.J., Watanabe, N., Tokusumi, T., Jiang, W., Verdecia, M.A. and Hunter, T. (1999) 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*, **112** (Pt 19), 3361-3371.
- Wera, S. and Hemmings, B.A. (1995) Serine/threonine protein phosphatases. *Biochem J*, **311** (Pt 1), 17-29.
- Whitehead, C.M. and Rattner, J.B. (1998) Expanding the role of HsEg5 within the mitotic and post-mitotic phases of the cell cycle. *J Cell Sci*, **111** (Pt 17), 2551-2561.
- Whitehead, C.M., Winkfein, R.J. and Rattner, J.B. (1996) The relationship of HsEg5 and the actin cytoskeleton to centrosome separation. *Cell Motil Cytoskeleton*, **35**, 298-308.
- Wilborn, M., Free, S., Ban, A. and Rudolph, J. (2001) The C-terminal tail of the dual-specificity Cdc25B phosphatase mediates modular substrate recognition. *Biochemistry*, **40**, 14200-14206.
- Wilson, N.J., Moss, S.T., Csar, X.F., Ward, A.C. and Hamilton, J.A. (1999) Protein phosphatase 2A is expressed in response to colony-stimulating factor 1 in macrophages and is required for cell cycle progression independently of extracellular signal-regulated protein kinase activity. *Biochem J*, **339** (Pt 3), 517-524.
- Won, K.A. and Reed, S.I. (1996) Activation of cyclin E/CDK2 is coupled to site-specific autophosphorylation and ubiquitin-dependent degradation of cyclin E. *Embo J*, **15**, 4182-4193.
- Wood, S.R., Zhao, Q., Smith, L.H. and Daniels, C.K. (2003) Altered morphology in cultured rat intestinal epithelial IEC-6 cells is associated with alkaline phosphatase expression. *Tissue Cell*, **35**, 47-58.

- Xie, H. and Clarke, S. (1994) Protein phosphatase 2A is reversibly modified by methyl esterification at its C-terminal leucine residue in bovine brain. *J Biol Chem*, **269**, 1981-1984.
- Xu, Z. and Williams, B.R. (2000) The B56alpha regulatory subunit of protein phosphatase 2A is a target for regulation by double-stranded RNA-dependent protein kinase PKR. *Mol Cell Biol*, **20**, 5285-5299.
- Yan, Z., Fedorov, S.A., Mumby, M.C. and Williams, R.S. (2000) PR48, a novel regulatory subunit of protein phosphatase 2A, interacts with Cdc6 and modulates DNA replication in human cells. *Mol Cell Biol*, **20**, 1021-1029.
- Yang, S.I., Lickteig, R.L., Estes, R., Rundell, K., Walter, G. and Mumby, M.C. (1991) Control of protein phosphatase 2A by simian virus 40 small-t antigen. *Mol Cell Biol*, **11**, 1988-1995.
- Yeong, F.M., Hombauer, H., Wendt, K.S., Hirota, T., Mudrak, I., Mechtler, K., Loregger, T., Marchler-Bauer, A., Tanaka, K., Peters, J.M. and Ogris, E. (2003) Identification of a subunit of a novel Kleisin-beta/SMC complex as a potential substrate of protein phosphatase 2A. *Curr Biol*, **13**, 2058-2064.
- Yin, M.J., Shao, L., Voehringer, D., Smeal, T. and Jallal, B. (2003) The serine/threonine kinase Nek6 is required for cell cycle progression through mitosis. *J Biol Chem*, **278**, 52454-52460.
- Yu, X.X., Du, X., Moreno, C.S., Green, R.E., Ogris, E., Feng, Q., Chou, L., McQuoid, M.J. and Pallas, D.C. (2001) Methylation of the protein phosphatase 2A catalytic subunit is essential for association of Balpha regulatory subunit but not SG2NA, striatin, or polyomavirus middle tumor antigen. *Mol Biol Cell*, **12**, 185-199.
- Yuan, J., Eckerdt, F., Bereiter-Hahn, J., Kurunci-Csacsko, E., Kaufmann, M. and Strebhardt, K. (2002) Cooperative phosphorylation including the activity of polo-like kinase 1 regulates the subcellular localization of cyclin B1. *Oncogene*, **21**, 8282-8292.
- Zavitz, K.H. and Zipursky, S.L. (1997) Controlling cell proliferation in differentiating tissues: genetic analysis of negative regulators of G1-->S-phase progression. *Curr Opin Cell Biol*, **9**, 773-781.
- Zetterberg, A., Larsson, O. and Wiman, K.G. (1995) What is the restriction point? *Curr Opin Cell Biol*, **7**, 835-842.
- Zhang, Z., Zhao, S., Long, F., Zhang, L., Bai, G., Shima, H., Nagao, M. and Lee, E.Y. (1994) A mutant of protein phosphatase-1 that exhibits altered toxin sensitivity. *J Biol Chem*, **269**, 16997-17000.
- Zheng, L., Chen, Y. and Lee, W.H. (1999) Hec1p, an evolutionarily conserved coiled-coil protein, modulates chromosome segregation through interaction with SMC proteins. *Mol Cell Biol*, **19**, 5417-5428.
- Zhou, H., Kuang, J., Zhong, L., Kuo, W.L., Gray, J.W., Sahin, A., Brinkley, B.R. and Sen, S. (1998) Tumour amplified kinase STK15/BTAK induces centrosome amplification, aneuploidy and transformation. *Nat Genet*, **20**, 189-193.
- Zhou, J., Pham, H.T., Ruediger, R. and Walter, G. (2003) Characterization of the Aalpha and Abeta subunit isoforms of protein phosphatase 2A: differences in expression, subunit interaction, and evolution. *Biochem J*, **369**, 387-398.
- Zhu, T., Matsuzawa, S., Mizuno, Y., Kamabayashi, C., Mumby, M.C., Andjelkovic, N., Hemmings, B.A., Onoe, K. and Kikuchi, K. (1997) The interconversion of protein phosphatase 2A between PP2A1 and PP2A0 during retinoic acid-induced granulocytic differentiation and a modification on the catalytic subunit in S phase of HL-60 cells. *Arch Biochem Biophys*, **339**, 210-217.
- Zolnierowicz, S. (2000) Type 2A protein phosphatase, the complex regulator of numerous signaling pathways. *Biochem Pharmacol*, **60**, 1225-1235.

- Zolnierowicz, S., Csortos, C., Bondor, J., Verin, A., Mumby, M.C. and DePaoli-Roach, A.A. (1994) Diversity in the regulatory B-subunits of protein phosphatase 2A: identification of a novel isoform highly expressed in brain. *Biochemistry*, **33**, 11858-11867.
- Zolnierowicz, S., Van Hoof, C., Andjelkovic, N., Cron, P., Stevens, I., Merlevede, W., Goris, J. and Hemmings, B.A. (1996) The variable subunit associated with protein phosphatase 2A0 defines a novel multimember family of regulatory subunits. *Biochem J*, **317 (Pt 1)**, 187-194.