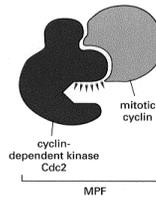


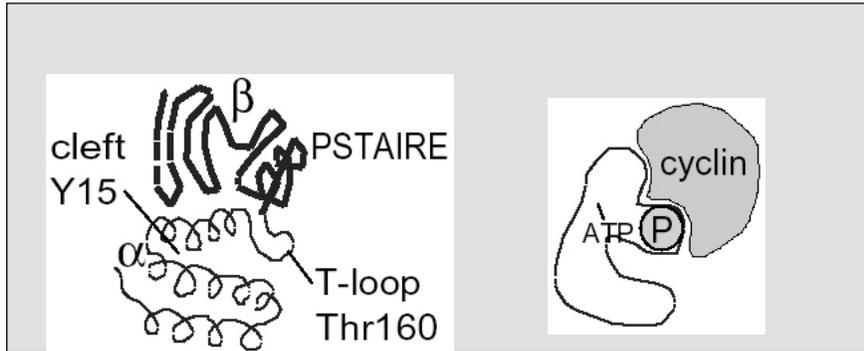
La régulation des complexes CDK-cyclines

Dr Gerardo Ferbeyre
Département de biochimie, E515
g.ferbeyre@umontreal.ca

- *Association des cyclines*
- Phosphorylation
- Déphosphorylation
- Inhibiteurs



Les CDK ont besoin d'une phosphorylation en Thr160 pour son activité: CAK



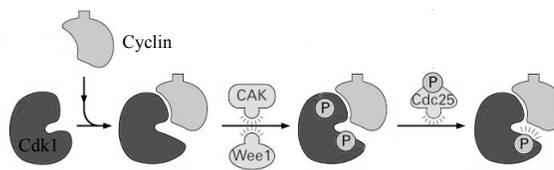
La kinase CAK (Cdk7/CyclinH/Mat1 chez les metazoos, Cak1 chez *S. cerevisiae*) phosphoryle Cdk1 dans la boucle T pour activer complètement Cdk1

La boucle T bloque le site actif de CDK. On a vu comment la liaison de cyclines active les CDK en déplaçant la boucle T de l'entrée du site active. Il semble que cet effet n'est pas suffisant pour l'activation complète des CDK. Une phosphorylation de la Thr 160 dans la boucle T provoque l'ajustement final pour activer les CDK. L'enzyme qui catalyse cette réaction a reçu le nom de CAK pour « CDK activating kinase », mais son identité n'est pas encore très claire.

Le complexe Cdk7/Cyclin H/Mat1 fonctionne comme CAK chez *S. pombe* et les metazoos, mais *S. cerevisiae* possède une protéine Cak1 qui a la même fonction. Cak1 de *S. cerevisiae* active Kin29 (Cdk7). La question c'est : est-ce que *S. cerevisiae* est une exception ou plus tôt, nous n'avons pas encore découvert ses homologues chez les metazoos .

Inhibition de CDK par phosphorylation: la kinase Wee1 et la phosphatase Cdc25

- Les kinases de la famille Wee1 phosphorylent deux tyrosines dans le site actif de Cdk1 et inhibent l'activité de l'enzyme.
- Les phosphatases Cdc25 enlèvent les phosphates mis par Wee1 (Cdc25 A, B, C)

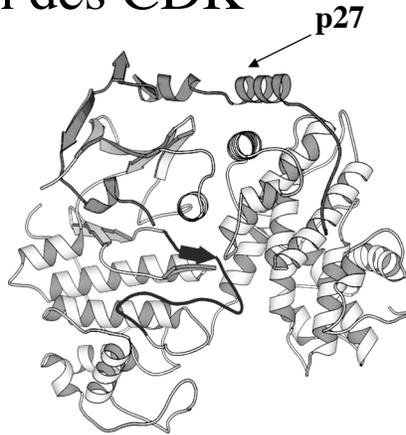


La phosphorylation des Cdk au niveau de deux tyrosines dans le site actif inhibe l'enzyme. Cette phosphorylation amène un contrôle additionnel sur l'activité de CDK. La kinase responsable de cette phosphorylation chez *S. pombe* est Wee1. Les levures mutantes pour Wee1 se divisent avec une petite taille (Wee ça veut dire petite en écossais). Chez les metazoos il en a deux types d'enzymes qui catalyse cette phosphorylation : Wee1 dans le noyau et Myt1 dans le cytoplasme.

Maintenant pour une activation complète, une déphosphorylation est nécessaire. La déphosphorylation est catalysée par la phosphatase Cdc25. Il y a trois Cdc25 phosphatases chez les mammifères. Cdc25 A régule Cdk2-cyclin E et Cdc25 B et C régulent Cdk1-cyclin B. Le contrôle de CDK par phosphorylation permet de coupler le cycle cellulaire à un système de checkpoints que l'on va étudier prochainement.

Régulation des CDK

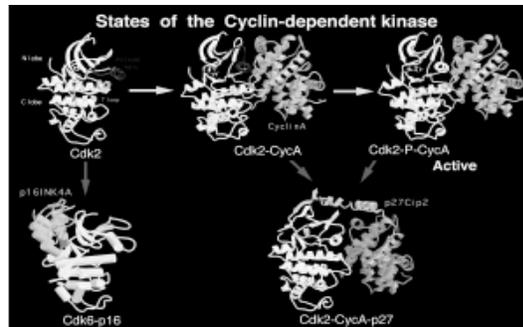
- Association des cyclines
- Phosphorylation
- Désphosphorylation
- Inhibiteurs (CKI)



Les CDKs sont tellement importantes que ce n'est pas suffisant de les contrôler par l'association des cyclines et des cycles de phosphorylation/déphosphorylation. Une famille de protéines connues sous le nom de CKI contrôlent aussi les CDK. La découverte des CKIs simultanément dans plusieurs labos illustre comment la recherche sur le cycle cellulaire était active au début des années 90. La première CKI a été découverte par le labo de David Beach comme une protéine de 21 kD qu'immunoprecipite avec Cdk2 (p21), aussi par le labo de Bert Vogelstein comme un gène induit par p53 (WAF1), par le labo de Steven Elledge qui a utilisé le système à double hybride pour isoler une « Cdk2 interacting protéine » (Cip1), par le labo de David Morgan comme une « Cdk Associated protéine de 20kD » (CAP20) et par le labo de Jim et Olivia Smith comme une protéine responsable de la sénescence cellulaire. Peu après Manuel Serrano aussi dans le labo de David Beach découvre la p16 et un an plus tard le labo de Charles Sherr, Joan Massagué et James Roberts découvrent la p27.

Sherr, C. J. & Roberts, J. M. CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev.* **13**, 1501-1512 (1999)

Cip/Kip vs. INKs



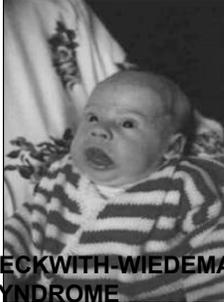
CDKI: deux familles chez les mammifères:

- la famille Cip/Kip: p21, p27, p57: inhibe les complexes Cdk2, Cdk4/6 cyclines et retarde la progression de G1 à S
- la famille Ink: p15, p16, p18, p19: inhibe la formation de complexes Cdk4/6 avec cyclin D

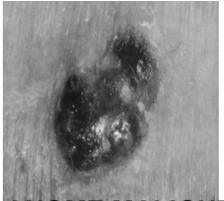
Chez la levure: SIC1

Nous pouvons diviser les CKI en deux groupes. La famille Cip/Kip et la famille INK. Les CKI de la famille Cip/Kip vont s'associer aux complexes CDK-cyclines inhibant leur activité kinase. Les CKI de la famille INK vont empêcher les CDK de former un complexe avec les cyclines.

Les maladies pour absence de CKI



**BECKWITH-WIEDEMANN
SYNDROME**



MELANOME MALIGNNE

BECKWITH-WIEDEMANN SYNDROME

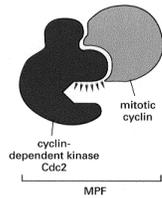
- 13.5 lb à la naissance
- Grosse langue
- Mutations dans le gène p57
- Grand risque de développer le cancer
- Des mutations en p57 sont aussi associées au gigantisme

• Phénotype similaire dans la souris p57^{-/-}

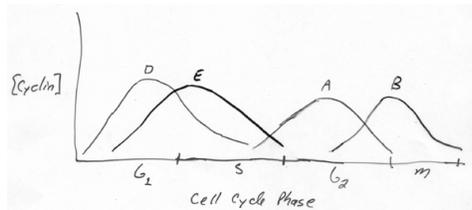
MÉLANOME MALIGNNE

- Mutations dans p16^{INK4a}

Régulation des cyclines

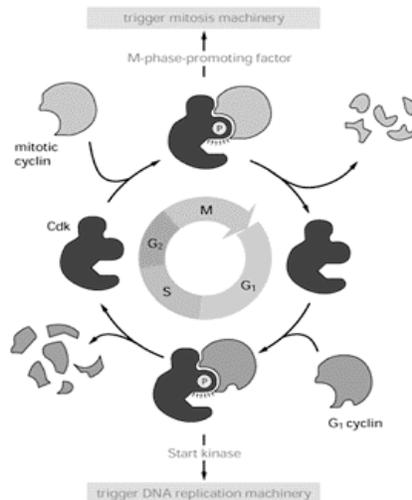


- Transcription
- Dégradation (phosphorylation)
- Sub-localisation cellulaire



L'activité CDK est régulée par les cyclines, la phosphorylation et les CKI. Mais les cyclines sont aussi régulées. Le contrôle transcriptionnel assure que la synthèse de chaque cycline corresponde à l'étape qu'elle régule. Ce contrôle sera étudié en détail après. La régulation de la synthèse n'est pas suffisante pour s'assurer que les cyclines soient seulement présentes dans l'étape qu'elles régulent. Les cyclines sont sujets d'un contrôle par dégradation protéolytique ce qui assure qu'elles ne seront pas présentes ailleurs que la phase qu'elles régulent. Pour assuré mieux ce contrôle les cyclines sont aussi sujet à un contrôle de localisation, elles sont exclues de noyau quand leur activité n'est pas désirée.

Contrôle de CDK par la dégradation des cyclines



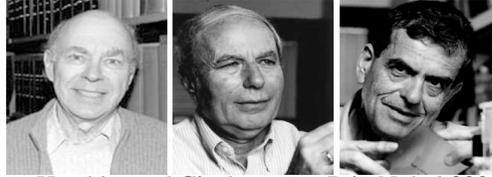
Modèle simplifié

En ce moment nous pouvons essayer d'intégrer ce que nous avons étudié afin de mieux comprendre le cycle cellulaire. Les complexes CDK-cyclines vont agir comme la minuterie de la laveuse. Ils contrôlent le cycle cellulaire à mesure que leur identité et composition changent. On va examiner un modèle simple qui implique la régulation de CDK par association des cyclines et dégradation des cyclines. Pour simplifier, nous avons appelé les complexes Cdk2, 4 et 6 avec les cyclines D et E comme Complexes de G₁. Les complexes Cdk1-cyclin A ou B seront appelés Complexes de phase M parce qu'ils vont catalyser l'entrée en mitose. Les cellules en G₁ expriment des cyclines de G₁ qui vont s'associer avec les CDK présentes (2, 4 et 6) pour phosphoryler les substrats qui permettront la progression G₁-S. Une fois la phase S est commencée les cyclines de G₁ seront dégradées. La phase M est ensuite induite par la synthèse des cyclines mitotiques A et B. Ces cyclines sont dégradées pendant la mitose. Ça va assurer que pendant G₁ ou S la cellule ne commence pas la mitose.

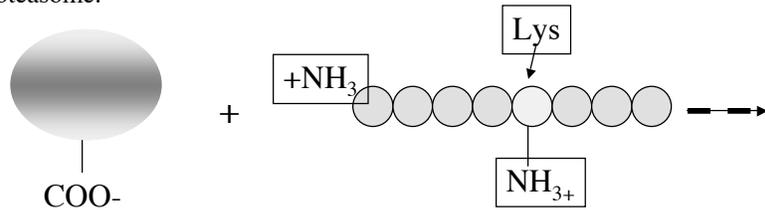
J'espère que vous avez compris l'idée derrière ce modèle simplifié. Maintenant nous pouvons passer aux détails moléculaires de la dégradation des cyclines.

L'ubiquitine cible les cyclines pour la dégradation

Une protéine de 76 acides aminés
Qui est attachée aux protéines qui
vont être dégradées par le
proteasome.



Rose, Hershko and Ciechanover: Prix Nobel 2004



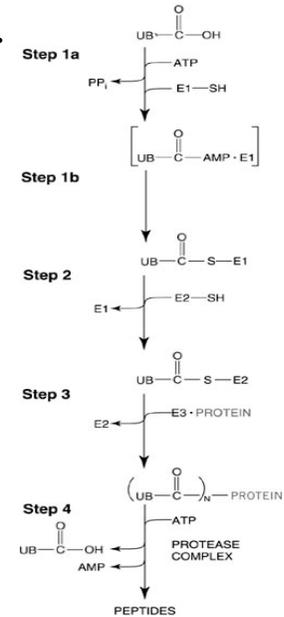
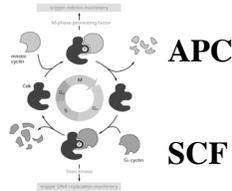
La glycine C terminale de l'ubiquitine
est attachée au groupe amino epsilon de
une lysine de la protéine cible.

Il était évident depuis le début des études sur les cyclines que le cycle cellulaire devait être régulé de façon très importante par la destruction des cyclines. Grâce aux études initiées par l'équipe de Mark Kirschner avec les oocytes de *Xenopus* nous avons appris que la dégradation des cyclines s'accomplit par la voie de l'ubiquitine et le proteasome. Cette voie de l'ubiquitine est une voie générale de dégradation de protéines dans la cellule (Prix Nobel 2004: Aaron Ciechanover, Avram Hershko et Irwin Rose). Alors la question est comment le proteasome qui porte une activité protéolytique constitutive est adapté pour dégrader les cyclines de façon très précise pendant le cycle cellulaire.

Glotzer, M., Murray, A. W. & Kirschner, M. W. Cyclin is degraded by the ubiquitin pathway. *Nature* **349**, 132-138 (1991)

Les ubiquitine-ligases E3 contrôlent la dégradation des cyclines.

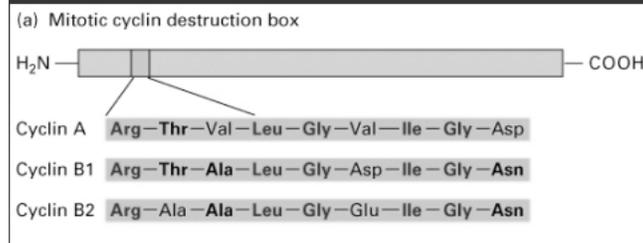
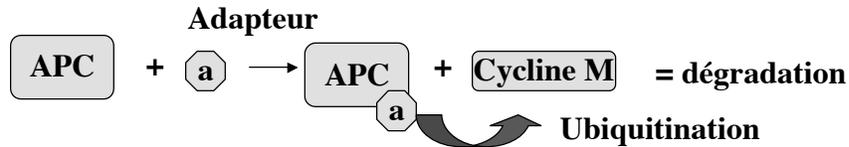
- Les enzymes de la famille « ubiquitine ligase » (E3) contrôlent la dégradation des cyclines
- Deux types d'E3 ligases
 - M et G1: anaphase promoting complex (APC) (activé par la protéine Cdc20/Fizzy pendant la mitose et par la protéine Cdh1 pendant G1)
 - G1/S: Ubiquitine ligase SCF (constitutive)



Pour comprendre comment le protéasome peut contrôler de façon spécifique le cycle cellulaire il faut que nous nous rappelions de son mécanisme d'action. Le protéasome peut dégrader seulement les protéines qui sont attachées à l'ubiquitine. Ce qui décide quelle protéine sera dégradée est au niveau de l'ubiquitination. Les enzymes qui catalysent l'attachement de l'ubiquitine sont connues comme ubiquitine ligases ou E3. Pour quoi E3?

Pour attacher l'ubiquitine, les ubiquitine ligases ne peuvent pas utiliser l'ubiquitine directement. Il faut activer l'ubiquitine avant de pouvoir l'attacher aux protéines cibles. Pour ça la cellule utilise deux enzymes. L'enzyme E1 active l'ubiquitine avec l'ATP et l'enzyme E2 sert d'intermédiaire entre E1 et E3. Par la suite E3 transfère l'ubiquitine de E2 aux protéines cibles. Comme l'ubiquitine et les enzymes E1 et E2 sont toujours disponibles, ce sont les enzymes E3 qui décident quelle protéine va être dégradée.

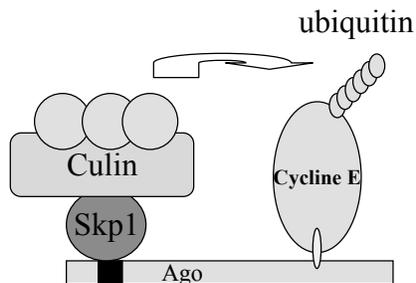
APC et la voie de l'ubiquitine



Les protéines adaptatrices d'APC (Cdc20 et Cdh1) décident quelles protéines seront dégradées.

Glotzer, Murray et Kirschner ont utilisés des oocytes de *Xenopus* pour étudier le mécanisme de dégradation de la Cyclin B. Ils ont découvert l'enzyme E3 responsable de la destruction du cycline B et ils l'ont nommée APC pour Anaphase Promoting Complex. Leur découverte était le premier montrant le rôle de la dégradation des protéines par la voie de l'ubiquitine pour contrôler le cycle cellulaire. APC agit pendant la phase M pour dégrader les cyclines mitotiques et d'autres substrats, ce qui permet aux cellules rentrer l'anaphase et finir la mitose. L'activité de APC est activée par deux protéines adaptatrices. Cdc20 permet la destruction des cyclines mitotiques A et B. Ses cyclines possèdent une signal de reconnaissance de Cdc20: la boîte de destruction des cyclines. Cdh1 permet la destruction d'autres substrats qui participent dans la mitose incluant Cdc20.

Les complexes SCF détruisent des protéines phosphorylées



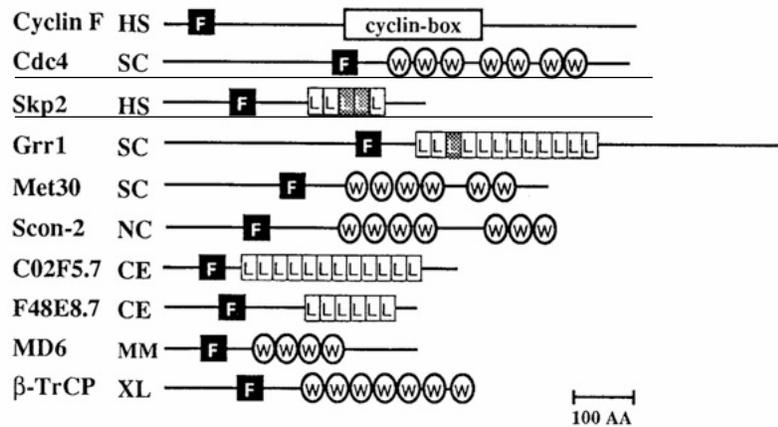
- SCF pour Skp + Culins + E box
- La sous-unité à boîte F reconnaît le substrat phosphorylé (Ago pour la cycline E)
- Il y a plusieurs protéines à boîte F dans la cellule

○ C'est la phosphorylation de substrats qui active la dégradation via les complexes SCF

Les cyclines de G1 sont dégradées par une E3 ligase différente d'APC, les complexes SCF. La sous-unité à boîte F reconnaît les substrats phosphorylés. Les protéines à boîte F seront donc des analogues fonctionnels de Cdc20 et Cdh1. Ils vont coupler l'activité E3 de Skp1 et les culins aux substrats. Il y a plusieurs protéines à boîte F dans la cellule. Par exemple, la dégradation de la cycline E dépend de AgøFbw7 qui reconnaît la cycline E phosphorylé en Thr380 par Cdk2 ou GSK3beta.

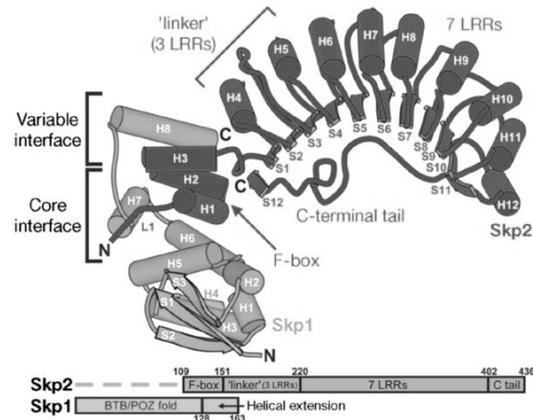
Pour les cyclines du type D, une protéine a boîte F similaire n'as pas encore été découverte. Par contre, nous savons que les cyclines D sont dégradées via SCF et le protéasome parce que l'inhibition des Skp1 ou de Cul1 permet l'accumulation de cycline D1 (Proc Natl Acad Sci U S A. 1998 Sep 15;95(19):11324-9). La phosphorylation qui cible la cycline D1 pour la dégradation est catalysé par la glycogène synthétase kinase 3 bêta (Genes Dev. 1998 Nov 15;12(22):3499-511).

Les protéines à boîte F contiennent des motifs pour les interactions protéines-protéines



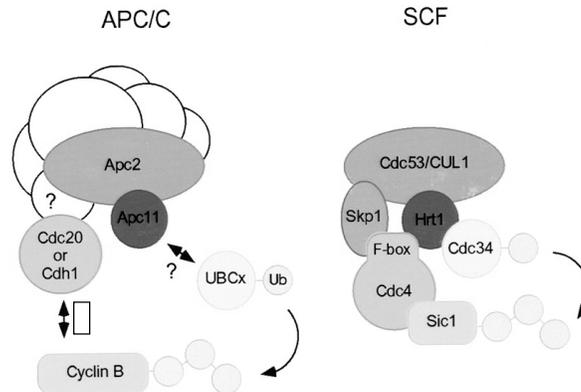
La diversité des protéines à boîte F dans les cellules indique que plusieurs nouveaux mécanismes de contrôle dépendant de ses protéines seront découverts dans un futur proche. Une caractéristique essentielle des protéines à boîte F est qu'elles possèdent des motifs d'interactions protéines-protéines qui accompagnent toujours la boîte F. On trouve souvent des répétitions WD, et des motifs riches en leucine. Cette organisation structurale explique comment les protéines à boîte F fonctionnent dans les complexes SCF pour faciliter la dégradation des protéines.

La structure du complexe Skp1 avec la protéine à boîte F Skp2



Les protéines à boîte F vont lier la sous unité Skp1 de SCF à travers la boîte F. Les motifs des interactions protéines protéines que nous retrouvons dans toutes les protéines a boîte F vont servir au recrutement des protéines pour la dégradation via SCF (*Nature* 408, 381 - 386 (2000))

« Ubiquitin protein ligases »



Vol. 13, No. 16, pp. 2039-2058, August 15, 1999

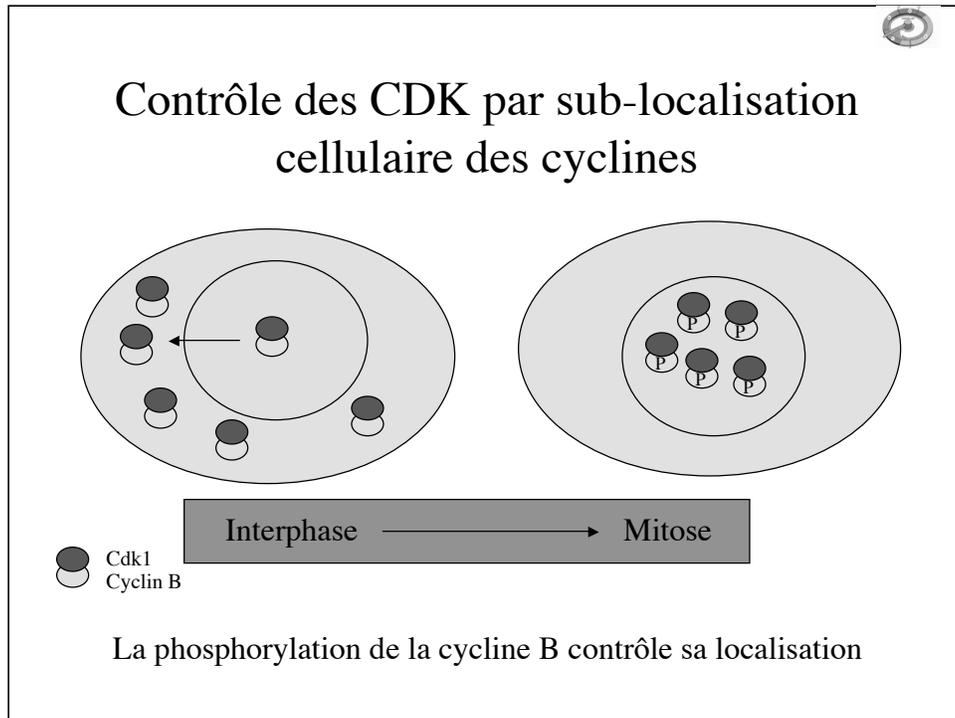
REVIEW

Whose end is destruction: cell division and the anaphase-promoting complex

Wolfgang Zachariae and Kim Nasmyth

Si bien on a décrit deux complexes E3 pour la dégradation des cyclines et d'autres substrats importants pour le contrôle du cycle cellulaire il y a beaucoup de similarités entre APC et SCF. Les protéines à boîtes F et les sous unités régulatrices de APC, CDC20 et Cdh1 servent comme protéines adaptatrices qui recrutent les substrats pour la dégradation via le protéasome. Il y a aussi des sous unités qui recrutent les enzymes de type E2 (UbcX pour APC et Cdc34 pour SCF). Finalement la sous unité Apc2 de APC a une homologie avec les culins qui forme les complexes SCF. Pour résumer cette partie :

La dégradation de protéines fait un parti essentiel du contrôle du cycle cellulaire et le rythme des découverts dans ce domaine n'as pas cesse depuis le papier classique de Glotzer, M., Murray, A. W. & Kirschner, M. W. (Cyclin is degraded by the ubiquitin pathway. *Nature* **349**, 132-138 (1991))



Il semble que ce n'est pas suffisant de contrôler les cyclines par la transcription et la dégradation dans une phase spécifique du cycle cellulaire. Les cyclines B et D et peut-être d'autres cyclines sont régulées aussi par un contrôle qui les exporte du noyau. Ce contrôle a été bien étudié pour la cycline B qui est exportée du noyau en interphase. La phosphorylation de la cycline B pendant la mitose inhibe son interaction avec les protéines d'exporte et permet son accumulation dans le noyau (Genes Dev. 1998 Jul 15;12(14):2131-43). De cette façon, la cellule s'assure que les complexes CDK-cycline B sont active seulement lors de la mitose et pas pendant les autres étapes du cycle cellulaire. On empêche comme ça une entrée prématurée à la mitose ou la possibilité que les complexes Cdk-cyclin B active la phase S. En fait une expression forcée de la cyclin B et Cdk1 dans un noyau en G1 déclenche la phase S (*Science* May 9 2003: 987-990). Une deuxième conclusion d'une telle expérience est que la régulation du cycle cellulaire par les complexes Cdk-cyclines n'est pas entièrement dépendante de la spécificité de substrat des cyclines.

Régulation des CKI

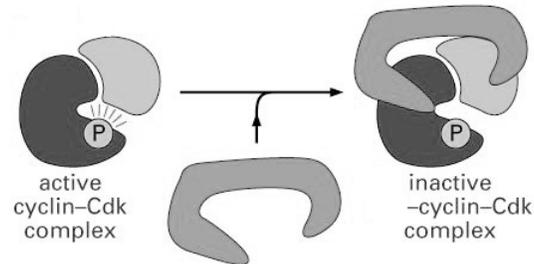


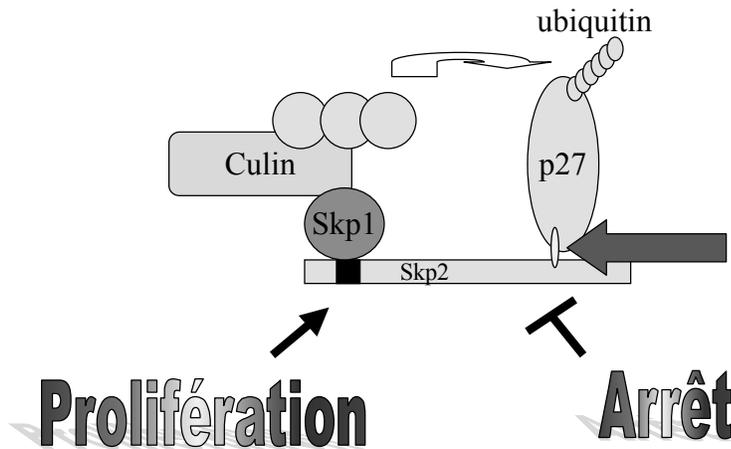
Figure 17-19. Molecular Biology of the Cell, 4th Edition.

- Transcription
- Phosphorylation/Dephosphorylation
- Dégradation
- Sub-localisation cellulaire

Est-ce que vous avez déjà remarqué la tendance de ce cours ? À chaque fois que je vous introduis un groupe de molécules qui régulent le cycle cellulaire, on trouve que ces molécules sont régulées aussi de plusieurs façons. On se dit qu'on ne va jamais finir de comprendre la régulation du cycle cellulaire, mais on va y arriver.

Nous avons commencé par étudier comment les CDK sont elles régulées. Ensuite on a vu la régulation des cyclines et maintenant on va voir la régulation de CKI. Comme vous savez, les CKI sont les protéines qu'inhibent les CDK et il y a deux groupes : les Kips/Cips et les INKS. En général elles sont régulées par les mêmes mécanismes que nous avons vus chez les cyclines : transcription, phosphorylation, dégradation et localisation. Encore nous allons traiter la transcription plus en détails par la suite. La régulation de CKI détermine de façon très importante le passage par G1 et la rentrée en phase S. Pourquoi ?

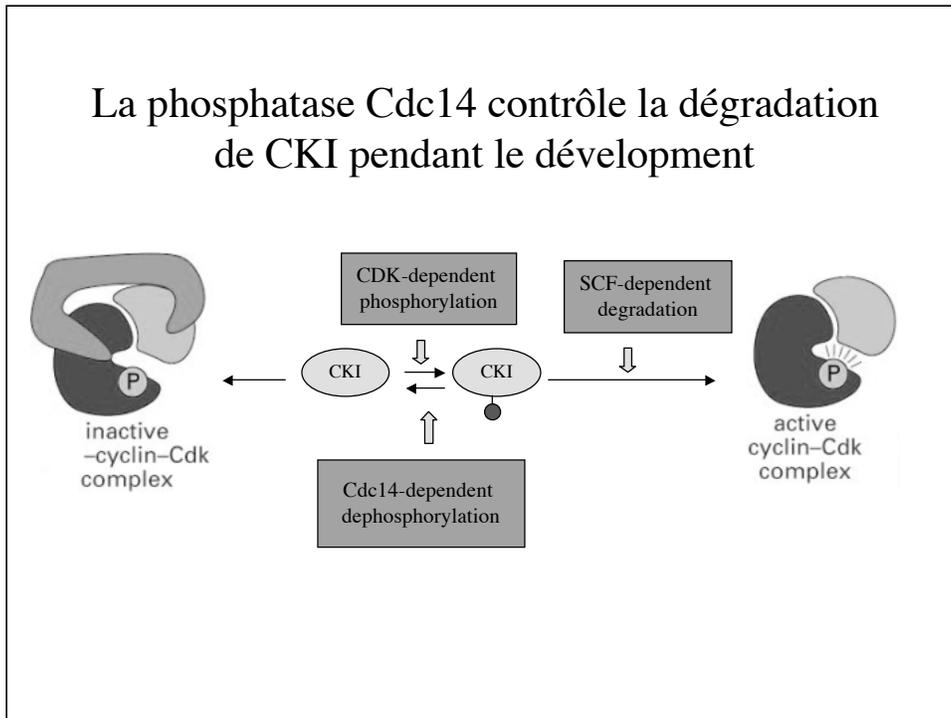
La protéine à boîte F, Skp2 régule la dégradation de p27



La protéine à boîte F mieux connue pour dégrader les CKI est Skp2. Skp2 est une pièce importante du contrôle du cycle cellulaire parce qu'elle couple les CKI p21 et p27 aux complexes SCF et au protéasome. Plusieurs signaux qui stimulent la prolifération augmentent l'activité de Skp2.

Aussi, les arrêts de croissance comme la sénescence, diminuent les niveaux de Skp2 (Exp Gerontol 2001 Dec;37(1):41-55)

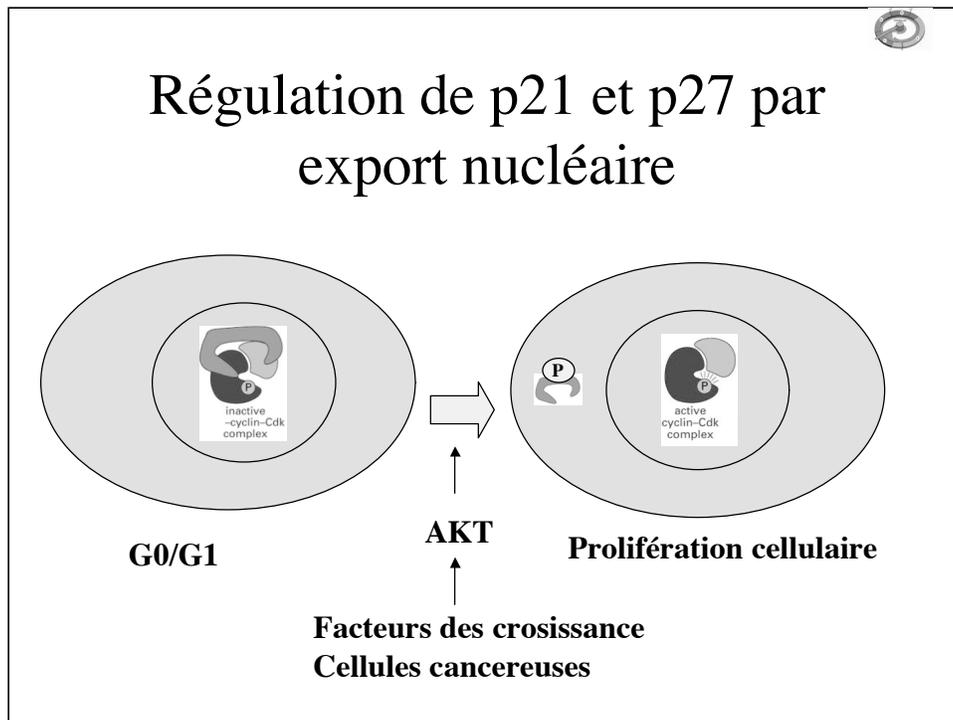
La phosphatase Cdc14 contrôle la dégradation de CKI pendant le développement



Il faut toujours penser en biologie moléculaire que chaque protéine régulée par phosphorylation est aussi régulée par déphosphorylation. La caractérisation des phosphatases a toujours été retardée par rapport à la caractérisation des kinases. Les CKI sont régulés par phosphorylation et puis dégradation dépendante de SCF. Ce processus est bloqué par la protéine phosphatase Cdc14. Des mutants de Cdc14 chez le vers *C. elegans* montrent des divisions additionnelles pendant le développement, ce qui indique que la déphosphorylation de CKI est un élément important pour contrôler la prolifération cellulaire lors du développement.

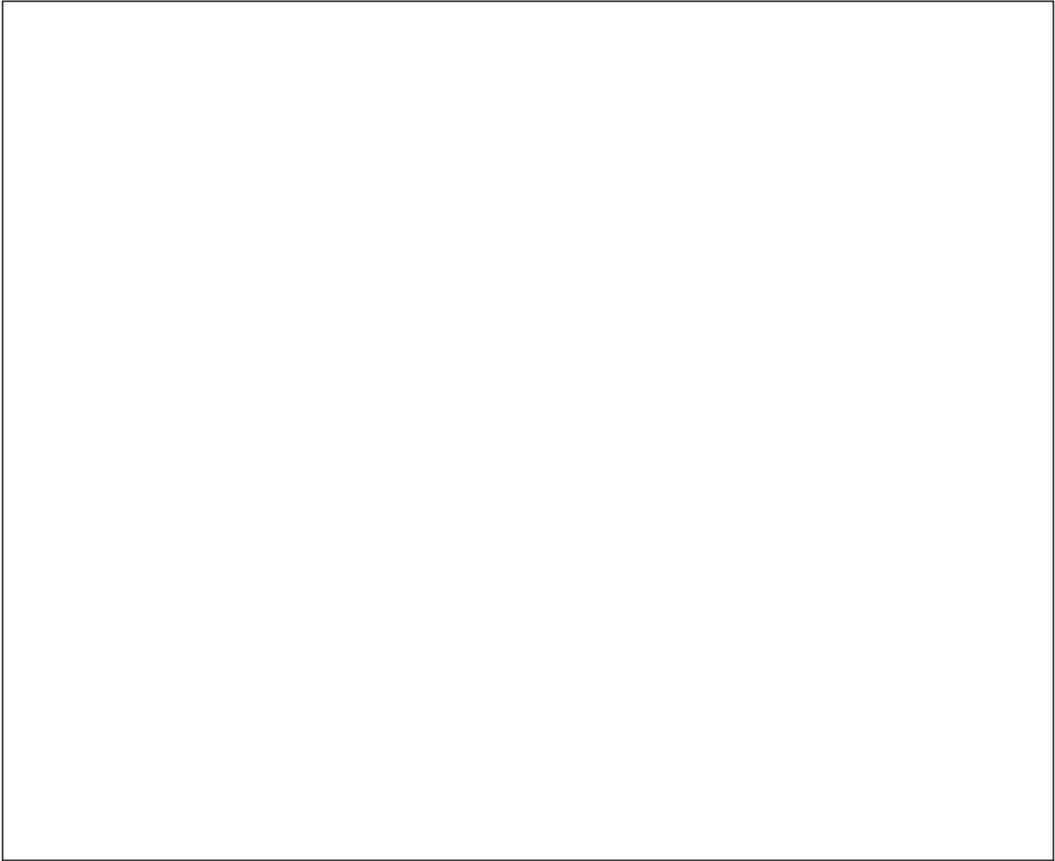
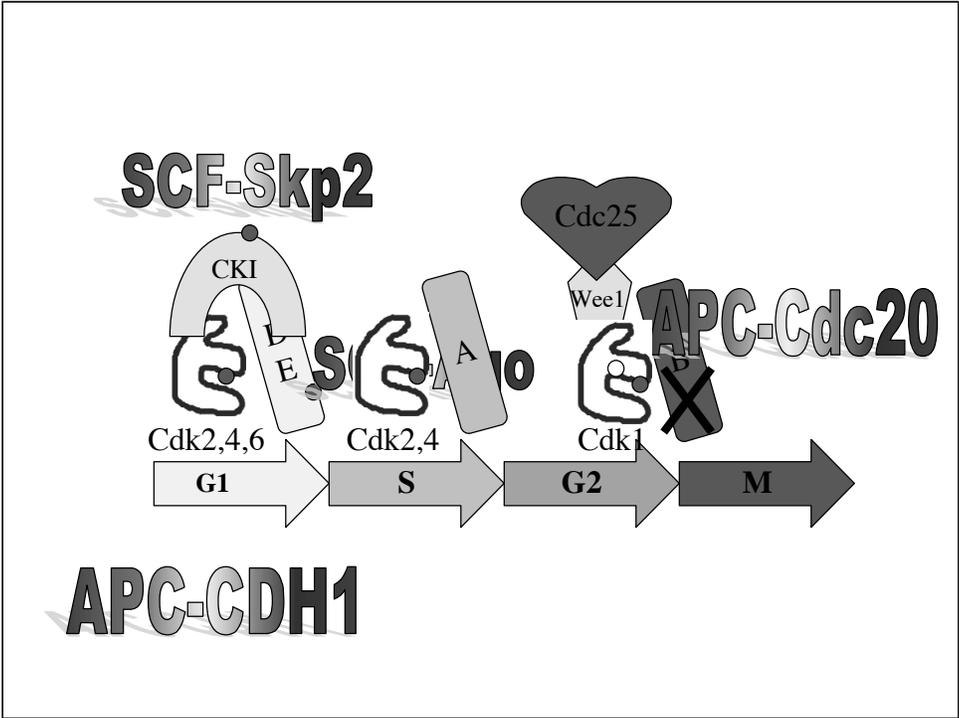
Kipreos: *Nature Cell Biology* 6:693, 2004

Alors, c'est n'est pas une surprise que quelques cellules cancéreuses portent des mutations du gène Cdc14.



Comme on l'a étudié pour la cycline B les CKI sont aussi contrôlés par leur exportation du noyau ou ils vont agir comme inhibiteurs des CDK. L'enzyme AKT une protéine kinase qui se trouve dans les voies de signalisation des facteurs de croissances phosphoryle les CKI et stimule leur exportation vers le cytoplasme.

(S W Blain & J Massagué Nature Med. Oct 2002. Breast cancer banishes p27 from nucleus. pp 1076 - 1078)



À rétenir

CAK et phosphorylation positive en Thr160

Wee1 et phosphorylation négative en Tyr14 et 15

Rôle activateur de CDK par les phosphatases Cdc25

Les familles de CKI: Cip/Kip et INK

Différents mécanismes d'action de CKI

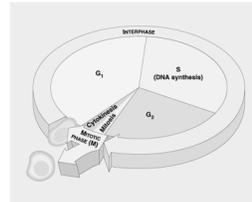
Les mécanismes de régulation de cyclines

E3 ligases et dégradation des cyclines

APC et protéines adaptatrices: Cdc20 (M) et Cdh1 (G1)

SCF et protéines à boîte F (phosphorylation des substrats)

Régulation de CKI: dégradation par SCF-Skp2 et export nucléaire



À venir

La régulation transcriptionnelle