THESE DE DOCTORAT DE
L'UNIVERSITE MONTPELLIER II
SCIENCES ET TECHNIQUES DU LANGUEDOC

Spécialité :
Biologie Cellulaire et Moléculaire, Biochimie

Ecole Doctorale :
Sciences Chimiques et Biologiques pour la Santé

Présentée par

ESTELLE BRIOUDES

Pour obtenir le grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE MONTPELLIER II

Sujet de thèse :

RSK2 ET GREATWALL, DEUX AGC KINASES ACTRICES DE LA MITOSE

Soutenue le jeudi 25 novembre 2010

Devant le jury composé de :

Pr. Christian Le Peuch	Président de Jury
Dr. Olivier Haccard	rapporteur
Dr. Jacek Kubiak	rapporteur
Dr.Katja Wassmann	examinateur
Dr. Thierry Lorca	examinateur
Dr. Anna Castro	Directeur de thèse

A tata Lulu

« Le commencement de toutes les Sciences, c'est l'étonnement de ce que les choses sont ce qu'elles sont »

Aristote

« Dans la vie, rien est à craindre, tout est à comprendre »

Marie Curie

« Il est des moments où il faut choisir entre vivre sa propre vie pleinement, entièrement, complètement, ou traîner l'existence dégradante, creuse et fausse que le monde, dans son hypocrisie, nous impose. »

Oscar Wilde

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier le Pr Paul Mangeat de m'avoir accueilli dans son laboratoire pour réaliser ce travail de thèse.

Un grand Merci à la Ligue Contre le Cancer qui m'a financée pendant ces 3 années et permis de réaliser cette thèse.

Je remercie chaleureusement le Pr Christian Le Peuch d'avoir accepté de présider mon jury de thèse.

Je tiens exprimer ma profonde gratitude aux Dr Olivier Haccard et Jacek Kubiak pour m'avoir fait l'honneur de rapporter mon travail de thèse, le Dr Katja Wassmann pour avoir accepté de l'examiner.

Je remercie très chaleureusement les Dr Anna Castro et Thierry Lorca pour avoir dirigé mon travail de thèse et pour le temps qu'ils m'ont consacrée. Merci pour votre encadrement scientifique et votre confiance, et de m'avoir laissé beaucoup d'autonomie qui m'ont permis de m'épanouir scientifiquement. Merci Thierry pour tes histoires drôles et anecdotes que je n'ai pas toujours, voir jamais comprises mais qui égaie le quotidien. Merci Anna pour ces longues heures passées avec moi au microscope et à la correction de ce manuscrit.

Je remercie Suzanne et Coco pour leurs connaissances scientifiques et techniques. Merci Suzanne de m'avoir initié à la biologie moléculaire et merci Coco pour ton sens critique.

Andrew, the king of the cell culture! Thank you for the precious advices and the corrections in English.

Aicha, le sourire de l'équipe, j'ai été contente que tu arrives dans l'équipe qui manquait d'étudiant à mon sens. Merci pour ta gentillesse, tes petites attentions pendant les moments de stress et tes encouragements. Je tiens également à te féliciter également pour ton travail, et je suis sure que maintenant tu ne regrettes pas ton choix !

Merci à tout le CRBM, pour avoir fait que ces années de travail se soient déroulées dans les meilleures conditions.

Merci aux deux Martine, à Monique et Mickael pour leur aide administrative.

Merci à tous les chercheurs avec qui j'ai eu de nombreuses discussions constructives au détour d'un couloir, au tour d'un pot ou d'un colloque. Ainsi je remercie, Didier, Jérôme, Nathalie, Véronique.

Je tiens à remercier les joyeux étudiants du CRBM avec lesquels j'ai partagé les pots du vendredi soir, qui se font trop rares d'ailleurs. Julien, Yann et Cyril, merci pour votre humeur particulière (je ne suis pas sure que merci soit le bon mot !). Merci à Sihem et Mathy pour votre gentillesse. Merci à Cédric, Cécile, Heiani pour les bons moments en culture cellulaire. Merci Ben de m'avoir accompagnée dans l'expérience du semi-marathon. Un grand merci à mes trois copines Pauline, Linda et Lili qui ont toujours été là dans les bons et surtout les mauvais moments et il y en a eu ! Merci pour toutes ces soirées nocturnes sous les miccos à refaire le monde, merci pour mon magnifique chapeau des catherinettes, pour toutes ces séances de sport et tous ces bons moments partagés !! Vous me manquerez ! (Linda c'est déjà fait !). Une petite mention spéciale à toi Lili surtout pour cette dernière année, merci pour les discussions footing, les encouragements et tous ces bons moments.

Un grand merci aussi à Olivier, tu m'as initié à la culture cellulaire, supporté mes manips farfelues (le fameux transfert !) lors de mon master. Merci pour ton écoute ces trois dernières années (oui oui, tu crois que je me rends pas compte qu'il n'y a que moi qui parle !), merci d'avoir été là quand j'ai eu besoin de toi ! Merci pour la relecture de mon manuscrit malgré ton effroyable emploi du temps.

Merci Isa, malgré la distance tu es toujours là pour prendre des nouvelles et pour m'encourager.

Je voudrais également remercier ma Steph, qui malgré les kilomètres qui nous séparent a toujours été là. Merci Steph pour ces week-ends lyonnais, ton écoute dans mes moments de déprimes et pour tes petits mails d'information qui a chaque fois me font mourir de rire.

Je voudrais aussi remercier les copains parisiens et nasbinalais : Régis, Gérald (merci pour ton Paris by night !), Richard, Damien, Romain, Juju (bientôt papa, je suis vraiment ravie pour toi ! tant de changement en si peu de temps), Amandine, lolo (merci pour tes mots justes quand j'en ai eu besoin), laure B (malgré quelques différents, je n'oublie pas les bon moments qui me paraissent si loin maintenant), Jean-Pierre (pour tout mais surtout malgré tout). Un merci spécial à Laure pour cette dernière année !!

Merci aux Montpelliérains adeptes du VA et du Carolan's : Charlotte (merci pour tous ces bons moments), Jeanette, Stéphane, De Ridder, Sasha, et à notre parisien et montpelliérain occasionnel Thomas (merci pour ta fraîcheur et ta joie de vivre).

Un merci tout spécial pour Mr Orange ou Mr l'ingénieur informatique pour ces 9 derniers mois. Je t'en ai fait voir des vertes et des pas mûres et je m'en excuse. Merci d'être toujours là, merci pour ton aide en informatique (et j'en ai eu besoin !), pour tes corrections orthographiques, pour ton soutien parfois maladroit, ta confiance en moi et tous ces bons moments partagés (Sunday night tranquillou). Encore merci Pascal.

Merci à Carole, 20 ans que nous sommes amies et malgré la distance et les appels téléphoniques qui se font parfois rares par manque de temps. Merci pour ton soutien et ton amitié pendant toutes ces années et merci d'être venue, ça me fait vraiment plaisir !

Un énorme merci à Vinciane, ma petite sœur toujours là malgré la distance. Là on dit merci le téléphone et les forfaits illimités ! Merci pour tout, je t'aime sœurette !!

Merci à ma grand-mère et mes grands-parents qui ont toujours été là.

Merci à tonton et Marie-Christine pour le déplacement, ça fait plaisir. J'en profite pour remercie aussi Patricia.

Enfin, merci papa et maman, merci de m'avoir fait confiance et de m'avoir laissée faire mes choix, j'espère que le résultat ne vous déçoit pas. Merci d'avoir écouté mes coups de blues et mes moments de joie un peu hystérique. Je compte sur vous pour mettre le feu à ma soirée de thèse.

Et merci à tous ceux que j'ai oubliés et qui m'ont aidé à un moment ou un autre…

RESUME

La mitose est une phase importante du cycle cellulaire. Les mécanismes de surveillance s'assurent de l'ordre et de l'exécution correcte des événements du cycle cellulaire dont les erreurs peuvent conduire à l'aneuploïdie. Pendant la mitose, la séparation des chromatides sœurs est régulée par le point de contrôle du fuseau mitotique qui s'assure que tous les chromosomes sont correctement alignés sur la plaque métaphasique. L'entrée et la sortie de mitose sont régulées par l'activation et l'inactivation de cycline B/Cdk1. Cette fine régulation fait intervenir de nombreuses kinases et phosphatases. Dans ce projet nous nous sommes intéressés plus particulièrement à deux AGC kinases : RSK2 et Greatwall (Gwl).

Dans cette étude nous nous sommes proposés d'analyser l'implication de RSK2, substrat majeur de la MAPK, dans le point de contrôle du fuseau mitotique. Nos résultats montrent que RSK2 est essentielle pour l'activité du point de contrôle du fuseau mitotique dans les extraits d'œufs de xénope ainsi que pour la localisation des autres protéines du point de contrôle localisées aux kinétochores. Nous montrons également que RSK2 participe au point de contrôle dans les cellules humaines. En effet, RSK2 est nécessaire à la localisation aux kinétochores de Mad1, Mad2 et Cenp-E, protéines essentielles à l'activité de ce checkpoint.

L'entrée et la sortie de mitose sont régulées par complexe cycline B/Cdk1 et des phosphatases. Gwl est une nouvelle kinase essentielle à l'entrée en mitose et au maintient de l'état mitotique dans les extraits d'œufs de xénope. En effet, nos résultats montrent que Gwl maintient l'état mitotique de manière indépendante du complexe cycline B/Cdk1, mais par la régulation négative de PP2A, phosphatase responsable des déphoshorylations des substrats mitotiques.

ABSTRACT

Mitosis is an important phase of cell cycle. Besides, basic mechanisms inducing mitotic entry and exit, the Spindle Assembly Checkpoint (SAC) is also required for a correct separation of sister chromatids. This checkpoint verifies the orders and the events to ensure the correct execution of the cell cycle, as errors may lead to aneuploidy. Entry and Exit of mitosis are regulated by the balance between cyclin B/Cdk1 and phosphatase PP2A. In this project, we are particularly focused on two AGC kinases: RSK2, a putative protein involved in SAC activity and Greatwall (Gwl), a kinase required to control cyclin B/Cdk1 - PP2A balance.

First, we analyzed RSK2, a major substrates of MAPK, involvement in the SAC. Our results show that RSK2 is essential for the activation of the SAC in xenopus egg extracts and for the localization of the others SAC components at the kinétochores. We also show that RSK2 participates in the maintenance of the SAC in human cells. Indeed, RSK2 is necessary for Mad1, Mad2 and Cenp-E localization which we are essential proteins for SAC activation.

Entry and exit of mitosis is regulated by the cyclin B/Cdk1 complex and phosphatases. Gwl is a new kinase essential to the entry into mitosis and maintenance of the mitotic state in xenopus egg extracts. Indeed, our results showed that Gwl maintains the mitotic state independently of cyclin B/Cdk1 activation though the negative regulation of PP2A, the phosphatase that dephosphorylates mitotic substrates

TABLES DES MATIERES

Liste des figures.....1

Abréviations.....2

CONTEXTE SCIENTIFIQUE.....4

Chapitre 1 : Le cycle cellulaire.....5

I. Les différentes phases du cycle cellulaire.....6

A. L'interphase.....7
B. La division cellulaire.....7

II. Les acteurs de la progression cellulaire.....9

A. Les complexes cyclines/Cdk.....10
B. Les points de contrôle du cycle cellulaire.....14

Chapitre 2: Entrée en mitose : activation du complexe Cycline B/Cdk1 ou MPF.....17

I. La découverte du MPF.....17
II. Regulation de Cdk1 par phosphorylation/ dephosphorylation.....18

A. Wee1/Myt1.....19
B. Cdc25.....20
C. Plk1.....23
D. Greatwall.....23
E. PP2A.....25

III. Régulation du MPF en fonction de sa localisation subcellulaire.....27

Chapitre 3 : La transition métaphase-anaphase et le point de contrôle du fuseau mitotique.....28

I. Attachement des kinétochores aux fibres du fuseau mitotique.....28

A. Le fuseau mitotique.....28
B. Les kinétochores.....29
C. Capture des kinétochores par les fibres du fuseau mitotique.....31
A. Les erreurs d'attachement.....32

II. Point de contrôle du fuseau mitotique : « Spindle Assembly Checkpoint » (SAC).....33

A. Dégradation des sécurines : séparation des chromatides soeurs.....34
B. Evénements surveillés par le SAC : tension et attachement.....37
C. Composants moléculaires impliqués dans le point de contrôle du fuseau mitotique 39
D. Complexe du point de contrôle mitotique : « Mitotic Checkpoint Complex ».....44
E. Inactivation du point de contrôle.....48

Chapitre 4 : L'ovocyte de xénope comme modèle d'étude du Spindle Assembly Checkpoint..... 50

I. La méiose dans l'ovocyte..... 50
II. L'arrêt en métaphase II..... 52

A. Caractéristiques l'arrêt en metaphase II..... 52
B. Mise en place de l'arrêt CSF : la voie Mos-MAPK..... 53
C. Implications de différents composants du SAC dans l'arrêt CSF..... 55

III. Fecondation de l'ovocyte :..... 56
IV. Les extraits CSF comme système d'étude du SAC..... 56

Chapitre 5 :RSK2 et Greatwall, deux AGC kinases actrices de la mitose..... 58

I. Généralités sur les AGC kinases..... 58
II. RSK2..... 60

A. Découverte de RSK..... 60
B. Structure et localisation..... 60
C. Mécanisme d'activation de RSK..... 61
D. Fonction de RSK2 et ses isoformes..... 63

III. Greatwall ou MASTL..... 65

RESULTATS **68**
Article 1 :RSK2 localise aux kinétochores et participe au Spindle Assembly Checkpoint..... 68

I. Contexte de l'étude..... 68
II. RESULTATS..... 69
III. Conclusion..... 73

Article 2 : Greatwall maintient l'état mitotique via l'inhibition de PP2A..... 86

I. Contexte de l'étude..... 86
II. Résultats..... 86
III. Conclusion..... 91

Resultats complémentaires : Gwl interagit avec Plk1 et Cdc14 et est phosphoryle par Plk1..... 106

DISCUSSION..... 113
Discussion RSK2..... 114
Discussion Greatwall..... 121

BIBLIOGRAPHIE..... 127

ANNEXES..... 153
Matériels et méthodes..... 153
Article 3: Loss of human Greatwall results in G2 arrest and multiple mitotic defects due to deregulation of the cyclin B-Cdc2/PP2A balance..... 156
Article 4: Constant regulation of both the MPF amplification loop and the Gwl-PP2A pathway is required fot metII arrest and correct entry into the first embryonic cell cycle..... 162

LISTES DES FIGURES

Figure 1 : Dessin de « cellules » observés dans des coupes par R. Hooke
Figure 2 : Le cycle cellulaire
Figure 3 : Les complexes cyclines/Cdk au cours du cycle cellulaire
Figure 4 : La voie ubiquitine protéasome
Figure 5 : Les composants de l'APC/C^{Cdc20}
Figure 6 : Points de contrôle du cycle cellulaire
Figure 7 : Mise en évidence du MPF
Figure 8 : Activation du complexe cycline B/Cdk1
Figure 9 : La régulation de Cdc25C pendant le cycle cellulaire
Figure 10 : Structure et diversité du complexe PP2A
Figure 11 : Organisation du fuseau mitotique
Figure 12 : Organisation structurale des kinétochores de vertébrés
Figure 13 : Attachement des microtubules aux kinétochores
Figure 14 : Capture des kinétochores
Figure 15 : Erreurs d'attachement des microtubules aux kinétochores
Figure 16 : Les complexes cohésines et chromatides sœurs
Figure 17 : Séparation des chromatides sœurs
Figure 18 : Deux modèles d'activation du Spindle Assembly Checkpoint
Figure 19 : Représentation schématique des tensions inter et intra-kinétochoriennes
Figure 20 : Interdépendance des protéines du checkpoint
Figure 21 : Activation du point de contrôle du fuseau mitotique
Figure 22 : Formation du MCC dépendante et indépendante des kinétochores
Figure 23 : Formation des complexes Mad2-Cdc20 à partir des complexes Mad1-Mad2
Figure 24 : Inactivation du point de contrôle du fuseau mitotique
Figure 25 : Les stades de la vitellogénèse chez le xénope
Figure 26 : La maturation méiotique
Figure 27 : Mise en évidence du CSF
Figure 28 : Le rôle d'Emi2/Erp1 dans l'arrêt CSF chez le xénope
Figure 29 : Modèle d'activation des AGC kinases
Figure 30 : Structure de RSK2
Figure 31 : Modèle d'activation de RSK2
Figure 32 : Régulation du cycle cellulaire par RSK2

ABRÉVIATIONS

ADN	acide désoxyribonucléique
AMP	Adenoside Monophosphate Cyclique
APC/C	Anaphase Promoting Complex/ Cyclosome
ARN	acide ribonucléique
ATM	Ataxia Telangiectasia Mutated
ATP	adénoside triphosphate
ATR	ATM Related
Bub	Budding Uninhibited by Benzamidazole
CAK	Cdk Activating Kinase
CamKII	Ca^{2+}Calmoduline dependent Protein Kinase II
CCAN	Constitutive Centromere Associated Network
Cdc	Cell Division Cycle
Cdk	Cyclin Dependent Kinase
Cenp-E	CENtromeric Protein
Chk	Checkpoint Kinase
CIP	Cyclin Dependent Kinase Inhibitor Protein
CKI	Cdk Inhibitor
CSF	Cytostatic Factor
CTDK	C-Terminal Domain Kinase
EB1	End Binding 1
Emi2	Early Mitotic Inhibitor 2
ERK	Extracellular Regulated Kinase
Erp1	Emi1 Related Protein 1
FEAR	Cdc fourteen early anaphase release
FRAP	Fluorescence Recovery After Photobleaching
GFP	Green Fluorescence Protein
GP	globule polaire
GST	Gluthation S Transferase
GVBD	Germinal Vesicule Breackdown
Gwl	Greatwall
Incenp	Inner CENtromeric Protein
INK4	Inhibitor of Cdk4
KAP	Cdk Associated Phosphatase
kDa	kiloDalton
Mad	Mitotic Arrest Deficient
MAP	Microtubule Associated Protein
MAPK	Mitogen Activated Protein Kinase
MAST	Microtubule Associated Serine/Threonine Kinase
MASTL	Microtubule Associated Serine/Threonine Kinase Like
MBP	Myeline Basic Protein
MCAK	Mitotic Activated Protein Kinase
MCC	Mitotic Checkpoint Complex
MEF	Mouse Embryonic Fibroblast
MEK	MAPK ERK Kinase
MEN	Mitotic Exit Network

MOS	v-mos Moloney murine sarcoma viral oncogene homolog
MPF	M-phase Promoting Factor
Mps1	Monopolar Spindle 1
Myt1	Membrane Associated and Tyrosine/Threonine Specific 1
NES	Nuclear Export Sequence
NLS	Nuclear Localization Signal
NTDK	N-Terminal Domain Kinase
OA	Okadaic Acid
PDK1	3'-Phosphatidylinositol Dependent Kinase
PKA	cAMP Dependent Protein Kinase
PKC	Protein Kinase C
PKG	cGMP Dependent Protein Kinase
Plk1	Polo Like Kinase 1 (mammifère)
Plx1	Polo Like Kinase 1 (xénope)
PP	Phosphatase
Prp4	Pre-mRNA Processing Factor 4
PtK	Potorous tridactilus Kidney
RNAi	RNA interference
Rod	Rough Deal
rpS6	40S Ribosomal Subunit Protein S6
RSK	Ribosomal S6 Kinase
RTK	Receptor Tyrosine Kinase
S6K	Ribosomique S6 Kinase
SAC	Spindle Assembly Checkpoint
Scc	Sisters Chromatides Cohesion
SCF	Skp1/Cullin/F-box protein
Ser	Serine
Sgo	Shogoshin
siRNA	Small interfering RNA
Smc	Structural Maintenance of Chromosome
Thr	Threonine
Tyr	Tyrosine
YFP	Yellow Fluorescence Protein
ZW10	Zeste White 10

CHAPITRE 1 : LE CYCLE CELLULAIRE

Tous les eucaryotes supérieurs sont constitués de nombreuses cellules qui se multiplient par division cellulaire. En 1665 Robert Hooke découvre dans du liège des cavités délimitées par des parois qu'il nommera cellule (Figure 1). C'est en 1839, que la théorie cellulaire voit le jour grâce au zoologiste Théodore Schwann qui découvre que les plantes et les animaux sont tous composés de cellules, il en conclu que la cellule est l'unité de base du règne végétal et du règne animal.



Figure 1: Dessin de « cellules » observées dans des coupes d'arbre par Rober Hooke en 1665.

En 1859, Rudolf Virchow réfute la croyance selon laquelle les formes de vie peuvent apparaître spontanément en suggérant que toute cellule provient d'une cellule préexistante « omnis cellula e cellula ». Par la suite, Louis Pasteur terminera de convaincre la communauté scientifique que les cellules viennent de cellules. Le concept de « cycle cellulaire » découle des travaux de Alma Howard et Stephen Pelc (1953) (pour revue, Voorhees et al, 1976). En effet, en faisant croître des plantes en présence de l'isotope P^{32}, ils ont montré que l'isotope était incorporé dans l'ADN uniquement durant la phase de croissance cellulaire, et qu'il se passait un délai de douze heures avant la réabsorption de l'isotope dans le nouvel ADN synthétisé. En analysant la population hétérogène des cellules méristématiques des plantes, ils en déduisirent que la synthèse d'ADN durait environ six heures, et que les cellules entraient en division huit heures après la fin de la synthèse de l'ADN. Howard et Pelc furent les premiers à proposer la notion de « délai » dans le cycle cellulaire et proposèrent l'existence de quatre périodes : une période de division des cellules ou mitose ; une période de synthèse d'ADN, qu'ils nommèrent phase S, une phase pré-S appelée la phase G1, et une période pré-mitotique pour la phase G2. Le concept de cycle cellulaire est ainsi né et depuis fait l'objet de très nombreuses études. Les scientifiques ont ainsi développé de nombreux modèles d'étude du cycle cellulaire tels que les levures, les

embryons d'oursin, les ovocytes d'étoiles de mer et d'amphibiens ou les cellules de mammifères en culture. En effet, la conservation des gènes impliqués dans la régulation du cycle cellulaire a permis des études croisées, de même que la complémentarité des résultats a permis l'établissement d'un modèle général de contrôle du cycle cellulaire.

I. LES DIFFERENTES PHASES DU CYCLE CELLULAIRE

Lorsqu'elle n'est pas en phase de croissance et de division, la cellule est dite en quiescence ou en phase G0. Celle-ci entrera dans le cycle cellulaire sous l'effet de signaux mitogènes, ce qui permettra d'obtenir à partir d'une cellule mère, deux cellules filles contenant le même patrimoine génétique. Un cycle cellulaire comporte deux grandes parties : l'interphase et la division cellulaire (ou phase mitotique) (Figure 2).

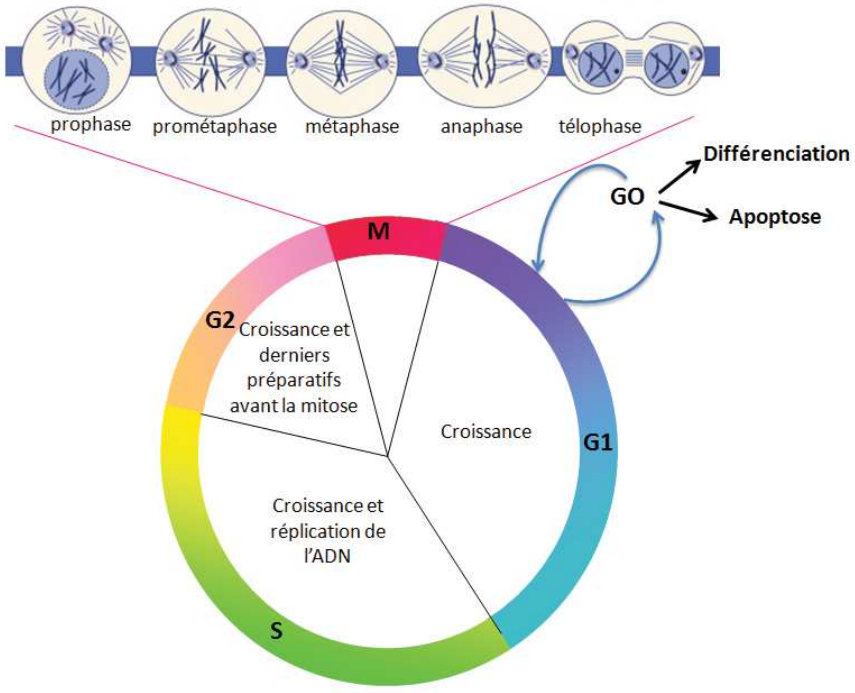


Figure 2: Cycle cellulaire: L'interphase: phase G1 (bleu), la phase S (vert), la phase G2 (rose). La mitose (rouge) et les étapes de la mitose.

A. L'INTERPHASE

L'interphase est une période de croissance cellulaire. Elle comprend trois phases :

La phase G1 (G pour « gap » ou intervalle) est la plus longue du cycle cellulaire. C'est une phase de croissance qui prépare la cellule à la phase S. La transition G1/S est contrôlée à différents niveaux, entre autres aux niveaux de l'intégrité de l'ADN, de la présence de facteurs de croissance et de l'adhérence cellulaire. C'est seulement pendant la phase G1 que la cellule peut se diriger vers la phase G0, phase durant laquelle elle peut rester un certain temps avant de reprendre le cycle cellulaire ou se différencier

La phase S est la phase de synthèse d'ADN qui se déroule selon un mécanisme de réplication semi-conservatif, permettant la duplication de la totalité de l'information génétique. La cellule commence également la duplication de son centrosome en fin de phase G1 et continue au cours de cette phase. Les centrosomes sont des structures cytoplasmiques constituées d'une paire de centrioles entouré d'une masse dense appelé matériel péricentriolaire.

La phase G2 prépare la cellule à entrer en division cellulaire. La réplication de l'ADN et la duplication des centrosomes sont vérifiées, et la plupart des protéines nécessaires à la poursuite du cycle cellulaire sont synthétisées pour effectuer la transition G2/M.

B. LA DIVISION CELLULAIRE

La division cellulaire comprend la mitose et la cytodiérèse. La mitose est marquée par le cycle de condensation/séparation/décondensation des chromosomes. Elle est composée de cinq étapes de la prophase à la télophase. En parallèle à la division chromosomique se fait la division cytoplasmique et centrosomique. La cytodiérèse est, quant à elle, l'étape finale de la division cellulaire. Elle conduit à l'individualisation des deux cellules filles.

La mitose peut être décrite de manière morphologique en six étapes différentes :

Prophase : Durant la prophase les chromosomes commencent à se condenser. Les deux centrosomes qui se sont dupliqués durant l'interphase forment, avec les microtubules, des asters qui migrent aux pôles de la cellule. Les asters vont définir les

deux pôles de la cellule diamétralement opposés. Le fuseau mitotique commence à se former et l'enveloppe nucléaire à se désagréger.

Prométaphase : A ce stade il n'y a plus de trafic nucléocytoplasmique étant donné la disparition du compartiment nucléaire (à l'exception de certains protistes qui réalisent des mitoses dites fermées, gardant cette structure intacte). L'enveloppe nucléaire se désagrège complètement sous forme de petites vésicules membranaires. Les chromosomes continuent de se condenser et le fuseau mitotique de s'organiser. Les microtubules émanant des deux pôles du fuseau mitotique en formation commencent à fixer aléatoirement des chromosomes au niveau de leurs centromères par l'intermédiaire d'une structure protéique appelée le **kinétochore**. Cette étape nécessite la polymérisation et la dépolymérisation des microtubules qui balayent la cellule de manière à capturer les kinétochores. Lorsque les deux kinétochores sont attachés à chacun des centrosomes, les forces de tension microtubulaires de part et d'autre du chromosome provoquent la migration (mouvement dit « de congression ») de tous les chromosomes et leur positionnement à mi-distance des pôles pour former la plaque métaphasique.

Métaphase : Les chromosomes sont sous tension maximale, chaque chromatide d'une paire de chromatides sœurs est reliée à un pôle opposé du fuseau mitotique par l'intermédiaire des microtubules kinétochoriens. Les chromatides sœur sont reliées par des complexes de cohésines présents sur les kinétochores. Les chromosomes ainsi configurés forment la plaque métaphasique. Cette étape est très brève.

Anaphase : Les deux chromatides sœurs se séparent rapidement. Les microtubules kinétochoriens se dépolymérisent entraînant les chromatides vers un pôle (anaphase A). Les microtubules polaires se polymérisent augmentant la distance entre les deux pôles des deux futures cellules filles (Anaphase B). Entre les lots de chromosomes, de nouveaux microtubules interzonaux (ou fuseau central) se polymérisent *de novo* et/ou se forment à partir des microtubules polaires. Ils seront présents jusqu'à la cytodiérèse. Ce réseau de microtubule est très stable. Le sillon de division commence à se mettre en place sous la membrane plasmique à mi-distance entre les deux pôles.

Télophase : Les chromosomes se décondensent, le noyau de chaque future cellule fille débute sa formation et les microtubules du fuseau central continuent de se polymériser. La distance entre les deux pôles continue d'augmenter et le sillon de division se contracte. La division du cytoplasme commence avec la contraction de l'anneau contractile composé principalement d'actine et de myosine.

La **cytodiérèse** : Elle permet la séparation physique des deux futures cellules filles par un processus dynamique. Elle doit donc être strictement coordonnée avec la division cellulaire et régulée dans le temps et l'espace pour que chaque cellule fille hérite de sa population chromosomique intacte. La cytodiérèse peut être divisée en quatre phases en fonction de l'état du cytosquelette (réseau de microtubules et microfilaments d'actine) :

1. La **détermination du plan de division** reposant sur le positionnement du fuseau bipolaire de microtubules et sur l'organisation du cytosquelette d'actine.
2. La **formation de l'anneau de contraction** d'actomyosine.
3. La **contraction de l'anneau d'actomyosine** conduisant à l'élongation du sillon de division pour former un pont intercellulaire. Ce pont cytoplasmique est formé de microtubules antiparallèles et de protéines indispensables à la division cellulaire pour former le *midbody*.
4. L'**abscission** ou complétion aboutissant à la séparation physique des deux cellules filles (Eggert et al, 2006)

II. LES ACTEURS DE LA PROGRESSION CELLULAIRE

La progression du cycle cellulaire est contrôlée de différentes manières. Tout d'abord par l'activation séquentielle des complexes **cycline/Cdk** qui est réalisée par la synthèse des cyclines puis leur dégradation par la voie du protéasome. La progression du cycle cellulaire est également régulée par des mécanismes de phosphorylation et déphosphorylation. Enfin, des mécanismes de surveillance appelés « **points de contrôles** » permettent d'interrompre la progression du cycle cellulaire lorsque que des anomalies sont détectées.

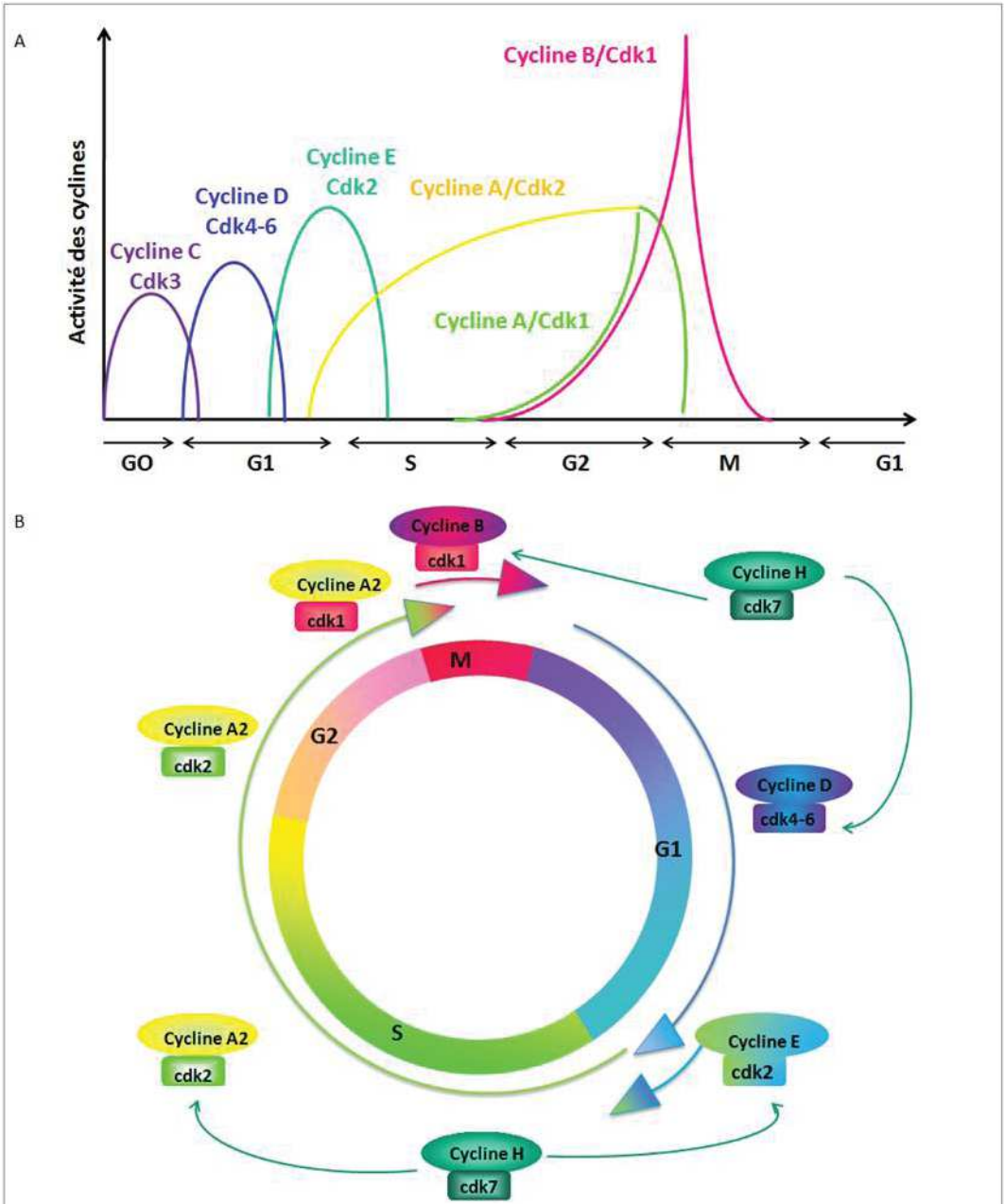


Figure 3: Les complexes cyclines/Cdk au cours du cycle cellulaire: (A) Le déroulement du cycle cellulaire est assuré par l'activation séquentielle de complexes à activité sérine/thréonine: les cyclines/Cdk: les cyclines/Cdk. (B) Les cyclines peuvent s'associer à plusieurs Cdk et une Cdk peut fixer plusieurs cyclines. Le complexe cyclineH/Cdk7 ou CAK participe à l'activation des Cdk.

A. LES COMPLEXES CYCLINES/CDK

La progression à travers les différentes phases du cycle cellulaire se fait grâce à l'activation et l'inactivation successives de protéines appartenant à la famille des Sérine/Thréonine kinases, très conservées au cours de l'évolution, les **Cdk** (Cyclin Dependent Kinase) (Morgan, 1995). Ces kinases sont régulées par leur association avec les cyclines qui s'expriment séquentiellement durant le cycle cellulaire (Figure 3). On peut distinguer deux types de cyclines : les cyclines mitotiques qui s'associent au Cdk

pendant la phase G2 et sont nécessaires à l'entrée en phase M et les cyclines G1/S qui s'associent durant la phase G1 et qui sont nécessaires pour entrer en phase S et poursuivre le cycle cellulaire.

a. Synthèse des cyclines

Lorsque les cellules quiescentes sont stimulées par des facteurs de croissance, les premières cyclines transcrites sont la cycline C associé à Cdk3 et la cycline D associée à Cdk4 ou Cdk6 en phase G1. Il existe plusieurs isoformes de la cycline D (D1, D2, et D3) présentent à un taux d'expression relativement constant à travers les différentes phases du cycle cellulaire, excepté en phase G0 où elles sont absentes. Les complexes cycline D/Cdk4-6 sont localisés dans le noyau en phase G1 puis sont exportés dans le cytoplasme lors de l'entrée en phase S (Baldin et al, 1993). La cycline D permet l'activation de la transcription des protéines nécessaire à la division.

Les deux sous types de cycline E (E1 et E2) sont exprimés juste après les cyclines D et ne s'associent qu'à une seule Cdk : Cdk2. Le complexe cycline E/Cdk2 est nécessaire à la transition G1/S, permettant d'initier l'entrée en phase S et la réplication de l'ADN (Dulic et al, 1992 ; Koff et al, 1992).

La cycline A est traduite peu après la cycline E et elle participe à l'entrée en phase S et à la transition G2/M. En effet, la micro-injection d'anticorps neutralisant la cycline A empêche le franchissement de ces deux transitions dans des cellules HeLa (Pagano et Al, 1992). La cycline A peut s'associer à Cdk1 et Cdk2 pour les activer de la transition G1/S à la prométaphase.

Enfin les cyclines B1 et B2 sont exprimées en phase S. Elles activent Cdk1 durant la mitose et sont dégradées en sortie de mitose, après la cycline A. Associée à Cdk1, la cycline B/Cdk1 constitue le complexe le plus important régulant la mitose, il est aussi appelé **MPF** (M phase Promoting Factor).

De plus, il existe une cycline dont le rôle principal est d'activer les autres complexes cycline/Cdk, il s'agit de la cycline H associée à Cdk7 que l'on nomme aussi **CAK** (Cdk

Activating Kinase). Ce complexe associé à MAT1 (ménage à trois) est capable d'activer Cdk1, Cdk2, Cdk4 et Cdk6 (Fesquet et al, 1993 ; Devault et al, 1995).

b. Activation des cyclines/Cdk

L'accumulation, la stabilisation et l'association des cyclines avec les Cdk sont des étapes déterminantes de la régulation temporelle de ces Cdk. Néanmoins, la régulation des complexes cyclines/Cdk par phosphorylation/déphosphorylation par les kinases CAK, Wee1 et Myt1 et la phosphatase Cdc25, est également importante. La CAK phosphoryle les complexes cyclines/Cdk sur un résidu activateur de Cdk, alors que Wee1 et Myt1 phosphorylent les complexes sur deux résidus inhibiteurs de Cdk. Les phosphorylations de Wee1 et Myt1 confèrent aux complexes cyclines/Cdk leur inactivité. C'est la déphosphorylation des résidus inhibiteur de Cdk par la phosphatase Cdc25 qui permet l'activation des complexes cyclines/Cdk. Ce mécanisme sera décrit plus en détail dans le chapitre 2.II.

En plus de cette régulation par phosphorylation/déphosphorylation des petites molécules inhibitrices permettent d'inhiber les Cdk, ce sont les **CKI** (Cyclin Dependent Kinase Inhibitor). Les CKI participent à la régulation de l'activité des complexes cycline/Cdk aux transitions G1/S et G2/M, en inhibant ces complexes jusqu'au moment de leur activation. Les CKI sont divisés en deux familles : la famille des **INK4** (inhibiteur de Cdk4 : $p15^{ink4b}$, $p16^{ink4a}$, $p18^{ink4c}$et $p19^{ink4d}$) et les **CIP/KIP** (protéines inhibitrices des Cdk4/Cdk6 : $p21^{cip1}$, $p27^{kip1}$ et $p57^{kip2}$). Les membres de la famille d'INK4 inactivent les Cdk4 et Cdk6, soit en se liant aux Cdk libres ce qui conduit à un changement de conformation et empêche la liaison aux cyclines, soit en se liant au complexe cycline/Cdk ce qui induit la déformation du site de liaison à l'ATP. Les CIP/KIP inhibent les Cdk en se liant au dimère de cycline/Cdk et en bloquant la poche de liaison à l'ATP (pour revue, Vidal and Koff, 2000).

c. Inactivation des cyclines/Cdk

L'inactivation finale des complexes cyclines/Cdk se produit grâce à la dégradation ubiquitine dépendante des sous unités régulatrices, les cyclines.

La réaction d'ubiquitylation fait intervenir trois types d'enzymes : une enzyme activatrice (E1) qui transfère le résidu ubiquitine à une enzyme de conjugaison (E2) qui catalyse, avec une ubiquitine ligase (E3), la formation de chaines d'ubiquitine sur les résidus lysine des substrats. Une fois ubiquitinylées, les protéines sont reconnues et dégradées par le protéasome 26S (Figure 4).

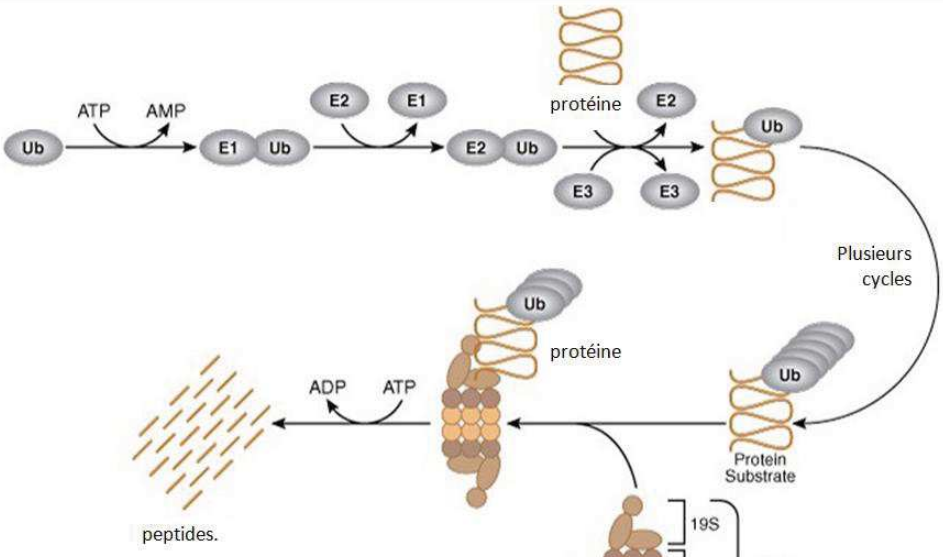


Figure 4 : Voie ubiquitine-protéasome: L'ubiquitinylation nécessite trois étapes. Une première enzyme E1, active l'ubiquitine (Ub) en se liant de manière covalente. Puis, l'ubiquitine est transférée sur le site actif de l'enzyme E2 qui pourra alors la transférer sur une ou plusieurs lysines de la protéines cibles. Ce transfert nécessite la liaison de l'enzyme E3, qui agit comme une protéine adapatrice en déterminant la spécificité des substrats. Plusieurs cycles de conjugaison aboutissent à la formation de chaînes poly-ubiquitine qui seront alors reconnues par le protéasome. (http:cellsignal.com)

Deux complexes à activité ubiquitine ligase participent au contrôle du cycle cellulaire : l'APC/C (Anaphase Promoting Complexe ou Cyclosome) et le SCF (Skp1/Cullin/F-box protein), mais seulement l'APC/C est nécessaire à la dégradation des cyclines (Peters, 1998).

L'APC/C a été découvert grâce à des études génétiques chez la levure (Irniger et al, 1995) et biochimique chez le xénope et la palourde (King et al, 1995 ; Sudakin et al, 1995). L'APC/C est un complexe composé d'une douzaine de sous unités chez les

vertébrés et treize sous unités chez la levure. Toutes ces sous unités sont associées au cours du cycle cellulaire, suggérant que la régulation du complexe ne dépend pas de l'association/dissociation des sous unités de l'APC/C. La reconnaissance spécifique des substrats à des moments clefs du cycle cellulaire nécessite l'interaction de l'APC/C avec les adaptateurs **Cdc20** (Figure 5) ou **Cdh1** (pour revue, Peters, 2002). L'APC/C s'associe à Cdc20 durant la mitose et à Cdh1 en fin de mitose et pendant la phase G1. L'activation de l'APC/C dépend de la phosphorylation de certaines de ses sous unités ou de ses adaptateurs qui font principalement intervenir les Cdk (pour revue, Peters, 2002).

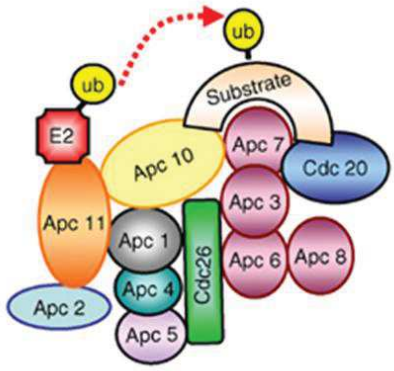


Figure 5: Composants de l'APC/C^{Cdc20} . Le complexe APC est composé de 12 sous unités. Un des effecteurs de l'APC est la protéine Cdc20 qui est recrutée et permet la spécificité des substrats. *(D'après Castro et al, 2005)*

B. LES POINTS DE CONTROLE DU CYCLE CELLULAIRE

La cellule dispose de différents mécanismes de contrôle permettant de vérifier le bon déroulement de chacune des phases du cycle cellulaire. Ces mécanismes contrôlant l'intégrité du cycle cellulaire sont appelés mécanismes de surveillance, points de contrôles ou « checkpoint » (pour revue, Hartwell and Weinert, 1989) (Figure 6). Il existe différents points de contrôle au cours du cycle cellulaire faisant intervenir des protéines qui détectent certains critères comme les cassures doubles brins de l'ADN ou encore l'attachement bipolaire des chromatides sœurs aux microtubules du fuseau mitotique. Si un défaut est détecté, des voies de signalisation s'activent et aboutissent à l'activation de plusieurs protéines effectrices qui ciblent les complexes cyclines/Cdk et permettent ainsi d'arrêter la progression du cycle cellulaire afin de réparer les erreurs détectées. Dans le cas où les erreurs ne sont pas réparables la cellule s'engagera dans la voie de l'apoptose.

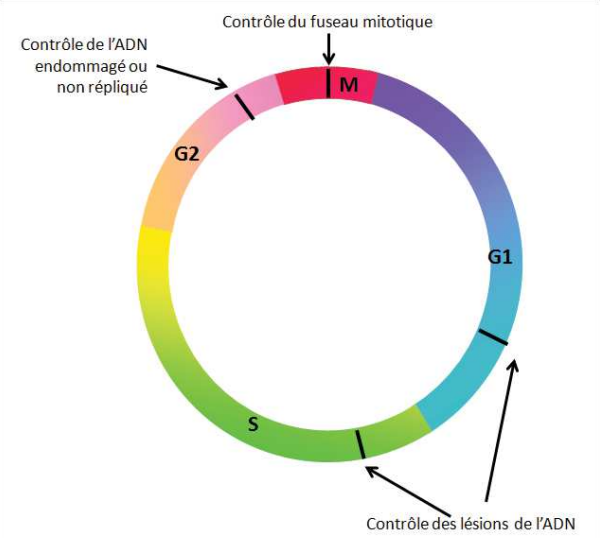


Figure 6: Points de contrôle du cycle cellulaire. Les points de contrôle du cycle cellulaire permettent de vérifier le bon déroulement de chaque phase du cycle cellulaire. Ces mécanismes contrôlent l'intégrité de l'ADN et la mise en place du fuseau mitotique.

Le point de restriction en phase G1/S permet de vérifier les critères de taille de la cellule, la présence de facteurs nutritifs ou environnementaux et la qualité de l'ADN. Une fois le point de restriction G1/S passé, la cellule s'engage dans le cycle cellulaire sans retour en arrière possible. Les points de contrôle des phases G1, S et G2 s'assurent de la réplication correcte et totale de l'ADN ainsi que de l'absence de lésions de celui-ci. Si ces critères sont vérifiés, la cellule entrera en division cellulaire. Ces points de contrôle font intervenir une cascade de signalisation composée de senseurs, de transducteurs et d'effecteurs du signal. Les senseurs et transducteurs clefs de ces points de contrôle sont les kinases de la famille des phosphoinositide-3-kinase related kinases (PIKK) : **ATM** (Ataxia-Telangiectasia Mutated) et **ATR** (ATM related Kinase). Ces PIKK–phosphorylent les protéines kinases **Chk1** and **Chk2** permettant d'amplifier et de diversifier le signal. Bien qu'ATM et ATR semblent avoir de nombreux substrats en commun, elles répondent généralement à des signaux de stress différents. Les mécanismes d'arrêt du cycle cellulaire par la voie ATM/ATR diffèrent selon la phase du cycle cellulaire. Selon le stress et selon le point de contrôle ils activent différents effecteurs qui sont les phosphatases Cdc25 et le suppresseur de tumeur p53. Par exemple durant l'arrêt en phase S les kinases ATM et ATR déclenchent les différentes voies de signalisation qui vont aboutir à la dégradation de la phosphatase Cdc25A qui ne pourra plus activer le complexe cycline E-A/Cdk2, et permet l'accumulation de p53 qui induit l'expression de p21, inhibiteur du complexe cycline E/Cdk2. De la même manière, à la transition G2/M, ATM et ATR vont inhiber Cdc25C qui ne pourra plus activer les complexes cycline/Cdk et vont également stabiliser p53 permettant l'expression de p21 qui est capable d'inhiber le complexe cycline B/Cdk1 (pour revue Niida and Nakanishi, 2006).

Enfin, il existe un dernier point de contrôle au cours de la mitose au niveau de la transition métaphase-anaphase. Ce point de contrôle s'assure que tous les chromosomes

sont alignés sur la plaque métaphasique, que les kinétochores des chromatides sœurs sont tous attachés aux fibres du fuseau et sous tension avant d'entrer en anaphase. Ce point de contrôle sera décrit plus précisément dans le chapitre 3.

CHAPITRE 2: ENTREE EN MITOSE : ACTIVATION DU COMPLEXE CYCLINE B/CDK1 OU MPF

I. LA DECOUVERTE DU MPF

La découverte d'un facteur permettant l'entrée en phase M date des années 1960-1970 : il s'agit du **MPF** (originellement pour Maturation Promoting Factor et maintenant pour **M**-Phase Promoting Factor - Masui, 2001). Les travaux de Y. Masui et ses collaborateurs sur le MPF réalisés à partir d'ovocytes d'amphibiens furent les plus marquants (Masui et al, 1972 ; Masui et al 2001 ; Masui et Market, 1971). En effet, ces auteurs ont montré que l'injection de cytoplasme d'un ovocyte de *Rana pipiens* bloqué en métaphase de deuxième méiose dans un autre ovocyte d'amphibien arrêté en prophase de première méiose (assimilé à la phase G2) induisait la reprise de méiose, la rupture de l'enveloppe nucléaire et l'émission du premier globule polaire (maturation méiotique). Ils nommèrent ce facteur cytoplasmique responsable de ce phénomène le Maturation Promoting Factor (Figure 7). Un peu plus tard, des expériences montrèrent qu'il s'agissait d'un facteur universel présent dans toutes les cellules capables de se diviser (Sunkara et al, 1979 ; Kishimoto et al, 1982 ; Wasserman and Smith, 1978). Enfin il fut montré à la fin des années 1980-début 1990 que le MPF était un hétérodimère composé d'une sous unité catalytique : la kinase Cdk1 (aussi appelée Cdc2) et d'une sous unité régulatrice : la cycline B (Gauthier et al, 1988 ; Labbé et al, 1989 ; Nurse, 1990). Par la suite un grand nombre de travaux ont montré que le complexe cycline B/Cdk1, comme les autres complexes cyclines/Cdk sont régulés à trois niveaux moléculaires : par des phosphorylations/ déphosphorylations de Cdk1 et par des variations de concentrations et localisations de la cycline B au cours du cycle cellulaire, enfin par la présence ou non d'inhibiteur de Cdk.

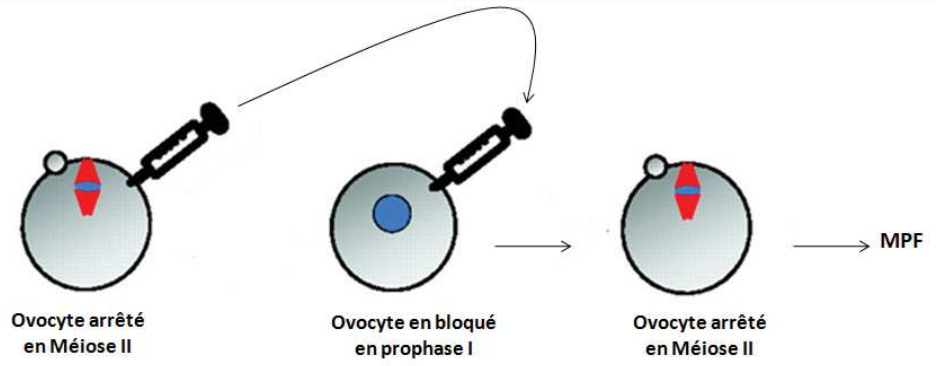


Figure 7 : Mise en évidence du MPF. L'injection de cytoplasme d'un ovocyte d'amphibien arrêté en métaphase II dans un ovocyte bloqué en prophase I conduit à la reprise de la maturation méiotique de cet ovocyte en absence de progestérone. *(D'après Schmidt et al, 2006; Masui et Market, 1971)*

II. REGULATION DE CDK1 PAR PHOSPHORYLATION/ DEPHOSPHORYLATION

La concentration de Cdk1 est stable tout au long du cycle cellulaire. L'association en G2 de Cdk1 à la cycline B entraîne le changement de conformation du domaine VIII de Cdk1 qui contient sa boucle d'activation ou « T-loop » permettant la phosphorylation d'un résidu activateur, la Thréonine 160 par la CAK présente dans cette T-loop (Solomon et al, 1992 ; Solomon et al 1993). La phosphorylation du résidu Thr160 de Cdk1 se produit en phase G2 et persiste jusqu'à sa déphosphorylation par la phosphatase KAP (Cdk Associated Phosphatase) lorsque la cycline se dégrade (Poon and Hunter, 1995). Cependant en G2, en plus de la phosphorylation du résidu Thr160, le complexe cycline B/Cdk1 présente deux phosphorylations sur les résidus Thréonine 14 et Tyrosine 15 de Cdk1 qui maintiennent le complexe inactif. La phosphorylation de ces résidus est catalysée par les kinases **Wee1** et **Myt1** (Pines and Hunter, 1991 ; Parker and Piwnica-Worms, 1992 ; Mueller et al, 1995a, Mueller et al, 1995b). En fin de phase G2, la phosphatase **Cdc25** est responsable de la déphosphorylation des résidus inhibiteurs provoquant la déphosphorylation et l'activation d'un pool de cycline B/Cdk1. Ce pool de cycline B/Cdk1 induit à la fois la phosphorylation de Myt1, Wee1 et Cdc25 ayant pour conséquence l'inactivation des kinases inhibitrices Myt1 et Wee1 et l'activation complète de la phosphatase Cdc25 (Dunphy and Kumagai, 1991 ; Gautier et al, 1991 ; Kumagai and Dunphy, 1991). Ceci se traduit par l'activation complète du complexe

cycline B/Cdk1 et l'entrée en mitose. Cette boucle d'activation est nommée boucle d'auto-amplification du MPF (Figure 8).

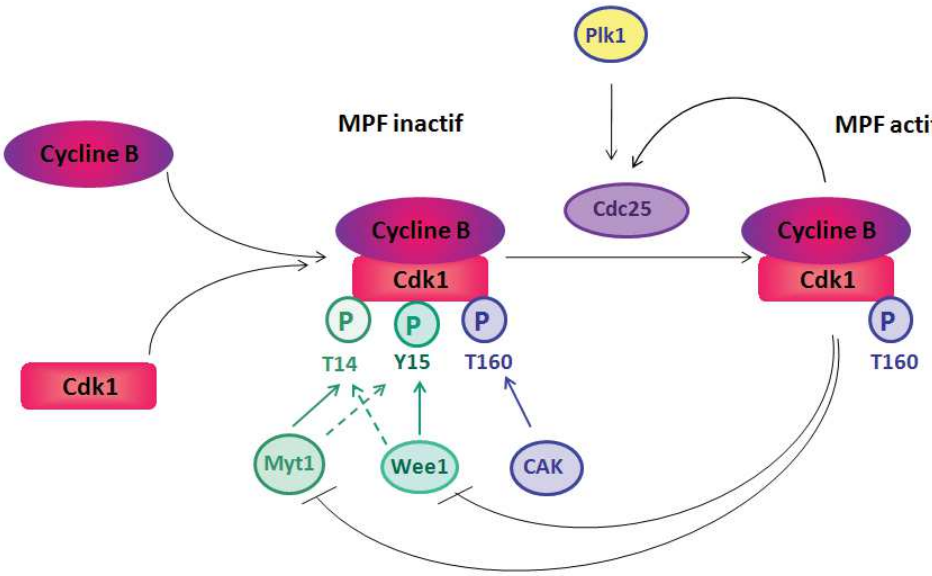


Figure 8: Activation du complexe cycline B/Cdk1. En phase G2, la cycline B et Cdk1 s'associent, le complexe est phosphorylé par la CAK sur le résidu T160. Cette phosphorylation activatrice ne suffit pas à activer le complexe puisque parallèlement, le MPF est inactivé par les phosphorylations inhibitrices de Wee1 et Myt1 sur les résidus T14 et Y15 de Cdk1. A la transition G2/M, un pool de Cdc25 est activé par Plk1 Ce pool de Cdc25, active un petit pool de MPF par déphosphorylation des résidus inhibiteurs de Cdk1. A son tour le MPF va phosphoryler Wee1 , Myt1 et Cdc25. Wee1 et Myt1 sont inactivées alors que Cdc25 est activée, c'est la boucle d'auto-amplification du MPF.

Mis à part le MPF, les kinases Wee1 et Myt1 et la phosphatase Cdc25 sont régulées par phosphorylation/déphosphorylation par d'autres kinases et phosphatases tels que **Plk1** (Polo Like Kinase 1) et la phosphatase **PP2A**. La région N-terminale de ces protéines contient un domaine régulateur riche en motif Ser/Thr-Pro qui peut être phosphorylé à divers moments du cycle cellulaire. Ces protéines sont hypophosphorylées en interphase, ce qui correspond à une forte activité de Wee1/Myt1 et une faible activité de Cdc25 et elles sont hyperphosphorylées lors de l'entrée en mitose.

A. WEE1/MYT1

Les kinases de la famille Wee ont d'abord été mises en évidence chez la levure *Schizosaccharomyces pombe* par des approches génétiques visant à comprendre le contrôle exercé sur la taille de la cellule durant la progression cellulaire. Ils montrèrent que deux protéines kinases codées par les gènes *wee1* et *myt1* régulaient de manière

négative le complexe cycline B/Cdk1 (Clb2/cdc28 pour la levure) (Russel and Nurse, 1987 ; Lundgren et al, 1991).

Ces deux kinases peuvent phosphoryler les résidus Thr14 et Tyr15 de Cdk1, mais Myt1 a une préférence pour la Thr14 (Liu, et al 1997) et Wee1 pour la Tyr15 (McGowan and Russel, 1993).

Mise à part la spécificité de Myt1 et Wee1 pour les résidus 14 et 15, la localisation subcellulaire de ces deux kinases joue un rôle important dans la régulation de Cdk1 : Myt1 est localisée au niveau du réticulum endoplasmique et de l'appareil de Golgi (Mueller et al, 1995b ; Kornbluth et al, 1994 ; Liu et al, 1997 ; Fattaey and Booher, 1997), alors que Wee1 est essentiellement nucléaire durant l'interphase et est cytoplasmique en mitose (Heald et al, 1993 ; Baldin and Ducommun, 1995). Ainsi, chacune de ces kinases régule une sous population de Cdk1 définie.

Comme décrit précédemment, Wee1 est régulée en partie par Cdk1. En effet, *in vitro*, il a été montré que Cdk1 pouvait lier et phosphoryler Wee1 et que Wee1 isolée à partir d'extraits mitotiques de Xénope présente une faible activité (Tang et al, 1993 ; Mueller et al, 1995a ; Mueller et al, 1995b). Ces observations appuient l'hypothèse selon laquelle il existerait une boucle d'activation où Cdk1 phosphoryle et inactive directement Wee1, ce processus augmente ainsi rapidement l'activité de Cdk1 pour l'entrée en mitose. Cependant, dans des extraits d'œufs de Xénope déplétés de Cdk1, Wee1 est phosphorylée ce qui suggère qu'au moins une autre kinase est capable de phosphoryler Wee1 (Mueller et al, 1995a). Myt1 est également phosphorylée en C-terminale par Cdk1. (Wells et al, 1999).

B. CDC25

La phosphatase Cdc25 fut identifiée par approche génétique chez la levure *S pombe*, comme inducteur de la mitose, dont l'activité s'opposait à celle de Wee1 et Myt1 (Russel and Nurse, 1986). L'activité de Cdc25 est régulée par sa localisation subcellulaire, ses phosphorylations et sa dégradation. Il existe trois isoformes de Cdc25 chez les mammifères codés par des gènes distincts : Cdc25A, B et C (pour revue, Boutros et al, 2006).

Les isoformes de Cdc25 sont redondantes durant le cycle cellulaire

Les premiers travaux réalisés sur ces protéines suggéraient que Cdc25A intervenait durant la transition G1/S en régulant Cdk2 (Hoffman, et al 1994 ; Jinno et al, 1994) tandis que Cdc25B et Cdc25C seraient impliquées dans l'activation de Cdk1 au cours de la transition G2/M (Karlsson et al, 1999). En effet, Cdc25B active le complexe cycline B/Cdk1 aux centrosomes lors de la transition G2/M. Ce qui constituerait un premier niveau d'action sur le MPF (De Souza et al, 2000 ; Jackman et al, 2003). Cdc25C participerait à l'entrée en mitose en activant le complexe cycline B/Cdk1 préférentiellement dans le noyau (Boutros et al, 2006 ; Perdiguero and Nebrada, 2004).

Cependant, des travaux plus récents ont remis en cause ce modèle et suggèrent que les différents isoformes de Cdc25 peuvent agir à divers moment du cycle cellulaire et compenser les défauts d'une ou plusieurs autres isoformes. En effet l'inhibition de l'expression de Cdc25A et Cdc25B par siRNA montre un arrêt en début de mitose des cellules humaines suggérant que Cdc25A et Cdc25B sont nécessaires à la transition G2/M et que Cdc25C seule n'est pas suffisante pour induire l'entrée en mitose (Lindqvist et al, 2005). D'autre part, les délétions simultanées de Cdc25B et Cdc25C sont viables chez la souris montrant que Cdc25A est suffisante pour permettre la progression du cycle cellulaire (Ferguson et al, 2005).

Régulation de Cdc25C pendant la transition G2/M

La régulation de Cdc25C au cours de la transition G2/M a plus particulièrement été étudiée. En interphase, Cdc25C est maintenue inactive par phosphorylation du résidu Ser287 (Ser216 chez l'humain) par Chk1. Cette phosphorylation sert de point d'ancrage à la protéine 14-3-3 qui constitue un adaptateur moléculaire pouvant réguler sa cible en modulant son activité, sa capacité d'interaction avec d'autres protéines et sa localisation subcellulaire. L'association de 14-3-3 à Cdc25C masque le signal de localisation nucléaire de Cdc25C et séquestre la phosphatase dans le cytoplasme empêchant son entrée dans le noyau où elle activera le complexe cycline B/Cdk1 (Kumagai et al, 1998 ; Kumagai and Dunphy, 1999 ; pour revue, Bollen et al, 2009 ; Perry and Kornbluth, 2007). Lors de la transition G2/M, la phosphorylation du résidu T138 (T130 chez l'humain) de Cdc25C par Cdk2 et la déphosphorylation de la Ser287 de Cdc25C par la phosphatase PP1, conduisent à la dissociation de Cdc25C et 14-3-3 et à la translocation de Cdc25C dans le noyau (Kumagai et al, 1998 ; Margolis et al, 2003 ; Margolis and

Kornbluth, 2004 ; Margolis et al, 2006 ; pour revue, Bollen et al, 2009 ; Perry and Kornbluth, 2007). La translocation de Cdc25C va permettre sa phosphorylation sur le résidu S285 (S214 chez l'humain) et son activation. En effet en entrée de mitose, Cdc25C est hyperphosphorylée. Il a été montré qu'en absence de Cdk1 actif et en inhibant les phosphatases sensibles à l'acide okadaique (OA), Cdc25C est toujours phosphorylée et activée (Izumi et al, 1992). Ces observations indiquent qu'une ou plusieurs autres kinases sont impliquées dans l'activation de Cdc25C durant la transition G2/M. Différentes études montrent dans des extraits de xénope que la MAPK (Mitogen Activated Protein Kinase) et Plx1 (Polo Like Kinase Xenopus 1) phosphorylent Cdc25C (Wang et al, 2007 ; Kumagai and Dunphy, 1996). Ces auteurs ont également montré que ERK (Extracellular Regulated Kinase), l'orthologue humain de la MAPK participent avec Plk1 au système de régulation de Cdc25C pendant la mitose de cellules somatiques de mammifères (Wang et al, 2007 ; Toyoshima-Morimoto et al, 2002 ; Nakajima et al, 2003). Une récente étude montre que RSK2 phosphoryle et active également Cdc25C (Wang et al, 2010). Une fois activée Cdc25C participera à la boucle d'auto-amplification de cycline B/Cdk1 (Margolis et al, 2006 ; Kumagai and Dunphy, 1992 ; Hoffman et al, 1993) (Figure 9).

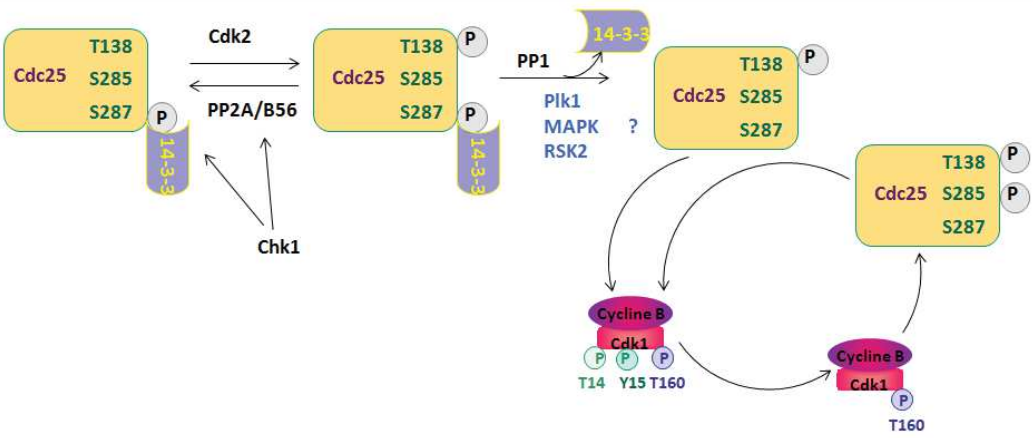


Figure 9: La régulation de Cdc25 pendant la transition G2-M: En G2, la phosphatase Cdc25C est maintenue inactive dans le cytoplasme grâce à sa liaison à 14-3-3 qui dépend de la phosphorylation du résidu Ser287 (Ser216 chez l'homme) par Chk1. La phosphorylation de Cdc25C sur le résidu T138 (T130 chez l'homme) par Cdk2 est requise pour son activation ultérieure à la transition G2/M. Pendant la phase G2, cette phosphorylation est absente grâce à l'activation par Chk1 de la phosphatase PP2A/B56, responsable de sa déphosphorylation. L'équilibre entre Cdk2 et PP2A/B56 est déplacé en faveur de Cdk2 à la transition G2/M et le résidu T138 est phosphorylé. De plus, pendant cette transition, le résidu S287 devient déphosphorylé par la phosphatase PP1, ce qui va permettre la dissociation de 14-3-3, la translocation au noyau et l'activation partielle de Cdc25C. Une fois dans le noyau, Cdc25C va être phosphorylée d'avantage par d'autres kinases dont Plx1, MAPK et RSK2 et cela va promouvoir l'activation complète d'une sous-population de Cdc25 ayant comme résultat final l'activation de la boucle d'autoamplification du MPF.
(D'après Perry and Kornbluth, 2007).

C. PLK1

La kinase **Polo** fut décrite pour la première fois chez la drosophile, la mutation du gène *polo* conduisait à des défauts méiotique et mitotique (Sunkel and Glover, 1988). Polo est hautement conservée, il existe quatre isoformes de Polo chez les mammifères (trois isoformes Plx1, Plx2 et Plx3 chez le Xénope). Plx1 participe à l'activation du MPF. En effet, chez le Xénope, il a été montré que Plx1 phosphoryle et active Cdc25C, *in vitro* (Kumagai and Dunphy, 1996 ; Nakajima et al, 2003). L'immunodéplétion de Plx1 dans des extraits d'œufs de xénope supprime l'hyperphosphorylation de Cdc25C (Karaiskou et al, 1998 ; Karaiskou et al, 1999 ; Abrieu et al, 1998). Chez l'homme, Plk1 régule et phosphoryle Cdc25C sur la Ser198 présente dans la séquence NLS (Nuclear Localization Signal), ce qui permettrait le transport de Cdc25C dans le noyau en début de prophase, lorsque l'enveloppe nucléaire n'est pas encore rompue (Toyoshima-Morimoto et al, 2002). De plus, il a été mis en évidence que la Thr130 de Cdc25 (Thr138 chez le xénope) sert de site de liaison à Plk1 (Elia et al, 2003). Cependant l'activation de Polo n'est pas encore comprise et serait sous la dépendance du MPF (Abrieu et al, 1998 ; Karaiskou et al, 2004).

Outre son implication dans l'activation du MPF, Plk1 participe à de nombreux événements mitotiques tels que la séparation des centrosomes, l'assemblage du fuseau, la dissociation des cohésines et la cytodiérèse (pour revue, Archambault and Glover, 2009). Ces différents rôles sont accompagnés d'une localisation dynamique de Plk1 durant la division cellulaire. En effet, Plk1 se localise aux niveaux des centrosomes et des kinétochores en début de mitose pour aller ensuite au centre du fuseau et au midbody en fin de phase M.

D. GREATWALL

La découverte de la kinase **Greatwall** (Gwl) est assez récente. En effet, son gène fut mis en évidence chez la drosophile par analyse de mutants présentant des défauts de condensation des chromosomes (Yu et al, 2004). Le gène *gwl* code pour une Ser/Thr kinase appartenant à la famille MAST (Microtubule Associated Ser/Thr Kinase) des AGC kinases. La protéine Gwl est conservée chez les insectes et les vertébrés, mais n'est pas

présente chez C. *elegans*. L'analyse de mutants *gwl* chez la drosophile a montré une accumulation en mitose de neuroblastes. Néanmoins, les auteurs ont également observé un grand nombre de cellules en G2/M ce qui suggérait que ces mutants avaient des défauts aux niveaux de la progression mitotique et de l'entrée en mitose (Yu et al, 2004). Il semblait donc que Gwl était une kinase importante au niveau de l'entrée en mitose et également durant la progression mitotique. L'analyse phénotypique à partir de mutants Gwl ou à l'aide de siRNA chez la drosophile a montré des défauts de formation du fuseau mitotique accompagnés d'une mauvaise congression et ségrégation des chromosomes (Yu et al, 2004 ; Bettencourt-Dias et al, 2004). Gwl fut ensuite étudiée dans le système *in vitro* des extraits d'œufs de xénope.

Les premières études menées chez le xénope ont montré que Gwl était phosphorylée dans des extraits d'œufs de xénope arrêtés en métaphase II. Gwl est capable de s'autophosphoryler, de plus, les résidus Glycine 41 et Aspartate 173 sont nécessaires à son activité puisque les mutations G41S et D173A inactivent la protéine (Yu et al, 2006). D'autre part, l'immunodéplétion de Gwl des extraits arrêtés en métaphase II induit une inactivation du MPF sans dégradation de la cycline B, due à l'accumulation des phosphorylations inhibitrices de Cdk1. Par ailleurs, l'immunodéplétion de Gwl des extraits d'œufs de xénope cyclants ne permet pas l'entrée en mitose de ces extraits. Les phénotypes induits par l'immunodéplétion de Gwl peuvent être sauvés par l'addition de Gwl ou partiellement sauvé par l'addition de la forme constitutivement active de Cdk1 (Yu et al, 2006). De plus, il a été mis en évidence que le MPF phosphoryle Gwl *in vitro* et que cette phosphorylation pourrait contribuer à l'activation de Gwl (Yu et al, 2006). Ces observations suggérèrent que Gwl pourrait participer à la boucle d'activation du MPF selon deux hypothèses : Gwl pourrait agir comme un effecteur négatif de Myt1 et Wee1 ou pourrait participer à l'activation de Cdc25.

A la transition G2/M, Gwl peut induire une phosphorylation partielle de Cdc25 indépendamment du MPF. En effet, en absence de la cycline B et d'activité du MPF, une légère phosphorylation de Cdc25 dépendante de Gwl est observée, suggérant que Gwl pourrait induire l'étape initiale de phosphorylation de Cdc25. Cependant, Cdc25 n'est pas un substrat direct de Gwl suggérant qu'elle agit de manière indirecte sur la phosphorylation de Cdc25. Néanmoins, elle est indépendante de Plx1 ou MAPK puisque

l'immunodéplétion de Plx1 ou l'inhibition de la voie Mos-MAPK n'empêchent pas la phosphorylation de Cdc25 (Zhao et al, 2008).

Notons que chez l'homme aucun orthologue de Gwl n'était connu lorsque notre travail a commencé. Cependant par son homologie de séquence il avait été proposé que l'orthologue humain de Gwl est **MAST-L** (Microtubule-Associated Ser/Thr Kinase Like) dont le rôle était peu connu. Deux publications à propos de MAST-L montraient que la mutation E167D dans le domaine N-terminal de MAST-L est associée à une thrombocytopénie autosomale dominante chez l'humain, qui correspond à une diminution du nombre de plaquettes sanguines (Gandhi et al, 2003). Cette mutation affecte le développement des thrombocytes (Johnson et al, 2009).

E. PP2A

Structure de PP2A

La phosphatase **PP2A** appartient à la famille des phosphoprotéines phosphatases (PPP). C'est un complexe trimérique, composé d'une sous-unité catalytique (sous-unité C), d'une sous-unité non catalytique « plateforme » (sous-unité A, ou PR65) et d'une sous-unité qui détermine le substrat (sous-unité B). Les sous-unités B sont divisées en trois sous-familles : B (PR55/B55), B' (PR56/B56) et B'' (PR72), chacune de ces sous-unités possèdent des isoformes (Figure 10). Les sous-unités A et C ont également de nombreux isoformes, de ce fait on peut distinguer un grand nombre d'holoenzymes de PP2A suggérant que PP2A à de nombreux rôles biologiques. En effet, PP2A joue un rôle dans le développement, la prolifération cellulaire, la mobilité cellulaire, la dynamique du cytosquelette et le cycle cellulaire (Janssens and Goris, 2001).

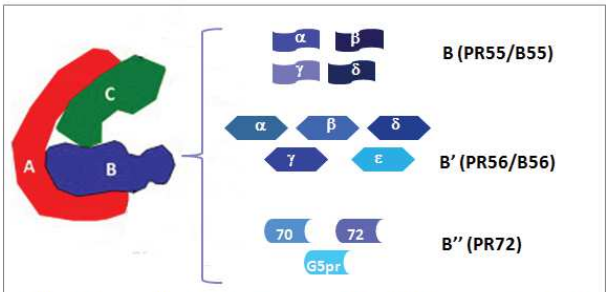


Figure 10: Structure et diversité du complexe PP2A. Le complexe PP2A est composé d'une sous unité catalytique (sous unité C), d'une sous unité échafaudage (sous unité A) et d'une sous unité régulatrice (sous unité B). Les sous-unités B sont divisées en trois sous-familles : B (PR55/B55), B'(PR56/B56) et B'' (PR72), chacune de ses sous-unités possèdent différents isoformes. Les sous-unités A et C possèdent également des isoformes. *(D'après Virshup and Shenolikar, 2009)*

Fonctions de PP2A au cours de la mitose

PP2A joue un rôle important dans la régulation de la mitose au niveau de l'entrée et de la sortie de celle-ci. Le rôle régulateur de PP2A à la transition G2/M a été mis en évidence chez le xénope et l'étoile de mer grâce à l'utilisation de l'acide okadaique (Goris et al, 1989; Picard et al, 1989). Il a été montré que l'inhibition de PP2A par l'acide okadaique dans des extraits d'œufs de xénope interphasiques conduisait à l'activation du complexe cycline B/Cdk1 et bloquait la déphosphorylation de Cdc25 suggérant que PP2A régule négativement le MPF en maintenant Cdc25 déphosphorylée et donc sous forme inactive (Clarke et al, 1993 ; Felix et al, 1990). Des études chez la levure, on montré que la diminution d'activité de PP2A induit une entrée prématurée en mitose probablement due à l'activation de Cdc25 (Kinoshita et al, 1990 ; Kinoshita et al, 1993). D'autre part, l'inhibition de PP2A par l'addition d'acide okadaique, dans des extraits d'œufs de xénope arrêtés en métaphase II, induit la dégradation de la cycline B et la sortie de mitose (Lorca et al, 1991). De plus une augmentation de l'activité de PP2A conduit à la ségrégation des chromosomes chez la levure (Kinoshita et al, 1990). Le mutant du gène *cdc55* chez la levure, lequel code pour une sous unité régulatrice de PP2A présente une séparation des chromatides sœurs prématurée et une sortie de mitose malgré la présence du point de contrôle du fuseau mitotique actif (Minshull et al, 1996). La sortie de mitose de ce mutant se fait en absence de dégradation de la cycline B à travers l'inactivation de CDC28 (Cdk1). Des études récentes ont également montré que la sous unité B55δ participe à l'entrée et la sortie de mitose (Mochida et al, 2009). En effet, l'immunodéplétion de PP2A/B55δ dans des extraits d'œufs de xénope cyclants accélère l'entrée en mitose et l'immunodéplétion de cette sous unité dans des extraits arrêtés en métaphase II induit un retard important dans la sortie de mitose (Mochida et al, 2009).

Notons que PP2A participe également à la cohésion des chromatides sœurs (pour revue, Nasmyth et al, 2005) (cf chapitre 3).

III. REGULATION DU MPF EN FONCTION DE SA LOCALISATION SUBCELLULAIRE

L'hypothèse actuelle sur l'activation du MPF propose qu'en plus de la régulation par phosphorylation et déphosphorylation du complexe cycline B/Cdk1, la localisation subcellulaire du complexe cycline B/Cdk1 influencerait son activation. En phase G2, le complexe cycline B1/Cdk1 naviguerait entre le noyau et le cytoplasme, l'export nucléaire étant plus important que l'import nucléaire, la cycline B1 se trouverait majoritairement dans le cytoplasme (Hagting et al, 1998). La translocation nucléaire de cycline B/Cdk1 en fin de phase G2 serait une étape nécessaire à l'entrée en mitose car c'est dans le noyau que le complexe serait activé par l'action de la phosphatase Cdc25, alors que les kinases inhibitrices Myt1 et Wee1 resteraient dans le cytoplasme pendant cette transition (Kornbluth et al, 1994 ; Liu et al, 1997 ; Fattaey and Boher, 1997 ; Baldin and Ducommun, 1995).

Cependant, des données récentes montrent que le MPF est d'abord activé dans le cytoplasme et qu'il est ensuite rapidement transporté dans le noyau où il s'accumule. Cette accumulation dépend de l'importation continuelle du complexe indépendamment de Plk1. L'importation du complexe cycline B1/Cdk1 serait produite par une modification générale de la machinerie d'importation. De plus, un pool important de cycline B1/Cdk1 resterait dans le cytoplasme même au moment où l'import nucléaire est le plus fort (Gavet and Pines, 2010).

Contrairement à cycline B1/Cdk1, la localisation cycline B2/Cdk1 semble restreinte à l'appareil de Golgi en interphase et en mitose (Jackman et al, 1995). L'expression dans des cellules de chimères entre la cycline B1 et B2 montre que la spécificité de fonction de ces deux cyclines dépend principalement de leur localisation subcellulaire : une cycline B1 dirigée vers l'appareil de Golgi se conduit comme une cycline B2 alors qu'une cycline B2 libérée de l'appareil de Golgi assure les fonctions cytoplasmiques de la cycline B1 (Draviam et al, 2001). En effet, la cycline B1 participe à la transition G2/M et à la séparation des centrosomes alors que la cycline B2 participe à la fragmentation de l'appareil de Golgi.

CHAPITRE 3 : LA TRANSITION METAPHASE-ANAPHASE ET LE POINT DE CONTROLE DU FUSEAU MITOTIQUE

Un des évènements clefs de la mitose est la transition métaphase-anaphase où le matériel génétique doit être correctement partagé entre les deux cellules sœurs. Ce partage de l'ADN est assuré d'une part, par l'attachement des kinétochores aux fibres du fuseau et d'autre part, par un mécanisme de surveillance qui va s'assurer que cet attachement est correct. Ce mécanisme de surveillance est nommé **Spindle Assembly Checkpoint** ou **SAC**.

I. ATTACHEMENT DES KINETOCHORES AUX FIBRES DU FUSEAU MITOTIQUE

A. LE FUSEAU MITOTIQUE

Le fuseau mitotique est une structure bipolaire symétrique constituée de polymères, de **microtubules** qui s'organisent autour des pôles formés par les **centrosomes**. Les microtubules sont formés de dimères de tubuline (α et β) qui sont orientés, les extrémités (-) sont ancrées aux niveaux des centrosomes. On distingue trois types de microtubules, les microtubules interpolaires, les microtubules kinétochoriens et les microtubules astraux (Figure 11). Les microtubules interpolaires viennent des pôles opposés et interagissent entre eux dans la partie médiane du fuseau pour assurer la bipolarité. Les microtubules kinétochoriens rattachent les paires de chromatides sœurs par une structure appelée **kinétochore** aux centrosomes. Il a récemment été proposé que des microtubules kinétochoriens puissent être générés à partir de polymérisation issue des kinétochores et indépendamment des centrosomes.

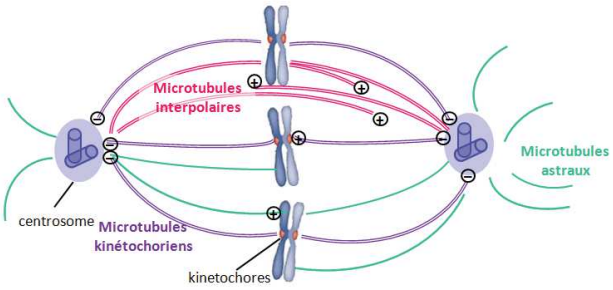


Figure 11: Organisation du fuseau mitotique: Le fuseau est composé de microtubules astraux (vert), kinétochoriens (violet) et interpolaires (rose) .

Ce mécanisme permet d'accélérer l'accrochage des chromosomes en début de mitose (Goshima and Kimura, 2010). Les microtubules astraux rayonnent autour des pôles et ancrent le fuseau au cortex cellulaire, permettant de déterminer l'axe de la division cellulaire.

B. LES KINETOCHORES

Le **kinétochore** est une structure multiprotéique se formant au niveau des centromères des chromosomes. Cette structure se met en place durant la mitose, participe à l'attachement des microtubules. Elle est un point d'assemblage des protéines impliquées dans le point de contrôle du fuseau mitotique.

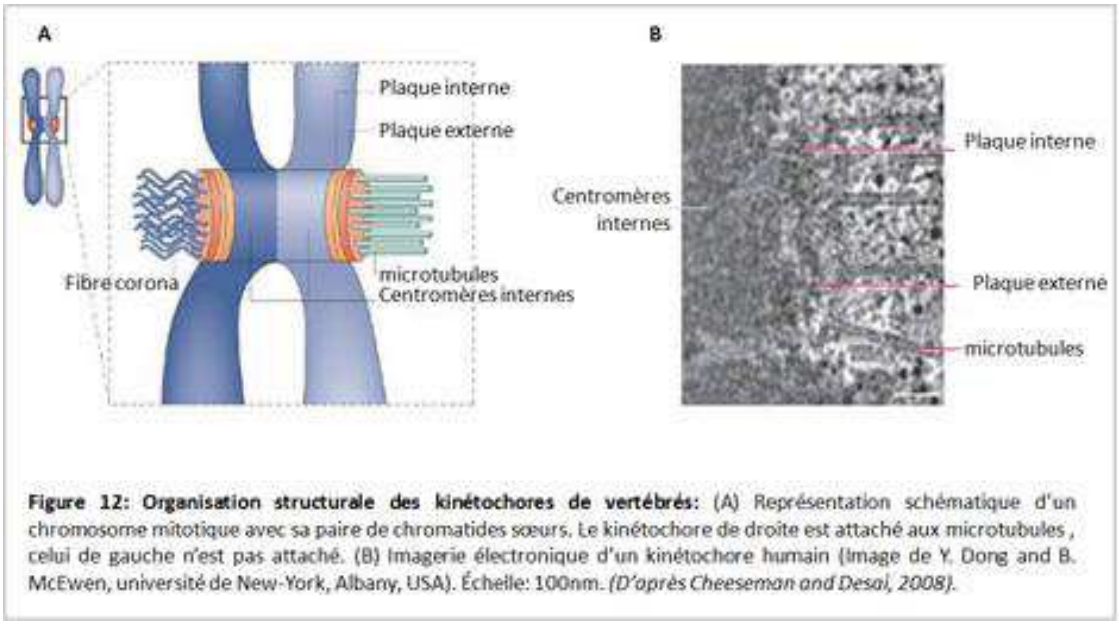


Figure 12: Organisation structurale des kinétochores de vertébrés: (A) Représentation schématique d'un chromosome mitotique avec sa paire de chromatides sœurs. Le kinétochore de droite est attaché aux microtubules, celui de gauche n'est pas attaché. (B) Imagerie électronique d'un kinétochore humain (Image de Y. Dong and B. McEwen, université de New-York, Albany, USA). Échelle: 100nm. *(D'après Cheeseman and Desai, 2008).*

L'organisation générale du kinétochore a été mise en évidence par microscopie électronique (Dong et al, 2007). Le kinétochore dévoile une structure trilamellaire formée d'une plaque interne, d'une plaque externe et d'un matériel fibrillaire, appelé corona qui s'étend sur toute la surface de la plaque externe (Figure 12). La plaque interne accolée à l'ADN centromérique permet l'organisation spécialisée de la chromatine centromérique. Les kinétochores sont constitués de nucléosomes formés d'octamères de **Cenp-A** (Centromeric Protein A) et d'histone H3 autour desquelles s'enroulent les molécules d'ADN. Cenp-A s'associe à des protéines centromériques pour former un réseau de protéines constitutives des centromères ou **CCNA** (Constitutive

Centromere Associated Network). Au niveau de la plaque interne se trouve également des protéines non constitutives qui s'associent aux centromères uniquement en mitose comme les protéines **KNL-1** et le complexe **Mis12** (pour revue, Cheeseman et al, 2004 ; Maiato et al, 2004). La plaque externe et la corona comprennent des composants stables comme le complexe Ndc80-Nuf2, ainsi que des composants dynamiques comme les MAPs et les protéines du point de contrôle du fuseau mitotique (pour revue Maiato et al, 2004). KNL-1, le complexe Mis12 et le complexe Ndc80-Nuf2 forment le réseau KMN qui est une structure stable du kinétochore. Cenp-A permet le recrutement des complexes KNL-1 et Mis12 sur la plaque interne des kinétochores et du complexe Ndc80-Nuf2 sur la plaque externe. Mis12 est associé à KNL-1 et au complexe Ndc80-Nuf2 mais contrairement à KNL-1 et Ndc80-Nuf2, Mis12 ne lie pas directement les microtubules aux kinétochores (Figure 13A). Ensemble ces complexes permettent l'attachement des microtubules aux kinétochores (Emanuele et al, 2005 ; pour revue, Cheeseman et al, 2004 ; Maiato et al, 2004). D'autres composants dynamiques se trouvent aux kinétochores tels que la kinésine Cenp-E et la dynéine/dynactine qui sont impliquées dans l'attachement des microtubules et dans la régulation de leur dynamique (Figure 13B).

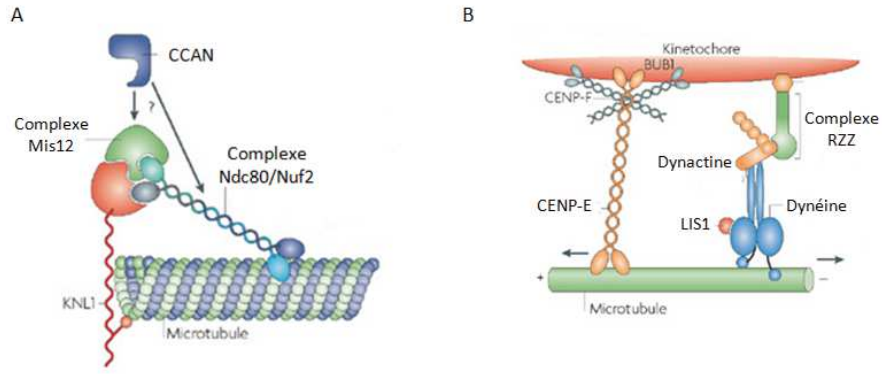


Figure 13: Attachement des kinétochores aux microtubules: (A) Le complexe CCAN localisé au kinétochore lie le microtubule via le réseau KMN composé de KNL-1, du complexe Mis12 et du complexe Ndc80/Nuf2. KNL-1 et le complexe Ndc80/Nuf2 s'associent directement aux kinétochores. (B) Les moteurs Cenp-E et Dynéine interviennent dans l'interaction kinétochore-microtubule et contribuent à l'alignement des chromosomes grâce à leur force exercée. *(D'après Cheeseman and Desai, 2008)*

C. CAPTURE DES KINETOCHORES PAR LES FIBRES DU FUSEAU MITOTIQUE

Deux modèles différents qui expliqueraient les mécanismes de capture des kinétochores par les fibres du fuseau mitotique ont été décrits : le modèle de recherche et capture ainsi que le modèle d'auto-assemblage.

a. Modèle de recherche et capture des kinétochores

Le modèle de **« recherche et capture »** est le modèle conventionnel qui fut le premier décrit (Waters et al, 1996). Ce modèle propose que la nucléation des microtubules ait lieu au niveau des centrosomes. Les microtubules sont continuellement soumis à l'instabilité dynamique et leur extrémité (+) s'allongent dans des directions aléatoires de l'espace cellulaire à la recherche de kinétochores. Lorsque les kinétochores ont capturés les microtubules ils se stabilisent et guident les autres microtubules. A la capture d'un kinétochore, le chromosome va migrer le long du microtubule vers le pôle correspondant. Quand le kinétochore est capturé par un microtubule du pôle opposé, le chromosome est alors bi-orienté et commence sa congression au centre du fuseau (pour revue, Biggins and Walczak, 2003 ; Maiato and Sunkel, 2004) (Figure 14A).

Modèle de congression assistée

D'autre part, dans des cellules de mammifères, il a été montré qu'un chromosome mono-orienté peut être transporté le long d'un microtubule kinétochorien d'un chromosome déjà bi-orienté et aligné à l'aide de la kinésine **Cenp-E**. Cenp-E est associée au kinétochore et se déplace le long du microtubule vers l'extrémité (+) de celui-ci, facilitant ainsi la capture du deuxième kinétochore du chromosome mono-orienté (Kapoor et al, 2006) (Figure 14B).

b. Modèle d'auto-assemblage

Plus récemment un autre modèle a été décrit s'appuyant sur la capacité **« d'auto-assemblage »** du fuseau mitotique, car différentes observations ne pouvaient pas expliquer le modèle précédemment décrit. En effet, la formation de fuseaux bipolaires était observée en absence de centrosome (Heald et al, 1996 ; Karsenti et al, 1984 ;

Khodjakov et al 2000 ; Nicklas and Gordon, 1985). Ce mécanisme d'assemblage du fuseau intervient de manière physiologique dans le système méiotique où il n'y a pas de centrosomes (McKim and Hawley, 1995). Dans ce modèle, les microtubules nucléés à proximité des chromosomes peuvent être capturés par les kinétochores et ensuite former deux pôles sous l'action de moteurs protéiques liés aux microtubules (Heald et al, 1996 ; Khodajkov et al, 2003 ; Walczak et al, 1998) (Figure 14C). Cette voie n'est pas exclusive aux cellules dépourvues de centrosomes. En effet, dans des cellules somatiques de vertébrés, le fuseau mitotique est capable de s'assembler correctement après ablation des centrosomes (Khodjakov et al, 2000 ; Hinchcliffe et al 2001). Il semble donc que ces deux voies d'assemblage du fuseau puissent coexister dans une même cellule.

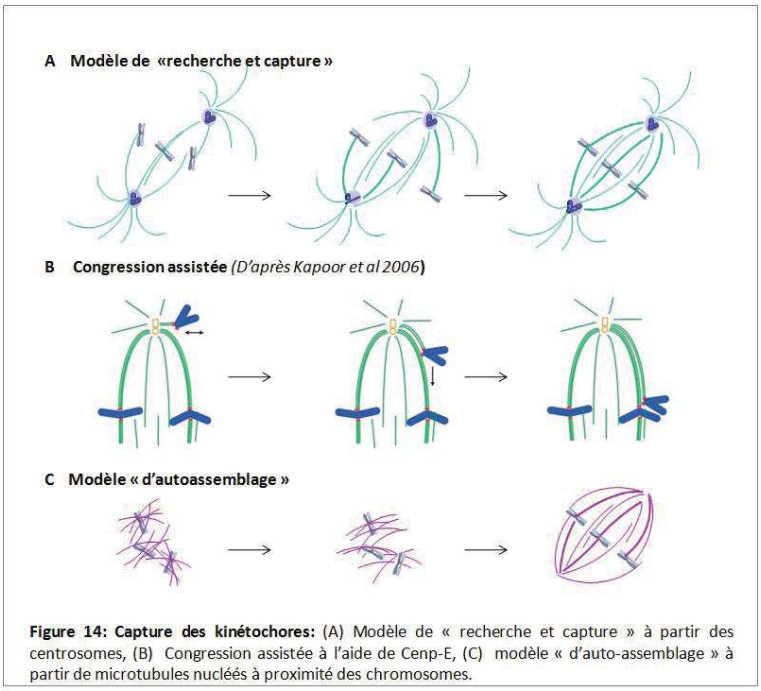


Figure 14: Capture des kinétochores: (A) Modèle de « recherche et capture » à partir des centrosomes, (B) Congression assistée à l'aide de Cenp-E, (C) modèle « d'auto-assemblage » à partir de microtubules nucléés à proximité des chromosomes.

A. LES ERREURS D'ATTACHEMENT

Comme les microtubules rencontrent les kinétochores au hasard, les erreurs d'attachements sont fréquentes (Cimini et al, 2003). Pour que chaque cellule fille possède un même patrimoine génétique, la cellule doit assurer une ségrégation correcte des chromatides sœurs. Pour cela, les chromosomes doivent établir un attachement **amphitélique**, c'est-à-dire que chaque kinétochore frère est relié à un centrosome opposé. Cependant, la cellule effectue parfois des erreurs d'attachement des

kinétochores que l'on nomme **monotélique,** lorsque seulement un kinétochore est attaché ; **syntéliques** lorsque les deux kinétochores sont attachés au même pôle et enfin **mérotélique** lorsque le même kinétochore est attaché aux deux pôles (Figure 15). Les défauts d'attachement sont souvent corrigés avant l'anaphase grâce à la kinase **Aurora-B** et ses protéines associées INCENP (Inner Centromeric Protein), Survivine et Boréaline (Adams et al, 2001a ; Honda et al, 2003 ; pour revue, Vagnarelli and Earnshaw, 2004). Ce complexe localisé au niveau des centromères surveille la tension exercée sur les kinétochores et permet la déstabilisation des attachements incorrects dans le but d'obtenir un attachement amphitélique des chromosomes (Lampson et al, 2004 ; Murata-Hori and Wang, 2002 ; Tanaka et al, 2002).

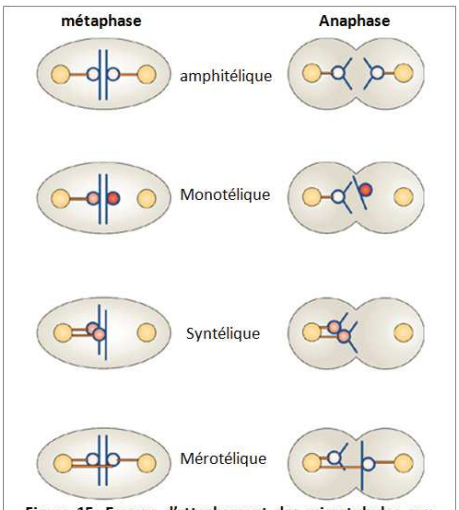


Figure 15: Erreurs d'attachement des microtubules aux kinétochores: Attachement amphitélique: chaque kinétochore frère est relié à un pôle opposé. Attachement monotélique: un seul kinétochore est relié à un pôle. Attachement syntélique: les deux kinétochores sont reliés au même pôle. Attachement mérotélique: le même kinétochore est attaché aux deux pôles. *(Adapté de Musacchio and Salmon, 2007)*

II. POINT DE CONTROLE DU FUSEAU MITOTIQUE : « SPINDLE ASSEMBLY CHECKPOINT » (SAC)

La capture des kinétochores par les microtubules est un processus aléatoire, de ce fait tous les chromosomes n'achèvent pas leur bi-orientation et n'atteignent pas la plaque métaphasique simultanément. Pourtant, la séparation des chromatides sœurs de tous les chromosomes se fait de manière synchrone au moment de l'entrée en anaphase, permettant la ségrégation équitable des chromosomes pour ne pas induire une perte ou un gain d'un ou plusieurs chromosomes dans les cellules filles (aneuploïdie). Cet

évènement indique que la cellule possède un mécanisme lui permettant de retarder le déclenchement de l'anaphase jusqu'à ce que tous les chromosomes soient alignés sur la plaque métaphasique. Ce mécanisme est le **point de contrôle du fuseau mitotique** ou **« Spindle Assembly Checkpoint » (SAC)**.

Le point de contrôle du fuseau mitotique empêche l'entrée prématurée en anaphase en inhibant le clivage des **cohésines**. Les cohésines sont des complexes protéiques qui maintiennent ensemble les chromatides sœurs. Le clivage de ces complexes va donc permettre la **séparation des chromatides sœurs**. L'activation du SAC permet donc de prévenir la séparation des chromatides sœurs tant que tous les chromosomes ne sont pas correctement attachés et alignés sur la plaque métaphasique. Ce point de contrôle permet de ralentir la progression mitotique pour corriger les erreurs d'attachements et permettre la bi-orientation des chromosomes (pour revue, Chan and yen, 2003 ; Cleveland et al, 2003 ; Musacchio and Hardwick, 2002). Pour cela, il génère un signal qui va inhiber l'ubiquitine ligase APC/C. Cette inhibition va empêcher l'activation de la protéase **Séparase** responsable du clivage des cohésines et permettre ainsi de maintenir l'attachement entre les chromatides sœurs.

Ce mécanisme de surveillance est fondamental pour la cellule car son absence conduit à l'aneuploïdie des cellules responsable de certains cancers.

A. DEGRADATION DES SECURINES : SEPARATION DES CHROMATIDES SOEURS

La cohésion des chromatides sœurs est assurée par des complexes multiprotéiques appelés **Cohésines**. Ces complexes chargés sur l'ADN en phase S, se localisent au niveau des centromères mais aussi sur les bras des chromosomes (Nasmyth et al, 2002 ; Vass et la, 2003, pour revue, Hoque and Ishikawa, 2002 ; Nasmyth et al 2000 ; Nasmyth et al, 2005). Les cohésines sont composés des protéines **Scc1**/Rad21/Mcd1, **Scc3** (Sister chromatid cohesion), **Smc1** et **Smc3** (Structural maintenance of chromosome). Les sous unités Smc1 et Smc3 forment un hétérodimère en anneau autour des deux molécules d'ADN, maintenu fermé par Scc1 et Scc3 (Haering et al, 2002 ; pour revue, Uhlmann et al, 2003) (Figure 16).

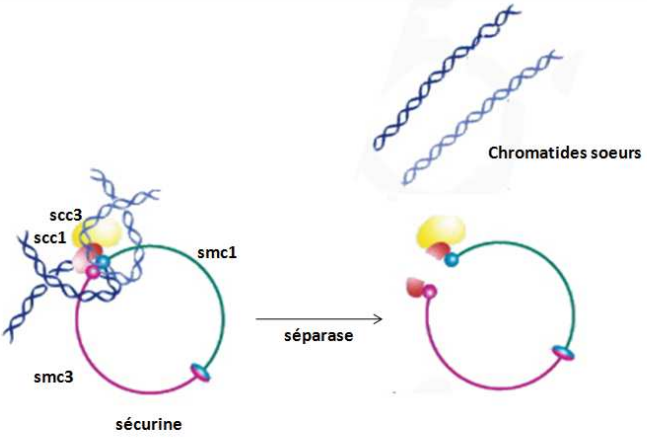


Figure 16: Les complexes cohésines et chromatides sœurs. Les complexes cohésines sont constitués des protéines Scc1, Scc3, Smc1, Smc3. Smc1 et Smc3 forment un hétérodimère en forme d'anneau qui est maintenu fermé par Scc1 et Scc3, et entourent les deux molécules d'ADN. L'action de la séparase clive Scc1, ouvre la structure en anneau et libère les chromatides sœurs. *(D'après Uhlmann et al, 2003)*

La séparation des chromatides sœurs s'effectue en deux temps :

Durant la prophase, les chromosomes se condensent et s'individualisent. Parallèlement à cela, Aurora-B et Plk1 phosphorylent les sous unités Scc1 et Scc3 induisant la dissociation des complexes cohésines le long des bras des chromosomes (Losada et al, 2000 ; Sumara et al, 2002). Seuls les complexes cohésines situés au niveau des centromères perdurent. Ainsi durant la métaphase, la liaison entre les chromatides sœurs est seulement assurée par les centromères.

La présence des complexes cohésines aux kinétochores est assurée par la protéine Sgo1 (Shugoshin). En prophase, Sgo1 empêche la dissociation des cohésines des kinétochores en recrutant la phosphatase PP2A qui déphosphoryle les phosphorylations de Plk1 et Aurora-B des sous unités Scc1 et Scc3 (Watanabe and Kitajima, 2005 ; Kitajima et al, 2005 ; McGuinness et al, 2005 ; Salic et al, 2004 ; Kitajima et al, 2006 ; Riedel et al, 2006) (Figure 17).

Pendant les phases précoces de la mitose, la **Séparase** est associée à la **Sécurine** ce qui bloque l'activité de la Séparase. A la transition métaphase-anaphase la Sécurine est ubiquitinylée par l'APC/C et dégradée par le protéasome permettant le clivage de la sous

unité Scc1 de la cohésine et la dissociation de ce complexe des kinétochores (Hornig et al, 2002 ; Jager et al, 2001 ; Uhlmann et al, 1999 ; Waizenegger et al, 2002).

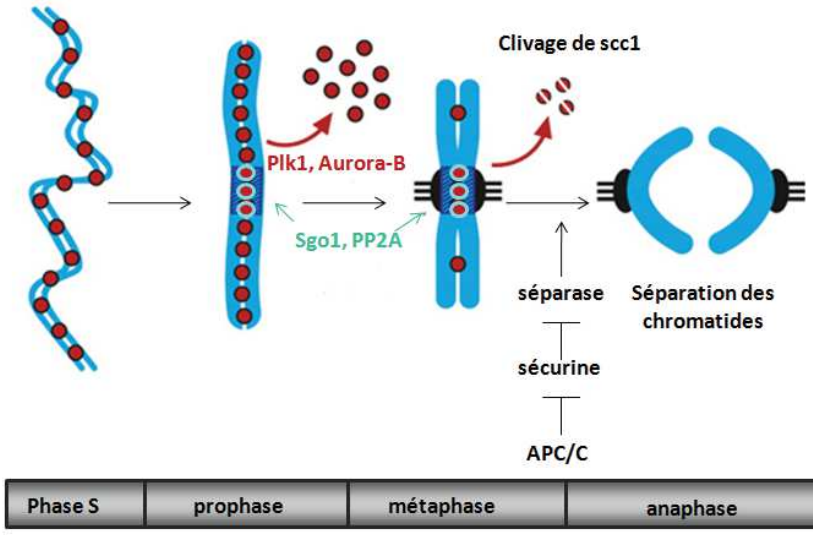


Figure 17: Séparation des chromatides sœurs. Les complexes de cohésines sont localisés sur les bras des chromatides sœurs et au niveau des centromères, et leur dissociation est régulée différemment. En prophase, la dissociation des cohésines associés aux bras des chromosomes dépend de Plk1 et Aurora-B. A la transition métaphase-anaphase , la dissociation des cohésines centromériques dépend de l'activation de la Séparase qui clive Scc1. L'activation de la Séparase est dépendante de la dégradation de la Sécurine via l'APC/C. La perte de cohésion des bras conduit à l'individualisation des chromatides sœurs et la perte de cohésion des centromères induit leur séparation en anaphase. Sgo1 (Shugoshin) et PP2A permettent de protéger les centromères de la dissociation des cohésines induite par Plk1 et Aurora-B en prophase. *(D'après Peters et al, 2008)*

Chez les mammifères, la dégradation de la Sécurine n'est pas suffisante pour induire la séparation des chromatides sœurs qui nécessite également la dégradation de la cycline B. Il a été montré que cycline B-Cdk1 est capable de phosphoryler et d'inhiber la Séparase et que la dégradation de la cycline B à l'entrée en anaphase permet l'activation de la Séparase et la séparation des chromatides sœurs chez les mammifères et dans les extraits d'ovocytes de xénope (Chang et al, 2003 ; Gorr et al, 2005 ; Stemman et al, 2001). Ceci peut être la raison pour laquelle la Sécurine n'est pas essentielle chez les mammifères (Jallepalli et al, 2001 ; Mei et al, 2001). La Sécurine et cycline B-Cdk1 peuvent lier la Séparase de manière exclusive suggérant que ces deux mécanismes peuvent être redondants durant la mitose (Gorr et al, 2005 ; Holland et al, 2006).

B. EVENEMENTS SURVEILLES PAR LE SAC : TENSION ET ATTACHEMENT

Le non attachement des kinétochores fut rapidement proposé comme source du signal inhibiteur de l'entrée en anaphase induit par le point de contrôle du fuseau mitotique (Zirkle, 1970). Cependant, certains travaux montrent que le SAC est également sensible à la tension exercée sur les kinétochores par les microtubules (Figure 18). Ainsi, le mode d'activation de ce point de contrôle par l'attachement ou la tension est très controversé (pour revue, Pinsky and Biggins, 2005 ; Musacchio and Salmon, 2007).

La controverse est alimentée par le fait que tension et attachement sont des évènements difficilement séparables au vu de leur interdépendance. En effet, les kinétochores non attachés ne sont pas sous tension et la tension affecte les attachements en stabilisant et en augmentant le nombre de microtubules attachés aux kinétochores (King and Nicklas, 2000 ; Nicklas and Ward, 1994). L'absence de tension pourrait donc activer le SAC directement par un mécanisme détectant la tension ou indirectement en altérant les attachements et en créant des kinétochores occupés partiellement par les microtubules.

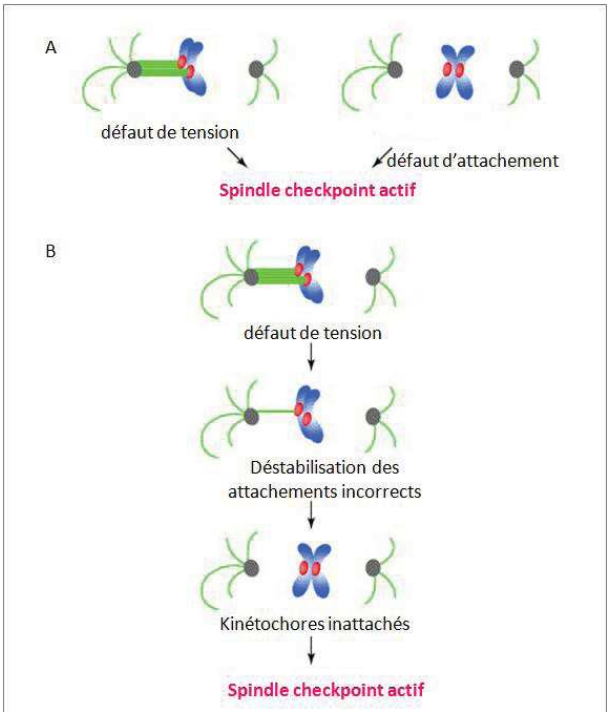


Figure 18: Deux modèles d'activation du spindle Assembly checkpoint: (A) Un défaut d'attachement ou de la tension conduit à l'activation du spindle checkpoint. (B) Un défaut de la tension percu par la cellule et conduit à la déstabilisation de l'attachement inapproprié. Cette déstabilisation crée un kinétochore non attaché lequel entraîne l'activation du spindle checkpoint. *(Adapté de Pinsky and Biggins, 2005)*

Pour étudier ces mécanismes, des drogues affectant la polymérisation des microtubules sont utilisées pour manier l'attachement et la tension et ainsi activer le SAC. Le nocodazole, le benomyl et la colchicine dépolymérisent les microtubules et sont donc utilisés pour créer des kinétochores non attachés. Le taxol et la vinblastine stabilisent les microtubules, créant ainsi des kinétochores attachés mais qui ne sont pas sous tension.

Les travaux qui suggèrent que l'activation du SAC se fait par l'attachement ont été réalisés dans les cellules PtK (Potorous tridactilus Kidney, cellules de rein de kangourou). L'observation de cellules PtK en mitose montre que la présence d'un kinétochore non attaché retarde l'entrée en anaphase (Rieder et al, 1994). De plus, la destruction au laser du dernier kinétochore non attaché induit l'entrée en anaphase dans un délai similaire à celui d'une cellule dont tous les chromosomes sont bi-orientés (Rieder et al, 1995). Or le dernier chromosome mono-orienté a son kinétochore restant qui n'est pas sous tension et pourtant le checkpoint est satisfait et permet l'entrée en anaphase. Il se peut tout de même que ce kinétochore soit sous tension grâce à des facteurs comme les chromokinésines liant les microtubules aux bras des chromosomes. Ces résultats ont récemment été étayés par une étude réalisée dans des cellules HeLa MUG. Les cellules MUG sont des cellules qui ne possèdent qu'un centromère car la réplication n'a pas eu lieu et ne peuvent donc réaliser que des attachements monotéliques ou mérotéliques. Malgré la présence d'attachements monotéliques ou mérotéliques, ces cellules présentent un SAC satisfait et permet l'entrée en anaphase (O'Connell et al, 2008).

Plus récemment, des marqueurs fluorescents ont été utilisés pour étudier le rôle de la tension dans la satisfaction du SAC (Uchida et al, 2009). Des marqueurs de protéines de différentes régions du kinétochores permettent de distinguer l'étirement entre les deux paires de kinétochores (inter-kinétochores) ou l'espace au sein même du kinétochore (intra-kinétochoriens) (Figure 19). Dans les cellules humaines, la suppression de la tension intra-kinétochorienne par addition d'une faible concentration de nocodazole induit le maintien du SAC (Uchida et al, 2009). Une autre expérience réalisée dans les cellules de drosophile S2 montre que lorsqu'une faible concentration de taxol est utilisée, la tension intra-kinétochorienne reste inchangée alors que la tension inter-kinétochorienne diminue et dans ces conditions le SAC est satisfait (Maresca and Salmon, 2009). Par ailleurs une forte concentration de taxol réduit les tensions intra et inter-kinétochoriennes induisant le maintien de l'activation du SAC alors que tous les

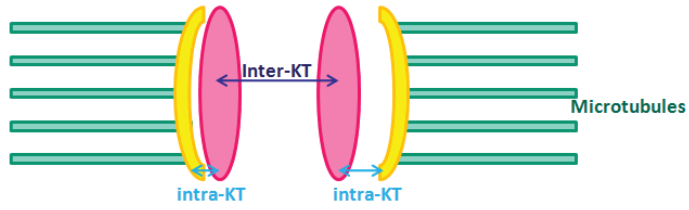


Figure 19: Représentation schématique des tensions inter et intra-kinétochoriennes. *(Adapté de Mc Ewen and Dong, 2009)*

kinétochores sont attachés (Maresca and Salmon, 2009). Ces deux expériences suggèrent donc que la tension au sein d'un même kinétochore est suffisante pour satisfaire le SAC, alors que la tension inter-kinétochorienne n'est pas nécessaire.

La question de qui, l'attachement et/ou de la tension, active(nt) le checkpoint reste à résoudre. Chez le xénope, il n'existe qu'une voie de signalisation du checkpoint activée par les défauts d'attachement. En effet, l'ajout de taxol dans des extraits d'œufs de xénope n'active pas le SAC (Minshull et al, 1994). Alors que dans les cellules humaines, il pourrait y avoir deux voies de signalisation, l'une déclenchée par les défauts de tension et l'autre par les défauts d'attachement des kinétochores (pour revue, Pinsky and Biggins, 2005).

C. COMPOSANTS MOLECULAIRES IMPLIQUES DANS LE POINT DE CONTROLE DU FUSEAU MITOTIQUE

Les premières protéines impliquées dans le SAC ont été identifiées chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* grâce à des cribles génétiques qui ont permis la caractérisation de mutants. Ces mutants étaient capables de séparer leurs chromatides sœurs et de sortir de mitose malgré la présence de défauts du fuseau mitotique induits par des drogues dépolymérisant les microtubules. Ces cribles ont permis d'identifier les gènes ***MAD1***, ***MAD2*** *et* ***MAD3*** *(**BubR1**,* Bub1-related Kinase chez l'humain*)* (Mitotic Arrest Deficient) ainsi que ***BUB1*** *et* ***BUB3*** (Budding Unihibited by Benzimidazole) (Hoyt et al, 1991 ; Li and Murray, 1991). Les gènes impliqués dans le SAC sont fortement conservés chez les eucaryotes supérieurs. Cependant, le SAC est plus complexe chez les vertébrés, car il fait intervenir des protéines qui ne sont pas retrouvées chez la levure. Parmi ces composants, **Cenp-E** (Abrieu et al, 2000 ; Putkey et al, 2002).et **Rod** (Rough Deal), **Zw10** (Zeste white 10) et **Zwilch** qui forment le complexe **RZZ** (Basto et al, 2000 ; Chan et al, 2000 ; Karess and Glover, 1989 ; Williams et al 1992 ; Williams et al 2003).

Les protéines du SAC interagissent avec la plaque externe des kinétochores non attachés, cependant les interactions entre les différentes protéines du checkpoint et leur interdépendance vis-à-vis de leur recrutement sont très complexes et rendent leur hiérarchisation difficile (Figure 20).

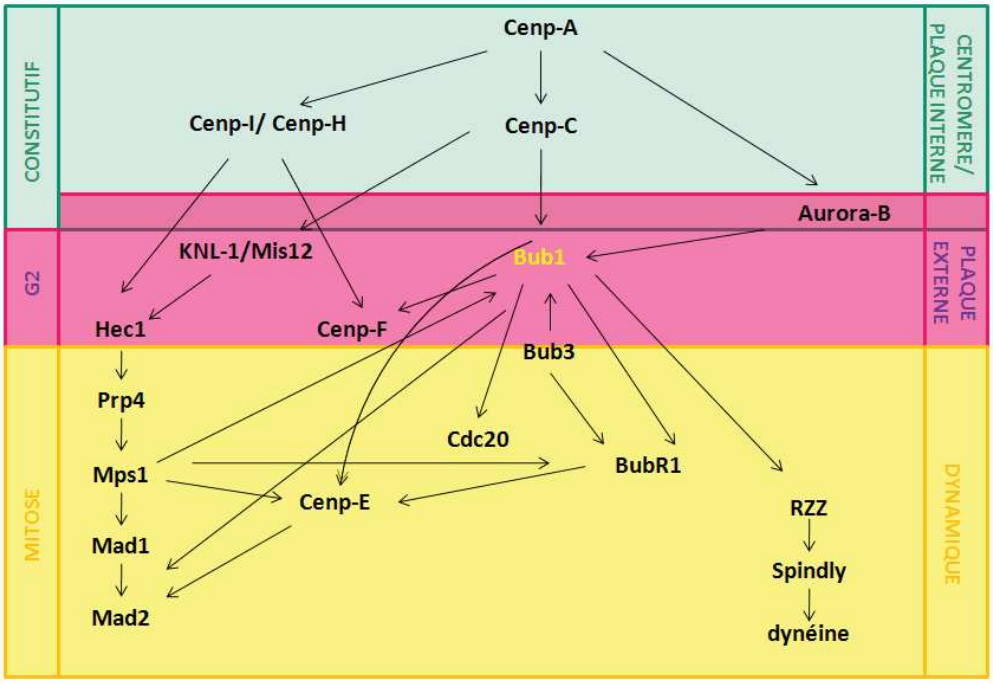


Figure 20: .Interdépendance des protéines du checkpoint

Les protéines du checkpoint ont largement été étudiées dans plusieurs modèles par immunodéplétion, siRNA ou mutation, afin d'observer la conséquence de leur inhibition sur la localisation des autres protéines du SAC. Les résultats obtenus ne sont pas toujours cohérents d'un système à l'autre. En général, les résultats obtenus chez le xénope montrent une interdépendance plus importante que dans les autres modèles (Vigneron et al, 2004 ; Sharp-Baker and Chen 2001). Le kinétochore est une structure solide non soluble ce qui rend l'étude biochimique des interactions entre les protéines difficiles. D'autre part, la nature transitoire et instable des différents complexes rajoute une difficulté à leur hiérarchisation. Néanmoins, certains complexes ont été identifiés comme Mad1-Mad2, Bub3-Bub1, Bub3-BubR1, BubR1-Cenp-E et Rod-ZW10-Zwilch (RZZ) (pour revue, Shah et al, 2000). Il a été également montré que Mad1-Mad2 est recruté par Hec1, dans les cellules humaines (Martin-Lluemsa et al, 2002). Enfin, Bub3 forme un complexe avec Bub1 et BubR1 et est requise pour leur recrutement (Campbell and Hardwick, 2003 ; Taylor et al, 1998) (Figure 21).

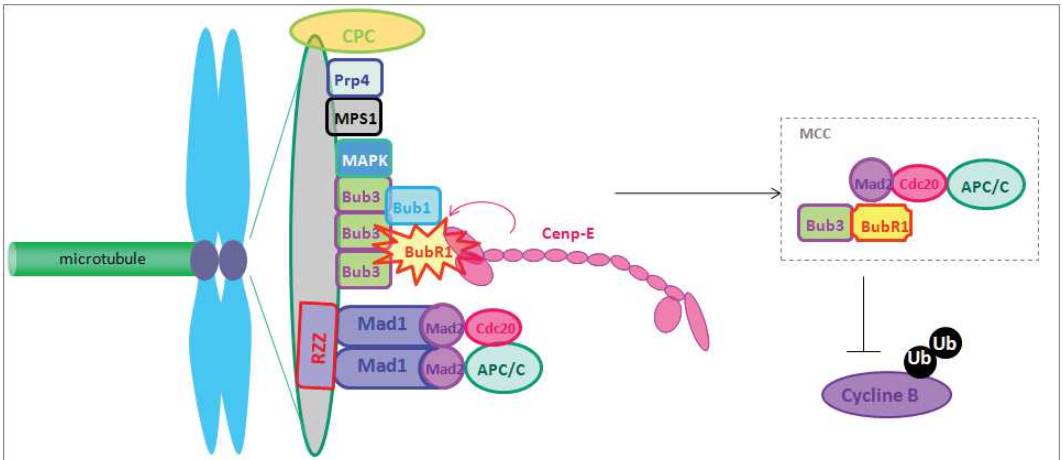


Figure 21: Activation du point de contrôle du fuseau mitotique. Les kinétochores non attachés aux microtubules induisent le recrutement aux kinétochores des protéines du checkpoint. Le complexe Mitotic Checkpoint Complex (MCC: Mad2-Cdc20-BubR1 et Bub3) inhibe l'APC et donc la dégradation de la cycline B. le complexe RZZ est composé des protéines Rod, ZW10 et Zwilch, et le CPC (Chromosomal passenger complex) est composé des protéines dites « passagères »: Aurora-B, Incenp, Survivine et Boréaline.

Dans les extraits d'ovocytes de xénope, les observations faites par les expériences d'immunodéplétion de protéines du checkpoint ont mis en évidence qu'il n'existait qu'une seule voie de signalisation du SAC. En effet, l'immunodéplétion d'Aurora-B induit la délocalisation de toutes les protéines du SAC (Vigneron et al, 2004). Chez l'homme, certaines études suggèrent que deux voies différentes d'activation du SAC existent, l'une dépendante de l'attachement et l'autre de la tension, cependant la différence entre ces deux voies n'est pas si évidente et certaines protéines participeraient à ces deux voies de signalisation (pour revue, Pinsky and Biggins, 2005).

Mad2 dans la voie de l'attachement

Dans les cellules humaines, des études ont montré que **Mad2** localise aux niveaux des kinétochores non attachés en prométaphase et disparait des kinétochores en métaphase lorsque les kinétochores sont attachés aux pôles du fuseau (Chen et al, 1996 ; Li et al, 1996). Mad2 a été proposé comme marqueur des kinétochores non attachés. En effet, il a été mis en évidence que Mad2 est recrutée aux kinétochores non attachés via son interaction avec Mad1, alors que Mad2 ne semble pas être recruté aux kinétochores en absence de tension (Chen et al, 1998 ; Waters et al, 1998 ; Skoufias et al, 2001).

BubR1, Bub1 et Aurora-B dans la voie de la tension

Le traitement des cellules de mammifère au taxol et à la vinblastine, qui induisent la perte de tension des kinétochores, conduit à l'accumulation de **BubR1** et **Bub1** aux kinétochores (Skoufias et al, 2001 ; Shannon et al, 2002 ; Logarinho et al, 2004 ; Taylor et al, 2001). Néanmoins, ces traitements peuvent également affecter l'attachement des microtubules aux kinétochores.

Dans les cellules humaines, l'inhibition d'**Aurora-B** à l'aide des inhibiteurs Hesperadine et ZM447439 ou par siRNA, en présence de nocodazole, maintient le SAC actif. Alors qu'en présence de taxol ou monastrol, les cellules sortent de mitose suggérant qu'Aurora-B participe à la voie de la tension plutôt que de l'attachement (Hauf et al, 2003 ; Ditchfield et al, 2003).

Interconnexion de Mad2, Bub1 et BubR1 entre les voies de l'attachement et de la tension

D'après les expériences décrites précédemment, il semble que Mad2 interviennent au niveau de la voie de l'attachement et BubR1 et Bub1 au niveau de la voie de la tension. Cependant d'autres études présentent des résultats discordants avec ces observations.

En effet, des cellules traitées au monastrol, qui induit la formation d'attachements syntéliques, montrent une accumulation de Mad2 sur les kinétochores attachés qui ne sont pas sous tension (Kapoor et al, 2000). Ainsi, Mad2 ne localiserait pas exclusivement sur les kinétochores non attachés.

De plus, l'inhibition de BubR1 par microinjection d'anticorps anti-BubR1 ou par siRNA dans des cellules humaines en présence de nocodazole induit l'inactivation du SAC et la délocalisation de Mad1, Mad2 et Bub1 aux kinétochores (Chan et al, 1999 ; Chen et al, 2002 ; Meraldi et al, 2004).

Enfin, la perte d'attachement par le nocodazole induit le recrutement de Bub1 aux kinétochores (Taylor et al, 2001). Et l'inhibition de Bub1 par siRNA, en présence de

défaut d'attachement, induit la délocalisation des protéines du checkpoint BubR1, Cenp-E et Mad2 (Johnson et al, 2004).

Notons que l'inhibition d'Aurora-B par siRNA conduit à un phénotype plus sévère qu'avec l'utilisation des drogues. En effet, l'inhibition d'Aurora-B par siRNA induit une délocalisation de BubR1, Cenp-E et Mad2 des kinétochores et un arrêt en métaphase en présence de nocodazole et taxol (Ditchfield et al, 2003). Ce qui indique qu'Aurora-B pourrait jouer sur les voies de l'attachement et de la tension et que l'utilisation de drogues ou de siRNA affecterait de différentes manières ces deux voies.

Cenp-E, un cas particulier

Dans les cellules humaines, la présence de taxol ou nocodazole induit l'arrêt en métaphase malgré l'absence **de Cenp-E**, ce qui suggère que Cenp-E ne participe pas à la voie du SAC (Tanudji et al, 2004). D'autre part, l'inhibition de l'expression de Cenp-E par le système Cre recombinase dans les cellules MEF (Mouse Embryonic Fibroblast) induit la délocalisation de Mad1, Mad2 et BubR1 des kinétochores et le maintien du SAC si de nombreux kinétochores ne sont pas attachés (Weaver et al, 2003). Notons que l'injection d'anticorps anti-Cenp-E dans des cellules humaines ne conduit pas à la délocalisation de Mad1, Mad2, Bub1 et BubR1 des kinétochores (McEwen et al, 2001). Contrairement à ce qui a été observé dans les cellules humaines, dans les extraits d'ovocytes de xénope l'immunodéplétion de Cenp-E est requise pour la localisation de Mad1, Mad2, BubR1, Mps1, Bub1 et Bub3 aux kinétochores et également pour le maintien de l'activité du SAC (Abrieu et al, 2000 ; Mao et al, 2003 ; Vigneron et al, 2004).

En résumé, il apparait que chez le xénope, il n'existe qu'une seule voie de signalisation sensible à l'attachement (Minshull et al, 1994 ; Vigneron et al, 2004), alors que dans les cellules humaines, une différence entre attachement et tension pourrait exister. Néanmoins, cette différence n'est drastique qu'à la vue de l'implication de certaines protéines dans les deux voies d'activation du checkpoint.

D. COMPLEXE DU POINT DE CONTROLE MITOTIQUE : « MITOTIC CHECKPOINT COMPLEX »

Les kinétochores non attachés et qui ne sont pas sous tension induisent le recrutement des protéines du checkpoint et la localisation de ces protéines sur les kinétochores permettant la formation d'un signal inhibiteur de l'APC/C pour empêcher la dégradation de la cycline B et de la Sécurine et par conséquent l'entrée en anaphase.

Ce signal fait intervenir le complexe du point de contrôle mitotique (ou **MCC** Mitotic Checkpoint Complex), composé des protéines **BubR1, Mad2, Bub3 et Cdc20.** Ce complexe a été isolé biochimiquement dans les cellules HeLa et chez la levure comme facteur inhibiteur de l'APC/C (Fraschini et al, 2001 ; Hardwick et al, 2000 ; Millband and Hardwick, 2002 ; Sudakin et al 2001). L'APC est inactif au cours des phases S et G2, il acquiert son activité au moment de l'entrée en mitose, notamment par la phosphorylation de plusieurs de ses sous unités par le MPF et par son interaction avec Cdc20 (pour revue, Peters et al, 2002). Cependant lorsque le SAC est activé le recrutement des protéines du checkpoint aux kinétochores permet aux protéines BubR1, Mad2 et Bub3 de s'associer à Cdc20 pour inhiber son action d'effecteur de l'APC (Sudakin et al, 2001) (Figure 22).

Les différentes protéines du checkpoint sont recrutées et activées aux kinétochores, ce qui laisse penser que le signal inhibiteur du checkpoint est aussi activé au niveau de cette structure cellulaire. Cependant, bien que les kinétochores aient été montrés comme indispensables à la signalisation du checkpoint, leur implication dans la formation du MCC est très controversée puisqu'il a été montré qu'ils pouvaient se former indépendamment des kinétochores dans les cellules humaines (Meraldi et al, 2004).

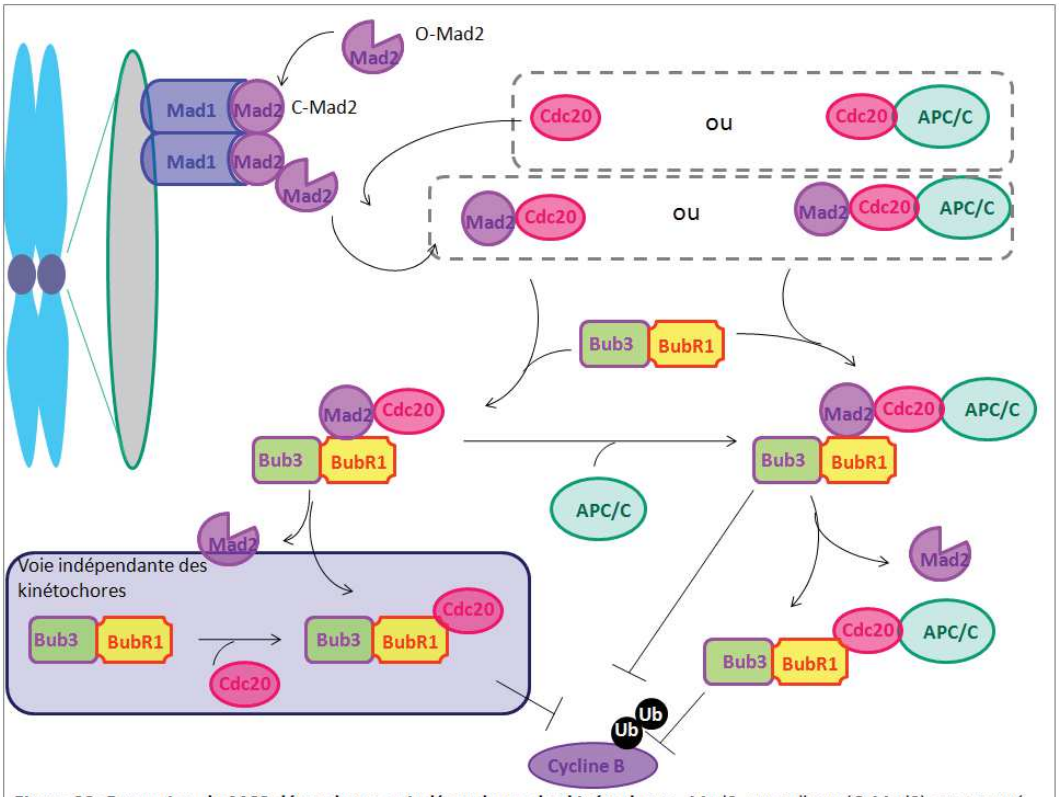


Figure 22: Formation du MCC dépendante et indépendante des kinétochores. Mad2 cytosolique (O-Mad2) est recruté par Mad1 aux kinétochores, et change de conformation en C-Mad2 ce qui va permettre le recrutement d'un second O-Mad2 qui pourra se lier à Cdc20 et être libéré dans le cytoplasme. Le complexe transitoire Mad2-Cdc20 favorise le transfert de Cdc20 à BubR1 inhibant ainsi la capacité de Cdc20 à activer l'ubiquitinylation de la cycline B par l'APC. (*D'après Kulukian et al, 2009*)

a. Formation du MCC dépendante des kinétochores

Lorsque le recrutement aux kinétochores de certaines protéines du checkpoint ne s'effectue pas correctement, le SAC n'est pas actif (Meraldi et al, 2004 ; Vigneron et al, 2004). Il existe donc un lien entre le SAC et la localisation de ces différents composants aux kinétochores.

Des expériences de FRAP (Fluorescence Recovery After Photobleaching) sur la localisation de Cdc20 et ses partenaires BubR1, Mad2 et Bub3 montrent que ces protéines sont très dynamiques contrairement à Mad1 et Bub1 qui s'associent aux kinétochores de manière plus stable (Howell et al, 2004 ; Kallio et al, 2002). Il semblerait que le fait qu'une fraction de Cdc20 localise aux kinétochores (Vigneron et al, 2004) permet la formation de complexes Mad2-Cdc20 aux kinétochores grâce à Mad1 pour ensuite être libéré dans le cytoplasme.

Formation des complexes Mad2-Cdc20 à partir des complexes Mad1-Mad2

En effet, il a été montré que Mad1 et Cdc20 possédaient le même motif de liaison à Mad2. Ce motif interagit avec un domaine situé en queue C-terminale de Mad2. L'association de Mad1 ou Cdc20 à Mad2 induit le même changement conformationnel de la queue C-terminale de Mad2 (Luo et al, 2000 ; Luo et al, 2002 ; Sironi et al, 2002). En effet, Mad2 existe sous deux formes : la forme libre, nommée O-Mad2 (open) et la forme liée, nommée C-Mad2 (closed). En plus de son domaine de liaison à Mad1 et Cdc20, Mad2 possède un domaine d'oligomérisation. Deux molécules de la même conformation ne sont pas capables de dimériser. Il semble donc que la forme O-Mad2 recrutée par Mad1 sur les kinétochores non attachés change de conformation en C-Mad2. C-Mad2 liée à Mad1 permet le recrutement d'un second O-Mad2 qui pourra ensuite se lier à Cdc20 et être libérée dans le cytoplasme (De Antoni et al, 2005). Ce modèle permet d'expliquer pourquoi il existe deux populations de Mad2 : une stable aux kinétochores associé à Mad1 et une dynamique dans le cytoplasme associé à Cdc20 (Shah et al, 2004 ; Kulukian et al, 2009). Des études récentes montrent que la phosphorylation de Mad2 en C-terminal empêcherait son changement de conformation et donc sa capacité de liaison à Cdc20 (Kim et al, 2010). Ainsi, des complexes C-Mad2-Cdc20 se trouvent dans le cytoplasme et peuvent également servir de matrice pour le recrutement de O-Mad2 libres et permettre la formation de nouveau complexe C-Mad2-Cdc20 (Figure 23). Ce modèle pourrait expliquer l'amplification du signal inhibiteur de l'APC/C. De plus, il a récemment été suggéré que Mps1 favoriserait la liaison entre Mad1 et Mad2 et serait essentiel au recrutement de O-Mad2 (Hewitt et al, 2010).

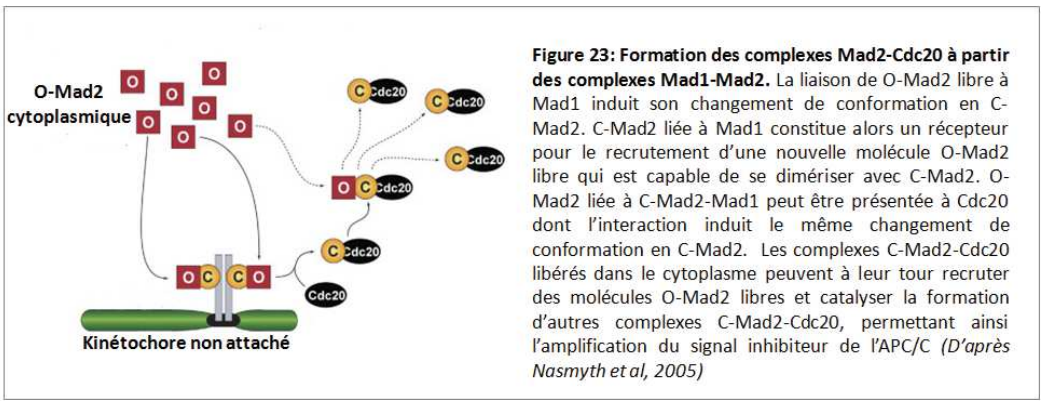


Figure 23: Formation des complexes Mad2-Cdc20 à partir des complexes Mad1-Mad2. La liaison de O-Mad2 libre à Mad1 induit son changement de conformation en C-Mad2. C-Mad2 liée à Mad1 constitue alors un récepteur pour le recrutement d'une nouvelle molécule O-Mad2 libre qui est capable de se dimériser avec C-Mad2. O-Mad2 liée à C-Mad2-Mad1 peut être présentée à Cdc20 dont l'interaction induit le même changement de conformation en C-Mad2. Les complexes C-Mad2-Cdc20 libérés dans le cytoplasme peuvent à leur tour recruter des molécules O-Mad2 libres et catalyser la formation d'autres complexes C-Mad2-Cdc20, permettant ainsi l'amplification du signal inhibiteur de l'APC/C *(D'après Nasmyth et al, 2005)*

Modèle d'inhibition directe de l'APC/C

Différentes études ont montré que l'inhibition de l'APC/C^{Cdc20} est régulé par la liaison de Mad2 et BubR1 à Cdc20 (Li et al, 1997 ; Fang et al, 1998 ; 1998 ; Kim et al, 1998). D'autre part, il a été mis en évidence la présence de complexe BubR1-Bub3-Cdc20, Mad2-Cdc20 et BubR1-Bub3-Mad2-Cdc20-APC *in vivo* dans des cellules dont le SAC était activé (Sudakin et al, 2001 ; Tang et al, 2001). Une récente étude menée *in vitro* suggère que les kinétochores facilitent la liaison de Mad2-BubR1-Bub3 à l'APC/C (Kulukian et al, 2009). Le MCC est présent à la fois en interphase et en mitose, néanmoins il n'est pas associé à l'APC durant l'interphase, ce qui suggère que le MCC peut se former indépendamment des kinétochores (Sudakin et al, 2001).

b. Formation du MCC indépendante des kinétochores

Dans les cellules humaines, il a été suggéré que le MCC pouvait aussi s'assembler en absence d'action du kinétochore (Meraldi et al, 2004 ; Sudakin et al, 2001). D'autre part, des travaux ont montré que Cdc20 pouvait former un complexe soit avec BubR1 soit avec Mad2 (Fang et al, 2002 ; Tang et al 2001). Ces observations pourraient s'expliquer par les différentes techniques de purification utilisées, ou par le fait que Cdc20 pourrait former des sous complexes BubR1-Bub3-Cdc20 et Mad2-Cdc20 qui s'assembleraient ensuite pour former le MCC. Une étude menée dans les cellules HeLa qui consistait à mesurer la durée de la mitose, suggère que Mad2 et BubR1 peuvent inhiber l'APC/C indépendamment de leur recrutement aux kinétochores et de leur fonction dans le SAC (Meraldi et al, 2004). L'inhibition de Mad2 ou de BubR1 accélère la durée de la mitose dans toutes les cellules et conduit à un défaut du SAC (Méraldi et al, 2004). Ces deux phénotypes peuvent être découplés. Lorsque le recrutement de Mad2 et BubR1 aux kinétochores est bloqué et que ces protéines sont présentes dans le cytoplasme cela conduit seulement à l'altération du SAC, dans ces conditions les protéines Mad2 et BubR1 contrôlent correctement la durée de la mitose (Meraldi et al, 2004). Ces résultats suggèrent que le rôle de Mad2 et BubR1 dans la fonctionnalité du checkpoint est dépendante des kinétochores et ces deux protéines régulent également la durée de la mitose de manière indépendante des kinétochores. Étant donné la synergie de Mad2 et BubR1 il semble qu'elles puissent agir dans un complexe cytoplasmique qui pourrait

être le MCC (Meraldi et al, 2004 ; Kulukian et al, 2009). Cependant, Bub3 qui fait parti du MCC n'agit pas sur la durée de la mitose. Finalement, il a également été suggéré que Mad2 et BubR1 pouvaient lier directement et indépendamment Cdc20 (Fang et al, 2002).

Une étude récente a mis en évidence que le MCC était associé à Cdc20 en phase G2, ce qui inhiberait l'APC/C^{Cdc20} (Malureanu et al, 2009). Il semble donc que le MCC interphasique permette d'inhiber l'APC/C^{Cdc20} en G2 permettant l'accumulation de la cycline B. Ainsi, il permettait l'inactivation rapide de l'APC dès l'entrée en mitose, ce signal sera amplifié par le MCC formé aux kinétochores par le SAC.

E. INACTIVATION DU POINT DE CONTROLE

Le point de contrôle du fuseau mitotique est actif jusqu'à ce que tous les chromosomes soient capturés correctement par les microtubules et alignés sur la plaque métaphasique (Figure 24). L'inactivation du point de contrôle est associée à l'activation de l'APC/C, la dégradation de la Sécurine et la séparation des chromatides sœurs.

Un des mécanismes proposé pour l'inactivation du SAC concerne les protéines Cenp-E, BubR1 et Mad2. En effet, lorsque Cenp-E est attachée à un microtubule sous tension, elle n'est plus capable d'activer BubR1 (Mao et al, 2005). D'autre part, lorsque le SAC est satisfait, Mad1 et Mad2 sont délocalisées des kinétochores et relocalisées aux pôles du fuseau (Shah et al, 2004). De plus, il a été montré qu'après satisfaction du SAC, Mad2 est phosphorylée. Cette phosphorylation conduirait à sa dissociation de Mad1 et empêche sont association avec l'APC/C^{Cdc20} (Wassmann et al, 2003).

Un autre mécanisme d'inactivation du SAC implique l'activité de la protéine $p31^{comet}$. En effet, la protéine **$p31^{comet}$** peut se lier à la forme C-Mad2 (liée) associée à Mad1 ou Cdc20 inactivant ainsi le SAC (Xia et al, 2004 ; Yang et al, 2007). Cette association via $p31^{comet}$ pourrait impliquer la poly-ubiquitinylation de Cdc20 de manière APC/C dépendante. Dans ce modèle, l'ubiquitinylation de Cdc20 pourrait permettre le changement de conformation de C-Mad2 (liée) en O-Mad2 (libre)

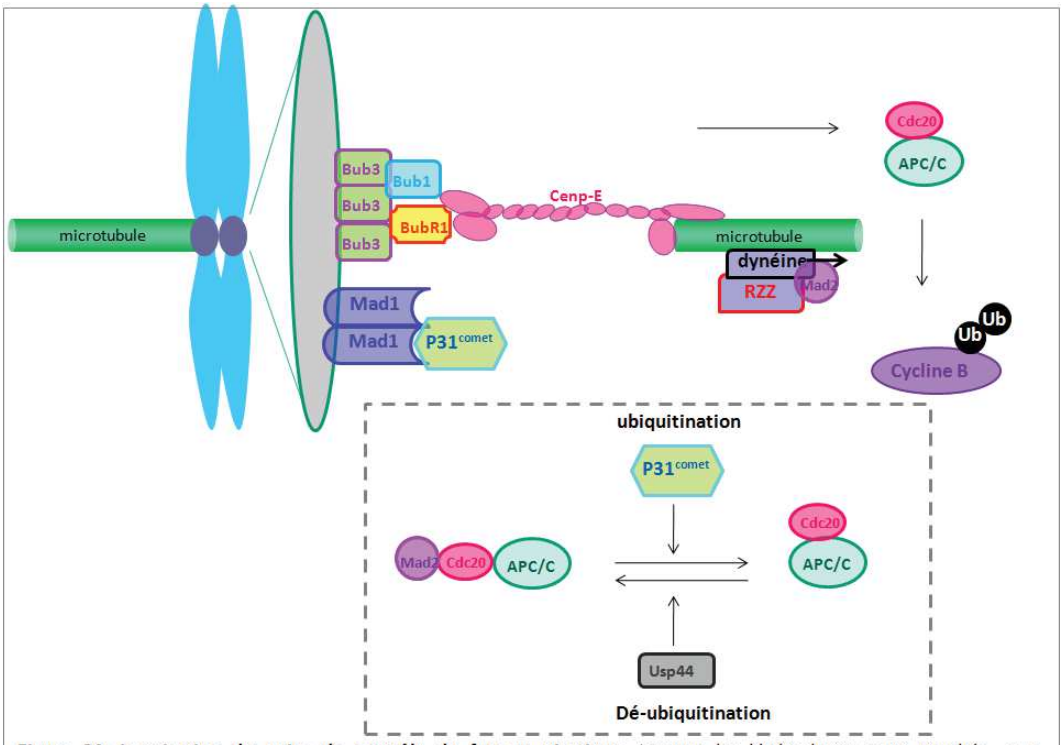


Figure 24: Inactivation du point de contrôle du fuseau mitotique. Lorsque les kinétochores sont attachés aux microtubules le SAC est inactivé . Le MCC se dissocie permettant l'activation de l'APC/C et la dégradation de la cycline B.

CHAPITRE 4 : L'OVOCYTE DE XENOPE COMME MODELE D'ETUDE DU SPINDLE ASSEMBLY CHECKPOINT

I. LA MEIOSE DANS L'OVOCYTE

La méiose consiste en la succession de deux cycles de division sans phase de réplication entre les deux, donnant naissance à quatre cellules haploïdes. Chez les vertébrés, à chaque division, une seule des deux cellules filles conserve la majeure partie du cytoplasme, ce qui forme une grosse cellule comportant la moitié du génome et une petite cellule possédant l'autre moitié du matériel génétique et un peu de cytoplasme que l'on appelle le globule polaire (GP).

La prophase de la méiose est composée de différents stades : leptotène, zygotène pachytène et diplotène, ce dernier est le stade dans lequel l'ovocyte est bloqué jusqu'au moment de l'ovulation. L'ovocyte bloqué en prophase présente un noyau volumineux appelé vésicule germinative et contient des chromosomes partiellement condensés. Les chromosomes homologues maternels et paternels sont associés au niveau des chiasmas qui ont permis les recombinaisons d'ADN lors du pachytène.

Au cours de cet arrêt en prophase, l'ovocyte synthétise et accumule une grande quantité de matériel nécessaire au développement du futur embryon : ARNm, protéines et réserves énergétiques sous forme de vitellus qui provoque l'augmentation de la taille de l'ovocyte. L'ovocyte de xénope mesure 50 μm de diamètre en début de vitellogénèse et atteint 1,2 mm en fin de croissance où il présente une pigmentation noire correspondant à l'hémisphère animal. Ces critères de tailles et de pigmentation ont été utilisés pour définir six stades de croissance chez cette espèce de I à VI (Dumont, 1972) (Figure 24). A partir du stade V, l'ovocyte est compétent pour reprendre la méiose après stimulation hormonale par la progestérone qui déclenche la maturation méiotique.

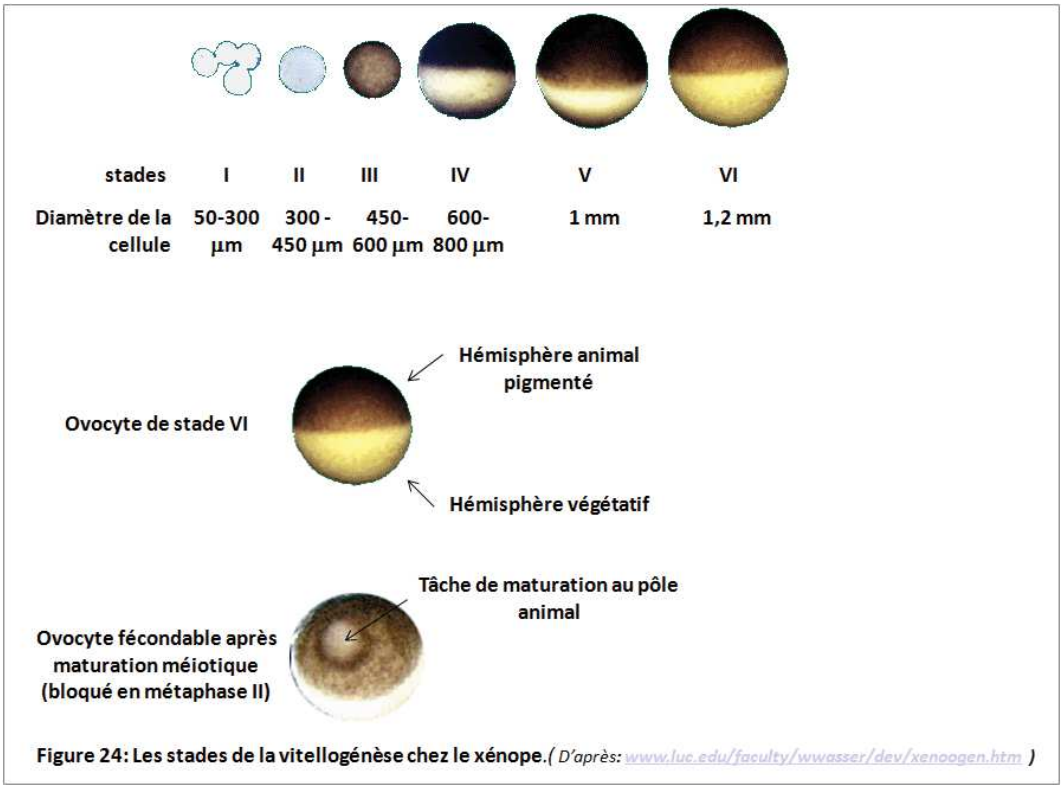


Figure 24: Les stades de la vitellogénèse chez le xénope. *(D'après: www.luc.edu/faculty/wwasser/dev/xenoogen.htm)*

La **maturation méiotique** débute par la rupture de la vésicule germinative, appelée GVBD (Germinal Vesicle Breakdown), provoquant l'apparition d'une tâche dépigmentée au pôle animal de l'ovocyte. Les chromosomes se condensent et un fuseau de métaphase I se forme. L'ovocyte se divise de manière asymétrique libérant un premier globule polaire, puis sans phase S intermédiaire et sans reformation de noyau, l'ovocyte entre dans la deuxième division de méiose. Le fuseau de métaphase II se forme et l'ovocyte se bloque à nouveau à ce stade en attendant la fécondation (Figure 26).

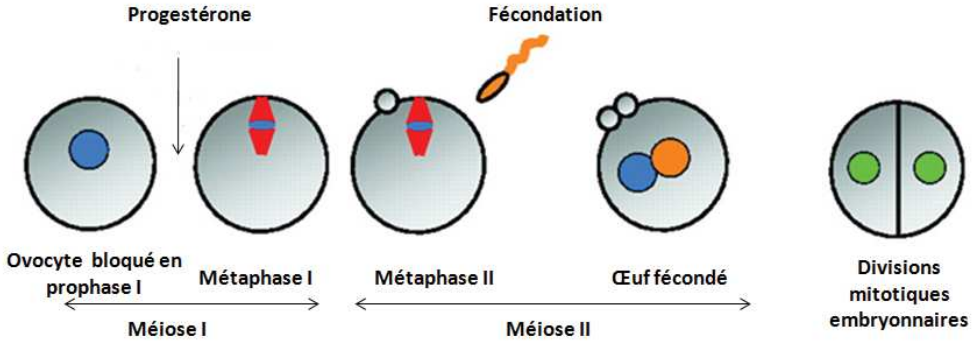


Figure 26: La maturation méiotique. Les ovocytes bloqués en prophase de Méiose I sont stimulés par la progestérone, ce qui conduit à la maturation méiotique. Les ovocytes vont achevés la Méiose I et commencer la Méiose II pour se bloquer en métaphase II afin d'attendre la fécondation. Après fécondation, les divisions mitotiques embryonnaires commencent. *(D'après Schmidt et al, 2006)*

II. L'ARRET EN METAPHASE II

A. CARACTERISTIQUES L'ARRET EN METAPHASE II

En 1971, les expériences de Masui et Market ont mis en évidence l'**activité CSF** (CytoStatic Factor) en parallèle à celle du MPF dans les ovocytes d'amphibiens. En effet, ils ont injecté un blastomère d'un embryon au stade deux cellules avec le cytoplasme d'un ovocyte mature non fécondé. Le blastomère injecté arrête ses divisions et reste bloqué en métaphase. A partir de ces résultats, les auteurs ont déduit qu'il existait un facteur cytoplasmique présent dans l'ovocyte en métaphase II qui permettait d'arrêter la division et qu'ils ont nommé facteur « cytostatique » (Masui and Market, 1971) (Figure 27). L'activité CSF permet de maintenir une activité élevée du MPF en empêchant la dégradation de la cycline B par l'inhibition de l'APC/C. Le mécanisme par lequel l'APC/C est inhibé durant l'arrêt CSF a longtemps été méconnu, mais de récentes études ont mis en évidence que la protéine **Emi2** ou **Erp1** (Early Mitotic Inhibitor 2/ Emi1 Related Protein 1) est l'inhibiteur de l'APC/C responsable de cet arrêt (Rauh et al, 2005 ; Schmidt et al, 2005 ; Tung et al, 2005).

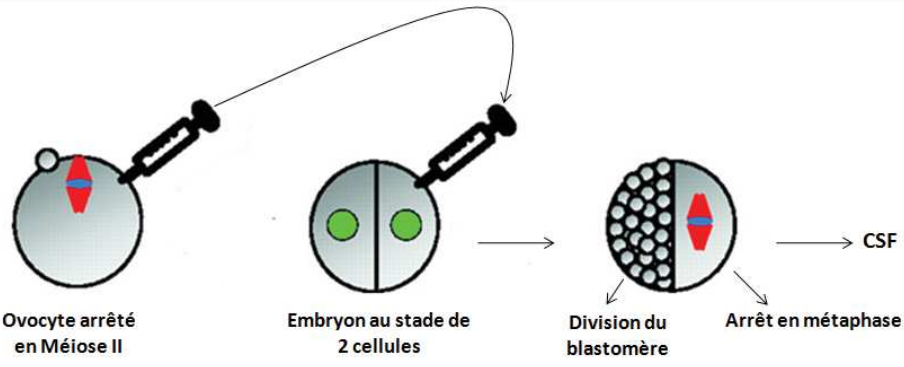


Figure 27 : Mise en évidence du CSF. L'injection de cytoplasme d'un ovocyte arrêté en métaphase II dans un blastomère d'embryon au stade de deux cellules induit l'arrêt en métaphase de ce blastomère, alors que le blastomère non injectée continue de se diviser *(D'après Schmidt et al, 2006; Masui et Market, 1971)*

Lorsque l'ovocyte atteint la métaphase de deuxième division de méiose le cycle s'arrête avec une activité MPF et MAPK élevées. Ils existent deux mécanismes

nécessaires à l'arrêt CSF : les voies de signalisation impliquées dans sa mise en place et les mécanismes nécessaires à son maintien.

B. MISE EN PLACE DE L'ARRET CSF : LA VOIE MOS-MAPK

Il a été proposé que la **voie Mos-MAPK** soit impliquée dans l'arrêt CSF. **Mos** a un rôle clé dans la maturation méiotique des ovocytes chez toutes les espèces dans lesquelles elle a été étudiée (pour revue, Sagata et al, 1997). C'est une Sérine/Thréonine kinase dont la synthèse est spécifique d'un type cellulaire et est restreinte dans le temps, en effet, Mos est exprimée seulement dans les cellules germinales, où elle n'agit que pendant la maturation méiotique des ovocytes. La surexpression de Mos via la microinjection d'ARNm dans un blastomère au stade de deux cellules provoque l'arrêt des divisions comme c'est le cas de l'arrêt CSF (Sagata et al, 1989). De même lorsque l'expression de Mos est inhibée par microinjection de morpholino antisens, dans des ovocytes de xénope de stade VI, l'addition de progestérone induit la maturation méiotique. Cependant, les ovocytes ne peuvent pas s'arrêter en métaphase II et entrent dans des divisions successives comme dans les cellules embryonnaires (Dupre et al, 2002). De plus, l'invalidation de Mos par knockdown chez la souris ou par morpholino antisens chez l'étoile de mer conduit à une absence d'arrêt de la méiose (Colledge et al, 1994 ; Hashimoto et al 1994 ; Verlhac et al, 1996 ; Tachibana et al, 2000). Ces observations indiquent que Mos n'est pas indispensable pour la maturation méiotique mais est essentiel pour l'arrêt CSF. Cet arrêt passe par la **voie de signalisation Mos-MEK-MAPK-RSK**. En effet, des études ont montré un phénotype semblable avec l'utilisation de l'inhibiteur de MEK, l'U0126 (Gross et al, 2000). De plus, l'injection de la forme thiophosphorylée de MAPK sauvage dans un blastomère d'embryon de deux cellules conduit à l'arrêt CSF, alors que la forme thiophosphorylée de MAPK kinase inactive permet la division du blastomère (Haccard et al, 1993). En outre, l'injection d'une forme constitutivement active de RSK dans un blastomère d'embryon de deux cellules conduit à l'arrêt de la division de celui-ci (Gross et al, 1999). Finalement, l'immunodéplétion de RSK dans des extraits d'œufs de xénope cyclants ne permet pas aux extraits de s'arrêter en métaphase, alors que si la forme sauvage de RSK est ajoutée

dans ces extraits, ils s'arrêtent en métaphase ce qui n'est pas le cas avec la forme inactive de la kinase (Bhatt and Ferrell, 1999). Ces résultats montrent donc que MAPK et RSK participe à l'arrêt CSF.

Cependant, l'immunodéplétion de RSK ou l'inactivation de la voie Mos-MAPK dans des extraits CSF de Xénope ne permet pas une sortie de l'état CSF (Bhatt and Ferrell, 1999 ; Reimann and Jackson, 2002). Ce qui suggère que si la voie Mos-MAPK est requise pour l'établissement du CSF, elle n'est pas nécessaire pour son maintien.

Lien entre la voie Mos-MAPK et l'arrêt CSF

Plusieurs études récentes ont relié le rôle de la **voie Mos-MAPK** et celui d'**Emi2/Erp1** dans l'arrêt CSF (Inoue et al, 2007 ; Nishiyama et al, 2007 ; Wu et al, 2007 ; Tung et al, 2007 ; Hansen et al, 2007). Ces travaux montrent qu'Emi2/Erp1 est phosphorylée durant l'arrêt en métaphase II par le complexe cycline B/Cdk et RSK. La phosphorylation d'Emi2/Erp1 par le complexe cycline B/Cdk conduit à l'inactivation et à la dégradation d'Emi2/Erp1 (Hanssen et al, 2007). Alors que la phosphorylation d'Emi2/Erp1 par RSK permet le recrutement de PP2A qui déphosphoryle les résidus phosphorylés par le complexe cycline B/Cdk1. La déphosphorylation de ces résidus confère à Emi2/Erp1 sa stabilité et sa capacité à interagir avec l'APC/C afin de l'inhiber (Wu et al, 2007 ; Nishiyama et al, 2007 ; Inoue et al, 2007) (Figure 28). La voie Mos-MAPK participe donc à l'arrêt CSF via la phosphorylation de RSK surEmi2/Erp1.

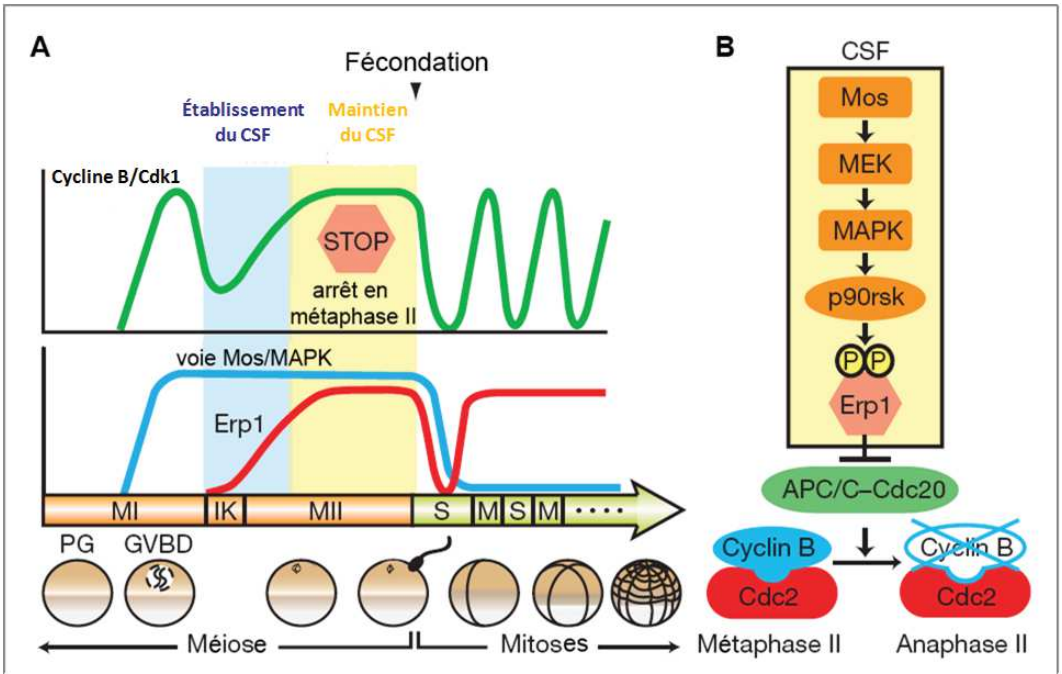


Figure 28: Le rôle d'Emi2/Erp1 dans l'arrêt CSF chez le xénope. (A) Niveaux d'activité de la voie Mos-MAPK, d'Emi2/Erp1 et du MPF pendant la maturation méiotique et les premiers stades embryonnaires. (B) La phosphorylation d'Emi2/Erp1 par p90rsk/RSK (cible de la voie MAPK) lui confère la capacité d'arrêter la cellule en métaphase II via l'inhibition de l'APC/C. *(D'après Inoue et al, 2007)*

C. IMPLICATIONS DE DIFFERENTS COMPOSANTS DU SAC DANS L'ARRET CSF

Mise à part la voie Mos-MAPK, l'implication de certaines protéines du spindle checkpoint dans l'établissement de l'arrêt CSF a été suggérée. En effet, l'immunodéplétion de certaines de ces protéines est capable de supprimer la mise en place de l'arrêt CSF induite par Mos, indiquant qu'elles pourraient être nécessaires à cet arrêt via Mos (Tunquist et al, 2002 ; Tunquist et and Maller 2003 ; Tunquist et al, 2003). Cependant, les protéines du checkpoint ne semblent pas nécessaires au maintien de l'activité CSF établi par Mos. En effet lorsque Bub1 et Mad2 sont immunodéplétées dans des extraits bloqués en métaphase II, les extraits ne perdent pas leur activité CSF contrairement à ce qui se passe pour l'activité du SAC, indiquant que Mos régule l'arrêt CSF de manière distincte du spindle checkpoint (Tunquist et al, 2002 ; Tunquist and Maller, 2003).

Finalement, il a été montré que RSK phosphoryle et active Bub1 suggérant que RSK pourrait également participer à l'arrêt CSF via l'activation de Bub1 (Schwab et al, 2001). Ainsi, RSK pourrait être un lien entre l'arrêt CSF et le SAC.

III. FECONDATION DE L'OVOCYTE :

La fécondation par un spermatozoïde induit une décharge calcique dans l'ovocyte responsable de la dégradation de la cycline B et de la sortie de métaphase II. Le signal calcique est transmis via la **CaMKII** (Lorca et al, 1993). En effet, l'addition d'une forme constitutivement active de la CaMKII dans des extraits d'œufs de xénope arrêtés en métaphase II induit la dégradation de la cycline B et l'inactivation du MPF en absence d'augmentation de calcium (Lorca et al, 1993). De plus, l'injection d'un peptide inhibiteur de la CaMKII inhibe la dégradation de la cycline B (Lorca et al, 1993). Il a récemment été mis en évidence que la CaMKII phosphoryle Emi2/Erp1, créant ainsi un site de phosphorylation pour Plx1 (Liu and Maller, 2005). La phosphorylation d'Emi2 par Plx1 entraîne sa dégradation rapide via l'ubiquitine ligase SCF, levant ainsi l'inhibition exercée sur l'APC/C (Rauh et al, 2005 ; Hansen et al, 2006 ; Schmidt et. Al, 2005).

Des études récentes ont mis en évidence qu'en plus de l'inactivation du MPF par la dégradation de la cycline B, l'activité de la phosphatase calcineurine est aussi nécessaire à la sortie de mitose. Ces phosphatases permettraient de déphosphoryler les substrats mitotiques et donc de sortir d'arrêt CSF (Mochida et al, 2009 ; Wu et al, 2009 ; Mochida and Hunt, 2007).

IV. LES EXTRAITS CSF COMME SYSTEME D'ETUDE DU SAC

Les extraits d'ovocyte de xénope arrêtés en métaphase II (extraits CSF) est un bon système d'étude du SAC pour plusieurs raisons :

1. Dans les extraits CSF, nous pouvons activer le checkpoint par l'addition de nocodazole et de 9000 têtes spermatiques /µl d'extrait.

2. Lorsque le checkpoint est actif, nous sommes en présence de deux activités qui permettent l'arrêt en métaphase II, l'une CSF due à l'inhibiteur de l'APC, Emi2/Erp1 qui bloque l'APC, l'autre, le SAC qui inhibe l'APC via Mad2-BubR1-Bub3.

3. Il est facile de s'affranchir de l'activité CSF en rajoutant du calcium dans les extraits et donc d'analyser si la deuxième activité, le SAC, est active.

4. Nous pouvons analyser par immunofluorescence si une protéine participe au SAC en étudiant la localisation des autres protéines du SAC aux kinétochores lorsque cette protéine a été immunodéplétés. L'activité CSF, qui maintient l'activité du MPF, assure la condensation des chromosomes même si la voie du SAC est inactive après l'immunodéplétion de notre protéine d'étude.

5. Par conséquent, l'extrait CSF nous permet dans un même modèle, d'analyser si l'immunodéplétion d'une protéine induit la perte d'activité du SAC et si cela est associé à une perte de localisation aux kinétochores des autres protéines du checkpoint.

CHAPITRE 5 :RSK2 ET GREATWALL, DEUX AGC KINASES ACTRICES DE LA MITOSE

I. GENERALITES SUR LES AGC KINASES

Généralités sur les AGC kinases

Les protéines kinases sont des enzymes régulatrices qui phosphorylent leurs substrats sur des résidus Ser, Thr ou Tyr. Le terme d'**AGC kinase** a été proposé par Steven Hanks et Tony Hunter en 1995, pour définir le sous groupe de kinases phosphorylant les résidus Ser/Thr se basant sur la séquence d'alignement de leur domaine catalytique proche de PKA (cAMP-Dependent Protein Kinase 1), PKG (cGMP-Dependant Protein Kinase) et PKC (Protein Kinase C) (Hanks and Hunter, 1995). La superfamille des AGC kinases comporte 60 kinases parmi les 518 protéines kinases connues à ce jour, lesquelles sont hautement conservées chez les eucaryotes (Manning et al, 2002). Les AGC kinases sont groupées en 21 sous familles selon leur homologie en dehors de leur domaine catalytique et de leur structure. Nous nous intéresserons plus particulièrement aux isoformes **RSK2** de la famille RSK (Ribosomal S6 Kinase) et **MASTL** ou **Greatwall** de la famille MAST (Microtubule-Associated Ser/Thr Kinase).

Structure des AGC kinases

Les AGC kinases ont une structure bi-lobulaire, constituée d'un petit lobe en N-terminal (N-lobe) et un grand lobe en C-terminal (C- lobe). Ces deux lobes ont une conformation ouverte lorsque la kinase est inactive et se referme sur une molécule d'ATP lorsqu'elle est active (Huse and Kuriyan, 2002). Le C-lobe contient la boucle d'activation, ou T-loop, nécessaire pour l'activation de la kinase. La particularité des AGC kinases est leur queue en C-terminal qui se replie pour interagir avec le N-lobe. Cette queue C-terminale contient des domaines importants pour l'activation et la stabilisation de la kinase, il s'agit du motif hydrophobe et du « turn motif » (Hauge et al, 2007 ; Frodin et al, 2002). Le motif hydrophobe présente la séquence consensus FxxFS, une fois phosphorylée la Sérine de ce domaine participe au repliement de la partie C-ter sur la partie N-ter. De manière similaire, le turn motif qui correspond à une Sérine conservé en

C-ter va permettre le repliement de la partie N-ter vers la partie C-ter en s'associant à une Lysine qui est aussi conservée dans certaines AGC kinases (Hauge et al, 2007) (Figure 29). De plus, dans certaines AGC kinases le motif hydrophobe et le turn motif agissent comme un site d'interaction avec PDK1, qui est une AGC kinase particulière puisqu'elle ne possède pas de motif hydrophobique. PDK1 phosphoryle la T-loop et active la kinase (Komander et al, 2005).

Dans cette étude, nous nous intéressons à deux AGC kinases RSK2 et Greatwall. Malgré le fait que ces deux kinases appartiennent à la famille des AGC kinases, elles sont particulières. Ainsi RSK2 possède deux domaines kinases distincts fonctionnels : le « N-terminal domain kinase » (NTDK) et le « C-terminal domain kinase » (CTDK) (Jones et al, 1988). Quant à Greatwall, elle possède un domaine kinase séparé en deux par un long insert de 500 acides aminés ou « T-loop » et ne possède pas de motif hydrophobique.

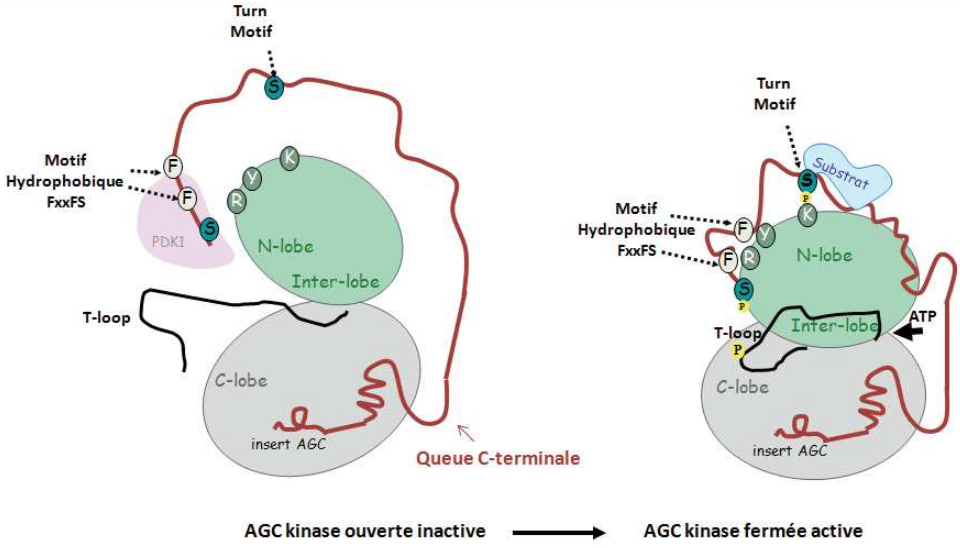


Figure 29: Modèle d'activation des AGC kinases. Les AGC kinases sont constituées de deux lobes (N-lobe et C-lobe) et une longue queue C-terminale qui se replie sur le N-lobe. La queue C-terminale possède deux domaines importants pour l'activation des AGC kinases, le motif hydrophobique (FxxFS) et le turn motif (composé d'une Sérine). Le turn motif s'associe à une Lysine du N-lobe et permet le repliement de la queue C-terminale sur le N-lobe Le motif hydrophobe s'associent à la poche hydrophobique (FxxFY), et la phosphorylation de se motif sert de point d'ancrage à PDK1 qui va phosphoryler la T-loop. Le repliement de la queue C-terminale et la phosphorylation sont nécessaires à l'activation des AGC kinases. Les deux lobes ont une conformation ouverte lorsque la kinase est inactive et se referme sur une molécule d'ATP lorsqu'elle est active. *(D'après Kannan et al, 2007)*

II. RSK2

A. DECOUVERTE DE RSK

Au début des années 1990, de nombreuses études se sont focalisées sur les événements moléculaires de phosphorylation et d'activation des récepteurs de facteurs de croissance régulant l'expression des gènes, la synthèse d'ADN et la mitose. Un des premiers mécanismes mis en évidence fut l'activation de la protéine kinase C (PKC) et l'activation des récepteurs Tyrosine ou l'oncogène v-src phosphorylé par **rpS6** (40S Ribosomal subunit Protein S6) (Blenis and Erickson, 1984 ; Nielsen et al, 1982). En 1985, une activité kinase intracellulaire qui phosphorylait rpS6 dans des œufs de xénope non fécondés fut purifiée. Cette activité a été initialement nommée **S6K** (Ribosomique S6 Kinase) (Erikson and Maller, 1985). Deux kinases S6 ribosomiques ont été identifiées (S6KI et S6KII) de 85 et 90 kDa par purification biochimique à partir d'extraits d'œufs de xénope. Il a ensuite été montré que S6KII était phosphorylée et activée par ERK2 suggérant que S6KII est activée en aval de la voie ERK/MAPK (Sturgill et al, 1988), S6KI et S6KII furent renommées **p90^{rsk}** ou **RSK**. Chez les mammifères, quatre isoformes de RSK ont été identifiées (RSK1, RSK2, RSK3, RSK4), il existe deux isoformes chez le xénope (RSK1 et RSK2).

B. STRUCTURE ET LOCALISATION

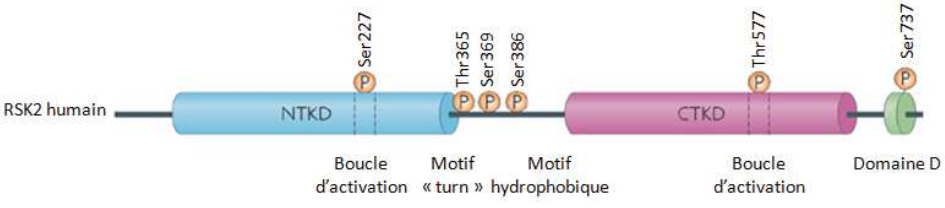


Figure 30: Structure de RSK2. Les protéines RSK sont caractérisées par la présence de 2 domaines kinases fonctionnels: le domaine kinase N-terminal (NTDK) et le domaine kinase C-terminal (CTDK), qui sont connectés par une région « linker ». La région « linker » comporte le motif « turn » et un motif hydrophobique. L'activation de RSK2 est caractérisée par six sites de phosphorylations (Ser227, Thr365, Ser369, Ser386, Thr577, Ser737), ces phosphorylations sont hautement conservées chez les quatre isoformes de RSK. (*D'après Anjum and Blenis, 2008 et Hauge and Frödin, 2006)*

La structure de RSK est complexe et comprend deux kinases fonctionnelles distinctes. La kinase C-terminale participe à l'autophosphorylation de RSK alors que la

kinase N-terminale est responsable de la phosphorylation des substrats (Fisher et al, 1996 ; Bjorbaek et al, 1995). Les deux kinases sont connectées par une région conservée. Au niveau de la queue C-terminale se trouve un motif de liaison d'ERK aussi appelé le domaine D, il permet l'interaction entre RSK et ERK1/2 (Roux et al, 2003) (Figure 30).

La régulation spatio-temporelle de RSK concorde avec sa participation à l'expression de gènes, synthèse de protéines et régulation de la motilité cellulaire. Lorsque RSK est inactive, elle est localisée dans le cytoplasme, alors que lorsqu'elle est activée par ERK1/2, elle est retrouvée dans le noyau (Chen et al, 1992).

C. MECANISME D'ACTIVATION DE RSK

Définir le modèle d'activation de RSK s'est avéré difficile à la vue de ses multiples sites de phosphorylation, de sa régulation spatio-temporelle, de ses interactions avec de nombreuses protéines et de la particularité de ses domaines kinases.

RSK est phosphorylée sur des résidus Sérine ou Thréonine par de nombreuses kinases activées directement ou indirectement par la MAPK (Dalby et al, 1998). Six sites de phosphorylations on été mis en évidence sur RSK1/2 (que l'on retrouve conservé sur RSK3/4) dont quatre sont importants pour l'activité de RSK (Ser227 ; Ser365 ; Ser369 ; et Thr577) (Figure 31).

La Sérine 227 se situe dans la boucle d'activation de la kinase N-terminale, et est phosphorylée par PDK1 (3'-Phosphoinositide Dependente Kinase 1) (Jensen et al, 1999). La phosphorylation du site consensus de la boucle d'activation est hautement conservée chez les AGC kinases.

Les Sérines 365 et 369 correspondent respectivement au « turn motif » et au motif hydrophobique de la région linker. La Sérine 363 peut être phosphorylée par ERK1/2 ou peut s'autophosphoryler et/ou être phosphorylée par d'autres kinases encore non définies (Richards et al, 2001). La Sérine 380 est phosphorylée par la kinase C-terminale mais l'implication de la kinase N-terminale ou d'autres kinases n'est pas exclue. La phosphorylation du motif hydrophobe permet de créer le site d'attachement de PDK1.

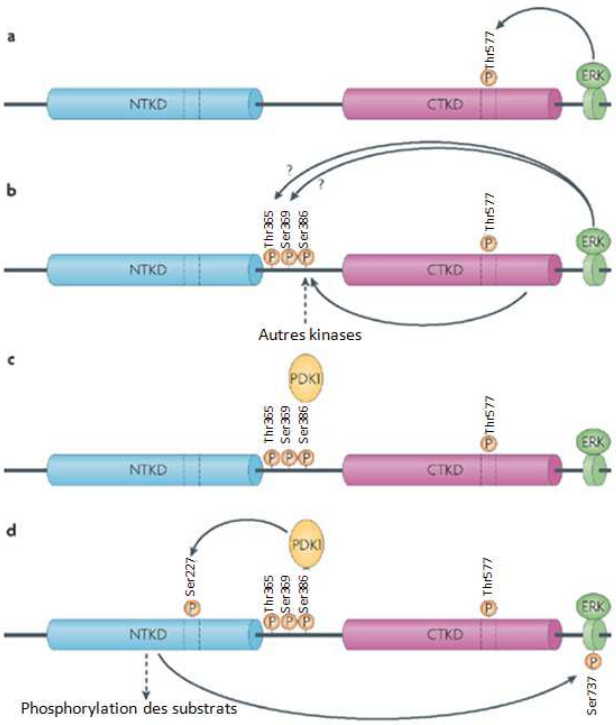


Figure 31: Modèle d'activation de RSK2: a) ERK interagit avec le site d'attachement d'ERK dans le domaine D. ERK phosphoryle le résidu Thr577 de la boucle d'activation du CTDK, ce qui active le CTDK. **b)** Le CTDK phosphoryle le motif hydrophobique sur le résidu Ser386, ce site pourrait aussi être phosphorylé par d'autres kinases. ERK1/2 peut phosphoryler la Thr365 et la Ser369. **c)** PDK1, Ser/Thr kinase, constitutivement active interagit avec l e motif hydrophobique et phosphoryle la Ser227 de la boucle d'activation du NTDK, ce qui permet l'activation complète de RSK. **d)** Le NTDK phosphoryle la Ser737 du domaine D, ce qui régule l'association de ERK et RSK. Le NTDK phosphoryle les substrats de RSK. (*D'après Anjum et Blenis, 2008)*

La Thréonine 577 se situe dans le CTDK et est phosphorylée par ERK1/2 (Sutherland et al, 1993 ; Smith et al, 1999). Cette phosphorylation peut conduire à la translocation de RSK au niveau de la membrane plasmique où elle peut être activée par une protéine associée à la membrane (Richards et al, 2001).

L'activation de RSK se fait de manière séquentielle, en effet, après stimulus et activation de la voie ERK-MAPK, ERK1/2 phosphoryle la boucle d'activation du CTDK sur le résidu Thr577 de RSK ce qui permet l'activation du CTDK. RSK peut phosphoryler le « turn motif » et le motif hydrophobique créant ainsi un site d'attachement de PDK1. Après, liaison de PDK1, celle-ci phosphoryle le NTDK en Ser227 conduisant ainsi à l'activation complète de RSK et par conséquent à la phosphorylation de ses substrats par le NTDK.

D. FONCTION DE RSK2 ET SES ISOFORMES

La plupart des fonctions de RSK peuvent être déduites de la nature de ses substrats, ainsi RSK intervient au niveau de la régulation de la transcription et de la traduction, de la croissance cellulaire, de la motilité, de la prolifération et survie cellulaire et dans la progression du cycle cellulaire. La majorité des substrats ont été identifiés pour RSK1 et RSK2, mais les études n'indiquent pas s'il y a redondance entre les différents isoformes de RSK, il se peut donc que les substrats identifiés puissent être phosphorylés par les différents isoformes de RSK (Carriere et al, 2008 ; pour revue, Anjum and Blenis, 2008).

RSK participe à la transcription, la traduction et à la survie cellulaire

RSK participe à la régulation de la transcription par la phosphorylation de nombreux facteurs de transcription (pour revue, Anjum and Blenis, 2008). D'autre part, RSK est également impliquée dans la traduction des protéines. En effet, elle phosphoryle et active des facteurs d'élongation et de traduction. Plus particulièrement RSK phosphoryle rpS6 dans les ovocytes de xénope et dans certaines cellules somatiques en réponse à l'activation de la voie Ras-MAPK (Schwab et al 2001 ; Roux et al 2007). En outre, RSK est capable d'assurer la survie cellulaire par phosphorylation et inactivation de certains facteurs pro-apoptotiques (pour revue, Anjum and Blenis, 2008).

RSK dans la progression du cycle cellulaire

Enfin RSK contribue à la progression cellulaire et à la prolifération (Figure 32). En effet, l'utilisation de l'inhibiteur de RSK, le SL0101 et de siRNA dirigé contre RSK1 et RSK2 ont mis en évidence l'inhibition de la prolifération de lignées cellulaires cancéreuses issues du sein et de la prostate (Smith et al, 2005 ; Clark et al, 2005). En accord avec ces observations, il a été montré que RSK1 et RSK2 étaient surexprimées dans les tumeurs du sein et de la prostate, suggérant que ces deux isoformes régulent positivement la prolifération des cellules cancéreuses (Smith et al, 2005 ; Clark et al, 2005).

A travers la régulation du facteur de transcription c-Fos, lequel participe à l'expression de la cycline D1 de la phase G1 à la phase S, il semblerait que RSK1 et RSK2 stimulent la progression du cycle cellulaire. RSK1 et RSK2 participe également à la régulation de la phase G1 par phosphorylation de l'inhibiteur de Cdk, $p27^{kipl}$ (Fujita et al,

2003). En effet, la phosphorylation de p27^{kip1} par RSK1 et RSK2 favorise son association avec la protéine 14-3-3 et prévient ainsi sa translocation au noyau et donc l'inhibition de Cdk.

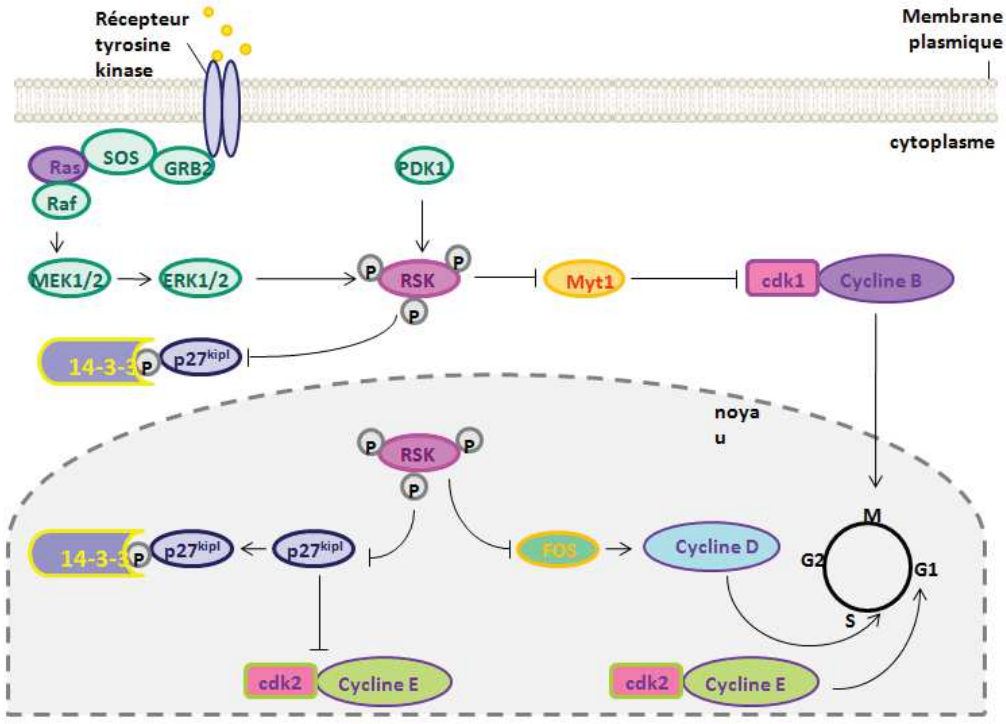


Figure 32 :Régulation du cycle cellulaire par RSK: RSK est activée via la voie Ras-MAPK stimulée par des facteurs de croissance. RSK phosphoryle de nombreux composants de la machinerie du cycle cellulaire et participe ainsi à sa progression. RSK participe à la progression G2/M en phosphorylant et inhibant Myt1. RSK phosphoryle et inhibe p27^{kipl} ce qui permet la progression en G1. En effet, la phosphorylation de RSK empêche sa translocation dans le noyau et donc inhibe le complexe cycline E/Cdk2. Enfin RSK active la transcription de FOS qui permet d'activer la cycline D et de progresser à la transition G1/S. *(D'après Anjum and Blenis, 2008)*

Un autre rôle de RSK dans l'activation des complexes cycline/Cdk a été mis en évidence par des expériences de pull-down à partir d'extraits d'œufs de xénope. Dans ces extraits, la kinase RSK interagit et phosphoryle la partie C-terminale non catalytique de la kinase inhibitrice du complexe cycline B/Cdk, Myt1 (Palmer et al, 1998). De plus, l'incubation de Myt1 avec la forme active de RSK réduit la capacité de Myt1 à inhiber l'activité histone H1 kinase de Cdk1, *in vitro*. L'ensemble de ces résultats montrent que RSK phosphoryle l'extrémité C-terminale de Myt1 et régule ainsi négativement son activité ce qui contribuerait à l'activation de Cdk1 (Palmer et al, 1998). Notons que, la plupart de ces expériences ont été menées *in vitro* avec une forme active de p90Rsk et des expériences *in vivo* n'ont jamais été réalisées dans des ovocytes. On ignore si ce

mécanisme est conservé dans les autres espèces mais des travaux ont montré qu'Akt peut aussi agir sur Myt1 dans les ovocytes d'étoile de mer (Okumura et al, 2002). RSK2 joue également un rôle important dans la progression cellulaire en phase G2 des fibroblastes NIH-3T3 (Wright et al, 1999).

Fonctions de RSK3 et RSK4

Peu d'études ont été réalisées sur RSK3 et RSK4. Concernant RSK3, il a été montré qu'elle jouerait un rôle positif dans la prolifération cellulaire (Zhao et al, 1995), cependant elle pourrait aussi agir comme un suppresseur de tumeur dans les cancers ovariens par un mécanisme encore inconnu (Bignone et al, 2007). D'autre part, l'implication de RSK4 au niveau de la prolifération apparait encore plus énigmatique. En effet, des études suggèrent que RSK4 joue un rôle d'inhibiteur pendant l'embryogénèse en régulant négativement RTK (Receptor Tyrosine Kinase) (Myers et al, 2004). RSK4 participe également à l'arrêt cellulaire de manière dépendante de p53, suggérant que cet isoforme se comporte comme un suppresseur de tumeur (Berns et al, 2004). Enfin, RSK4 est impliquée dans certains cancers du sein, suggérant qu'elle joue aussi un rôle oncogénique (Thakur et al, 2007).

III. GREATWALL OU MASTL

Structure

Par homologie de séquence, Gwl a été classifié parmi les membres des AGC kinases et plus particulièrement dans la sous famille MAST (Manning et al, 2002). Gwl est une kinase particulière car elle possède un insert de 500 acides aminés entre ses sous domaines VII et VIII, où se trouve une « T-loop » (Yu et al, 2004). La fonction de cette T-loop particulière n'est pas encore définie.

Des résultats encore non publiés du laboratoire ont mis en évidence que contrairement à la plus part des AGC kinases Gwl est dépourvue de motif hydrophobe malgré la présence d'une poche hydrophobe fonctionnelle. Ces observations suggèrent que l'activation de Gwl pourrait être régulée par la liaison de la poche hydrophobe au motif hydrophobe d'une autre AGC kinase.

L'analyse de modélisation moléculaire et des expériences de mutagénèses montrent que Gwl présente une interaction entre la queue C-ter et deux lysines à l'extrémité N-terminale. Cette interaction est nécessaire pour la fonctionnalité et l'activation de la kinase.

Enfin, nous avons mis en évidence par phosphomapping la phosphorylation de nombreux résidus Sérine et Thréonine présent dans l'insert de Gwl en mitose. La mutation de ces résidus en Alanine a montré que ces phosphorylations de sont pas essentielles à l'activation de la kinase. Par ailleurs, nous avons réalisé des mutants de délétions de l'insert, et il apparait que ce n'est pas la séquence en acides aminés qui est importante pour l'activation de Gwl mais la longueur de cet insert (Vigneron et al, soumis)

Localisation subcellulaire

Les premières études chez la drosophile sur Gwl ont mis en évidence que Gwl était une protéine nucléaire. De récentes études montrent que durant l'interphase Gwl localise au niveau du noyau et des centrosomes. Puis Gwl s'accumule aux pôles du fuseau mitotique et le long des fibres de fuseau. Enfin au moment de la télophase et de la cytodiérèse, Gwl se situe au niveau de la zone intermédiaire du pont cytoplasmique (Burgess et al, 2010 ; Voets et al, 2010).

ARTICLE 1 :RSK2 LOCALISE AUX KINETOCHORES ET PARTICIPE AU SPINDLE ASSEMBLY CHECKPOINT

I. CONTEXTE DE L'ETUDE

Le SAC est le système de surveillance permettant de vérifier que tous les kinétochores sont correctement attachés aux pôles du fuseau et sous tension, pour permettre une bonne ségrégation des chromosomes. Lorsqu'un kinétochore n'est pas attaché ou n'est pas sous tension, le SAC est activé par le recrutement aux kinétochores des protéines du checkpoint telles que Bub1, Bub3, BubR1, Mad1, Mad2, Mps1 etc. La localisation de ces protéines aux kinétochores est importante pour l'activité du SAC. En effet, l'immunodéplétion de ces protéines chez le xénope induit la délocalisation des protéines du checkpoint en aval de celle qui a été immunodéplétée et induit également l'inactivation SAC, après traitement au nocodazole (Vigneron et al, 2004). Dans les cellules humaines le mécanisme est un peu plus complexe car il semblerait qu'il existe deux voies de signalisation, l'une s'activant en cas de défauts d'attachement et l'autre en cas de défauts de tension. Ainsi, dans les cellules humaines l'inhibition des protéines du checkpoint par siRNA ou par utilisation de drogues n'induit pas la délocalisation de toutes les protéines du checkpoint, mais seulement celles participant à la même voie de signalisation de celle qui a été inhibée.

Chez les vertébrés, la MAPK est recrutée au niveau des kinétochores après dépolymérisation des microtubules par traitement au nocodazole (Shapiro et al, 1998) et est requise pour l'activité du SAC (Minshull et al, 1994; Takenaka et al, 1997; Wang et al, 1997). Cependant, le mécanisme par lequel la MAPK participe au SAC n'est pas connu. Une des cibles principales de la MAPK est RSK (pour revue, Anjum and Blenis, 2008). Chez le xénope il existe deux isoformes de RSK : RSK1 et RSK2, RSK2 étant l'isoforme majoritaire dans les extraits d'œufs de xénope (Bhatt and Ferrell, 2000). RSK2 est activée par la voie Mos-MAPK et participe à la maturation méiotique en inhibant la kinase Myt1 (Nebreda and Ferby, 2000). D'autre part, RSK via la voie Mos-MAPK est requis pour la mise en place de l'arrêt en métaphase II (arrêt CSF). En effet, RSK phosphoryle et stabilise Emi2/Erp1 qui est un inhibiteur de l'APC/C (Nishimiya and al,

2007; Wu et al, 2007). Enfin, il a été montré que RSK phosphoryle et active la protéine du checkpoint Bub1 durant l'arrêt en métaphase II (Schwab et al, 2000).

En résumé, MAPK localise aux kinétochores et est requis pour l'activité du SAC. Rsk2 est le substrat majeur de la MAPK. Elle participe à l'arrêt en métaphase II par inhibition l'APC/C via la protéine du checkpoint Bub1 et via l'inhibiteur de l'APC Emi2/Erp1. Il est donc possible que RSK2 puisse être la cible de MAPK dans la voie de signalisation du SAC. C'est pourquoi nous nous sommes proposés d'analyser l'implication de RSK2 dans l'activité du SAC à la fois dans les extraits d'œufs de xénope et dans les cellules humaines.

II. RESULTATS

Rsk2 localise aux kinétochores quand le SAC est actif

Une des premières tâches à réaliser fut d'analyser la localisation de RSK2 dans les extraits d'œufs de xénope et dans des cellules HeLa. En effet, la localisation d'une protéine aux kinétochores est un bon indice de participation au SAC. Tout d'abord dans des extraits arrêtés en métaphase II où le SAC est activé par ajout de nocodazole et de 9000 têtes spermatiques/µl, nous avons étudié la localisation de RSK2 à l'aide de deux anticorps, l'un dirigé contre la partie C-terminale de la kinase et l'autre dirigé contre la protéine entière. Nous avons pu observer avec ces deux anticorps la co-localisation de RSK2 avec la protéine du checkpoint Cenp-E. Par conséquent, RSK2 localise aux kinétochores dans les extraits d'œufs de xénope (Figure 1a). Afin de déterminer la localisation de RSK2 dans les cellules HeLa nous avons surexprimé la protéine taguée à la GFP. Cette analyse n'a pas donné des résultats fiables car les anticorps commerciaux avaient beaucoup de bruit de fond. Dans des cellules HeLa où nous avons activé le SAC par addition de nocodazole, nous observons que RSK2 co-localise avec la protéine du checkpoint BubR1.Ces résultats montrent que RSK2 localise au niveau des kinétochores dans les cellules présentant un SAC actif (Figure 1b). Nous avons ensuite analysé si la forme inactive de RSK2 pouvait se localiser aux kinétochores dans les mêmes conditions.

Cependant dans ces conditions, nous observons un marquage diffus qui ne localise pas avec BubR1. Ainsi la localisation de RSK2 aux kinétochores est dépendante de son activité kinase.

RSK2 est essentiel à l'établissement du SAC dans les extraits d'œufs de xénope

Après avoir mis en évidence que RSK2 localise aux kinétochores nous avons ensuite analysé l'implication de la kinase au niveau du SAC. Pour cela nous avons utilisé des extraits arrêtés en métaphase II qui ont été préalablement immunodéplétés de la protéine RSK2. Comme décrit dans l'introduction, l'arrêt CSF est établi par la voie Mos-MAPK qui stabilise Emi2/Erp1, inhibiteur de l'APC. Dans ces extraits, le SAC est activé par addition de têtes spermatiques et de nocodazole. Afin d'analyser la voie du SAC, nous avons rajouté du nocodazole et des têtes spermatiques pour activer le SAC et nous avons ensuite ajouté du calcium pour inactiver le CSF. Ainsi, nous avons montré que lorsque RSK2 est immunodéplétée le checkpoint n'est plus actif (Figure 2). Ces résultats montrent donc que RSK2 est requis pour l'activité du SAC.

RSK2 est requis pour la localisation des protéines du checkpoint dans les extraits d'œufs de xénope

Etant donné que RSK2 est essentielle à l'activité du SAC, nous nous sommes demandé si l'inactivation du SAC dans les extraits immunodéplétés en RSK2 était associée à une modification des localisations des autres protéines du SAC. Lorsque Rsk2 n'est pas présent, nous observons une délocalisation des protéines Aurora-B, Incenp, Bub1, Mps1, Cenp-E, Mad1, Mad2 et Bub3 des kinétochores (Figure 3a). Ces résultats indiquent que RSK2 participe à l'activité du SAC en permettant la localisation des autres protéines de cette voie de signalisation dans ce mécanisme de surveillance.

Il a été mis en évidence qu'Aurora-B est la protéine la plus en amont dans la voie de signalisation du SAC dans les extraits d'œufs de xénope (Vigneron et al, 2004), et puisque l'absence de RSK2 délocalise Aurora-B nous avons voulu savoir à quel niveau se plaçait RSK2 vis-à-vis d'Aurora-B dans cette voie de signalisation. Pour cela Aurora-B est

immunodéplétée des extraits CSF afin d'étudier la localisation de RSK2. Nous montrons qu'en absence d'Aurora-B, RSK2 n'est plus localisée aux kinétochores (Figure 3b). Par conséquent Aurora-B et RSK2 se situerait au même niveau dans la voie de signalisation du SAC.

RSK2 délocalise Cenp-E, Mad1 et Mad2 des kinétochores dans les cellules humaines

Les études décrites dans la littérature sur la voie de signalisation du SAC montrent qu'il existe des différences entre xénope et cellules humaines. Afin d'étudier l'implication de RSK2 dans le SAC des cellules HeLa, nous avons éteint l'expression de la protéine à l'aide de siRNA dirigé contre RSK2. Après 32h de transfection, nous observons environ 80% d'inhibition d'expression de RSK2. Les cellules sont traitées au nocodazole afin d'activer le checkpoint et nous examinons la localisation des protéines du checkpoint par immunofluorescence. Nous observons que les protéines Cenp-A, BubR1, Bub1 et Incenp restent localisées aux kinétochores après inhibition de l'expression de RSK2, contrairement aux protéines, Cenp-E, Mad1 et Mad2 qui délocalisent des kinétochores (Figure 4). Notons que nous observons une très forte diminution du signal de Mad1 et Mad2 aux kinétochores alors que la délocalisation de Cenp-E des kinétochores est totale. Nos résultats suggèrent que RSK2 n'affecte pas la structure des kinétochores puisque l'inhibition de l'expression de la kinase ne perturbe ni la localisation de Cenp-A, composant structural des kinétochores, ni celles des protéines du checkpoint Incenp, Bub1 et BubR1. Ainsi, nos résultats montrent que RSK2 serait requise pour les localisations de Cenp-E, Mad1 et Mad2 aux kinétochores.

La surexpression de RSK2 résistant au siRNA prévient la délocalisation des protéines du checkpoint Cenp-E, Mad1 et Mad2.

De manière à vérifier la spécificité du phénotype observé par l'inhibition de l'expression de RSK2, nous avons utilisé un plasmide codant pour la protéine xRSK2-GFP du xénope qui est insensible à notre siRNA. Les cellules HeLa ont donc été co-

transfectées avec le siRNA et le plasmide xRsk2-GFP. Elles ont été ensuite traitées au nocodazole pour activer le SAC. Les protéines Cenp-E, Mad1 et Mad2 sont relocalisées aux kinétochores dans ces conditions (Figure 6), ce qui indique que la protéine de xénope peut sauver le phénotype induit par l'inhibition de l'expresion de RSK2 dans les cellules humaines.

RSK1 n'est pas essentiel à la localisation des protéines du checkpoint

Nous nous sommes ensuite intéressés à la protéine RSK1, isoforme le plus proche de RSK2. L'expression de la protéine est éteinte de la même manière que RSK2, mais dans ce cas nous n'observons pas la délocalisation de Cenp-E, Mad1 et Mad2 aux kinétochores après inhibition de l'expression de RSK1 (Figure 5). Ces résultats suggèrent donc que RSK1 n'est pas requise pour la localisation des protéines du checkpoint aux kinétochores.

RSK2 serait nécessaire à l'activité du SAC

Puisque RSK2 délocalise Cenp-E, Mad1 et Mad2 des kinétochores, nous nous sommes demandés si la délocalisation de ces protéines du checkpoint pouvait affecter la fonctionnalité du SAC. Pour réponde à cette question, nous avons fait une analyse par cytométrie en flux des cellules traitées au nocodazole, sauvage versus traitées avec un siRNA, afin de déterminer leur index mitotique. Nous n'avons observé aucune différence significative entre les deux populations cellulaires (résultats non montrés). Ces résultats pourraient indiquer que RSK2 n'est pas essentielle à la fonctionnalité du SAC dans les cellules humaines. Cependant, l'inhibition de l'expression de RSK2 n'est pas totale et il reste une petite quantité de Mad1 et Mad2 aux kinétochores qui pourrait être suffisante pour activer le checkpoint. Des résultats similaires ont été observés après inhibition de Hec1 (Martin-Lluemsa, 2002) et Bub1 (Johnson et al, 2004).

III. CONCLUSION

Nos résultats montrent d'une part, que RSK2 est requise pour le maintien du SAC et pour la localisation des protéines du checkpoint dans les extraits d'œufs de xénope, et d'autre part, que RSK2 est nécessaire à la localisation de Cenp-E, Mad1 et Mad2 aux kinétochores dans les cellules humaines, et probablement participerait à l'activité du SAC par un mécanisme qui reste à comprendre.

Oncogene (2010) 29, 3566–3574
© 2010 Macmillan Publishers Limited All rights reserved 0950-9232/10
www.nature.com/onc

SHORT COMMUNICATION

RSK2 is a kinetochore-associated protein that participates in the spindle assembly checkpoint

S Vigneron[1], E Brioudes[1], A Burgess, J-C Labbé, T Lorca and A Castro

Universités Montpellier 2 et 1, Centre de Recherche de Biochimie Macromoléculaire, CNRS UMR 5237, Montpellier cedex 5, France

The spindle assembly checkpoint (SAC) prevents anaphase onset until all the chromosomes have successfully attached to the spindle microtubules. The MAP kinase (MAPK) is an important player in this pathway, however its exact role is not fully understood. One major target of MAPK is the p90 ribosomal protein S6 kinase (RSKs) family. In this study, we analyse whether Rsk2 could participate in the activation of the SAC. Our data indicate that this protein is localized at the kinetochores under checkpoint conditions. Moreover, it is essential for the SAC activity in Xenopus egg extracts as its depletion prevents metaphase arrest as well as the kinetochore localization of the other SAC components. We also show that this kinase might also participate in the maintenance of the SAC in mammalian cells as Rsk2 knockdown in these cells prevents the kinetochore localization of Mad1, Mad2 and CENP-E under checkpoint conditions.
Oncogene (2010) **29,** 3566–3574; doi:10.1038/onc.2010.105; published online 12 April 2010

Keywords: Rsk2; SAC; kinetochore; Mad2; CENP-E

Introduction

The spindle assembly checkpoint (SAC) is a cell-cycle surveillance system that monitors kinetochore–microtubule attachment and guards against chromosome missegregation (Musacchio and Salmon, 2007). This checkpoint delays anaphase onset until all chromosomes are correctly attached to the spindle microtubules. Unattached kinetochores activate the SAC by recruiting to these chromosome structures the SAC proteins Bub1, Bub3, BubR1, Mps1, Mad1, Mad2 and the passenger proteins Aurora B, INCENP, Survivin and Borealin. In vertebrate cells, MAP kinase (MAPK) is also recruited to the kinetochores after microtubule disruption (Shapiro *et al*., 1998) and it is also required for SAC activity (Minshull *et al*., 1994; Takenaka *et al*., 1997; Wang *et al*., 1997).

The MAPK is a key signalling pathway that is involved in the regulation of normal cell proliferation, survival, growth and differentiation. This pathway consists of the MAPK, the MAP kinase kinases and the MAP kinase kinase kinases. An important family of cytoplasmic targets activated by the MAPKs is ribosomal protein S6 kinase (RSKs) (Anjum and Blenis, 2008). In Xenopus, the MAPK-dependent activation of RSK is required to promote oocyte maturation through the inhibition of Myt1, an inhibitory kinase of cyclin B/Cdk1, and to prevent DNA replication between meiosis I and II (Nebreda and Ferby, 2000). In these oocytes, both the Rsk1 and 2 isoforms mediate the MAPK-dependent activity of the cytostatic factor required for metaphase II arrest through the phosphorylation of the APC inhibitor Erp1 (Nishiyama *et al*., 2007; Wu *et al*., 2007) and of the spindle checkpoint protein Bub1 (Tunquist and Maller, 2003).

The fact that MAPK is required for SAC activity, with RSK being one of the major targets of this kinase and that RSK can modulate the cytostatic activity of metaphase II-arrested oocytes through the phosphorylation of the spindle checkpoint protein Bub1, prompted us to ask whether RSK could also be required for the SAC. In this study, we analysed the involvement of Rsk2 in the activation and maintenance of the SAC in metaphase II-arrested Xenopus egg extracts and in human cells.

Results and discussion

Rsk2 localizes at the kinetochores under spindle checkpoint conditions

Inactive Rsk2 was originally reported to be localized in both the cytoplasm and the nucleus during interphase. The addition of growth factors to quiescent cells induces the activation of this kinase at the plasma membrane and the subsequent nuclear translocation where it induced gene expression (Chen *et al*., 1992; Murphy *et al*., 2002). During mitosis, Rsk2 is associated with the centrosomes, the spindle and at the mid-body (Willard and Crouch, 2001); however, the localization of this protein under spindle checkpoint conditions has never been analysed. To study whether Rsk2 could participate in the SAC, we analysed whether this protein localizes at the kinetochores in metaphase II-arrested Xenopus egg extracts (CSF extracts) in which the SAC was activated by the addition of Nocodazole and sperm nuclei (9000/μl). Chromosomes were isolated from this mix

Correspondence: Dr A Castro or Dr T Lorca, Universités Montpellier 2 et 1, Centre de Recherche de Biochimie Macromoléculaire, CNRS UMR 5237, IFR 122, 1919 Route de Mende, 34293 Montpellier cedex 5, France. E-mails: anna.castro@crbm.cnrs.fr or thierry.lorca@crbm.cnrs.fr
[1]These authors contributed equally to this work.
Received 20 July 2009; revised 26 February 2010; accepted 1 March 2010; published online 12 April 2010

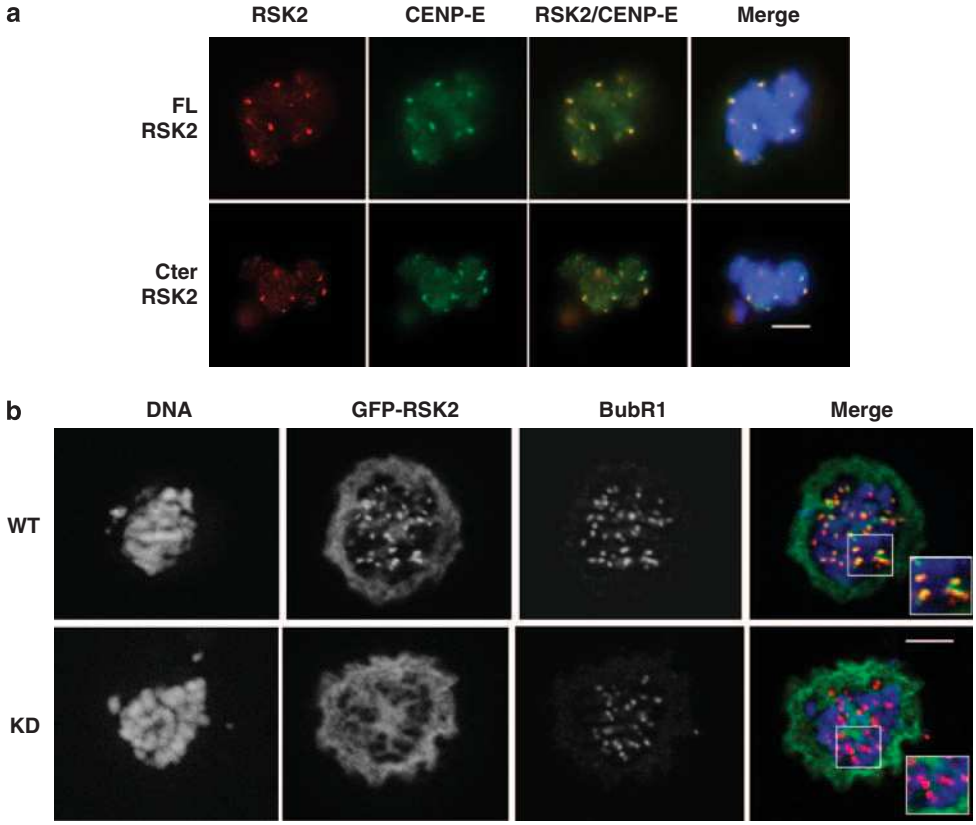


Figure 1 Rsk2 localizes at the kinetochores under spindle checkpoint conditions. (**a**) CSF extracts supplemented with nocodazole and sperm nuclei (9000/μl) were incubated for 75 min and used for immunofluorescence staining to analyse the kinetochore localization of Rsk2 by a co-staining with the kinetochore protein CENP-E. Two different antibodies, one against the full-length Rsk2 protein (FL RSK2) and the other against a C-terminal peptide of Rsk2 (Cter RSK2), were used. (**b**) HeLa cells were transfected with either the wild-type (WT) or the kinase-dead (KD) GFP-tagged forms of Xenopus Rsk2; 24 h after transfection cells were treated with 50 ng/ml of nocodazole to activate the SAC and the kinetochore localization of GFP-Xenopus Rsk2 was analysed by co-staining with the kinetochore protein BubR1. Cells were analysed using a Statif Axioimager 21 (Zeiss) microscope with Structured Ilumination (ApoTome). Bar represents 5 μm.

and the localization of Rsk2 was studied by immunofluorescence with two different antibodies, one against the full-length Xenopus Rsk2 protein and the other against the last 12 aminoacids (FL RSK2 and Cter RSK2, respectively). Rsk2 presented a punctuated staining that was identical with the two different antibodies used and that clearly co-localized with CENP-E, indicating that Rsk2 is present at the kinetochores under checkpoint conditions (Figure 1a). We next asked whether this could be also the case in human cells. To determine the localization of Rsk2 in HeLa cells, we overexpressed a GFP-tagged Xenopus Rsk2 protein and analysed in the presence or absence of nocodazole (16-h treatment), whether it co-localizes with the SAC protein BubR1. We did not observe a co-localization of GFP-Rsk2 with BubR1 in non-treated cells (data not shown). However, Rsk2 clearly co-localized with BubR1 at the kinetochores when microtubules were depolymerized by the addition of Nocodazole. Interestingly, this localization is dependent on the kinase activity of Rsk2, as co-localization was not observed under checkpoint conditions when a GFP-Rsk2 kinase-dead form was transfected (Figure 1b).

Rsk2 is essential for the establishment of the SAC in CSF extracts

To study the involvement of Rsk2 in the SAC, we first immunodepleted Rsk2 from CSF extracts and subsequently supplemented them with sperm nuclei (9000/μl). In these extracts two different activities inhibit the APC. First, the CSF activity mediated by Erp1, and second the SAC activity mediated by the mitotic checkpoint complex. To examine the consequence of Rsk2 depletion in the CSF activity we simply measured H1 kinase activity and assessed chromatin condensation in Rsk2-depleted extracts. To analyse the involvement of Rsk2 in SAC activity, we first depleted this kinase from CSF extracts, then subsequently supplemented these extracts with sperm nuclei and finally we added calcium to inactivate CSF. The H1 activity and chromatin condensation were measured to determinate the mitotic state (Vigneron *et al*., 2004).

According to the data reported by other laboratories (Bhatt and Ferrell, 2000; Nishiyama *et al*., 2007), our data show that Rsk2 depletion does not promote metaphase II exit. Rsk2-depleted CSF extracts presented phosphorylated cyclin B-Cdk1 substrates and condensed

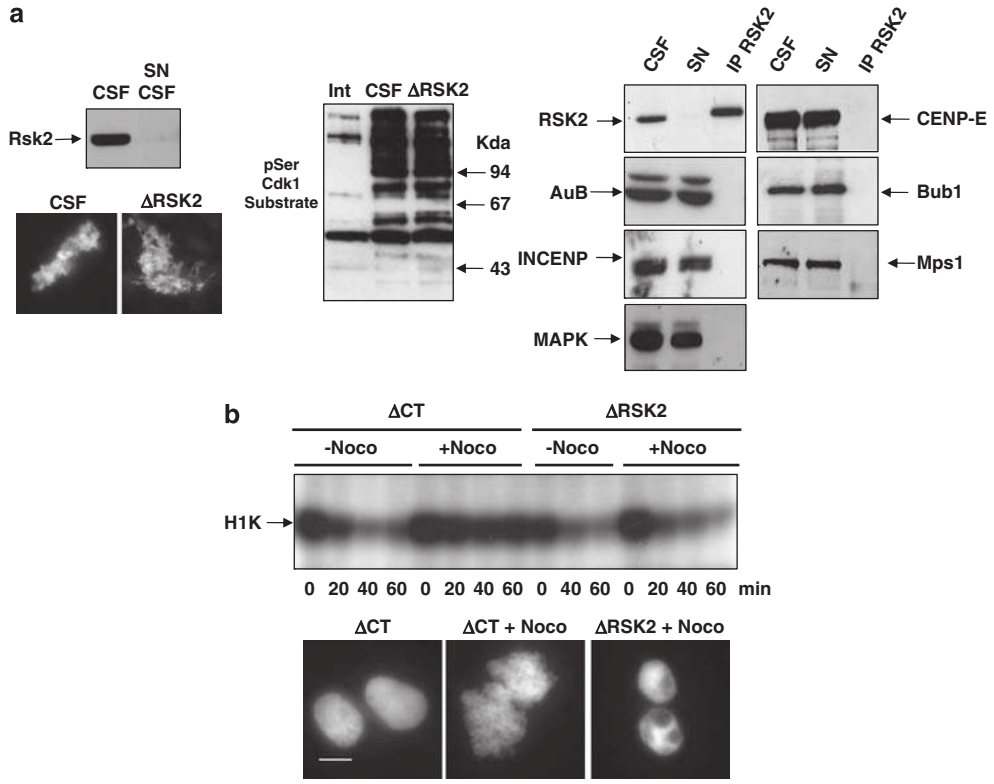


Figure 2 Rsk2 is essential for the establishment of the SAC in CSF extracts. (**a**) CSF extracts were immunodepleted of Rsk2. A sample of CSF extract (CSF) or Rsk2 immunodepleted supernatant (SN) was used as determinate by western blotting the levels of Rsk2 or to analyse chromatin condensation. The phosphorylation of cyclin B-Cdk1 substrates was investigated by using an antibody directed against the phosphorylated Serine of the Cdk consensus motif (Cell Signalling Technology Inc., Danvers, MA, USA) in 1 μl of CSF and in interphase extracts as well as in Rsk2 immunodepleted supernatants. Finally, the levels of the different spindle checkpoint components (Aurora B, INCENP, MAPK, CENP-E, Bub1 and Mps1) were also analysed by western blotting in 1 μl of CSF extracts, Rsk2-depleted supernatants and in the immunoprecipitates corresponding to 5 or 30 μl (for MAPK) of CSF extracts (IP RSK2). (**b**) CSF extracts were immunodepleted by using control (ΔCT) or anti-C-terminal Xenopus Rsk2 (ΔRSK2) antibodies and subsequently supplemented with sperm nuclei (9000/μl) and incubated with (+Noco) or without (−Noco) nocodazole (10 μg/ml). After 75-min incubation, a sample was taken to measure H1 kinase activity (H1K) at 0, 20, 40 and 60 min after calcium addition (0.4 mM) and chromatin condensation at 60 min after calcium addition. Bar, 5 μm.

DNA (Figure 2a, left). Thus, phosphorylation of Erp1 by Rsk2 must be exclusively required to establish CSF arrest but not to maintain this activity.

Immunodepletion of Rsk2 removed >98% of this kinase but did not deplete either of the other checkpoint proteins. Accordingly, the endogenous levels of these checkpoint proteins were not affected (Figure 2a, right). As shown in Figure 2b, the addition of calcium induced a loss of the H1 kinase activity in both control and Rsk2-depleted CSF extracts in the absence of Nocodazole (Figure 2b, ΔCT and ΔRSK2 −Noco). However, though control-depleted CSF extracts maintained H1 kinase activity and chromatin condensation in the presence of Nocodazole (Figure 2b, ΔCT +Noco), Rsk2-depleted extracts lost H1 kinase activity and decondensed chromatin after calcium addition, indicating Rsk2 is required to maintain the SAC activity in these extracts (Figure 2b, ΔRSK2 +Noco).

We next analysed whether the failure of the spindle checkpoint in Rsk2-depleted CSF extracts was associated with a modification of the localization pattern of the different checkpoint proteins. To do that, we first depleted CSF extracts of Rsk2 and we subsequently supplemented these extracts with sperm nuclei. Finally, chromosomes were isolated and the kinetochore localization of Aurora B, INCENP, Bub1, Mps1, CENP-E, Mad1, Mad2 and Bub3 was examined by immunofluorescence. The results showed a loss of the kinetochore binding of all these proteins (Figure 3a) indicating that Rsk2 association at the kinetochores is required to maintain the SAC activation by allowing the localization of the other checkpoint proteins to the kinetochores, thus, Rsk2 could be the most upstream protein of the spindle checkpoint pathway. To test whether this was the case, we analysed the kinetochore localization of Rsk2 in CSF extracts in which the most upstream protein of the SAC pathway, Aurora B, was depleted (Vigneron *et al*., 2004). As depicted in Figure 3b, the depletion of Aurora B from CSF extracts induced a complete disappearance of the immunofluorescence signal of Rsk2 indicating that the kinetochore localizations of Aurora B and Rsk2 are dependent on each other and that they could act together at the same level of the spindle checkpoint pathway.

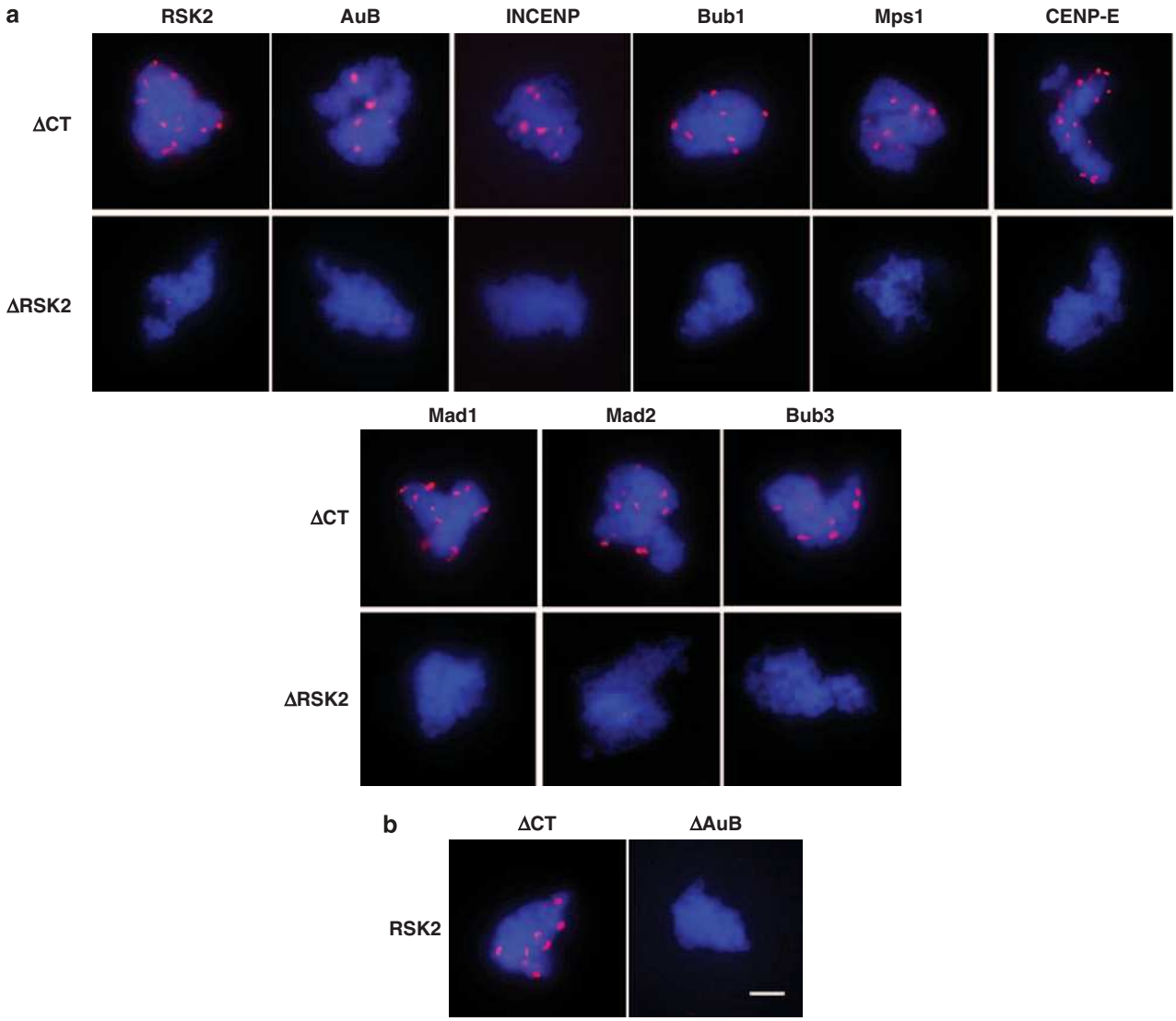


Figure 3 Rsk2 regulates the kinetochore localization of all the other SAC proteins in Xenopus egg extracts. (**a**) Control (ΔCT) or anti-C-terminal Xenopus Rsk2-depleted CSF extracts (ΔRSK2) were supplemented with sperm nuclei and nocodazole and after a 75-min incubation used for immunofluorescence staining to analyse the kinetochore localization of Rsk2, Aurora B, INCENP, Bub1, Mps1, CENP-E, Mad1, Mad2 and Bub3. (**b**) Similar to (**a**) except for the immunodepletion of Aurora B instead of Rsk2. Bar, 5 μm.

Rsk2 knockdown in HeLa cells induces a loss of Mad1, Mad2 and CENP-E from the kinetochores under spindle checkpoint conditions

To extend our findings to human cells we knocked down Rsk2 in HeLa cells by siRNA. As shown in Figure 4a, Rsk2 siRNA induced a $>80\%$ decrease in endogenous Rsk2, 32 h after transfection. To analyse the role of Rsk2 in the maintenance of the SAC activity in these cells we treated Rsk2-knockdown cells with 50 ng/ml of nocodazole for 16 h and analysed the localization of the kinetochore protein CENP-A, and of the spindle checkpoint proteins BubR1, Bub1, INCENP, Mad1, Mad2 and CENP-E at the kinetochores. The knockdown of Rsk2 did not affect the basic structure of the kinetochores, as no difference in the localization of CENP-A was observed between control and Rsk2 siRNA-treated cells. We neither observed a difference in the localization of the spindle checkpoint proteins BubR1, Bub1 or INCENP. However, Rsk2-knockdown cells presented a clear decrease in the kinetochore localization of Mad1 (Figure 4f) and Mad2 (Figure 4g; Supplementary Figure S1) compared with control cells and a complete disappearance of the kinetochore staining of CENP-E (Figure 4h; Supplementary Figure S2). Thus, Rsk2 is required in HeLa cells for the kinetochore localization of CENP-E, Mad1 and Mad2. However, despite the fact that Rsk2 is clearly required for the kinetochore localization of these checkpoint proteins, we did not observe any difference in the mitotic index of Rsk2-knockdown cells when treated with nocodazole (data not shown) indicating that in these cells the SAC was active enough to maintain a metaphase arrest. In this regard, it is likely that the small amount of Mad2 left at the kinetochores after Rsk2 depletion was sufficient to maintain SAC activity and that this residual kinetochore localization of Mad2 is due to the

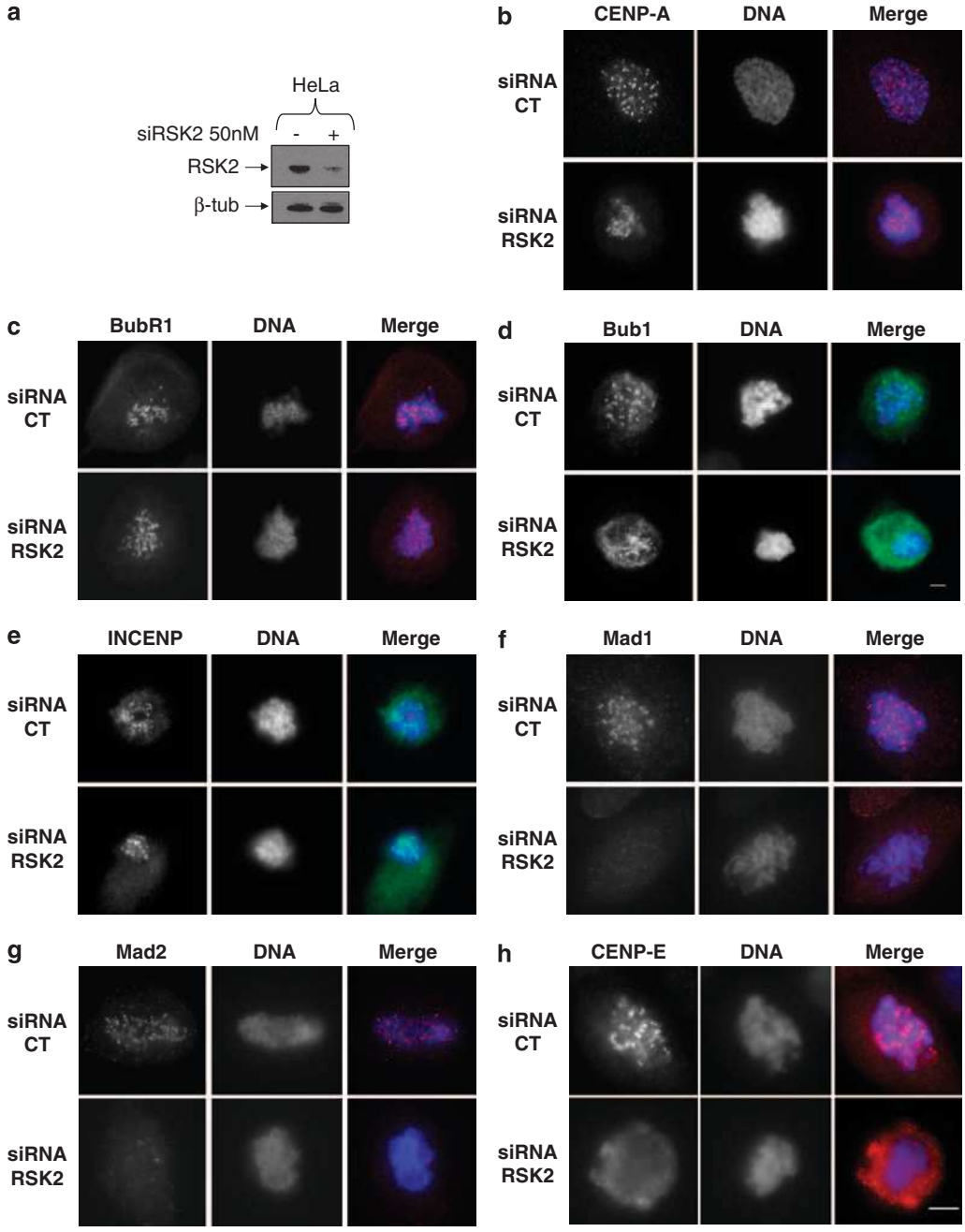


Figure 4 Rsk2 knockdown in HeLa cells induces a loss of Mad1, Mad2 and CENP-E from the kinetochores under SAC conditions. (**a**) HeLa cells were transfected with Rsk2 siRNA and the levels of this kinase were analysed 48 h after transfection by western blotting with anti-C-terminal human Rsk2. (**b**) HeLa cells were transfected with either a scramble siRNA (siRNA CT) or with a siRNA directed to the N-terminal domain of Rsk2 (siRNA RSK2); 24 h later, cells were incubated with nocodazole (50 ng/ml) for 16 h and were subsequently used to analyse the levels of CENP-A by immunofluorescence. (**c**–**h**) Similar to (**b**) except for the use of anti-BubR1, anti-Bub1, anti-INCENP, anti-Mad1, anti-Mad2 or anti-CENP-E antibodies, respectively, for the immunofluorescence analysis.

residual Rsk2 left in the cell after knockdown. However, we cannot exclude the possibility that this localization is mediated by other Rsk isoform, such as Rsk1. To investigate whether Rsk1 could also participate in the maintenance of the SAC, we depleted this protein by immunoprecipitation in Xenopus egg extracts and by siRNA treatment in human cells and analysed the kinetochore localization of the different SAC components. Despite the fact that more than 90% of the endogenous Rsk1 protein was depleted from CSF extracts, we did not observe any difference in the kinetochore localization of Aurora B, INCENP or CENP-E compared with controls (Figures 5a and b) whereas these proteins clearly disappeared from this localization after Rsk2 depletion. As in CSF extracts, after more than 85% knockdown of Rsk1, both control and siRNA-treated Hela cells presented identical kinetochore levels of Mad1, Mad2 and CENP-E indicating that

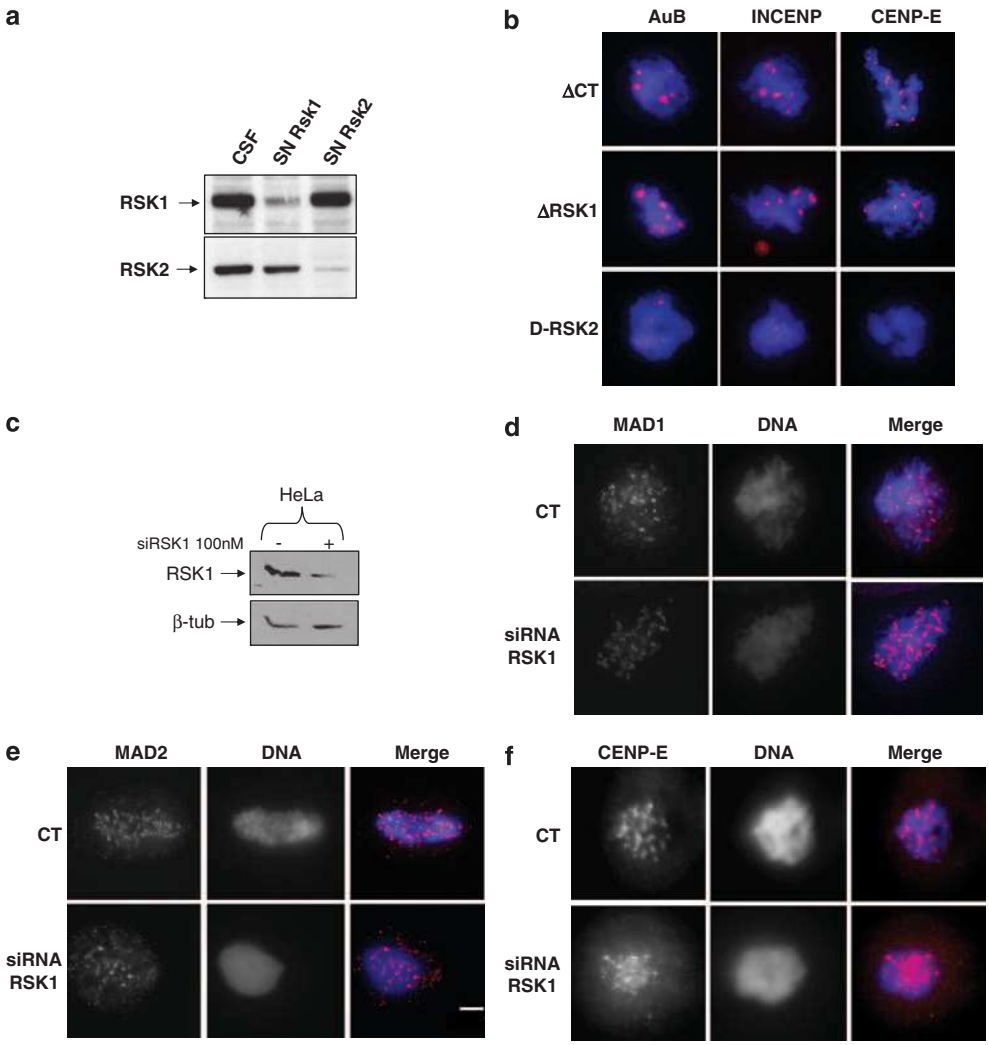


Figure 5 Rsk1 is not required for the maintenance of the SAC in CSF egg extracts and in human cells. (**a**) A sample of 1 μl of CSF extract (CSF) and Rsk1 or Rsk2 immunodepleted supernatants (SN) were used to analyse by western blotting the endogenous levels of Rsk1 and Rsk2. (**b**) Control (ΔCT) or anti-C-terminal Xenopus Rsk1 or Rsk2-depleted CSF extracts (ΔRSK1 and ΔRSK2, respectively) were supplemented with sperm nuclei and nocodazole and after a 75-min incubation used for immunofluorescence staining to analyse the kinetochore localization of Aurora B, INCENP, and CENP-E. (**c**) HeLa cells were transfected with Rsk1 siRNA and the levels of this kinase were analysed 48 h after transfection by western blotting with anti-C-terminal human Rsk1 antibodies. (**d**) HeLa cells were transfected (siRNA RSK1) or not (CT) with an siRNA directed to the N-terminal domain of Rsk1; 24 h later, cells were incubated with nocodazole (50 ng/ml) for 16 h and were subsequently used to analyse the kinetochore levels of Mad1 by immunofluorescence. (**e**, **f**) Similar to (**d**) except for the use of anti-human Mad2 or anti-human CENP-E, respectively, for the immunofluorescence analysis.

Rsk1 does not participate in the SAC (Figures 5c–f; Supplementary Figure S2).

Expression of a siRNA-resistant Rsk2 plasmid prevents the loss of Mad1, Mad2 and CENP-E from the kinetochores in human cells

To analyse the specificity of the Rsk2 knockdown on the kinetochore localization of Mad1, Mad2 and CENP-E, we performed the knockdown of Rks2 in Hela cells and 24 h later, we transfected a siRNA-resistant plasmid encoding a GFP-tagged form of Xenopus Rsk2. Cells were subsequently synchronized with a thymidine block for 24 h and treated with nocodazole for an additional period of 12 h. The kinetochore localization of Mad1, Mad2 and CENP-E was analysed in GFP-positive and -negative cells.

In this experiment, GFP staining appeared diffuse in most cells and the kinetochore localization of GFP-Rsk2 could not be visualized possibly because of the low permeabilization conditions required for Mad1, Mad2 and CENP-E immunofluorescences (0.1% Triton X100 in anti-human Mad1 and Mad2 versus 0.2% in the rest of the immunofluorescences and 100% methanol for anti-human CENP-E). Moreover, the results show that in GFP-negative cells, Mad1, Mad2 and CENP-E were completely absent from the kinetochores. On the contrary, these proteins clearly stained the kinetochores in GFP-positive cells (Figure 6). These data indicates that Xenopus Rsk2 protein rescues the effect of the

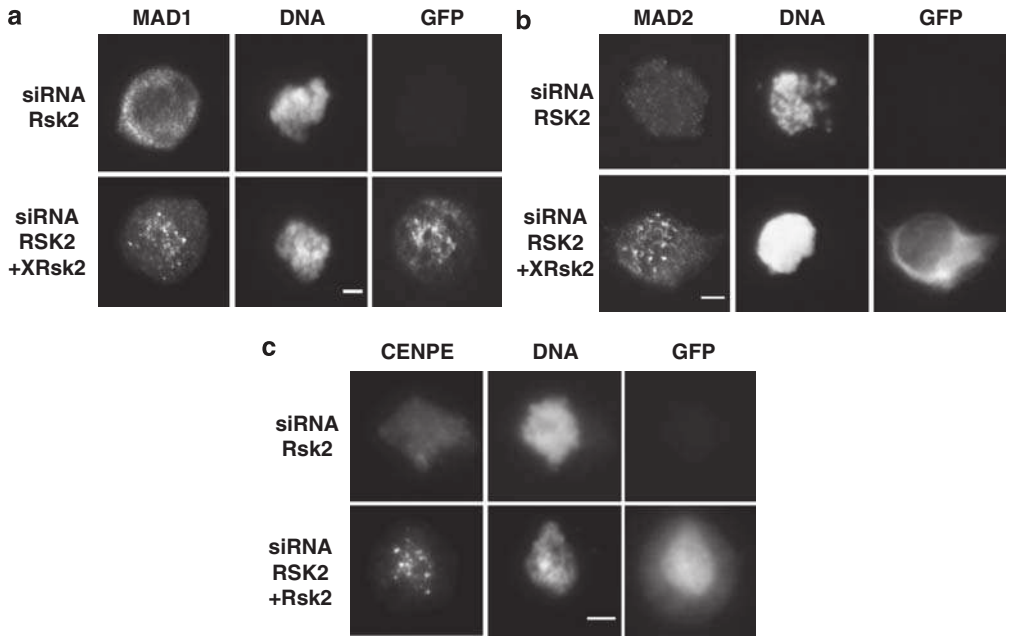


Figure 6 Expression of a siRNA-resistant Rsk2 plasmid prevented the loss of Mad1, Mad2 and CENP-E from the kinetochores in Rsk2-knockdown cells. (**a**) Rks2-knockdown Hela cells were transfected with an siRNA-resistant plasmid encoding a GFP-tagged form of Xenopus Rsk2. Cells were subsequently synchronized with a thymidine block for 24 h and treated with nocodazole for an additional period of 12 h. The kinetochore localization of Mad1 was analysed in Rsk2-knockdown cells (siRNA Rsk2) and in Rsk2-knockdown cells co-transfected with GFP-Xenopus Rsk2 (siRNA Rsk2 + XRsk2). (**b**, **c**) Similar to (**a**) except for the use of anti-human Mad2 or anti-human CENP-E, respectively, for the immunofluorescence analysis.

human Rsk2 siRNA knockdown confirming the specificity of the Rsk2 siRNA knockdown phenotypes.

We also analysed the effect of the add-back of an ectopic Xenopus Rsk2 protein to Rsk2-depleted CSF extracts. Unfortunately, the expression of ectopic Rsk2 did not prevent the phenotypes induced by Rsk2 depletion (data not shown). However, as similar phenotypes are observed in depleted egg extracts and in siRNA-treated cells, and that these phenotypes are clearly rescued in Hela cells by the expression of an siRNA-resistant Rsk2 protein, we hypothesize that the lack of rescue in Xenopus egg extracts is probably because of the loss of an Rsk2 partner during depletion other than MAPK that forms complex with this protein and that is likely required to mediate Rsk2-dependent SAC activity. Similar results have been shown for the kinase Aurora B in which its depletion in CSF extracts promotes the loss of the Aurora B–INCENP–Survivin–Borealin complex and the inactivation of the SAC. The subsequent addition of Aurora B does not restore SAC activity because of the absence of these other partners that are required to form the active complex (Vigneron *et al*., 2004).

In this regard, it seems surprising that kinetochore localization of Aurora B–INCENP–Survivin–Borealin complex is not affected by Rsk2 depletion in HeLa cells (INCENP is normally localized) whereas in Xenopus egg extracts this complex completely disappeared in the absence of Rsk2 kinase (Aurora B and INCENP disappeared from kinetochores after Rsk2 depletion). Similarly, Bub1 is also present in Rsk2-depleted Hela cells whereas it is completely absent in kinetochores from Rsk2-depleted extracts. However, these results could be explained taking into account the significant differences described in the regulation of the SAC between eukaryotic cells and egg extracts. Two branches of checkpoint signalling and silencing have been described in eukaryotic cells. One detects microtubule attachment and depends on Mad2 whereas the second detects tension and depends on BubR1 and Aurora B (Pinsky and Biggins, 2005). However, in egg extracts only a single pathway that detects attachment exists and contrary to eukaryotic cells, the attachment is dependent on Aurora B and Mad2 (Vigneron *et al*., 2004). Our results suggest that Rsk2 in eukaryotic cells participates in the branch regulating kinetochore attachment and thus, depletion of this kinase in HeLa cells induces Mad2 disappearance from the kinetochores without affecting BubR1 or Aurora B. Unlike eukaryotic cells, the same depletion in egg extracts, which contain only one branch, induces a disappearance of the kinetochore localization of all the SAC proteins downstream Rsk2.

CENP-E is completely lost from the kinetochores when Rsk2 is depleted in both human cells and Xenopus egg extracts. In Xenopus egg extracts CENP-E has been shown to be essential for the establishment of the SAC (Abrieu *et al*., 2000; Vigneron *et al*., 2004). In contrast, the role of CENP-E in the activation and kinetochore localization of mitotic checkpoint proteins in mammalian cells is not clear (Yao *et al*., 2000; McEwen *et al*., 2001). CENP-E is a kinesin-like motor protein that is required for efficient capture and attachment of spindle microtubules by kinetochores, a necessary step in chromosome alignment in the metaphase plate.

Accordingly, functional disruption of CENP-E in cultured cells results in the appearance of unaligned chromosomes. However, some studies report that the presence of unattached chromosomes because of CENP-E knockdown promotes SAC activation and induces a prolonged mitotic arrest (Yao *et al*., 2000; McEwen *et al*., 2001), whereas in others mitosis is not delayed suggesting an involvement of CENP-E in the maintenance of this checkpoint (Putkey *et al*., 2002; Tanudji *et al*., 2004). Our results show that the inactivation of Rsk2 induces the loss of the recruitment of CENP-E to the kinetochores in both Xenopus egg extracts and HeLa cells. However, though in Xenopus egg extracts Rsk2 depletion induces SAC inactivation, in HeLa cells the knockdown of Rsk2 does not prevent metaphase arrest after nocodazole treatment despite the complete absence of CENP-E from the kinetochores suggesting that under these conditions CENP-E would not be essential for the maintenance of the spindle checkpoint. In addition, the disappearance of CENP-E from the kinetochores after Rsk2 depletion suggests that this kinase could also be indirectly required for the correct attachment of spindle microtubules to the kinetochores. Accordingly, previous studies have shown that the knockdown of Rsk in HeLa cells induces an increase in chromosome segregation defects (Nam *et al*., 2008).

Conclusion

Our data shows that Rsk2 is required for the maintenance of the SAC in Xenopus egg extracts and probably also participates to maintain SAC activity in mammalian cells, although in the latter model we have been unable to observe a decrease in SAC activity, probably because of a residual level of Rsk2 left in cell after siRNA treatment. However, the knockdown of Rsk2 in these cells induces a clear decrease in the levels of kinetochore Mad1 and Mad2 and completely prevented the recruitment of CENP-E at the kinetochores suggesting that this kinase is required for the correct activation of the SAC in Xenopus egg extracts and in mammalian cells.

Materials and methods

Immunization procedures, plasmids and cell transfection and immunofluorescence

Immunization procedures, antibodies, plasmids and conditions of cell transfection and immunofluorescence are described in Supplementary data.

siRNA knockdown

Rsk2 and Rsk1 knockdown in HeLa cells were performed by using the siRNA sequence 5′-GGAGGAGATTAACCCAC AA-3′ located at the N-terminal domain of human Rsk2 and 5′-GUGGGCACCUGUAUGCUAU-3′ at the N-terminal domain of human Rsk1.

Preparation of Xenopus egg extracts, immunofluorescence and immunoprecipitation

CSF-arrested extracts and demembranated sperm nuclei were prepared as described (Murray, 1991).

For immunofluorescence staining of unreplicated chromosomes, 20 μl of CSF extract were incubated with nocodazole (10 μg/ml) and sperm nuclei (9000/μl) for 75 min. Chromosomes were isolated and processed as described (Abrieu *et al*., 2001).

For immunodepletion, 50 μg of affinity-purified antibodies (anti-Rsk2 and anti-Aurora B) or non-immune IgG were bound to 250 μl of Dynal beads protein A for 30 min and then added to 250 μl of CSF extract for 1 h at 4 °C. Two successive immunodepletions of 30 min each were performed to remove these two endogenous proteins.

Light microscopy

A DMR A Leica microscope, with a $\times 63$ or $\times 100$ immersion oil objective (HCX PL APO), tube factor 1, was used for epifluorescence imaging (A4, GFP, N2.1 cube filters, excitation HBO light bulb); images were captured with a Roper MicroMax 1300 Y/HS camera; the whole set was driven by MetaMorph (Universal Imaging Corporation, West Chester, PA, USA).

A Statif Axioimager 21 (Zeiss) with Structured Ilumination (ApoTome). Images were captured with an AxioCameraMRm (Zeiss, Le Pecq, France).

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgements

We thank Dr JE Ferrell for the generous gift of the pFast-Rsk2 WT and the pFast-Rsk2 KD constructs. We thank Julian Cau from the Montpellier RIO Imaging facility (CRBM). This work was supported by the Ligue Nationale Contre le Cancer (Equipe Labellisée). AB and EB are fellows from the Fondation pour la Recherche Medicale and the Ligue Nationale Contre le Cancer, respectively.

References

Abrieu A, Kahana JA, Wood KW, Cleveland DW. (2000). CENP-E as an essential component of the mitotic checkpoint *in vitro*. *Cell* **102**: 817–826.

Abrieu A, Magnaghi-Jaulin L, Kahana JA, Peter M, Castro A, Vigneron S *et al*. (2001). Mps1 is a kinetochore-associated kinase essential for the vertebrate mitotic checkpoint. *Cell* **106**: 83–93.

Anjum R, Blenis J. (2008). The RSK family of kinases: emerging roles in cellular signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**: 747–758.

Bhatt RR, Ferrell Jr JE. (2000). Cloning and characterization of Xenopus Rsk2, the predominant p90 Rsk isozyme in oocytes and eggs. *J Biol Chem* **275**: 32983–32990.

Chen RH, Sarnecki C, Blenis J. (1992). Nuclear localization and regulation of erk- and rsk-encoded protein kinases. *Mol Cell Biol* **12**: 915–927.

McEwen BF, Chan GK, Zubrowski B, Savoian MS, Sauer MT, Yen TJ. (2001). CENP-E is essential for reliable bioriented spindle

attachment, but chromosome alignment can be achieved via redundant mechanisms in mammalian cells. *Mol Biol Cell* **12**: 2776–2789.

Minshull J, Sun H, Tonks NK, Murray AW. (1994). A MAP kinase-dependent spindle assembly checkpoint in Xenopus egg extracts. *Cell* **79**: 475–486.

Murphy LO, Smith S, Chen RH, Fingar DC, Blenis J. (2002). Molecular interpretation of ERK signal duration by immediate early gene products. *Nat Cell Biol* **4**: 556–564.

Murray A. (1991). Cell cycle extracts. *Methods Cell Biol* **36**: 581–605.

Musacchio A, Salmon ED. (2007). The spindle-assembly checkpoint in space and time. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**: 379–393.

Nam HJ, Kim S, Lee MW, Lee BS, Hara T, Saya H *et al*. (2008). The ERK-RSK1 activation by growth factors at G2 phase delays cell cycle progression and reduces mitotic aberrations. *Cell Signal* **20**: 1349–1358.

Nebreda AR, Ferby I. (2000). Regulation of the meiotic cell cycle in oocytes. *Curr Opin Cell Biol* **12**: 666–675.

Nishiyama T, Ohsumi K, Kishimoto T. (2007). Phosphorylation of Erp1 by p90rsk is required for cytostatic factor arrest in Xenopus laevis eggs. *Nature* **446**: 1096–1099.

Pinsky BA, Biggins S. (2005). The spindle checkpoint: tension versus attachment. *Trends Cell Biol* **15**: 486–493.

Putkey FR, Cramer T, Morphew MK, Silk AD, Johnson RS, McIntosh JR *et al*. (2002). Unstable kinetochore-microtubule capture and chromosomal instability following deletion of CENP-E. *Dev Cell* **3**: 351–365.

Shapiro PS, Vaisberg E, Hunt AJ, Tolwinski NS, Whalen AM, McIntosh JR *et al*. (1998). Activation of the MKK/ERK pathway during somatic cell mitosis: direct interactions of active ERK with kinetochores and regulation of the mitotic 3F3/2 phosphoantigen. *J Cell Biol* **142**: 1533–1545.

Takenaka K, Gotoh Y, Nishida E. (1997). MAP kinase is required for the spindle assembly checkpoint but is dispensable for the normal M phase entry and exit in Xenopus egg cell cycle extracts. *J Cell Biol* **136**: 1091–1097.

Tanudji M, Shoemaker J, L'Italien L, Russell L, Chin G, Schebye XM. (2004). Gene silencing of CENP-E by small interfering RNA in HeLa cells leads to missegregation of chromosomes after a mitotic delay. *Mol Biol Cell* **15**: 3771–3781.

Tunquist BJ, Maller JL. (2003). Under arrest: cytostatic factor (CSF)-mediated metaphase arrest in vertebrate eggs. *Genes Dev* **17**: 683–710.

Vigneron S, Prieto S, Bernis C, Labbe JC, Castro A, Lorca T. (2004). Kinetochore localization of spindle checkpoint proteins: who controls whom? *Mol Biol Cell* **15**: 4584–4596.

Wang XM, Zhai Y, Ferrell Jr JE. (1997). A role for mitogen-activated protein kinase in the spindle assembly checkpoint in XTC cells. *J Cell Biol* **137**: 433–443.

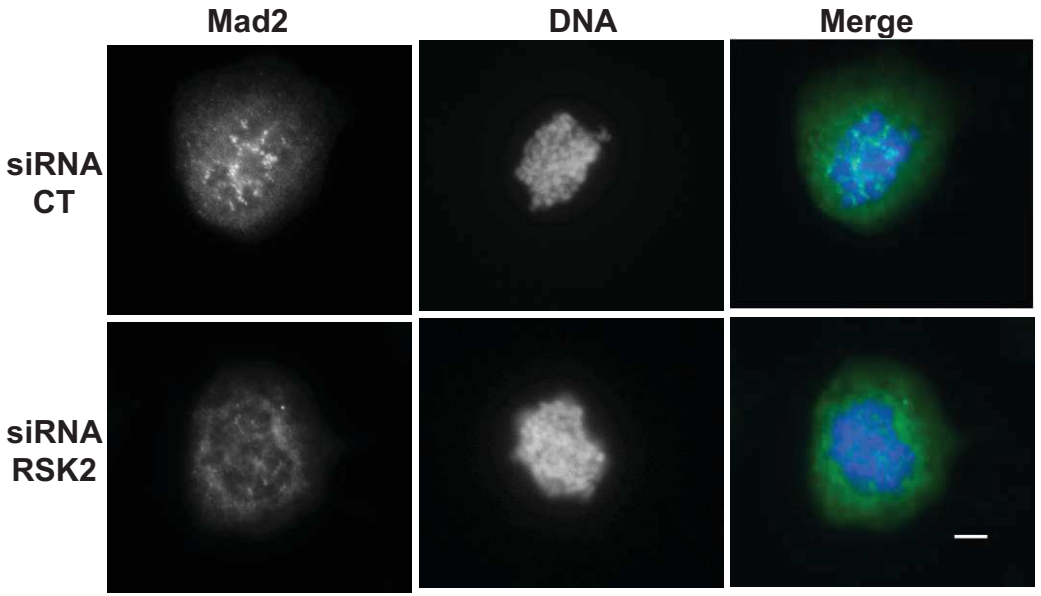
Willard FS, Crouch MF. (2001). MEK, ERK, and p90RSK are present on mitotic tubulin in Swiss 3T3 cells: a role for the MAP kinase pathway in regulating mitotic exit. *Cell Signal* **13**: 653–664.

Wu JQ, Hansen DV, Guo Y, Wang MZ, Tang W, Freel CD *et al*. (2007). Control of Emi2 activity and stability through Mos-mediated recruitment of PP2A. *Proc Natl Acad Sci USA* **104**: 16564–16569.

Yao X, Abrieu A, Zheng Y, Sullivan KF, Cleveland DW. (2000). CENP-E forms a link between attachment of spindle microtubules to kinetochores and the mitotic checkpoint. *Nat Cell Biol* **2**: 484–491.

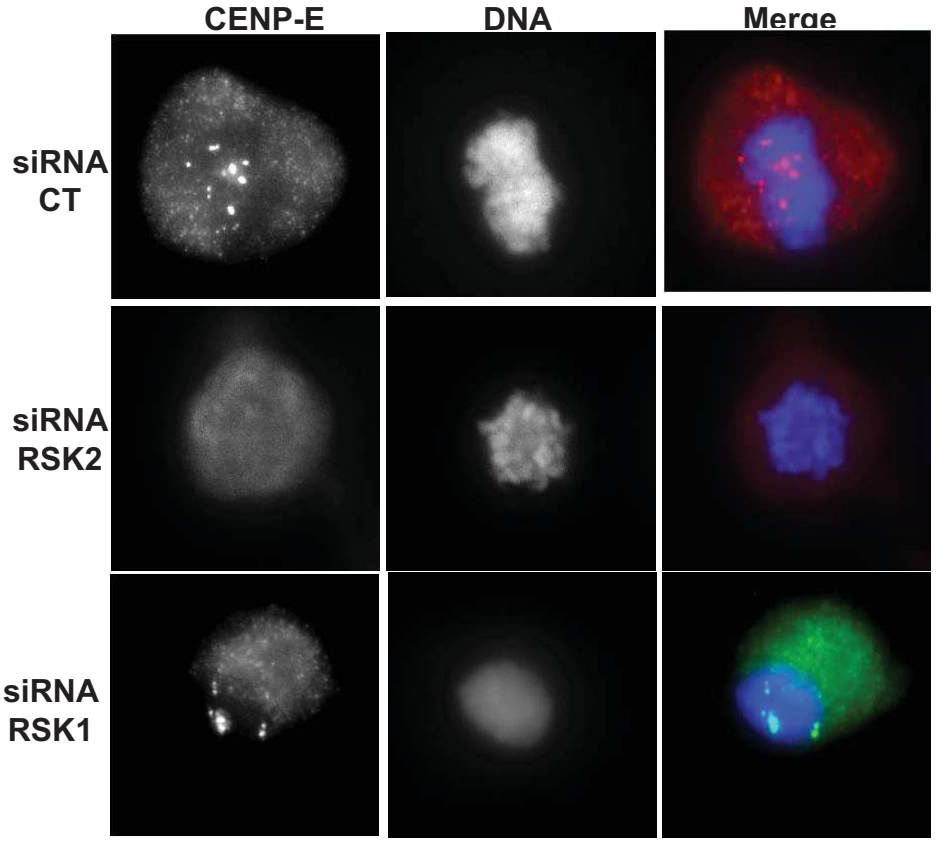
Supplementary Information accompanies the paper on the Oncogene website (http://www.nature.com/onc)

Figure S1



Control and Rsk2-knockdown cells were treated with 50 ng/ml of nocodazole during 16 hours and the kinetochore localization of Mad2 was analysed by using antibodies directed against full lenght Xenopus Mad2 protein (Lorca et al.1998 EMBO 17:3565-3575).

Figure S2



Control, Rsk2 and Rsk1-knockdown cells were treated with 50 ng/ml of nocodazole during 16 hours and the kinetochore localization of CENP-E was analysed by using antibodies directed against full lenght Xenopus CENP-E protein (Vigneron et al.Mol Biol Cell 15 (10):4584-4596).

METHODS

Figure S3

Immunization procedures

The Xenopus anti-Aurora B and anti-Mad2 antibodies have been described elsewhere (Castro et al, 2002; Lorca et al, 1998). Antibodies against the N-terminal domain of Xenopus Mps1 (residues 1 to 626) were obtained as previously described (Abrieu et al, 2001). CENP-E was detected by using anti-human CENP-E monoclonal antibody in Hela cells (1H1, AbCam) (Figures 4H and 5F) or anti-tail Xenopus CENP-E polyclonal antibodies inCSF extrats (Figures 1A, 3A, 5B and Figure S2) (Wood et al, 1997). Anti Xenopus Bub1 antibodies were generated against a GST fusion protein corresponding to the N-terminal domain of this protein (residues from 1 to 850). Anti Xenopus Rsk2 antibodies were obtained against either a His-tagged Xenopus Rsk2 protein (Full Length Rsk2 antibodies) or against a peptide corresponding to the 12 last C-terminal aminoacids (Cterminal Rsk2 antibodies). Finally, rabbit polyclonal antibodies anti-Xenopus Bub3 and Mad1 were generated against two peptides (MNTQTDMTGSNE and MDDSEDNTTVIS respectively) corresponding to the N-terminal sequence of these proteins.

Anti-Cterminal human Rsk1 polyclonal antibody, anti-Cterminal human Rsk2 monoclonal antibody (E1), anti-Mad2 monoclonal antibody (17D10) and anti-Mad1 monoclonal antibody (9B10) were obtained from Santa Cruz Biotechnology.

Anti-Cterminal Xenopus Rsk2 as well as anti-Cterminal human Rsk1 (Santa Cruz) were used in CSF extracts for immunoprecipitation, immunobloting as well as for immunofluorescence except for Figure 1A in which anti-full length Xenopus Rsk2 was also used.

Plasmids

pFastBac1-Xenopus Rsk2 wild-type and kinase dead mutant (K97R) constructs were kindly provided by Dr. JE Ferrell. Both cDNAs were subcloned in a pCS2 plasmid in which the GFP cDNA from the phmGFP vector (Promega) was subcloned in the StuI-XbaI site.

Cell culture, transfection and immunofluorescence

Human HeLa cells were grown in DMEM medium with 10% FBS and penicillin/streptomycin. Plasmid transfections were performed by using Fugene (Roche).

For immunofluorescence, cells were first fixed with either 3,7% formaldehyde or with 100% methanol (when anti-INCENP or anti-human CENP-E antibodies were used) for 10 minutes at room temperature, permeabilized with 0,2% of Triton X100 in PBS for 10 min (except for anti-human Mad2 and Mad1 antibodies where we used 0,1% Triton W100) and blocked with 5% of FBS in PBS for 30 min. Polyclonal anti-XCENP-E tail (1/600), anti-XMad2 (1/200), anti-XBub1 (1/200) anti-XINCENP (1/400) (Vigneron et al, 2004) and monoclonal anti-hCENP-A (1/300, Abcam) and anti-hBubR1(1/500, BD Transduction Laboratories) were used as primary antibodies. The corresponding Alexa488 (1/600) or Alexa555 (1/1000) anti-rabbit or anti-mouse secondary antibodies (Molecular Probes) were used as indicated.

References

1-Abrieu A, Magnaghi-Jaulin L, Kahana JA, Peter M, Castro A, Vigneron S, Lorca T, Cleveland DW, Labbe JC (2001) Mps1 is a kinetochore-associated kinase essential for the vertebrate mitotic checkpoint. *Cell* **106**(1)**:** 83-93.

2-Castro A, Arlot-Bonnemains Y, Vigneron S, Labbe JC, Prigent C, Lorca T (2002) APC/Fizzy-Related targets Aurora-A kinase for proteolysis. *EMBO Rep* **3**(5)**:** 457-462.

3-Lorca T, Castro A, Martinez AM, Vigneron S, Morin N, Sigrist S, Lehner C, Doree M, Labbe JC (1998) Fizzy is required for activation of the APC/cyclosome in Xenopus egg extracts. *Embo J* **17**(13)**:** 3565-3575

4-Vigneron S, Prieto S, Bernis C, Labbe JC, Castro A, Lorca T (2004) Kinetochore localization of spindle checkpoint proteins: who controls whom? *Mol Biol Cell* **15**(10)**:** 4584-4596

5-Wood KW, Sakowicz R, Goldstein LS, Cleveland DW (1997) CENP-E is a plus end-directed kinetochore motor required for metaphase chromosome alignment. *Cell* **91**(3)**:** 357-366

ARTICLE 2 : GREATWALL MAINTIENT L'ETAT MITOTIQUE VIA L'INHIBITION DE PP2A

I. CONTEXTE DE L'ÉTUDE

L'entrée et la sortie de mitose sont régulées par le complexe cycline B/Cdk1 ou MPF. Ce complexe est activé à la transition G2/M par la boucle d'activation du MPF, et inactivé en anaphase par la dégradation de la cycline B. Mises à part, les kinases Plx1, CAK, Wee1, Myt1 et la phosphatase Cdc25 qui participent à la boucle d'activation du MPF, un nouveau régulateur de la mitose, Greatwall a été mis en évidence. En effet, il a été montré que l'immunodéplétion de Gwl dans des extraits arrêtés en métaphase II (arrêt CSF) induit la sortie de mitose sans dégradation de la cycline B et avec phosphorylation des résidus Thr14 et Tyr 15. De plus, l'immunodéplétion de Gwl dans des extraits d'œufs de xénope cyclants ne permet pas à ces extraits d'entrer en mitose (Yu et al, 2006 ; Zhao et al, 2008). En outre, il a été mis en évidence que le MPF phosphoryle Gwl *in vitro* et cette phosphorylation pourrait activer cette kinase (Yu et al, 2006). Ces observations suggèrent que Gwl est un régulateur important de l'entrée en mitose et de la progression mitotique. Cependant le mécanisme par lequel il régule ces événements est encore mal connu. C'est dans ce contexte que nous nous sommes proposés d'étudier le mécanisme par lequel Gwl régule la mitose.

II. RÉSULTATS

Gwl maintien l'état mitotique indépendamment de l'activité du MPF par l'inhibition des déphosphorylations des substrats mitotiques

L'immunodéplétion de Gwl conduit à l'inactivation du MPF, sans dégradation de la cycline B et à la rephosphorylation de la Tyr15 de Cdk1, suggérant que Gwl participerait à la boucle d'auto-amplification du MPF, soit par inactivation des kinases Wee1 et Myt1, soit par activation de la phosphatase Cdc25 (Zhao et al, 2008). Nous avons commencé

notre étude en analysant si Wee1 et/ou Myt1 pourrait être régulées par Gwl. Pour déterminer si Gwl régule le MPF par inactivation de Wee1 et Myt1, nous avons co-immunodéplété dans des extraits d'œufs de xénope arrêtés en métaphase II, Wee1 et Gwl ou Myt1 et Gwl. Pour déterminer si l'état mitotique est présent dans ces extraits nous avons analysé la décondensation de l'ADN, l'état de phosphorylation des phosphoprotéines mitotiques Emi2/Erp1, Cdc27 (sous-unité de l'APC/C), Cdc25, le résidu Tyr15 de Cdk1, et enfin l'activité du MPF via l'activité H1 kinase. Comme il a été montré précédemment par Zhao *et al,* nous observons que l'immunodéplétion de Gwl induit la décondensation de l'ADN, ainsi que la déphosphorylation des substrats mitotiques Emi2/Erp1, Cdc27 et Cdc25, et la rephosphorylation de la Tyr15 de Cdk1 (Figure 1A). Afin de vérifier que le phénotype induit par l'immunodéplétion de Gwl est spécifique, des extraits d'œufs de xénope arrêtés en métaphase II ont été immunodéplétés de Gwl et ensuite supplémentés avec la forme sauvage ou la forme inactive de Gwl (Figure S2A). Nous observons que le phénotype induit par l'immunodéplétion de Gwl est parfaitement sauvé par l'addition de la protéine sauvage, alors que la forme inactive n'a aucun effet sur le phénotype, ce qui indique que le phénotype observé par l'immunodéplétion de Gwl est spécifique à Gwl.

La co-immunodéplétion de Gwl et Wee1 ne prévient pas la déphosphorylation des phosphoprotéines ni la perte d'activité du MPF (Figure 1A). Les mêmes résultats sont observés lorsque Gwl et Myt1 sont co-immunodéplétés (Figure 1B). Les kinases Wee1 et Myt1 peuvent indifféremment phosphoryler les résidus Thr14 et Tyr 15 même si Myt1 a une préférence pour le résidu Thr14 (Liu et al, 1994), et Wee1 pour le résidu Tyr15. Nos résultats montrent que ni l'immunodéplétion de Wee1 ni celle de Myt1 ne sauve pas individuellement le phénotype induit par Gwl suggérant que soit l'immunodéplétion de l'une ou l'autre de ces kinases peut être compensée par la kinase restante, soit ces kinases ne sont pas les cibles directes de Gwl.

Pour déterminer si Myt1 et Wee1 sont les cibles de Gwl, nous avons réalisé une triple immunodéplétion de Gwl, Wee1 et Myt1. L'immunodéplétion de Wee1 et Myt1 assure l'activation complète du MPF. Cependant, de manière surprenante, nous observons une déphosphorylation des substrats mitotiques Emi2/Erp1, Cdc27, MAPK, Rsk2, Cdc25, Cdc20, en présence d'un MPF complètement actif (Figure 2). Ces résultats

suggèrent que Wee1 et Myt1 ne sont pas des cibles de Gwl. Par conséquent, Gwl maintiendrait l'état mitotique par un nouveau mécanisme indépendant de la boucle d'amplification du MPF qui serait probablement lié à la déphosphorylation des substrats mitotiques par une phosphatase.

La microcystine et l'acide okadaique, inhibiteurs de PP1/PP2A sauvent le phénotype induit par l'inactivation de Gwl dans des extraits d'œufs de xénope arrêtés en métaphase II

La déphosphorylation rapide des substrats mitotiques induit par l'immunodéplétion de Gwl malgré l'activité du MPF suggèrent que cette kinase pourrait agir comme un inhibiteur de phosphatase. Une étude récente a montré que la phosphatase calcineurine est requise pour la déphosphorylation des phosphoprotéines en sortie de méiose (Mochida and Hunt, 2007 ; Nishiyama et al, 2007). De plus, nos résultats montrent que la surexpression de Gwl dans des extraits d'œufs de xénope arrêtés en métaphase II induit un délai de sortie de méiose après ajout de calcium (figure S2B). Par conséquent, une des cibles de Gwl pourrait être la calcineurine. Pour tester cette hypothèse, nous avons utilisé la cyclosporine qui est un inhibiteur spécifique de la calcineurine. Dans des extraits d'œufs de xénope arrêtés en méaphase II, l'ajout de cyclosporine et de calcium induit un retard de sortie de méiose. Cependant, l'ajout de cyclosporine dans des extraits arrêtés en métaphase II déplétés de Gwl n'a aucun effet sur la cinétique de sortie de mitose. Ces résultats indiquent que l'inhibition de la calcineurine ne sauve pas le phénotype induit par l'immunodéplétion de Gwl, suggérant que Gwl ne régule pas la sortie de méiose via la l'inhibition de la calcineurine.

PP1 et PP2A sont les phosphatases majeures des extraits d'œufs de xénope, et il a été suggéré que ces phosphatases participent à la sortie de mitose. En effet, l'inhibition de PP2A dans des extraits d'œufs de xénope arrêtés en métaphase II induit la dégradation de la cycline B et la sortie de méiose (Lorca et al, 1991). Plus récemment, il a été mis en évidence que PP1 serait inhibée durant la mitose par phosphorylation du MPF, et activée après la dégradation de la cycline B pour déphosphoryler les phosphoprotéines mitotiques (Wu et al, 2009). L'hypothèse est donc que Gwl pourrait réguler négativement ces phosphatases. Pour tester cette hypothèse, nous avons tout d'abord utilisé la microcystine qui est un inhibiteur à la fois de PP1 et PP2A (MacKintosh

et al, 1990 ; Rivas et al, 2000), et nous avons analysé si l'ajout de cette drogue pouvait sauver la sortie de mitose induite par l'immunodéplétion de Gwl. Après ajout de la microcystine dans les extraits arrêtés en métaphase II immunodéplétés de Gwl, les substrats mitotiques Cdc27, Cdc25, la MAPK, et Wee1 sont rephosphosphorylées, la Tyr15 est déphosphorylée et le MPF redevient actif (Figure 3A). Il semble donc que la microcystine sauve le phénotype induit par l'immunodéplétion de Gwl.

Cependant, comme la microcystine inhibe à la fois PP1 et PP2A, elle ne nous permet pas de conclure laquelle des deux phosphatases pourrait être régulée négativement par Gwl. Pour répondre à cette question nous avons utilisé un autre inhibiteur de ces phosphatases qui est l'acide okadaique. La concentration inhibitrice maximale à 50% ou IC50 de l'acide okadaique pour PP1 se situe entre 15 et 50 nM alors qu'elle est entre 0,1 et 0,3 nM pour PP2A (Felix et al, 1990). Cette drogue peut donc être utilisée pour distinguer le rôle de ces phosphatases. Dans un premier temps, nous avons effectué une gamme dose réponse de la capacité de l'acide okadaique à sauver le phénotype induit par l'immunodéplétion de Gwl. Nos résultats montrent qu'avec les doses de 600 nM et 800 nM d'acide okadaique, le phénotype de Gwl est sauvé (Figure 3B). Cette concentration est ensuite affinée pour trouver la dose minimale capable de sauver le phénotype. Nous avons mis en évidence que la concentration de 500 nM d'acide okadaique est suffisante pour induire la rephosphorylation des substrats mitotiques Cdc27, Cdc25, la MAPK, Wee1, la déphosphorylation de la Tyr15 de Cdk1 ainsi que la réactivation du MPF (Figure 3C). Il est décrit dans la littérature que la dose de 500nM d'acide okadaique inhibe 70% de PP2A et seulement 20% de PP1, par conséquent il est plus probable que PP2A plutôt que PP1 soit impliquée dans le sauvetage de phénotype induit par l'immunodéplétion de Gwl. Pour confirmer que PP1 n'est pas régulée négativement par Gwl, nous avons utilisé un inhibiteur spécifique de PP1, l'Inhibiteur 2 (I2). Après ajout de cet inhibiteur dans des extraits arrêtés en métaphase II immunodéplétés de Gwl, les substrats mitotiques ne sont pas rephosphorylés, suggérant que PP1 ne serait pas régulée par Gwl. Par ailleurs, des extraits arrêtés en métaphase II immunodéplétés de Gwl et traités par l'acide okadaique puis supplémentés avec la protéine recombinante PP2A active présentent une réversion de l'effet de l'acide okadaique. Par conséquent, ces résultats suggèrent que Gwl régulerait la sortie de mitose via l'inhibition de PP2A.

Gwl s'associe à PP2A dans les cellules humaines et dans les extraits d'œufs de xénope arrêtés en métaphase II

Les résultats précédents ont mis en évidence que Gwl pourrait maintenir l'état mitotique en régulant négativement l'activité de PP2A, évoquant que Gwl et PP2A pourrait interagir. Pour tester cette hypothèse, Gwl et les sous unités PP2A/A et PP2A/C ont été surexprimées dans des cellules Hek293T. Dans un premier temps, les plasmides codant les protéines YFP-Gwl et les sous-unités PP2A/A et PP2/C non taguées ont été co-transfectées et les lysats cellulaires ont ensuite été immunoprécipités avec un anticorps anti-YFP ou un anticorps contrôle. Les sous-unités PP2A/A et PP2A/C sont présentes dans l'immunoprécipitation anti-YFP mais pas celle avec l'anticorps contrôle (Figure 4A). Dans un second temps, HA-PP2A/C et PP2/C ont été co-exprimées dans les cellules, et les lysats cellulaires ont été immunoprécipités avec un anticorps anti-HA. Gwl endogène et PP2A/A ont été retrouvées dans l'immunoprécipitation anti-HA mais pas dans l'immunoprécipitation contrôle (Figure 4B). Finalement, les lysats des cellules exprimant YFP-Gwl et PP2A/A ont été immunoprécipités avec un anticorps anti-YFP. Dans cette condition, ni PP2A/A ni PP2A/C ne sont retrouvées dans l'immunoprécipitation (Figure 4C). Ces observations nous suggèrent que dans les cellules Hek293T, Gwl, PP2A/A et PP2A/C interagissent entre elles et que cette interaction est dépendante de la sous unité PP2A/C.

Nous avons ensuite examiné l'interaction de Gwl et PP2A dans des extraits d'œufs de xénope arrêtés en métaphase II. Pour cela PP2A a été immunoprécipité à l'aide d'un anticorps monoclonal dirigé contre la sous unité PP2A/A (Kremmer et al, 1997). Nos résultats montrent que Gwl est clairement présent dans l'immunoprécipitation de PP2A mais pas dans l'immunoprécipitation contrôle. Egalement, lorsque Gwl est immunoprécipitée nous détectons PP2A/C (Figure 4D). Notons que seulement une petite quantité de PP2A/C co-précipite avec Gwl ce qui suggère que Gwl lie une sous population de PP2A présent dans ces extraits. Ces résultats montrent que dans les cellules Hek293T et dans les extraits mitotiques de xénope, PP2A est associée au moins en partie à Gwl.

Gwl maintien l'état mitotique en inhibant PP2A

Nous avons précédemment démontré que Gwl lie PP2A et que l'inhibition de PP2A sauve le phénotype induit par l'immunodéplétion de Gwl. Afin de vérifier que PP2A est bien une cible de Gwl, des extraits arrêtés en métaphase II ont été co-immunodéplétés de PP2A/A et Gwl. Dans ces conditions, les protéines Cdc27 et la cycline B2 sont phosphorylées, la Tyr15 de Cdk1 est déphosphorylée et le MPF est activé, indiquant que l'immunodéplétion de PP2A sauve le phénotype induit par l'immunodéplétion de Gwl dans les extraits CSF.

Finalement, nous avons analysé si Gwl module l'activité de déphosphorylation des substrats de cycline B/Cdk1 par PP2A. Pour cela, nous avons utilisé le substrat du MPF, c-Mos (Castro et al, 2001). Dans un premier temps, cMos est phosphorylée en présence d'ATP$^{\gamma 33}$ par le complexe MPF qui a été préalablement immunoprécipité à partir d'extraits d'œufs de xénope arrêtés en métaphase II. Dans un second temps, l'échantillon radioactif de cMos^{p33} est incubé en présence du complexe PP2A obtenu à partir d'une immunoprécipitation issus d'extraits arrêtés en métaphase II immunodéplété en Gwl ou contrôle. Le niveau de phosphorylation cMos^{p33} est ensuite analysé à différents temps. Après 80 min, nos résultats montrent une diminution significative du niveau de phosphorylation de cMos^{p33} lorsqu'il a été incubé avec PP2A issus de d'extraits arrêtés en métaphase II immunodéplété de Gwl par rapport à PP2A issus des extraits arrêtés en métaphase II contrôle (Figure 5). Par conséquent, les résultats indiquent que la déphosphorylation des substrats du MPF par PP2A est régulée par Gwl dans des extraits d'œufs de xénope arrêtés en métaphase II.

III. CONCLUSION

Nos résultats montrent qu'en plus de l'activé du MPF, l'activité de Gwl est également nécessaire pour maintenir l'état mitotique. En effet, Gwl régule l'état mitotique en régulant négativement la phosphatase PP2A, responsable de la déphosphorylation des substrats du MPF.

The EMBO Journal (2009) 28, 2786–2793 | © 2009 European Molecular Biology Organization | All Rights Reserved 0261-4189/09
www.embojournal.org

THE EMBO JOURNAL

Greatwall maintains mitosis through regulation of PP2A

Suzanne Vigneron, Estelle Brioudes, Andrew Burgess, Jean-Claude Labbé, Thierry Lorca[1,*] and Anna Castro[1,*]

[1]Centre de Recherche de Biochimie Macromoléculaire, CNRS UMR 5237, IFR 122, Labellisée Ligue Nationale Contre le Cancer, Universités Montpellier 2 et 1, Montpellier, France

Greatwall (GW) is a new kinase that has an important function in the activation and the maintenance of cyclin B–Cdc2 activity. Although the mechanism by which it induces this effect is unknown, it has been suggested that GW could maintain cyclin B–Cdc2 activity by regulating its activation loop. Using *Xenopus* egg extracts, we show that GW depletion promotes mitotic exit, even in the presence of a high cyclin B–Cdc2 activity by inducing dephosphorylation of mitotic substrates. These results indicate that GW does not maintain the mitotic state by regulating the cyclin B–Cdc2 activation loop but by regulating a phosphatase. This phosphatase is PP2A; we show that (1) PP2A binds GW, (2) the inhibition or the specific depletion of this phosphatase from mitotic extracts rescues the phenotype induced by GW inactivation and (3) the PP2A-dependent dephosphorylation of cyclin B–Cdc2 substrates is increased in GW-depleted *Xenopus* egg extracts. These results suggest that mitotic entry and maintenance is not only mediated by the activation of cyclin B–Cdc2 but also by the regulation of PP2A by GW.

The EMBO Journal (2009) **28,** 2786–2793. doi:10.1038/emboj.2009.228; Published online 13 August 2009
Subject Categories: proteins; cell cycle
Keywords: cyclin B–Cdc2; greatwall; mitosis; PP2A

Introduction

The entry into mitosis is driven by the activation of the cell-cycle kinase cyclin B–Cdc2 or MPF. MPF activity oscillates through the cell cycle, peaking at mitosis and dropping during interphase. The primary event controlling MPF activation is the binding of Cdc2 to cyclin B. The expression of cyclin B is restricted to late S and G2 phases and thus, the formation of the complex can only take place during this phase of the cell cycle (Pines and Hunter, 1989; Nurse, 1990). After cyclin B–Cdc2 association, which only yields a partially active complex, the CAK kinase phosphorylates Cdc2 at thr 161. This phosphorylation induces a change in the T loop of Cdc2, making the catalytic cleft fully accessible to ATP (Russo *et al*, 1996; Draetta, 1997; Fesquet *et al*, 1997). Finally, Cdc2 is regulated by phosphorylation at thr 14 and tyr 15, which involves a balance of the inhibitory kinases Myt1/Wee1 and the activatory phosphatase Cdc25. Myt1/Wee1 phosphorylate Cdc2 at residues thr 14 and tyr 15 during G2, whereas Cdc25 reverses these inhibitory phosphorylations at mitotic entry (Morgan, 1997). This model proposes that after thr 161 phosphorylation, cyclin B–Cdc2 complexes are held in an inactive state by phosphorylation at Thr 14 and Tyr 15 by Myt1 and Wee1. At the end of the G2 phase, the MPF feedback loop is activated by the abrupt dephosphorylation of these residues by Cdc25. This dephosphorylation promotes an initial activation of cyclin B–Cdc2, which in turns activates Cdc25 and inactivates Wee1 and Myt1 by phosphorylation, resulting in full activation of the cyclin B–Cdc2 complex (Perdiguero and Nebreda, 2004; Perry and Kornbluth, 2007).

Apart from CAK, Cdc25, Myt1 and Wee1, a new MPF regulator, GW, has been described. The depletion of GW from metaphase II-arrested *Xenopus* egg extracts (CSF extracts) induces mitotic exit, whereas the same depletion prevents mitotic entry in cycling extracts. GW kinase has an important function in both, the activation and the maintenance of cyclin B–Cdc2 activity, however, the mechanism by which it regulates this complex is completely unknown (Yu *et al*, 2006; Zhao *et al*, 2008).

Results

Greatwall maintains the mitotic state independently of MPF activity by inhibiting dephosphorylation

The removal of GW in mitosis induces the inactivation of MPF concomitantly with phosphorylation of Cdc2 at tyr 15, indicating that it could regulate the MPF feedback loop. To characterize the mechanism by which GW regulates cyclin B–Cdc2 kinase activity, we used CSF extracts depleted of GW alone or co-depleted of Wee1 or Myt1 and GW, and analysed the state of DNA condensation, the phosphorylation of Erp1/Emi2, Cdc27, Cdc25, and tyr 15 of Cdc2 and the activity of cyclin B–Cdc2. Our antibodies efficiently depleted the corresponding proteins from the extracts (Supplementary Figure S1). Moreover, as previously described, GW depletion induced the MPF inactivation, as reflected by dephosphorylation of Erp1/Emi2, Cdc27 and Cdc25; rephosphorylation on tyr 15 of Cdc2 and a decondensation of the DNA (Figure 1A, left panels). This corresponds to a specific effect of GW removal, as the observed phenotype is clearly rescued by the addition of a recombinant wild-type form of GW, but not by a kinase-dead version (Supplementary data, Figure S2A). As tyr 5 of Cdc2 was phosphorylated in the absence of GW, we expected that the co-depletion of Wee1 or Myt1 and GW would reverse this phenotype. However, Wee1/GW co-depletion neither reversed the phosphorylation of tyr 15 nor prevented the MPF inactivation (Figure 1A, right panels),

*Corresponding author. A Castro or T Lorca, Centre de Recherche de Biochimie Macromoléculaire, CNRS UMR 5237, IFR 122, Labellisée Ligue Nationale Contre le Cancer, Universités Montpellier 2 et 1, 1919 Route de Mende, 34293 Montpellier cedex 5, France.
Tel.: +33 4 6761 3330; Fax: +33 4 6752 1559;
E-mails: anna.castro@crbm.cnrs.fr or thierry.lorca@crbm.cnrs.fr
[1]These authors contributed equally to this work

Received: 12 May 2009; accepted: 20 July 2009; published online: 13 August 2009

 ©2009 European Molecular Biology Organization

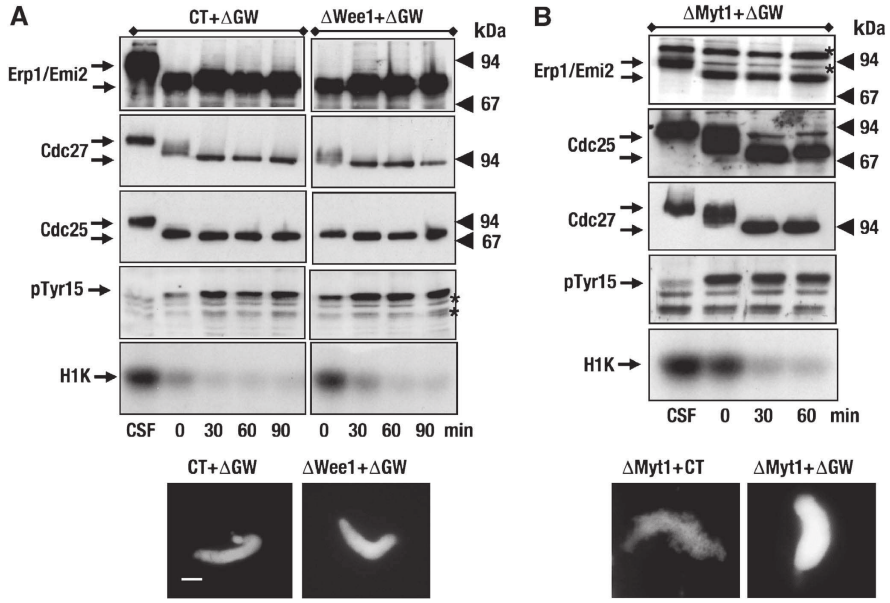


Figure 1 Co-depletion of GW with Wee1 or Myt1 does not prevent mitotic exit. (**A**) CSF extracts were co-depleted with control (CT) or anti-Wee1 (ΔWee1) and anti-GW (ΔGW) antibodies. Phosphorylation of the indicated proteins was analysed by western blot. Cyclin B–Cdc2 activity was measured by H1 histone phosphorylation assay (H1K). Finally, chromatin condensation was visualized by light microscopy. Asterisks denote non-specific bands of anti-pTyr 15 antibody. (**B**) Similar to (A) except that the depletion of Myt1 (ΔMyt1) was studied instead that of Wee1 before GW immunoprecipitation. Bar, 5 μm.

although, a slight delay of this inactivation was observed (compare Figure 1A, H1K, times 0 of CT + ΔGW and ΔWee1 + ΔGW). Moreover, all the analysed MPF substrates were dephosphorylated and DNA decondensed under these conditions. From these results, we conclude that Wee1 is not the main target of GW. We next investigated whether GW could maintain MPF activity by inhibiting Myt1 kinase. To test this hypothesis, we co-depleted Myt1 kinase and GW from CSF extracts. Similar results were observed (Figure 1B), therefore, Myt1 is also not the main target of GW. Next, we asked whether this kinase could regulate phosphorylation of tyr 15 of Cdc2 by inhibiting both kinases, Wee1 and Myt1, or by activating Cdc25 phosphatase. To analyse this hypothesis, we co-depleted Wee1 and Myt1 in CSF extracts before GW depletion. When Wee1 and Myt1 co-depletion was followed by the depletion with control antibodies, CSF extracts remained in mitosis, but the triple depletion of Myt1, Wee1 and GW still induced mitotic exit (Figure 2A). However, interestingly, due to the double removal of Myt1 and Wee1, we no longer observed any inhibitory phosphorylation of Cdc2 on tyr 15 and the cyclin B–Cdc2 kinase activity remained high (Figure 2A, left panels). We obtained the same results when Myt1, Wee1, Cdc25 and GW were depleted from the CSF extracts (data not shown). Thus, surprisingly, extracts still exited mitosis in the presence of a high cyclin B–Cdc2 activity. We conclude that GW preserves the mitotic state by a new unknown mechanism that is independent of cyclin B–Cdc2 activity. Moreover, this new mechanism seems to be very rapid, as Cdc27 and Erp1/Emi2 are dephosphorylated immediately after GW depletion. To measure the kinetics of this dephosphorylation, we developed a time-course analysis in which anti-GW antibodies bound to Dynabeads were added to the extract after control or after Myt1–Wee1 co-depletions. Samples were removed at the indicated time points after addition of anti-GW antibodies. The depletion of GW induced a rephosphorylation of Cdc2 on tyr 15 and a decrease of cyclin B–Cdc2 activity (Figure 2B), due to Cdc25 and Wee1 dephosphorylation 5 min after antibody addition (Figure 2C). As expected, prior co-depletion of Myt1 and Wee1 prevented the rephosphorylation of Cdc2 on tyr 15 as well as the decrease of MPF activity. However, dephosphorylation of the different MPF-dependent substrates (Erp1/Emi2, Cdc27 and MAPK) was observed as early as 5 min after antibody addition in both conditions.

These results show that GW maintains phosphorylation of, at least, four different MPF-dependent substrates, that is, Cdc25, Cdc27, MAPK and Erp1/Emi2. To investigate if this protection against phosphorylation is a general response, we analysed the phosphorylation state of four different proteins (Rsk2, Wee1, Cdc25 and Cdc20) whose phosphorylation depends directly or indirectly on cyclin B–Cdc2 activity during mitosis. Most of the analysed proteins (Rsk2, Wee1 and Cdc25 shown in Figure 2C and Cdc27, MAPK and Erp1/Emi2 in Figure 2B) were dephosphorylated after GW depletion. However, this is not the result of a non-specific dephosphorylation, as cyclin B2, Cdc20 (Figure 2C) and Cdc2 (see phospho tyr 15, Figure 2B) conserved their phosphorylation states under these conditions. Finally, we analysed the general cyclin B–Cdc2-dependent phosphorylation state in these extracts by using an antibody directed against the phosphorylated serine of the Cdk consensus motif. As shown in Figure 2C (right panel), a strong signal, corresponding to phosphorylated MPF substrates, was present in CSF as well as Myt1–Wee1 co-depleted extracts, however, this signal decreased markedly in both Myt1–Wee1–GW co-depleted extracts and in interphase extracts. Thus, GW keeps the mitotic state by maintaining phosphorylation of the majority of MPF substrates, although some of them are not subjected to this regulation.

©2009 European Molecular Biology Organization

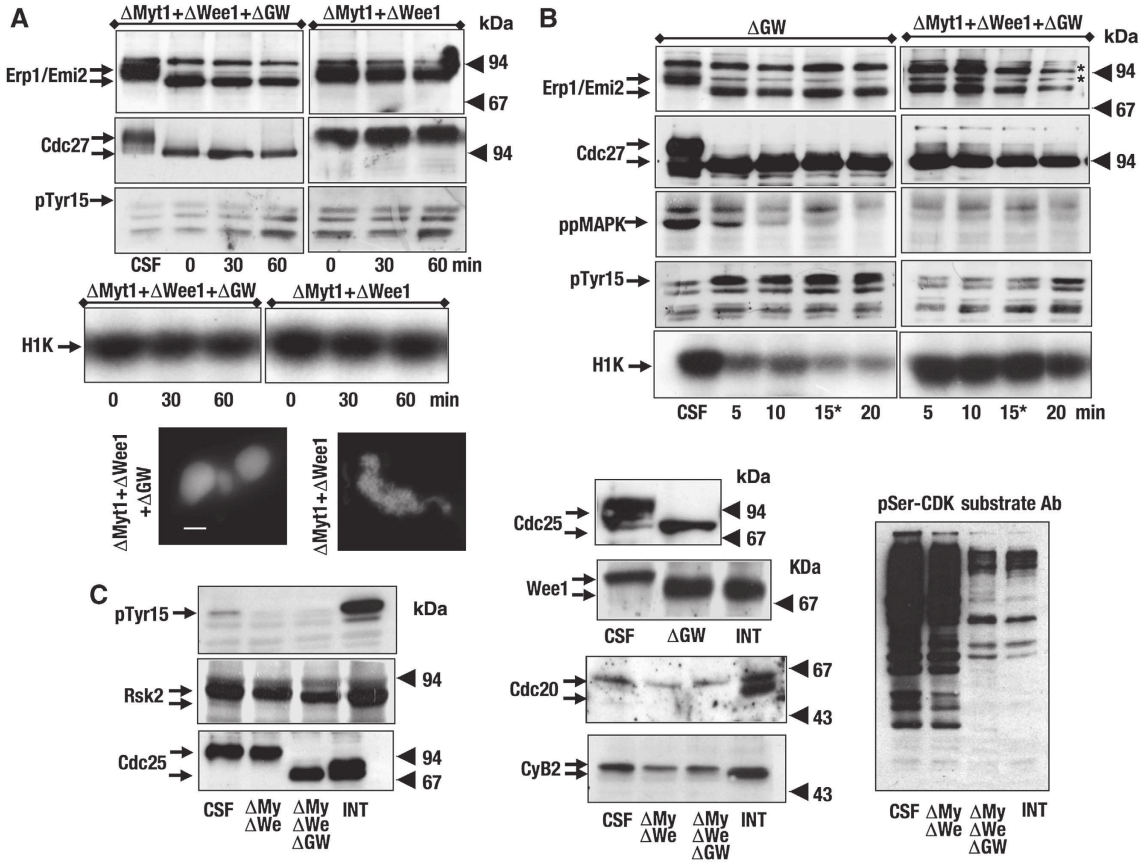


Figure 2 GW depletion induces mitotic exit in CSF extracts in the presence of high cyclin B–Cdc2 activity. (**A**) A triple depletion with Myt1–Wee1–GW antibodies or Myt1–Wee1–Control antibodies were carried out in CSF extracts and the phosphorylation of the indicated proteins, as well as the cyclin B–Cdc2 activity and chromatin condensation were analysed. (**B**) CSF extracts were immunoprecipitated twice with control antibodies or with anti-Myt1 and anti-Wee1 antibodies. Subsequently, anti-GW antibody-bound Dynabeads were added to the supernatants and samples were removed at the indicated times. * Time-point 0 min in GW immunodepletions of Figure 1 corresponds to time-point 15 min of this figure. (**C**) Supernatants of GW, Myt1–Wee1 or Myt1–Wee1–GW immunoprecipitates were used to analyse the phosphorylation of the indicated proteins using western blot. Bar 5 μm.

The PP1/PP2A inhibitors, microcystin and okadaic acid, rescue the phenotype induced by Greatwall inactivation in CSF extracts

The general and rapid dephosphorylation induced by GW removal in CSF extracts suggests that this kinase could act as a phosphatase inhibitor. It has recently been shown that the phosphatase, calcineurin, is required to release CSF extracts from meiotic M phase (Mochida and Hunt, 2007; Nishiyama *et al*, 2007). In addition, our results show that the overexpression of GW in CSF extracts delays mitotic exit induced by calcium (Supplementary Figure S2B). Thus, one putative target of GW could be calcineurin. We tested the role of calcineurin in this pathway by using the specific inhibitor cyclosporin. However, the inhibition of this phosphatase did not affect the exit of mitosis induced by GW removal, although, as described, it clearly delayed the dephosphorylation of Cdc27 and cyclin B degradation after Ca^{2+} addition (Supplementary Figure S3B). Thus, GW does not regulate mitosis through calcineurin inhibition.

We next questioned whether GW could inhibit PP1 and/or PP2A, the major phosphatases present in *Xenopus* egg extracts. To test this hypothesis, we used the potent PP1/PP2A phosphatase inhibitor, microcystin, and we investigated whether it could rescue mitotic exit in GW-depleted CSF extracts. To this end, we first depleted GW from CSF extracts and we subsequently added microcystin. Samples were taken just after GW depletion and 0, 30 and 60 min after microcystin addition. The results are shown in Figure 3A. We observed the first dephosphorylation of the different analysed proteins just after GW depletion, followed by a rephosphorylation of these proteins at 30 min after microcystin addition. Moreover, after GW depletion, we observed a phosphorylation on tyr 15 of Cdc2 that was concomitant with Cdc25 and Wee1 dephosphorylation and with a clear decrease in cyclin B–Cdc2 activity. However, 30 min later, tyr 15 was dephosphorylated again, MPF substrates were re-phosphorylated and cyclin B–Cdc2 complex was reactivated. Thus, microcystin rescues the phenotype induced by GW inactivation.

Microcystin is a potent inhibitor of both PP1 and PP2A (MacKintosh *et al*, 1990; Rivas *et al*, 2000). To elucidate which of these two phosphatases could be involved in mitotic exit, we used the phosphatase inhibitor, okadaic acid (OA), specificity of which for PP1 and PP2A, at different doses, has been described (Felix *et al*, 1990). We tested the dose–response of Cdc25 dephosphorylation on OA in GW-depleted CSF extracts, to analyse at what dose this inhibitor was capable to reverse Cdc25 dephosphorylation. As shown in Figure 3B, we observed a complete rephosphorylation of

 ©2009 European Molecular Biology Organization

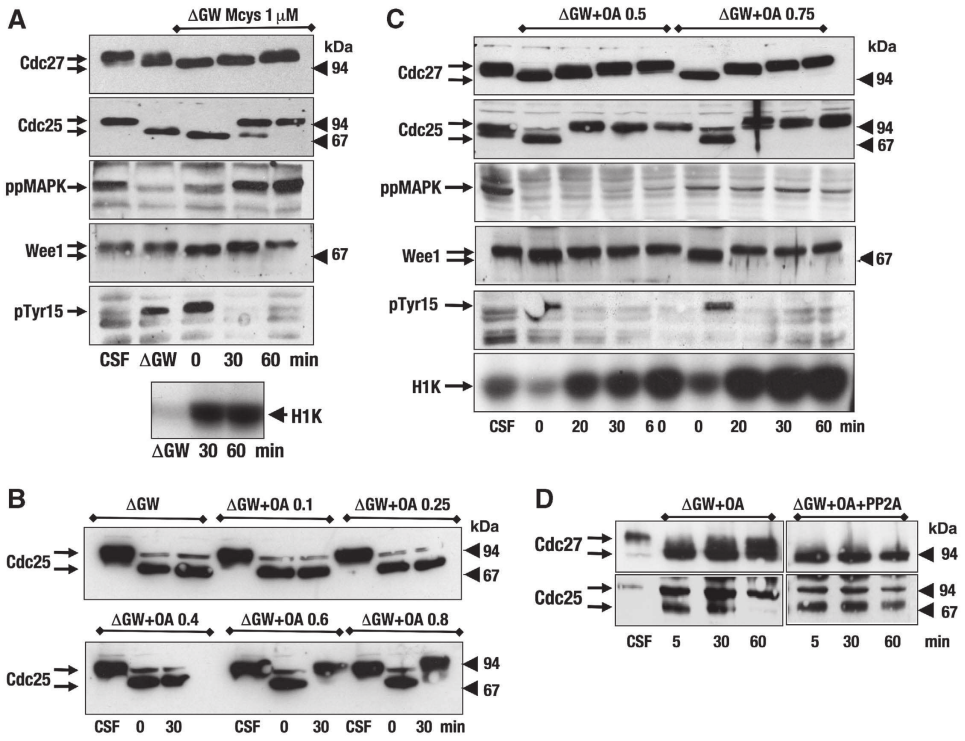


Figure 3 Phosphatase inhibitors, microcystin and okadaic acid (OA), rescue the phenotype induced by GW inactivation in CSF extracts. (**A**) GW-depleted CSF extracts were supplemented with microcystin (1 μM) and the phosphorylation of the indicated proteins as well as the cyclin B–Cdc2 activity were analysed. (**B**) CSF extracts were devoid of GW and supplemented with increasing doses of OA (from 0.1 to 0.8 μM). (**C**) GW-depleted CSF extracts were supplemented with 0.5 or 0.75 μM OA. (**D**) GW-depleted CSF extracts were supplemented with 0.75 μM OA and subsequently supplemented or not with purified PP2A (Upstate).

Cdc25, 30 min after GW depletion due to a 600-nM dose of OA. We next tried to determine, more accurately, the minimal dose that was capable of rescuing the GW phenotype. A total of 500 nM OA was sufficient to reverse the dephosphorylation of Cdc27, Cdc25, Wee1 and MAPK, although phosphorylation of the latter was only observed at 60 min probably due to the fact that it is induced indirectly by MPF-dependent phosphorylation of c-Mos (Figure 3C). At this dose, we also observed a dephosphorylation of Cdc2 at tyr 15 and an increase in cyclin B–Cdc2 activity at 20 min after the addition of the drug. As 500 nM of OA has been reported to inhibit 70% of PP2A activity and only 20% of PP1, it is likely that PP2A, rather than PP1, could be involved in the reversion of mitotic exit induced by GW depletion. In agreement with this hypothesis, the addition of the PP1 inhibitor, Inhibitor 2, was not able to reverse GW phenotype in CSF extracts (Supplementary Figure S4). Moreover, we observed a reversion of the effect of OA in GW-depleted CSF extracts when an active form of PP2A phosphatase was added after this phosphatase inhibitor (Figure 3D).

GW binds PP2A in human cells and in CSF extracts

The results presented above suggest that GW maintains the mitotic state by regulating PP2A activity, suggesting that GW could bind PP2A. To investigate whether GW could associate with PP2A, we co-transfected YFP-tagged GW, and non-tagged PP2A/A and /C subunits in HEK293 cells and we subsequently immunoprecipitated cell lysate with either an anti-YFP or a control antibody. As shown in Figure 4A, both PP2A/A and C subunits were present in the immunoprecipitate when anti-YFP antibody, but not a control antibody, was used. We next co-transfected HEK293 cells with a non-tagged PP2A/A subunit and with either HA-tagged or non-tagged PP2A/C subunit, and the cell lysates were then immunoprecipitated with anti-HA antibodies. The results show that endogenous GW was present in the immunoprecipitate when HA-tagged PP2A/C, but not non-tagged PP2A/C, was used in co-transfection (Figure 4B). Finally, we analysed whether GW and PP2A/A could associate when co-transfected in the absence of PP2A/C overexpression. Under these conditions, we did not observed any association of these two proteins, indicating that PP2A/C subunit is required to mediate GW binding with PP2A (Figure 4C). Thus, GW, PP2A/A and PP2A/C interact in HEK293 cells and this interaction is dependent on the PP2A/C subunit.

We next analysed whether endogenous GW and PP2A could bind in CSF extracts. To this end, we immunoprecipitated PP2A from CSF extracts by using a monoclonal antibody against the PP2A/A subunit (Kremmer *et al*, 1997). The results show that GW is clearly present in this immunoprecipitate (Figure 4D, left panel). We next carried out the reverse immunoprecipitation by using anti-GW antibodies. As depicted in Figure 4D (right panel), PP2A was present in the GW IP and completely absent when control antibodies were used, however, unlike the high amount of GW observed in PP2A IP, only a small quantity of PP2A was detected in the GW IP, suggesting that GW does not bind to all PP2A complexes, but probably to one particular sub-complex of this phosphatase.

©2009 European Molecular Biology Organization

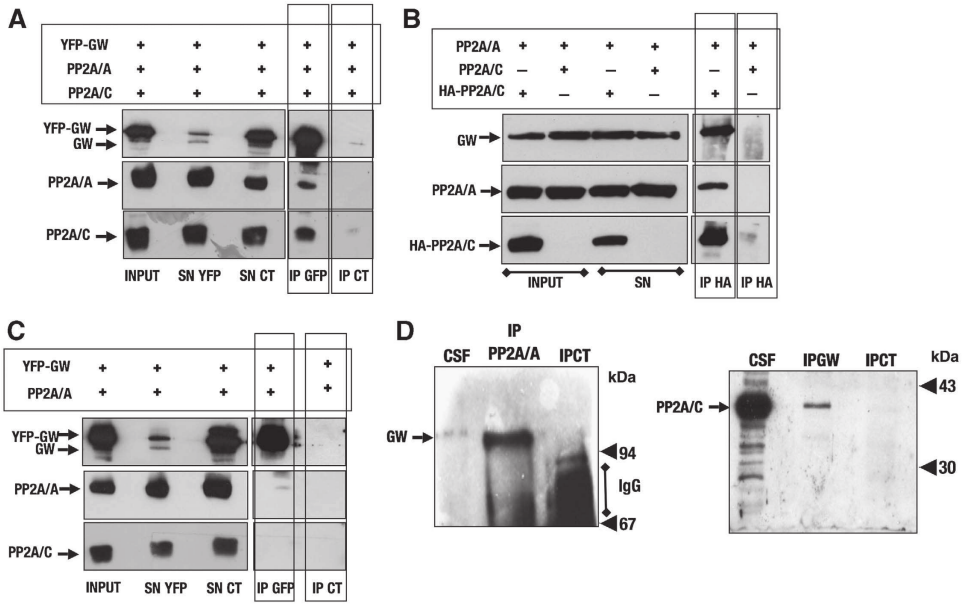


Figure 4 PP2A binds GW in human cells and CSF extracts. (**A**) HEK293 cells were co-transfected with YFP-GW, PP2A/A subunit and PP2A/C subunit. Cells were then lysed and immunoprecipitated with anti-GFP antibodies or with control antibodies. The presence of GW, PP2A/A and PP2A/C in 40 ng of total protein of the input and the supernatant, as well as the IP corresponding to 500 μg of total protein were analysed by SDS–PAGE and western blot. (**B**) HEK293 cells were co-transfected with PP2A/A and either PP2A/C or HA-PP2A/C and immunoprecipitated with anti-HA antibodies. The presence of GW, PP2A/A and PP2A/C was then analysed in the inputs, the supernatants and the Ips. (**C**) HEK293 cells were co-transfected with YFP-GW and PP2A/A subunit, lysed and immunoprecipitated with anti-GFP or control antibodies as described in Material and methods section. The presence of GW, PP2A/A and PP2A/C was then analysed in the inputs and supernatants by SDS–PAGE and western blot. (**D**) A total of 50 μl CSF extracts were immunoprecipitated with anti-PP2A/A monoclonal antibodies (6F9) or control antibodies, and the immunoprecipitates as well as a 1.5-μl CSF sample were used to analyse the presence of GW by immunoblotting. The smeared bands present in control IP between 94 and 67 kDa correspond to immunoglobulins in which the heavy and light chains have not been correctly dissociated after boiling. The same amount of CSF extracts were used to immunoprecipitate GW with anti-GW or control antibodies, and the immunoprecipitates as well as a 1.5-μl CSF sample were treated as described above to analyse the presence of PP2A/C.

GW maintains the mitotic state by promoting PP2A inhibition

The results above show that GW binds PP2A and that the inhibition of this phosphatase rescues the phenotype induced by GW inactivation. To further investigate whether PP2A is the target of GW, we removed this phosphatase from CSF extracts before GW depletion by using a monoclonal antibody directed against PP2A/A subunit (Kremmer *et al*, 1997). Samples of the PP2A-depleted extracts were taken at the indicated times and used to analyse the phosphorylation of Cdc27, cyclin B2 and tyr 15 of Cdc2 and to measure cyclin B–Cdc2 kinase activity. As shown in Figure 5A (upper panel), 61% of PP2A/A and 83% of PP2A/C were depleted from these extracts. Moreover, this removal clearly prevented the dephosphorylation of Cdc27, as well as phosphorylation of tyr 15 of Cdc2 and cyclin B–Cdc2 inactivation although a small decrease in cyclin B–Cdc2 activity was observed 1 h after GW depletion, probably due to the PP2A left in these extracts (lower panel). Similar results were obtained when PP2A was removed from the extracts by using microcystin–agarose beads (Supplementary Figure S5A). Thus, PP2A depletion rescues the phenotype induced by GW inactivation in CSF extracts.

Finally, we analysed whether GW modulates the PP2A-dependent dephosphorylation of cyclin B–Cdc2 substrates during mitosis. With this aim, a p-mal-tagged form of the cyclin B–Cdc2 substrate, c-Mos (Castro *et al*, 2001b), was purified and used as a substrate for PP2A.

p-mal-tagged cMos protein was first phosphorylated in the presence of $ATP^{\gamma 33}$ by a cyclin B–Cdc2 complex immunoprecipitated from CSF extracts. A sample of radiolabelled p-mal-$cMos^{p33}$ was then incubated with a PP2A complex obtained by immunoprecipitation from either CT or GW-depleted CSF extracts. After 1-h incubation, the level of p-mal-cMos phosphorylation was analysed. The results show that despite the fact that similar amounts of PP2A/C were present in immunoprecipitates from control and GW-depleted CSF extracts (Figure 5B, upper panel) and that the same quantity of p-mal-$cMos^{P33}$ was incubated with both PP2A IPs (Figure 5B, Coomassie blue staining), a higher decrease of the phosphorylation levels of p-mal-$cMos^{p33}$ was observed when PP2A was obtained from GW-depleted extracts. The quantification of the autoradiography indicates a threefold decrease in the radiolabelled p-mal-$cMos^{P33}$ signal when PP2A from GW-depleted extracts was used compared with CT (Supplementary Figure S5B). We next repeated this assay activity as a time course by triplicate and we measured c-Mos phosphorylation at 0, 20, 40, 60 and 80 min. The results of these experiments are shown as the mean value plus error bars in Figure 5C. Confirming the results shown above, dephosphorylation of c-Mos was higher when PP2A was obtained from GW-depleted CSF extracts. This difference was observed after 40 min and was statistically significant at 80 min ($^*P < 0.0212$). Thus, these results clearly show that dephosphorylation of cyclin B–Cdc2 substrates by PP2A is regulated by GW in mitotic egg extracts.

 ©2009 European Molecular Biology Organization

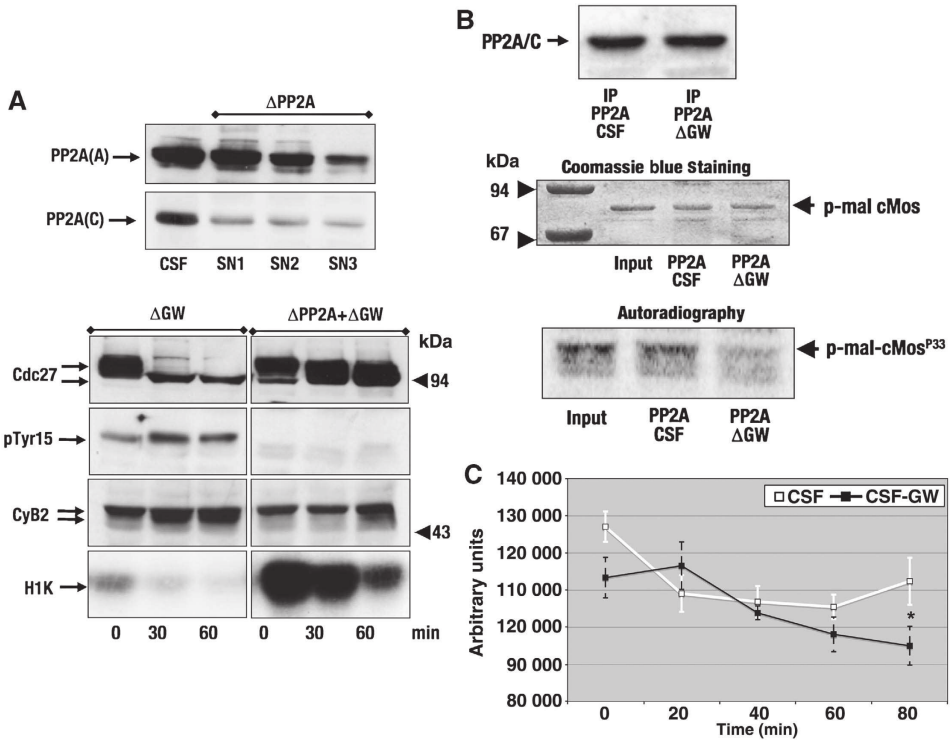


Figure 5 GW maintains the mitotic state by promoting PP2A inhibition. (**A**) CSF extract was incubated with anti-PP2A/A monoclonal antibodies bound to protein G–Sepharose beads. Three runs of immunodepletion were carried out to remove PP2A. The last supernatant was then depleted of GW by a subsequent immunoprecipitation and used to analyse the phophorylation of Cdc27, Cdc2 and cyclin B2 and to measure cyclin B–Cdc2 activity. The levels of PP2A/A and C were also examined in the three supernatants recovered after PP2A/A immunoprecipitation. (**B**) Radiolabelled p-mal-cMos was incubated with a PP2A complex obtained from CSF (PP2A CSF) or GW-depleted CSF extracts (PP2A Δ GW). After 1-h incubation, the supernatants were submitted to SDS–PAGE, stained with Coomassie Blue and the phosphorylation of p-mal-cMos revealed by autoradiography. One-tenth of the PP2A immunoprecipitates from CSF (IP PP2A CSF) and GW-depleted CSF extracts (IP PP2A ΔGW) were used to measure the amount of PP2A/C immunoprecipitated in each condition by western blotting. Coomassie Blue staining showing the levels of phosphorylated p-mal-cMos, as well as a scan of this gel using Typhoon Scanner, from the input (10 μl p-mal-cMos^{P33}) and the supernatant of the dephosphorylation reactions with PP2A from CSF (PP2A CSF) and GW-depleted CSF extracts (PP2A ΔGW) are shown. (**C**) A procedure similar to that followed in (B) except that supernatants were taken at 0, 20, 40, 60 and 80 min of incubation. The gels were scanned using a Typhoon Scanner and quantified by using ImageQuant TL software. Statistical analysis of the results, obtained from three different independent experiments, was performed using unpaired Student's *t* test. The amounts of phosphorylated p-mal-cMos present at each time were expressed as mean ± s.e.m. Statistical difference in the last time point is indicated by an asterisk (*) $P<0.0212$.

Discussion

It is established that, at mitosis entry, cyclin B–Cdc2 is irreversibly activated and that this irreversibility is directly induced by this complex through a feedback loop. Our results clearly show that the irreversibility of cyclin B–Cdc2 activation is not exclusively induced by the MPF feedback loop. We characterize a pathway controlled by the recently identified GW kinase that acts in parallel to MPF feedback loop and is essential for the irreversibility of cyclin B–Cdc2 activation and for the maintaining of the mitotic state.

The GW kinase was first identified at Goldberg's laboratory where it was shown that depletion of this protein from CSF extracts induces mitotic exit concomitantly with rephosphorylation of tyr 15 of Cdc2 and cyclin B–Cdc2 inactivation (Yu *et al*, 2004, 2006; Zhao *et al*, 2008). From their results, the authors suggested that GW could maintain the mitotic state by controlling cyclin B–Cdc2 feedback loop. Surprisingly, we found that GW inactivation induces mitotic exit by promoting a rapid dephosphorylation of different mitotic substrates independently of cyclin B–Cdc2 activity. Moreover, although we cannot exclude a direct control of GW on the Myt1–Wee1–Cdc25 pathway, we show that even in the absence of this pathway, GW is still required to maintain the mitotic state. In this light, it is likely that cyclin B–Cdc2 inactivation after GW depletion is not the cause of mitotic exit, but the consequence of Cdc25, Wee1 and Myt1 dephosphorylation. Moreover, we show that this phenotype is reversed by the addition of the phosphatase inhibitors, microcystin and OA, and that this reversion is not observed if additional active PP2A phosphatase is further supplemented. We also present data showing that GW binds PP2A *in vivo* through its PP2A–C subunit although this association is likely restricted to a specific subcomplex of this phosphatase. Finally, we show that the depletion of PP2A completely rescues the phenotype induced by GW inactivation in CSF extracts and that GW depletion results in an increase of the capacity of PP2A to dephosphorylate cyclin B–Cdc2 substrates. Thus, all these results clearly indicate that GW maintains the mitotic state by regulating PP2A.

Until now, mitotic entry and exit was equated to cyclin B–Cdc2 activation and inactivation, respectively, and once this kinase was activated, mitosis was thought to be irreversible. It now seems that mitotic control is not only under the control of cyclin B–Cdc2 kinase activity, but also under the control of phosphatases that counterbalances the kinase

©2009 European Molecular Biology Organization

activity of cyclin B–Cdc2. A role of the inhibition of PP1 in the maintenance of the mitotic state has already been shown, however, in this case the regulation of this phosphatase is directly controlled by the mitotic kinase cyclin B–Cdc2 itself (Wu *et al*, 2009). However, our results show a new PP2A pathway regulated by GW that is required for the maintenance of mitosis and that is independent of cyclin B–Cdc2. This might have important consequences for the regulation of mitosis by checkpoints, as this GW-dependent regulation may well be a target of the G2/M and M checkpoints. One might imagine a situation in which the DNA-damage checkpoint induces G2 arrest by preventing the activation of GW. Under these conditions, PP2A phosphatase would be active and would dephosphorylate mitotic substrates. As Cdc25, Wee1 and Myt1 are also mitotic substrates, GW inhibition would also results in the inactivation of cyclin B–Cdc2 and G2 arrest. The opposite situation might be true for the spindle assembly checkpoint. In this case, this surveillance mechanism could maintain an active GW, favouring the stability of phosphorylation of mitotic substrates, thereby, maintaining the mitotic state. Finally, we also hypothesize that GW might be the target of the newly described G2–prophase checkpoint (Matsusaka and Pines, 2004). This checkpoint induces a G2 delay or a prophase–G2 reversion if there is a depolymerization of microtubules, either at G2 or at prophase. Interestingly, cells in which microtubule poisons are added at prophase, with a high cyclin A–Cdk activity and with condensed DNA, are capable of decondensing chromatin and reversing to G2 (Matsusaka and Pines, 2004), a situation that is reminiscent to the one we observed in interphase and CSF extracts immunodepleted of GW.

In summary, we show that two different kinase activities, regarding cyclin B–Cdc2 and GW, are essential to maintain the mitotic state, the former is required to phosphorylate mitotic substrates and the latter to prevent the dephosphorylation of these substrates. These data provide a completely new view of the regulation of mitosis. Until now, mitotic entry and exit were equated to cyclin B–Cdc2 activation and inactivation, respectively, and once this kinase was activated, mitosis was thought to be irreversible. It now seems that mitosis is not only under the control of cyclin B–Cdc2 kinase activity, but is also modulated by PP2A that counterbalances cyclin B–Cdc2, preventing a premature mitotic entry and assuring a correct mitotic progression.

Materials and methods

c-DNA cloning, immunization procedures, protein purification and antibodies

For the immunization protocol, *Xenopus* GW cDNA was amplified from pGEM-GW (a generous gift from Dr M Goldberg) by PCR. The PCR product was subcloned into the *Eco*R1–*Sal*1 site of pGEX5X1. pCMVsport6–*Xenopus* Wee1 was obtained from RZPD Deutsches Ressourcenzentrum für Genomforschung GmbH, amplified by PCR and subcloned at the *Bam*HI and *Xho*I site of pGEX4T2. The fusion proteins of both kinases were expressed in *Escherichia coli*. Inclusion bodies were prepared and subjected to SDS–PAGE and electroeluted according to standard procedures. These proteins were dialysed against 500 mM NaCl, 100 mM $NaHCO_3$ buffer and used to immunize rabbits. Immune sera were first pre-cleared of the anti-GST antibodies in a GST-immobilized column and were subsequently affinity purified on immobilized GST–GW and GST–Wee1 columns, respectively. Anti-Myt1 antibodies were generated against a peptide (H2N-CRNLLGMFDDATEQ-COOH) corresponding to the C-terminal sequence of *Xenopus* Myt1 protein. Peptides were coupled to thyroglobulin for immunization and to immobilized bovine serum albumin for affinity purification as previously described by Abrieu *et al* (2001).

Monoclonal p44/42 MAPK and PP2A/A (6G3) antibodies as well as polyclonal phospho-tyr 15 Cdc2 and anti-phospho-Ser Cdk substrates were obtained from Cell Signaling Technology. Anti-PP2A C subunit and anti-human PP1 alpha antibodies were obtained from Upstate/Millipore. Monoclonal anti-Rsk2 was provided by Santa Cruz Biotechnology, CA. Anti-GFP polyclonal antibody and anti-HA monoclonal antibody were obtained from Torrey Pines and Roche, respectively. Affinity purified antibodies against Cdc20, Cdc27, cyclin B2, Cdc25, Plx1 and Erp1/Emi2 were obtained as previously described (Abrieu *et al*, 1998; Lorca *et al*, 1998; Castro *et al*, 2001a; Bernis *et al*, 2007). Anti-*Xenopus* PP2A subunit C antibodies were a generous gift from Dr D Fesquet. 6F9 anti-PP2A/A monoclonal antibodies were kindly provided by Dr G Walter and Dr T Hunt.

Preparation of Xenopus egg extract and sperm nuclei and immunoprecipitation

CSF egg extracts were prepared from unfertilized *Xenopus* egg that were arrested at metaphase stage of the second meiotic division as previously described (Murray, 1991). Interphase egg extracts were prepared from de-jellied unfertilized eggs transferred in MMR/4 (25 mM NaCl, 0.5 mM KCl, 0.25 mM $MgCl_2$, 0.025 mM Na EGTA, 1.25 mM HEPES–NaOH (pH 7.7)) Extracts were prepared 15 or 40 min after ionophore addition by the same procedure as described for CSF extracts. De-membraned sperm nuclei were prepared as described (Murray, 1991). Immunoprecipitations/immunodepletions were carried out using 10 μl of extracts, 10 μl of magnetic Protein A-Dynabeads (Dynal) and 2 μg of each antibody. Beads were washed twice with RIPA (10 mM NaH_2PO_4, 100 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1% Triton X-100, 0.5% deoxycholate, 80 μM β-glycerophosphate, 50 mM NaF, 1 mM DTT), followed by a washing twice with 50 mM TRIS (pH 7.5) and incubated for 15 min at RT with 10 μl *Xenopus* egg extracts. For immunodepletion, the supernatant was recovered and used for subsequent experiments. When two subsequent immunodepletions were carried out, the supernatant from the first immunodepletion was recovered and used for the second. Two and three consecutive immunoprecipitations were made to completely remove the endogenous Cdc25 and Myt1 proteins, respectively, whereas one immunoprecipitation was enough to completely deplete endogenous GW, Wee1 and Plx1.

Immunodepletion of PP2A/A was carried by using 55 μl CSF extracts and 40 μl 6F9 anti-PP2A/A monoclonal antibodies bound to protein G–Sepharose beads. After 15-min incubation, extracts were centrifuged and supernatant was used for a subsequent immunodepletion. Three consecutive runs of immunodepletion were required to remove 90% of PP2A/A and PP2A/C.

H1 kinase and p-mal-cMos dephosphorylation assays

A total of 1 μl extract was frozen in liquid nitrogen at the indicated times. Extract samples were then thawed by the addition of 19 μl H1 buffer including [γ^{32}P]ATP (Chen and Murray, 1997) and incubated for 10 min at room temperature. Reactions were stopped by adding Laemmli sample buffer and analysed by SDS–PAGE.

Purified p-mal-cMos protein was phosphorylated using cyclin B–Cdc2 complex immunoprecipitated from 60 μl CSF extracts with anti-cyclin B2 antibodies. Briefly, cyclin B2–Cdc2 immunoprecipitates were washed twice with RIPA buffer and twice with 50 mM Tris (pH 7.5) and were subsequently incubated for 20 min at room temperature with 20 μl purified p-mal-cMos protein (1 μg/μl) in the presence of 40 μl phosphorylation buffer (100 μM ATP, 50 mM Tris (pH 7.5) 100 mM $MgCl_2$ and 4 μl [γ^{33}P]ATP 10 μCi/μl). Free [γ^{33}P]ATP was eliminated from the supernatant by using micro bio-spin chromatography columns (Bio-Rad) and used to analyse the dephosphorylation activity of PP2A.

PP2A was immunoprecipitated from 25 μl CSF or GW-depleted CSF extracts by using monoclonal anti-PP2A/C antibody (1D6, Upstate), washed twice with 50 mM Tris (pH 7.5) and incubated for 1 h at 30°C in the presence of pre-phosphorylated p-mal-cMos (10 μl) and 20 μl of dephosphorylation buffer (50 mM Tris (pH 7.5), 0.1 mM $CaCl_2$). Supernatant was submitted to PAGE and Coomassie Blue staining, and the phosphorylation of p-mal-cMos was measured by autoradiography.

 ©2009 European Molecular Biology Organization

GW and PP2A/A-C overexpression and immunoprecipitation

HEK293 cells were transfected with pCS2-GW, pCS2-YFP-GW, pCS2-PP2A/C, pCS2-HA-PP2A/C subunit or pCMV-PP2A/A constructs by using the transfection reagent JetPei (PolyPlus transfection). After 36 h, cells were lysed using a lysis buffer containing 20 mM Tris (pH 8), 1 mM EDTA, 150 mM NaCl, 0.5% IGEPAL, 100 mM Na_3VO_4, 100 mM NaF and a complete EDTA-free protease inhibitor cocktail tablet. Total protein (500 μg) was used for immunoprecipitation with 50 μl Dynabeads +; 2 or 5 μl anti-GFP; or anti-HA antibodies. As anti-GFP antibodies cross-react with YFP, they can successfully immunoprecipitate this protein (see Figure 4).

Light microscopy

A DMR A Leica microscope DM 4500B with a ×63 immersion oil objective (HCX PL APO), tube factor 1 was used for epifluorescence imaging. Images were captured with a CoolSnap HQ camera (Roger Scientific) and the whole set was driven by MetaMorph (Universal Imaging, Downingtown, PA).

Supplementary data

Supplementary data are available at *The EMBO Journal* Online (http://www.embojournal.org).

Acknowledgements

We thank Drs S Galas and M Goldberg for the generous gift of anti-Wee1 and anti-GW antibodies. We also thank Drs T Hunt and G Walter for kindly providing 6F9 anti-PP2A/A monoclonal antibody. We are also indebted to Drs D Fisher and C Jessus for helpful discussion. We acknowledge the technical support provided by J Casanova and MRI. This study was supported by the Ligue Nationale Contre le Cancer (Equipe Labellisée). AB and EB are fellows of the Fondation pour la Recherche Medicale and Ligue Nationale Contre le Cancer.

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

References

Abrieu A, Brassac T, Galas S, Fisher D, Labbe JC, Doree M (1998) The polo-like kinase plx1 is a component of the MPF amplification loop at the G2/M-phase transition of the cell cycle in *Xenopus* eggs. *J Cell Sci* **111:** 1751–1757

Abrieu A, Magnaghi-Jaulin L, Kahana JA, Peter M, Castro A, Vigneron S, Lorca T, Cleveland DW, Labbe JC (2001) Mps1 is a kinetochore-associated kinase essential for the vertebrate mitotic checkpoint. *Cell* **106:** 83–93

Bernis C, Vigneron S, Burgess A, Labbe JC, Fesquet D, Castro A, Lorca T (2007) Pin1 stabilizes Emi1 during G2 phase by preventing its association with SCF (betatrcp). *EMBO Rep* **8:** 91–98

Castro A, Peter M, Lorca T, Mandart E (2001a) c-Mos and cyclin B/cdc2 connections during Xenopus oocyte maturation. *Biol Cell* **93:** 15–25

Castro A, Peter M, Magnaghi-Jaulin L, Vigneron S, Galas S, Lorca T, Labbe JC (2001b) Cyclin B/cdc2 induces c-Mos stability by direct phosphorylation in *Xenopus* oocytes. *Mol Biol Cell* **12:** 2660–2671

Chen RH, Murray A (1997) Characterization of spindle assembly checkpoint in *Xenopus* egg extracts. *Methods Enzymol* **283:** 572–584

Draetta GF (1997) Cell cycle: will the real Cdk-activating kinase please stand up. *Curr Biol* **7:** R50–R52

Felix MA, Cohen P, 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

Fesquet D, Morin N, Doree M, Devault A (1997) Is Cdk7/cyclin H/MAT1 the genuine cdk activating kinase in cycling *Xenopus* egg extracts? *Oncogene* **15:** 1303–1307

Kremmer E, Ohst K, Kiefer J, Brewis N, Walter G (1997) Separation of PP2A core enzyme and holoenzyme with monoclonal antibodies against the regulatory A subunit: abundant expression of both forms in cells. *Mol Cell Biol* **17:** 1692–1701

Lorca T, Castro A, Martinez AM, Vigneron S, Morin N, Sigrist S, Lehner C, Doree M, Labbe JC (1998) Fizzy is required for activation of the APC/cyclosome in *Xenopus* egg extracts. *EMBO J* **17:** 3565–3575

MacKintosh C, Beattie KA, Klumpp S, Cohen P, Codd GA (1990) Cyanobacterial microcystin-LR is a potent and specific inhibitor of protein phosphatases 1 and 2A from both mammals and higher plants. *FEBS Lett* **264:** 187–192

Matsusaka T, Pines J (2004) Chfr acts with the p38 stress kinases to block entry to mitosis in mammalian cells. *J Cell Biol* **166:** 507–516

Mochida S, Hunt T (2007) Calcineurin is required to release *Xenopus* egg extracts from meiotic M phase. *Nature* **449:** 336–340

Morgan DO (1997) Cyclin-dependent kinases: engines, clocks, and microprocessors. *Annu Rev Cell Dev Biol* **13:** 261–291

Murray A (1991) Cell cycle extracts. *Methods Cell Biol* **36:** 581–605

Nishiyama T, Yoshizaki N, Kishimoto T, Ohsumi K (2007) Transient activation of calcineurin is essential to initiate embryonic development in *Xenopus laevis*. *Nature* **449:** 341–345

Nurse P (1990) Universal control mechanism regulating onset of M-phase. *Nature* **344:** 503–508

Perdiguero E, Nebreda AR (2004) Regulation of Cdc25C activity during the meiotic G2/M transition. *Cell cycle* **3:** 733–737

Perry JA, Kornbluth S (2007) Cdc25 and Wee1: analogous opposites? *Cell division* **2:** 12

Pines J, Hunter T (1989) Isolation of a human cyclin cDNA: evidence for cyclin mRNA and protein regulation in the cell cycle and for interaction with p34cdc2. *Cell* **58:** 833–846

Rivas M, Garcia C, Liberona JL, Lagos N (2000) Biochemical characterization and inhibitory effects of dinophysistoxin-1, okadaic acid and microcystine 1-r on protein phosphatase 2a purified from the mussel *Mytilus chilensis*. *Biol Res* **33:** 197–206

Russo AA, Jeffrey PD, Pavletich NP (1996) Structural basis of cyclin-dependent kinase activation by phosphorylation. *Nat Struct Biol* **3:** 696–700

Wu JQ, Guo JY, Tang W, Yang CS, Freel CD, Chen C, Nairn AC, Kornbluth S (2009) PP1-mediated dephosphorylation of phosphoproteins at mitotic exit is controlled by inhibitor-1 and PP1 phosphorylation. *Nat Cell Biol* **11:** 644–651

Yu J, Fleming SL, Williams B, Williams EV, Li Z, Somma P, Rieder CL, Goldberg ML (2004) Greatwall kinase: a nuclear protein required for proper chromosome condensation and mitotic progression in *Drosophila*. *J Cell Biol* **164:** 487–492

Yu J, Zhao Y, Li Z, Galas S, Goldberg ML (2006) Greatwall kinase participates in the Cdc2 autoregulatory loop in *Xenopus* egg extracts. *Mol Cell* **22:** 83–91

Zhao Y, Haccard O, Wang R, Yu J, Kuang J, Jessus C, Goldberg ML (2008) Roles of Greatwall kinase in the regulation of Cdc25 phosphatase. *Mol Biol Cell* **19:** 1317–1327

©2009 European Molecular Biology Organization

Figure S1

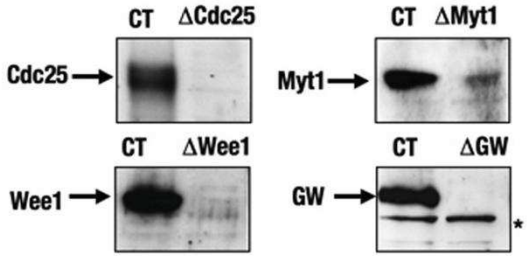


Figure S1. CSF extracts were immunoprecipitated with antibodies against the indicated proteins as described in Methods. 1 μl of CSF extract as well as 1μl of the supernatants were analysed by Western Blot to verify the immunodepletion of these proteins. Asterisk denotes non-specific band

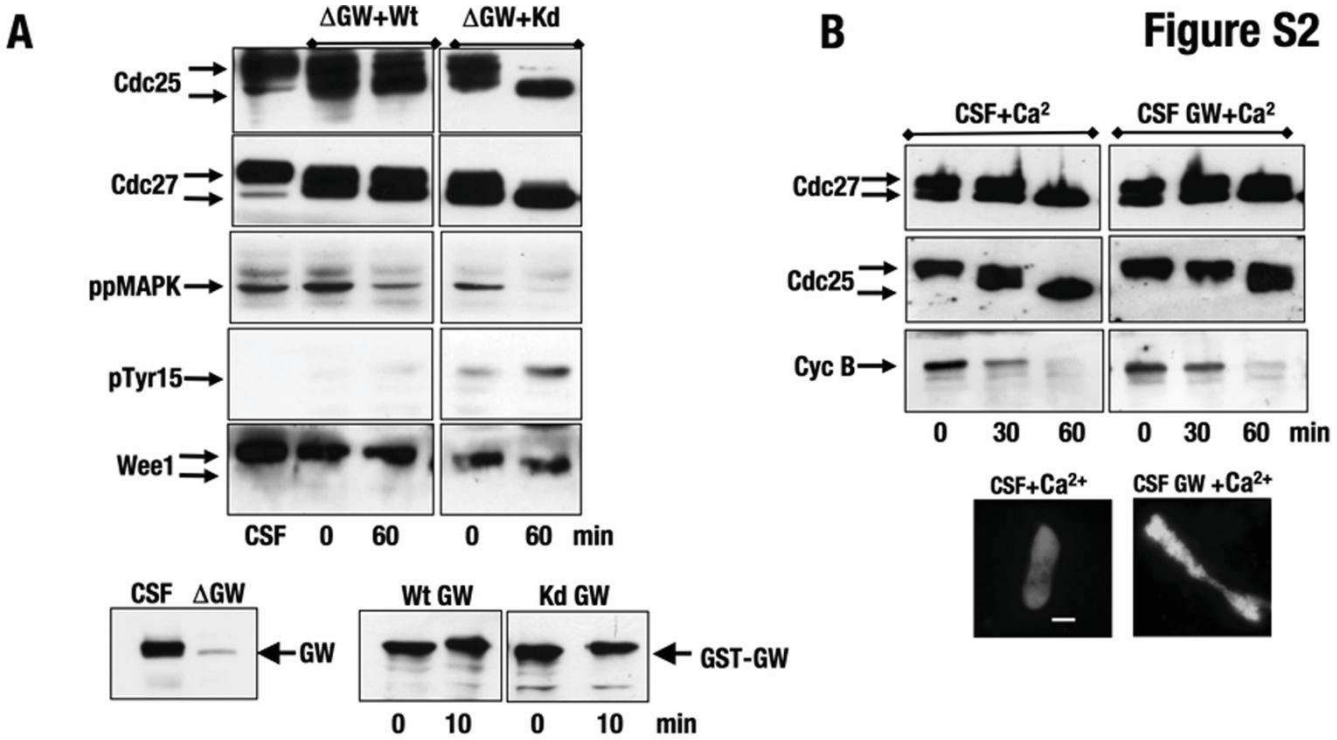


Figure S2. The overexpression of Greatwall importantly delays dephosphorylation of the different mitotic substrates induced by either Greatwall depletion or Calcium addition in CSF extracts (A) CSF extracts were immunoprecipitated with anti-Greatwall antibodies and subsequently supplemented with a recombinant GST wild type (Wt) or kinase dead (Kd) Greatwall protein. Samples were removed at 0 and 60 minutes after GST-Greatwall addition and used to perform Western Blots with anti-Cdc25, anti-Cdc27, anti-phosphoMAPK, anti phospho-tyrosine 15 of Cdc2 and anti-Wee1 antibodies. The removal of the endogenous Greatwall (left-hand side, lower panel) as well as the levels of the overexpressed GST-Wt and GST-Kd (right-hand side, lower panel) are shown. (B) CSF egg extracts were translated (CSF GW+Ca^{2+}) or not (CSF+ Ca^{2+}) with exogenous non-tagged Greatwall by the addition of its mRNA and subsequently supplemented with a final calcium concentration of 0,6 μM to induce metaphase II exit. Samples were taken at the indicated times and immunoblotted against anti-Cdc27, anti-Cdc25 and anti-Cyclin B2. Two additional samples were taken from both extracts at 30 minutes after calcium addition and supplemented with sperm nuclei in order to analyse DNA condensation by light microscopy. Bar, 5 μm.

Figure S3

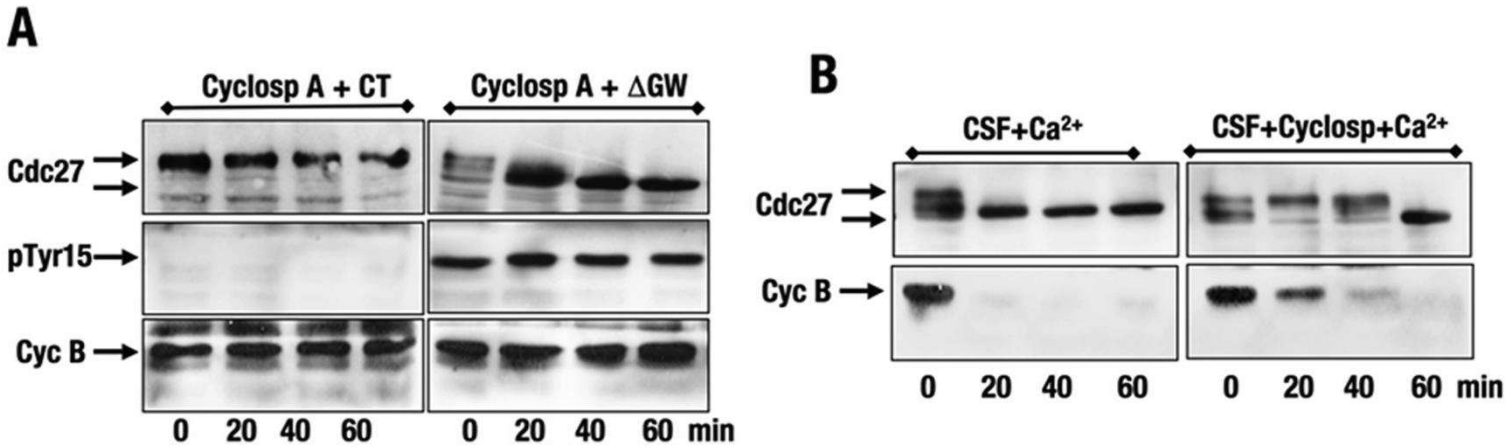


Figure S3. Calcineurin is not involved in the dephosphorylation of the different mitotic substrates induced by Greatwall depletion from CSF extracts (A) CSF extracts were first supplemented with 1μM of the specific Calcineurin inhibitor Cyclosporin A and subsequently immunoprecipitated with antibodies against Greatwall or control antibodies. Samples were removed at 0, 20, 40 and 60 minutes after cyclosporin A addition and used to perform Western Blots with anti-Cdc27, anti phospho-tyrosine 15 of Cdc2 and anti-cyclin B2 antibodies. (B) CSF extracts were supplemented or not with the 1 μM of cyclosporin A and subsequently treated with a final calcium concentration of 0,6 μM to induce metaphase II exit. Samples were taken at the indicated times and immunoblotted with anti- Cdc27 and anti-Cyclin B2 antibodies.

Figure S4

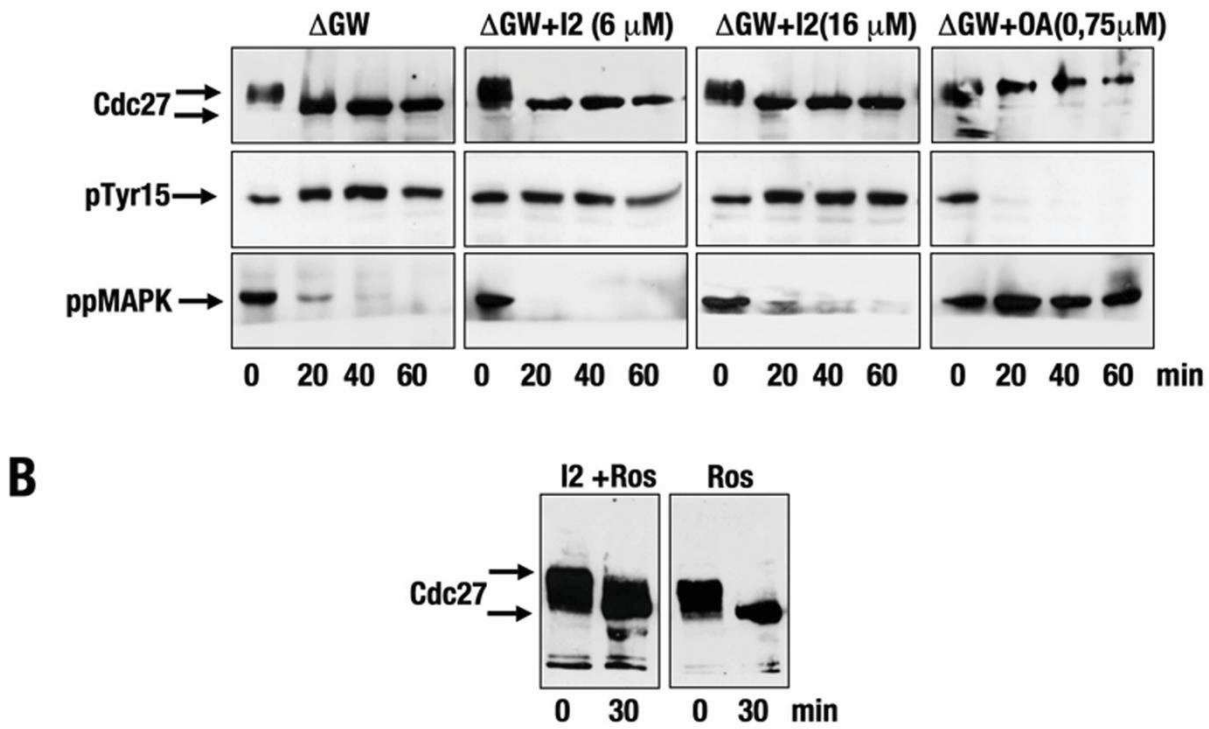


Figure S4. PP1 is not involved in the reversion of the Greatwall-depletion phenotype induced by Okadaic Acid. (A) CSF extracts were immunoprecipitated with anti-Greatwall antibodies and subsequently supplemented with either the specific PP1 inhibitor, Inhibitor 2 (I2, Upstate), at a final doses of 6 and 12 μM or with Okadaic Acid (OA) at a final dose of 0,75 μM. Samples were removed at 0, 20, 40 and 60 minutes after drug addition and used to perform Western Blots with anti-Cdc27, anti-phosphoMAPK and anti phospho-tyrosine 15 of Cdc2 antibodies.

(B) We took advantage of the fact that the inhibition of PP1 in CSF extracts prevents mitotic exit after cyclin B-Cdc2 inhibition by roscovitine (Wu et al. 2009. NCB 11:644-651) to test whether the dose used in these extracts is efficient to inhibit PP1. Thus, CSF extracts were first supplemented (I2+Ros) or not (Ros) with the PP1 inhibitor I2 (6 μM) and 15 min later the cyclin B-Cdc2 inhibitor roscovitine was mixed at a final concentration of 0,3 mM. Samples were taken at 0, 30 min time-points and used to analyse the phosphorylation of the mitotic substrate Cdc27.

Figure S5

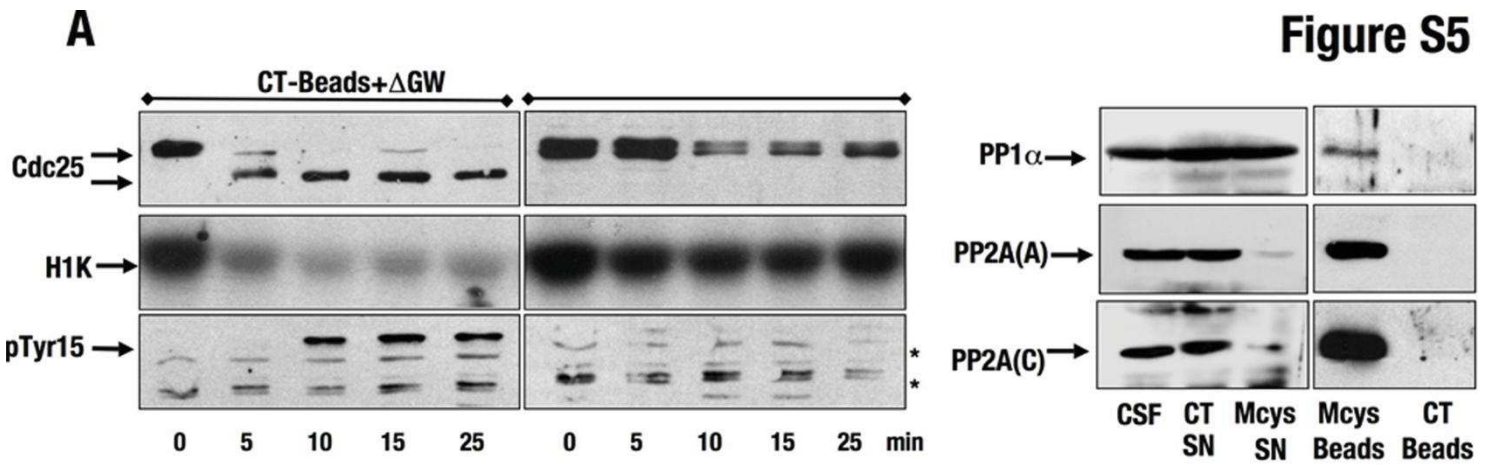


Figure S5A. PP2A removal by using microcystin-agarose beads rescues GW phenotpe. We took advantage of the previously demonstrated capacity of microcystin immobilized on agarose beads to deplete PP2A but not PP1 from Xenopus egg extracts. We incubated CSF extracts three times with microcystin or Glutathion-agarose beads as a control and after centrifugation, the supernatant was immunodepleted with anti-GW antibodies. Treatment of CSF extracts with control agarose-beads did not prevent mitotic exit after GW depletion, but incubation with microcystin-beads clearly prevented dephosphorylation of Cdc25, as well as cyclin B-Cdc2 inactivation (left panel). The rescue of this phenotype is the result of PP2A depletion since PP1 was not removed by microcystin pull-down (right panel).

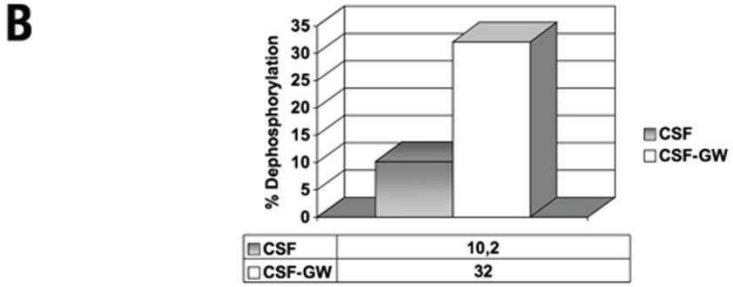


Figure S5B. GW regulates PP2A activity. Gels obtained in Figure 5B were scanned by using Typhoon™ scanner and quantified by using ImageQuant™TL software. The percentage of dephosphorylation was calculated in each group (CSF and GW-depleted CSF extracts) and represented in a graph.

RESULTATS COMPLEMENTAIRES : GWL INTERAGIT AVEC PLK1 ET CDC14 ET EST PHOSPHORYLE PAR PLK1

Gwl ne phosphoryle pas directement PP2A

Nos résultats précédents ont mis en évidence que Gwl était nécessaire au maintien de l'état mitotique en régulant négativement PP2A. De plus, nous avons montré que Gwl s'associe à PP2A dans les cellules humaines et dans les extraits d'ovocytes de xénope. Nous nous sommes donc demandés si PP2A pouvait être un substrat direct de Gwl. PP2A est composée de trois sous unités : une sous-unité catalytique (sous-unité C) et une sous-unité non catalytique « échafaudage » (sous-unité A, ou PR65), et une sous unité qui détermine la spécificité de substrat (sous-unité B). Les sous-unités B sont divisées en trois sous-familles : B (PR55/B55), B' (PR56/B56) et B'' (PR72). Nous avons testé *in vitro*, si les sous unités de PP2A/B55, PP2A/B56 et PP2A/C pouvaient être phosphorylées par Gwl. Pour cela, nous avons purifié par immunoprécipitation une forme HA-Gwl traduite dans des extraits d'œufs de xénope arrêtés en métaphase II, et nous avons vérifié son activité *in vitro* sur le substrat MBP (Myelin Basic Protein). Finalement nous avons développé une phosphorylation *in vitro* des protéines PP2A/B55, PP2A/B56 ; PP2A/C purifiées en présence d'ATP$^{\gamma 33}$. Aucune des sous unités de PP2A/B55, PP2A/B56 et PP2A/C n'est phosphorylée par Gwl (Figure 1). Ces résultats suggèrent qu'il n'y a pas de phosphorylation directe de ces sous unités par Gwl. Ainsi, Gwl régulerait l'activité de PP2A indirectement via un substrat encore inconnu.

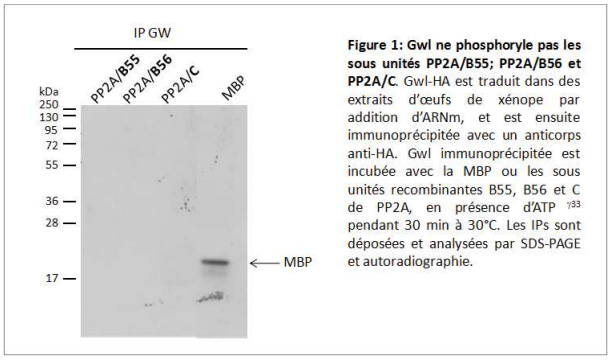


Figure 1: Gwl ne phosphoryle pas les sous unités PP2A/B55; PP2A/B56 et PP2A/C. Gwl-HA est traduit dans des extraits d'œufs de xénope par addition d'ARNm, et est ensuite immunoprécipitée avec un anticorps anti-HA. Gwl immunoprécipitée est incubée avec la MBP ou les sous unités recombinantes B55, B56 et C de PP2A, en présence d'ATP $^{\gamma 33}$ pendant 30 min à 30°C. Les IPs sont déposées et analysées par SDS-PAGE et autoradiographie.

Gwl interagit avec Plk1

Il a été montré que Gwl n'est active et phosphorylée que durant la mitose. De plus, il a été mis en évidence que le MPF et Plx1 sont capables de phosphoryler Gwl *in vitro* (Yu et al, 2006). Cependant, le mécanisme d'activation de Gwl à l'entrée de mitose reste encore inconnu. Il a été montré que Plx1 est activée à l'entrée de mitose, et participe à l'activation du MPF en phosphorylant Cdc25 à la transition G2/M (Kumagai and Dunphy, 1996 ; Karaiskou et al, 1998 ; Karaiskou et al, 1999 ; Abrieu et al, 1998). Toutefois, il est possible que Plx1 puisse aussi participer à l'activation de Gwl en début de mitose. Pour réponde à cette question, nous avons tout d'abord étudié l'interaction entre Gwl et Plk1 dans les cellules Hek293T. Dans un premier temps, YFP-Gwl est surexprimée dans les cellules, et les lysats cellulaires sont immunoprécipités avec un anticorps anti-GFP. Lorsque nous analysons les immunoprécipitations, nous constatons que la protéine Plk1 endogène est présente dans cette immunoprécipitation. Dans un second temps, Gwl endogène est immunoprécipitée à l'aide d'un anticorps anti-Gwl dirigé contre la partie C-terminale de Gwl (anti-Gwl C-ter). Nous disposons au laboratoire de deux anticorps anti-Gwl, l'un dirigé contre la protéine entière (anti-Gwl entier) et l'autre contre la partie C-terminale. L'anticorps anti-Gwl entier comme l'anticorps anti-Gwl C-ter sont capables d'immunoprécipiter la protéine mais contrairement à l'anticorps anti-Gwl entier, l'anticorps C-ter ne permet pas la co-immunoprécipitation d'autres protéines. Il semble que l'anticorps entier entre en compétition avec les partenaires de Gwl. Nos résultats montrent que Plk1 est co-immunoprécipitée avec Gwl (Figure 2). Ces résultats suggèrent donc que Gwl et Plk1 interagissent, dans les cellules Hek293T.

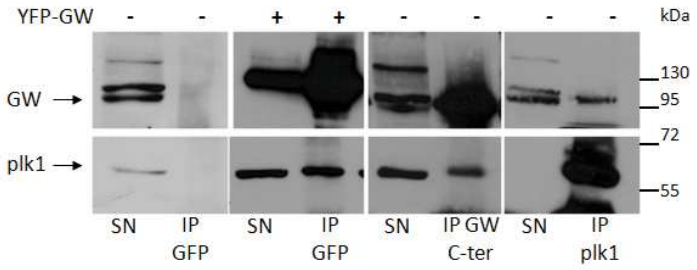


Figure 2: Gwl interagit avec Plk1. Des cellules Hek293T sont transfectées avec YFP-Gwl ou plasmide vide. Les cellules sont lysées et immunoprécipitées avec un anticorps anti-GFP ou anti-Plk1 ou anti-Gwl C-ter. La présence de Gwl et Plk1 dans 40 ng de protéines totales dans le surnageant , et dans les 500 ng de protéines totales des IPs est analysée avec les anticorps anti-Gwl et Plk1 par SDS-PAGE et Western blot.

Gwl et Plk1 p s'associe de manière cycle cellulaire dépendante

Nos résultats montrent que Gwl s'associe à Plk1 dans les cellules Hek293T. Plk1 est synthétisée durant la phase S pour atteindre un pic d'expression durant la mitose. (pour revue, Archambault and Glover, 2009). Ces observations nous ont conduits à nous demander si l'association entre Gwl et Plk1 pouvait être cycle cellulaire dépendante. Pour répondre à cette question, nous avons utilisé des cellules HeLa, facilement synchronisables contrairement aux Hek293T. Les cellules HeLa sont traitées pendant 20h à la thymidine et sont ensuite relarguées après rinçage du milieu de culture. Les cellules sont prélevées au temps, 0h, 6h, 8h et 10h post relarguage. De plus, un pool de ces cellules est traité au nocodazole pour disposer de cellules mitotiques. Comme il avait été décrit (pour revue, Archambault and Glover, 2009 ; Burgess et al, 2010) nos résultats montrent que le niveau d'expression de Gwl est constant durant le cycle cellulaire et Gwl est phosphorylée en mitose, alors que le niveau d'expression de Plk1 augmente durant le cycle pour atteindre son maximum durant la mitose (Figure 3).

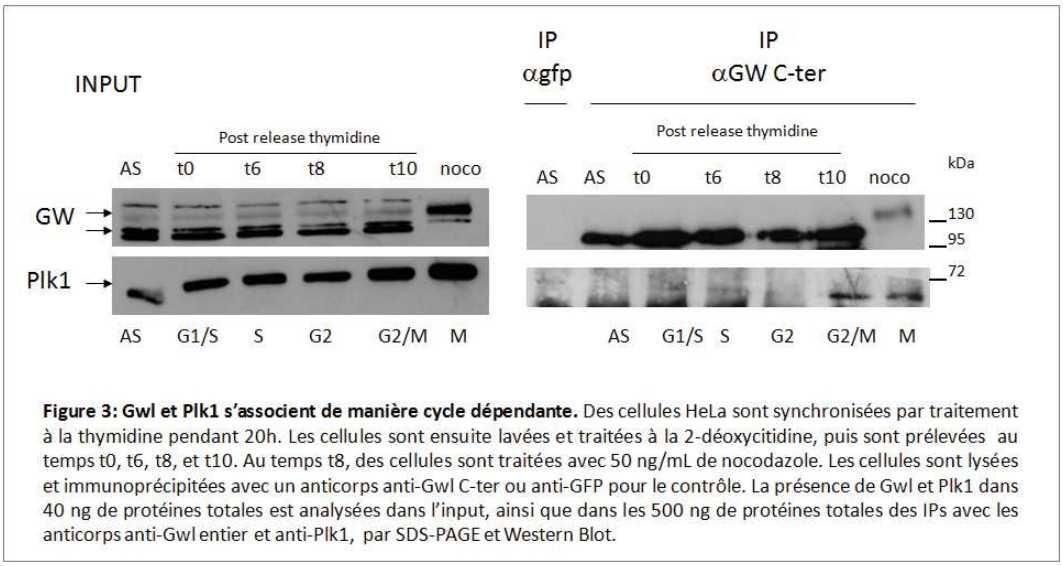


Figure 3: Gwl et Plk1 s'associent de manière cycle dépendante. Des cellules HeLa sont synchronisées par traitement à la thymidine pendant 20h. Les cellules sont ensuite lavées et traitées à la 2-déoxycitidine, puis sont prélevées au temps t0, t6, t8, et t10. Au temps t8, des cellules sont traitées avec 50 ng/mL de nocodazole. Les cellules sont lysées et immunoprécipitées avec un anticorps anti-Gwl C-ter ou anti-GFP pour le contrôle. La présence de Gwl et Plk1 dans 40 ng de protéines totales est analysées dans l'input, ainsi que dans les 500 ng de protéines totales des IPs avec les anticorps anti-Gwl entier et anti-Plk1, par SDS-PAGE et Western Blot.

Nous avons observé que l'association Plk1-Gwl n'avait lieu que pendant la transition G2/M et la mitose. Ces résultats indiquent que l'interaction entre Gwl est Plk1 est cycle cellulaire dépendante. De plus, il a été mis en évidence au laboratoire que Plk1 phosphoryle Gwl et les sites de phosphorylation de Plk1 sur Gwl ont été séquencés par spectrométrie de masse. Ceci nous a permis de développer un anticorps anti-Gwl phosho 874. Des cellules HeLa ont été synchronisées comme précédemment et les lysats cellulaires ont été immunodétectés avec l'anticorps anti-phospho 874. Gwl est

phosphorylée sur son résidu 874 seulement durant la mitose (Figure 4). Ces résultats suggèrent donc que Plk1 pourrait phosphoryler Gwl sur son résidu 874 pendant la mitose.

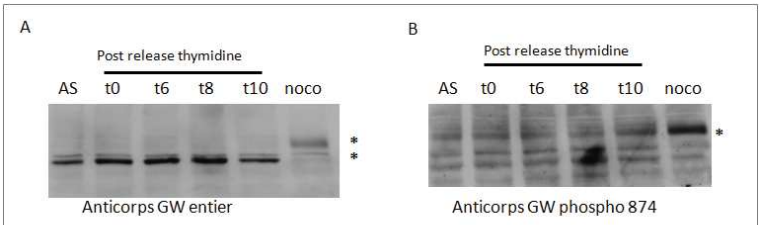


Figure 4: Gwl est phosphorylée sur le résidu 874 en mitose. Des cellules HeLa sont synchronisées par traitement à la thymidine pendant 20h. Les cellules sont ensuite lavées et traitées à la 2-déoxycitidine, puis sont prélevées au temps t0, t6, t8, et t10. Au temps t8, des cellules sont traitées avec 50 ng/mL de nocodazole. Les cellules sont lysées et 40 ng de protéines totales est déposées dans un gel SDS-PAGE. (A) La présence de Gwl est analysée avec un anticorps anti-Gwl entier par Western blot. (B) La présence de Gwl phospho 874 est analysée avec un anticorps anti-phosho874 par Western blot. Les étoiles (*) représentent Gwl phosphorylée et non phosphorylée.

Gwl interagit avec Cdc14

Dans les extraits d'ovocytes de xénope, nous avons mis en évidence que Gwl maintient l'état mitotique en régulant négativement PP2A. En effet, la co-immunodéplétion de Gwl et PP2A prévient le phénotype induit par la seule immunodéplétion de Gwl (Vigneron et al, 2009). Des résultats obtenus dans les cellules humaines par A. Burgess, mettent en évidence que Gwl pourrait réguler PP2A dans les cellules humaines, cependant la double inhibition de Gwl et PP2A par siRNA ne sauve que partiellement le phénotype induit par la seule inhibition de Gwl (Burgess et al, 2010). Ces observations suggèrent que Gwl pourrait réguler négativement d'autres phosphatases mitotiques capables de déphosphoryler les substrats de cycline B/Cdk1. Mise à part PP2A, les phosphatases PP1 et Cdc14 interviennent pendant la sortie de mitose, cependant dans les extraits d'œufs de xénope, nous avons montré que Gwl ne régulerait pas PP1 (Vigneron et al, 2009). Cdc14 pourrait être un bon candidat.

La phosphatase Cdc14 a été initialement découverte chez la levure S. *cerevisiae.* Chez la levure, la principale fonction de Cdc14 est de réguler la sortie de mitose (Visintin et al, 1999). Durant l'interphase et le début de mitose Cdc14 est séquestrée sous forme inactive dans les nucléoles par la protéine Net1 (Shou et al, 1999). Cdc14 est libérée des nucléoles par deux mécanismes distincts à différents moments de la mitose. Le réseau FEAR (Cdc fourteen early anaphase release) qui permet la libération d'une petite

population de Cdc14 durant l'anaphase précoce et ensuite par le MEN (mitotic exit network) en fin d'anaphase (Jaspersen et al, 1998 ; Stegmeier et al, 2002). La libération de Cdc14 dépendante du réseau FEAR est activée par la phosphorylation de Net1 par le complexe cycline B/Cdk1 (Azzam et al, 2004). Le MEN représente une cascade de signalisation faisant intervenir un grand nombre de protéines, dont la protéine kinase Cdc15 (polo) (pou revue, Bardin and Amon, 2001 ; D'Amours and Amon, 2004). Il s'assure que la sortie de mitose n'a lieu que lorsque les chromosomes sont partagés de manière égale. L'activité de Cdc14 est essentielle pour antagoniser l'activité de Cdk en fin de mitose (Knapp et al, 1996 ; Toyn et al, 1997 ; Visintin et al, 1998). Cdc14 peut également déphosphoryler des substrats de Cdk (Sullivan et al, 2004)

Dans les cellules humaines deux homologues de Cdc14 ont été identifiée hCdc14A et hCdc14B (Li et al, 1997). L'expression des isoformes de Cdc14 peut sauver le phénotype S. *pombe* déficiente en Clb1 indiquant que les fonctions de Cdc14 sont conservées à travers l'évolution (Vazquez-Novelle et al, 2005). Des études *in vitro* ont montré que hCdc14 a une forte préférence pour les protéines phosphorylées sur les sites S/T-P (Gray et al, 2003). L'inhibition de l'expression de hCdc14A conduit à une mauvaise ségrégation des chromosomes et un défaut de cytodiérèse (Kaiser et al, 2002 ; Mailand et al, 2002). Il a récemment été mis en évidence que hCdc14A déphosphoryle *in vitro* Cdc25A sur les sites de phosphorylation du complexe Cycline B/Cdk1 (Esteban et al, 2006). Contrairement à hCdc14A, hCdc14B n'est pas essentielle à la ségrégation des chromosomes et à la sortie de mitose (pour revue, Berdougo et al, 2008).

Afin de déterminer s'il existerait un lien entre Gwl et Cdc14, nous avons tout d'abord analysé les interactions entre Gwl et Cdc14A/Cdc14B. Pour cela, Gwl taguée YFP et les isoformes cdc14A ou cdc14B tagués FLAG ont été surexprimés dans des Hek293T. Nos résultats montrent que Gwl co-immunoprécipite avec Cdc14A et Cdc14B, mais également que les deux phosphatases co-immunoprécipitent avec Gwl (Figure 5). Ces résultats suggèrent que Gwl interagit avec Cdc14A et Cdc14B.
Cependant, nous avons mis en évidence que Gwl interagit avec Plk1 et également avec Cdc14. De plus, l'interaction entre Gwl et Plk1 est cycle cellulaire dépendante. Enfin, une étude récente dans les cellules humaines a mis en évidence que Plk1 peut lier et phosphoryler hCdc14A *in vitro* et *in vivo.* Plk1 régulerait l'auto-inhibition de Cdc14A

mais aussi la localisation de Cdc14A. En télophase Plk1 et Cdc14A sont localisées au niveau du midbody. Finalement, la surexpression d'un mutant inactif de Cdc14A conduit à une mauvaise ségrégation des chromosomes (Yuan et al, 2007). Nous nous sommes donc demandés si Gwl, Plk1 et Cdc14 interagissaient entre elles. Pour répondre à cette question, Cdc14A-FLAG ou Cdc14B-FLAG ont été surexprimées dans des Hek293T, et nous avons analysé par immunoprécipitation si ces protéines pouvaient former un complexe. Comme montré précédemment, Gwl, Plk1 et Cdc14A-FLAG ou Cdc14B-FLAG co-immunoprécipitent (Figure 6). Ces résultats suggèrent que Plk1, Gwl et Cdc14 pourrait former un trimère (Gwl-Plk1-Ccd14) ou des dimères (Gwl-Plk1, Gwl-Cdc14, Plk1-Cdc14) qui s'associeraient entre eux.

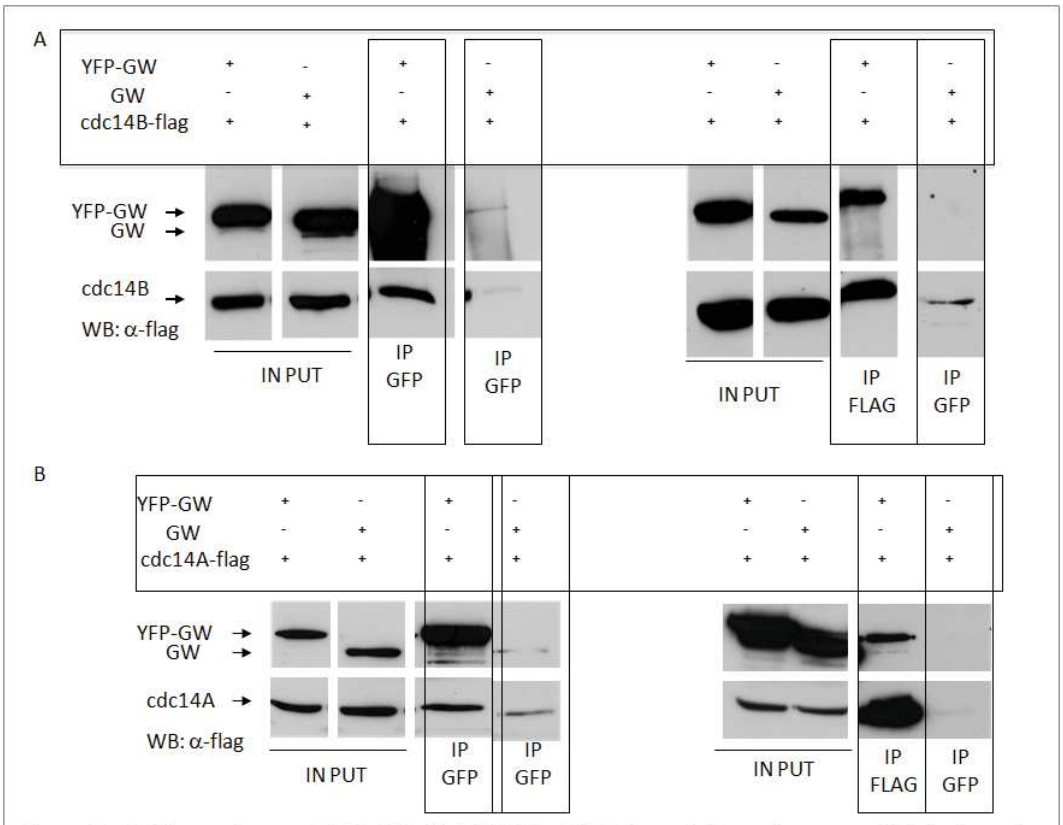


Figure 5: Gwl interagit avec Cdc14. (A) Cdc14B-FLAG, YFP-Gwl, et Gwl sont immunoprécipités dans des Hek293T. Les cellules sont lysées et Gwl ou Cdc14B sont immunoprécipitées avec un anticorps anti-GFP ou anti-FLAG. La présence de Gwl et Cdc14B dans les 40ng de protéines totales de l'input et 500ng de protéines totales des IPs est analysée avec les anticorps anti-Gwl entier et anti-FLAG par SDS-PAGE et Western blot. (B) Cdc14A-FLAG, YFP-Gwl, et Gwl sont immunoprécipitées dans des Hek293T. Les cellules sont lysées et Gwl ou Cdc14A sont immunoprécipitées avec un anticorps anti-GFP ou anti-FLAG. La présence de Gwl et Cdc14A dans les 40ng de protéines totales de l'input et 500ng de protéines totales des IPs est analysées avec les anticorps anti-Gwl entier et anti-FLAG par SDS-PAGE et Western blot.

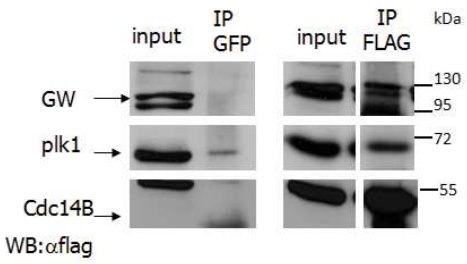


Figure 6: Gwl interagit avec Cdc14B et Plk1. Cdc14B-FLAG est transfectée dans des Hek293T. Les cellules sont lysées Cdc14B est immunoprécipitée avec un anticorps anti-FLAG ou anti-GFP pour le contrôle. La présence de Gwl, Cdc14B et Plk1 dans les 40 ng de protéines totales de l'input et les 500 ng de protéines totales des IPs est analysée avec les anticorps anti-Gwl entier, anti-FLAG et anti-Plk1 par SDS-PAGE et Western blot.

Cdc14 est phosphorylée en mitose

Les résultats précédents montrent que Gwl interagit avec Cdc14. Nous avons voulu savoir si Cdc14 pouvait être un substrat de Gwl. Pour répondre à cette question, les cellules HeLa sont transfectées avec les plasmides codant pour YFP-Gwl ou FLAG-Cdc14B, puis les cellules sont synchronisées en mitose à l'aide de nocodazole. Enfin, les cellules sont lysées et Gwl ou Cdc14 sont immunoprécipitées avec un anticorps anti-GFP ou anti-FLAG. Les immunoprécipitations sont ensuite traitées avec de l'ATP$^{\gamma 33}$ et analysées par SDS-PAGE et autoradiographie. Les résultats montrent une bande de la taille de Cdc14 qui est radiomarquée et identique dans des deux immunoprécipitations (Figure 7). Ces résultats suggèrent que Cdc14B pourrait être phosphorylée par Gwl ou par un de ses partenaires.

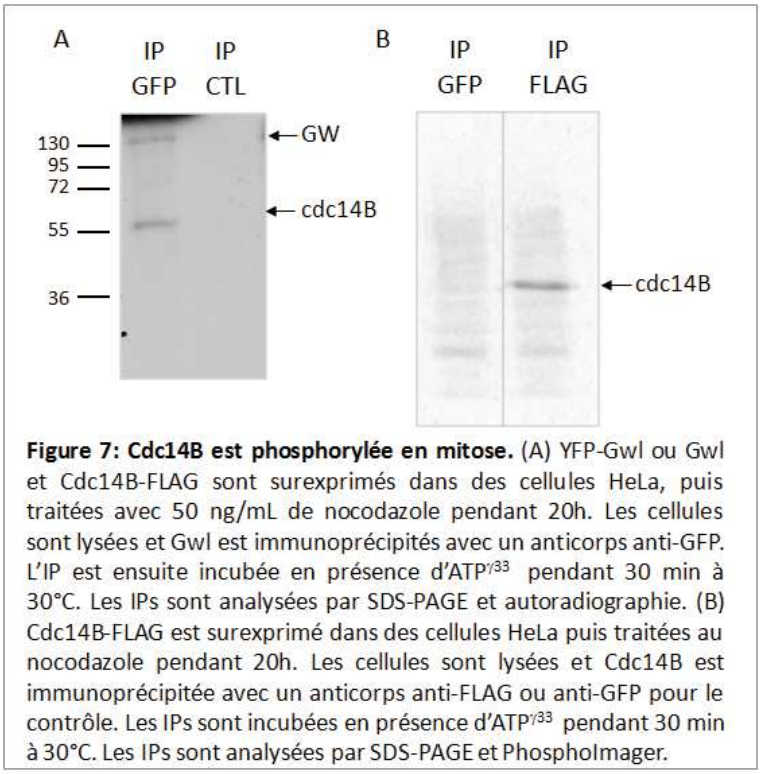


Figure 7: Cdc14B est phosphorylée en mitose. (A) YFP-Gwl ou Gwl et Cdc14B-FLAG sont surexprimés dans des cellules HeLa, puis traitées avec 50 ng/mL de nocodazole pendant 20h. Les cellules sont lysées et Gwl est immunoprécipités avec un anticorps anti-GFP. L'IP est ensuite incubée en présence d'ATP$^{\gamma 33}$ pendant 30 min à 30°C. Les IPs sont analysées par SDS-PAGE et autoradiographie. (B) Cdc14B-FLAG est surexprimé dans des cellules HeLa puis traitées au nocodazole pendant 20h. Les cellules sont lysées et Cdc14B est immunoprécipitée avec un anticorps anti-FLAG ou anti-GFP pour le contrôle. Les IPs sont incubées en présence d'ATP$^{\gamma 33}$ pendant 30 min à 30°C. Les IPs sont analysées par SDS-PAGE et PhosphoImager.

DISCUSSION RSK2

Rsk2 localise aux kinétochores dans les extraits d'œufs de xénope et dans les cellules humaines.

Nous avons mis en évidence la localisation aux kinétochores de RSK2 dans les extraits d'ovocytes de xénope et dans les cellules humaines, en condition de spindle checkpoint actif. Des travaux plus anciens ont montré que RSK2 localise à la fois dans le cytoplasme et dans le noyau, durant l'interphase dans des cellules HeLa (Chen et al, 1992). Après l'addition de facteur de croissance, RSK2 est activée par la voie MAPK kinase et elle se retrouve localisée au niveau de la membrane plasmique ou dans le noyau, où elle induit l'expression de certains gènes (Chen et al, 1992). Nous avons mis en évidence que RSK2 localise essentiellement dans le cytoplasme en interphase. Alors qu'après traitement des cellules au nocodazole pour activer le SAC, RSK2 localise aux niveaux des kinétochores. Cependant, nous n'observons pas cette localisation dans des cellules mitotiques non traitées au nocodazole. Enfin, la surexpression de la forme inactive de RSK2 ne montre pas un marquage aux kinétochores mais plutôt un marquage diffus sur l'ADN et le cytoplasme. Il semble donc que l'activation de RSK2 aux kinétochores serait dépendante de son activité kinase. Ces observations suggèrent que l'activation du checkpoint permettrait le recrutement de RSK2 aux kinétochores et activerait celle-ci. Comme l'activité kinase de RSK2 serait requise pour sa localisation aux kinétochores, il serait possible sa localisation nécesite son autophosphorylation ou la phosphorylation d'un de ses substrats s. Par ailleurs, en absence de nocodazole le SAC est activé par seulement quelques kinétochores non attachés, alors qu'en présence de nocodazole aucun kinétochore n'est attaché. Ceci peut expliquer la présence de RSK2 après addition de nocodazole mais pas en condition normale. De ce fait, en absence de nocodazole, seulement une petite quantité de RSK2 est certainement localisée aux kinétochores mais n'est pas détectable par la surexpression de GFP-RSK2 qui n'est pas assez sensible.

RSK2 est essentiel à l'établissement du SAC dans les extraits d'œufs de xénope

Dans les ovocytes de xénope, l'arrêt CSF est établi par l'inhibition de l'APC/C. En effet cet arrêt est mis en place par la voie Mos-MAPK qui active l'inhibiteur de l'APC/C, Emi2/Erp1. Dans les extraits CSF, il est possible d'activer le SAC par addition de têtes spermatiques et de nocodazole. Dans ces conditions, l'APC/C sera inhibé par deux voies, le CSF et le SAC. A partir de ces extraits, il est donc possible d'étudier la localisation des protéines du checkpoint après immunodéplétion des différentes protéines candidates à faire partie de la voie de signalisation du SAC, et ce même si cette immunodéplétion induit la perte d'activité du SAC. De plus, l'activité du SAC peut être étudiée après addition de calcium qui libérera l'arrêt CSF.

L'immunodéplétion de RSK2 des extraits arrêtés en métaphase II, traités au nocodazole et additionnés de têtes spermatiques ne maintient pas cet arrêt induit par l'activation du SAC. Dans ces extraits, l'arrêt CSF n'est plus maintenu après l'addition de calcium indiquant que le SAC n'est plus actif du à l'immunodéplétion de RSK2. Nos résultats suggèrent donc que RSK2 participe à l'établissement du SAC. Nous avons observé que l'inactivation du SAC est associée à une délocalisation des protéines du checkpoint Aurora-B, Incenp, Bub1, Mps1, Cenp-E, Mad1, Mad2, et Bub3 des kinétochores. Or, il a été mis en évidence que la localisation de ces protéines était essentielle à l'activité du SAC. Mais également que la déplétion d'une de ces protéines conduit à la délocalisation des protéines en aval de celle-ci, dans la voie de signalisation du SAC (Vigneron et al, 2004). Aurora-B est la protéine la plus en amont de la voie de signalisation du SAC, dans les extraits d'œufs de xénope. En effet, l'immunodéplétion d'Aurora-B induit la délocalisation de toutes les autres protéines du checkpoint dans les extraits d'œufs de xénope, alors que la déplétion de ces protéines ne conduit pas à la délocalisation d'Aurora-B des kinétochores (Vigneron et al, 2004). Puisque, la déplétion de RSK2 conduit à la délocalisation d'Aurora-B et que la déplétion d'Aurora-B induit la délocalisation de RSK2, il semblerait que ces deux protéines se situent au même niveau de la voie de signalisation du SAC. Enfin, afin de vérifier si le phénotype observé par la l'immunodéplétion de RSK2 est spécifique, RSK2 est traduit dans des extraits après immunodéplétion de la protéine endogène pour sauver le phénotype. Cependant, la

traduction de RSK2 ne permet pas de sauver le phénotype induit par l'immunodéplétion de la protéine endogène. Ce résultat peut être expliqué par le fait que l'immunodéplétion de RSK2 immunodéplète également un ou plusieurs partenaires de RSK2. Partenaires avec lesquels elle formerait un complexe, et qui serait requis pour l'activité du SAC. Des résultats similaires ont été mis en évidence avec la kinase Aurora-B. En effet, l'immunodéplétion d'Aurora-B conduit à l'inactivation du SAC et à la co-immunodéplétion de ses partenaires Incenp, Survivine, Boréaline avec lesquels elles forment le complexe CPC (Chromosomal Passenger Complex). L'immunodéplétion de ce complexe induit l'inactivation du SAC. L'addition d'Aurora-B dans ces extraits immunodéplétés ne permet pas de restaurer l'activité du SAC puisque ses partenaires (Incenp-Survivine-Boréaline) sont absents de l'extrait et qu'ils sont requis pour l'activité du checkpoint (Vigneron et al, 2004)

L'inhibition de l'expression de RSK2 induit la délocalisation de Mad1, Mad2 et Cenp-E des kinétochores en condition de SAC actif dans les cellules humaines

Dans les cellules HeLa, nous avons montré qu'en condition de SAC actif par traitement au nocodazole, les protéines du checkpoint BubR1, Incenp et Bub1 restent localisées aux kinétochores. Alors que le signal de Mad1 et Mad2 diminue fortement aux kinétochores et Cenp-E est complètement délocalisée des kinétochores. D'autre part, nous avons mis en évidence que le phénotype observé est spécifique puisque la surexpression dans les cellules humaines de l'orthologue xénope de RSK2 sauve la délocalisation de Mad1, Mad2 et Cenp-E des kinétochores. Dans les extraits d'œufs de xénope nous avons observé la disparition de toutes les protéines du checkpoint après immunodéplétion de RSK2 ; alors que dans les cellules humaines seulement Mad1, Mad2 et Cenp-E sont délocalisées des kinétochores. Chez le xénope, il n'y a qu'une voie d'activation du SAC qui est la voie de l'attachement (Vigneron et al, 2004). Alors que dans les cellules humaines, il y aurait deux voies de signalisation l'une activée par les défauts de tension et l'autre par les défauts de l'attachement (pour revue, Pinsky and Biggins, 2005). La protéine Mad2 appartiendrait à la voie de l'attachement (Chen et al, 1996 ; Waters et al, 1998 ; Skoufias et al, 2001), alors que les protéines BubR1 et Bub1 interviendraient plutôt dans la voie de la tension (Skoufias et al, 2001 ; Shannon et al,

2004 ; Logarinho et al, 2004 ; Taylor et al, 2001). Néanmoins, BubR1 semble également intervenir dans la voie de l'attachement (Johnson et al, 2004 ; Chan et al, 1999 ; Chen et al, 2002 Meraldi et al, 2004). Dans les extraits d'ovocytes de xénope, il a été montré que Cenp-E est essentielle à l'activité du SAC (Abrieu et al, 2000 ; Vigneron et al, 2004). Cependant, dans les cellules humaines, le rôle de Cenp-E n'est pas très clair dans la localisation des protéines du checkpoint. En effet, une étude montre que son inhibition par système Cre recombinase dans des cellules MEFs induit la délocalisation de BubR1, Mad1 et Mad2 mais pas de Bub1 des kinétochores (Weaver et al, 2003). Alors que d'autres études, dans les cellules humaines montrent que l'inhibition de Cenp-E induit une diminution du signal de BubR1 (Weaver et al, 2003) ou n'affecte pas la localisation de Mad1, Mad2, Bub1 et BubR1 (Yao et al, 2000 ; McEwen et al, 2001). La différence de résultats obtenue entre les cellules humaines et les MEFs peut être expliquée par la nature de l'inhibition de l'expression de Cenp-E. En effet, l'inhibition de son expression dans les cellules humaines est obtenue à l'aide de siRNA ou par microinjection d'anticorps anti-Cenp-E, dont le résultat n'est pas de 100%, alors que dans les MEFs l'inhibition par le système Cre recombinase inhibe complètement l'expression de Cenp-E. Néanmoins, l'extinction totale de Cenp-E induit la délocalisation de BubR1 et Mad2 mais pas de Bub1. De plus, il a été montré que l'inhibition de Bub1 induit la délocalisation de BubR1, suggérant que BubR1 se trouve en aval de Bub1 dans la voie de signalisation (Johnson et al, 2004). A la vue de ces observations, il est difficile de définir à laquelle de ces deux voies de signalisation appartient Cenp-E, mais il semblerait qu'elle se place en aval de Bub1 et en amont de BubR1. Ceci nous amenant à spéculer sur le fait qu'elle pourrait faire la jonction entre les deux voies via BubR1 et Mad2. Enfin, nos résultats montrent que l'inhibition de l'expression de RSK2 conduit à la délocalisation de Cenp-E, Mad2 et Mad1 et n'intervient pas au niveau de celle d'Incenp, BubR1 et Bub1, ce qui suggère que RSK2 appartiendrait plutôt à la voie de l'attachement en amont de Mad1, Mad2 et Cenp-E.

D'autre part, nos résultats étayent l'hypothèse selon laquelle la voie de signalisation du SAC est différente chez le xénope et dans les cellules humaines, puisque chez le xénope l'immunodéplétion de RSK2 induit la délocalisation de toutes les protéines du checkpoint alors que l'inhibition de l'expression de RSK2 dans les cellules humaines induit seulement la délocalisation de Cenp-E, Mad1 et Mad2.

RSK2 participerait à l'activation du SAC dans les cellules humaines

Chez le xénope, l'immunodéplétion de RSK2, dans des extraits arrêtés en métaphase II, montre que RSK2 est requise pour l'activité du SAC. De manière surprenante, malgré la délocalisation de Cenp-E, Mad1 et Mad2 aux kinétochores, nos résultats dans les cellules humaines ne montrent pas de différence d'index mitotique entre la population de cellules sauvages et la population de cellules dont l'expression de RSK2 est inhibée. Ceci peut être expliqué par l'inhibition d'expression incomplète de RSK2 dans les cellules. En effet, le siRNA anti-RSK2 inhibe seulement 80% de la protéine, le fait qu'il reste 20% de RSK2 exprimée pourrait expliquer que l'on observe une forte diminution de Mad1 et Mad2 aux kinétochores et non pas une disparition complète. De ce fait, la quantité de Mad1 et Mad2 aux kinétochores pourrait être suffisante pour activer le SAC.

D'autres études ont montré des résultats similaires aux nôtres. En effet, l'inhibition de Hec1 par siRNA, dans des cellules, conduit à la délocalisation de Mps1, Mad1 et Mad2 des kinétochores. Malgré cette délocalisation le SAC est toujours actif (Martin-Lluemsa et al, 2002). De plus, deux études montrent que l'inhibition d'Aurora-B par l'hesperadine, ou par le ZM447439, n'induit pas l'activation du SAC en présence de nocodazole (Hauf et al, 2003 ; Ditchfield et al, 2004). Deux possibilités peuvent expliquer ces résultats : La première serait que le checkpoint est activé par deux voies. Aurora-B (Ditchfield et al, 2003 ; Hauf et al, 2003) ou RSK2 participerait seulement à l'une de ces deux voies. La seconde possibilité serait que le SAC est activé par une seule voie de signalisation. L'inhibition d'Aurora-B (Ditchfield et al, 2003 ; Hauf et al, 2003) ou RSK2 n'inhiberait que partiellement cette voie. En effet, la quantité de Mad2 et Mad1 restant aux kinétochores serait suffisante pour activer le SAC. Enfin une autre étude montre que Bub1 est requise pour la localisation de BubR1, Cenp-E et Mad2 aux kinétochores mais que l'inhibition de Bub1 par siRNA n'induit pas l'inactivation du SAC (Johnson et al, 2004). Ces résultats peuvent être expliqués par le fait qu'après inhibition de l'expression de Bub1, 30% de BubR1 et 25% de Mad2 sont localisés aux kinétochores, ce qui serait suffisant pour activer le SAC. En outre, dans cette étude, il est montré que l'inhibition de Cenp-E ne conduit pas à la délocalisation de BubR1 et Bub1 alors que seulement 40% de Mad2 est localisés aux kinétochores (Johnson et al, 2004).

Par ailleurs, il a été montré dans les cellules HeLa que Cenp-E est requise pour la capture et l'attachement des kinétochores aux microtubules, étape nécessaire à l'alignement des chromosomes sur la plaque métaphasique. En accord avec son rôle dans la capture et la congression des kinétochores, l'inhibition de Cenp-E induit des défauts d'alignements des chromosomes. Des études ont mis en évidence que la présence de kinétochores non attachés, en conséquence de l'absence de Cenp-E, induit l'activation du SAC et l'arrêt prolongé en mitose (Yao et al, 2000 ; McEwen et al, 2001). Alors que d'autres études ne montrent pas d'arrêt prolongé des cellules en mitose suggérant l'implication de Cenp-E dans le maintien du SAC (Putkey et al, 2002 ; Tanudji et al, 2004). Nos résultats montrent que dans les conditions d'inhibition d'expression de RSK2, Cenp-E ne serait pas requis pour l'activation du SAC, néanmoins la délocalisation de Cenp-E suggère que RSK2 pourrait être indirectement requise pour l'attachement correct des kinétochores au fuseau mitotique.

Finalement, en accord avec ces résultats et nos observations, il se pourrait que l'inhibition de RSK2 induise la délocalisation de Cenp-E qui par conséquent conduirait à la diminution de localisation de Mad1 et Mad2 aux kinétochores. De cette manière RSK2 interviendrait dans la voie de l'attachement. Néanmoins, afin d'affiner l'implication de RSK2 dans la voie de signalisation du SAC, des expériences à l'aide de taxol ou de vinblastine devraient être réalisées pour activer le checkpoint par la voie de la tension.

RSK1 ne participe pas à la localisation des protéines du checkpoint

Comme nos résultats montrent une délocalisation de Cenp-E, Mad1 et Mad2 aux kinétochores et le maintien de l'activité du SAC, nous nous sommes demandé s'il ne pourrait pas y avoir redondance des isoformes de RSK2 dans la participation à l'activation du SAC. Nous avons choisi d'étudier RSK1 car c'est l'isoforme comportant la plus forte homologie avec RSK2 (73%) et parce que chez le xénope seuls les isoformes RSK1 et RSK2 sont présents. Nos résultats montrent que RSK1 ne localise pas les protéines du checkpoint aux kinétochores. Il semble donc que RSK1 ne pourrait pas remplacer RSK2. Cependant, afin de vérifier qu'il n'y a pas de redondance de RSK2, une

double inhibition par siRNA de RSK2 et RSK1 devrait être réalisée, ainsi que l'inhibition des quatre isoformes de RSK.

DISCUSSION GREATWALL

Historiquement, l'hypothèse la plus acceptée était que l'entrée et la sortie de mitose étaient directement régulées par l'activation et l'inactivation du complexe cycline B/Cdk1. L'activation du complexe cycline B/Cdk1 par sa boucle d'auto-amplification conduirait à la phosphorylation protéines mitotiques et à l'entrée en mitose. Alors que la dégradation de la cycline B induirait l'inactivation du complexe, la déphosphorylation des substrats mitotiques et la sortie de mitose. Toutefois, nos résultats ont mis en évidence l'implication d'une nouvelle kinase, Gwl, dans la régulation de la progression mitotique. En effet, les premières études sur Gwl ont montré que son immunodéplétion induit la sortie de méiose, ainsi que la rephosphorylation de la Tyr15 de Cdk1 et l'inactivation du complexe cycline B/Cdk1, en absence de dégradation de la cycline B (Yu et al, 2004 ; Yu et al, 2006, Zhao et al, 2008). Ces résultats suggéraient que Gwl maintenait l'état mitotique en contrôlant la boucle d'auto-amplification du MPF, soit en phosphorylant et en inactivant Myt1 et Wee1, soit en activant Cdc25. Cependant, nos résultats montrent que l'immunodéplétion de Gwl induit effectivement la sortie de mitose ainsi qu'une déphosphorylation rapide des substrats mitotiques de manière indépendante de l'activité du MPF. De plus, nous montrons que Gwl régule négativement la phosphatase PP2A. Ces résultats sont en accord avec les résultats de Castilho *et al,* qui montrent que Gwl régule négativement PP2A/B55δ (Castilho et al, 2009).

Nos données ont donc participées de manière importante à la mise en évidence d'une nouvelle hypothèse, où en plus du compexe cycline B/Cdk1, l'inactivation de PP2A via la kinase Gwl jouerait un rôle essentielle dans le contrôle de l'entrée et de la sortie de mitose

Comment Gwl pourrait réguler PP2A ?

Des études ont mis en évidence que mise à part le complexe cycline B/Cdk1, les phosphatases jouent un rôle important dans la régulation mitotique. En effet, il a été montré que l'inhibition des phosphatases par l'acide okadaique dans des extraits d'œufs de xénope interphasiques conduit à l'activation du MPF et bloque la déphosphorylation

de Cdc25. Ce qui indique que PP2A régule négativement le MPF en maintenant Cdc25, Wee1 et Myt1 déphosphorylées (Clarke et al, 1993 ; Felix et al, 1990). Ainsi, la phosphatase PP2A doit être régulée durant la mitose. En effet, elle doit être inhibée en début de mitose afin de permettre l'activation du MPF et la phosphorylation de ses substrats. Elle doit également être activée en fin de mitose afin de permettre la déphosphorylation des substrats mitotiques nécessaire à la sortie de mitose. Nous avons mis en évidence que Gwl est un régulateur négatif de PP2A. Gwl s'associe à PP2A, néanmoins Gwl ne phosphoryle pas directement PP2A suggérant que Gwl inhibe cette phosphatase via une autre protéine. En effet, Gwl pourrait phosphoryler et activer une kinase qui à son tour phosphorylerait et inhiberait PP2A ou une protéine qui s'associerait à PP2A pour l'inhiber, comme c'est le cas pour PP1. PP1 est requise pour l'activation de Cdc25 à la transition G2/M et pour la déphosphorylation des substrats mitotiques en sortie de mitose (Bailis et al, 2000). PP1 est inhibée par l'inhibiteur 1 (I1) et par le complexe cycline B/Cdk1 pendant la mitose (Wu et al, 2009). A l'entrée en mitose, I1 est phosphorylée et activée par PKA. A la transition métaphase-anaphase, l'inactivation de Cdk1 permet l'auto-déphosphorylation de PP1 et la déphosphorylation de l'I1 conduisant ainsi à l'activation complète de PP1 (Wu et al, 2009). Gwl pourrait dont phosphoryler et activer une protéine inhibitrice, comme le fait PKA. Cette protéine inhibitrice, une fois activée par Gwl pourrait inactiver PP2A, elle pourrait agir en s'associant à PP2A et entrer en compétition avec ses substrats ou alors changer la conformation de PP2A. Par ailleurs, il a été montré que PP2A pouvait être associée et régulée par les inhibiteurs I1 et I2 (Janssens et al, 2001). Gwl pourrait donc activer ces inhibiteurs de PP2A par phosphorylation. De plus, il a été montré que PP2A pouvait être régulée par méthylation de la sous unité catalytique (Longin et al, 2007). En effet, la méthylation de PP2A/C est nécessaire à la formation du trimère de PP2A. Nous pouvons donc supposer que durant la mitose, Gwl phosphorylerait et activerait l'enzyme responsable de la déméthylation de PP2A. En outre, d'autres études seront nécessaires pour déterminer quel est le lien entre Gwl et PP2A.

Activation de Gwl

Gwl est phosphorylée et activée durant la mitose. Il a été mis en évidence que le MPF et Plx1 sont capables de phosphoryler Gwl (Yu et al, 2006). Gwl appartient à la famille

des AGC kinases, néanmoins, Gwl a la particularité de ne pas posséder de motif hydrophobe pourtant nécessaire à l'activation des AGC kinases. Cependant, comme les autres AGC kinases, Gwl possède en N-terminal une poche hydrophobique fonctionnelle à laquelle le motif hydrophobe doit s'associer pour stabiliser la forme active de la kinase. La kinase PDK1, comme Gwl ne possède pas de motif hydrophobe. Cependant, la liaison de la poche hydrophobe de PDK1 au motif hydrophobique d'autres AGC kinases induit le changement de conformation de la kinase lui permettant ainsi son activation. Puisque Gwl et PDK1 ont toutes les deux la particularité de ne pas posséder de motif hydrophobe, il est possible que Gwl s'active de manière similaire à PDK1. Ainsi, la poche hydrophobe de Gwl pourrait s'associer au motif hydrophobe phosphorylé par d'autres AGC kinases qui pourraient participer à l'activation de Gwl, induisant son changement de conformation. Gwl pourrait donc être régulée par d'autres kinases de la famille AGC. Par ailleurs, Gwl possède en C-terminal, un turn motif comme les autres AGC kinases. Ce motif stimule l'association de la poche hydrophobe avec le motif hydrophobe, association nécessaire à l'activation de la kinase (Hauge et al, 2007). Le turn motif de Gwl peut être phosphorylé par Plx1 et le MPF *in vitro* (résultats non publiés). Le MPF peut phosphoryler ses substrats seulement si PP2A est partiellement inhibée par Gwl. Au vu de ces données, nous pourrions donc imaginer que le MPF pourrait être la kinase qui déclenche l'activation de Gwl. Cependant, nos résultats montrent que lorsque Gwl est immunodéplétée dans des extraits arrêtés en métaphase II et que le MPF est maintenu actif par les déplétions de Wee1 et Myt1, les substrats mitotiques sont déphosphorylés. Le MPF ne pourrait donc pas être la kinase activatrice de Gwl, mais il serait plutôt une kinase qui amplifie l'activation de Gwl. Par ailleurs, Plx1 est capable de phosphoryler Gwl (Yu et al, 2006), de plus Plx1 est déjà active en entrée en mitose (Kumagai and Dunphy, 1996 ; Nakajima et al, 2003). Nous pouvons donc supposer que Plx1 serait la kinase activatrice de Gwl. En effet, Plx1 pourrait phosphoryler le turn motif de Gwl et permettre son activation. A l'aide de ces données nous pouvons imaginer l'activation de Gwl de la manière suivante : dans un premier temps, Gwl serait partiellement activée par Plx1 ou une autre kinase, l'activation partielle de Gwl inhiberait partiellement PP2A qui permettrait l'activation du MPF. Une fois activé le MPF activerait complètement Gwl qui inhiberait à son tour complètement PP2A. L'inactivation complète de PP2A permettrait la phosphorylation des substrats mitotiques jusqu'à la dégradation de la

cycline B. Le fait que le MPF pourrait agir comme un amplificateur de Gwl assure que la cellule entre en mitose seulement si une quantité suffisante de cycline B/Cdk1 est activée. L'entrée en mitose serait donc régulée par deux boucles d'amplification, celle du MPF et celle de Gwl.

Inactivation de Gwl

En sortie de mitose, Gwl est déphosphorylée et inactivée. Cette inactivation permet à PP2A de déphosphoryler les substrats mitotiques nécessaires à la sortie de mitose. Cependant, puisque Gwl inhibe PP2A, il est peu probable que la phosphatase responsable de la déphosphorylation et inactivation de Gwl soit PP2A. Hormis PP2A, les phosphatases PP1 et Cdc14 participent à la sortie de mitose (Wu et al, 2009 ; Kaiser et al, 2002 ; Mailand et al, 2002). On peut donc imaginer que ces deux phosphatases pourraient déphosphoryler Gwl en fin de mitose. En effet, dans les extraits d'œufs de xénope, PP1 déphosphoryle les substrats de cycline B/Cdk1 en sortie de mitose (Wu et al, 2009). Gwl est un substrat du complexe cycline B/Cdk1, PP1 pourrait donc déphosphoryler Gwl en fin de mitose.

D'autre part, une fois Gwl inactivée, PP2A peut déphosphoryler les substrats mitotiques. Cependant, l'inhibition de PP2A ne sauve pas complètement le phénotype induit par l'inhibition de Gwl dans les extraits d'œufs de xénope et dans les cellules humaines (Burgess et al, 2010). Il a été montré dans les extraits d'œufs de xénope que PP1 participe à la déphosphorylation des substrats de cycline B/Cdk1 (Wu et al, 2009). Nous pouvons donc supposer que PP1 agit en synergie avec PP2A pour déphosphoryler les substrats mitotiques. D'autre part, Il a été montré chez la levure que la déphosphorylation des substrats mitotiques est catalysée par Cdc14 (Sullivan et al, 2004). Durant la mitose, Cdc14 est séquestrée par Net1 dans les nucléoles et sa libération en fin de mitose est dépendante de la phosphorylation de Net1 par le complexe cycline B/Cdk1 (Azzam et al, 2004). En outre, dans les cellules humaines, il a été montré que Cdc14A est nécessaire à la ségrégation des chromosomes et à la cytodiérèse (Kaiser et al, 2002 ; Mailand et al, 2002), contrairement à Cdc14B (pour revue, Berdougo et al, 2008). Cdc14 pourrait donc déphosphoryler les substrats de

cycline B/Cdk1 en fin de mitose. Par ailleurs, nous avons montré que Gwl, Plk1 et Cdc14 s'associaient dans les cellules. Il a été montré que Cdc14A serait phosphorylée par Plk1 en fin de mitose et que cette phosphorylation inhiberait l'auto-inhibition de Cdc14 en fin de mitose (Yan et al, 2007). A la vu de ces données, nous pouvons donc imaginer que Plk1 pourrait phosphoryler et activer Cdc14 qui à son tour déphosphorylerait et inactiverait Gwl, en sortie de mitose.

Gwl et les points de contrôles

Puisque Gwl participe à l'entrée et à la sortie de mitose, cette kinase pourrait être inactivée par les points de contrôle de dommage à l'ADN en transition G2/M et par le SAC durant la mitose. En effet, le point de contrôle de dommage à l'ADN en phase G2 pourrait prévenir l'activation de Gwl. Dans ces conditions, PP2A serait active et déphosphorylerait les substrats mitotiques tels que Cdc25, Wee1 et Myt1, ne permettant pas l'activation du MPF et l'entrée en mitose. Une étude récente suggère que l'activation de la voie de signalisation ATM/ATR en réponse à des dommages de l'ADN inhibe l'activité de Gwl (Peng et al, 2010) Quant au SAC, son activation pourrait conduire à la stabilisation des phosphorylations de Gwl. En effet, Gwl pourrait être phosphorylée par les kinases qui participent à l'activation du SAC, favorisant le maintien des phosphorylations de substrats mitotiques et donc l'état mitotique en attendant que le checkpoint soit satisfait. On pourrait imaginer que Gwl participe à une voie parallèle de l'inhibition de l'APC. Dans le cas ou l'APC serait activée prématurément, le maintient de l'activité de Gwl préviendrait la sortie de mitose.

Abraham, R.T. 2001. Cell cycle checkpoint signaling through the ATM and ATR kinases. Genes Dev. 15:2177-96.

Abrieu, A., T. Brassac, S. Galas, D. Fisher, J.C. Labbe, and M. Doree. 1998. The Polo-like kinase Plx1 is a component of the MPF amplification loop at the G2/M-phase transition of the cell cycle in Xenopus eggs. J Cell Sci. 111 (Pt 12):1751-7.

Abrieu, A., J.A. Kahana, K.W. Wood, and D.W. Cleveland. 2000. CENP-E as an essential component of the mitotic checkpoint in vitro. Cell. 102:817-26.

Abrieu, A., L. Magnaghi-Jaulin, J.A. Kahana, M. Peter, A. Castro, S. Vigneron, T. Lorca, D.W. Cleveland, and J.C. Labbe. 2001. Mps1 is a kinetochore-associated kinase essential for the vertebrate mitotic checkpoint. Cell. 106:83-93.

Adams, R.R., H. Maiato, W.C. Earnshaw, and M. Carmena. 2001. 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. 153:865-80.

Ahonen, L.J., M.J. Kallio, J.R. Daum, M. Bolton, I.A. Manke, M.B. Yaffe, P.T. Stukenberg, and G.J. Gorbsky. 2005. Polo-like kinase 1 creates the tension-sensing 3F3/2 phosphoepitope and modulates the association of spindle-checkpoint proteins at kinetochores. Curr Biol. 15:1078-89.

Amano, M., A. Suzuki, T. Hori, C. Backer, K. Okawa, I.M. Cheeseman, and T. Fukagawa. 2009. The CENP-S complex is essential for the stable assembly of outer kinetochore structure. J Cell Biol. 186:173-82.

Andrews, P.D., Y. Ovechkina, N. Morrice, M. Wagenbach, K. Duncan, L. Wordeman, and J.R. Swedlow. 2004. Aurora B regulates MCAK at the mitotic centromere. Dev Cell. 6:253-68.

Anjum, R., and J. Blenis. 2008. The RSK family of kinases: emerging roles in cellular signalling. Nat Rev Mol Cell Biol. 9:747-58.

Archambault, V., and D.M. Glover. 2009. Polo-like kinases: conservation and divergence in their functions and regulation. Nat Rev Mol Cell Biol. 10:265-75.

Atherton-Fessler, S., L.L. Parker, R.L. Geahlen, and H. Piwnica-Worms. 1993. Mechanisms of p34cdc2 regulation. Mol Cell Biol. 13:1675-85.

Azzam, R., S.L. Chen, W. Shou, A.S. Mah, G. Alexandru, K. Nasmyth, R.S. Annan, S.A. Carr, and R.J. Deshaies. 2004. Phosphorylation by cyclin B-Cdk underlies release of mitotic exit activator Cdc14 from the nucleolus. Science. 305:516-9.

Baldin, V., and B. Ducommun. 1995. Subcellular localisation of human wee1 kinase is regulated during the cell cycle. J Cell Sci. 108 (Pt 6):2425-32.

Baldin, V., J. Lukas, M.J. Marcote, M. Pagano, and G. Draetta. 1993. Cyclin D1 is a nuclear protein required for cell cycle progression in G1. Genes Dev. 7:812-21.

Bardin, A.J., and A. Amon. 2001. Men and sin: what's the difference? Nat Rev Mol Cell Biol. 2:815-26.

Basto, R., R. Gomes, and R.E. Karess. 2000. Rough deal and Zw10 are required for the metaphase checkpoint in Drosophila. Nat Cell Biol. 2:939-43.

Berdougo, E., M.V. Nachury, P.K. Jackson, and P.V. Jallepalli. 2008. The nucleolar phosphatase Cdc14B is dispensable for chromosome segregation and mitotic exit in human cells. Cell Cycle. 7:1184-90.

Berns, K., E.M. Hijmans, J. Mullenders, T.R. Brummelkamp, A. Velds, M. Heimerikx, R.M. Kerkhoven, M. Madiredjo, W. Nijkamp, B. Weigelt, R. Agami, W. Ge, G. Cavet, P.S. Linsley, R.L. Beijersbergen, and R. Bernards. 2004. A large-scale

RNAi screen in human cells identifies new components of the p53 pathway. Nature. 428:431-7.
Bettencourt-Dias, M., R. Giet, R. Sinka, A. Mazumdar, W.G. Lock, F. Balloux, P.J. Zafiropoulos, S. Yamaguchi, S. Winter, R.W. Carthew, M. Cooper, D. Jones, L. Frenz, and D.M. Glover. 2004. Genome-wide survey of protein kinases required for cell cycle progression. Nature. 432:980-7.
Bhatt, R.R., and J.E. Ferrell, Jr. 1999. The protein kinase p90 rsk as an essential mediator of cytostatic factor activity. Science. 286:1362-5.
Biggins, S., and C.E. Walczak. 2003. Captivating capture: how microtubules attach to kinetochores. Curr Biol. 13:R449-60.
Bignone, P.A., K.Y. Lee, Y. Liu, G. Emilion, J. Finch, A.E. Soosay, F.M. Charnock, S. Beck, I. Dunham, A.J. Mungall, and T.S. Ganesan. 2007. RPS6KA2, a putative tumour suppressor gene at 6q27 in sporadic epithelial ovarian cancer. Oncogene. 26:683-700.
Bjorbaek, C., Y. Zhao, and D.E. Moller. 1995. Divergent functional roles for p90rsk kinase domains. J Biol Chem. 270:18848-52.
Blenis, J., and R.L. Erikson. 1984. Phosphorylation of the ribosomal protein S6 is elevated in cells transformed by a variety of tumor viruses. J Virol. 50:966-9.
Bollen, M., D.W. Gerlich, and B. Lesage. 2009. Mitotic phosphatases: from entry guards to exit guides. Trends Cell Biol. 19:531-41.
Booher, D.L. 1992. When and why to consider estrogen therapy. Cleve Clin J Med. 59:345-7.
Boutros, R., C. Dozier, and B. Ducommun. 2006. The when and wheres of CDC25 phosphatases. Curr Opin Cell Biol. 18:185-91.
Brady, D.M., and K.G. Hardwick. 2000. Complex formation between Mad1p, Bub1p and Bub3p is crucial for spindle checkpoint function. Curr Biol. 10:675-8.
Burgess, A., S. Vigneron, E. Brioudes, J.C. Labbe, T. Lorca, and A. Castro. Loss of human Greatwall results in G2 arrest and multiple mitotic defects due to deregulation of the cyclin B-Cdc2/PP2A balance. Proc Natl Acad Sci U S A. 107:12564-9.
Campbell, L., and K.G. Hardwick. 2003. Analysis of Bub3 spindle checkpoint function in Xenopus egg extracts. J Cell Sci. 116:617-28.
Campbell, M.S., and G.J. Gorbsky. 1995. Microinjection of mitotic cells with the 3F3/2 anti-phosphoepitope antibody delays the onset of anaphase. J Cell Biol. 129:1195-204.
Carriere, A., H. Ray, J. Blenis, and P.P. Roux. 2008. The RSK factors of activating the Ras/MAPK signaling cascade. Front Biosci. 13:4258-75.
Carroll, C.W., M.C. Silva, K.M. Godek, L.E. Jansen, and A.F. Straight. 2009. Centromere assembly requires the direct recognition of CENP-A nucleosomes by CENP-N. Nat Cell Biol. 11:896-902.
Castilho, P.V., B.C. Williams, S. Mochida, Y. Zhao, and M.L. Goldberg. 2009. The M phase kinase Greatwall (Gwl) promotes inactivation of PP2A/B55delta, a phosphatase directed against CDK phosphosites. Mol Biol Cell. 20:4777-89.
Castro, A., C. Bernis, S. Vigneron, J.C. Labbe, and T. Lorca. 2005. The anaphase-promoting complex: a key factor in the regulation of cell cycle. Oncogene. 24:314-25.
Castro, A., M. Peter, L. Magnaghi-Jaulin, S. Vigneron, S. Galas, T. Lorca, and J.C. Labbe. 2001. Cyclin B/cdc2 induces c-Mos stability by direct phosphorylation in Xenopus oocytes. Mol Biol Cell. 12:2660-71.

Chan, G.K., S.A. Jablonski, D.A. Starr, M.L. Goldberg, and T.J. Yen. 2000. Human Zw10 and ROD are mitotic checkpoint proteins that bind to kinetochores. Nat Cell Biol. 2:944-7.

Chan, G.K., S.A. Jablonski, V. Sudakin, J.C. Hittle, and T.J. Yen. 1999. Human BUBR1 is a mitotic checkpoint kinase that monitors CENP-E functions at kinetochores and binds the cyclosome/APC. J Cell Biol. 146:941-54.

Chan, G.K., and T.J. Yen. 2003. The mitotic checkpoint: a signaling pathway that allows a single unattached kinetochore to inhibit mitotic exit. Prog Cell Cycle Res. 5:431-9.

Chang, D.C., N. Xu, and K.Q. Luo. 2003. Degradation of cyclin B is required for the onset of anaphase in Mammalian cells. J Biol Chem. 278:37865-73.

Cheeseman, I.M., J.S. Chappie, E.M. Wilson-Kubalek, and A. Desai. 2006. The conserved KMN network constitutes the core microtubule-binding site of the kinetochore. Cell. 127:983-97.

Cheeseman, I.M., and A. Desai. 2008. Molecular architecture of the kinetochore-microtubule interface. Nat Rev Mol Cell Biol. 9:33-46.

Cheeseman, I.M., S. Niessen, S. Anderson, F. Hyndman, J.R. Yates, 3rd, K. Oegema, and A. Desai. 2004. A conserved protein network controls assembly of the outer kinetochore and its ability to sustain tension. Genes Dev. 18:2255-68.

Chen, R.H. 2002. BubR1 is essential for kinetochore localization of other spindle checkpoint proteins and its phosphorylation requires Mad1. J Cell Biol. 158:487-96.

Chen, R.H., C. Sarnecki, and J. Blenis. 1992. Nuclear localization and regulation of erk- and rsk-encoded protein kinases. Mol Cell Biol. 12:915-27.

Chen, R.H., A. Shevchenko, M. Mann, and A.W. Murray. 1998. Spindle checkpoint protein Xmad1 recruits Xmad2 to unattached kinetochores. J Cell Biol. 143:283-95.

Cho, H.P., Y. Liu, M. Gomez, J. Dunlap, M. Tyers, and Y. Wang. 2005. The dual-specificity phosphatase CDC14B bundles and stabilizes microtubules. Mol Cell Biol. 25:4541-51.

Cimini, D., B. Moree, J.C. Canman, and E.D. Salmon. 2003. Merotelic kinetochore orientation occurs frequently during early mitosis in mammalian tissue cells and error correction is achieved by two different mechanisms. J Cell Sci. 116:4213-25.

Clark, D.E., T.M. Errington, J.A. Smith, H.F. Frierson, Jr., M.J. Weber, and D.A. Lannigan. 2005. The serine/threonine protein kinase, p90 ribosomal S6 kinase, is an important regulator of prostate cancer cell proliferation. Cancer Res. 65:3108-16.

Clarke, P.R., S.R. Siddhanti, P. Cohen, and P.J. Blackshear. 1993. Okadaic acid-sensitive protein phosphatases dephosphorylate MARCKS, a major protein kinase C substrate. FEBS Lett. 336:37-42.

Cleveland, D.W., Y. Mao, and K.F. Sullivan. 2003. Centromeres and kinetochores: from epigenetics to mitotic checkpoint signaling. Cell. 112:407-21.

Colledge, W.H., M.B. Carlton, G.B. Udy, and M.J. Evans. 1994. Disruption of c-mos causes parthenogenetic development of unfertilized mouse eggs. Nature. 370:65-8.

D'Amours, D., and A. Amon. 2004. At the interface between signaling and executing anaphase--Cdc14 and the FEAR network. Genes Dev. 18:2581-95.

D'Angiolella, V., L. Palazzo, C. Santarpia, V. Costanzo, and D. Grieco. 2007. Role for non-proteolytic control of M-phase-promoting factor activity at M-phase exit. PLoS One. 2:e247.

Dalby, K.N., N. Morrice, F.B. Caudwell, J. Avruch, and P. Cohen. 1998. Identification of regulatory phosphorylation sites in mitogen-activated protein kinase (MAPK)-activated protein kinase-1a/p90rsk that are inducible by MAPK. J Biol Chem. 273:1496-505.

De Antoni, A., C.G. Pearson, D. Cimini, J.C. Canman, V. Sala, L. Nezi, M. Mapelli, L. Sironi, M. Faretta, E.D. Salmon, and A. Musacchio. 2005. The Mad1/Mad2 complex as a template for Mad2 activation in the spindle assembly checkpoint. Curr Biol. 15:214-25.

De Souza, C.P., K.A. Ellem, and B.G. Gabrielli. 2000. Centrosomal and cytoplasmic Cdc2/cyclin B1 activation precedes nuclear mitotic events. Exp Cell Res. 257:11-21.

DeLuca, J.G., B. Moree, J.M. Hickey, J.V. Kilmartin, and E.D. Salmon. 2002. hNuf2 inhibition blocks stable kinetochore-microtubule attachment and induces mitotic cell death in HeLa cells. J Cell Biol. 159:549-55.

den Elzen, N., and J. Pines. 2001. Cyclin A is destroyed in prometaphase and can delay chromosome alignment and anaphase. J Cell Biol. 153:121-36.

Devault, A., A.M. Martinez, D. Fesquet, J.C. Labbe, N. Morin, J.P. Tassan, E.A. Nigg, J.C. Cavadore, and M. Doree. 1995. MAT1 ('menage a trois') a new RING finger protein subunit stabilizing cyclin H-cdk7 complexes in starfish and Xenopus CAK. EMBO J. 14:5027-36.

Diaz-Martinez, L.A., J.F. Gimenez-Abian, and D.J. Clarke. 2007. Cohesin is dispensable for centromere cohesion in human cells. PLoS One. 2:e318.

Ditchfield, C., V.L. Johnson, A. Tighe, R. Ellston, C. Haworth, T. Johnson, A. Mortlock, N. Keen, and S.S. Taylor. 2003. Aurora B couples chromosome alignment with anaphase by targeting BubR1, Mad2, and Cenp-E to kinetochores. J Cell Biol. 161:267-80.

Dong, Y., K.J. Vanden Beldt, X. Meng, A. Khodjakov, and B.F. McEwen. 2007. The outer plate in vertebrate kinetochores is a flexible network with multiple microtubule interactions. Nat Cell Biol. 9:516-22.

Draviam, V.M., S. Orrechia, M. Lowe, R. Pardi, and J. Pines. 2001. The localization of human cyclins B1 and B2 determines CDK1 substrate specificity and neither enzyme requires MEK to disassemble the Golgi apparatus. J Cell Biol. 152:945-58.

Dulic, V., E. Lees, and S.I. Reed. 1992. Association of human cyclin E with a periodic G1-S phase protein kinase. Science. 257:1958-61.

Dumont, J.N. 1972. Oogenesis in Xenopus laevis (Daudin). I. Stages of oocyte development in laboratory maintained animals. J Morphol. 136:153-79.

Dunphy, W.G., and A. Kumagai. 1991. The cdc25 protein contains an intrinsic phosphatase activity. Cell. 67:189-96.

Dupre, A., C. Jessus, R. Ozon, and O. Haccard. 2002. Mos is not required for the initiation of meiotic maturation in Xenopus oocytes. EMBO J. 21:4026-36.

Echeverri, C.J., B.M. Paschal, K.T. Vaughan, and R.B. Vallee. 1996. Molecular characterization of the 50-kD subunit of dynactin reveals function for the complex in chromosome alignment and spindle organization during mitosis. J Cell Biol. 132:617-33.

Eggert, U.S., T.J. Mitchison, and C.M. Field. 2006. Animal cytokinesis: from parts list to mechanisms. Annu Rev Biochem. 75:543-66.
Elia, A.E., P. Rellos, L.F. Haire, J.W. Chao, F.J. Ivins, K. Hoepker, D. Mohammad, L.C. Cantley, S.J. Smerdon, and M.B. Yaffe. 2003. The molecular basis for phosphodependent substrate targeting and regulation of Plks by the Polo-box domain. Cell. 115:83-95.
Emanuele, M.J., M.L. McCleland, D.L. Satinover, and P.T. Stukenberg. 2005. Measuring the stoichiometry and physical interactions between components elucidates the architecture of the vertebrate kinetochore. Mol Biol Cell. 16:4882-92.
Endicott, J.A., P. Nurse, and L.N. Johnson. 1994. Mutational analysis supports a structural model for the cell cycle protein kinase p34. Protein Eng. 7:243-53.
Erikson, E., and J.L. Maller. 1985. A protein kinase from Xenopus eggs specific for ribosomal protein S6. Proc Natl Acad Sci U S A. 82:742-6.
Esteban, V., M.D. Vazquez-Novelle, E. Calvo, A. Bueno, and M.P. Sacristan. 2006. Human Cdc14A reverses CDK1 phosphorylation of Cdc25A on serines 115 and 320. Cell Cycle. 5:2894-8.
Fang, G. 2002. Checkpoint protein BubR1 acts synergistically with Mad2 to inhibit anaphase-promoting complex. Mol Biol Cell. 13:755-66.
Fang, G., H. Yu, and M.W. Kirschner. 1998. The checkpoint protein MAD2 and the mitotic regulator CDC20 form a ternary complex with the anaphase-promoting complex to control anaphase initiation. Genes Dev. 12:1871-83.
Fattaey, A., and R.N. Booher. 1997. Myt1: a Wee1-type kinase that phosphorylates Cdc2 on residue Thr14. Prog Cell Cycle Res. 3:233-40.
Faulkner, N.E., D.L. Dujardin, C.Y. Tai, K.T. Vaughan, C.B. O'Connell, Y. Wang, and R.B. Vallee. 2000. A role for the lissencephaly gene LIS1 in mitosis and cytoplasmic dynein function. Nat Cell Biol. 2:784-91.
Felix, M.A., P. Cohen, and E. Karsenti. 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. 9:675-83.
Ferguson, A.M., L.S. White, P.J. Donovan, and H. Piwnica-Worms. 2005. Normal cell cycle and checkpoint responses in mice and cells lacking Cdc25B and Cdc25C protein phosphatases. Mol Cell Biol. 25:2853-60.
Fernandez, A., D.L. Brautigan, and N.J. Lamb. 1992. Protein phosphatase type 1 in mammalian cell mitosis: chromosomal localization and involvement in mitotic exit. J Cell Biol. 116:1421-30.
Fesquet, D., N. Morin, M. Doree, and A. Devault. 1997. Is Cdk7/cyclin H/MAT1 the genuine cdk activating kinase in cycling Xenopus egg extracts? Oncogene. 15:1303-7.
Fisher, R.P., and D.O. Morgan. 1994. A novel cyclin associates with MO15/CDK7 to form the CDK-activating kinase. Cell. 78:713-24.
Fisher, T.L., and J. Blenis. 1996. Evidence for two catalytically active kinase domains in pp90rsk. Mol Cell Biol. 16:1212-9.
Forester, C.M., J. Maddox, J.V. Louis, J. Goris, and D.M. Virshup. 2007. Control of mitotic exit by PP2A regulation of Cdc25C and Cdk1. Proc Natl Acad Sci U S A. 104:19867-72.
Fraschini, R., A. Beretta, L. Sironi, A. Musacchio, G. Lucchini, and S. Piatti. 2001. Bub3 interaction with Mad2, Mad3 and Cdc20 is mediated by WD40 repeats and does not require intact kinetochores. EMBO J. 20:6648-59.

Frodin, M., T.L. Antal, B.A. Dummler, C.J. Jensen, M. Deak, S. Gammeltoft, and R.M. Biondi. 2002. A phosphoserine/threonine-binding pocket in AGC kinases and PDK1 mediates activation by hydrophobic motif phosphorylation. EMBO J. 21:5396-407.

Fujita, N., S. Sato, and T. Tsuruo. 2003. Phosphorylation of p27Kip1 at threonine 198 by p90 ribosomal protein S6 kinases promotes its binding to 14-3-3 and cytoplasmic localization. J Biol Chem. 278:49254-60.

Gandhi, M.J., C.L. Cummings, and J.G. Drachman. 2003. FLJ14813 missense mutation: a candidate for autosomal dominant thrombocytopenia on human chromosome 10. Hum Hered. 55:66-70.

Gautier, J., C. Norbury, M. Lohka, P. Nurse, and J. Maller. 1988. Purified maturation-promoting factor contains the product of a Xenopus homolog of the fission yeast cell cycle control gene cdc2+. Cell. 54:433-9.

Gautier, J., M.J. Solomon, R.N. Booher, J.F. Bazan, and M.W. Kirschner. 1991. cdc25 is a specific tyrosine phosphatase that directly activates p34cdc2. Cell. 67:197-211.

Gavet, O., and J. Pines. Activation of cyclin B1-Cdk1 synchronizes events in the nucleus and the cytoplasm at mitosis. J Cell Biol. 189:247-59.

Geley, S., E. Kramer, C. Gieffers, J. Gannon, J.M. Peters, and T. Hunt. 2001. Anaphase-promoting complex/cyclosome-dependent proteolysis of human cyclin A starts at the beginning of mitosis and is not subject to the spindle assembly checkpoint. J Cell Biol. 153:137-48.

Gimenez-Abian, J.F., L.A. Diaz-Martinez, K.G. Wirth, C.A. Andrews, G. Gimenez-Martin, and D.J. Clarke. 2005. Regulated separation of sister centromeres depends on the spindle assembly checkpoint but not on the anaphase promoting complex/cyclosome. Cell Cycle. 4:1561-75.

Glotzer, M., A.W. Murray, and M.W. Kirschner. 1991. Cyclin is degraded by the ubiquitin pathway. Nature. 349:132-8.

Gorbsky, G.J., R.H. Chen, and A.W. Murray. 1998. Microinjection of antibody to Mad2 protein into mammalian cells in mitosis induces premature anaphase. J Cell Biol. 141:1193-205.

Gorbsky, G.J., and W.A. Ricketts. 1993. Differential expression of a phosphoepitope at the kinetochores of moving chromosomes. J Cell Biol. 122:1311-21.

Goris, J., J. Hermann, P. Hendrix, R. Ozon, and W. Merlevede. 1989. Okadaic acid, a specific protein phosphatase inhibitor, induces maturation and MPF formation in Xenopus laevis oocytes. FEBS Lett. 245:91-4.

Gorr, I.H., D. Boos, and O. Stemmann. 2005. Mutual inhibition of separase and Cdk1 by two-step complex formation. Mol Cell. 19:135-41.

Goshima, G., and A. Kimura. New look inside the spindle: microtubule-dependent microtubule generation within the spindle. Curr Opin Cell Biol. 22:44-9.

Gray, C.H., and D. Barford. 2003. Getting in the ring: proline-directed substrate specificity in the cell cycle proteins Cdc14 and CDK2-cyclinA3. Cell Cycle. 2:500-2.

Gross, S.D., M.S. Schwab, A.L. Lewellyn, and J.L. Maller. 1999. Induction of metaphase arrest in cleaving Xenopus embryos by the protein kinase p90Rsk. Science. 286:1365-7.

Gross, S.D., M.S. Schwab, F.E. Taieb, A.L. Lewellyn, Y.W. Qian, and J.L. Maller. 2000. The critical role of the MAP kinase pathway in meiosis II in Xenopus oocytes is mediated by p90(Rsk). Curr Biol. 10:430-8.

Guadagno, T.M., and J.W. Newport. 1996. Cdk2 kinase is required for entry into mitosis as a positive regulator of Cdc2-cyclin B kinase activity. Cell. 84:73-82.

Haccard, O., and C. Jessus. 2006. Oocyte maturation, Mos and cyclins--a matter of synthesis: two functionally redundant ways to induce meiotic maturation. Cell Cycle. 5:1152-9.

Haccard, O., B. Sarcevic, A. Lewellyn, R. Hartley, L. Roy, T. Izumi, E. Erikson, and J.L. Maller. 1993. Induction of metaphase arrest in cleaving Xenopus embryos by MAP kinase. Science. 262:1262-5.

Haering, C.H., J. Lowe, A. Hochwagen, and K. Nasmyth. 2002. Molecular architecture of SMC proteins and the yeast cohesin complex. Mol Cell. 9:773-88.

Hagting, A., N. Den Elzen, H.C. Vodermaier, I.C. Waizenegger, J.M. Peters, and J. Pines. 2002. Human securin proteolysis is controlled by the spindle checkpoint and reveals when the APC/C switches from activation by Cdc20 to Cdh1. J Cell Biol. 157:1125-37.

Hagting, A., M. Jackman, K. Simpson, and J. Pines. 1999. Translocation of cyclin B1 to the nucleus at prophase requires a phosphorylation-dependent nuclear import signal. Curr Biol. 9:680-9.

Hagting, A., C. Karlsson, P. Clute, M. Jackman, and J. Pines. 1998. MPF localization is controlled by nuclear export. EMBO J. 17:4127-38.

Hanks, S.K., and T. Hunter. 1995. Protein kinases 6. The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification. FASEB J. 9:576-96.

Hansen, D.V., J.R. Pomerening, M.K. Summers, J.J. Miller, J.E. Ferrell, Jr., and P.K. Jackson. 2007. Emi2 at the crossroads: where CSF meets MPF. Cell Cycle. 6:732-8.

Hansen, D.V., J.J. Tung, and P.K. Jackson. 2006. CaMKII and polo-like kinase 1 sequentially phosphorylate the cytostatic factor Emi2/XErp1 to trigger its destruction and meiotic exit. Proc Natl Acad Sci U S A. 103:608-13.

Hardwick, K.G., R.C. Johnston, D.L. Smith, and A.W. Murray. 2000. MAD3 encodes a novel component of the spindle checkpoint which interacts with Bub3p, Cdc20p, and Mad2p. J Cell Biol. 148:871-82.

Hartwell, L.H., and T.A. Weinert. 1989. Checkpoints: controls that ensure the order of cell cycle events. Science. 246:629-34.

Hashimoto, N., N. Watanabe, Y. Furuta, H. Tamemoto, N. Sagata, M. Yokoyama, K. Okazaki, M. Nagayoshi, N. Takeda, Y. Ikawa, and et al. 1994. Parthenogenetic activation of oocytes in c-mos-deficient mice. Nature. 370:68-71.

Hauf, S., R.W. Cole, S. LaTerra, C. Zimmer, G. Schnapp, R. Walter, A. Heckel, J. van Meel, C.L. Rieder, and J.M. Peters. 2003. The small molecule Hesperadin reveals a role for Aurora B in correcting kinetochore-microtubule attachment and in maintaining the spindle assembly checkpoint. J Cell Biol. 161:281-94.

Hauge, C., T.L. Antal, D. Hirschberg, U. Doehn, K. Thorup, L. Idrissova, K. Hansen, O.N. Jensen, T.J. Jorgensen, R.M. Biondi, and M. Frodin. 2007. Mechanism for activation of the growth factor-activated AGC kinases by turn motif phosphorylation. EMBO J. 26:2251-61.

Heald, R., M. McLoughlin, and F. McKeon. 1993. Human wee1 maintains mitotic timing by protecting the nucleus from cytoplasmically activated Cdc2 kinase. Cell. 74:463-74.

Heald, R., R. Tournebize, T. Blank, R. Sandaltzopoulos, P. Becker, A. Hyman, and E. Karsenti. 1996. Self-organization of microtubules into bipolar spindles around artificial chromosomes in Xenopus egg extracts. Nature. 382:420-5.

Hewitt, L., A. Tighe, S. Santaguida, A.M. White, C.D. Jones, A. Musacchio, S. Green, and S.S. Taylor. Sustained Mps1 activity is required in mitosis to recruit O-Mad2 to the Mad1-C-Mad2 core complex. J Cell Biol. 190:25-34.

Hinchcliffe, E.H., F.J. Miller, M. Cham, A. Khodjakov, and G. Sluder. 2001. Requirement of a centrosomal activity for cell cycle progression through G1 into S phase. Science. 291:1547-50.

Hisamoto, N., K. Sugimoto, and K. Matsumoto. 1994. The Glc7 type 1 protein phosphatase of Saccharomyces cerevisiae is required for cell cycle progression in G2/M. Mol Cell Biol. 14:3158-65.

Hoffman, D.B., C.G. Pearson, T.J. Yen, B.J. Howell, and E.D. Salmon. 2001. Microtubule-dependent changes in assembly of microtubule motor proteins and mitotic spindle checkpoint proteins at PtK1 kinetochores. Mol Biol Cell. 12:1995-2009.

Hoffmann, I., P.R. Clarke, M.J. Marcote, E. Karsenti, and G. Draetta. 1993. Phosphorylation and activation of human cdc25-C by cdc2--cyclin B and its involvement in the self-amplification of MPF at mitosis. EMBO J. 12:53-63.

Hoffmann, I., and E. Karsenti. 1994. The role of cdc25 in checkpoints and feedback controls in the eukaryotic cell cycle. J Cell Sci Suppl. 18:75-9.

Holland, A.J., F. Bottger, O. Stemmann, and S.S. Taylor. 2007. Protein phosphatase 2A and separase form a complex regulated by separase autocleavage. J Biol Chem. 282:24623-32.

Holland, A.J., and S.S. Taylor. 2006. Cyclin-B1-mediated inhibition of excess separase is required for timely chromosome disjunction. J Cell Sci. 119:3325-36.

Holloway, S.L., M. Glotzer, R.W. King, and A.W. Murray. 1993. Anaphase is initiated by proteolysis rather than by the inactivation of maturation-promoting factor. Cell. 73:1393-402.

Holt, L.J., A.N. Krutchinsky, and D.O. Morgan. 2008. Positive feedback sharpens the anaphase switch. Nature. 454:353-7.

Honda, R., R. Korner, and E.A. Nigg. 2003. Exploring the functional interactions between Aurora B, INCENP, and survivin in mitosis. Mol Biol Cell. 14:3325-41.

Hoque, M.T., and F. Ishikawa. 2002. Cohesin defects lead to premature sister chromatid separation, kinetochore dysfunction, and spindle-assembly checkpoint activation. J Biol Chem. 277:42306-14.

Hori, T., T. Haraguchi, Y. Hiraoka, H. Kimura, and T. Fukagawa. 2003. Dynamic behavior of Nuf2-Hec1 complex that localizes to the centrosome and centromere and is essential for mitotic progression in vertebrate cells. J Cell Sci. 116:3347-62.

Hornig, N.C., P.P. Knowles, N.Q. McDonald, and F. Uhlmann. 2002. The dual mechanism of separase regulation by securin. Curr Biol. 12:973-82.

Howell, B.J., B.F. McEwen, J.C. Canman, D.B. Hoffman, E.M. Farrar, C.L. Rieder, and E.D. Salmon. 2001. Cytoplasmic dynein/dynactin drives kinetochore protein transport to the spindle poles and has a role in mitotic spindle checkpoint inactivation. J Cell Biol. 155:1159-72.

Howell, B.J., B. Moree, E.M. Farrar, S. Stewart, G. Fang, and E.D. Salmon. 2004. Spindle checkpoint protein dynamics at kinetochores in living cells. Curr Biol. 14:953-64.

Hoyt, M.A., L. Totis, and B.T. Roberts. 1991. S. cerevisiae genes required for cell cycle arrest in response to loss of microtubule function. Cell. 66:507-17.

Huse, M., and J. Kuriyan. 2002. The conformational plasticity of protein kinases. Cell. 109:275-82.

Inoue, D., M. Ohe, Y. Kanemori, T. Nobui, and N. Sagata. 2007. A direct link of the Mos-MAPK pathway to Erp1/Emi2 in meiotic arrest of Xenopus laevis eggs. Nature. 446:1100-4.

Irniger, S., S. Piatti, C. Michaelis, and K. Nasmyth. 1995. Genes involved in sister chromatid separation are needed for B-type cyclin proteolysis in budding yeast. Cell. 81:269-78.

Ishii, K., K. Kumada, T. Toda, and M. Yanagida. 1996. Requirement for PP1 phosphatase and 20S cyclosome/APC for the onset of anaphase is lessened by the dosage increase of a novel gene sds23+. EMBO J. 15:6629-40.

Iwashita, J., H. Shima, M. Nagao, and N. Sagata. 1997. cDNA cloning of a novel B subunit of Xenopus protein phosphatase 2A and its biological activity in oocytes. Biochem Biophys Res Commun. 232:218-22.

Izumi, T., D.H. Walker, and J.L. Maller. 1992. Periodic changes in phosphorylation of the Xenopus cdc25 phosphatase regulate its activity. Mol Biol Cell. 3:927-39.

Jackman, M., M. Firth, and J. Pines. 1995. Human cyclins B1 and B2 are localized to strikingly different structures: B1 to microtubules, B2 primarily to the Golgi apparatus. EMBO J. 14:1646-54.

Jackman, M., C. Lindon, E.A. Nigg, and J. Pines. 2003. Active cyclin B1-Cdk1 first appears on centrosomes in prophase. Nat Cell Biol. 5:143-8.

Jackson, P.K., A.G. Eldridge, E. Freed, L. Furstenthal, J.Y. Hsu, B.K. Kaiser, and J.D. Reimann. 2000. The lore of the RINGs: substrate recognition and catalysis by ubiquitin ligases. Trends Cell Biol. 10:429-39.

Jager, H., A. Herzig, C.F. Lehner, and S. Heidmann. 2001. Drosophila separase is required for sister chromatid separation and binds to PIM and THR. Genes Dev. 15:2572-84.

Jallepalli, P.V., I.C. Waizenegger, F. Bunz, S. Langer, M.R. Speicher, J.M. Peters, K.W. Kinzler, B. Vogelstein, and C. Lengauer. 2001. Securin is required for chromosomal stability in human cells. Cell. 105:445-57.

Janssens, V., and J. Goris. 2001. Protein phosphatase 2A: a highly regulated family of serine/threonine phosphatases implicated in cell growth and signalling. Biochem J. 353:417-39.

Jaspersen, S.L., J.F. Charles, R.L. Tinker-Kulberg, and D.O. Morgan. 1998. A late mitotic regulatory network controlling cyclin destruction in Saccharomyces cerevisiae. Mol Biol Cell. 9:2803-17.

Jelluma, N., A.B. Brenkman, N.J. van den Broek, C.W. Cruijsen, M.H. van Osch, S.M. Lens, R.H. Medema, and G.J. Kops. 2008. Mps1 phosphorylates Borealin to control Aurora B activity and chromosome alignment. Cell. 132:233-46.

Jensen, C.J., M.B. Buch, T.O. Krag, B.A. Hemmings, S. Gammeltoft, and M. Frodin. 1999. 90-kDa ribosomal S6 kinase is phosphorylated and activated by 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1. J Biol Chem. 274:27168-76.

Jin, J., and J.W. Harper. 2002. RING finger specificity in SCF-driven protein destruction. Dev Cell. 2:685-7.

Jinno, S., K. Suto, A. Nagata, M. Igarashi, Y. Kanaoka, H. Nojima, and H. Okayama. 1994. Cdc25A is a novel phosphatase functioning early in the cell cycle. EMBO J. 13:1549-56.

Johnson, H.J., M.J. Gandhi, E. Shafizadeh, N.B. Langer, E.L. Pierce, B.H. Paw, D.M. Gilligan, and J.G. Drachman. 2009. In vivo inactivation of MASTL kinase results in thrombocytopenia. Exp Hematol. 37:901-8.

Johnson, V.L., M.I. Scott, S.V. Holt, D. Hussein, and S.S. Taylor. 2004. Bub1 is required for kinetochore localization of BubR1, Cenp-E, Cenp-F and Mad2, and chromosome congression. J Cell Sci. 117:1577-89.

Jones, S.W., E. Erikson, J. Blenis, J.L. Maller, and R.L. Erikson. 1988. A Xenopus ribosomal protein S6 kinase has two apparent kinase domains that are each similar to distinct protein kinases. Proc Natl Acad Sci U S A. 85:3377-81.

Kaiser, B.K., Z.A. Zimmerman, H. Charbonneau, and P.K. Jackson. 2002. Disruption of centrosome structure, chromosome segregation, and cytokinesis by misexpression of human Cdc14A phosphatase. Mol Biol Cell. 13:2289-300.

Kalab, P., A. Pralle, E.Y. Isacoff, R. Heald, and K. Weis. 2006. Analysis of a RanGTP-regulated gradient in mitotic somatic cells. Nature. 440:697-701.

Kallio, M.J., V.A. Beardmore, J. Weinstein, and G.J. Gorbsky. 2002. Rapid microtubule-independent dynamics of Cdc20 at kinetochores and centrosomes in mammalian cells. J Cell Biol. 158:841-7.

Kannan, N., N. Haste, S.S. Taylor, and A.F. Neuwald. 2007. The hallmark of AGC kinase functional divergence is its C-terminal tail, a cis-acting regulatory module. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 104:1272-1277.

Kapoor, T.M., M.A. Lampson, P. Hergert, L. Cameron, D. Cimini, E.D. Salmon, B.F. McEwen, and A. Khodjakov. 2006. Chromosomes can congress to the metaphase plate before biorientation. Science. 311:388-91.

Kapoor, T.M., T.U. Mayer, M.L. Coughlin, and T.J. Mitchison. 2000. Probing spindle assembly mechanisms with monastrol, a small molecule inhibitor of the mitotic kinesin, Eg5. J Cell Biol. 150:975-88.

Karaiskou, A., X. Cayla, O. Haccard, C. Jessus, and R. Ozon. 1998. MPF amplification in Xenopus oocyte extracts depends on a two-step activation of cdc25 phosphatase. Exp Cell Res. 244:491-500.

Karaiskou, A., C. Jessus, T. Brassac, and R. Ozon. 1999. Phosphatase 2A and polo kinase, two antagonistic regulators of cdc25 activation and MPF auto-amplification. J Cell Sci. 112 (Pt 21):3747-56.

Karaiskou, A., A.C. Lepretre, G. Pahlavan, D. Du Pasquier, R. Ozon, and C. Jessus. 2004. Polo-like kinase confers MPF autoamplification competence to growing Xenopus oocytes. Development. 131:1543-52.

Karess, R.E., and D.M. Glover. 1989. rough deal: a gene required for proper mitotic segregation in Drosophila. J Cell Biol. 109:2951-61.

Karlsson, C., S. Katich, A. Hagting, I. Hoffmann, and J. Pines. 1999. Cdc25B and Cdc25C differ markedly in their properties as initiators of mitosis. J Cell Biol. 146:573-84.

Karsenti, E., S. Kobayashi, T. Mitchison, and M. Kirschner. 1984. Role of the centrosome in organizing the interphase microtubule array: properties of cytoplasts containing or lacking centrosomes. J Cell Biol. 98:1763-76.

Khodjakov, A., R.W. Cole, B.R. Oakley, and C.L. Rieder. 2000. Centrosome-independent mitotic spindle formation in vertebrates. Curr Biol. 10:59-67.

Khodjakov, A., L. Copenagle, M.B. Gordon, D.A. Compton, and T.M. Kapoor. 2003. Minus-end capture of preformed kinetochore fibers contributes to spindle morphogenesis. J Cell Biol. 160:671-83.

Kim, S., H. Sun, H.L. Ball, K. Wassmann, X. Luo, and H. Yu. Phosphorylation of the spindle checkpoint protein Mad2 regulates its conformational transition. Proc Natl Acad Sci U S A.

Kim, S.H., D.P. Lin, S. Matsumoto, A. Kitazono, and T. Matsumoto. 1998. Fission yeast Slp1: an effector of the Mad2-dependent spindle checkpoint. Science. 279:1045-7.

King, J.M., and R.B. Nicklas. 2000. Tension on chromosomes increases the number of kinetochore microtubules but only within limits. J Cell Sci. 113 Pt 21:3815-23.

King, R.W., J.M. Peters, S. Tugendreich, M. Rolfe, P. Hieter, and M.W. Kirschner. 1995. A 20S complex containing CDC27 and CDC16 catalyzes the mitosis-specific conjugation of ubiquitin to cyclin B. Cell. 81:279-88.

Kinoshita, N., H. Ohkura, and M. Yanagida. 1990. Distinct, essential roles of type 1 and 2A protein phosphatases in the control of the fission yeast cell division cycle. Cell. 63:405-15.

Kishimoto, T., R. Kuriyama, H. Kondo, and H. Kanatani. 1982. Generality of the action of various maturation-promoting factors. Exp Cell Res. 137:121-6.

Kitajima, T.S., S. Hauf, M. Ohsugi, T. Yamamoto, and Y. Watanabe. 2005. Human Bub1 defines the persistent cohesion site along the mitotic chromosome by affecting Shugoshin localization. Curr Biol. 15:353-9.

Kitajima, T.S., T. Sakuno, K. Ishiguro, S. Iemura, T. Natsume, S.A. Kawashima, and Y. Watanabe. 2006. Shugoshin collaborates with protein phosphatase 2A to protect cohesin. Nature. 441:46-52.

Kline-Smith, S.L., and C.E. Walczak. 2004. Mitotic spindle assembly and chromosome segregation: refocusing on microtubule dynamics. Mol Cell. 15:317-27.

Knapp, D., L. Bhoite, D.J. Stillman, and K. Nasmyth. 1996. The transcription factor Swi5 regulates expression of the cyclin kinase inhibitor p40SIC1. Mol Cell Biol. 16:5701-7.

Koff, A., A. Giordano, D. Desai, K. Yamashita, J.W. Harper, S. Elledge, T. Nishimoto, D.O. Morgan, B.R. Franza, and J.M. Roberts. 1992. Formation and activation of a cyclin E-cdk2 complex during the G1 phase of the human cell cycle. Science. 257:1689-94.

Komander, D., G. Kular, M. Deak, D.R. Alessi, and D.M. van Aalten. 2005. Role of T-loop phosphorylation in PDK1 activation, stability, and substrate binding. J Biol Chem. 280:18797-802.

Kong, M., E.A. Barnes, V. Ollendorff, and D.J. Donoghue. 2000. Cyclin F regulates the nuclear localization of cyclin B1 through a cyclin-cyclin interaction. EMBO J. 19:1378-88.

Kornbluth, S., B. Sebastian, T. Hunter, and J. Newport. 1994. Membrane localization of the kinase which phosphorylates p34cdc2 on threonine 14. Mol Biol Cell. 5:273-82.

Kraft, C., F. Herzog, C. Gieffers, K. Mechtler, A. Hagting, J. Pines, and J.M. Peters. 2003. Mitotic regulation of the human anaphase-promoting complex by phosphorylation. EMBO J. 22:6598-609.

Kremmer, E., K. Ohst, J. Kiefer, N. Brewis, and G. Walter. 1997. Separation of PP2A core enzyme and holoenzyme with monoclonal antibodies against the regulatory A subunit: abundant expression of both forms in cells. Mol Cell Biol. 17:1692-701.

Kulukian, A., J.S. Han, and D.W. Cleveland. 2009. Unattached kinetochores catalyze production of an anaphase inhibitor that requires a Mad2 template to prime Cdc20 for BubR1 binding. Dev Cell. 16:105-17.

Kumagai, A., and W.G. Dunphy. 1991. The cdc25 protein controls tyrosine dephosphorylation of the cdc2 protein in a cell-free system. Cell. 64:903-14.

Kumagai, A., and W.G. Dunphy. 1992. Regulation of the cdc25 protein during the cell cycle in Xenopus extracts. Cell. 70:139-51.

Kumagai, A., and W.G. Dunphy. 1996. Purification and molecular cloning of Plx1, a Cdc25-regulatory kinase from Xenopus egg extracts. Science. 273:1377-80.

Kumagai, A., and W.G. Dunphy. 1999. Binding of 14-3-3 proteins and nuclear export control the intracellular localization of the mitotic inducer Cdc25. Genes Dev. 13:1067-72.

Kumagai, A., P.S. Yakowec, and W.G. Dunphy. 1998. 14-3-3 proteins act as negative regulators of the mitotic inducer Cdc25 in Xenopus egg extracts. Mol Biol Cell. 9:345-54.

Labbe, J.C., J.P. Capony, D. Caput, J.C. Cavadore, J. Derancourt, M. Kaghad, J.M. Lelias, A. Picard, and M. Doree. 1989. MPF from starfish oocytes at first meiotic metaphase is a heterodimer containing one molecule of cdc2 and one molecule of cyclin B. EMBO J. 8:3053-8.

Lampson, M.A., and T.M. Kapoor. 2005. The human mitotic checkpoint protein BubR1 regulates chromosome-spindle attachments. Nat Cell Biol. 7:93-8.

Lampson, M.A., K. Renduchitala, A. Khodjakov, and T.M. Kapoor. 2004. Correcting improper chromosome-spindle attachments during cell division. Nat Cell Biol. 6:232-7.

Landsverk, H.B., M. Kirkhus, M. Bollen, T. Kuntziger, and P. Collas. 2005. PNUTS enhances in vitro chromosome decondensation in a PP1-dependent manner. Biochem J. 390:709-17.

Lee, T.H., M.J. Solomon, M.C. Mumby, and M.W. Kirschner. 1991. INH, a negative regulator of MPF, is a form of protein phosphatase 2A. Cell. 64:415-23.

Lee, T.H., C. Turck, and M.W. Kirschner. 1994. Inhibition of cdc2 activation by INH/PP2A. Mol Biol Cell. 5:323-38.

Lenart, P., M. Petronczki, M. Steegmaier, B. Di Fiore, J.J. Lipp, M. Hoffmann, W.J. Rettig, N. Kraut, and J.M. Peters. 2007. The small-molecule inhibitor BI 2536 reveals novel insights into mitotic roles of polo-like kinase 1. Curr Biol. 17:304-15.

Li, L., B.R. Ernsting, M.J. Wishart, D.L. Lohse, and J.E. Dixon. 1997. A family of putative tumor suppressors is structurally and functionally conserved in humans and yeast. J Biol Chem. 272:29403-6.

Li, R., and A.W. Murray. 1991. Feedback control of mitosis in budding yeast. Cell. 66:519-31.

Li, X., and R.B. Nicklas. 1997. Tension-sensitive kinetochore phosphorylation and the chromosome distribution checkpoint in praying mantid spermatocytes. J Cell Sci. 110 (Pt 5):537-45.

Li, Y., and R. Benezra. 1996. Identification of a human mitotic checkpoint gene: hsMAD2. Science. 274:246-8.

Lindqvist, A., H. Kallstrom, A. Lundgren, E. Barsoum, and C.K. Rosenthal. 2005. Cdc25B cooperates with Cdc25A to induce mitosis but has a unique role in activating cyclin B1-Cdk1 at the centrosome. J Cell Biol. 171:35-45.

Liu, F., J.J. Stanton, Z. Wu, and H. Piwnica-Worms. 1997. The human Myt1 kinase preferentially phosphorylates Cdc2 on threonine 14 and localizes to the endoplasmic reticulum and Golgi complex. Mol Cell Biol. 17:571-83.

Liu, J., and J.L. Maller. 2005. Xenopus Polo-like kinase Plx1: a multifunctional mitotic kinase. Oncogene. 24:238-47.

Liu, S.T., G.K. Chan, J.C. Hittle, G. Fujii, E. Lees, and T.J. Yen. 2003. Human MPS1 kinase is required for mitotic arrest induced by the loss of CENP-E from kinetochores. Mol Biol Cell. 14:1638-51.

Logarinho, E., H. Bousbaa, J.M. Dias, C. Lopes, I. Amorim, A. Antunes-Martins, and C.E. Sunkel. 2004. Different spindle checkpoint proteins monitor microtubule attachment and tension at kinetochores in Drosophila cells. J Cell Sci. 117:1757-71.

Lombillo, V.A., R.J. Stewart, and J.R. McIntosh. 1995. Minus-end-directed motion of kinesin-coated microspheres driven by microtubule depolymerization. Nature. 373:161-4.

Longin, S., K. Zwaenepoel, J.V. Louis, S. Dilworth, J. Goris, and V. Janssens. 2007. Selection of protein phosphatase 2A regulatory subunits is mediated by the C terminus of the catalytic Subunit. J Biol Chem. 282:26971-80.

Lorca, T., C. Bernis, S. Vigneron, A. Burgess, E. Brioudes, J.C. Labbe, and A. Castro. Constant regulation of both the MPF amplification loop and the Greatwall-PP2A pathway is required for metaphase II arrest and correct entry into the first embryonic cell cycle. J Cell Sci. 123:2281-91.

Lorca, T., F.H. Cruzalegui, D. Fesquet, J.C. Cavadore, J. Mery, A. Means, and M. Doree. 1993. Calmodulin-dependent protein kinase II mediates inactivation of MPF and CSF upon fertilization of Xenopus eggs. Nature. 366:270-3.

Lorca, T., S. Galas, D. Fesquet, A. Devault, J.C. Cavadore, and M. Doree. 1991. Degradation of the proto-oncogene product p39mos is not necessary for cyclin proteolysis and exit from meiotic metaphase: requirement for a Ca(2+)-calmodulin dependent event. EMBO J. 10:2087-93.

Losada, A., J.P. Abad, M. Agudo, and A. Villasante. 2000. Long-range analysis of the centromeric region of Drosophila melanogaster chromosome 3. Chromosome Res. 8:651-3.

Lundgren, K., N. Walworth, R. Booher, M. Dembski, M. Kirschner, and D. Beach. 1991. mik1 and wee1 cooperate in the inhibitory tyrosine phosphorylation of cdc2. Cell. 64:1111-22.

Luo, X., Z. Tang, J. Rizo, and H. Yu. 2002. The Mad2 spindle checkpoint protein undergoes similar major conformational changes upon binding to either Mad1 or Cdc20. Mol Cell. 9:59-71.

Luo, X., Z. Tang, G. Xia, K. Wassmann, T. Matsumoto, J. Rizo, and H. Yu. 2004. The Mad2 spindle checkpoint protein has two distinct natively folded states. Nat Struct Mol Biol. 11:338-45.

Maciejowski, J., K.A. George, M.E. Terret, C. Zhang, K.M. Shokat, and P.V. Jallepalli. Mps1 directs the assembly of Cdc20 inhibitory complexes during interphase and mitosis to control M phase timing and spindle checkpoint signaling. J Cell Biol. 190:89-100.

MacKintosh, R.W., G. Haycox, D.G. Hardie, and P.T. Cohen. 1990. Identification by molecular cloning of two cDNA sequences from the plant Brassica napus which are very similar to mammalian protein phosphatases-1 and -2A. FEBS Lett. 276:156-60.

Maiato, H., J. DeLuca, E.D. Salmon, and W.C. Earnshaw. 2004a. The dynamic kinetochore-microtubule interface. J Cell Sci. 117:5461-77.
Maiato, H., C.L. Rieder, and A. Khodjakov. 2004b. Kinetochore-driven formation of kinetochore fibers contributes to spindle assembly during animal mitosis. J Cell Biol. 167:831-40.
Maiato, H., and C.E. Sunkel. 2004. Kinetochore-microtubule interactions during cell division. Chromosome Res. 12:585-97.
Mailand, N., C. Lukas, B.K. Kaiser, P.K. Jackson, J. Bartek, and J. Lukas. 2002. Deregulated human Cdc14A phosphatase disrupts centrosome separation and chromosome segregation. Nat Cell Biol. 4:317-22.
Malureanu, L.A., K.B. Jeganathan, M. Hamada, L. Wasilewski, J. Davenport, and J.M. van Deursen. 2009. BubR1 N terminus acts as a soluble inhibitor of cyclin B degradation by APC/C(Cdc20) in interphase. Dev Cell. 16:118-31.
Manning, G., G.D. Plowman, T. Hunter, and S. Sudarsanam. 2002. Evolution of protein kinase signaling from yeast to man. Trends Biochem Sci. 27:514-20.
Mao, Y., A. Desai, and D.W. Cleveland. 2005. Microtubule capture by CENP-E silences BubR1-dependent mitotic checkpoint signaling. J Cell Biol. 170:873-80.
Maresca, T.J., and E.D. Salmon. 2009. Intrakinetochore stretch is associated with changes in kinetochore phosphorylation and spindle assembly checkpoint activity. J Cell Biol. 184:373-81.
Margolis, S.S., and S. Kornbluth. 2004. When the checkpoints have gone: insights into Cdc25 functional activation. Cell Cycle. 3:425-8.
Margolis, S.S., J.A. Perry, C.M. Forester, L.K. Nutt, Y. Guo, M.J. Jardim, M.J. Thomenius, C.D. Freel, R. Darbandi, J.H. Ahn, J.D. Arroyo, X.F. Wang, S. Shenolikar, A.C. Nairn, W.G. Dunphy, W.C. Hahn, D.M. Virshup, and S. Kornbluth. 2006a. Role for the PP2A/B56delta phosphatase in regulating 14-3-3 release from Cdc25 to control mitosis. Cell. 127:759-73.
Margolis, S.S., J.A. Perry, D.H. Weitzel, C.D. Freel, M. Yoshida, T.A. Haystead, and S. Kornbluth. 2006b. A role for PP1 in the Cdc2/Cyclin B-mediated positive feedback activation of Cdc25. Mol Biol Cell. 17:1779-89.
Margolis, S.S., S. Walsh, D.C. Weiser, M. Yoshida, S. Shenolikar, and S. Kornbluth. 2003. PP1 control of M phase entry exerted through 14-3-3-regulated Cdc25 dephosphorylation. EMBO J. 22:5734-45.
Martin-Lluesma, S., V.M. Stucke, and E.A. Nigg. 2002. Role of Hec1 in spindle checkpoint signaling and kinetochore recruitment of Mad1/Mad2. Science. 297:2267-70.
Masui, Y. 1972. Hormonal and cytoplasmic control of the maturation of frog oocytes. Sov J Dev Biol. 3:484-95.
Masui, Y. 2001. From oocyte maturation to the in vitro cell cycle: the history of discoveries of Maturation-Promoting Factor (MPF) and Cytostatic Factor (CSF). Differentiation. 69:1-17.
Masui, Y., and C.L. Markert. 1971. Cytoplasmic control of nuclear behavior during meiotic maturation of frog oocytes. J Exp Zool. 177:129-45.
Maton, G., T. Lorca, J.A. Girault, R. Ozon, and C. Jessus. 2005. Differential regulation of Cdc2 and Aurora-A in Xenopus oocytes: a crucial role of phosphatase 2A. J Cell Sci. 118:2485-94.
Mayer-Jaekel, R.E., H. Ohkura, R. Gomes, C.E. Sunkel, S. Baumgartner, B.A. Hemmings, and D.M. Glover. 1993. The 55 kd regulatory subunit of Drosophila protein phosphatase 2A is required for anaphase. Cell. 72:621-33.

McCleland, M.L., R.D. Gardner, M.J. Kallio, J.R. Daum, G.J. Gorbsky, D.J. Burke, and P.T. Stukenberg. 2003. The highly conserved Ndc80 complex is required for kinetochore assembly, chromosome congression, and spindle checkpoint activity. Genes Dev. 17:101-14.

McCleland, M.L., M.J. Kallio, G.A. Barrett-Wilt, C.A. Kestner, J. Shabanowitz, D.F. Hunt, G.J. Gorbsky, and P.T. Stukenberg. 2004. The vertebrate Ndc80 complex contains Spc24 and Spc25 homologs, which are required to establish and maintain kinetochore-microtubule attachment. Curr Biol. 14:131-7.

McEwen, B.F., G.K. Chan, B. Zubrowski, M.S. Savoian, M.T. Sauer, and T.J. Yen. 2001. CENP-E is essential for reliable bioriented spindle attachment, but chromosome alignment can be achieved via redundant mechanisms in mammalian cells. Mol Biol Cell. 12:2776-89.

McEwen, B.F., A.B. Heagle, G.O. Cassels, K.F. Buttle, and C.L. Rieder. 1997. Kinetochore fiber maturation in PtK1 cells and its implications for the mechanisms of chromosome congression and anaphase onset. J Cell Biol. 137:1567-80.

McGowan, C.H., and P. Russell. 1993. Human Wee1 kinase inhibits cell division by phosphorylating p34cdc2 exclusively on Tyr15. EMBO J. 12:75-85.

McGowan, C.H., and P. Russell. 2004. The DNA damage response: sensing and signaling. Curr Opin Cell Biol. 16:629-33.

McGuinness, B.E., T. Hirota, N.R. Kudo, J.M. Peters, and K. Nasmyth. 2005. Shugoshin prevents dissociation of cohesin from centromeres during mitosis in vertebrate cells. PLoS Biol. 3:e86.

McKim, K.S., and R.S. Hawley. 1995. Chromosomal control of meiotic cell division. Science. 270:1595-601.

Mei, J., X. Huang, and P. Zhang. 2001. Securin is not required for cellular viability, but is required for normal growth of mouse embryonic fibroblasts. Curr Biol. 11:1197-201.

Meraldi, P., V.M. Draviam, and P.K. Sorger. 2004. Timing and checkpoints in the regulation of mitotic progression. Dev Cell. 7:45-60.

Meraldi, P., and P.K. Sorger. 2005. A dual role for Bub1 in the spindle checkpoint and chromosome congression. EMBO J. 24:1621-33.

Millband, D.N., and K.G. Hardwick. 2002. Fission yeast Mad3p is required for Mad2p to inhibit the anaphase-promoting complex and localizes to kinetochores in a Bub1p-, Bub3p-, and Mph1p-dependent manner. Mol Cell Biol. 22:2728-42.

Minshull, J., A. Straight, A.D. Rudner, A.F. Dernburg, A. Belmont, and A.W. Murray. 1996. Protein phosphatase 2A regulates MPF activity and sister chromatid cohesion in budding yeast. Curr Biol. 6:1609-20.

Minshull, J., H. Sun, N.K. Tonks, and A.W. Murray. 1994. A MAP kinase-dependent spindle assembly checkpoint in Xenopus egg extracts. Cell. 79:475-86.

Miranda, J.J., P. De Wulf, P.K. Sorger, and S.C. Harrison. 2005. The yeast DASH complex forms closed rings on microtubules. Nat Struct Mol Biol. 12:138-43.

Mitchison, T., and M. Kirschner. 1984. Dynamic instability of microtubule growth. Nature. 312:237-42.

Mochida, S., and T. Hunt. 2007. Calcineurin is required to release Xenopus egg extracts from meiotic M phase. Nature. 449:336-40.

Mochida, S., S. Ikeo, J. Gannon, and T. Hunt. 2009. Regulated activity of PP2A-B55 delta is crucial for controlling entry into and exit from mitosis in Xenopus egg extracts. EMBO J. 28:2777-85.

Morgan, D.O. 1995. Principles of CDK regulation. Nature. 374:131-4.
Morgan, D.O. 1997. Cyclin-dependent kinases: engines, clocks, and microprocessors. Annu Rev Cell Dev Biol. 13:261-91.
Mueller, P.R., T.R. Coleman, and W.G. Dunphy. 1995a. Cell cycle regulation of a Xenopus Wee1-like kinase. Mol Biol Cell. 6:119-34.
Mueller, P.R., T.R. Coleman, A. Kumagai, and W.G. Dunphy. 1995b. Myt1: a membrane-associated inhibitory kinase that phosphorylates Cdc2 on both threonine-14 and tyrosine-15. Science. 270:86-90.
Murata-Hori, M., and Y.L. Wang. 2002. The kinase activity of aurora B is required for kinetochore-microtubule interactions during mitosis. Curr Biol. 12:894-9.
Murray, A.W. 2004. Recycling the cell cycle: cyclins revisited. Cell. 116:221-34.
Musacchio, A., and K.G. Hardwick. 2002. The spindle checkpoint: structural insights into dynamic signalling. Nat Rev Mol Cell Biol. 3:731-41.
Musacchio, A., and E.D. Salmon. 2007. The spindle-assembly checkpoint in space and time. Nat Rev Mol Cell Biol. 8:379-93.
Myers, A.P., L.B. Corson, J. Rossant, and J.C. Baker. 2004. Characterization of mouse Rsk4 as an inhibitor of fibroblast growth factor-RAS-extracellular signal-regulated kinase signaling. Mol Cell Biol. 24:4255-66.
Nakajima, H., F. Toyoshima-Morimoto, E. Taniguchi, and E. Nishida. 2003. Identification of a consensus motif for Plk (Polo-like kinase) phosphorylation reveals Myt1 as a Plk1 substrate. J Biol Chem. 278:25277-80.
Nakayama, K.I., and K. Nakayama. 2005. Regulation of the cell cycle by SCF-type ubiquitin ligases. Semin Cell Dev Biol. 16:323-33.
Nasmyth, K. 2002. Segregating sister genomes: the molecular biology of chromosome separation. Science. 297:559-65.
Nasmyth, K. 2005a. How do so few control so many? Cell. 120:739-46.
Nasmyth, K. 2005b. How might cohesin hold sister chromatids together? Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 360:483-96.
Nasmyth, K., J.M. Peters, and F. Uhlmann. 2000. Splitting the chromosome: cutting the ties that bind sister chromatids. Science. 288:1379-85.
Nicklas, R.B., M.S. Campbell, S.C. Ward, and G.J. Gorbsky. 1998. Tension-sensitive kinetochore phosphorylation in vitro. J Cell Sci. 111 (Pt 21):3189-96.
Nicklas, R.B., and G.W. Gordon. 1985. The total length of spindle microtubules depends on the number of chromosomes present. J Cell Biol. 100:1-7.
Nicklas, R.B., and S.C. Ward. 1994. Elements of error correction in mitosis: microtubule capture, release, and tension. J Cell Biol. 126:1241-53.
Nicklas, R.B., S.C. Ward, and G.J. Gorbsky. 1995. Kinetochore chemistry is sensitive to tension and may link mitotic forces to a cell cycle checkpoint. J Cell Biol. 130:929-39.
Nielsen, P.J., K.L. Manchester, H. Towbin, J. Gordon, and G. Thomas. 1982. The phosphorylation of ribosomal protein S6 in rat tissues following cycloheximide injection, in diabetes, and after denervation of diaphragm. A simple immunological determination of the extent of S6 phosphorylation on protein blots. J Biol Chem. 257:12316-21.
Niida, H., and M. Nakanishi. 2006. DNA damage checkpoints in mammals. Mutagenesis. 21:3-9.
Nishiyama, T., K. Ohsumi, and T. Kishimoto. 2007. Phosphorylation of Erp1 by p90rsk is required for cytostatic factor arrest in Xenopus laevis eggs. Nature. 446:1096-9.

Nurse, P. 1990. Universal control mechanism regulating onset of M-phase. Nature. 344:503-8.
O'Connell, C.B., J. Loncarek, P. Hergert, A. Kourtidis, D.S. Conklin, and A. Khodjakov. 2008. The spindle assembly checkpoint is satisfied in the absence of interkinetochore tension during mitosis with unreplicated genomes. J Cell Biol. 183:29-36.
Obaya, A.J., and J.M. Sedivy. 2002. Regulation of cyclin-Cdk activity in mammalian cells. Cell Mol Life Sci. 59:126-42.
Ohkura, H., N. Kinoshita, S. Miyatani, T. Toda, and M. Yanagida. 1989. The fission yeast dis2+ gene required for chromosome disjoining encodes one of two putative type 1 protein phosphatases. Cell. 57:997-1007.
Okumura, E., T. Fukuhara, H. Yoshida, S. Hanada Si, R. Kozutsumi, M. Mori, K. Tachibana, and T. Kishimoto. 2002. Akt inhibits Myt1 in the signalling pathway that leads to meiotic G2/M-phase transition. Nat Cell Biol. 4:111-6.
Pagano, M., R. Pepperkok, F. Verde, W. Ansorge, and G. Draetta. 1992. Cyclin A is required at two points in the human cell cycle. EMBO J. 11:961-71.
Palmer, A., A.C. Gavin, and A.R. Nebreda. 1998. A link between MAP kinase and p34(cdc2)/cyclin B during oocyte maturation: p90(rsk) phosphorylates and inactivates the p34(cdc2) inhibitory kinase Myt1. EMBO J. 17:5037-47.
Parker, L.L., and H. Piwnica-Worms. 1992. Inactivation of the p34cdc2-cyclin B complex by the human WEE1 tyrosine kinase. Science. 257:1955-7.
Parry, D.H., and P.H. O'Farrell. 2001. The schedule of destruction of three mitotic cyclins can dictate the timing of events during exit from mitosis. Curr Biol. 11:671-83.
Peng, A., T.M. Yamamoto, M.L. Goldberg, and J.L. Maller. A novel role for greatwall kinase in recovery from DNA damage. Cell Cycle. 9.
Perdiguero, E., and A.R. Nebreda. 2004. Regulation of Cdc25C activity during the meiotic G2/M transition. Cell Cycle. 3:733-7.
Perry, J.A., and S. Kornbluth. 2007. Cdc25 and Wee1: analogous opposites? Cell Div. 2:12.
Peters, J.M. 2002. The anaphase-promoting complex: proteolysis in mitosis and beyond. Mol Cell. 9:931-43.
Picard, A., J.P. Capony, D.L. Brautigan, and M. Doree. 1989. Involvement of protein phosphatases 1 and 2A in the control of M phase-promoting factor activity in starfish. J Cell Biol. 109:3347-54.
Pines, J., and T. Hunter. 1991. Cyclin-dependent kinases: a new cell cycle motif? Trends Cell Biol. 1:117-21.
Pinsky, B.A., and S. Biggins. 2005. The spindle checkpoint: tension versus attachment. Trends Cell Biol. 15:486-93.
Pinsky, B.A., C.R. Nelson, and S. Biggins. 2009. Protein phosphatase 1 regulates exit from the spindle checkpoint in budding yeast. Curr Biol. 19:1182-7.
Poddar, A., P.T. Stukenberg, and D.J. Burke. 2005. Two complexes of spindle checkpoint proteins containing Cdc20 and Mad2 assemble during mitosis independently of the kinetochore in Saccharomyces cerevisiae. Eukaryot Cell. 4:867-78.
Poon, R.Y., and T. Hunter. 1995. Dephosphorylation of Cdk2 Thr160 by the cyclin-dependent kinase-interacting phosphatase KAP in the absence of cyclin. Science. 270:90-3.

Putkey, F.R., T. Cramer, M.K. Morphew, A.D. Silk, R.S. Johnson, J.R. McIntosh, and D.W. Cleveland. 2002. Unstable kinetochore-microtubule capture and chromosomal instability following deletion of CENP-E. Dev Cell. 3:351-65.

Queralt, E., and F. Uhlmann. 2008. Separase cooperates with Zds1 and Zds2 to activate Cdc14 phosphatase in early anaphase. J Cell Biol. 182:873-83.

Rauh, N.R., A. Schmidt, J. Bormann, E.A. Nigg, and T.U. Mayer. 2005. Calcium triggers exit from meiosis II by targeting the APC/C inhibitor XErp1 for degradation. Nature. 437:1048-52.

Reddy, S.K., M. Rape, W.A. Margansky, and M.W. Kirschner. 2007. Ubiquitination by the anaphase-promoting complex drives spindle checkpoint inactivation. Nature. 446:921-5.

Richards, S.A., V.C. Dreisbach, L.O. Murphy, and J. Blenis. 2001. Characterization of regulatory events associated with membrane targeting of p90 ribosomal S6 kinase 1. Mol Cell Biol. 21:7470-80.

Riedel, C.G., V.L. Katis, Y. Katou, S. Mori, T. Itoh, W. Helmhart, M. Galova, M. Petronczki, J. Gregan, B. Cetin, I. Mudrak, E. Ogris, K. Mechtler, L. Pelletier, F. Buchholz, K. Shirahige, and K. Nasmyth. 2006. Protein phosphatase 2A protects centromeric sister chromatid cohesion during meiosis I. Nature. 441:53-61.

Rieder, C.L., R.W. Cole, A. Khodjakov, and G. Sluder. 1995. The checkpoint delaying anaphase in response to chromosome monoorientation is mediated by an inhibitory signal produced by unattached kinetochores. J Cell Biol. 130:941-8.

Rieder, C.L., A. Schultz, R. Cole, and G. Sluder. 1994. Anaphase onset in vertebrate somatic cells is controlled by a checkpoint that monitors sister kinetochore attachment to the spindle. J Cell Biol. 127:1301-10.

Rivas, M., C. Garcia, J.L. Liberona, and N. Lagos. 2000. Biochemical characterization and inhibitory effects of dinophysistoxin-1, okadaic acid and microcystine 1-r on protein phosphatase 2a purified from the mussel Mytilus chilensis. Biol Res. 33:197-206.

Roux, P.P., S.A. Richards, and J. Blenis. 2003. Phosphorylation of p90 ribosomal S6 kinase (RSK) regulates extracellular signal-regulated kinase docking and RSK activity. Mol Cell Biol. 23:4796-804.

Russell, P., and P. Nurse. 1986. cdc25+ functions as an inducer in the mitotic control of fission yeast. Cell. 45:145-53.

Russell, P., and P. Nurse. 1987. Negative regulation of mitosis by wee1+, a gene encoding a protein kinase homolog. Cell. 49:559-67.

Sagata, N. 1997. What does Mos do in oocytes and somatic cells? Bioessays. 19:13-21.

Sagata, N., N. Watanabe, G.F. Vande Woude, and Y. Ikawa. 1989. The c-mos proto-oncogene product is a cytostatic factor responsible for meiotic arrest in vertebrate eggs. Nature. 342:512-8.

Salic, A., J.C. Waters, and T.J. Mitchison. 2004. Vertebrate shugoshin links sister centromere cohesion and kinetochore microtubule stability in mitosis. Cell. 118:567-78.

Sawin, K.E., and S.A. Endow. 1993. Meiosis, mitosis and microtubule motors. Bioessays. 15:399-407.

Sawin, K.E., K. LeGuellec, M. Philippe, and T.J. Mitchison. 1992. Mitotic spindle organization by a plus-end-directed microtubule motor. Nature. 359:540-3.

Scaerou, F., D.A. Starr, F. Piano, O. Papoulas, R.E. Karess, and M.L. Goldberg. 2001. The ZW10 and Rough Deal checkpoint proteins function together in a large, evolutionarily conserved complex targeted to the kinetochore. J Cell Sci. 114:3103-14.

Schaar, B.T., G.K. Chan, P. Maddox, E.D. Salmon, and T.J. Yen. 1997. CENP-E function at kinetochores is essential for chromosome alignment. J Cell Biol. 139:1373-82.

Schmidt, A., P.I. Duncan, N.R. Rauh, G. Sauer, A.M. Fry, E.A. Nigg, and T.U. Mayer. 2005. Xenopus polo-like kinase Plx1 regulates XErp1, a novel inhibitor of APC/C activity. Genes Dev. 19:502-13.

Schmidt, A., N.R. Rauh, E.A. Nigg, and T.U. Mayer. 2006. Cytostatic factor: an activity that puts the cell cycle on hold. J Cell Sci. 119:1213-8.

Schwab, M.S., B.T. Roberts, S.D. Gross, B.J. Tunquist, F.E. Taieb, A.L. Lewellyn, and J.L. Maller. 2001. Bub1 is activated by the protein kinase p90(Rsk) during Xenopus oocyte maturation. Curr Biol. 11:141-50.

Shah, J.V., E. Botvinick, Z. Bonday, F. Furnari, M. Berns, and D.W. Cleveland. 2004. Dynamics of centromere and kinetochore proteins; implications for checkpoint signaling and silencing. Curr Biol. 14:942-52.

Shang, C., T.R. Hazbun, I.M. Cheeseman, J. Aranda, S. Fields, D.G. Drubin, and G. Barnes. 2003. Kinetochore protein interactions and their regulation by the Aurora kinase Ipl1p. Mol Biol Cell. 14:3342-55.

Shannon, K.B., J.C. Canman, and E.D. Salmon. 2002. Mad2 and BubR1 function in a single checkpoint pathway that responds to a loss of tension. Mol Biol Cell. 13:3706-19.

Shapiro, L., K.A. Heidenreich, M.K. Meintzer, and C.A. Dinarello. 1998. Role of p38 mitogen-activated protein kinase in HIV type 1 production in vitro. Proc Natl Acad Sci U S A. 95:7422-6.

Sharp-Baker, H., and R.H. Chen. 2001. Spindle checkpoint protein Bub1 is required for kinetochore localization of Mad1, Mad2, Bub3, and CENP-E, independently of its kinase activity. J Cell Biol. 153:1239-50.

Sharp, D.J., K.L. McDonald, H.M. Brown, H.J. Matthies, C. Walczak, R.D. Vale, T.J. Mitchison, and J.M. Scholey. 1999. The bipolar kinesin, KLP61F, cross-links microtubules within interpolar microtubule bundles of Drosophila embryonic mitotic spindles. J Cell Biol. 144:125-38.

Shou, W., J.H. Seol, A. Shevchenko, C. Baskerville, D. Moazed, Z.W. Chen, J. Jang, H. Charbonneau, and R.J. Deshaies. 1999. Exit from mitosis is triggered by Tem1-dependent release of the protein phosphatase Cdc14 from nucleolar RENT complex. Cell. 97:233-44.

Sironi, L., M. Mapelli, S. Knapp, A. De Antoni, K.T. Jeang, and A. Musacchio. 2002. Crystal structure of the tetrameric Mad1-Mad2 core complex: implications of a 'safety belt' binding mechanism for the spindle checkpoint. EMBO J. 21:2496-506.

Skoufias, D.A., P.R. Andreassen, F.B. Lacroix, L. Wilson, and R.L. Margolis. 2001. Mammalian mad2 and bub1/bubR1 recognize distinct spindle-attachment and kinetochore-tension checkpoints. Proc Natl Acad Sci U S A. 98:4492-7.

Smith, J.A., C.E. Poteet-Smith, K. Malarkey, and T.W. Sturgill. 1999. Identification of an extracellular signal-regulated kinase (ERK) docking site in ribosomal S6 kinase, a sequence critical for activation by ERK in vivo. J Biol Chem. 274:2893-8.

Smith, J.A., C.E. Poteet-Smith, Y. Xu, T.M. Errington, S.M. Hecht, and D.A. Lannigan. 2005. Identification of the first specific inhibitor of p90 ribosomal S6 kinase (RSK) reveals an unexpected role for RSK in cancer cell proliferation. Cancer Res. 65:1027-34.

Solomon, M.J., J.W. Harper, and J. Shuttleworth. 1993. CAK, the p34cdc2 activating kinase, contains a protein identical or closely related to p40MO15. EMBO J. 12:3133-42.

Solomon, M.J., T. Lee, and M.W. Kirschner. 1992. Role of phosphorylation in p34cdc2 activation: identification of an activating kinase. Mol Biol Cell. 3:13-27.

Stegmeier, F., and A. Amon. 2004. Closing mitosis: the functions of the Cdc14 phosphatase and its regulation. Annu Rev Genet. 38:203-32.

Stegmeier, F., M. Rape, V.M. Draviam, G. Nalepa, M.E. Sowa, X.L. Ang, E.R. McDonald, 3rd, M.Z. Li, G.J. Hannon, P.K. Sorger, M.W. Kirschner, J.W. Harper, and S.J. Elledge. 2007. Anaphase initiation is regulated by antagonistic ubiquitination and deubiquitination activities. Nature. 446:876-81.

Stegmeier, F., R. Visintin, and A. Amon. 2002. Separase, polo kinase, the kinetochore protein Slk19, and Spo12 function in a network that controls Cdc14 localization during early anaphase. Cell. 108:207-20.

Stemmann, O., H. Zou, S.A. Gerber, S.P. Gygi, and M.W. Kirschner. 2001. Dual inhibition of sister chromatid separation at metaphase. Cell. 107:715-26.

Sturgill, T.W., L.B. Ray, E. Erikson, and J.L. Maller. 1988. Insulin-stimulated MAP-2 kinase phosphorylates and activates ribosomal protein S6 kinase II. Nature. 334:715-8.

Sudakin, V., G.K. Chan, and T.J. Yen. 2001. Checkpoint inhibition of the APC/C in HeLa cells is mediated by a complex of BUBR1, BUB3, CDC20, and MAD2. J Cell Biol. 154:925-36.

Sudakin, V., D. Ganoth, A. Dahan, H. Heller, J. Hershko, F.C. Luca, J.V. Ruderman, and A. Hershko. 1995. The cyclosome, a large complex containing cyclin-selective ubiquitin ligase activity, targets cyclins for destruction at the end of mitosis. Mol Biol Cell. 6:185-97.

Sullivan, M., T. Higuchi, V.L. Katis, and F. Uhlmann. 2004. Cdc14 phosphatase induces rDNA condensation and resolves cohesin-independent cohesion during budding yeast anaphase. Cell. 117:471-82.

Sumara, I., J.F. Gimenez-Abian, D. Gerlich, T. Hirota, C. Kraft, C. de la Torre, J. Ellenberg, and J.M. Peters. 2004. Roles of polo-like kinase 1 in the assembly of functional mitotic spindles. Curr Biol. 14:1712-22.

Sumara, I., E. Vorlaufer, P.T. Stukenberg, O. Kelm, N. Redemann, E.A. Nigg, and J.M. Peters. 2002. The dissociation of cohesin from chromosomes in prophase is regulated by Polo-like kinase. Mol Cell. 9:515-25.

Sunkara, P.S., D.A. Wright, and P.N. Rao. 1979. Mitotic factors from mammalian cells induce germinal vesicle breakdown and chromosome condensation in amphibian oocytes. Proc Natl Acad Sci U S A. 76:2799-802.

Sunkel, C.E., and D.M. Glover. 1988. polo, a mitotic mutant of Drosophila displaying abnormal spindle poles. J Cell Sci. 89 (Pt 1):25-38.

Surana, U., A. Amon, C. Dowzer, J. McGrew, B. Byers, and K. Nasmyth. 1993. Destruction of the CDC28/CLB mitotic kinase is not required for the metaphase to anaphase transition in budding yeast. EMBO J. 12:1969-78.

Sutherland, C., J. Alterio, D.G. Campbell, B. Le Bourdelles, J. Mallet, J. Haavik, and P. Cohen. 1993. Phosphorylation and activation of human tyrosine hydroxylase

in vitro by mitogen-activated protein (MAP) kinase and MAP-kinase-activated kinases 1 and 2. Eur J Biochem. 217:715-22.
Tachibana, K., D. Tanaka, T. Isobe, and T. Kishimoto. 2000. c-Mos forces the mitotic cell cycle to undergo meiosis II to produce haploid gametes. Proc Natl Acad Sci U S A. 97:14301-6.
Tai, C.Y., D.L. Dujardin, N.E. Faulkner, and R.B. Vallee. 2002. Role of dynein, dynactin, and CLIP-170 interactions in LIS1 kinetochore function. J Cell Biol. 156:959-68.
Takenaka, K., Y. Gotoh, and E. Nishida. 1997. MAP kinase is required for the spindle assembly checkpoint but is dispensable for the normal M phase entry and exit in Xenopus egg cell cycle extracts. J Cell Biol. 136:1091-7.
Tanaka, K., E. Kitamura, Y. Kitamura, and T.U. Tanaka. 2007. Molecular mechanisms of microtubule-dependent kinetochore transport toward spindle poles. J Cell Biol. 178:269-81.
Tanaka, T.U., N. Rachidi, C. Janke, G. Pereira, M. Galova, E. Schiebel, M.J. Stark, and K. Nasmyth. 2002. Evidence that the Ipl1-Sli15 (Aurora kinase-INCENP) complex promotes chromosome bi-orientation by altering kinetochore-spindle pole connections. Cell. 108:317-29.
Tang, Z., R. Bharadwaj, B. Li, and H. Yu. 2001. Mad2-Independent inhibition of APCCdc20 by the mitotic checkpoint protein BubR1. Dev Cell. 1:227-37.
Tang, Z., H. Shu, W. Qi, N.A. Mahmood, M.C. Mumby, and H. Yu. 2006. PP2A is required for centromeric localization of Sgo1 and proper chromosome segregation. Dev Cell. 10:575-85.
Tang, Z.H., T.R. Coleman, and W.G. Dunphy. 1993. 2 Distinct Mechanisms for Negative Regulation of the Wee1 Protein-Kinase. Embo Journal. 12:3427-3436.
Tanudji, M., J. Shoemaker, L. L'Italien, L. Russell, G. Chin, and X.M. Schebye. 2004. Gene silencing of CENP-E by small interfering RNA in HeLa cells leads to missegregation of chromosomes after a mitotic delay. Mol Biol Cell. 15:3771-81.
Taylor, S.S., E. Ha, and F. McKeon. 1998. The human homologue of Bub3 is required for kinetochore localization of Bub1 and a Mad3/Bub1-related protein kinase. J Cell Biol. 142:1-11.
Taylor, S.S., D. Hussein, Y. Wang, S. Elderkin, and C.J. Morrow. 2001. Kinetochore localisation and phosphorylation of the mitotic checkpoint components Bub1 and BubR1 are differentially regulated by spindle events in human cells. J Cell Sci. 114:4385-95.

Tetzlaff, M.T., C. Bai, M. Finegold, J. Wilson, J.W. Harper, K.A. Mahon, and S.J. Elledge. 2004. Cyclin F disruption compromises placental development and affects normal cell cycle execution. Mol Cell Biol. 24:2487-98.
Thakur, A., K.W. Rahman, J. Wu, A. Bollig, H. Biliran, X. Lin, H. Nassar, D.J. Grignon, F.H. Sarkar, and J.D. Liao. 2007. Aberrant expression of X-linked genes RbAp46, Rsk4, and Cldn2 in breast cancer. Mol Cancer Res. 5:171-81.
Toyn, J.H., A.L. Johnson, J.D. Donovan, W.M. Toone, and L.H. Johnston. 1997. The Swi5 transcription factor of Saccharomyces cerevisiae has a role in exit from mitosis through induction of the cdk-inhibitor Sic1 in telophase. Genetics. 145:85-96.

Toyoshima-Morimoto, F., E. Taniguchi, and E. Nishida. 2002. Plk1 promotes nuclear translocation of human Cdc25C during prophase. EMBO Rep. 3:341-8.

Tung, J.J., K. Padmanabhan, D.V. Hansen, J.D. Richter, and P.K. Jackson. 2007. Translational unmasking of Emi2 directs cytostatic factor arrest in meiosis II. Cell Cycle. 6:725-31.

Tunquist, B.J., P.A. Eyers, L.G. Chen, A.L. Lewellyn, and J.L. Maller. 2003. Spindle checkpoint proteins Mad1 and Mad2 are required for cytostatic factor-mediated metaphase arrest. J Cell Biol. 163:1231-42.

Tunquist, B.J., and J.L. Maller. 2003. Under arrest: cytostatic factor (CSF)-mediated metaphase arrest in vertebrate eggs. Genes Dev. 17:683-710.

Tunquist, B.J., M.S. Schwab, L.G. Chen, and J.L. Maller. 2002. The spindle checkpoint kinase bub1 and cyclin e/cdk2 both contribute to the establishment of meiotic metaphase arrest by cytostatic factor. Curr Biol. 12:1027-33.

Uchida, K.S., K. Takagaki, K. Kumada, Y. Hirayama, T. Noda, and T. Hirota. 2009. Kinetochore stretching inactivates the spindle assembly checkpoint. J Cell Biol. 184:383-90.

Uhlmann, F. 2003. Chromosome cohesion and separation: from men and molecules. Curr Biol. 13:R104-14.

Uhlmann, F., F. Lottspeich, and K. Nasmyth. 1999. Sister-chromatid separation at anaphase onset is promoted by cleavage of the cohesin subunit Scc1. Nature. 400:37-42.

Vagnarelli, P., and W.C. Earnshaw. 2004. Chromosomal passengers: the four-dimensional regulation of mitotic events. Chromosoma. 113:211-22.

van Vugt, M.A., B.C. van de Weerdt, G. Vader, H. Janssen, J. Calafat, R. Klompmaker, R.M. Wolthuis, and R.H. Medema. 2004. Polo-like kinase-1 is required for bipolar spindle formation but is dispensable for anaphase promoting complex/Cdc20 activation and initiation of cytokinesis. J Biol Chem. 279:36841-54.

Vanoosthuyse, V., and K.G. Hardwick. 2009. A novel protein phosphatase 1-dependent spindle checkpoint silencing mechanism. Curr Biol. 19:1176-81.

Vanoosthuyse, V., R. Valsdottir, J.P. Javerzat, and K.G. Hardwick. 2004. Kinetochore targeting of fission yeast Mad and Bub proteins is essential for spindle checkpoint function but not for all chromosome segregation roles of Bub1p. Mol Cell Biol. 24:9786-801.

Vass, S., S. Cotterill, A.M. Valdeolmillos, J.L. Barbero, E. Lin, W.D. Warren, and M.M. Heck. 2003. Depletion of Drad21/Scc1 in Drosophila cells leads to instability of the cohesin complex and disruption of mitotic progression. Curr Biol. 13:208-18.

Vazquez-Novelle, M.D., V. Esteban, A. Bueno, and M.P. Sacristan. 2005. Functional homology among human and fission yeast Cdc14 phosphatases. J Biol Chem. 280:29144-50.

Verlhac, M.H., J.Z. Kubiak, M. Weber, G. Geraud, W.H. Colledge, M.J. Evans, and B. Maro. 1996. Mos is required for MAP kinase activation and is involved in microtubule organization during meiotic maturation in the mouse. Development. 122:815-22.

Vidal, A., and A. Koff. 2000. Cell-cycle inhibitors: three families united by a common cause. Gene. 247:1-15.

Vigneron, S., E. Brioudes, A. Burgess, J.C. Labbe, T. Lorca, and A. Castro. RSK2 is a kinetochore-associated protein that participates in the spindle assembly checkpoint. Oncogene. 29:3566-74.
Vigneron, S., E. Brioudes, A. Burgess, J.C. Labbe, T. Lorca, and A. Castro. 2009. Greatwall maintains mitosis through regulation of PP2A. EMBO J. 28:2786-93.
Vigneron, S., S. Prieto, C. Bernis, J.C. Labbe, A. Castro, and T. Lorca. 2004. Kinetochore localization of spindle checkpoint proteins: who controls whom? Mol Biol Cell. 15:4584-96.
Virshup, D.M., and S. Shenolikar. 2009. From promiscuity to precision: protein phosphatases get a makeover. Mol Cell. 33:537-45.
Visintin, R., K. Craig, E.S. Hwang, S. Prinz, M. Tyers, and A. Amon. 1998. The phosphatase Cdc14 triggers mitotic exit by reversal of Cdk-dependent phosphorylation. Mol Cell. 2:709-18.
Visintin, R., E.S. Hwang, and A. Amon. 1999. Cfi1 prevents premature exit from mitosis by anchoring Cdc14 phosphatase in the nucleolus. Nature. 398:818-23.
Voets, E., and R.M. Wolthuis. MASTL is the human orthologue of Greatwall kinase that facilitates mitotic entry, anaphase and cytokinesis. Cell Cycle. 9:3591-601.
Voorhees, J.J., E.A. Duell, D.A. Chambers, and C.L. Marcelo. 1976. Regulation of cell cycles. J Invest Dermatol. 67:15-9.
Waizenegger, I., J.F. Gimenez-Abian, D. Wernic, and J.M. Peters. 2002. Regulation of human separase by securin binding and autocleavage. Curr Biol. 12:1368-78.
Walczak, C.E., I. Vernos, T.J. Mitchison, E. Karsenti, and R. Heald. 1998. A model for the proposed roles of different microtubule-based motor proteins in establishing spindle bipolarity. Curr Biol. 8:903-13.
Wang, R., G. He, M. Nelman-Gonzalez, C.L. Ashorn, G.E. Gallick, P.T. Stukenberg, M.W. Kirschner, and J. Kuang. 2007. Regulation of Cdc25C by ERK-MAP kinases during the G2/M transition. Cell. 128:1119-32.
Wang, R., S.Y. Jung, C.F. Wu, J. Qin, R. Kobayashi, G.E. Gallick, and J. Kuang. Direct roles of the signaling kinase RSK2 in Cdc25C activation during Xenopus oocyte maturation. Proc Natl Acad Sci U S A.
Wang, X.M., Y. Zhai, and J.E. Ferrell, Jr. 1997. A role for mitogen-activated protein kinase in the spindle assembly checkpoint in XTC cells. J Cell Biol. 137:433-43.
Wasserman, W.J., and L.D. Smith. 1978. The cyclic behavior of a cytoplasmic factor controlling nuclear membrane breakdown. J Cell Biol. 78:R15-22.
Wassmann, K., V. Liberal, and R. Benezra. 2003. Mad2 phosphorylation regulates its association with Mad1 and the APC/C. EMBO J. 22:797-806.
Watanabe, Y., and T.S. Kitajima. 2005. Shugoshin protects cohesin complexes at centromeres. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 360:515-21, discussion 521.
Waters, J.C., R.H. Chen, A.W. Murray, and E.D. Salmon. 1998. Localization of Mad2 to kinetochores depends on microtubule attachment, not tension. J Cell Biol. 141:1181-91.
Waters, J.C., T.J. Mitchison, C.L. Rieder, and E.D. Salmon. 1996. The kinetochore microtubule minus-end disassembly associated with poleward flux produces a force that can do work. Mol Biol Cell. 7:1547-58.
Weaver, B.A., Z.Q. Bonday, F.R. Putkey, G.J. Kops, A.D. Silk, and D.W. Cleveland. 2003. Centromere-associated protein-E is essential for the mammalian mitotic

checkpoint to prevent aneuploidy due to single chromosome loss. J Cell Biol. 162:551-63.
Welburn, J.P., E.L. Grishchuk, C.B. Backer, E.M. Wilson-Kubalek, J.R. Yates, 3rd, and I.M. Cheeseman. 2009. The human kinetochore Ska1 complex facilitates microtubule depolymerization-coupled motility. Dev Cell. 16:374-85.
Wells, N.J., N. Watanabe, T. Tokusumi, W. Jiang, M.A. Verdecia, and T. Hunter. 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):3361-71.
Westermann, S., A. Avila-Sakar, H.W. Wang, H. Niederstrasser, J. Wong, D.G. Drubin, E. Nogales, and G. Barnes. 2005. Formation of a dynamic kinetochore-microtubule interface through assembly of the Dam1 ring complex. Mol Cell. 17:277-90.
Williams, B.C., T.L. Karr, J.M. Montgomery, and M.L. Goldberg. 1992. The Drosophila l(1)zw10 gene product, required for accurate mitotic chromosome segregation, is redistributed at anaphase onset. J Cell Biol. 118:759-73.
Williams, B.C., Z. Li, S. Liu, E.V. Williams, G. Leung, T.J. Yen, and M.L. Goldberg. 2003. Zwilch, a new component of the ZW10/ROD complex required for kinetochore functions. Mol Biol Cell. 14:1379-91.
Wittmann, T., A. Hyman, and A. Desai. 2001. The spindle: a dynamic assembly of microtubules and motors. Nat Cell Biol. 3:E28-34.
Wong, O.K., and G. Fang. 2005. Plx1 is the 3F3/2 kinase responsible for targeting spindle checkpoint proteins to kinetochores. J Cell Biol. 170:709-19.
Wong, O.K., and G. Fang. 2007. Cdk1 phosphorylation of BubR1 controls spindle checkpoint arrest and Plk1-mediated formation of the 3F3/2 epitope. J Cell Biol. 179:611-7.
Wright, J.H., E. Munar, D.R. Jameson, P.R. Andreassen, R.L. Margolis, R. Seger, and E.G. Krebs. 1999. Mitogen-activated protein kinase kinase activity is required for the G(2)/M transition of the cell cycle in mammalian fibroblasts. Proc Natl Acad Sci U S A. 96:11335-40.
Wu, J.Q., J.Y. Guo, W. Tang, C.S. Yang, C.D. Freel, C. Chen, A.C. Nairn, and S. Kornbluth. 2009. PP1-mediated dephosphorylation of phosphoproteins at mitotic exit is controlled by inhibitor-1 and PP1 phosphorylation. Nat Cell Biol. 11:644-51.
Wu, J.Q., D.V. Hansen, Y. Guo, M.Z. Wang, W. Tang, C.D. Freel, J.J. Tung, P.K. Jackson, and S. Kornbluth. 2007. Control of Emi2 activity and stability through Mos-mediated recruitment of PP2A. Proc Natl Acad Sci U S A. 104:16564-9.
Xia, G., X. Luo, T. Habu, J. Rizo, T. Matsumoto, and H. Yu. 2004. Conformation-specific binding of p31(comet) antagonizes the function of Mad2 in the spindle checkpoint. EMBO J. 23:3133-43.
Yamano, H., J. Gannon, and T. Hunt. 1996. The role of proteolysis in cell cycle progression in Schizosaccharomyces pombe. EMBO J. 15:5268-79.
Yang, M., B. Li, D.R. Tomchick, M. Machius, J. Rizo, H. Yu, and X. Luo. 2007. p31comet blocks Mad2 activation through structural mimicry. Cell. 131:744-55.
Yao, X., A. Abrieu, Y. Zheng, K.F. Sullivan, and D.W. Cleveland. 2000. CENP-E forms a link between attachment of spindle microtubules to kinetochores and the mitotic checkpoint. Nat Cell Biol. 2:484-91.
Yu, J., S.L. Fleming, B. Williams, E.V. Williams, Z. Li, P. Somma, C.L. Rieder, and M.L. Goldberg. 2004. Greatwall kinase: a nuclear protein required for proper

chromosome condensation and mitotic progression in Drosophila. J Cell Biol. 164:487-92.
Yu, J., Y. Zhao, Z. Li, S. Galas, and M.L. Goldberg. 2006. Greatwall kinase participates in the Cdc2 autoregulatory loop in Xenopus egg extracts. Mol Cell. 22:83-91.
Yuan, K., H. Hu, Z. Guo, G. Fu, A.P. Shaw, R. Hu, and X. Yao. 2007. Phospho-regulation of HsCdc14A By Polo-like kinase 1 is essential for mitotic progression. J Biol Chem. 282:27414-23.
Zecevic, M., A.D. Catling, S.T. Eblen, L. Renzi, J.C. Hittle, T.J. Yen, G.J. Gorbsky, and M.J. Weber. 1998. Active MAP kinase in mitosis: localization at kinetochores and association with the motor protein CENP-E. J Cell Biol. 142:1547-58.
Zhao, L.J., X.L. Zhang, P. Zhao, J. Cao, M.M. Cao, S.Y. Zhu, H.Q. Liu, and Z.T. Qi. 2006. Up-regulation of ERK and p38 MAPK signaling pathways by hepatitis C virus E2 envelope protein in human T lymphoma cell line. J Leukoc Biol. 80:424-32.
Zhao, Y., C. Bjorbaek, S. Weremowicz, C.C. Morton, and D.E. Moller. 1995. RSK3 encodes a novel pp90rsk isoform with a unique N-terminal sequence: growth factor-stimulated kinase function and nuclear translocation. Mol Cell Biol. 15:4353-63.
Zhao, Y., O. Haccard, R. Wang, J. Yu, J. Kuang, C. Jessus, and M.L. Goldberg. 2008. Roles of Greatwall kinase in the regulation of cdc25 phosphatase. Mol Biol Cell. 19:1317-27.

MATÉRIELS ET MÉTHODES

1. Culture cellulaire et transfections

Les cellules HeLa et Hek293T sont cultivées dans un milieu de culture DMEM (Dubelcco modified Eagle's medium, GIBCO/BRL Inc. Life Technologies) supplémenté avec 10% de sérum de veau fétal (FBS), 2mM de glutamine, pénicilline et streptomycine, dans une étude 37°C et à 5% de CO_2. Les transfections transitoires ont été réalisées à l'aide de Jetpei™ (Polytransfection). Les cellules sont trypsinées, récoltées et resuspendues à une concentration de 150 000 cellules par puits de 35 mm^2. 6µl de Jetpei™ dans 100µl de NaCl (150 mM) et x µg d'ADN codant pour les plasmides (pCS2-YFP-Gwl : 0,5 µg ; pCDNA3-Cdc14A-FLAG et pCDN3-Cdc14B-FLAG : 2 µg) dans 100µl de NaCl sont incubées ensemble pendant 20 min, et ensuite distribuées sur les cellules.

2. Synchronisation des cellules

Pour synchroniser les cellules en fin de phase G1, les cellules HeLa sont traitées pendant 20h avec 2,5mM de thymidine (Invitrogen). Les cellules sont ensuite lavées trois fois avec du milieu DMEM, puis ré-incubées avec du milieu DMEM complet supplémenté de 25µM de 2-déoxycitidine (Invitrogen). Pour synchroniser les cellules en prométaphase, 8h après le lavage de la thymidine, les cellules sont traitées pendant 12h avec 50 ng/mL de nocodazole (Sigma).

3. Analyse par FACS

Pour analyser l'index mitotique, les cellules sont trypsinées 12h après traitement au nocodazole, lavées et fixées dans 70% d'éthanol/PBS pendant une nuit. Puis les cellules sont réhydratées dans une solution de PBS, puis incubées pendant 1h à 4°C dans une solution de PBS contenant 10mg/mL d'iodure de propidium et 10 mg/mL de RNAse. 20 000 cellules sont analysées par un cytomètre BD FACScalibur™.

4. Préparation des extraits d'œufs de xénope, traduction des ARNm et immunoprécipitations et essai kinase in vitro

Les extraits CSF sont préparés à partir d'ovocytes non fertilisés qui sont arrêtés en métaphase II comme décrit (Murray, 1991).

Les ARNms codant le plasmide PCS2-HA-Gwl sont transcrits in vitro avec ARN polymérase SP6. Pour la traduction, les extraits CSF sont supplémentés avec du dithiothreitol (1 mM), RNAguard (0,4 U/µl d'extrait ; Amersham Biosciences), ARNt (0,1 µg/µl) et l'ARNm (0,05 µg/µl d'extrait), et incubés pendant 2h à 20°C (Vigneron et al, 2004).

Les immunoprécipitations sont réalisées à partir de 10 µl d'extraits, 10 µl de billes magnétiques protéine A-Dynabeads (Dynal®) et 2 µg d'anticorps anti-HA. Les anticorps liés aux billes sont lavés deux fois avec du tampon RIPA (10 mM de NaH_2PO_4, 100mM de NaCl, 5mM d'EDTA, 1% de Triton X-100, 0,5% de déoxycholate, 80 µM de β-glycerophosphate, 50 mM de NAF et 1mM de DTT), puis deux fois avec du tampon Tris 50 mM à pH 7,5 pendant 20 min à température ambiante avec 10 µl d'extraits d'œufs de xénope. Les billes sont ensuite lavées trois fois avec du tampon RIPA + 300 mM de NaCl, puis trois fois avec 50mM de Tris pH 7,5 ; et incubées avec le tampon de phosphorylation (20 mM d'HEPES, 10 mM de MgCL2, 100 µM d'ATP et 1 mg/mL de MBP ou des sous unités PP2A/B55, PP2A/B56, PP2A/C) et 2 µCi d'$ATP^{\gamma 33}$. La réaction est incubée pendant 30 min à 30°C, puis stoppée par addition de tampon Laemmli et analysée par SDS-PAGE. La phosphorylation de la MPB et des sous unités de PP2A est mesurée par autoradiographie.

Pour les essais kinase in vitro de Cdc14B, les lysats cellules sont immunoprécipités à l'aide d'anticorps anti-GFP ou anti-FLAG (comme décrit Vigneron et al, 2009) puis les billes sont incubées avec du tampon de phosphorylation et 2 µCi d'$ATP^{\gamma 33}$. La réaction est incubée pendant 30 min à 30°C, puis stoppée avec du tampon Laemmli et analysée par SDS-PAGE. Le profil de phosphorylation est mesuré par PhosphoImager (GE Healthcare).

5. Anticorps

L'obtention des anticorps anti-Gwl, anti-GFP et anti-FLAG a été décrit (Vigneron et al, 2009).

L'anticorps anti-Plk1 est un anticorps monoclonal provenant de chez Abnova (H00005347-M02)

Loss of human Greatwall results in G2 arrest and multiple mitotic defects due to deregulation of the cyclin B-Cdc2/PP2A balance

Andrew Burgess, Suzanne Vigneron, Estelle Brioudes, Jean-Claude Labbé, Thierry Lorca[1,2], and Anna Castro[1,2]

Universités Montpellier 2 et 1, Centre de Recherche de Biochimie Macromoléculaire, Centre National de la Recherche Scientifique UMR 5237, 34293 Montpellier Cedex 5, France

Edited by Tim Hunt, Cancer Research UK, South Mimms, United Kingdom, and approved April 21, 2010 (received for review December 9, 2009)

Here we show that the functional human ortholog of Greatwall protein kinase (Gwl) is the microtubule-associated serine/threonine kinase-like protein, MAST-L. This kinase promotes mitotic entry and maintenance in human cells by inhibiting protein phosphatase 2A (PP2A), a phosphatase that dephosphorylates cyclin B-Cdc2 substrates. The complete depletion of Gwl by siRNA arrests human cells in G2. When the levels of this kinase are only partially depleted, however, cells enter into mitosis with multiple defects and fail to inactivate the spindle assembly checkpoint (SAC). The ability of cells to remain arrested in mitosis by the SAC appears to be directly proportional to the amount of Gwl remaining. Thus, when Gwl is only slightly reduced, cells arrest at prometaphase. More complete depletion correlates with the premature dephosphorylation of cyclin B-Cdc2 substrates, inactivation of the SAC, and subsequent exit from mitosis with severe cytokinesis defects. These phenotypes appear to be mediated by PP2A, as they could be rescued by either a double Gwl/PP2A knockdown or by the inhibition of this phosphatase with okadaic acid. These results suggest that the balance between cyclin B-Cdc2 and PP2A must be tightly regulated for correct mitotic entry and exit and that Gwl is crucial for mediating this regulation in somatic human cells.

spindle assembly checkpoint | cell cycle | phosphatase | kinase | slippage

In eukaryotic cells, the mitotic state is maintained by the mitotic kinase cyclin B-Cdc2. Historically, mitotic entry and exit was thought to be the direct consequence of cyclin B-Cdc2 activation and inactivation, respectively (1). Recent results have expanded this model to include phosphatases (2). Specifically, recent evidence indicates that protein phosphatase 2A (PP2A) is responsible for dephosphorylation of cyclin B-Cdc2 substrates and that the regulation of this dephosphorylation is required in mitotic entry and exit (3). This finding suggests a previously unexplored model in which the balance between cyclin B-Cdc2 and PP2A controls mitotic entry and exit. Thus, during G2 PP2A activity is high and cyclin B-Cdc2 activity low, thereby preventing phosphorylation of mitotic substrates, whereas at mitotic entry the balance flips, allowing entry into mitosis. The mechanisms controlling cyclin B-Cdc2 activity have been largely described (4). Briefly, cyclin B-Cdc2 is inhibited during G2 by inhibitory phosphorylations on threonine 14 and tyrosine 15 by Wee1 and Myt1 kinases. Upon mitotic entry, these are removed by the Cdc25 phosphatase (4). Finally, at mitotic exit cyclin B-Cdc2 is inhibited by the ubiquitin-dependent degradation of its regulatory subunit cyclin B (5). Unlike cyclin B-Cdc2 regulation, very little is known about the mechanisms controlling PP2A activity during mitosis, and therefore our understanding of G2 and mitosis is incomplete.

Recently, Greatwall (Gwl), a unique critical mitotic regulator, has been discovered in *Drosophila* (6, 7). It is a member of the AGC family of serine/threonine kinases that phosphorylates substrates on S/T residues encircled by basic amino acids (7). Work done in *Xenopus* egg extracts suggested that Gwl promoted mitotic entry by controlling the auto-amplification loop of cyclin B/Cdc2 (8, 9). However, it has been recently demonstrated that the main role of this kinase is not the regulation of cyclin B-Cdc2 activity but the inhibition of PP2A, the phosphatase that de-phosphorylates cyclin B-Cdc2 substrates (10, 11).

Despite the critical roles of Gwl in mitosis, the functional human ortholog of this kinase is currently unknown. The human protein with the closest homology to *Drosophila* and *Xenopus* Gwl is the microtubule-associated serine/threonine kinase-like (MAST-L) (50.2 and 65.7% of sequence homology, respectively) (Fig. S1). In addition to the high homology of MAST-L with the other members of the Gwl family, it also contains a very long T-loop (>500 amino acids) that separates the kinase subdomains VII and VIII, a particular feature exclusive to Gwl kinases. In contrast, although MAST-L was first classified as a member of the MAST family, it contains very little homology to any of the MAST kinases. All of the members of the MAST family are large enzymes (1,309–2,444 amino acids) with a short T-loop (31 amino acids for MAST1), and contain a PDZ domain in the C terminus. However, MAST-L has minimal homology to MAST proteins (10.4% with MAST1) and no PDZ domain, suggesting that it is not a true member of the MAST family.

Very little is known about the role of MAST-L in human cells, with only two publications to date. Both of these publications focus on the role of MAST-L in autosomal-dominant thrombocytopenia, showing that a single-point mutation (E167D) in the N-terminal kinase domain correlates with this syndrome (12), and transient knockdown in zebrafish results in a reduction of circulating thrombocytes (13).

In the present study, we verified that MAST-L is the functional human ortholog of Gwl. Using siRNA knockdown of hGwl, we show in human cells that this kinase mediates mitotic entry and maintains the mitotic state by inhibiting PP2A, and thus maintains the correct equilibrium between cyclin B-Cdc2 and PP2A.

Results

MAST-L Is the Functional Human Homolog of *Xenopus* Greatwall. To analyze the role of Gwl in human cells, we cloned the closest related human protein to the *Drosophila* and *Xenopus* Greatwall, MAST-L (Fig. S1). Our previous results demonstrated that the depletion of Gwl from mitotic egg extracts induced the loss of the mitotic state. To check whether MAST-L corresponds to the Gwl ortholog, we translated MAST-L in M-phase frog egg extracts (CSF extracts) and tested its capacity to rescue the loss of endogenous Gwl. The expression, at endogenous levels, of WT MAST-L in these CSF extracts completely rescued the mitotic state (Fig. S2*A*). However, expression of a kinase-dead mutant of MAST-L failed to rescue, indicating that MAST-L is the functional ortologue of Gwl. Thus, from now on, it will be referred to as "human Greatwall" (hGwl) in this article.

Author contributions: A.B., T.L., and A.C. designed research; A.B., S.V., E.B., and J.-C.L. performed research; A.B., T.L., and A.C. analyzed data; and A.C. wrote the paper.

The authors declare no conflict of interest.

This article is a PNAS Direct Submission.

See Commentary on page 12409.

[1]T.L. and A.C. contributed equally to this work.

[2]To whom correspondence may be addressed. E-mail: anna.castro@crbm.cnrs.fr or thierry.lorca@crbm.cnrs.fr.

This article contains supporting information online at www.pnas.org/lookup/suppl/doi:10.1073/pnas.0914191107/-/DCSupplemental.

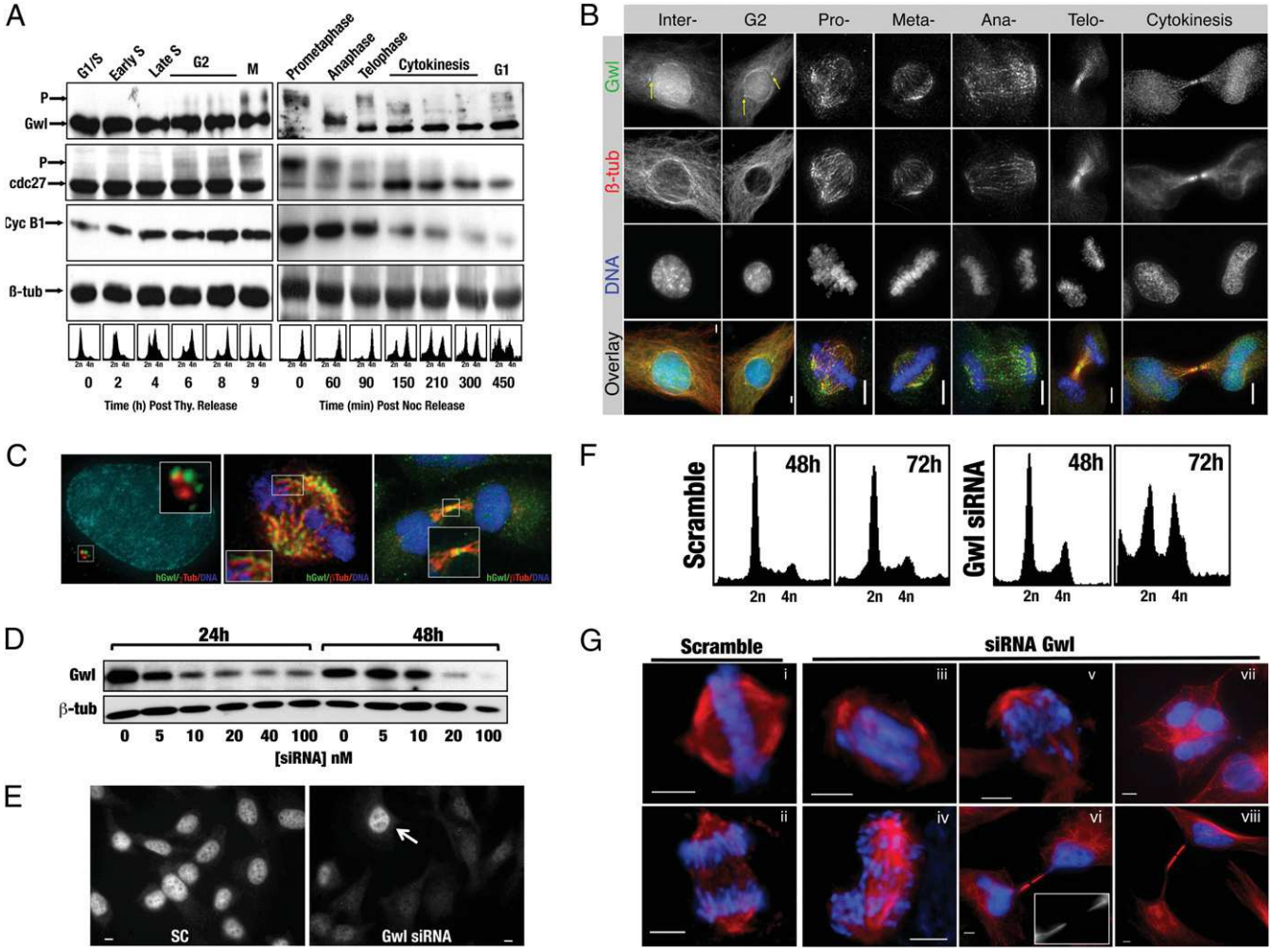


Fig. 1. hGwl siRNA knockdown induces multiple mitotic defects. (*A*) HeLa cells were synchronized by either thymidine (Thy) or nocodazole (Noc) shake-off and released into fresh media. Samples were collected at the indicated times and processed for Western blot. Cell synchrony was confirmed by FACS. (*B*) HeLa cells were probed with anti-hGwl (green), anti-β-tubulin (red), and DAPI (DNA, blue). The maximum projections from 0.3-μm Z-sections are shown. Yellow arrows indicate the centrosomal localization of hGwl. (Scale bars, 5 μm.) (*C*) Enlargements of HeLa cells treated as per *B*. Cells were counterstained with γ- (interphase, red) or β-tubulin (mitotic, cytokinesis, red), hGwl (green), and DNA (blue). (*D*) Asynchronous HeLa cells were transfected with the indicated amounts of hGwl siRNA for 24 h and harvested immediately (24 h) or 1 d later (48 h). The levels of hGwl were analyzed by Western blot. (*E*) Asynchronous HeLa cells were transfected with 50 nM of siRNA and analyzed by immunofluorescence with anti-hGwl antibodies. Arrow indicates a nontransfected cell. (*F*) HeLa cells were treated as per *D* with either 50 nM of Scramble or hGwl siRNA and analyzed by FACS. (*G*) Asynchronous HeLa cells treated as in *D* were analyzed by immunofluorescence. For β-tubulin (red) and DAPI (DNA, blue). (Scale bars, 5 μm.)

We next analyzed by Western blot the expression of the endogenous human protein in HeLa cells. Our antibodies clearly recognized and specifically immunoprecipitated a band around 110 KDa, the expected molecular weight of hGwl (Fig. S2*B*). The levels of hGwl appeared to be constant throughout the cell cycle (Fig. 1*A* and Fig. S2 *C* and *D*). However, a lower electrophoretic mobility of this protein appeared as cells entered mitosis, was maximal in prometaphase, and disappeared by anaphase (Fig. 1*A*). This lower mobility was induced by phosphorylation as λ-Phosphatase treatment reversed the shift (Fig. S2*E*).

Previously in *Drosophila*, Gwl was identified as a nuclear protein (7). However, although hGwl is mostly present in the nucleus of interphase human cells, we also noted a consistent partial localization in the cytoplasm and at the centrosomes during G1, S, and G2 phases (Fig. 1*B*). The centrosomal hGwl appeared to surround γ-tubulin, indicating that hGW is localized around the pericentriolar material (Fig. 1*C*). As cells entered mitosis, hGwl concentrated at the poles of the spindle and emanated out along the microtubule spindle fibers (Fig. 1 *B* and *C*). At anaphase, the protein started to leave the mitotic spindle, eventually becoming more diffuse in the cytoplasm. Finally, from telophase to cytokinesis, once the nuclear membrane reformed, most of the hGwl was localized in the nucleus, but a small fraction stayed at the cleavage furrow where it remained on the midzone microtubules, although occasionally it was also observed at the midbody (Fig. 1*C*). We detected a similar localization of this protein in U2OS cells and by using two different antibodies, one against the full-length protein and the other against the last 12 C-terminal amino acids of hGwl.

hGwl Knockdown Promotes G2 Arrest and Mitotic Defects in HeLa Cells That Can Be Rescued by the Knockdown or the Inhibition of PP2A by Okadaic Acid. It has been previously shown that depletion of Gwl in *Xenopus* egg extracts both prevents mitotic entry and promotes mitotic exit (8, 10, 11).

To investigate the role of hGwl in human cells, we induced its knockdown by siRNA in HeLa cells. The levels of hGwl decreased in a dose-dependent manner when increasing doses of the hGW siRNA were used, with an almost complete knockdown of this protein after 48 h with a 100-nM dose of this siRNA, both by Western blot (Fig.1*D*) and immunofluorescence (Fig. 1*E*).

We next analyzed if knockdown of hGwl in cells resulted in any alteration in mitotic entry or in the maintenance of the mi-

totic state. FACS, after a 48-h siRNA treatment of asynchronous cells, produced an accumulation (40%) of cells with a 4n DNA content and a notable increase of subdiploid cells, indicating that the knockdown of hGwl induced G2/M cell cycle-dependent defects and an increase in cell death (Fig. 1*F*).

Immunofluorescence analysis revealed that the accumulation of cells with 4n DNA content was not primarily because of an increase in the mitotic index (6.9% of mitotic cells from 40% of knockdown cells containing 4n DNA content), but likely because of an increase in multinuclear cells (Fig.1*G*, vii and Fig. S3*A*), although some of these 4n cells could be arrested in G2.

The multinuclear cells are likely the result of an improper cytokinesis, as there were numerous signs of incorrect mitotic divisions, with many cells displaying DNA bridges connecting daughter cells (Fig. 1*G*, vi and Fig. S3*A*). Finally, in some cases we noticed a more severe cytokinesis phenotype, with one daughter cell containing the complete DNA content, whereas the other was completely devoid of chromatin (Fig. 1*G*, viii).

In addition to multinuclear cells, we also observed significant chromosome abnormalities in mitotic cells. Metaphase cells showed either a mass of under-condensed chromatin that was scattered along the spindle (Fig. 1*G*, iii) or condensed chromosomes that did not correctly congress to the metaphase plate (Fig. 1*G*, v). A very low number of anaphases were observed, but those that were present showed multiple lagging chromosomes and chromosome bridges (Fig. 1*G*, iv). No major defects were observed in the spindle, although some were longer and appeared to have a lower number of microtubules (Fig. 1*G*, iii). These phenotypes were specific to Gwl knockdown, as similar phenotypes were observed with two other siRNAs targeting different regions of hGwl mRNA (Fig. S3 *B* and *C*).

The mitotic defects observed after hGwl knockdown are indicative of a premature exit from mitosis. To assess whether this was the case, time-lapse movies were performed on synchronized HeLa cells stably expressing EB3-GFP and H2B-CherryFP. Scramble siRNA-treated cells progressed through mitosis normally (Fig. 2*A* and Movie S1). One of the major phenotypes observed at a 50-nM dose of hGwl siRNA was a decrease in the total number of cells that were able to perform mitosis during the experiment (65 vs. 80% in controls), suggesting that some cells were arrested at G2, similar to what has been described in *Xenopus* egg extracts (11). However, most cells were still able to enter into mitosis, albeit with numerous mitotic defects. Although the mitotic spindle structure did not contain any observable defects, in some cases the spindle rotated dynamically within the cell, performing several rotations (Fig. 2*A*, Fig. S4, and Movie S2). Moreover, some knockdown cells showed normal formation of the metaphase plate; however, chromosomes segregated incorrectly, resulting in the formation of DNA bridges ("segregation defects") (Fig. 2*A* and Movie S3). Other cells displayed clear defects in chromosome congression, showing a high number of lagging chromosomes that were constantly present at the spindle poles and never correctly congressed to the metaphase plate. Many of these cells arrested during metaphase for long periods and finally died ("metaphase arrest") (Fig. 2*A* and Movie S3), whereas others first delayed during metaphase and subsequently performed an aberrant anaphase, with significant chromosome segregation and cytokinesis defects ("metaphase delay") (Fig. 2*A* and Movie S4). This delay or arrest in metaphase appeared to be mediated by the spindle assembly checkpoint (SAC), as the SAC proteins BubR1 and Aurora B were clearly localized at the kinetochores in hGwl-depleted cells (Fig. 2*B*). Finally, a subpopulation of cells displayed the most severe mitotic phenotype, in which cells entered and exited mitosis prematurely without forming a metaphase plate and with severe chromosome segregation defects ("no metaphase") (Fig. 2*A* and Movie S5). In these cells, a cytokinesis furrow was formed and attempted to pinch through the DNA (Fig. S5), promoting the formation of multiple DNA bridges that were resolved by the cell rejoining and the formation of a multinuclear cell (Fig. 2*A* and Movie S5).

Comparing the different phenotypes (segregation defects, metaphase arrest, metaphase delay, and no metaphase) against the time spent in mitosis, we noticed that all hGwl knockdown cells had an increased transit time through mitosis. Mitotic length in the metaphase arrest and metaphase delay phenotypes was four times longer compared with those of control cells. However, mitotic length in the segregation defects and no metaphase plate phenotypes was only twice that of controls (Fig. 2*C*), suggesting that despite the total absence of chromosome alignment, cells displaying a no metaphase plate phenotype were unable to maintain the mitotic state. No difference was observed in spindle rotation between the various subpopulation of hGwl-depleted cells, although cells that maintained prolonged SAC activity were more likely to rotate. Thus, similar to *Xenopus* extracts, one of the major phenotypes of hGwl knockdown is a premature exit from mitosis. The knockdown of hGwl at a 50-nM dose induced a variety of phenotypes, probably because of the intrinsic heterogeneity of the siRNA transfection procedure. To try to separate the various phenotypes, we repeated the experiment using various concentrations of hGwl siRNA (25, 50, and 100 nM). As the concentration of siRNA increased, there was a shift from cells that maintained the mitotic state (cells displaying the phenotypes segregation defects, metaphase arrest, and metaphase delay) toward cells incapable of maintaining mitosis (cells displaying the no metaphase plate phenotype) (Fig. 3*A*). Accordingly, mitotic length decreased concomitantly with the increasing siRNA concentration (Fig. 3*B*).

Furthermore, as the dose of siRNA increased, there was a significant delay in the time of mitotic entry (Fig. 3*C*), suggesting that cells were arrested in G2. To assess this issue in more detail,

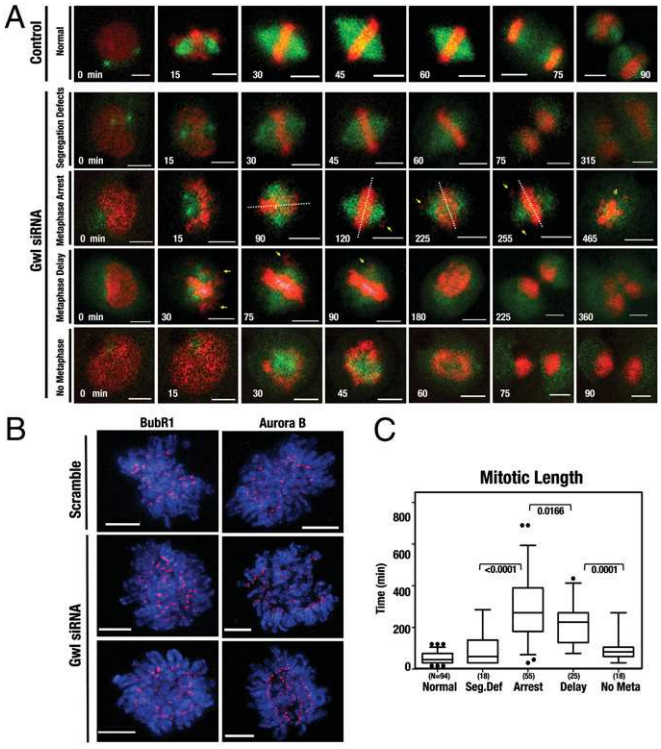


Fig. 2. hGwl knockdown promotes heterogeneity of phenotypes of varying severity in human cells. (*A*) HeLa cells stably expressing EB3-GFP (green) and H2B-CherryFP (red) were transfected with 50 nM of Scramble (Control) or hGwl siRNA for 24 h. After transfection, cells were synchronized with thymidine block. Movies were started 5 h after release and images were taken every 15 min. Notations indicate, time of the frame in minutes (white), lagging chromosomes (yellow arrows), metaphase plate orientation (dotted white lines), and cell death (yellow "d"). (Scale bars, 5 μm.) (*B*) Mitotic HeLa cells were treated with scramble or hGwl siRNA and stained with anti-Aurora B or anti-BubR1 (red) antibodies and with DAPI (DNA, blue). Shown are the deconvoluted maximum projections from 0.3-μm Z- sections. (Scale bars, 5 μm.) (*C*) Cells from *A* were separated according to their mitotic phenotype and plotted against mitotic length. Mitotic entry was determined by analyzing the first signs of DNA condensation cross-reinforced with cell rounding. Mitotic exit was scored based on chromosome segregation at anaphase or DNA decondensation. Shown are box-plots with 5 to 95% confidence intervals (black dots indicate outliers). Two-tailed unpaired Student *t* tests were performed to determine statistical relevance; significant *P* values are shown.

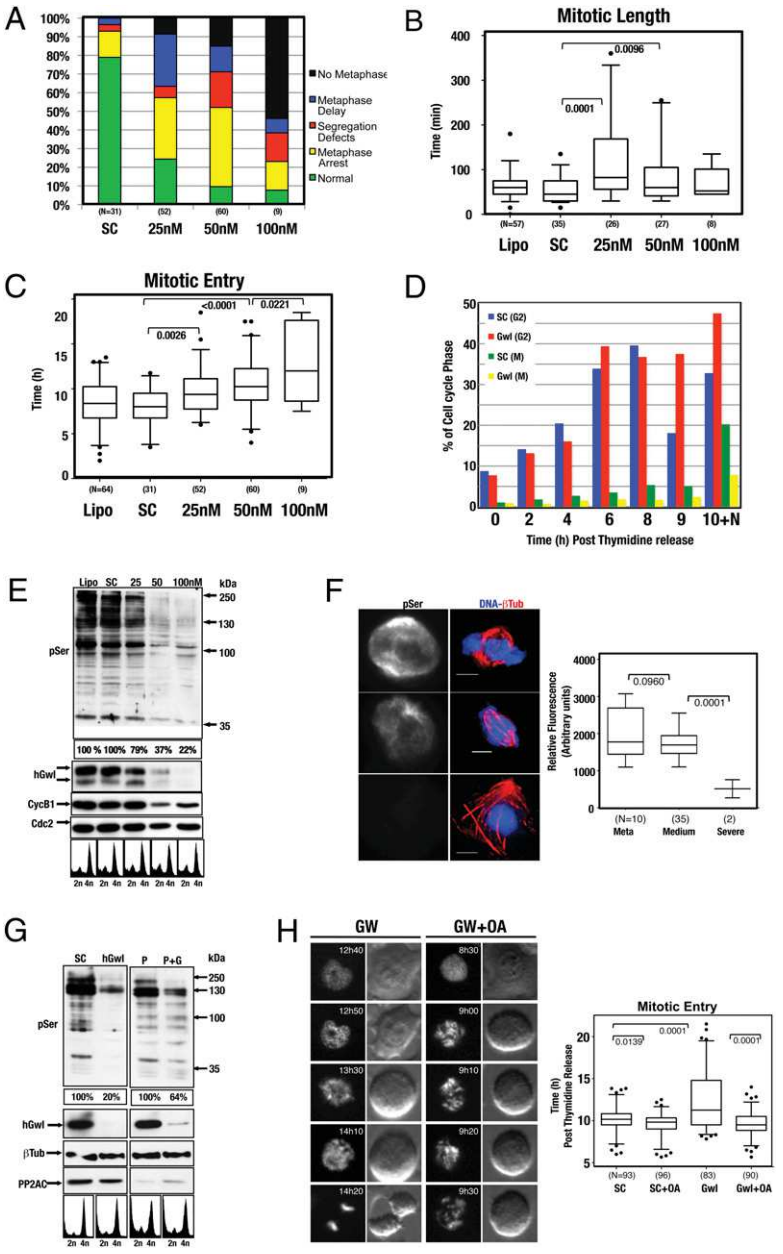


Fig. 3. hGwl knockdown phenotypes can be rescued by the inactivation of PP2A. (*A*) Cells treated with increasing doses of hGwl siRNA were analyzed by time-lapse microscopy, as in Fig. 2*A*. The mitotic population was then scored on different criteria: cells that performed a correct mitosis (normal) and cells that displayed the various aberrant phenotypes (no metaphase plate, metaphase arrest, metaphase delay, and segregation defects). (*B*) Shown are box-plots for the mitotic length in non-transfected cells (Lipo) and cells transfected with Scramble siRNA (SC) or increasing doses of hGwl siRNA (25, 50, and 100 nM). Mitotic entry and exit was determined as in Fig.2. The small percentage of siRNA-treated cells that completed mitosis correctly was not included in the analysis, as these were likely to be untransfected cells. The total number of cells observed in each condition is listed (N). Black dots indicate outliers. (*C*) Similar to *B* except that the time of mitotic entry instead of the mitotic length was measured. (*D*) HeLa cells were transfected with 100 nM of siRNA and synchronized with thymidine. The number of cells at S, G2, and mitosis at the indicated times was measured by 2D-FACS (propidium Iodide versus anti-phospho Ser Cdk1 staining). In one instance, cells were released and treated with nocodazole (100 ng/mL) for 10 h to capture the mitotic population (10+N). (*E*) HeLa cells were transfected or not (Lipo) with scramble (SC) or increasing amounts of siRNA (25, 50, and 100 nM), synchronized by thymidine, and released into nocodazole (100 ng/mL) for 16 h. The phosphorylation of the different cyclin B-Cdc2 substrates (pSer), as well as the levels of cyclin B1, hGW, and Cdc2 were analyzed. The pSer staining was equalized against Cdc2 and the percentage of staining in each condition is indicated. (*F*) HeLa cells were transfected with 50 nM of siRNA, synchronized by thymidine, and 16 h later analyzed by immunofluorescence using anti-β-tubulin (red), anti-phospho Ser antibodies, and DAPI for DNA (blue). Cells were separated into the various mitotic phenotypes observed: normal metaphase (Meta), metaphase with uncongressed chromosomes or undercondensed chromatin scattered along the spindle (Medium), or cells that underwent mitotic exit (Severe). Identical acquisition exposure-time conditions were used to capture images. Scale bar, 5 μm. The intensity of staining obtained with anti-phospho Ser antibody was measured in each unaltered cell and displayed as box-plots with 5 to 95% confidence intervals. Two-tailed unpaired student *t* tests were performed to determine statistical relevance; significant *P* values are shown. (*G*) HeLa cells were transfected with 100 nM of human Greatwall (hGwl), PP2AC (P), or both human Greatwall and PP2AC (P + G) siRNAs. The pSer was equalized against β-tubulin. Percentage of phosphorylation of the single hGwl knockdown (hGwl) was compared with scramble siRNA knockdown (SC), whereas the percentage of phosphorylation of the double PP2AC/hGwl knockdown (P + G) was compared with single PP2AC knockdown (P). FACS analysis confirmed that the majority of cells were arrested in G2/M. (*H*) HeLa H2B-CherryFP cells were transfected with 100 nM of Scramble (SC) or hGwl siRNA (GW) and, 24 h later, synchronized with thymidine. Six hours after release, cells were treated (+ OA) or not (SC and Gwl) with 500 nM of OA and followed by time-lapse microscopy with images captured every 10 min. Time of mitotic entry was determined by DNA condensation and cell detachment in each cell and displayed as box-plots with 5 to 95% confidence intervals. Two-tailed unpaired student *t* tests were performed to determine statistical relevance; significant *P* values are shown.

synchronized cells were analyzed by 2D FACS (Fig. 3*D*). Both Scramble- and hGwl siRNA-treated cells transited S and entered G2 phase with similar kinetics, indicating that hGwl is not critical for S-phase progression. Entry into mitosis in Scramble cells began at 8 h, peaking at 9 h after thymidine release. In contrast, there was a clear impairment in the ability of hGwl-depleted cells to enter mitosis, with almost three times more (7.8 vs. 20.9%) mitotic cells present in the Scramble-treated nocodazole captured 10 h time-point (10+N). Thus, at the highest dose of hGwl siRNA, cells arrest in G2.

It has been recently shown that the inhibition of PP2A phosphatase activity is required to allow the phosphorylation of cyclin B-Cdc2 substrates, which promotes entry and maintains mitosis (3, 10, 11). Therefore, we next analyzed the capacity of these cells to phosphorylate the different cyclin B-Cdc2 substrates at the different doses of siRNA (Fig. 3*E*). As most cells treated with a dose of 25 nM of siRNA arrest in mitosis after nocodazole treatment, we only observed a slight decrease in the levels of phosphorylation of cyclin B-Cdc2 substrates. However, at the higher doses of 50 and 100 nM, the phosphorylation levels of cyclin B-Cdc2 substrates were significantly reduced. These data are most likely a result of the G2 arrest, although a partial degradation of cyclin B was also observed, probably as a result of cells that entered and subsequently slipped out of mitosis. In agreement with these results, we observed only a slight decrease in the immunostaining of cyclin B-Cdc2 substrates in mitotic hGwl-depleted cells (Fig. 3*F*), whereas a significant decrease in this signal was observed when cells prematurely exited mitosis (note decondensed DNA in the presence of a mitotic spindle). This decrease in the phosphorylation pattern of cyclin B-Cdc2 substrates was specific to hGwl knockdown, as it was mostly

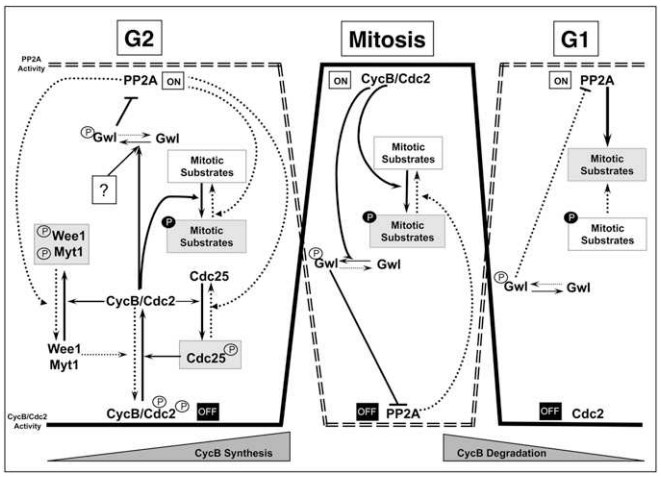


Fig. 4. Hypothetical model showing the different steps required for mitotic entry. Black arrows denote pathways active during mitotic entry. Dotted arrow denotes pathways that are inhibited at mitotic entry, during mitosis, or at mitotic exit.

rescued by the concomitant transfection of a siRNA-resistant plasmid encoding *Xenopus* Gwl (Fig. S6).

To assess if the decrease in cyclin B-Cdc2 substrate phosphorylation after hGW knockdown could be the consequence of an increase in PP2A activity because of a loss of hGW, we performed a double hGwl-PP2A siRNA knockdown (Fig. 3*G*). As expected, hGwl knockdown decreased the cyclin B-Cdc2 substrate phosphorylation by 80% in nocodazole captured cells. When PP2A siRNA knockdown was performed, we noticed that the general substrate phosphorylation pattern was partially decreased compared with the Scramble siRNA. This decrease is probably because of the 15% increase in cell death induced by PP2A depletion. Importantly, the double hGwl/PP2A knockdown rescued the general phosphorylation pattern of cyclin B-Cdc2 substrates from 20 to 64%. These results indicate that the hGwl knockdown phenotype is likely mediated by increased PP2A activity. However, it is possible that the knockdown of PP2A could promote a pleiotropic effect in other phases of the cell cycle (14). Thus, to more specifically investigate the role of Gwl in the regulation of PP2A activity at mitotic entry, we analyzed if the inhibition of this phosphatase by okadaic acid (OA) could rescue the G2 arrest, the most severe phenotype observed in hGwl knockdown cells. Cells transfected with 100 nM of hGwl siRNA, were synchronized in G1/S phase, treated with OA, and followed by time-lapse microscopy. The addition of OA at the end of S phase promoted a small but consistent advance in mitotic entry in Scramble- (SC) transfected cells (SC cells entered at an average time of 10 h 20 min after release versus 9 h 35 min in OA-treated cells) (Fig. 3*H*). As previously observed, hGwl knockdown cells delayed or arrested for a significant time in G2 (mean time of mitotic entry 12 h 12 min, with significant number of cells arrested in G2 for as long as 20 h postrelease) (Movie S6). Importantly, OA treatment rescued the G2 delay/arrest induced by hGwl knockdown and cells entered into mitosis with similar kinetics as control cells (mean-time of mitotic entry 9 h 45 min versus 9 h 35 min in OA-treated SC control cells), indicating that G2 arrest was mediated by an increased PP2A activity (Movie S7).

Discussion

Historically, mitotic entry and exit was thought to be directly equivalent to cyclin B-Cdc2 activation and inactivation, respectively, and the activity of the phosphatases required for cyclin B/Cdc2 substrate dephosphorylation during mitosis was thought to be constant. According to this hypothesis, the large increase in cyclin B/cdc2 activity was sufficient to overcome the background dephosphorylation of mitotic substrates, thereby promoting mitotic entry. Similarly, inactivation of the cyclin B-Cdc2 complex by cyclin B degradation was sufficient to trigger mitotic exit. However, recent data from our and other laboratories has demonstrated that PP2A is highly regulated during mitotic entry and exit (3, 10, 11). Therefore, the old cell-cycle model now must be updated to include a different regulator of mitosis that modulates PP2A during this phase of the cell cycle. In this work we demonstrate that Gwl is this critical and evolutionally conserved regulator of PP2A in human cells.

Greatwall is a unique kinase whose role is essential in *Xenopus* egg extracts to promote mitotic entry and to maintain the mitotic state (8, 10, 11). Here, we identified MAST-L as the functional human ortholog of Gwl and demonstrated that its role is evolutionary conserved from *Xenopus* to human cells. During mitotic division, there is a highly regulated balance between cyclin B-Cdc2 and PP2A, and this balance dictates the phosphorylation level of mitotic substrates. The regulation of this balance, performed by Gwl-dependent inhibition of PP2A, is essential to allow the correct entry into and exit from mitosis. Accordingly, the phenotypes observed after hGwl knockdown likely reflect the differential phosphorylation pattern of cyclin B-Cdc2 substrates. Thus, cells lacking hGwl have a fully active PP2A that will completely dephosphorylate cyclin B-Cdc2 substrates, preventing cells from entering mitosis. Cells in which hGwl is partially present show an incomplete inactivation of PP2A. If this inactivation is sufficient, then cells can enter into mitosis, but display only a partial phosphorylation of the different mitotic substrates of cyclin B-Cdc2. Depending on the level of cyclin B-Cdc2-substrate phosphorylation, cells will display different mitotic defects, such as improper chromosome congression or spindle rotation, which in some cases leads to a permanent prometaphase arrest by the SAC, and in others can lead to mitotic slippage. In this regard, other reports described the presence of similar mitotic defects because of a partial inhibition of cyclin-Cdk activity (15–17). For example, siRNA knockdown of cyclin A results in improper chromosome congression and spindle rotation (15). Moreover, the inhibition of cyclin B-Cdc2 activity in mitotic cells also induced mitotic slippage, resulting in severe cytokinesis defects (17–19).

The exact mechanism of how Gwl regulates PP2A activity is currently unknown, although we previously demonstrated that xGwl can bind with PP2A/A and A/C (11). PP2A itself is a complicated ternary complex comprised of a catalytic subunit (C), a scaffold subunit (subunit A), and a regulatory B subunit (14). The substrate specificity of the PP2A complex is thought to be conferred by the B subunit that includes the B55 (B), B56 (B'), and B72/130 (B''), with each also containing multiple isoforms. Recently, PP2A-B55∂ was identified as a key phosphatase responsible for removing cyclin B/cdc2 phosphorylations (3). There are several possible phosphorylation sites in B55∂, suggesting that this complex could be regulated by phosphorylation, perhaps by Gwl itself.

It is clear from our work and others that the classic cyclin/cdk cell-cycle model, must be perfectly coordinated with the phosphatases (especially PP2A) for correct mitotic entry, progression, and exit. In this regard, it has been shown that cyclin B-Cdc2 is capable of phosphorylating and activating Gwl kinase in vitro (8), suggesting that cyclin B-Cdc2 itself would induce PP2A inhibition through Gwl activation (Fig. 4). Thus, it is possible that at mitotic entry, cyclin B-Cdc2 is first activated and this activation would further induce Gwl phosphorylation and activation. Accordingly, our data identified a pool of Gwl localized at the centrosome during G2 phase, the same subcellular and temporal localization where cyclin B-Cdc2 is first activated (20). Activated Gwl could subsequently induce PP2A inhibition, permitting the correct phosphorylation of the different cyclin B-Cdc2 substrates. However, PP2A can also regulate cyclin B-Cdc2 activity, as the Wee1/Myt1 inhibitory kinases and the Cdc25 activatory phosphatase are themselves substrates of PP2A. Thus, the G2 arrest and the premature mitotic exit observed in Gwl knockdown cells are probably the result of both a dephosphorylation of cyclin B-Cdc2 substrates and a subsequent inhibition of cyclin B-Cdc2 by Myt1/Wee1/Cdc25 dephosphorylation. Therefore, cyclin B-Cdc2 kinase cannot be activated at mitotic entry if there is not at first a partial inhibition of PP2A. This inhibition of PP2A could be mediated by a partial activation of Gwl through a cyclin B-Cdc2-independent phosphorylation of Gwl. Once cyclin B-Cdc2 is activated, it could act as the starter, promoting full activation of Gwl and mitotic phosphorylation. The fact that cyclin B-Cdc2 could be one of the starters that promotes mitotic entry

would assure that cells enter into mitosis only when a complete activation of this kinase is achieved.

Once cells enter into mitosis, Gwl-dependent inhibition of PP2A is still required to maintain the mitotic state. We have previously demonstrated that even in the presence of a high cyclin B-Cdc2 activity, the substrates of this kinase become dephosphorylated and *Xenopus* egg extracts slip out of mitosis when PP2A cannot be inactivated by Gwl (11). Finally, at mitotic exit, cyclin B is degraded by the ubiquitin-dependent pathway, promoting the inactivation of the cyclin B-Cdc2 complex. This inactivation results in the dephosphorylation of Gwl and the reactivation of PP2A. Once activated, PP2A induces dephosphorylation of mitotic substrates, triggering an irreversible exit from mitosis until the next G2, when cyclin B will accumulate again. Interestingly, to date, mitotic slippage has been solely attributed to the slow continual degradation of cyclin B (21). However, from our results, premature activation of PP2A or loss of Gwl during mitosis is a unique mechanism that could induce mitotic slippage independently of cyclin B degradation. This finding could have broad implications in defining new chemotherapies for cancer treatments that target the mitotic slippage pathway.

Materials and Methods

Chemicals, Reagents, and Antibodies. MG132 and OA were purchase from Calbiochem. Anti-Cyclin B1 and Cdc2 (Santa Cruz), anti-Phospho-(Ser) CDK Substrate and Phospho- Cdc2-Tyr15 (Cell Signaling), monoclonal 1D6 against PP2AC (Millipore), anti-Aurora B and BUBR1 (Becton Dickinson), and monoclonal anti-γ and β-Tubulin (Sigma-Aldrich) were used. Anti-Cdc25 and Cdc27 were obtained as previously described (7, 19-22). pCMVsport6-MAST-L was obtained from RZPD Deutsches Ressourcenzentrum fuer Genomforschung GmbH, amplified by PCR and subcloned in the pGEX4T2 plasmid. The fusion protein was expressed in *Escherichia coli*. Inclusion bodies were prepared and used to immunize rabbits. Immune serum against the full-length protein (anti-hGwl) was affinity-purified on an immobilized GST-MAST-L column. Anti-C-terminal hGwl antibodies were also generated against the last 12 amino acids of the C-terminal sequence of this protein. Peptides were coupled to thyroglobulin for immunization and to immobilized BSA for affinity purification, as previously described (23).

Cell Synchrony. Thymidine block/release synchronizations were performed as previously described (24). For nocodazole synchrony, cells were first released from G1/S thymidine block, and treated with 100 ng/mL of nocodazole for 16 h. Floating cells were then removed, washed three times, and seeded back in fresh media.

siRNA Design and Transfection. The Promega T7 Ribomax Express RNAi system was used to produce in vitro transcribed siRNAs against human Gwl and PP2Ac. The following target sequences were identified and appropriate sense and antisense oligonucleotides were synthesized. For human Gwl positions from #1 = 389–409, #2 = 840–860, and #3 = 1516–136. For PP2Ac, position #169–187, which targeted both α and β isoforms. The following Scramble sequence was used SC = GGATTGTGCGGTCATTAAC, as a control. Transfection of siRNA was performed using Lipofectamine RNAiMax Reagent (Invitrogen) as per the manufacturer's instructions. Rescue experiments were performed as per Fig. S6. Briefly, synchronized HeLa cells were first transfected with hGwl siRNA sequence #2 and subsequently transfected with a plasmid (PCS2) encoding full length *Xenopus* Gwl. Cells were synchronized, captured in mitosis with nocodazole, and analyzed by Western blot.

Immunofluorescent Staining. Cells were grown on poly-lysine coated glass coverslips and prepermeabilized for 30 s in PHEM buffer (60 mM Pipes, 25 mM hepes, 1 mM EGTA, 2 mM MgCl2) plus 0.25% Triton X-100. Then, cells were fixed for 10 min in PHEM buffer with 3.7% formaldehyde and 0.5% Triton X-100, washed, and blocked (3% BSA, 0,1% tween 20 in PBS) for 30 min. Primary antibodies were incubated for 2 h at room temperature in blocking solution. Images were captured using a Leica DM6000 microscope coupled with a Coolsnap HQ2 camera, using a Leica 63× APO 1.4 lens, powered by metamorph 7.1 software. For mitotic cells, 0.3-m Z- sections were taken and deconvoluted using Huygens 3.0 software. Maximum projections and total fluorescence measurements were performed with Image J, metaphase plate measurements and false coloring were performed using Photoshop CS4 Extended software.

Live Cell Imaging. Thymidine-synchronized cells were filmed with a Micromax YHS 1300 camera coupled to a Zeiss Axiovert 200 M inverted microscope fitted with a Zeiss slider PlasDIC 32× LD A plan NA 0.4 lens, Zeiss mercury lamp, and controlled by Metamorph 7.1 software (Molecular Devices). Images, both phase-contrast and GFP/CherryFP fluorescence, were taken every 10 to 15 min. The resulting images were processed, analyzed, and false-colored using Photoshop CS4 Extended software. Box graphs and statistical analysis was performed using GraphPad Prism 5. Mitotic entry, length, exit, and cell death were determined as described in Fig. S7. Briefly, the following parameters were used to identify mitotic entry: first appearance of a mitotic spindle with condensed chromosomes, loss of a nucleolus, and rounding up of the cell from the culture plate. Exit was scored based on the first appearance of anaphase, thus visualization of chromosome separation, pinching of the membrane, and appearance of a midbody.

ACKNOWLEDGMENTS. We thank Dr. J. Ellenberg (European Molecular Biology Laboratory) and Dr. V. Doye (Institut Jacques-Monod) for the generous gift of the Hela EB3/H2B cell line, Montpellier RIO Imaging for microscopy facilities, and B. Gabrielli and K. Rogowski for helpful comments on the manuscript. This work was supported by the Ligue Nationale Contre le Cancer (Equipe Labellisée, 2004–2008). A.B. and E.B. are "Fondation pour la Recherche Medicale" and "Ligue Nationale Contre le Cancer" Fellows respectively.

1. Jackman MR, Pines JN (1997) Cyclins and the G2/M transition. *Cancer Surv* 29:47–73.
2. Bollen M, Gerlich DW, Lesage B (2009) Mitotic phosphatases: From entry guards to exit guides. *Trends Cell Biol* 19:531–541.
3. Mochida S, Ikeo S, Gannon J, Hunt T (2009) Regulated activity of PP2A-B55 delta is crucial for controlling entry into and exit from mitosis in *Xenopus* egg extracts. *EMBO J* 28:2777–2785.
4. Morgan DO (1997) Cyclin-dependent kinases: Engines, clocks, and microprocessors. *Annu Rev Cell Dev Biol* 13:261–291.
5. Glotzer M, Murray AW, Kirschner MW (1991) Cyclin is degraded by the ubiquitin pathway. *Nature* 349:132–138.
6. Bettencourt-Dias M, et al. (2004) Genome-wide survey of protein kinases required for cell cycle progression. *Nature* 432:980–987.
7. Yu J, et al. (2004) Greatwall kinase: A nuclear protein required for proper chromosome condensation and mitotic progression in *Drosophila*. *J Cell Biol* 164:487–492.
8. Yu J, Zhao Y, Li Z, Galas S, Goldberg ML (2006) Greatwall kinase participates in the Cdc2 autoregulatory loop in *Xenopus* egg extracts. *Mol Cell* 22:83–91.
9. Zhao Y, et al. (2008) Roles of Greatwall kinase in the regulation of cdc25 phosphatase. *Mol Biol Cell* 19:1317–1327.
10. Castilho PV, Williams BC, Mochida S, Zhao Y, Goldberg ML (2009) The M phase kinase Greatwall (Gwl) promotes inactivation of PP2A/B55delta, a phosphatase directed against CDK phosphosites. *Mol Biol Cell* 20:4777–4789.
11. Vigneron S, et al. (2009) Greatwall maintains mitosis through regulation of PP2A. *EMBO J* 28:2786–2793.
12. Gandhi MJ, Cummings CL, Drachman JG (2003) FLJ14813 missense mutation: A candidate for autosomal dominant thrombocytopenia on human chromosome 10. *Hum Hered* 55:66–70.
13. Johnson HJ, et al. (2009) In vivo inactivation of MASTL kinase results in thrombocytopenia. *Exp Hematol* 37:901–908.
14. Janssens V, 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.
15. Beamish H, et al. (2009) Cyclin A/cdk2 regulates adenomatous poylposis coli-dependent mitotic spindle anchoring. *J Biol Chem* 284:29015–29023.
16. Burgess A, et al. (2006) Inhibition of S/G2 phase CDK4 reduces mitotic fidelity. *J Biol Chem* 281:9987–9995.
17. Potapova TA, et al. (2006) The reversibility of mitotic exit in vertebrate cells. *Nature* 440:954–958.
18. Potapova TA, Daum JR, Byrd KS, Gorbsky GJ (2009) Fine tuning the cell cycle: Activation of the Cdk1 inhibitory phosphorylation pathway during mitotic exit. *Mol Biol Cell* 20:1737–1748.
19. Vassilev LT, et al. (2006) Selective small-molecule inhibitor reveals critical mitotic functions of human CDK1. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:10660–10665.
20. Jackman M, Lindon C, Nigg EA, Pines J (2003) Active cyclin B1-Cdk1 first appears on centrosomes in prophase. *Nat Cell Biol* 5:143–148.
21. Brito DA, Rieder CL (2006) Mitotic checkpoint slippage in humans occurs via cyclin B destruction in the presence of an active checkpoint. *Curr Biol* 16:1194–1200.
22. Lorca T, et al. (1998) Fizzy is required for activation of the APC/cyclosome in Xenopus egg extracts. *Embo J* 17:3565–3575.
23. Abrieu A, et al. (2001) Mps1 is a kinetochore-associated kinase essential for the vertebrate mitotic checkpoint. *Cell* 106:83–93.
24. Gabrielli BG, De Souza CP, Tonks ID, Clark JM, Hayward NK, Ellem KA (1996) Cytoplasmic accumulation of cdc25B phosphatase in mitosis triggers centrosomal microtubule nucleation in HeLa cells. *J Cell Sci* 109:1081–1093.

Constant regulation of both the MPF amplification loop and the Greatwall-PP2A pathway is required for metaphase II arrest and correct entry into the first embryonic cell cycle

Thierry Lorca*, Cyril Bernis‡, Suzanne Vigneron, Andrew Burgess, Estelle Brioudes, Jean-Claude Labbé and Anna Castro*

Universités Montpellier 2 et 1, Centre de Recherche de Biochimie Macromoléculaire, CNRS UMR 5237, IFR 122, 1919 Route de Mende, 34293 Montpellier CEDEX 5, France

*Authors for correspondence (thierry.lorca@crbm.cnrs.fr; anna.castro@crbm.cnrs.fr)

‡Present address: Section of Cell and Developmental Biology, Division of Biological Sciences, University of California San Diego, La Jolla, CA 92093-0347, USA

Accepted 18 April 2010
Journal of Cell Science 123, 2281-2291
© 2010. Published by The Company of Biologists Ltd
doi:10.1242/jcs.064527

Summary

Recent results indicate that regulating the balance between cyclin-B–Cdc2 kinase, also known as M-phase-promoting factor (MPF), and protein phosphatase 2A (PP2A) is crucial to enable correct mitotic entry and exit. In this work, we studied the regulatory mechanisms controlling the cyclin-B–Cdc2 and PP2A balance by analysing the activity of the Greatwall kinase and PP2A, and the different components of the MPF amplification loop (Myt1, Wee1, Cdc25) during the first embryonic cell cycle. Previous data indicated that the Myt1-Wee1-Cdc25 equilibrium is tightly regulated at the G2-M and M-G1 phase transitions; however, no data exist regarding the regulation of this balance during M phase and interphase. Here, we demonstrate that constant regulation of the cyclin-B–Cdc2 amplification loop is required for correct mitotic division and to promote correct timing of mitotic entry. Our results show that removal of Cdc25 from metaphase-II-arrested oocytes promotes mitotic exit, whereas depletion of either Myt1 or Wee1 in interphase egg extracts induces premature mitotic entry. We also provide evidence that, besides the cyclin-B–Cdc2 amplification loop, the Greatwall-PP2A pathway must also be tightly regulated to promote correct first embryonic cell division. When PP2A is prematurely inhibited in the absence of cyclin-B–Cdc2 activation, endogenous cyclin-A–Cdc2 activity induces irreversible aberrant mitosis in which there is, first, partial transient phosphorylation of mitotic substrates and, second, subsequent rapid and complete degradation of cyclin A and cyclin B, thus promoting premature and rapid exit from mitosis.

Key words: Greatwall, PP2A, Myt1, Wee1, Cdc25, Mitosis

Introduction

Entry and exit of mitosis are regulated by the cyclin-B–Cdc2 complex, also known as the M-phase-promoting factor (MPF). Mitotic entry is induced by the activation of this complex by phosphorylation (Nurse, 1990), whereas mitotic exit is promoted by inactivation through the ubiquitin-dependent degradation of its cyclin B regulatory subunit (Glotzer et al., 1991).

During G2, cyclin-B–Cdc2 is maintained in an inactive state by phosphorylation of the catalytic Cdc2 subunit on two inhibitory residues: threonine 14 and tyrosine 15 (Draetta and Beach, 1988; Gould and Nurse, 1989; Krek and Nigg, 1991). The identity of the kinases responsible for these phosphorylation events was first shown in yeast. Different genetic studies indicated that the protein kinases encoded by the genes *wee1* and *myt1* acted as negative regulators of cyclin-B–Cdc2 (Lundgren et al., 1991; Russell and Nurse, 1987a). Subsequent studies performed with human and *Xenopus* Wee1 and Myt1 proteins demonstrated a role for these two kinases in the phosphorylation of Thr14 and Tyr15 of Cdc2 (Mueller et al., 1995a; Mueller et al., 1995b; Parker and Piwnica-Worms, 1992). The subsequent activation of the cyclin-B–Cdc2 complex at mitotic entry is promoted by the dephosphorylation of these two inhibitory residues of Cdc2 by the phosphatase Cdc25 (Gautier et al., 1991; Kumagai and Dunphy, 1991; Millar et al., 1991; Strausfeld et al., 1991). At the end of G2, abrupt dephosphorylation of Tyr15 and Thr14 residues by Cdc25 triggers initial activation of cyclin-B–Cdc2, which in turn further activates Cdc25 and inactivates Wee1 and Myt1 by phosphorylation, resulting in full activation of the cyclin-B–Cdc2 complex (Hoffmann et al., 1993; Izumi et al., 1992; Mueller et al., 1995b; Russell and Nurse, 1987b; Smythe and Newport, 1992). This positive-feedback mechanism is called the MPF amplification loop.

Besides the direct regulation of cyclin-B–Cdc2 by this amplification loop, other feedback mechanisms also indirectly regulate cyclin-B–Cdc2 activation. In this regard, the Polo kinase Plx1 participates in the activation of cyclin-B–Cdc2 by directly phosphorylating and activating the Cdc25 phosphatase (Abrieu et al., 1998; Kumagai and Dunphy, 1996; Qian et al., 1998; Qian et al., 2001), and by promoting ubiquitin-dependent degradation of Wee1 (Watanabe et al., 2004) or inactivation of Myt1 (Nakajima et al., 2003).

The current model proposes that mitotic entry is promoted by cyclin-B–Cdc2 activation through the MPF amplification loop (Nurse, 1990), whereas mitotic exit is triggered by the inactivation of this complex through ubiquitin-dependent degradation of cyclin B (Murray et al., 1989). However, the involvement of other phosphatases in mitosis entry and exit has also been reported. In

Journal of Cell Science

Journal of Cell Science

this regard, it has been shown in interphase *Xenopus* egg extracts that the inhibition of PP2A by okadaic acid (OA) promotes cyclin-B–Cdc2 activation and blocks Cdc25 dephosphorylation, suggesting that PP2A negatively regulates MPF by maintaining Cdc25 in its inactive dephosphorylated form (Clarke et al., 1993; Felix et al., 1990). Accordingly, in fission yeast, decreased activity of PP2A induces premature mitosis, probably through the activation of Cdc25 (Kinoshita et al., 1990; Kinoshita et al., 1993). The role of PP2A in mitotic exit has also been suggested. Thus, inhibition of PP2A in *Xenopus* extracts from metaphase-II-arrested oocytes induces cyclin B degradation and exit from mitosis (Lorca et al., 1991). In addition, a decrease in PP2A activity promotes chromosome nondisjunction in fission yeast (Kinoshita et al., 1990). Moreover, a mutant *CDC55* in budding yeast, which encodes a PP2A regulatory subunit, displays premature separation of sister chromatids and mitotic exit in the presence of an active spindle-assembly checkpoint (Minshull et al., 1996). Mitotic exit in this mutant takes place in the absence of cyclin B degradation through the inactivation of Cdc28 on its inhibitory residues. Finally, the activation of Cdc14 is also required in budding yeast to promote cyclin-B–Cdc2 substrate dephosphorylation and mitotic exit (D'Amours and Amon, 2004; Stegmeier and Amon, 2004). However, the Cdc14 phosphatase does not play a major role in late mitosis in fission yeast or in higher eukaryotes (Trautmann and McCollum, 2002).

Recent results have shed light on the mechanisms by which PP2A can control mitotic entry and exit (Castilho et al., 2009; Mochida et al., 2009; Vigneron et al., 2009). These new data indicate that PP2A induces dephosphorylation of MPF substrates. To promote mitotic entry and to maintain the mitotic state, this phosphatase must be inhibited by the recently identified Greatwall kinase. At mitotic exit, however, PP2A must be activated again to promote cyclin-B–Cdc2 substrate dephosphorylation (Castilho et al., 2009; Vigneron et al., 2009). Thus, it appears that regulating the balance between the cyclin-B–Cdc2 kinase and PP2A phosphatase is crucial to permit correct mitotic entry and exit.

In this work, we studied the regulation mechanisms controlling the balance between cyclin-B–Cdc2 and PP2A by analysing the activity of Greatwall and PP2A, and the different components of the MPF amplification loop at mitosis entry and during the first embryonic cell cycle.

Our data demonstrate that a constant counterbalance between the inhibitory kinases Myt1 and Wee1 and the activating phosphatase Cdc25 is required during metaphase II to prevent meiotic exit and during interphase of the first embryonic cell cycle to promote correct mitotic entry. Moreover, we also show that tight regulation of PP2A activity by Greatwall is essential to ensure correct timing of the first embryonic division. When PP2A is prematurely inhibited in the absence of cyclin-B–Cdc2 activity, endogenous cyclin-A–Cdc2 promotes an aberrant mitosis-like state in which there is only partial transient phosphorylation of the different cyclin-B–Cdc2 substrates followed by complete degradation of cyclin A and cyclin B.

Results

Constant activity of Cdc25 is required to maintain MPF activity in CSF extracts and in metaphase-II-arrested oocytes

The inhibitory role of Wee1- and Myt1-dependent phosphorylation of cyclin-B–Cdc2 during G2 is well established. Similarly, the activation of cyclin-B–Cdc2 through the dephosphorylation of its inhibitory sites by Cdc25 at mitotic entry has been largely described. However, less is known about the role of Cdc25, Myt1 and Wee1 in maintaining cyclin-B–Cdc2 activity during mitosis. Because only residual activity of Myt1 and/or Wee1 is present during mitosis (Smythe and Newport, 1992; Solomon et al., 1990), we asked whether Cdc25 is still required to maintain MPF activity in this phase of the cell cycle. To answer this question, we used egg extracts obtained from *Xenopus* oocytes arrested at metaphase II of meiosis (CSF extracts). Taking advantage of the fact that these extracts only contain the Cdc25C isoform, we could completely eliminate this phosphatase by immunodepletion and then analyse its effect on cyclin-B–Cdc2 activity. The depletion of Cdc25C induced complete dephosphorylation of the MPF substrates Erp1 (also called Emi2) and Cdc27, and a rapid decrease in cyclin-B–Cdc2 activity, as measured by histone H1 phosphorylation (Fig. 1A). We also observed dephosphorylation of cyclin B, rephosphorylation of Cdc2 on its inhibitory Try15 site and DNA decondensation. These results indicate that the extracts exited mitosis; however, this outcome occurred in the absence of cyclin B degradation. Moreover, we observed the same results when Cdc25 was depleted in CSF extracts in which the ubiquitin-dependent degradation pathway was blocked by the addition of the proteasome inhibitor MG132 (Fig. 1B) or when the anaphase-promoting complex (APC) was inhibited by Cdc27 depletion (data not shown). These results suggest that, rather than mitotic exit, Cdc25 depletion induced a loss of the mitotic state. This phenotype is specific to Cdc25 inhibition, as it was reversed by the addition of recombinant active Cdc25-GST protein to Cdc25-depleted CSF extracts (Fig. 1C). Although it seemed to be less efficient, the addition of anti-Cdc25 antibodies to CSF extracts induced the same effect, indicating that the simple addition of these antibodies blocks Cdc25 activity (Fig. 1D). Thus, we took advantage of the capacity of these antibodies to block Cdc25 to study the role of this phosphatase 'in vivo' in metaphase-II-arrested oocytes. We microinjected oocytes with either control (MII+αCT) or anti-Cdc25 antibodies (MII+αCdc25) in an MMR buffer supplemented with 5 mM EGTA to prevent oocyte activation. As shown in Fig. 1E, the microinjection of anti-Cdc25 antibodies induced dephosphorylation but not degradation of Erp1 (Emi2), and inactivation of cyclin-B–Cdc2, although this dephosphorylation occurred 30 minutes later in microinjected oocytes than in Cdc25-depleted CSF extracts. This indicates that the 'in vivo' inhibition of Cdc25 during metaphase II also induces the loss of the mitotic state. Thus, the activity of Cdc25 is continuously required to maintain the mitotic state 'in vitro' in CSF extracts and 'in vivo' in metaphase-II-arrested oocytes.

We subsequently analysed whether the inactivation of cyclin-B–Cdc2 induced by Cdc25 removal is dependent on the Myt1 and/or Wee1 kinases. We co-depleted Wee1 and Cdc25 from CSF extracts. As depicted in Fig. 2A, the co-depletion of Cdc25 and Wee1 abolished the phenotype observed by Cdc25 removal. Thus, under these conditions, Erp1 (Emi2) and Cdc27 remained phosphorylated, cyclin-B–Cdc2 had high kinase activity, Try15 of Cdc2 stayed dephosphorylated and DNA remained condensed.

We next co-depleted Myt1 and Cdc25. Unlike Wee1, the co-depletion of Myt1 and Cdc25 from CSF extracts did not prevent Erp1 (Emi2) and Cdc27 dephosphorylation, or rephosphorylation of Tyr15 of Cdc2. However, although we observed a clear decrease in cyclin-B–Cdc2 activity, residual cyclin-B–Cdc2 kinase activity remained for up to 90 minutes after depletion. This was probably sufficient to maintain the condensation state of DNA throughout the experiment (Fig. 2B). Thus, Wee1 and, to a lesser extent, Myt1

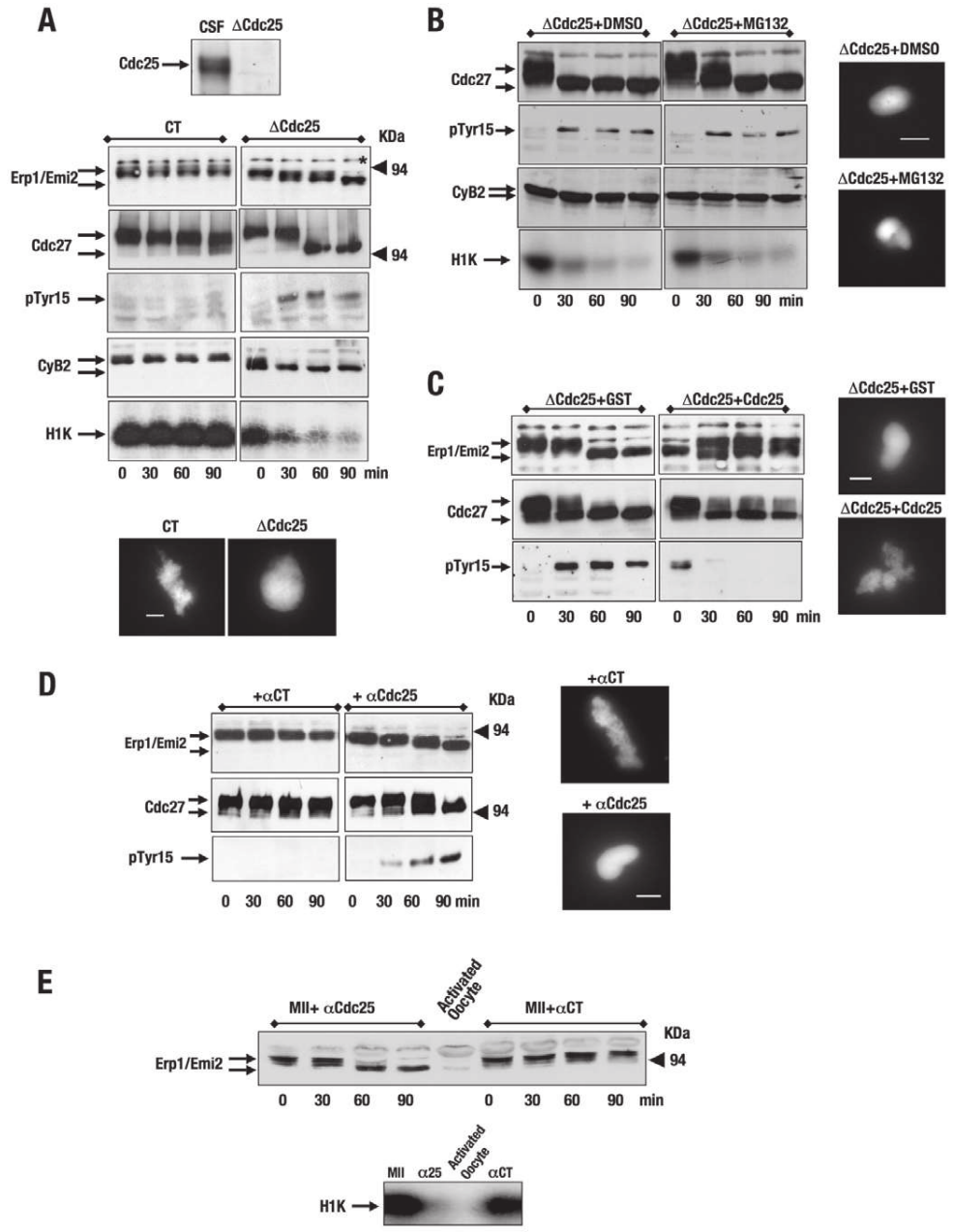


Fig. 1. Cdc25 activity is required to maintain an active MPF kinase in CSF extracts and metaphase-II-arrested oocytes. (**A**) Two successive 15-minute immunoprecipitations with control (CT) or anti-Cdc25 (ΔCdc25) antibodies were developed in 30 µl CSF extract, as described in Materials and Methods. 1 µl CSF extract and 1 µl supernatant were analysed by western blot to verify the immunodepletion of this protein. Time points of 1 µl supernatant were removed at 0, 30, 60 and 90 minutes after the second immunoprecipitation and used either for western blot to visualise Erp1 (Emi2), Cdc27, phospho-Tyr15 of Cdc2 (pTyr15) and cyclin B2 (cyB2), or for measuring cyclin-B–Cdc2 activity by histone H1 kinase assay (H1K). 1000-2000 sperm nuclei per microlitre was added to 10 µl supernatant after immunoprecipitation and incubated for 90 minutes. After fixation of the samples with 1% formaldehyde containing DAPI (1 µg/ml), 1 µl sample was used to visualise chromatin condensation by light microscopy (bottom). (**B**) CSF extracts were supplemented with 0.7 µl proteasome inhibitor MG132 (final concentration 1 mM) or the same volume of DMSO. 15 minutes later, they were depleted with anti-Cdc25 antibodies as in A. (**C**) CSF extracts were immunoprecipitated with anti-Cdc25 antibodies and were subsequently supplemented with either GST or GST-Cdc25 recombinant protein. Samples were removed at the indicated time points to study the phosphorylation pattern of Erp1 (Emi2), Cdc27 and Tyr15 of Cdc2. Sperm nuclei were added to immunodepleted Cdc25 CSF extracts after the addition of GST or the GST-Cdc25 recombinant protein, and DNA condensation was analysed by light microscopy. (**D**) CSF extracts were incubated for 5 minutes with control (αCT) or anti-Cdc25 antibodies (αCdc25). Subsequently, samples were removed to perform western blots and to analyse DNA condensation. (**E**) Metaphase-II-arrested oocytes were microinjected with either control (MII+αCT) or anti-Cdc25 antibodies (MII+αCdc25) in an MMR buffer (see Materials and Methods) supplemented with 5 mM EGTA to prevent oocyte activation by microinjection. One oocyte was lysed by time point and used to analyse the phosphorylation pattern of Erp1 (Emi2) by western blot. Activated oocytes were obtained by microinjecting buffer in the presence of an MMR buffer without EGTA. Cyclin-B–Cdc2 activity was measured in non-injected (MII), activated (activated oocytes), anti-Cdc25 (α25) and control-injected (αCT) oocytes 90 minutes after microinjection by H1 kinase assay (H1K). Scale bars: 5 µm.

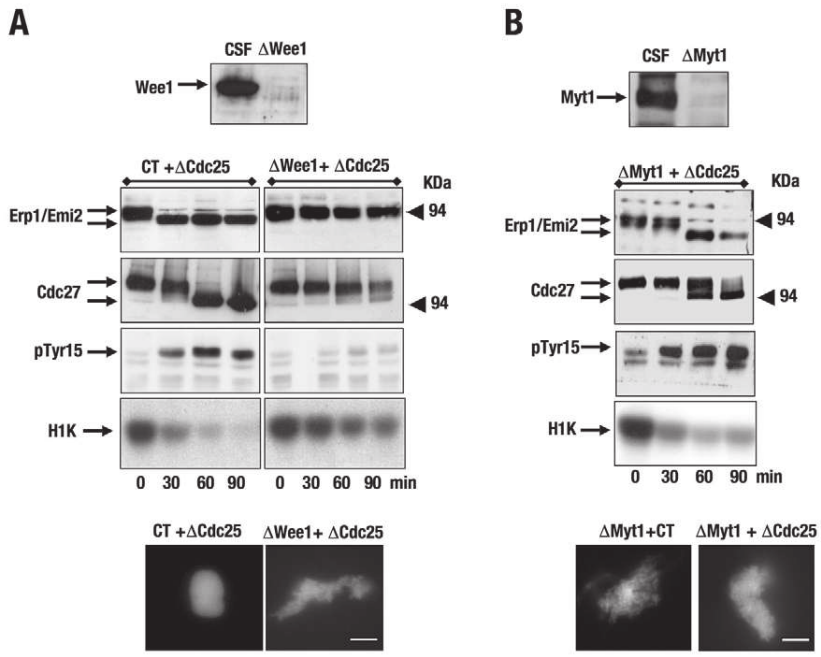


Fig. 2. Cdc25 is continuously counterbalancing Wee1 and Myt1 to maintain the mitotic state. (**A**) 30 µl CSF extract was immunoprecipitated once with control or Wee1 antibodies, and subsequently immunoprecipitated twice with anti-Cdc25 antibodies. Immunodepletion efficacy is shown by western blot. Supernatants were then removed at the indicated times and used to analyse phosphorylation of Erp1 (Emi2), Cdc27, phospho-Tyr15 of Cdc2 (pTyr15), as well as cyclin-B–Cdc2 activity and chromatin condensation. (**B**) CSF extracts were treated as described in A, except for the depletion of Myt1 instead of Wee1 before Cdc25 immunoprecipitation. Scale bars: 5 µm.

must be continuously counterbalanced by Cdc25 for the mitotic state to be maintained in metaphase II.

Constant activity of Myt1 and Wee1 is required to counterbalance Cdc25 activity during interphase, ensuring correct timing of first embryonic mitosis

The role of the inhibitory phosphorylation of Cdc2, in particular by the Wee1 kinase, during interphase of the first embryonic cell cycle has been well established (Murakami and Vande Woude, 1998; Walter et al., 2000). In this regard, Wee1-dependent phosphorylation of Cdc2 prevents premature entry into mitosis, allowing completion of meiosis II. However, unlike Wee1, no data exist regarding the activity of the Cdc25 phosphatase during this phase of the cell cycle. We analysed this issue using interphase *Xenopus* egg extracts arrested 50 minutes after ionophore addition. Interphase extracts contain high cyclin A and cyclin B levels. Cyclin A association with Cdc2 forms an active cyclin-A–Cdc2 complex that is not regulated by Thr14 or Tyr15 phosphorylation (Clarke et al., 1992). However, despite the fact that cyclin-A–Cdc2 is fully active after cyclin A synthesis, mitotic substrates remain dephosphorylated (Fig. 3A, Cdc27), indicating that cyclin-A–Cdc2 kinase cannot induce mitotic entry in the absence of cyclin-B–Cdc2. Unlike cyclin-A–Cdc2, cyclin-B–Cdc2 is rapidly inactivated by Myt1 and Wee1 (note phosphorylation of Cdc2 on inhibitory Tyr15 site in Fig. 3A, time 0 minutes). To investigate whether Cdc25 activity was present in these extracts, we depleted the two inhibitory kinases Wee1 and Myt1. We then analysed by western blot the phosphorylation of the mitotic substrate Cdc27, the levels of cyclin A and cyclin B, and the activity of the cyclin-B–Cdc2 complex. As shown in Fig. 3A, we did not observe any phosphorylation of the mitotic substrate Cdc27; however, we clearly detected degradation of cyclins A and B concomitant with loss of the inhibitory phosphorylation on Tyr15 of Cdc2. From these results, we hypothesised that depletion of these two inhibitory kinases would induce activation of the cyclin-B–Cdc2 complex, which would subsequently trigger degradation of cyclin A and cyclin B, thus mimicking normal mitotic entry and exit.

To investigate whether this was the case, we depleted the extracts of either Wee1 (Fig. 3B) or Myt1 (Fig. 3C), and performed a time-course analysis of the phosphorylation of the mitotic substrate Cdc27, the levels of cyclins A and B, and the inhibitory phosphorylation on Tyr15 of Cdc2. The results demonstrate that the depletion of either of these two kinases induces rapid phosphorylation of Cdc27 concomitant with cyclin-B–Cdc2 activation (note dephosphorylation of Try15 of Cdc2), followed by the degradation of cyclin A and cyclin B. Depletion of Wee1 kinase induces quicker activation of cyclin-B–Cdc2 than Myt1 depletion, indicating that the former probably participates to a greater extent than the latter in the inhibition of this complex. We next tested whether cyclin A and B proteolysis is dependent on the APC, as in normal mitosis. We analysed the effect of the co-depletion of Cdc27 and Wee1 on the activation of cyclin-B–Cdc2, and the degradation of cyclin A and B. As depicted in Fig. 3D, the concomitant removal of Cdc27 and Wee1 induced rapid entry into mitosis. Thus, 20 minutes after removal, cyclin B2 was phosphorylated whereas Try15 of Cdc2 was completely dephosphorylated. Consequently, the mitotic substrate Greatwall was phosphorylated at this time. However, unlike the sole depletion of Wee1, the double depletion of Cdc27 and Wee1 did not induce the proteolysis of either cyclin A or cyclin B. Interestingly, because of the stabilisation of these proteins, the mitotic state was maintained throughout the experiment, as shown by the condensed DNA present 60 minutes after depletion. Similar results were observed when Myt1 (instead of Wee1) was co-depleted with Cdc27 (Fig. 3E), although, as observed in Fig. 3C, the activation of cyclin-B–Cdc2 was delayed in this case. Finally, we analysed whether mitotic entry induced by Wee1 and/or Myt1 depletion is specific to the loss of these kinases. We performed a first depletion of Cdc27 in interphase egg extracts, followed by a second depletion of Wee1 or Myt1, and subsequently added recombinant GST-Wee1 or GST-Myt1, respectively. Samples were then taken every 20 minutes to analyse the mitotic state (Fig. 3F,G). Adding Wee1 and Myt1 to depleted interphase extracts prevented mitotic entry,

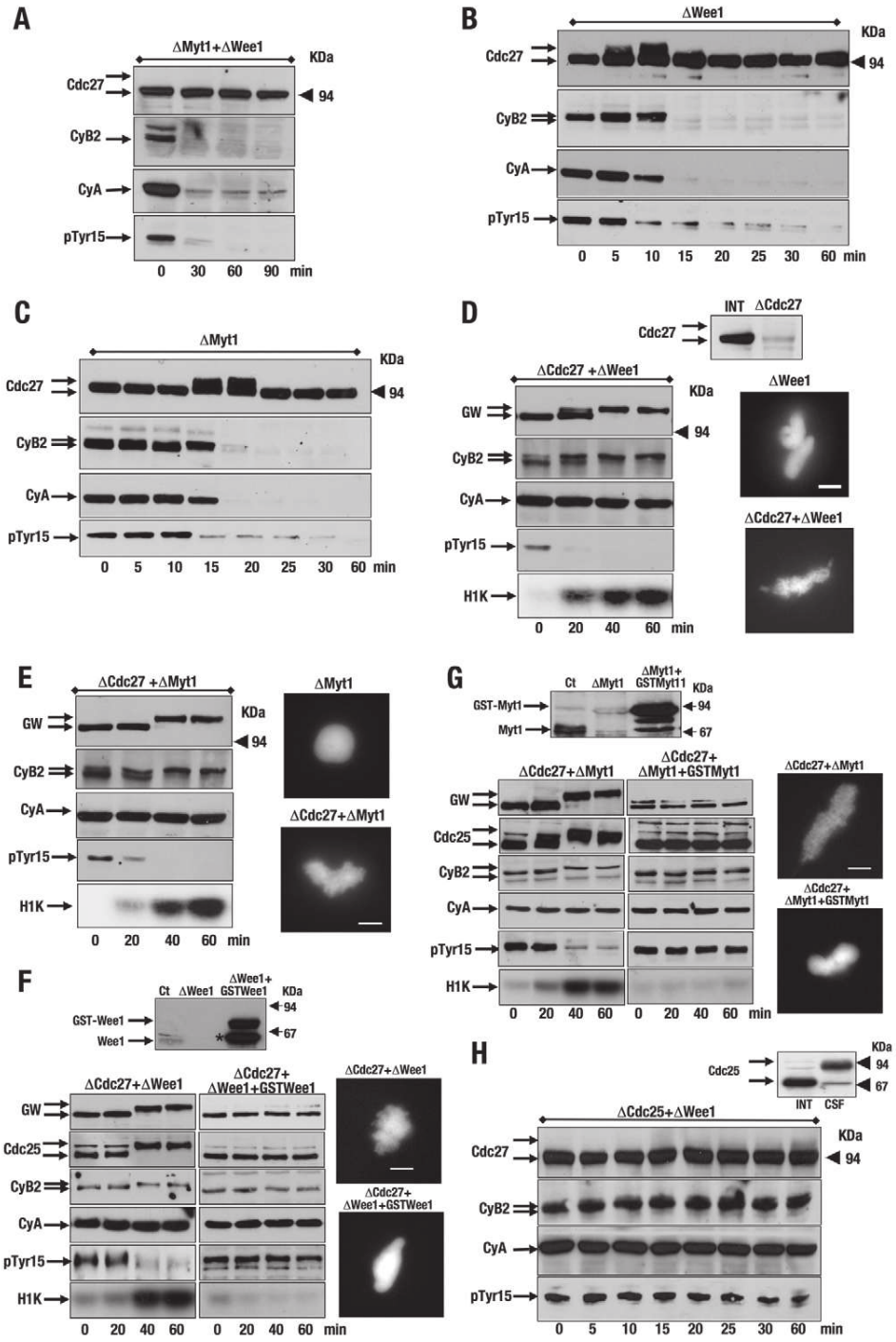


Fig. 3. The constant activity of Myt1 and Wee1 is required to counterbalance Cdc25 during interphase. (**A**) Interphase extracts were immunodepleted of Myt1 and Wee1 proteins, and the supernatants were recovered at the indicated times to analyse the state of phosphorylation of the indicated proteins. CyA, cyclin A; CyB2, cyclin B2. (**B**) Similar to A, except that interphase extracts were only immunodepleted of Wee1 protein. (**C**) Similar to B, except that anti-Myt1 instead of anti-Wee1 antibodies were used. (**D**) Interphase extracts (INT) were immunodepleted of Cdc27 and Wee1 proteins. The phosphorylation of the indicated proteins and the cyclin-B–Cdc2 kinase activity were analysed by western blot and by H1 kinase activity, respectively. 1 µl interphase extract and 1 µl supernatant was analysed by western blot to verify the immunodepletion of Cdc27. (**E**) Similar to D, except for the depletion of Myt1 instead of Wee1. (**F**) Interphase extracts were first immunoprecipitated with anti-Cdc27 antibodies and subsequently with anti-Wee1 antibodies. After depletion, the supernatants were supplemented with recombinant GST-Wee1 protein. 1 µl interphase extract, supernatant and supernatant supplemented with GST-Wee1 protein were analysed by western blot to investigate the levels of endogenous and recombinant Wee1 protein present in these extracts. The asterisk denotes a band of probably a cleaved GST-Wee1 protein. DNA condensation was analysed as described in Fig. 1A. (**G**) Similar to F, except for the depletion and the addition of the recombinant protein Myt1 instead of Wee1. (**H**) Interphase extracts were immunodepleted of Cdc25 and Wee1 proteins, and the phosphorylation of the indicated proteins was analysed by western blot. Phosphorylation of Cdc25 in interphase and CSF extracts is shown. Scale bars: 5 µm.

indicating that this effect is specific to the loss of these kinases. Because the simple depletion of Wee1 or Myt1 induces activation of cyclin-B–Cdc2, it is likely that Cdc25 is at least partially active in these extracts and that this activity is sufficient to induce mitotic entry and exit when either of the inhibitory kinases (Wee1 or Myt1) is removed. This is in fact the case; the double depletion of Cdc25 and Wee1 (Fig. 3H) or Myt1 (data not shown) completely reverses the Wee1- or Myt1-depletion phenotype, indicating that mitotic entry is mediated by Cdc25. It is noteworthy that this phosphatase showed higher electrophoretic mobility in interphase compared to mitotic extracts (Fig. 3H), suggesting either that only an undetectable part of this phosphatase is phosphorylated during interphase or that the non-shifted form corresponds to a partially active phosphatase.

These results indicate that, in interphase of the first embryonic cell cycle, Myt1 and Wee1 must both be active to counterbalance the partial activity of Cdc25. The sole removal of one of these kinases is sufficient to induce first mitotic entry followed by subsequent mitotic exit. This removal promotes rapid activation of cyclin-B–Cdc2 kinase, which induces entry into mitosis by

Journal of Cell Science

phosphorylation of the different mitotic substrates, among them the APC subunit Cdc27. The phosphorylation of Cdc27 probably activates the APC, triggering degradation of cyclin A and cyclin B and mitotic exit.

Mitotic entry induced by Wee1 or Myt1 depletion in interphase extracts is dependent on cyclin-A–Cdc2 and Plx1 kinases

The fact that the removal of Wee1 and Myt1 induces the activation of cyclin-B–Cdc2 implies that partial activity of Cdc25 is already present in these extracts. Because Plx1 has been largely described as an activator of Cdc25 (Kumagai and Dunphy, 1996; Qian et al., 1998; Qian et al., 2001), we asked whether Plx1 might be required to maintain this partial activity of Cdc25 and to promote the activation of cyclin-B–Cdc2 after Wee1 and Myt1 co-depletion. To test this hypothesis, we performed a triple depletion of Wee1, Myt1 and Plx1 in interphase extracts. As shown in Fig. 4A, unlike the double removal of Wee1 and Myt1 (Fig. 3A), the co-depletion of Plx1, Wee1 and Myt1 did not induce cyclin-B–Cdc2 activation, because tyrosine 15 of Cdc2 remained phosphorylated, cyclin A and cyclin B were stable, and Cdc27 was maintained in a dephosphorylated state. This effect is specific to Plx1 depletion, because cyclin-B–Cdc2 is reactivated after Plx1-Wee1-Myt1 depletion if a constitutively active form but not a kinase-dead form of Plx1 is added to these depleted extracts (Fig. 4B). Moreover, the reactivation of this complex is also observed if these extracts were first co-depleted of Plx1, Wee1 and Myt1, and subsequently supplemented with an ectopic recombinant Cdc25 protein (Fig. 4C). These results indicate that Plx1 is required to induce cyclin-B–Cdc2 activation and mitotic entry through the activation of Cdc25.

Previously reported data indicate that the level of Plx1 activity increases from 20 to 40 minutes after oocyte activation and that this increase is concomitant with the increase in cyclin-A–Cdc2 activity (Abrieu et al., 1998) (our unpublished results). Moreover, previous data from starfish oocytes demonstrate a role for cyclin-

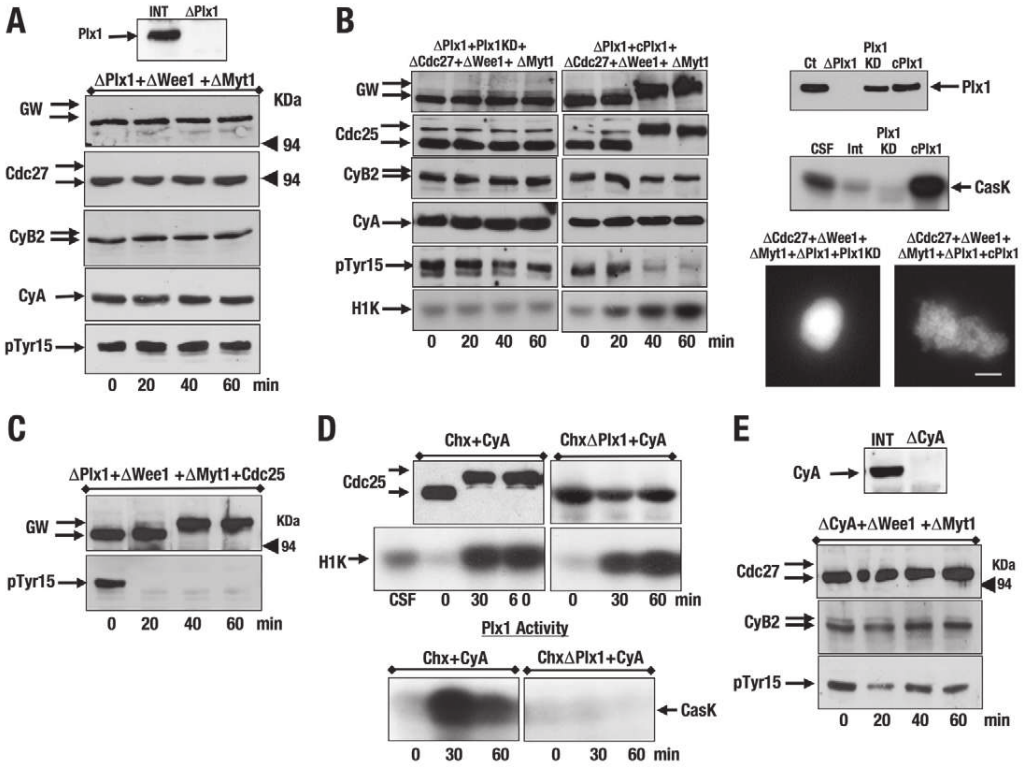


Fig. 4. Mitotic entry induced by Wee1 or Myt1 depletion is dependent on cyclin-A–Cdk and Plx1 kinases. (**A**) Interphase extracts were immunodepleted of Plx1, Wee1 and Myt1 proteins, and mitotic entry was investigated by western blot. Plx1 levels in control and Plx1-immunoprecipitated extracts are shown. (**B**) Interphase extracts were depleted of endogenous Plx1 by a double immunoprecipitation and supplemented with the mRNA encoding a kinase-dead or a constitutively active form of Plx1 (Qian et al., 1999). These extracts were used as a source of kinase-dead or constitutively active Plx1 protein. Another pool of interphase extracts was immunoprecipitated twice with Plx1 antibodies and subsequently supplemented with 10% of either kinase-dead or constitutively active Plx1 translated extracts. The mix was subsequently depleted of Cdc27, Wee1 and Myt1 proteins, and mitotic entry was analysed by western blot. The levels and activities of the different Plx1 proteins (endogenous and translated kinase-dead and constitutive Plx1) were investigated by western blot and by using anti-Plx1 immunoprecipitates and casein as a substrate. DNA condensation was analysed by light microscopy. (**C**) Similar to A, except for the addition of recombinant human Cdc25B-MBP protein to the extracts just after immunoprecipitation (5 ng/μl Cdc25b-MBP). (**D**) Cycloheximide (Chx)-treated interphase extracts were first depleted (ΔPlx1) or not with anti-Plx1 antibodies, and subsequently supplemented with a final concentration of 60 nM human cyclin A (CyA). Samples of 1 μl were removed after Plx1 depletion and before cyclin A addition (0 minutes) or 30 and 60 minutes after cyclin A addition. The phosphorylation pattern of Cdc25 was studied by western blot, whereas cyclin-A–Cdk activity was measured by H1K activity. To compare the activity of ectopic cyclin-A–Cdc2 and endogenous cyclin-B–Cdc2, a sample of a CSF extract was used to measure H1K activity. Plx1 activity in cycloheximide interphase extracts was measured in vitro using anti-Plx1 immunoprecipitates and casein as a substrate. (**E**) Similar to A, except for the depletion of cyclin A instead of Plx1. The levels of cyclin A left in the supernatants after depletion are shown. Scale bar: 5 μm.

A–Cdc2 in Plk1 and cyclin-B–Cdc2 activation during the first embryonic division (Okano-Uchida et al., 2003). To test whether cyclin-A–Cdc2 could participate in the activation of Plx1 in *Xenopus* oocytes, we either depleted Plx1 or did not and next added purified cyclin A to cycloheximide-treated interphase egg extracts, which are devoid of endogenous cyclin B and cyclin A. We analysed cyclin-A–Cdc2 and Plx1 activity, as well as Cdc25 phosphorylation. As depicted in Fig. 4D, the addition of ectopic cyclin A promotes the activation of Plx1. However, despite the fact that cyclin-A–Cdc2 activity was identical in non-depleted and Plx1-depleted extracts, the phosphorylation of Cdc25 was only observed when Plx1 was present. These results indicate that, in these extracts, cyclin-A–Cdc2 induces Cdc25 phosphorylation through the activation of Plx1.

We further investigated whether endogenous cyclin-A–Cdc2 is required to maintain partial Cdc25 activity by co-depleting interphase extracts of cyclin A, Myt1 and Wee1. Under these conditions, no activation of cyclin-B–Cdc2 was observed, phosphorylation on Try15 of Cdc2 was maintained, Cdc27 was dephosphorylated and cyclin B2 remained stable (Fig. 4E). Thus, cyclin-A–Cdc2 activity, probably through the activation of Plx1, is essential to maintain the partial activity of Cdc25, which promotes the activation of cyclin-B–Cdc2 after Wee1 and Myt1 depletion.

Together, these results indicate that the balance between Wee1 and Myt1 kinases and Cdc25 phosphatase is tightly regulated in metaphase II and in interphase of first mitosis to ensure correct first embryonic cell division.

Besides Wee1, Myt1 and Cdc25, regulation of PP2A is also essential to maintain the correct timing of mitosis in the first embryonic cell cycle

Recent results demonstrate that the inhibition of the PP2A phosphatase by the Greatwall kinase is essential for inducing the correct timing of mitosis (Castilho et al., 2009; Vigneron et al., 2009). Depletion of Greatwall in CSF extracts induces the loss of the mitotic state, indicating that, similar to Cdc25, it is required to maintain mitosis. In addition, Greatwall is also required for entry into mitosis. In this regard, it has been shown that the depletion of Greatwall from cycling extracts prevents mitotic entry (Yu et al., 2006). We asked whether Greatwall is also required to induce mitotic entry and exit in interphase extracts after the removal of Wee1 and Myt1. We co-depleted these three proteins and analysed whether cyclin-B–Cdc2 was activated under these conditions. The removal of Greatwall prevents mitotic entry in these extracts (Fig. 5A). This is a specific effect of Greatwall depletion, because adding this protein completely rescued this phenotype (Fig. 5B). Moreover, the loss of mitotic entry is due to the persistently high PP2A activity, because its inhibition by the addition of microcystin completely reversed this phenotype (Fig. 5C). We conclude that Greatwall-dependent PP2A inhibition is required for the partial activity of Cdc25 to promote cyclin-B–Cdc2 activation after the removal of the Wee1 and Myt1

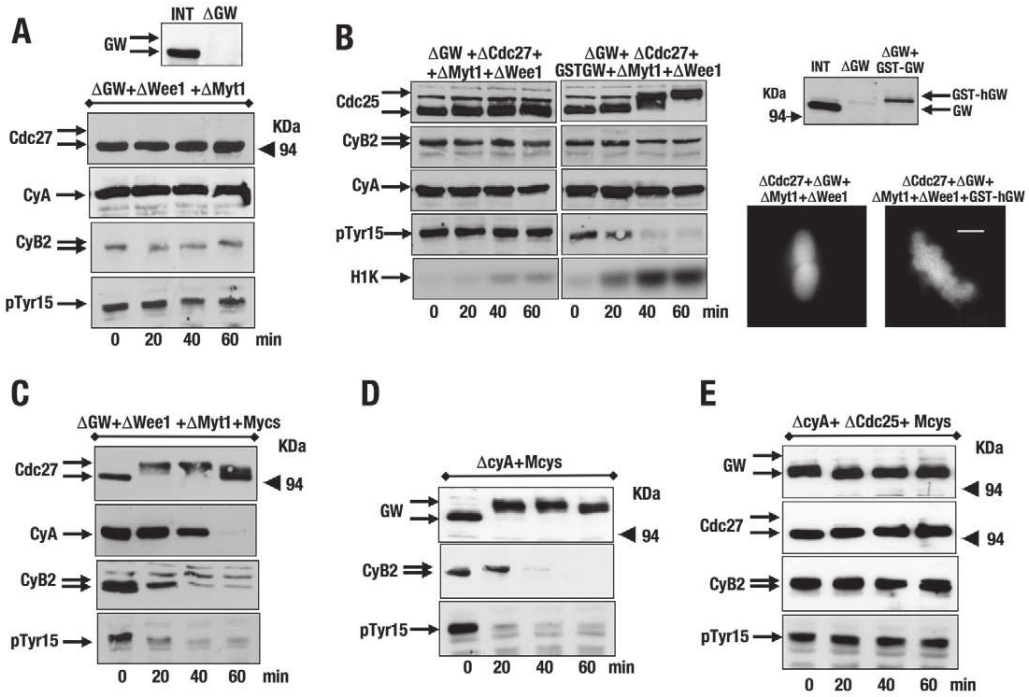


Fig. 5. The regulation of phosphatases is also essential to maintain correct timing of mitosis in the first embryonic cell cycle. (**A**) Interphase extracts were depleted of Greatwall (GW), Myt1 and Wee1, and mitotic entry was determined by analysing the phosphorylation of the indicated proteins. The efficacy of anti-Greatwall antibodies to immunodeplete this protein is shown. (**B**) Interphase extracts were depleted of Greatwall and Cdc27 proteins. The supernatants were then supplemented with GST-Greatwall recombinant protein and immunoprecipitated again with anti-Wee1 and anti-Myt1 antibodies to deplete these two proteins. Mitotic entry was then analysed by western blot. The levels of endogenous and recombinant GST-Greatwall proteins are shown. (**C**) Similar to A, except for the addition of 800 nM of the PP2A inhibitor microcystin (Mycs) after protein depletion. (**D**) Interphase extracts were first depleted of cyclin A and subsequently supplemented with 800 nM microcystin. (**E**) Interphase extracts were immunoprecipitated with anti-cyclin A and anti-Cdc25 antibodies, and subsequently supplemented with 800 nM microcystin. Mitotic entry was analysed by western blot. Scale bar: 5 μm.

Journal of Cell Science

kinases. These results were expected, because the sole addition of microcystin to interphase extracts promotes cyclin-B–Cdc2 activation and mitotic entry (Felix et al., 1990).

We showed above that Cdc25 has partial activity that is counterbalanced by Wee1 and Myt1 in interphase extracts. This activity is probably required to induce robust activation of the MPF amplification loop and to promote rapid mitotic entry. We next asked whether this partial activity was still required to promote cyclin-B–Cdc2 activation when PP2A was inhibited. To do that, we prevented the partial activation of Cdc25 by depletion of cyclin A and subsequently inhibited PP2A by the addition of microcystin. The removal of cyclin A did not prevent either MPF activation or degradation of cyclin B after PP2A inhibition (Fig. 5D). Thus, the activation of Cdc25 dependent on cyclin-A–Cdc2 and Plx1 is not required when mitotic-substrate dephosphorylation was prevented by PP2A inhibition. However, cyclin-B–Cdc2 activation was still dependent on Cdc25, because no activation was observed when the co-depletion of cyclin A and Cdc25 was performed (Fig. 5E).

It is well established that most of the cyclin-B–Cdc2 substrates can also be phosphorylated in vitro by cyclin-A–Cdc2. We showed above that, in interphase extracts, cyclin-A–Cdc2 activity is not sufficient to phosphorylate all of the mitotic substrates by itself or to promote proteolysis (see Fig. 3H). Rather, this activity seems to be required to maintain partial Plx1-dependent activation of Cdc25 (see Fig. 4A,E). However, the endogenous cyclin-A–Cdc2 activity could be sufficient to phosphorylate the mitotic substrates under PP2A inhibition. We investigated this possibility in interphase extracts in which the activation of cyclin- B–Cdc2 was prevented by Cdc25 depletion and PP2A was inhibited by microcystin. The addition of microcystin to these extracts promoted phosphorylation of the mitotic substrates Greatwall and Cdc27, and degradation of cyclin A and cyclin B (Fig. 6A). We also observed a late dephosphorylation on Tyr15 of Cdc2. We reasoned that this dephosphorylation could be the result of the degradation of cyclin B. However, we could not exclude the fact that activation of cyclin-B–Cdc2 could be triggered by incomplete depletion of Cdc25. To exclude this possibility, we repeated the same experiment by co-depleting Cdc27 and Cdc25 to block cyclin B proteolysis. As depicted in Fig. 6B, phosphorylation of Greatwall was observed, although, in this case, Tyr15 of Cdc2 stayed phosphorylated, indicative of an inactive cyclin-B–Cdc2 (Fig. 6B). Thus, the endogenous activity of cyclin-A–Cdc2 can phosphorylate at least some of the mitotic substrates of Cdc2 and induce proteolysis of cyclin A and cyclin B when PP2A is inhibited. To investigate whether the other substrates of cyclin-B–Cdc2 could also be phosphorylated by endogenous cyclin-A–Cdc2, we analysed the general cyclin-B–Cdc2-dependent phosphorylation state in these extracts using an antibody directed against the phosphorylated serine of the Cdk consensus motif. A strong signal, corresponding to phosphorylated MPF substrates, was observed when cyclin-B–Cdc2 is present in the microcystin-treated extracts independently of the presence or absence of cyclin-A–Cdc2 (Fig. 6C, Mycs and ΔcyA). However, this signal was clearly lower when only cyclin-A–Cdc2 was left in these extracts (Fig. 6C, ΔCdc25). These results indicate that, despite the fact that cyclin-A–Cdc2 can induce phosphorylation of some cyclin-B–Cdc2 substrates (such as Greatwall or Cdc27) and thus the degradation of cyclin A and cyclin B, this complex cannot promote normal mitosis because most of the mitotic substrates are not correctly phosphorylated.

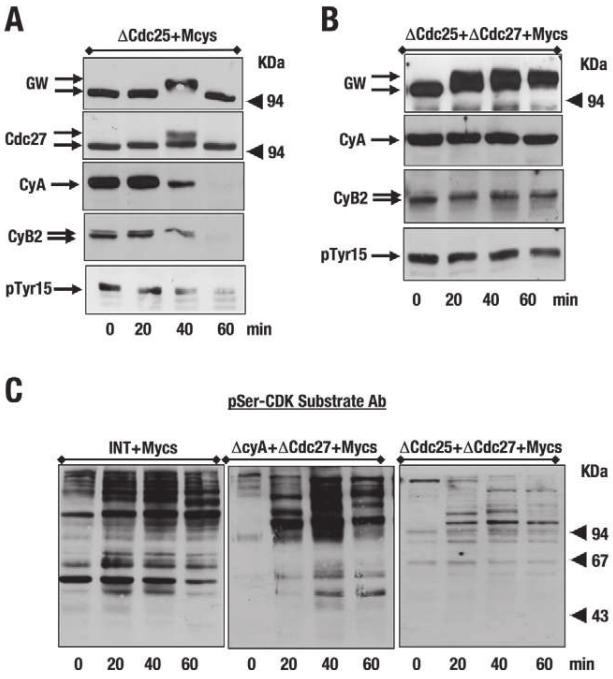


Fig. 6. Endogenous cyclin-A–Cdc2 can induce aberrant mitosis when PP2A is prematurely inhibited in interphase egg extracts. (**A**) Interphase egg extracts were immunodepleted of Cdc25 and subsequently supplemented with 800 nM microcystin. Supernatants were recovered at the indicated times and the phosphorylation state of Greatwall, Cdc27, Cyclin A, Cyclin B2 and Try15 of Cdc2 was analysed by western blot. (**B**) Similar to A, except that a double depletion of Cdc25 and Cdc27 was performed before microcystin addition. (**C**) The phosphorylation pattern of cyclin-B–Cdc2 substrates (phospho-serine Cdk substrate Ab) was analysed in interphase extracts supplemented with 800 nM microcystin and in interphase extracts previously depleted of cyclin A and Cdc27, or Cdc25 and Cdc27, and subsequently supplemented with the same dose of microcystin.

Discussion

The role of Cdc25 in promoting cyclin-B–Cdc2 activation and mitotic entry during oocyte maturation and the first embryonic cell cycle has been largely demonstrated (Gautier et al., 1991; Kumagai and Dunphy, 1991). Similarly, the inhibitory role of Myt1 and Wee1 towards Cdc2 to prevent mitotic entry during interphase of the first mitotic division is well established (Mueller et al., 1995a; Mueller et al., 1995b). However, there are no data on whether the regulatory balance between the Myt1 and Wee1 kinases and Cdc25 phosphatase is continuously working throughout the cell cycle or whether it is limited just to the boundary of cyclin-B–Cdc2 activation. The major mechanism that induces MPF inactivation upon mitotic exit is cyclin B degradation; thus, we would expect that, once cyclin-B–Cdc2 is activated, the Myt1-Wee1-Cdc25 loop is no longer required. We could also imagine that Cdc25 is not active during interphase and that only the activities of Myt1 and Wee1 are present to maintain inhibition of cyclin-B–Cdc2. However, surprisingly we demonstrated the presence of partial activity of Wee1 and Myt1 during metaphase II arrest and of Cdc25 during interphase of the first embryonic cell cycle, indicating that a constant counterbalance between the inhibitory kinases and the activating phosphatase is present during this first embryonic cell division. During metaphase II arrest, *Xenopus* oocytes show

partial but constant degradation of cyclin B, which is counterbalanced by new synthesis of this protein (Yamamoto et al., 2005). This implies the formation of new cyclin-B–Cdc2 complexes, which could be partially phosphorylated and inhibited by Myt1 and Wee1 kinases to accurately control a constant level of cyclin-B–Cdc2 activity during metaphase II. Besides the role of the amplification loop in maintaining cyclin-B–Cdc2 activity during metaphase II, this pathway must also be important during interphase of the first embryonic cell cycle, in which there are no G1-G2 phases and additional gaps of time are required to complete meiosis II (polar body extrusion, decondensation of sperm nucleus and fusion of the two pronuclei). The constant functionality of this loop would ensure that these gaps occur and would confer the rapid subsequent resumption of the cell cycle required for correct embryonic development. This loop also seems to be functional during G2 in fission yeast. Accordingly, Wee1 mutants initiate mitosis at half the cell size of the wild type, whereas the overexpression of this kinase delayed mitosis until cells grow to a larger size (Russell and Nurse, 1987a). We do not know whether this feedback is also constantly active during the mitotic cell cycle in somatic cells; however, this seems to be the case because some data have recently demonstrated that the inhibitory kinases Wee1 and Myt1 have the capacity to negatively regulate Cdc2 activity in G1 (Potapova et al., 2009).

Apart from the activation of cyclin-B–Cdc2, the inhibition of the PP2A phosphatase is also essential for correct timing of mitosis. In this regard, it has been shown in both *Xenopus* egg extracts and fission yeast that the inhibition of PP2A induces premature mitotic entry and that this effect is correlated with Cdc25 hyperphosphorylation and activation (Clarke et al., 1993; Felix et al., 1990; Kinoshita et al., 1990; Kinoshita et al., 1993). However, the activity of this phosphatase seems to be required again to promote mitotic exit (Kinoshita et al., 1990; Minshull et al., 1996). According to these data, it has been recently demonstrated that two different kinase activities, cyclin-B–Cdc2 and Greatwall, are essential for mitotic entry, the former to phosphorylate mitotic substrates and the latter to prevent massive dephosphorylation of these substrates by PP2A (Castilho et al., 2009; Vigneron et al., 2009). At mitotic entry, Greatwall inhibits PP2A, the phosphatase capable of dephosphorylating the majority of cyclin-B–Cdc2 substrates; at mitotic exit, Greatwall is inactivated, allowing the subsequent activation of PP2A and promoting cyclin-B–Cdc2 substrate dephosphorylation. In this work, we asked whether Greatwall and the inactivation of PP2A are also required to correctly develop the first mitotic cell cycle. Interestingly, we show that this is the case.

As described above, in the absence of the inhibitory activity of Myt1 and/or Wee1, partial activity of Cdc25 maintained by cyclin-A–Cdc2 and Plx1 is required to induce mitotic entry in interphase. However, our results demonstrate that the inhibition of PP2A induces mitotic entry, even in the absence of activation of Cdc25 dependent on cyclin-A–Cdc2 and Plx1. Thus, neither cyclin-A–Cdc2 nor Plx1 are required to activate cyclin-B–Cdc2 when PP2A is inhibited. A regulatory relationship between Polo and Greatwall has previously been suggested in *Drosophila* (Archambault et al., 2007). *Drosophila* females with the Scant mutation, a hyperactive form of Greatwall, show enhanced female sterility induced by *polo* mutants. These data suggest that Greatwall antagonizes Polo (Archambault et al., 2007). However, our results clearly demonstrate an agonistic relationship between these two proteins. We do not have an explanation for the origin of these differences between the two models; however, it is possible that they might reflect different aspects of the mechanisms regulating cell-cycle progression.

It is likely that, in the absence of activation of Cdc25 dependent on cyclin-A–Cdc2 and Plx1, the small amount of cyclin-B–Cdc2 complex that could be activated by the basal activity of Cdc25 would promote partial phosphorylation of Wee1 and Myt1, favouring still more the activation of the cyclin-B–Cdc2 complex and thus triggering the MPF amplification loop. In this regard, the complete removal of cyclin-A–Cdc2 and cyclin-B–Cdc2 prevents mitotic entry after PP2A inhibition, indicating that kinase activity of either cyclin-A–Cdc2 or cyclin-B–Cdc2, or both, is required to promote mitotic entry, even without PP2A activity. Interestingly,

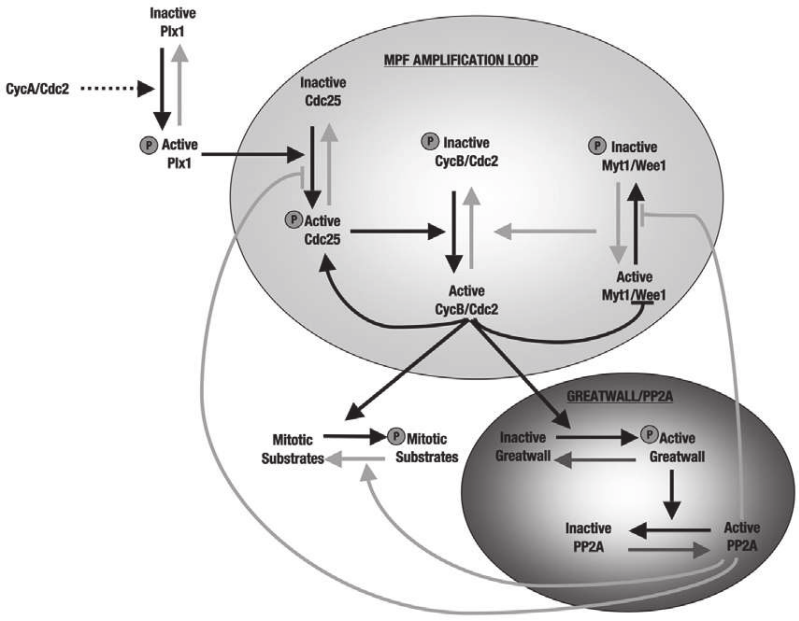


Fig. 7. Hypothetical model showing the different steps required for mitotic entry. During interphase, cyclin-A–Cdc2 will accumulate and will promote partial Cdc25 activation through Plx1 activation. Partial activity of Cdc25 will promote the activation of a burst of cyclin-B–Cdc2, which will trigger the MPF amplification loop. Complete activation of cyclin-B–Cdc2 will promote the activation of Greatwall, which will subsequently induce PP2A inhibition, thus permitting phosphorylation of mitotic substrates by MPF and mitotic entry. Black arrows denote the pathways active at mitotic entry. Grey arrows denote pathways active during interphase. The dotted arrow indicates that the pathway can be direct or indirect.

Journal of Cell Science

after PP2A inhibition and in the absence of cyclin-B–Cdc2 activity, the endogenous cyclin-A–Cdc2 is sufficient to promote phosphorylation of some mitotic substrates, such as Cdc27 and Greatwall, and to trigger cyclin A and cyclin B degradation. However, the general cyclin-B–Cdc2-dependent phosphorylation pattern in these extracts indicates a clear decrease in the phosphorylation level of the majority of the mitotic substrates, suggesting that the activity of cyclin-A–Cdc2 under these conditions is not sufficient to induce correct mitosis. Thus, PP2A activity must be tightly regulated to allow proper mitosis, because the premature inhibition of PP2A in interphase at a moment when cyclin A but not cyclin B is completely accumulated would probably induce poor phosphorylation of the majority of mitotic substrates, but would activate the APC. This would then degrade cyclin A and cyclin B, promoting an abnormal and irreversible first mitotic division.

Our results could be explained by the model depicted in Fig. 7. We propose that, during interphase, cyclin A and cyclin B accumulate, giving an active cyclin-A–Cdc2 complex but a Wee1- and Myt1-inhibited MPF complex. The accumulation of active cyclin-A–Cdc2 will induce partial activation of Plx1, which, in turn, partially activates Cdc25. This partially active Cdc25 will promote a burst of MPF activity, which will phosphorylate and inhibit Myt1 and Wee1 and further activate Cdc25, triggering the MPF amplification loop. However, the complete activation of MPF is not sufficient to induce mitotic phosphorylation in the presence of high PP2A activity (Vigneron et al., 2009), unless Greatwall is activated. It is the activation of Greatwall by MPF itself that will finally promote mitotic entry.

According to this model, when cyclin-B–Cdc2 accumulates during interphase to a certain level, Myt1 and/or Wee1 are no longer capable of completely phosphorylating MPF and thus, the partial activity of Cdc25 maintained by cyclin-A–Cdc2 and Plx1 will be sufficient to trigger the MPF amplification loop (Fig. 3). However, this will not be the case if we prevent Cdc25 partial activation by inhibiting either of these two kinases (Fig. 4). On the other hand, if PP2A is inhibited, the basal activity of Cdc25 would be sufficient to completely activate MPF, even in the absence of cyclin-A–Cdc2 or Plx1 (Fig. 5). Finally, if we artificially decrease the dephosphorylation of mitotic substrates by the inhibition of PP2A in the absence of cyclin-B–Cdc2 complex, partial phosphorylation of some mitotic substrates will be performed. One of these proteins is the APC subunit Cdc27, which, once phosphorylated, will promote APC activation and degradation of cyclin A and B (Fig. 6).

In conclusion, our results demonstrate that, during the first mitotic division, the MPF amplification loop is constantly active throughout the cell cycle. This activity is probably required to promote correct timing by providing pseudo-gaps during this first division without affecting rapid mitotic resumption after meiosis II completion. Moreover, we also demonstrate that the correct regulation of PP2A activity is essential to promote normal mitosis, because premature inhibition of this phosphatase could induce aberrant mitosis due to partial cyclin-A–Cdc2-dependent phosphorylation of mitotic substrates.

Materials and Methods

Immunisation procedures, protein purification and antibodies

Anti-Greatwall and anti-Wee1 antibodies were obtained as previously described (Vigneron et al., 2009). Anti-Myt1 antibodies were generated against a peptide (H_2N-CRNLLGMFDDATEQ-COOH) corresponding to the C-terminal sequence of the *Xenopus* Myt1 protein. Peptides were coupled to thyroglobulin for immunisation and to immobilised BSA for affinity purification, as previously described (Lorca et al., 1998).

Polyclonal phospho-Tyr-15 Cdc2 and anti-phospho-Ser Cdk substrates were obtained from Cell Signalling Technology. Affinity-purified antibodies against Cdc27, cyclin B2, Cdc25, Plx1 and Erp1 (Emi2) were obtained as previously described (Abrieu et al., 1998; Bernis et al., 2007; Castro et al., 2001; Lorca et al., 1998).

Recombinant human Cdc25B-MBP was a generous gift of Veronique Baldin (CRBM, CNRS, Montpellier, France).

Full-length human cyclin A was produced in *Escherichia coli* and purified as previously reported (Lorca et al., 1992).

Preparation of *Xenopus* egg extracts and sperm nuclei, and immunoprecipitation

CSF egg extracts were prepared from unfertilised *Xenopus* eggs that were arrested at metaphase of the second meiotic division, as previously described (Murray and Kirschner, 1991). Interphase egg extracts and cycloheximide-treated interphase extracts were prepared from dejellied unfertilised eggs transferred in MMR/4 (25 mM NaCl, 0.5 mM KCl, 0.25 $MgCl_2$, 0.025 mM NaEGTA, 1.25 mM HEPES-NaOH pH 7.7) supplemented with cycloheximide (100 μg/ml) or left untreated. Extracts were prepared 50 minutes after ionophore addition by the same procedure as described for CSF extracts.

Demembraned sperm nuclei were prepared as described (Glotzer et al., 1991).

Immunoprecipitations and immunodepletions were performed using 10 μl extract, 10 μl magnetic protein G-Dynabeads (Dynal) and 2 μg each antibody. Antibody-linked beads were washed two times with RIPA (10 mM NaH_2PO_4, 100 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1% Triton X100, 0.5% deoxycholate, 80 μM β-glycerophosphate, 50 mM NaF, 1 mM DTT), two times with 50 mM TRIS pH 7.5 and incubated for 15 minutes at room temperature with 10 μl *Xenopus* egg extracts. For immunodepletion, the supernatant was recovered and used for subsequent experiments. When two subsequent immunodepletions were performed, the supernatant from the first immunodepletion was recovered and used for the second one. Two consecutive immunoprecipitations were made to completely remove the endogenous Cdc25, Plx1, Greatwall and Myt1 proteins, whereas one immunoprecipitation was enough to completely deplete endogenous Wee1, Cdc27 and cyclin A.

H1 kinase and casein kinase assays

Extract (1 μl) was frozen in liquid nitrogen at the indicated times. Extract samples were then thawed by the addition of 19 μl H1 buffer, including [γ^{33}P]ATP (Zhang et al., 1997), and incubated for 10 minutes at room temperature. Reactions were stopped by adding Laemmli sample buffer and analysed by SDS-PAGE.

Casein kinase assays were performed as previously described (Abrieu et al., 1998).

Light microscopy

A DMR A Leica microscope DM 4500B with a 63× immersion oil objective (HCX PL APO), tube factor 1 was used for epifluorescence imaging. Images were captured with a CoolSnap HQ camera (Roger Scientific) and the whole set was driven by MetaMorph (Universal Imaging, Downingtown, PA).

We thank Veronique Baldin for the generous gift of recombinant human Cdc25B protein. We gratefully acknowledge Jean Marc Donnay and Jean Charles Mazur for technical support. This work was supported by the Association pour la Recherche sur le Cancer. A.B. and E.B. are fellows from the Fondation pour la Recherche Medicale and Ligue Nationale Contre le Cancer, respectively.

References

Abrieu, A., Brassac, T., Galas, S., Fisher, D., Labbe, J. C. and Doree, M. (1998). The Polo-like kinase Plx1 is a component of the MPF amplification loop at the G2/M-phase transition of the cell cycle in Xenopus eggs. *J. Cell Sci.* **111**, 1751-1757.

Archambault, V., Zhao, X., White-Cooper, H., Carpenter, A. T. and Glover, D. M. (2007). Mutations in Drosophila Greatwall/Scant reveal its roles in mitosis and meiosis and interdependence with Polo kinase. *PLoS Genet.* **3**, e200.

Bernis, C., Vigneron, S., Burgess, A., Labbe, J. C., Fesquet, D., Castro, A. and Lorca, T. (2007). Pin1 stabilizes Emi1 during G2 phase by preventing its association with SCF(betatrcp). *EMBO Rep.* **8**, 91-98.

Castilho, P. V., Williams, B. C., Mochida, S., Zhao, Y. and Goldberg, M. L. (2009). The M phase kinase Greatwall (Gwl) promotes inactivation of PP2A/B55delta, a phosphatase directed against CDK phosphosites. *Mol. Biol. Cell* **20**, 4777-4789.

Castro, A., Peter, M., Magnaghi-Jaulin, L., Vigneron, S., Galas, S., Lorca, T. and Labbe, J. C. (2001). Cyclin B/cdc2 induces c-Mos stability by direct phosphorylation in Xenopus oocytes. *Mol. Biol. Cell* **12**, 2660-2671.

Clarke, P. R., Leiss, D., Pagano, M. and Karsenti, E. (1992). Cyclin A- and cyclin B-dependent protein kinases are regulated by different mechanisms in Xenopus egg extracts. *EMBO J.* **11**, 1751-1761.

Clarke, P. R., Hoffmann, I., Draetta, G. and Karsenti, E. (1993). Dephosphorylation of cdc25-C by a type-2A protein phosphatase: specific regulation during the cell cycle in Xenopus egg extracts. *Mol. Biol. Cell* **4**, 397-411.

D'Amours, D. and Amon, A. (2004). At the interface between signaling and executing anaphase-Cdc14 and the FEAR network. *Genes Dev.* **18**, 2581-2595.
Draetta, G. and Beach, D. (1988). Activation of cdc2 protein kinase during mitosis in human cells: cell cycle-dependent phosphorylation and subunit rearrangement. *Cell* **54**, 17-26.
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.
Gautier, J., Solomon, M. J., Booher, R. N., Bazan, J. F. and Kirschner, M. W. (1991). cdc25 is a specific tyrosine phosphatase that directly activates p34cdc2. *Cell* **67**, 197-211.
Glotzer, M., Murray, A. W. and Kirschner, M. W. (1991). Cyclin is degraded by the ubiquitin pathway. *Nature* **349**, 132-138.
Gould, K. L. and Nurse, P. (1989). Tyrosine phosphorylation of the fission yeast cdc2+ protein kinase regulates entry into mitosis. *Nature* **342**, 39-45.
Hoffmann, I., Clarke, P. R., Marcote, M. J., Karsenti, E. and Draetta, G. (1993). Phosphorylation and activation of human cdc25-C by cdc2-cyclin B and its involvement in the self-amplification of MPF at mitosis. *EMBO J.* **12**, 53-63.
Izumi, T., Walker, D. H. and Maller, J. L. (1992). Periodic changes in phosphorylation of the Xenopus cdc25 phosphatase regulate its activity. *Mol. Biol. Cell* **3**, 927-939.
Kinoshita, N., Ohkura, H. and Yanagida, M. (1990). Distinct, essential roles of type 1 and 2A protein phosphatases in the control of the fission yeast cell division cycle. *Cell* **63**, 405-415.
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.
Krek, W. and Nigg, E. A. (1991). Differential phosphorylation of vertebrate p34cdc2 kinase at the G1/S and G2/M transitions of the cell cycle: identification of major phosphorylation sites. *EMBO J.* **10**, 305-316.
Kumagai, A. and Dunphy, W. G. (1991). The cdc25 protein controls tyrosine dephosphorylation of the cdc2 protein in a cell-free system. *Cell* **64**, 903-914.
Kumagai, A. and Dunphy, W. G. (1996). Purification and molecular cloning of Plx1, a Cdc25-regulatory kinase from Xenopus egg extracts. *Science* **273**, 1377-1380.
Lorca, T., Fesquet, D., Zindy, F., Le Bouffant, F., Cerruti, M., Brechot, C., Devauchelle, G. and Doree, M. (1991). An okadaic acid-sensitive phosphatase negatively controls the cyclin degradation pathway in amphibian eggs. *Mol. Cell. Biol.* **11**, 1171-1175.
Lorca, T., Labbe, J. C., Devault, A., Fesquet, D., Strausfeld, U., Nilsson, J., Nygren, P. A., Uhlen, M., Cavadore, J. C. and Doree, M. (1992). Cyclin A-cdc2 kinase does not trigger but delays cyclin degradation in interphase extracts of amphibian eggs. *J. Cell Sci.* **102**, 55-62.
Lorca, T., Castro, A., Martinez, A. M., Vigneron, S., Morin, N., Sigrist, S., Lehner, C., Doree, M. and Labbe, J. C. (1998). Fizzy is required for activation of the APC/cyclosome in Xenopus egg extracts. *EMBO J.* **17**, 3565-3575.
Lundgren, K., Walworth, N., Booher, R., Dembski, M., Kirschner, M. and Beach, D. (1991). mik1 and wee1 cooperate in the inhibitory tyrosine phosphorylation of cdc2. *Cell* **64**, 1111-1122.
Millar, J. B., McGowan, C. H., Lenaers, G., Jones, R. and Russell, P. (1991). p80cdc25 mitotic inducer is the tyrosine phosphatase that activates p34cdc2 kinase in fission yeast. *EMBO J.* **10**, 4301-4309.
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.
Mochida, S., Ikeo, S., Gannon, J. and Hunt, T. (2009). Regulated activity of PP2A-B55 delta is crucial for controlling entry into and exit from mitosis in Xenopus egg extracts. *EMBO J.* **28**, 2777-2785.
Mueller, P. R., Coleman, T. R. and Dunphy, W. G. (1995a). Cell cycle regulation of a Xenopus Wee1-like kinase. *Mol. Biol. Cell* **6**, 119-134.
Mueller, P. R., Coleman, T. R., Kumagai, A. and Dunphy, W. G. (1995b). Myt1: a membrane-associated inhibitory kinase that phosphorylates Cdc2 on both threonine-14 and tyrosine-15. *Science* **270**, 86-90.
Murakami, M. S. and Vande Woude, G. F. (1998). Analysis of the early embryonic cell cycles of Xenopus; regulation of cell cycle length by Xe-wee1 and Mos. *Development* **125**, 237-248.
Murray, A. W. and Kirschner, M. W. (1991). What controls the cell cycle? *Sci. Am.* **264**, 56-63.
Murray, A. W., Solomon, M. J. and Kirschner, M. W. (1989). The role of cyclin synthesis and degradation in the control of maturation promoting factor activity. *Nature* **339**, 280-286.
Nakajima, H., Toyoshima-Morimoto, F., Taniguchi, E. and Nishida, E. (2003). Identification of a consensus motif for Plk (Polo-like kinase) phosphorylation reveals Myt1 as a Plk1 substrate. *J. Biol. Chem.* **278**, 25277-25280.
Nurse, P. (1990). Universal control mechanism regulating onset of M-phase. *Nature* **344**, 503-508.
Okano-Uchida, T., Okumura, E., Iwashita, M., Yoshida, H., Tachibana, K. and Kishimoto, T. (2003). Distinct regulators for Plk1 activation in starfish meiotic and early embryonic cycles. *EMBO J.* **22**, 5633-5642.
Parker, L. L. and Piwnica-Worms, H. (1992). Inactivation of the p34cdc2-cyclin B complex by the human WEE1 tyrosine kinase. *Science* **257**, 1955-1957.
Potapova, T. A., Daum, J. R., Byrd, K. S. and Gorbsky, G. J. (2009). Fine tuning the cell cycle: activation of the Cdk1 inhibitory phosphorylation pathway during mitotic exit. *Mol. Biol. Cell* **20**, 1737-1748.
Qian, Y. W., Erikson, E., Li, C. and Maller, J. L. (1998). Activated polo-like kinase Plx1 is required at multiple points during mitosis in Xenopus laevis. *Mol. Cell. Biol.* **18**, 4262-4271.
Qian, Y. W., Erikson, E. and Maller, J. L. (1999). Mitotic effects of a constitutively active mutant of the Xenopus polo-like kinase Plx1. *Mol. Cell. Biol.* **19**, 8625-8632.
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.
Russell, P. and Nurse, P. (1987a). Negative regulation of mitosis by wee1+, a gene encoding a protein kinase homolog. *Cell* **49**, 559-567.
Russell, P. and Nurse, P. (1987b). The mitotic inducer nim1+ functions in a regulatory network of protein kinase homologs controlling the initiation of mitosis. *Cell* **49**, 569-576.
Smythe, C. and Newport, J. W. (1992). Coupling of mitosis to the completion of S phase in Xenopus occurs via modulation of the tyrosine kinase that phosphorylates p34cdc2. *Cell* **68**, 787-797.
Solomon, M. J., Glotzer, M., Lee, T. H., Philippe, M. and Kirschner, M. W. (1990). Cyclin activation of p34cdc2. *Cell* **63**, 1013-1024.
Stegmeier, F. and Amon, A. (2004). Closing mitosis: the functions of the Cdc14 phosphatase and its regulation. *Annu. Rev. Genet.* **38**, 203-232.
Strausfeld, U., Labbe, J. C., Fesquet, D., Cavadore, J. C., Picard, A., Sadhu, K., Russell, P. and Doree, M. (1991). Dephosphorylation and activation of a p34cdc2/cyclin B complex in vitro by human CDC25 protein. *Nature* **351**, 242-245.
Trautmann, S. and McCollum, D. (2002). Cell cycle: new functions for Cdc14 family phosphatases. *Curr. Biol.* **12**, R733-R735.
Vigneron, S., Brioudes, E., Burgess, A., Labbe, J. C., Lorca, T. and Castro, A. (2009). Greatwall maintains mitosis through regulation of PP2A. *EMBO J.* **28**, 2786-2793.
Walter, S. A., Guadagno, S. N. and Ferrell, J. E., Jr (2000). Activation of Wee1 by p42 MAPK in vitro and in cycling xenopus egg extracts. *Mol. Biol. Cell* **11**, 887-896.
Watanabe, N., Arai, H., Nishihara, Y., Taniguchi, M., Hunter, T. and Osada, H. (2004). M-phase kinases induce phospho-dependent ubiquitination of somatic Wee1 by SCFbeta-TrCP. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**, 4419-4424.
Yamamoto, T. M., Iwabuchi, M., Ohsumi, K. and Kishimoto, T. (2005). APC/C-Cdc20-mediated degradation of cyclin B participates in CSF arrest in unfertilized Xenopus eggs. *Dev. Biol.* **279**, 345-355.
Yu, J., Zhao, Y., Li, Z., Galas, S. and Goldberg, M. L. (2006). Greatwall kinase participates in the Cdc2 autoregulatory loop in Xenopus egg extracts. *Mol. Cell* **22**, 83-91.
Zhang, Y., Yao, B., Delikat, S., Bayoumy, S., Lin, X. H., Basu, S., McGinley, M., Chan-Hui, P. Y., Lichenstein, H. and Kolesnick, R. (1997). Kinase suppressor of Ras is ceramide-activated protein kinase. *Cell* **89**, 63-72.

Journal of Cell Science

RSK2 et Greatwall, deux kinases actrices de la mitose

La mitose est une phase importante du cycle cellulaire. Pendant la mitose, la séparation des chromatides sœurs est régulée par le point de contrôle du fuseau mitotique qui s'assure que tous les chromosomes sont correctement alignés sur la plaque métaphasique. L'entrée et la sortie de mitose sont régulées par l'activation et l'inactivation de cycline B/Cdk1. Cette fine régulation fait intervenir de nombreuses kinases et phosphatases. Dans ce projet nous nous sommes intéressées plus particulièrement à deux AGC kinases : RSK2 et Greatwall (Gwl). Dans cette étude nous nous sommes proposés d'analyser l'implication de RSK2, substrat majeur de la MAPK, dans le point de contrôle du fuseau mitotique. Nos résultats montrent que RSK2 est essentielle pour l'activité du point de contrôle du fuseau mitotique dans les extraits d'œufs de xénope ainsi que pour la localisation des autres protéines du point de contrôle localisées aux kinétochores. Nous montrons également que RSK2 participe au point de contrôle dans les cellules humaines. En effet, RSK2 est nécessaire à la localisation aux kinétochores de Mad1, Mad2 et Cenp-E, protéines essentielles à l'activité de ce checkpoint. L'entrée et la sortie de mitose sont régulées par complexe cycline B/Cdk1 et des phosphatases. Gwl est une nouvelle kinase essentielle à l'entrée en mitose et au maintient de l'état mitotique dans les extraits d'œufs de xénope. En effet, nos résultats montrent que Gwl maintient l'état mitotique de manière indépendante du complexe cycline B/Cdk1, mais par la régulation négative PP2A, phosphatase responsable des déphoshorylations des substrats mitotiques.

RSK2 and Greatwall, two AGC kinases involved in the regulation of mitosis

Mitosis is an important phase of cell cycle. Besides, basic mechanisms inducing mitotic entry and exit, the Spindle Assembly Checkpoint (SAC) is also required for a correct separation of sister chromatids. This checkpoint verifies the orders and the events to ensure the correct execution of the cell cycle, as errors may lead to aneuploidy. Entry and Exit of mitosis are regulated by the balance between cyclin B/Cdk1 and phosphatase PP2A. In this project, we are particularly focused on two AGC kinases: RSK2, a putative protein involved in SAC activity and Greatwall (Gwl), a kinase required to control cyclin B/Cdk1 - PP2A balance. First, we analyzed RSK2, a major substrates of MAPK, involvement in the SAC. Our results show that RSK2 is essential for the activation of the SAC in xenopus egg extracts and for the localization of the others SAC components at the kinétochores. We also show that RSK2 participates in the maintenance of the SAC in human cells. Indeed, RSK2 is necessary for Mad1, Mad2 and Cenp-E localization which we are essential proteins for SAC activation. Entry and exit of mitosis is regulated by the cyclin B/Cdk1 complex and phosphatases. Gwl is a new kinase essential to the entry into mitosis and maintenance of the mitotic state in xenopus egg extracts. Indeed, our results showed that Gwl maintains the mitotic state independently of cyclin B/Cdk1 activation though the negative regulation of PP2A, the phosphatase that dephosphorylates mitotic substrates

Discipline: Biochimie, Biologie moléculaire et cellulaire

Mots-cles : RSK2, Spindle Assembly Checkpoint, Greatwall, PP2A, cycline B/Cdk1, mitose, cycle cellulaire

Adresse :Centre de Recherche de Biochimie Macromoléculaire
UMR 5237- CNRS 1919, route de Mende- 34293 MONTPELLIER (France)