

Université de Montréal

**Identification et caractérisation de candidats
régulateurs du cycle cellulaire chez le dinoflagellé
*Lingulodinium polyedrum***

par

Thierry Bertomeu

Programmes de Biologie Moléculaire
Faculté des Études Supérieures

Thèse présentée à la Faculté des Études Supérieures
en vue de l'obtention du grade de doctorat
en biologie moléculaire

Juillet, 2007

© Thierry Bertomeu, 2007



QH
506
U54
2007
v.016

AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal
Faculté des Études Supérieures

Cette thèse intitulée :

Identification et caractérisation de candidats régulateurs
du cycle cellulaire chez le dinoflagellé *Lingulodinium polyedrum*

présentée par :
Thierry Bertomeu

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Martine Raymond, président-rapporteur
David Morse, directeur de recherche
Daniel Matton, membre du jury
Hervé Moreau, examinateur externe
Trang Hoang, représentant du doyen de la FES

Résumé

Les dinoflagellés sont des eucaryotes unicellulaires qui composent une majeure partie du phytoplancton. Leur biologie et leur organisation nucléaire sont uniques. Leur chromosomes sont condensés en permanence et l'organisation de leur ADN génomique est hors du commun car ils n'ont pas d'histone ni de nucléosome. Leur noyau ne se désagrège pas à la mitose et la ségrégation du matériel génétique se fait via un fuseau mitotique cytoplasmique passant au travers du noyau par des invaginations nucléaires avec un contact indirect aux chromosomes attachés à la surface interne du noyau.

Lingulodinium polyedrum est un dinoflagellé modèle pour l'étude des mécanismes de contrôle des rythmes circadiens car plusieurs de ses aspects physiologiques (bioluminescence, photosynthèse, migration verticale et mitose) sont circadiens. Les intervenants biochimiques de ces rythmes circadiens doivent être ciblés par l'horloge circadienne pour effectivement contrôler l'occurrence de ces rythmes. L'isolement et la caractérisation de candidats régulateurs du cycle cellulaire de ce dinoflagellé pourraient alors nous faire découvrir d'autres particularités du cycle cellulaire des dinoflagellés tout en nous permettant de découvrir quel contrôle biochimique amène une division cellulaire circadienne.

Nous avons isolé deux gènes d'une banque d'ADNc de *Lingulodinium* insérée dans un vecteur d'expression chez la levure capables de compléter de manière fonctionnelle un mutant conditionnel létal de *Saccharomyces cerevisiae* (pour ses cyclines Cln1, Cln2 et Cln3).

Le premier gène encode une cycline authentique que l'on a appelé LpCyc1. Cette cycline possède un domaine repliement-cycline ainsi qu'une boîte de

destruction cycline typique des cyclines mitotiques. Un anticorps, dirigé contre sa partie N-terminale excluant ses domaines cyclines, reconnaît une protéine de 68 kDa par transfert de type Western. Ce signal est plus abondant sur des extraits protéiques de cultures aux cellules enrichies en G2 plutôt que sur des extraits protéiques de cultures aux cellules enrichies en G1.

Le second gène encode une protéine AAA (ATPases Associées à différentes Activités cellulaires) appelée LpAAA. Elle est similaire à des protéines bactériennes impliquées dans la sporulation et à des AAA de plantes supérieures aux fonctions inconnues. Une augmentation des niveaux de transcrits de la cycline *CLB5* a été détectée chez la levure exprimant LpAAA et nous proposons que LpAAA pourrait remodeler et inactiver l'inhibiteur Whi5 du facteur de transcription SBF responsable de la transcription de *CLB5*. Une activité similaire de LpAAA chez les dinoflagellés est prometteuse.

Nous avons purifié et microséquéncé une protéine, LpCDK5, reconnue par un anticorps anti-PSTAIRE, un motif caractéristique de plusieurs CDKs. Malheureusement, cette CDK ressemble à un type non-impliqué dans les étapes de transition du cycle cellulaire. L'absence de changement de phosphorylation de cette CDK dans le temps, détecté par transfert Western de gels SDS-PAGE 2D, est en accord avec cette proposition.

La découverte de LpCyc1 et LpCDK5 laisse présager la présence de plusieurs familles de cyclines et CDKs chez les dinoflagellés. Il se pourrait ainsi que le cycle cellulaire des dinoflagellés soit contrôlé en suivant les principes généraux déjà connus d'autres organismes, tout en ayant des mécanismes qui restent à découvrir qui leurs sont propres.

Mots-clés : Cycline, CDK, AAA, cycle cellulaire, dinoflagellé, rythme circadien

Abstract

Dinoflagellates are unicellular eukaryotes that comprise a large part of phytoplankton. Their biology and nuclear organisation are unique. Their chromosomes are permanently condensed and organisation of their genomic DNA differs from that of other eukaryotes because they lack both classic histone and nucleosome. Their nuclei do not disassemble at mitosis and segregation of their genetic material is done by a cytoplasmic mitotic spindle passing through the nuclei by several nuclear invaginations and chromosomes being attached indirectly to them by the internal surface of the nuclei.

Lingulodinium polyedrum is a dinoflagellate used for studying the control mechanisms of circadian rhythms because many aspects of its physiology (bioluminescence, photosynthesis, vertical migration and mitosis) are circadian. The biochemical components of these circadian rhythms must be targets of the circadian clock in order to effectively control the occurrence of these rhythms. The isolation and characterization of candidate regulators of the cell cycle from this dinoflagellate could not only uncover new peculiarities of the cell cycle of dinoflagellates but also uncover the targets for the circadian control of cell division.

We isolated two genes from a cDNA library from *Lingulodinium* in a yeast expression vector able to functionally complement a conditional lethal mutant of *Saccharomyces cerevisiae* (for cyclins Cln1, Cln2 and Cln3).

The first gene encodes an authentic cyclin we called LpCyc1. This cyclin has a cyclin-fold domain and a cyclin destruction-box motif, typical of mitotic cyclins. We raised an antibody directed against the N-terminal part of the protein, excluding the cyclin domains, and it recognizes a 68 kDa band on Western blot.

The signal is more abundant in extracts from cultures enriched in G2 phase cells compared to cultures enriched in G1 phase cells.

The second gene encodes an AAA protein (ATPases Associated with different cellular Activities) we called LpAAA. This protein is similar to bacterial proteins implicated in sporulation and to AAA of unknown function from higher plants. Augmentation of the cyclin *CLB5* transcript levels was detected in the yeast expressing LpAAA and we propose that LpAAA might remodel and inactivate Whi5, an inhibitor of the transcription factor SBF responsible for the transcription of *CLB5*. A similar activity of LpAAA in the dinoflagellate is possible.

We purified and microsequenced a protein, LpCDK5, reacting to an anti-PSTAIRE antibody, a motif common to many CDKs. Unfortunately, this CDK looks like a type of CDK not implicated in the different transitions of the cell cycle. The lack of changes in the phosphorylation state of LpCDK5 over time, as detected by Western blotting of 2D SDS-PAGE gels, is in accordance with no such role.

The discovery of LpCyc1 and LpCDK5 suggests there are many different families of CDKs and cyclins in dinoflagellates. It is therefore possible that the cell cycle of dinoflagellates is controlled with the same general rules already discovered in other organisms, while still having their own peculiarities that are still to be discovered.

Keywords : Cyclin, CDK, AAA, cell cycle, dinoflagellate, circadian rhythm

Table des matières

Résumé	iii
Abstract	v
Table des matières	vii
Liste des tableaux.....	x
Liste des figures	xi
Liste des abréviations.....	xiii
Remerciements	xviii
Avant-propos	xix
1 Introduction	1
1.1 Les dinoflagellés.....	1
1.1.1 Biologie générale	1
1.1.2 Matériel génétique et noyau.....	4
1.1.3 Biochimie particulière.....	7
1.1.4 <i>Lingulodinium polyedrum</i> et rythmes biologiques	9
1.2 Contrôle du cycle cellulaire.....	14
1.2.1 Cycle cellulaire : principes de base.....	14
1.2.2 Cycle cellulaire : régulation	15
1.2.2.1 Isolement biochimique de MPF : une kinase et une cycline	15
1.2.2.2 Les mutants cdc : rôle central de Cdc2	16
1.2.2.3 Cyclines et kinases cyclines-dépendantes (anglais : CDKs)	18
1.2.3 Regard sur <i>S. cerevisiae</i>	21
1.3 Études du cycle cellulaire chez les dinoflagellés	27
1.4 Approches et objectifs du projet	33
2 Publication #1 : Isolation of a dinoflagellate mitotic cyclin by functional complementation in yeast.....	37

2.1	Abstract.....	38
2.2	Introduction.....	38
2.3	Experimental Procedures	42
2.4	Results	45
2.4.1	Functional cloning of a mitotic cyclin.....	45
2.4.2	The cyclin sequences are derived from dinoflagellates.....	53
2.4.3	Cyclin expression is controlled post translationally	60
2.5	Discussion	62
2.6	Acknowledgements	68
3	Publication #2 : A Dinoflagellate AAA Family Member Rescues a Conditional Yeast G1/S Phase Cyclin Mutant through Increased <i>CLB5</i> Accumulation.....	69
3.1	Abstract.....	70
3.2	Introduction.....	70
3.3	Results	74
3.3.1	A <i>Gonyaulax</i> AAA protein rescues the yeast <i>cln1cln2cln3</i> mutant phenotype.....	74
3.3.2	The level of Sic1p necessary to inhibit cell growth is not altered by GpAAA	82
3.3.3	GpAAA interacts only weakly with Cdc28p in a two-hybrid assay.....	86
3.3.4	GpAAA rescues the <i>cln1cln2cln3</i> phenotype by increasing <i>CLB5</i> transcript levels	89
3.4	Discussion	90
3.5	Methods.....	94
3.6	Acknowledgements	97
4	Publication #3 : A dinoflagellate CDK5-like cyclin-dependent kinase.....	98
4.1	Abstract.....	99
4.2	Introduction.....	99

4.3	Results	103
4.4	Discussion	118
4.5	Methods.....	120
4.6	Acknowledgements	126
5	Discussion générale et perspectives.....	129
6	Bibliographie	146

Liste des tableaux

Table 1 Codon usage of Cyc115 compared to other <i>Gonyaulax</i> genes.....	55
Table 2 Sequence identities in cyclin domains	56
Tableau 3 Nombre de séquences nucléotidiques disponibles sur GenBank par espèces de dinoflagellés.	140
Tableau 4 Projets de séquençage d'ESTs de dinoflagellés publiés ou en cours de réalisation.	141

Liste des figures

Figure 1.1 Marée rouge	3
Figure 1.2 Les chromosomes des dinoflagellés sont condensés à l'interphase.	5
Figure 1.3 Temps d'occurrence de 4 rythmes circadiens de <i>Lingulodinium polyedrum</i> (bioluminescence, photosynthèse, migration et division cellulaire).	11
Figure 1.4 Sommaire des intervenants moléculaires principaux du cycle cellulaire de <i>S. cerevisiae</i> (voir le texte pour plus de détails).	22
Figure 2.1 Rescue of the <i>Cln123</i> mutant yeast phenotype by <i>Gonyaulax</i> cDNAs.	46
Figure 2.2 <i>Gonyaulax</i> cyclin contains two conserved cyclin domains and a degradation box.....	49
Figure 2.3 Two different <i>Gonyaulax</i> cyclin genes are expressed.....	52
Figure 2.4 <i>Gonyaulax</i> contains multiple cyclin genes.	57
Figure 2.5 Phylogeny of <i>Gonyaulax</i> cyclin sequence is consistent with known relationships.	59
Figure 2.6 <i>Gonyaulax</i> cyclin is more abundant in G2 cells.	61
Figure 3.1 Partial rescue of <i>cln1cln2cln3</i> mutant phenotype by a dinoflagellate cDNA.....	77
Figure 3.2 <i>Cyc17</i> encodes an AAA protein.....	81
Figure 3.3 Schematic representation of possible mechanisms allowing GpAAA to pass the START checkpoint in the absence of CLN3.....	84
Figure 3.4 GpAAA does not compete with the CKI Sic1p.	85
Figure 3.5 GpAAA activates <i>CLB5</i> transcription.	88
Figure 4.1 Cell cycle analysis of <i>L. polyedrum</i> over time.	105
Figure 4.2 Chromatography of LpCyc1 and an anti-PSTAIRE reactive protein. ..	108

Figure 4.3 Microsequence analysis of proteins bound to p13 ^{suc1} -Sepharose beads.	111
Figure 4.4 Identification of an anti-PSTAIRES reactive protein following two dimensional SDS/PAGE.	112
Figure 4.5 Anti-PSTAIRES reactive protein corresponds to a CDK5 isoform.....	114
Figure 4.6 No variation upon the expression of LpCDK5-like is detected over time.	116
Figure 4.7 Isoelectric point of LpCDK5-like is invariant over time.....	117
Supplementary Figure 4.8 LpCDK5 partial sequence alignment.	128
Figure 5.1 Hypothèse de la fenêtre d'opportunité du cycle circadien donnée au cycle cellulaire pour le contrôle du moment d'entrée en mitose via l'enlèvement du phosphate inhibiteur de la CDK1.	132

Liste des abréviations

2D bidimensionnel

5-FOA (anglais : 5-FluoroOrotic Acid)

AAA ATPases associées à différentes activités cellulaires (anglais : ATPases Associated with different cellular Activities)

AD domaine d'activation (anglais : activation domain)

ADN acide désoxyribonucléique

APC complexe favorisant l'anaphase (anaphase promoting complex)

ARN acide ribonucléique

ARNm acide ribonucléique messenger

ARNr acide ribonucléique ribosomal

ARS séquence autonome de réplication (anglais : autonomous replication sequence)

ATP adénosine tri-phosphatée

BD domaine de liaison (anglais : binding domain)

BLAST (anglais : basic local alignment search tool)

bp paire de base (anglais : base pair)

BSA albumine sérique de bœuf (anglais : bovine serum albumin)

C Celsius

CAK kinase activatrice de CDK (anglais : CDK-activating kinase)

CCD (anglais : charged-couple device)

CCMP (anglais : national culture collection of marine phytoplankton)

CDC cycle de division cellulaire (anglais : cell division cycle)

CDK kinase cycline-dépendante (anglais : cyclin-dependent kinase)

- cDNA** (anglais : complementary deoxyribonucleic acid)
- CHAPS** (anglais : cholamidopropyl-dimethylammonio propanesulfonate)
- CIP** phosphatase intestinale de veau (anglais : calf intestinal phosphatase)
- CKI** inhibiteur de CDK (anglais : CDK inhibitor)
- CO₂** dioxyde de carbone
- CT** temps circadien (anglais : circadian time)
- Cyc** cycline
- DAPI** (anglais : 4', 6-diamidino-2-phenylindole)
- DEAE** (anglais : diethylamino ethanol)
- DEPC** diéthylène pyrocarbonate
- DTT** (anglais : dithiothreitol)
- EDTA** acide éthylènediamine tétraacétique
- EGTA** acide éthylène glycol-bis (2-aminoéthyle éther)-N, N, N', N'-tétraacétique
- EST** (anglais : expressed sequence tag)
- FPLC** (anglais : fast protein liquid chromatography)
- g** gravité
- G1** (anglais : gap 1)
- G2** (anglais : gap 2)
- Gp** *Gonyaulax polyedra*
- GPD** (anglais : glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase)
- GST** (anglais : glutathione s-transferase)
- h** heure
- HABs** population explosive d'algues nocives (anglais : harmful algal blooms)
- HCl** chlorure d'hydrogène
- hν** lumière
- HEPES** (anglais : 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid)
- HSP** protéine de choc thermique (anglais : heat-shock protein)

IEF (anglais : isoelectric focusing)

IgG immunoglobuline G

IPG (anglais : immobilized pH gradient)

IPTG isopropyl thio- β -galactoside

kb kilobase

kDa kiloDalton

L litre

LBP protéine liant la luciférine (anglais : Luciferin-Binding Protein)

LD jour/nuit (light/dark)

LiOAc acétate de lithium

Lp *Lingulodinium polyedrum*

m mètre

M molaire

MAPs protéines associées aux microtubules (anglais : Microtubule-Associated Proteins)

MBF (anglais : Mlu1 Cell Cycle BOX Binding Factor)

μ **g** microgramme

mg milligramme

MgCl₂ chlorure de magnésium

mL millilitre

μ **m** micromètre

mM millimolaire

μ **mol** micromolaire

MPF facteur initiant l'entrée en mitose / la maturation (anglais : mitosis/maturation-promoting factor)

mRNA (anglais : messenger ribonucleic acid)

MS spectroscopie de masse (anglais : mass spectroscopy)

MTOC centre organisateur des microtubules (anglais : microtubules organisation center)

NaOAc acétate de sodium

NaOH hydroxide de sodium

Ni-NTA (anglais : nickel nitrilo-tri-acetic acid)

NL non-linéaire

NLS signal de localisation nucléaire (anglais : nuclear localization signal)

OD densité optique (anglais : optical density)

ORC (anglais : origin recognition complex)

ORF cadre de lecture ouvert (anglais : open reading frame)

PBS (anglais : phosphate-buffered saline)

PCP protéine-*a* péridinine-chlorophylle (anglais : peridinin-chlorophyll *a*-protein)

PCR réaction en chaîne de la polymérase (anglais : polymerase chain reaction)

pg picogramme

phase G1 (anglais : gap 1)

phase G2 (anglais : gap 2)

phase M phase mitotique

phase S phase de synthèse d'ADN

PI iodure de propidium (anglais : propidium iodide)

PMSF (anglais : phenylmethylsulfonyl fluoride)

Poly(A) polyadénylé

PVDF (anglais : polyvinylidene fluoride)

RB rétinoblastôme (anglais : retinoblastoma)

RNA (anglais : ribonucleic acid)

RNase ribonucléase

rRNA (anglais : ribosomal RNA)

rpm tours par minute (anglais : rounds per minute)

RT-PCR réaction en chaîne de la polymérase amorcée par une transcriptase inverse (anglais : reverse transcriptase)

RuBisCO (anglais : ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase-oxygenase)

s seconde

SBF (anglais : Swi4/6 Cell Cycle BOX Binding Eactor)

SCB (anglais : Swi4/6 Cell Cycle BOX)

SCF (anglais : Skp1/Cullin/F-box protein)

SDS sulfate dodécyle de sodium (anglais : sodium dodecyl sulfate)

SDS-PAGE (anglais : SDS polyacrylamide gel electrophoresis)

SL (anglais : spliced leader)

SPB (anglais : spindle pole body)

SPF facteur initiant l'entrée en phase S (anglais : S phase promoting factor)

SRH (anglais : second region of homology)

ssDNA acide désoxyribonucléique simple brin (anglais : single stranded deoxyribonucleic acid)

TBP protéine liant la boîte TATA (anglais : TATA-box binding protein)

UTR région non-traduite (anglais : untranslated region)

UV ultra violet

Remerciements

Je tiens premièrement à remercier mon directeur de recherche David Morse. Son esprit scientifique, son humour et ses qualités humaines m'avaient attiré au baccalauréat et m'ont convaincu d'aller étudier ce petit être bizarre qu'est *Gonyaulax*. Un grand merci pour sa patience, ses bonnes idées, son support financier et moral et ses approches scientifiques qui me serviront tout au long de ma carrière.

Je tiens aussi à remercier mes partenaires et camarades de laboratoire : Nasha Nassoury, Yunling Wang, Mathieu Lapointe et Tyler Mackenzie. J'ai partagé avec vous les hauts et les bas de travailler avec Gony et c'est une expérience unique. Votre amitié, votre humour et un votre aide à ma formation m'ont fait me sentir au labo comme un deuxième chez moi.

Je remercie tous les autres professeurs, post-docs et élèves de l'IRBV qui ont participé chacun à leur manière à créer la magnifique ambiance que l'on y retrouve. Un grand merci à Mario Cappadocia et aux membres présents et passés de son laboratoire pour tous les gâteaux d'anniversaire, sorties à *La Stanza* et « vols » de matériel. Un merci particulier à Martin O'Brien pour sa précieuse amitié en dedans et en dehors du cadre de travail.

Je tiens à remercier mon père Philippe Bertomeu pour l'amour de la science que j'ai trouvé initialement chez lui et ma sœur Christine Bertomeu pour toutes les belles choses que nous avons vécues ensemble.

Finalement, un immense merci à mon épouse Marie-Claude Joly pour les encouragements et la patience d'avoir bien voulu attendre la fin de mes études.

Avant-propos

Au cours de mes études, l'organisme modèle sur lequel je travaillais, *Gonyaulax polyedra*, a changé de nom pour *Lingulodinium polyedrum*. Afin de respecter la nouvelle nomenclature, j'y référerai par son nouveau nom. Toutefois, les articles déjà soumis ou publiés sous l'ancienne nomenclature n'ont pas été modifiés et le lecteur de cette thèse doit voir les deux termes comme interchangeables, se référant à la même espèce. Les mêmes règles s'appliquent à leurs abréviations respectives (Gp et Lp).

1 Introduction

1.1 Les dinoflagellés

1.1.1 Biologie générale

Les dinoflagellés (division Pyrrophytes, classe Dinophyceae) sont des protistes regroupant près de 4000 espèces. Ils vivent en eau douce et dans les océans où ils composent une partie importante du phytoplancton et sont donc ainsi à la base de la chaîne alimentaire. Environ 50% des espèces sont phototrophes et nagent librement. Les autres espèces démontrent une grande diversité dans leur mode de vie et peuvent être hétérotrophes, mixotrophes (phototrophes et hétérotrophes), être en symbiose au sein d'autres protistes ou invertébrés ou en être les parasites. Parmi les exemples de symbiose, certains dinoflagellés se retrouvent au sein de coraux et pourraient leur procurer jusqu'à 50% de leur apport en carbone. La survie de certains dinoflagellés étant très sensible à des hausses de température, on assiste parfois à un phénomène de blanchiment des coraux (anglais : coral bleaching) qui perdent leur symbiote dinoflagellé s'il fait trop chaud. L'étude des dinoflagellés est donc à l'avant-plan des effets du réchauffement global de la planète qui pourrait justement compromettre l'apport de CO₂ fixé par les dinoflagellés.

Tous les dinoflagellés possèdent à un moment de leur cycle de vie un stade motile. Deux flagelles, un transversal et l'autre longitudinal, leur procurent le mouvement caractéristique des dinoflagellés (grec *dinos* : tourbillonnant). Tous contiennent aussi des sacs (alvéoles), en dessous de leur membrane plasmique. Certaines sont emplies de thèques de cellulose (ou autre) aux formes variées qui sont utilisées comme critère principal de classification taxonomique. Plusieurs

espèces marines sont bioluminescentes et il est proposé que ce phénomène leur soit bénéfique en réduisant leur prédation par les copépodes (Mesinger et Case 1992).

À diverses occasions de nature mal comprise, on assiste à l'apparition très rapide d'une forte concentration de dinoflagellés, surtout en période chaude et en eaux peu profondes. Les dinoflagellés étant généralement de couleur rouge-brunâtre, on parle alors de tels phénomènes en tant que « marées rouges » (voir Figure 1.1, p.3). Mais, il est plus exact de se référer à ce phénomène de surpopulation explosive d'algues nocives pour l'humain en tant que HABs (anglais : harmful algal blooms) car ce ne sont pas toutes les espèces qui produisent des toxines et plusieurs dinoflagellés ne sont pas colorés. Les intoxications humaines par des dinoflagellés arrivent la plupart du temps par l'ingestion d'organismes marins filtrants qui auront concentré leurs toxines. Les toxines de la famille des saxitoxines sont les plus répandues et causent une paralysie musculaire via une liaison très forte aux canaux sodiques. La biologie générale des dinoflagellés est substantiellement décrite par Hackett, Anderson, Erdner et Bhattacharya (Hackett, Anderson et al. 2004), Taylor et Pollingher (Taylor et Pollingher 1987) et Spector (Spector 1984).



Figure 1.1 Marée rouge

(photo : courtoisie de Peter Franks)

1.1.2 Matériel génétique et noyau

La phylogénie des dinoflagellés, selon l'analyse de leurs séquences d'ARNr (Cavalier-Smith 1993; Daugbjerg, Hansen et al. 2000), les place à côté des apicomplexans et des ciliés, solidement parmi les eucaryotes. Curieusement, leur organisation génétique diffère tellement des autres eucaryotes qu'il a déjà été proposé par le passé que les dinoflagellés soient classés dans un règne intermédiaire aux procaryotes et aux eucaryotes : les mésocaryotes (Dodge 1965). En effet, leurs chromosomes sont condensés en permanence (Dodge 1966) et sont donc visibles par microscopie à tout moment du cycle cellulaire, contrairement aux autres eucaryotes chez qui ils se condensent seulement au moment de la mitose (voir Figure 1.2, p.5). Pour des raisons inconnues, on retrouve un fort pourcentage de la prévalence des nucléotides G et C dans le génome (jusqu'à 65%). C'est assez particulier car la plupart des organismes sont plutôt A-T riches. En guise d'exemple, *Plasmodium falciparum* est seulement 20% G-C riche. De plus, il n'y a pas de nucléosome ni d'histone dans le noyau des dinoflagellés (Rizzo 1987; Rizzo 1991). Chez plusieurs espèces, leurs noyaux peuvent contenir une grande quantité d'ADN; *Lingulodinium polyedrum* contient 200 pg d'ADN par cellule (Sigeo 1983), ce qui représente 60 fois plus que le contenu d'une cellule haploïde humaine. Ainsi, on comprend facilement que la présence d'une si grande quantité d'ADN combinée à l'absence du système classique de compactage de l'ADN autour d'histones formant des nucléosomes nécessite un système tout à fait différent d'organisation de l'ADN. En effet, le ratio protéine:ADN à l'intérieur des cellules n'est que de 1:10, contrairement à 1:1 chez les autres eucaryotes; ce qui est logique étant donné avec la forte abondance d'ADN génomique et l'absence des histones devant le compacter.

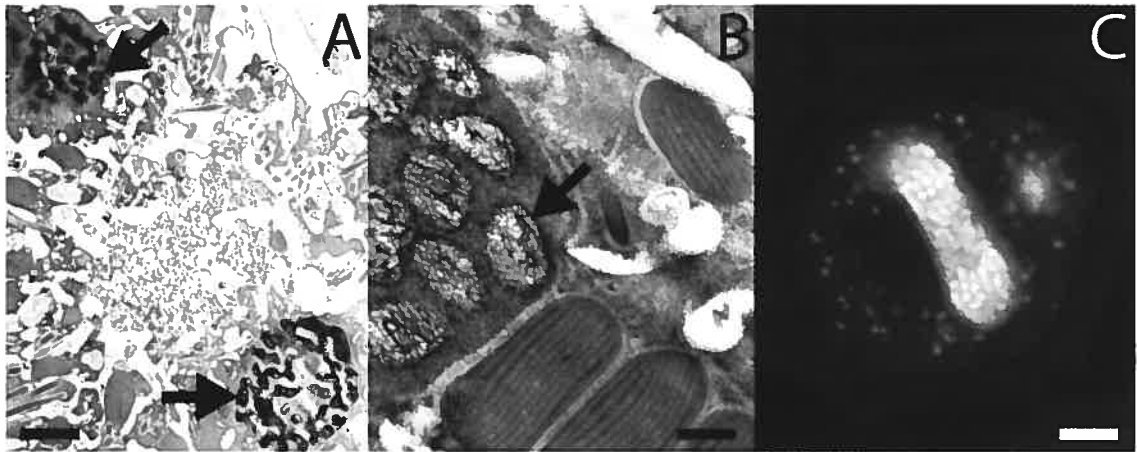


Figure 1.2 Les chromosomes des dinoflagellés sont condensés à l'interphase.

(A et B) Des cellules de *Lingulodinium polyedrum*, récoltées à l'interphase, fixées au glutaraldéhyde et colorées à l'acétate d'uranyle, sont photographiées au microscope électronique. Des flèches indiquent la présence de chromosomes condensés. **(A)** Ce qui peut sembler être deux noyaux à l'intérieur d'une seule cellule est en réalité le même noyau en forme de « C », coupé en deux par le microtome. **(B)** L'apparence des chromosomes individuels est plus évidente à plus fort grossissement. **(C)** *Lingulodinium* coloré au DAPI et visualisé au microscope confocal révèle un noyau en forme de fer à cheval avec son centre nous faisant face; près de 200 chromosomes individuels sont perceptibles. L'échelle représente respectivement 2 μm , 0.5 μm et 5 μm pour A, B et C (photos A et B : courtoisie de Nasha Nassoury, photo B : Thierry Bertomeu et David Morse).

Il a été démontré que la partie interne des chromosomes des dinoflagellés contenait de l'ADN sous la forme Z, enroulé sur la gauche (Soyer-Gobillard, Geraud et al. 1990). À l'inverse, de longues branches d'ADN sous la forme classique B, enroulé vers la droite, ont été vues au pourtour des chromosomes. La transcription de gènes semble improbable dans le centre ultra-condensé des chromosomes ayant de l'ADN sous forme de cristal liquide cholestérique (Costas et Goyanes 2005), une forme chirale de la matière. Il est alors tentant de penser que les branches décondensées des chromosomes sont garantes de la transcription de gènes à l'interphase malgré une condensation permanente des chromosomes.

De nombreuses hypothèses ont été avancées pour expliquer une condensation de l'ADN en absence d'histones. 12 à 68 % des nucléotides thymidines (selon les espèces de dinoflagellés) sont remplacés dans leur génome par le nucléotide analogue hydroxyméthyluracil (Colette 1984). Seuls les dinoflagellés ont ce nucléotide particulier et il se pourrait qu'il ait la propriété de favoriser la condensation des chromosomes. Un autre mécanisme de condensation pourrait aussi faire intervenir la grande quantité de cations divalents présents dans le noyau qui pourraient contribuer à neutraliser les charges négatives de l'ADN. Enfin, de nombreuses protéines aux propriétés basiques ainsi que d'autres protéines ressemblant à des histones eucaryotiques et à des protéines bactériennes liant l'ADN ont été isolées (Sala-Rovira, Geraud et al. 1991; Taroncher-Oldenburg et Anderson 2000; Wong, New et al. 2003). Mais, l'affinité testée de l'une d'entre elles est spécifique seulement à certaines séquences d'ADN (Chudnovsky, Li et al. 2002) et n'a donc pas la propriété de lier tout ADN qu'il soit tel que chez les histones classiques.

La mitose particulière des dinoflagellés est aussi un phénomène unique à cette classe, tellement que l'on parle d'elle en tant que dinomitose (Chatton 1920). En effet, le noyau des dinoflagellés, qui peut se retrouver sous plusieurs formes (sphérique chez *Cryptothecodinium cohnii*, pyramidale chez *Gymnodinium dodgei* et en forme de fer à cheval chez *Lingulodinium polyedrum*), ne se dissout pas au moment de la mitose (Rae 1970). Cette persistance de l'enveloppe nucléaire pendant la mitose a déjà été rapportée chez d'autres organismes (levures, diatomées et euglènes). Toutefois, dans leur cas, un fuseau mitotique intranucléaire sert à la ségrégation des chromosomes, tandis que chez les dinoflagellés, un fuseau mitotique s'établit à partir du cytoplasme et traverse le noyau par une ou plusieurs invaginations nucléaires ou canaux (Spector 1984). Les chromosomes sont attachés à la surface interne de la membrane nucléaire tandis que les microtubules s'y attachent du côté cytoplasmique, adjacents au point d'ancrage des chromosomes (Bhaud, Guillebault et al. 2000).

1.1.3 Biochimie particulière

L'étude des dinoflagellés continue de produire d'étonnantes découvertes concernant plusieurs aspects de leur biochimie qui leur est singulière et unique. En guise d'exemple, aucune séquence promotrice n'a encore été caractérisée chez un dinoflagellé. Cela est dû en partie à l'absence de techniques pouvant leur introduire un transgène. Toutefois, lorsque l'on examine les séquences d'ADN génomique en amont de différents gènes devant normalement contenir un promoteur, on ne retrouve pas de boîte TATA (Le, Markovic et al. 1997; Li et Hastings 1998). Chez les autres eucaryotes, le promoteur est lié par la protéine TBP (anglais : TATA-box binding protein) qui sert à l'initiation de la transcription. Une protéine analogue à TBP a été séquencée du dinoflagellé *Cryptothecodinium*

cohnii (Guillebault, Sasorith et al. 2002) et il a été montré que celle-ci a plus d'affinité envers une séquence TTTT que TATA. Également, dans les séquences 3' UTR des ARNm, on ne retrouve aucune séquence ressemblant de près ou de loin au signal de polyadénylation (AAUAAA) fréquemment retrouvé 30 nucléotides en amont du début de la queue de poly A. Cette séquence chez les autres eucaryotes permet le positionnement de la coupure du transcrit suivie de l'ajout d'une queue de poly A. Les mécanismes de base de la transcription et de la traduction chez les dinoflagellés sont donc différents de ceux classiquement connus chez les eucaryotes supérieurs. Finalement, une séquence de 22 nucléotides de long, appelée SL (anglais : spliced leader), vient tout juste d'être rapportée à l'extrémité 5' de tous les transcrits nucléaires des dinoflagellés (Zhang, Hou et al. 2007). La séquence SL s'agit d'un ajout post-transcriptionnel que l'on retrouve chez plusieurs autres classes d'organismes tels les nématodes, planaires, trypanosomes et euglènes.

En plus du noyau, les chloroplastes des dinoflagellés démontrent aussi des caractéristiques peu communes. Parmi ces caractères, on retrouve la présence de trois membranes autour des chloroplastes qui nécessitent un mécanisme spécial pour le ciblage des protéines (Nassoury, Cappadocia et al. 2003; Patron, Waller et al. 2005). Il y a aussi la présence de la protéine soluble de l'antenne, PCP (anglais : peridinin-chlorophyll *a*-protein), qui a une structure unique (Hofmann, Wrench et al. 1996) et qui ne se retrouve dans aucun autre organisme. Il y a également l'utilisation d'une RuBisCO de forme II pour fixer le carbone (Morse, Salois et al. 1995; Whitney, Shaw et al. 1995). Les dinoflagellés sont ainsi les seuls eucaryotes ayant cette forme inusitée de cette enzyme auparavant retrouvée seulement chez des espèces procaryotiques anaérobiques. Quant aux gènes chloroplastiques, plusieurs gènes typiquement transcrits dans les chloroplastes ont

été transférés au noyau des dinoflagellés (Zhang, Green et al. 1999). Aussi, le peu de gènes encore présents dans les chloroplastes des dinoflagellés sont portés sur des structures appelées « minicercles ». Finalement, une queue de poly U a été trouvée à l'extrémité 3' des transcrits des gènes chloroplastiques (Wang et Morse 2006), en place de la queue de poly A plus classique. La fonction d'une telle modification demeure inconnue, mais reste définitivement un mécanisme hors du commun lors de l'expression génique des organites.

1.1.4 *Lingulodinium polyedrum* et rythmes biologiques

Lingulodinium polyedrum est une espèce phototrophe d'un diamètre d'environ 40 μm qui nage librement en milieu salin. Elle est le sujet de très nombreuses études chronobiologiques depuis plus de 50 ans (Hastings 2001) car elle possède toute une panoplie de rythmes circadiens.

Les rythmes circadiens peuvent être définis comme étant des propriétés physiologiques se reproduisant une fois par jour en avec une rythmicité proche de 24 heures. Ils sont entraînés par des signaux journaliers, tels que des changements lumineux ou de température, qui amènent leur rythmicité à exactement 24 heures. En condition constante, leur rythmicité persiste et il doit aussi exister un mécanisme de compensation envers la température qui empêche la période du rythme de changer en fonction des changements de température. Enfin, les rythmes circadiens sont engendrés par un contrôle à partir d'horloges moléculaires, mais ne sont pas en soi des horloges.

Or, *Lingulodinium* possède plusieurs rythmes circadiens classiques bien étudiés : bioluminescence, photosynthèse (comprenant l'évolution d' O_2 et la fixation du CO_2), migration verticale et division cellulaire (Figure 1.3, p.11). Ainsi, ce dinoflagellé produit une lumière bleutée seulement en phase de nuit, est

capable de photosynthèse surtout en phase de jour, migre vers la surface de l'océan le jour et descend à une profondeur de -10 m la nuit et ne se divise qu'une heure après le lever du soleil (McMurry et Hastings 1972).

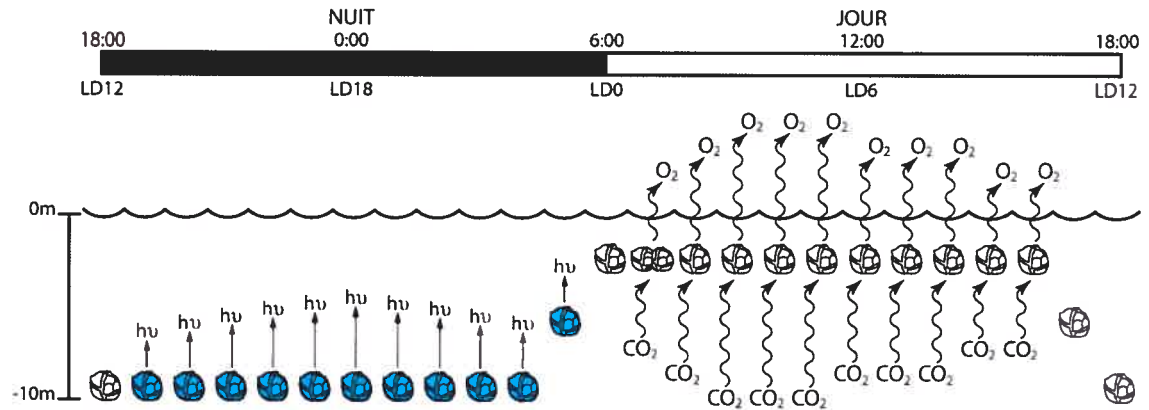


Figure 1.3 Temps d'occurrence de 4 rythmes circadiens de *Lingulodinium polyedrum* (bioluminescence, photosynthèse, migration et division cellulaire).

Les moments d'occurrence de 4 rythmes circadiens classiques de *Lingulodinium* sont présentés sur une période de 24 heures avec 12 heures d'obscurité et 12 heures de lumière (LD12 :12). La concordance des temps chronobiologiques (LD, de l'anglais Light-Dark) et journaliers est montrée; LD0 représente le moment où le soleil se lève. La bioluminescence, illustrée par des cellules bleues émettant de la lumière ($h\nu$), a lieu la nuit. La photosynthèse, où il y a simultanément émission d' O_2 et absorption de CO_2 , a lieu le jour. *Lingulodinium*, un peu avant la tombée de la nuit, migre pour atteindre une profondeur de -10 m et, peu avant le lever du jour, remonte vers la surface. La division cellulaire n'a lieu qu'une heure après l'aube (Image : Thierry Bertomeu).

Puisque les dinoflagellés sont unicellulaires, il faut donc que la nature même de ces rythmes soit biochimique. Or, dans une chaîne classique de réactions enzymatiques, il est souvent possible de moduler toute la cascade en modulant l'enzyme présente en quantité limitante. On parle alors de l'étape à vitesse limitante (anglais : rate-limiting step). Il est donc possible et même probable que le contrôle circadien des rythmes de bioluminescence, de fixation du carbone et de division cellulaire se fasse sur la protéine limitante de ces réactions.

Les protéines responsables de la bioluminescence chez *Lingulodinium* ont déjà été caractérisées. La luciférase (nom générique donné aux enzymes variées d'organismes différents catalysant la bioluminescence) de *Lingulodinium* est l'enzyme qui oxyde le substrat luciférine (Bae et Hastings 1994) et LBP (anglais : luciferin-binding protein) (Lee, Mittag et al. 1993) est la protéine qui séquestre ce substrat et le relâche à la luciférine au bon moment. Il a déjà été montré qu'il y a un rythme journalier d'abondance de ces deux protéines avec un maximum atteint la nuit, coïncidant avec le rythme circadien de la bioluminescence (Johnson, Roeber et al. 1984; Morse, Milos et al. 1989). Un contrôle circadien de la synthèse ou de la dégradation de ces protéines peut par conséquent parfaitement expliquer le mécanisme de contrôle du rythme circadien de la bioluminescence.

Des mesures du flux d'électrons à travers le photosystème II faites *in vitro* montrent une plus grande activité le jour que la nuit et il a été proposé qu'une modulation de ce flux puisse expliquer le rythme circadien d'évolution d'oxygène (Samuelsson, Sweeney et al. 1983). La RuBisCO de forme II est la seule enzyme chez *Lingulodinium* qui fixe le CO₂ (Morse, Salois et al. 1995) et est considérée comme l'étape limitante du cycle de Calvin. Il a été montré que l'abondance de cette enzyme est constante dans le temps mais que sa distribution dans le

chloroplaste de *Lingulodinium* change avec une localisation dans les pyrénoides (la partie évasée dirigée vers l'intérieur des chloroplastes auréolés) correspondant avec le maximum d'activité de fixation du carbone (Nassoury, Fritz et al. 2001). Ainsi, un contrôle de localisation protéique à l'intérieur des plastides eux-mêmes pourrait expliquer le rythme circadien de fixation du carbone chez les dinoflagellés.

La mitose de *Lingulodinium* ne se passe qu'à une heure précise du jour et est donc sous contrôle circadien. Toutefois, puisque le temps de génération d'une cellule est typiquement plus long qu'une journée, ce contrôle circadien est plutôt perçu comme donnant une opportunité au cycle cellulaire de se poursuivre seulement à certains moments du jour. C'est cette hypothèse de fenêtres d'opportunités (anglais : gating) momentanées, données au cycle cellulaire par le cycle circadien, que nous proposons afin de concilier la concordance des cycles circadiens et cellulaires sur le moment d'entrée en mitose. Le mécanisme de contrôle du rythme circadien de la division cellulaire n'est pas encore connu. Toutefois, par analogie avec les rythmes de bioluminescence et de photosynthèse, on peut penser qu'une caractérisation biochimique des protéines responsables de l'entrée en phase M de *Lingulodinium* pourrait nous indiquer quel mécanisme de contrôle l'horloge circadienne utilise pour moduler le rythme circadien de la division cellulaire. Ainsi, un autre mécanisme de contrôle d'un rythme circadien chez *L. polyedrum* pourrait être mis à jour, au côté de ceux déjà connus pour les rythmes circadiens de la bioluminescence et de la photosynthèse.

En relation avec les singularités de la dinomitose et l'organisation de l'ADN des dinoflagellés, le fonctionnement et la régulation des composantes du contrôle du cycle cellulaire pourraient exposer un fonctionnement biochimique nouveau, exclusif aux dinoflagellés vis-à-vis leur cycle cellulaire. C'est pour cette raison, tout en gardant l'objectif à long terme d'une découverte du mécanisme de contrôle du

rythme circadien de la division cellulaire, que le sujet de mon doctorat consiste en la recherche de composantes de contrôle du cycle cellulaire du dinoflagellé *Lingulodinium polyedrum*.

1.2 Contrôle du cycle cellulaire

1.2.1 Cycle cellulaire : principes de base

Le cycle cellulaire, ou cycle de division cellulaire (cdc), peut être défini comme la série d'étapes ordonnées entre deux mitoses d'une cellule, amenant le dédoublement fidèle du matériel génétique et sa ségrégation précise entre les deux nouvelles cellules filles. C'est depuis Howard & Pelc en 1951 (Howard et Pelc 1951) que l'on sait que la duplication de l'ADN génomique des eucaryotes n'arrive qu'à un moment précis et pas tout au long du cycle cellulaire. On appelle ainsi phase S, le moment de la synthèse d'ADN et phase M, le moment de la mitose. Les temps intermédiaires à ces deux phases sont G1 et G2 (anglais : Gap), de sorte qu'un cycle complet est composé des phases : G1, S, G2 et M. L'ensemble des phases G1, S et G2 est appelé interphase et c'est surtout durant cette période que la cellule croît, de manière à fournir le gain de volume et de matériel nécessaire à la future division mitotique.

La transition entre ces quatre étapes n'est pas simplement liée au passage du temps. Elle est plutôt liée à la satisfaction de « points de contrôle » (anglais : checkpoints), disposés à des moments critiques du cdc, où n'est autorisée une progression du cycle que lorsque certaines conditions sont atteintes (Nurse 1994). Ce concept (Hartwell et Weinert 1989) vient du fait que certaines cellules arrêtent la progression de leur cycle cellulaire à des moments précis du cycle suivant des stimuli particuliers et que cet arrêt peut souvent être brisé par la mutation d'un seul gène. Le point de contrôle le plus connu est celui appelé « START » chez les

levures ou point de restriction chez les mammifères. Il s'agit d'un moment en G1 d'engagement à procéder plus tard à la phase S en réaction à un milieu favorable (Cross 1995). Parmi les autres points de contrôle, on retrouve entre autres celui d'arrêt du cycle cellulaire en tout temps suivant une coupure d'ADN double-brin, un contrôle en G2 s'assurant que tout l'ADN est répliqué avant l'entrée en phase M et un contrôle en phase M s'assurant que tous les chromosomes sont attachés aux microtubules avant leur ségrégation (Stein, Baserga et al. 1998).

Les premières propriétés de base du contrôle du cdc furent élucidées par la fusion de cellules (hétérocaryons) à différentes phases et de l'observation des changements associés à leurs noyaux (Johnson et Rao 1970). Une cellule en G1 fusionnée à une cellule en phase S entre en phase S. En parallèle, une cellule en G2 fusionnée à une cellule en phase M entre en phase M. Il devait donc exister des facteurs initiant l'entrée en phase S et d'autres facteurs initiant l'entrée en phase M. Toutefois, il a été trouvé que ces facteurs agissaient de manière passagère puisque qu'une cellule en G2 ne fait pas entrer une cellule en G1, en phase S et vice-versa pour une cellule en G1 qui ne fait pas entrer une cellule en G2, en phase M. Finalement, une cellule en G2, fusionnée à une cellule en phase S, n'entreprend pas un deuxième cycle de duplication de son ADN, ce qui montre qu'il doit y avoir des mécanismes inhibiteurs de retour à une phase précédente si elle vient de se terminer.

1.2.2 Cycle cellulaire : régulation

1.2.2.1 Isolement biochimique de MPF : une kinase et une cycline

Notre compréhension actuelle du cycle cellulaire combine des approches expérimentales variées sur des organismes très différents. L'expérience historique qui a le plus réussi à unifier les efforts de plusieurs approches fut probablement la

purification du facteur entraînant l'entrée en mitose. La stimulation d'oocytes de grenouilles arrêtés en G2 par des hormones provoque leur maturation en les faisant entrer en méiose I. L'injection d'un peu de cytoplasme provenant d'un œuf mature dans le cytoplasme d'un œuf immature, même avec l'utilisation d'inhibiteurs de synthèse protéique, est suffisante pour les faire entamer la maturation (Masui et Markert 1971). Cette expérience offrait donc un système de détection du facteur initiant la maturation. La purification biochimique de MPF (anglais : maturation-promoting factor) par une série de fractionnements chromatographiques (Lohka, Hayes et al. 1988) révéla deux composantes majeures : une kinase (Gautier, Norbury et al. 1988) et une cycline (Gautier, Minshull et al. 1990). MPF se révéla capable d'induire la mitose, composée d'une série d'évènements similaires à la méiose si ce n'est l'alignement des chromosomes, chez des organismes hétérologues (Tachibana, Yanagishima et al. 1987). Des cyclines et des kinases similaires sont maintenant reconnues comme des protéines universelles aux eucaryotes. On se réfère désormais à MPF en tant que facteur initiant la mitose plutôt que la maturation.

1.2.2.2 Les mutants cdc : rôle central de Cdc2

La kinase de MPF se révéla être l'homologue de la kinase Cdc2 (Gautier, Norbury et al. 1988) auparavant isolée d'un mutant thermoconditionnel léthal de *Schizosaccharomyces pombe*. La génétique des levures *S. pombe* et *S. cerevisiae*, comme système d'isolement de gènes responsables du contrôle du cycle cellulaire, s'est montrée avec le temps très efficace (Lee et Nurse 1988). En effet, ce sont des eucaryotes qui peuvent être maintenus à l'état haploïde, ce qui facilite les études génétiques. Aussi, ces deux levures possèdent des caractères morphologiques servant à diagnostiquer à quelle étape du cdc elles sont rendues. *S. pombe*, aussi connue sous le nom de levure fissipare, s'allonge tout au long du

cycle cellulaire et une cellule ne se divisant plus devient anormalement grosse. *S. cerevisiae*, aussi connue sous le nom de levure bourgeonnante, produit un bourgeon à partir de la transition G1/S qui grossit à mesure que la cellule approche de la phase M. Ainsi, une mutation dans un gène initiant l'entrée en phase S chez *S. cerevisiae* produira des levures ayant toutes un très petit bourgeon, arrêtées à ce point de contrôle. La génération de collections de mutants et leur complémentation génétique pour rétablir leur phénotype est un outil fort puissant chez les levures pour déterminer les gènes responsables d'une fonction particulière. Puisque des gènes contrôlant le cycle cellulaire doivent justement empêcher la progression du cycle cellulaire s'ils sont mutés, des levures thermoconditionnelles létales furent sélectionnées avec une température permissive de 25 °C et une température conditionnelle de 36 °C. Des collections de mutants du cdc chez *S. cerevisiae* et *S. pombe* (nommés *cdc1*, *cdc2*...) furent établies par les chercheurs Leland Hartwell et Paul Nurse respectivement. Toutes les cellules d'un mutant particulier mis en condition restrictive présentent les mêmes caractères morphologiques et donc un arrêt au même stade du cdc. Pour diverses raisons, les mécanismes de contrôle d'entrée en phase S sont plus connus chez *S. cerevisiae*, tandis que pour *S. pombe*, ce sont ceux d'entrée en mitose.

Or, il a été montré que Cdc2 de *S. pombe* (Lee et Nurse 1988) est une kinase dont l'activité est maximale à la transition G2/M et qui, lorsque inactivée par la chaleur, arrête la levure à la transition G2/M. De plus, avec d'autres mutants de *S. pombe* arrêtant aussi le cdc à la transition G2/M, il a été montré génétiquement que l'action de plusieurs gènes intervenait via *CDC2*, ce qui démontre que ce gène est un acteur clé de l'entrée en phase M. Parmi ces mutants, Cdc25 est une protéine tyrosine phosphatase qui déphosphoryle et active Cdc2 (Millar, McGowan et al. 1991). D'ailleurs, le phénotype de *cdc25* en condition restrictive est une

cellule très allongée qui tarde à entreprendre une mitose. À l'inverse, la protéine Wee1 (anglais : petit) procure à la levure mutée pour ce gène une morphologie petite. Il s'agit d'une tyrosine et sérine/thréonine kinase qui phosphoryle Cdc2 et l'inactive (Parker, Atherton-Fessler et al. 1992). La morphologie petite s'explique alors parfaitement par une entrée précoce en phase M par Cdc2 activée trop tôt. Finalement, la protéine Cdc13 est requise à l'activation de Cdc2 (Moreno, Hayles et al. 1989). Cdc13 est une cycline et se retrouve associée à Cdc2 à la mitose. Cette convergence de mécanismes d'action de contrôle d'entrée en mitose via Cdc2 plaçait donc cette kinase à l'avant-plan du contrôle de l'entrée en mitose. Aussi, les intervenants génétiques kinase *cdc2* et cycline *cdc13* chez *S. pombe* ayant été trouvés et l'isolement biochimique faisant entrer les œufs de grenouilles en phase M d'un facteur composé d'une kinase homologue à Cdc2 et d'une cycline démontrait l'existence universelle d'un contrôle d'entrée en mitose chez différentes espèces (Nurse 1990).

1.2.2.3 Cyclines et kinases cyclines-dépendantes (anglais : CDKs)

Des homologues de Cdc2 ont été trouvés chez tous les eucaryotes séquencés. Aujourd'hui on se réfère à ces kinases en tant que CDKs car elles nécessitent une liaison avec une cycline pour être actives (Pines 1995). Ce sont des sérine/thréonine kinases qui possèdent la plupart des autres domaines conservés retrouvés chez les autres kinases, en plus d'avoir dans leur domaine III une séquence identique ou similaire à la séquence PSTAIRE retrouvée chez Cdc2. Les CDKs possèdent surtout deux sites de phosphorylation. Le premier, sur la tyrosine 15 de Cdc2, se trouve dans la boucle-P (anglais : P-loop) en N-terminal qui est un site où une phosphorylation limite l'accès à l'ATP et est donc inhibitrice pour Cdc2 (Smits et Medema 2001). Le deuxième site, sur la thréonine 161 de

Cdc2, est un site activateur qui réoriente la boucle-T (anglais : T-loop), change la conformation de la CDK et la rend active (Smits et Medema 2001). C'est la kinase Wee1 qui est responsable de la phosphorylation inactivatrice, la phosphatase Cdc25 qui enlève ce phosphate inhibiteur et la CAK (anglais : CDK-activating kinase) qui est responsable de la phosphorylation activatrice.

Chez l'humain, on retrouve plus de 10 CDKs avec la CDK1 comme homologue de la kinase Cdc2 de levure (Stein, Baserga et al. 1998). La structure cristallographique de la CDK2 humaine en association avec la cycline A humaine révèle que le domaine III contenant la séquence PSTAIRE et la boucle-T contenant le site de phosphorylation activatrice de la CDK sont en étroite association avec la cycline (Jeffrey, Ruso et al. 1995). Cette association change la conformation de la CDK qui voit son site catalytique s'ouvrir et devient alors potentiellement active.

Les cyclines ont originellement été découvertes comme des protéines cycliquement détruites après chaque division dans des œufs d'oursins de mer en mitoses répétées (Evans, Rosenthal et al. 1983). Toutefois, la définition d'une cycline a changé pour maintenant être attribuée aux protéines ayant la séquence consensus « repliement-cycline » (anglais : cyclin-fold), contenant deux domaines boîte-cycline (anglais : cyclin-box) d'environ 150 acides aminés chacun, et étant capable de lier et d'activer une CDK (Kobayashi, Stewart et al. 1992). Chez l'humain, près de 25 cyclines différentes ont été rapportées dont seulement la moitié ont un rôle à jouer dans le cycle cellulaire (Stein, Baserga et al. 1998). Toutes les cyclines sont classées en famille chez les organismes selon leur similarité de séquence mais aussi selon leur patron d'expression et leur similarité structurale. En effet, contrairement aux CDKs dont l'expression est généralement constante, les cyclines aux fonctions liées au cycle cellulaire ont des pics d'expression associés au moment du cycle cellulaire où leur activité est nécessaire

à la progression du cdc (Murray 2004). Chez les mammifères, ce sont surtout les cyclines des familles A, B, D et E qui sont impliquées dans le cycle cellulaire (Stein, Baserga et al. 1998). L'hypothèse selon laquelle les cyclines, en plus d'activer leurs partenaires CDKs, déterminent la spécificité du substrat de leurs kinases, est assez répandue (Loog et Morgan 2005).

MPF phosphoryle les substrats aux sites consensus S/T*-P-X-K/R (Lewin 2004) où X représente n'importe quel acide aminé. Chez *S. pombe*, on retrouve plus de 200 substrats de MPF (Ubersax, Woodbury et al. 2003) dont des histones, des condensines et des protéines associées aux microtubules (MAPs, anglais : microtubule-associated proteins). Il est proposé que la phosphorylation d'histones pourrait favoriser la condensation de l'ADN mais cette relation n'est pas encore prouvée. Les condensines phosphorylées s'associent en complexes qui lient l'ADN et participent à sa condensation (Belmont 2006). Les multiples phosphorylations de protéines associées aux microtubules (Wittmann, Hyman et al. 2001) participent à l'élaboration du fuseau mitotique qui s'associe aux chromosomes. Aussi, chez les organismes supérieurs ayant un noyau qui se désassemble à la mitose contrairement aux levures, la phosphorylation des lamines nucléaires, les protéines formant un réseau soutenant la structure du noyau à sa surface interne, provoque leur dépolymérisation (Pines 1995). Le rôle physiologique de la phosphorylation de la grande majorité des substrats de MPF demeure encore inconnu (Ubersax, Woodbury et al. 2003).

Puisque les CDKs ont absolument besoin de se lier à une cycline pour être actives, la destruction des cyclines est donc un mécanisme efficace d'inactivation de leur activité kinase. D'ailleurs, il existe deux mécanismes de protéolyse de cyclines bien documentés. Le premier fait intervenir des séquences PEST dans les cyclines impliquées à la transition G1/S. Il s'agit de régions riches en acides

aminés proline, acide glutamique, sérine et thréonine qui rendent instables les protéines avec de tels motifs qui seront alors dégradées par le protéasome suite à une poly-ubiquitination (Alberts, Johnson et al. 2002). Le second fait intervenir une séquence appelée « boîte de destruction » (anglais : destruction-box) présente en N-terminal chez toutes les cyclines impliquées à la transition G2/M (Pines 1995). On se réfère souvent à ce deuxième type de cycline en tant que cyclines de type A ou B, en se basant sur la classification des cyclines de mammifères. La séquence consensus des boîtes de destruction est R-X-X-L-X-X-(L/I)-X-N, où X représente n'importe quel acide aminé, et la dégradation des cyclines mitotiques via leur boîte de destruction se fait aussi via l'ubiquitination (Glotzer, Murray et al. 1991).

1.2.3 Regard sur *S. cerevisiae*

Pour donner un aperçu de l'implication moléculaire des CDKs et cyclines à tous les stades du cycle cellulaire, de leur contrôle et de leur effet, une partie de ce qui est connu du contrôle du cdc chez *S. cerevisiae* est présenté plus en détail. Ainsi, même si les autres organismes possèdent des intervenants différents, certains principes généraux sont appliqués à tous les eucaryotes. Le lecteur de cette thèse pourra se référer à la Figure 1.4 (p.22) pour mieux visualiser les intervenants du cycle cellulaire qui seront décrits.

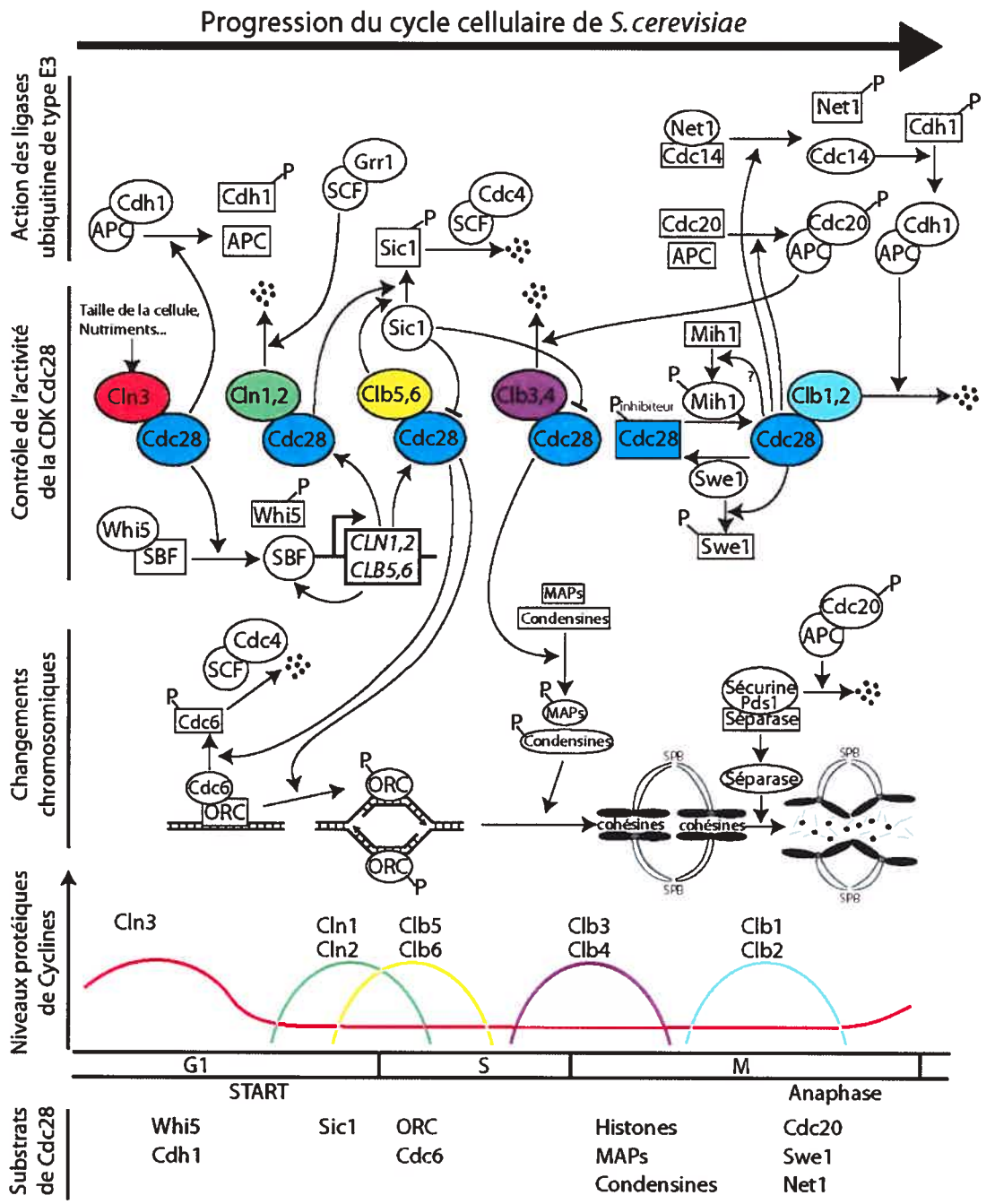


Figure 1.4 Sommaire des intervenants moléculaires principaux du cycle cellulaire de *S. cerevisiae* (voir le texte pour plus de détails) (Image : Thierry Bertomeu).

La levure bourgeonnante possède 5 CDKs dont seulement Cdc28, l'homologue de Cdc2 de *S. pombe*, est impliquée dans le cdc et ce à toutes les étapes (Mendenhall et Hodge 1998). *S. cerevisiae* possède aussi 22 cyclines dont seulement 9 s'associent à Cdc28 et donc servent au contrôle du cdc (Measday et Andrews 1998). Cln1, Cln2 et Cln3 sont les cyclines de type G1 tandis que les cyclines Clb1, Clb2, Clb3, Clb4, Clb5 et Clb6 sont de type mitotique.

Cln3 est présente à travers tout le cycle cellulaire avec une transcription un peu plus élevée en début G1. Elle agit en amont des cyclines Cln1 et Cln2 et influence directement le passage du point de contrôle START (Tyers, Tokiwa et al. 1993) en étant un des senseurs de la taille de *S. cerevisiae* (Cross 1995). Un des substrats de Cln3/Cdc28 est la protéine Whi5 qui, à l'image de la protéine analogue Rb (Rétinoblastôme) des mammifères (Kaelin 1999), agit comme inhibiteur du point de contrôle START. Whi5 lie et inhibe le facteur de transcription SBF (anglais : Swi4/6 Cell Cycle Box (SCB) Binding Factor) et sa phosphorylation par Cln3/Cdc28 enlève cette inhibition (Costanzo, Nishikawa et al. 2004; de Bruin, McDonald et al. 2004). SBF, qui est capable d'induire la transcription de près de 200 gènes (Iyer, Horak et al. 2001), va alors induire la transcription de *CLN1* (Partridge, Mikesell et al. 1997), *CLN2* (Iyer, Horak et al. 2001), *CLB5* (Bean, Siggia et al. 2005) et *CLB6* (Iyer, Horak et al. 2001).

Il existe des protéines capables de lier des CDKs, en association ou non avec une cycline, et qui inhibent leur activité. On appelle CKI (anglais : CDK inhibitors) de telles protéines et la protéine Sic1 de levure est justement une CKI capable d'inhiber Cdc28 en complexe avec une cycline de type mitotique, Clb/Cdc28 (Schwob, Bohm et al. 1994). Cette inhibition est enlevée par la phosphorylation de Sic1 par Cdc28 en association avec Cln1 ou Cln2 (Verma, Annan et al. 1997). La forme phosphorylée de Sic1 est reconnue par la protéine

Cdc4. Cdc4, en association avec le complexe SCF (anglais : Skp1/Cullin/F-box protein), est une ligase ubiquitine de type E3 (Nash, Tang et al. 2001) qui engendre donc la dégradation de Sic1 phosphorylée. Ce mécanisme d'inhibition par la CKI et sa dégradation après l'activation de Cln1/Cdc28 et Cln2/Cdc28 s'assure donc que le peu de Cdc28/Clb présent en G1 ne puisse initier START. D'ailleurs, une mutation dans le gène *SIC1* rend viable le phénotype auparavant non-viable d'une levure ayant ses trois 3 cyclines G1/S mutées (cln1, cln2 et cln3) (Tyers 1996).

Les mécanismes par lesquels l'activité kinase des CDKs arrive à induire l'initiation de la réplication ne sont pas encore très bien compris. On sait toutefois que la phosphorylation par des CDKs des protéines Sld2/Drc1 nécessaires à la réplication est essentielle à l'initiation de cette réplication (Masumoto, Muramatsu et al. 2002). Les protéines de l'ORC (anglais : origin recognition complex) forment un complexe autour des sites ARS (anglais : autonomous replication sequence), sites d'origine de la réplication chez la levure. Les complexes Clb5/Cdc28 et Clb6/Cdc28 phosphorylent les protéines de l'ORC (Weinreich, Liang et al. 2001) ainsi que la protéine Cdc6. Cdc6 lie l'ORC et engendre le recrutement de protéines nécessaires à la formation du complexe de préinitiation. Sa phosphorylation par Clb/Cdc28 la fait relâcher l'ORC, ce qui initie la réplication. Cdc6 phosphorylée est ensuite dégradée et la persistance de l'activité Clb/Cdc28 en G2 empêche ainsi la formation de nouveaux complexes de préinitiation en maintenant les niveaux de Cdc6 bas (Donaldson et Blow 1999). Les cyclines Cln1, Cln2 et Clb6 sont ciblées à la dégradation proche de la transition G1/S par l'ubiquitine ligase SCF couplée à la protéine Grr1 activée (Bloom et Cross 2007).

Les cyclines mitotiques sont exprimées par paires : Clb5 et Clb6 exprimées à la transition G1/S, Clb3 et Clb4 à la fin de la phase S et Clb1 et Clb2 10 minutes

avant l'anaphase (Epstein et Cross 1992). Clb3/Cdc28 et Clb4/Cdc28 ont pour effet d'initier la formation du fuseau mitotique (Richardson, Lew et al. 1992) alors que Clb1/Cdc28 et Clb2/Cdc28 initient la mitose (Surana, Robitsch et al. 1991). La kinase Swe1, un homologue de la protéine Wee1 de *S. pombe*, ajoute un phosphate inhibiteur à la CDK Cdc28 couplée aux cyclines mitotiques (Booher, Deshaies et al. 1993). La phosphatase Mih1, un homologue de la protéine Cdc25 de *S. pombe*, enlève ce même phosphate inhibiteur de Cdc28 (Mendenhall et Hodge 1998). Or, la protéine Swe1 est justement un substrat de Clb1/Cdc28 et Clb2/Cdc28, ce qui favorise sa dégradation via le complexe ubiquitine ligase APC (anglais : Anaphase-promoting complex) (Asano, Park et al. 2005). Chez *S. pombe*, la phosphorylation de Cdc25 par Cdc2/Cdc13 rend celle-ci plus active, ce qui active davantage le complexe CDK/cycline (Smits et Medema 2001). Si l'on admettait que ce même mécanisme de rétroaction positive sur Cdc25 fonctionne de la même manière chez *S. cerevisiae*, on aurait ainsi deux systèmes de rétroaction amenant une activation explosive des complexes Clb1/Cdc28 et Clb2/Cdc28 via la dégradation de l'inhibiteur Swe1 et l'activation de l'activateur Mih1. C'est cette réaction en chaîne, élucidée chez *S. pombe*, qui empêche un retour en arrière une fois la phase M commencée.

L'établissement du fuseau mitotique composé de microtubules nécessaires à la future division mitotique se fait à la phase M. Chez les mammifères, deux centrosomes cytoplasmiques se forment d'où partent des filaments de microtubules terminés à chacune des extrémités par des complexes protéiques appelés centres organisateurs des microtubules. Le noyau de la levure demeurant intact, le réseau de microtubules s'installe alors à l'intérieur du noyau à partir d'homologues de centrosomes, des SPBs (anglais : spindle pole body) périnucléaires.

La dégradation des cyclines mitotiques à la fin de la mitose est capitale car la surexpression de celles-ci, ou l'utilisation de formes non-dégradables, bloque les cellules en métaphase (Murray 2004). L'APC est un complexe ubiquitine ligase de type E3 qui induit l'anaphase suite, entre autres, à la dégradation de cyclines. Chez *S. cerevisiae*, l'APC peut être associé aux protéines Cdc20 ou Cdh1 et celles-ci spécifient au complexe quelles protéines seront ubiquitinées (Peters 1999). La phosphorylation de Cdc20 par Clb1,2/Cdc28 permet l'association et l'activation du complexe APC^{Cdc20} (Pines 2006). APC^{Cdc20} est responsable de la dégradation de Pds1, une sécurine, et de cyclines mitotiques. La sécurine est une protéine qui lie et maintient inactif une séparase, une protéase capable de couper les protéines cohésines qui lient et retiennent ensemble les chromatides sœurs. La dégradation des cohésines initie donc l'anaphase et la séparation des chromosomes tirés par l'instabilité dynamique des microtubules. Il existe un point de contrôle s'assurant que l'APC^{Cdc20} ne soit actif que lorsque tous les kinétochores des chromosomes sont attachés au fuseau mitotique pour ne pas provoquer d'accidents mitotiques mais l'identité de ce mécanisme n'est pas connu. Vers la fin de la mitose, la phosphorylation de la protéine du nucléole Net1 par Clb1,2/Cdc28 libère la phosphatase Cdc14. Elle déphosphoryle les substrats de Clb/Cdc28, enlève le phosphate inhibiteur de la CKI Sic1 et déphosphoryle Cdh1 (Bloom et Cross 2007). Cdh1 déphosphorylée forme APC^{Cdh1} actif qui participe aussi à la dégradation de cyclines mitotiques (Bloom et Cross 2007). La cytokynèse suit par la fermeture d'un cercle contractile d'actine associée à la membrane de la cellule et coupant aussi le noyau et la mitose est alors terminée. Le complexe APC^{Cdh1} est de nouveau inactivé par la phosphorylation de Cdh1 par Cln3/Cdc28. Les deux cellules filles sont de nouveau en G1.

1.3 Études du cycle cellulaire chez les dinoflagellés

Aucun des génomes de dinoflagellés n'a encore été séquencé et le fait qu'ils soient si gros y est probablement pour quelque chose. Aussi, jusqu'en 2002, aucune collection d'ESTs dépassant 1000 séquences provenant d'un dinoflagellé n'avait encore été réalisée. Il était alors peu étonnant que l'on ne retrouve encore aucun régulateur du cycle cellulaire parmi le peu de séquences publiées. Malheureusement, seulement deux publications rapportent des tentatives d'isolement de régulateurs du cycle cellulaire chez un dinoflagellé (Salois et Morse 1996; Salois et Morse 1997). L'approche PCR et le criblage de banques d'ADNc avec un anticorps dirigé contre l'homologue de Cdc2 ont ainsi toutes deux été infructueuses. Dans ces conditions, l'étude du fonctionnement du cycle cellulaire des dinoflagellés s'est limitée qu'à certains types d'expérience. La cytométrie en flux permet un diagnostic fiable de l'état (G0/G1, S et G2/M) du cycle cellulaire où se trouve une cellule. Les études microscopiques permettent d'observer les changements d'ordre morphologique à l'intérieur de la cellule en rapport avec le cycle cellulaire. L'utilisation d'anticorps contre des protéines régulatrices du cycle cellulaire établies chez d'autres organismes peut nous indiquer le comportement de protéines chez les dinoflagellés. La purification par affinité envers la protéine p13^{suc1} de levure fissipare est une technique qui fonctionne chez plusieurs organismes hétérologues et permet l'enrichissement du complexe protéique MPF. Les tests d'activités kinase avec de l'ATP marqué radioactivement sur le substrat histone H1 peut nous indiquer le niveau d'activité des CDKs mais il faut se rappeler que presque toutes les kinases ont cette activité *in vitro*. Il faut donc ainsi s'assurer que les protéines responsables des activités mesurées sont bel et bien des CDKs. Finalement, des drogues arrêtant le cycle cellulaire à des points de contrôle précis

peuvent être utilisées et, si elles ont le même effet chez les dinoflagellés, la présence de ce point de contrôle peut être confirmée.

Cryptocodinium cohnii est un dinoflagellé hétérotrophe avec un cycle cellulaire partiellement synchronisable grâce à la technique de relâchement d'un stade motile en G1 suite à une culture sur milieu solide (Bhaud, Salmon et al. 1991). C'est probablement cette raison pratique qui a fait de cette espèce celle sur laquelle le plus d'études biochimiques des régulateurs du cycle cellulaire ont été réalisées. Un anticorps dirigé contre la séquence peptidique de 7 acides aminés PSTAIRE, la séquence conservée de la CDK1 qui sert à son association avec les cyclines (Jeffrey, Ruso et al. 1995), reconnaît chez cette espèce une protéine de 34 kDa (Rodriguez, Cho et al. 1993), une taille similaire à toutes les autres CDKs. L'utilisation de p13^{suc1} couplée à des billes de sépharose sur un extrait de *Cryptocodinium cohnii* arrive à retenir la protéine réagissant à l'anticorps anti-PSTAIRE tel que testé par transfert de type Western. Une protéine similaire à CDK1 doit donc être présente chez les dinoflagellés. Toutefois, dans cette expérience (Rodriguez, Cho et al. 1993), le degré d'enrichissement du signal de l'anticorps obtenu par l'affinité à p13^{suc1} n'a pas été testé.

Une activité kinase est associée aux protéines purifiées par affinité à p13^{suc1} couplée à des billes de sépharose, tel que testé par essai-kinase *in vitro* envers l'histone H1 (Rodriguez, Cho et al. 1993). Ce même test d'activité kinase retrouve 60 à 70% plus d'activité dans des extraits provenant de cellules en phase M comparées à des cellules en interphase (Bhaud, Barbier et al. 1994; Barbier, Albert et al. 1995). Lorsque ce test d'activité est étalé sur un cycle cellulaire complet avec des extraits pris aux heures, on voit un pic d'activité s'étalant sur toute la phase G2 avec un sommet (2.5 fois plus d'activité que le minimum d'activité détectée) atteint 2 heures avant la cytokynèse (Leveson, Wong et al. 1997). Ce comportement est

très surprenant puisque chez les autres organismes modèles du cycle cellulaire, l'activité de MPF augmente rapidement seulement à la transition G2/M pour ensuite aussi rapidement décliner (Smits et Medema 2001). Aussi, la différence d'activité kinase de MPF entre l'interphase et la phase M des organismes modèles est de beaucoup supérieure à un facteur de seulement 2.5. Il est dommage que les protéines actuellement retenues par affinité envers p13^{suc1} n'est pas été analysées.

Toujours chez *Cryptothecodinium cohnii*, la détection de cyclines a été tentée par l'utilisation d'anticorps envers des cyclines d'autres organismes. En utilisant un anticorps contre la cycline Cdc13 de levure fissipare, une protéine exclusivement cytoplasmique de 56 kDa est détectée dont l'abondance ne varie pas entre les phases G1 et M (Barbier, Albert et al. 1995). Ce résultat est plutôt surprenant si la protéine détectée est effectivement une cycline mitotique. Aussi, un extrait protéique immunoprécipité avec le même anticorps possède une activité kinase. En utilisant cette fois un anticorps dirigé contre les boîtes-cyclines d'oursins de mer, 4 bandes sont reconnues : 50, 65, 75 et 90 kDa (Leveson, Wong et al. 1997). Étonnement, la bande de 56 kDa n'est pas reconnue. Seule la bande de 50 kDa est retenue par affinité envers p13^{suc1} et les bandes de 50 et 65 kDa ont toutes deux un pic d'expression correspondant à la phase S tandis que l'expression des bandes de 75 et 90 kDa est constante.

Grâce à l'utilisation du nocodazole, une drogue dépolymérisatrice des microtubules, il est possible de prolonger la phase M de *Cryptothecodinium cohnii* avec un arrêt souvent à la métaphase (Yeung, New et al. 2000). Aussi, la cycline B1 humaine est dégradée plus rapidement lorsque mélangée à un extrait de *C. cohnii* en G1 plutôt qu'à un autre provenant de cellules en G2/M. Grâce à ces expériences, la présence d'un point de contrôle inhibant l'activation de l'APC suite

au mésappariement des chromosomes au fuseau mitotique était fortement démontrée.

La morphologie des chromosomes de *Crypthecodinium cohnii* a été observée sur un cycle cellulaire grâce à des populations synchronisées en G1, G2/M et en phase S grâce à l'aphidicoline, une drogue qui bloque la polymérase d'ADN (Bhaud, Guillebault et al. 2000). Ainsi, en G1, les chromosomes paraissent lâchement condensés pour l'être un peu plus en fin G1. À la phase S, ils se déroulent pour se compacter plus intensément en G2. À la prophase, les chromatides sœurs auparavant condensées ensemble en une seule entité en G2 se séparent partiellement pour former un V attaché via leur kinétochore à une invagination nucléaire traversée par le fuseau mitotique extra-nucléaire. Finalement, lors de la métaphase, le noyau s'aplatit dans le sens attendu d'un alignement classique des chromosomes à la métaphase mais les kinétochores attachés aux invaginations nucléaires ne semblent pas s'aligner sur un seul plan médian.

Chez le dinoflagellé *Gambierdiscus toxicus* un anticorps anti-PSTAIRE reconnaît aussi une protéine de 34 kDa (Van Dolah, Leighfield et al. 1995). En utilisant ce même anticorps pour immunoprécipiter des extraits du dinoflagellé à différentes périodes du cycle cellulaire, une activité kinase envers l'histone H1 est détectée avec un maximum atteint avec des cellules en phase M. Toutefois, il est plutôt curieux que les auteurs aient utilisés cet anticorps pour immunoprécipiter l'activité de MPF. En effet, un anticorps anti-PSTAIRE ne reconnaît que la forme monomérique d'une CDK non-dénaturée (Pines et Hunter 1990), donc inactive sans cycline.

Chez *Karenia brevis*, un anticorps anti-Cdc13 et un anticorps anti-boîtes cyclines d'oursins de mer reconnaissent tous deux sur transfert de type Western une bande de 56 kDa (Barbier, Leighfield et al. 2003). Ainsi, seule une bande est rapportée suite à l'utilisation de l'anticorps anti boîtes-cyclines chez *Karenia brevis*, contrairement aux 4 bandes chez *Cryptothecodinium cohnii* (Leveson, Wong et al. 1997). Ce signal de 56 kDa se retrouve dans un extrait protéique immunoprécipité avec un anticorps anti-PSTAIRE. La présence de cette protéine est détectée tout au long du cycle cellulaire et seulement dans le cytoplasme et le nucléole (Barbier, Leighfield et al. 2003).

Chez *Lingulodinium polyedrum*, il a été montré par cytométrie en flux que la phase S, tout comme la mitose, est circadienne et commence 6 heures après la transition lumière/noirceur lorsque des cellules sont cultivées sous un cycle d'éclairage 12 heures lumière/12 heures noirceur (Homma et Hastings 1989). Les auteurs proposaient alors qu'un contrôle circadien d'entrée en phase S et une durée de phase G2 constante pouvaient accommoder une mitose synchronisée à un cycle journalier. Ainsi, l'horloge circadienne n'ayant qu'un contrôle sur l'entrée en phase S suffirait à produire le rythme circadien de la mitose. Ce modèle demeure toutefois hypothétique.

L'utilisation d'un anticorps anti-PSTAIRE chez *Lingulodinium polyedrum* révèle une bande de 32 kDa par transfert de type Western (Salois et Morse 1996). Ce résultat est en contradiction avec les mêmes expériences faites sur *Cryptothecodinium cohnii* et *Gambierdiscus toxicus* qui reconnaissent une bande de 34 kDa, une taille plus typique des CDKs. La protéine liée par l'anticorps fut clonée par le criblage d'une banque d'ADNc avec cet anticorps et la protéine reconnue n'est pas une kinase. Aussi, plusieurs approches PCR pour isoler une séquence

codant pour une CDK de *Lingulodinium* ont été infructueuses (Salois et Morse 1996; Salois et Morse 1997).

1.4 Approches et objectifs du projet

Il est étonnant que si peu d'études d'ordre biochimique aient été réalisées sur le cycle de division cellulaire des dinoflagellés. Leur propension à former très rapidement des HABs donne pourtant à la recherche sur leur cdc une certaine importance d'ordre économique. Aussi, leur organisation nucléaire si particulière laisse présager plusieurs découvertes de mécanismes nouveaux de contrôle du cdc, liées au domaine de la recherche fondamentale.

En 1999, au début de mes études graduées, à peine près de 1000 séquences nucléotidiques de dinoflagellés étaient disponibles dans les banques de données publiques et, évidemment, aucune d'entre elles n'étaient liées au contrôle du cycle cellulaire. Dans un contexte où les données de séquences étaient si rares, une utilisation systématique d'anticorps hétérologues pour l'étude du cdc des dinoflagellés semblait logique et était donc l'alternative la plus utilisée. En relation avec cet énoncé, lorsque l'on sait qu'un organisme tel que *S. cerevisiae* possède à lui seul 22 cyclines, on peut toutefois se questionner sur l'identité réelle des protéines reconnues avec un anticorps anti-(boîte-cycline). Il y avait donc un manque flagrant de composantes du cycle cellulaire déjà isolées ainsi qu'un manque de données de séquence s'y rattachant nous permettant de pouvoir les étudier plus en détail.

Puisque les approches classiques d'amplification par PCR de régions conservées de CDKs (Salois et Morse 1996; Salois et Morse 1997) et de cyclines (Salois et Morse, non-publié; Bertomeu et Morse, non-publié) demeureraient infructueuses, il nous fallait adopter une autre technique pour arriver à les isoler.

à les isoler. Un séquençage systématique d'un très grand nombre d'ESTs (anglais : Expressed Sequence Tag) de notre organisme était une possibilité. Toutefois, un manque de ressources humaines et financières ainsi que l'existence d'une méthode alternative aux possibilités nouvelles, la complémentation fonctionnelle, nous a fait plutôt privilégier celle-ci. La complémentation fonctionnelle est définie comme étant le remplacement en tout ou en partie d'une fonction biologique perdue par un organisme par un gène provenant d'un autre organisme. Ainsi, il était possible grâce à cette technique de faire des criblages permettant d'isoler des gènes de *L. polyedrum* selon leur capacité à compléter une perte de fonction spécifique. Puisque la fonction et l'identité du ou des gènes inactivés chez l'organisme à compléter sont connues, il est fort probable que les gènes isolés par cette technique en soient les homologues fonctionnels et aient donc une fonction similaire.

La levure bourgeonnante est un organisme modèle unicellulaire eucaryotique pour lequel il existe des milliers de mutants conditionnels pour toute une panoplie de fonctions biologiques, y compris le contrôle du cdc. Elle est donc un outil idéal pour effectuer des criblages de complémentation fonctionnelle d'une banque d'ADNc de *L. polyedrum* insérée dans un vecteur d'expression chez la levure. Ainsi, pour autant qu'il existe un mutant conditionnel d'une fonction spécifique de la biologie de cette levure et que l'on sache qu'il y ait cette même fonction chez les dinoflagellés, un criblage fonctionnel aurait de très bonnes chances de réussir à isoler le gène responsable de cette fonction chez les dinoflagellés. Évidemment, tous les gènes des dinoflagellés n'ont pas forcément leur équivalent chez la levure et vice-versa. Il est aussi possible qu'un gène à la séquence très rapprochée et ayant sensiblement la même fonction chez les deux organismes ne puisse pas compléter l'absence de son homologue dans l'autre

organisme. Par exemple, le choix du promoteur utilisé pourrait influencer sur le succès de la complémentation. Toutefois, on est en droit de penser que, pour un mécanisme aussi fondamental que le contrôle du cycle cellulaire, il puisse y avoir conservation de fonction des intervenants clé, tel que les cyclines et CDKs. D'ailleurs, les premières cyclines humaines furent isolées par complémentation fonctionnelle de *S. cerevisiae* mutante conditionnelle pour ses cyclines G1/S (Lew, V. et al. 1991).

Avec tous les projets de créations de lignées mutantes conditionnelles nouvelles de *S. cerevisiae*, dont en outre un projet de délétions systématiques de chacun de ses gène (Winzeler, Shoemaker et al. 1999), et pour autant que les mutants résultants provoquent un phénotype distinct du type sauvage, les possibilités de criblages fonctionnels sont immenses. Aussi, puisqu'à ce jour il n'existe pas encore de méthode pour transformer un dinoflagellé, le report de la génétique de ce protiste dans un organisme aussi facilement manipulable génétiquement que la levure ouvre la voie aux expériences de type « gains de fonction » aux dinoflagellés. Ainsi, le nombre d'expériences possibles avec un système de complémentation de la levure par des gènes de dinoflagellés ne seraient limitées que par l'imagination de l'investigateur. Comme exemple de criblages innovateurs, on pourrait penser mettre dans la région 5' non-traduite d'un gène létal pour la levure une séquence d'ARN que l'on sait liée par un inhibiteur de la traduction chez les dinoflagellés, et effectivement réussir à isoler cet inactivateur avec un tel criblage. Ainsi, l'établissement d'une banque d'ADNc de *L. polyedrum* dans un vecteur d'expression chez le levure pour fin d'isolement de composantes du cycle cellulaire de notre dinoflagellé avait aussi pour objectif secondaire d'établir un nouveau type d'approche de l'étude de la génétique des dinoflagellés.

Pour arriver à contrôler le moment de l'entrée en mitose chez *Lingulodinium*, on peut penser à plusieurs mécanismes biochimiques différents. Il pourrait y avoir un contrôle transcriptionnel ou traductionnel par l'horloge circadienne ne permettant aux intervenants de l'entrée en mitose leur expression qu'à un moment précis du jour. Aussi, une modification post-traductionnelle, telle qu'une phosphorylation d'un site activateur ou la déphosphorylation d'un site inactivateur, pourrait aussi être une possibilité. L'objectif à long terme de cette thèse est donc d'établir les prémisses de la découverte du mécanisme de contrôle du rythme circadien d'entrée en mitose des dinoflagellés, à savoir l'isolement de candidats régulateurs du cycle cellulaire du dinoflagellé *Lingulodinium polyedrum*.

Hypothèses :

- Le contrôle du cycle de division cellulaire des dinoflagellés utilise les mêmes sortes de régulateurs que les autres eucaryotes.
- Le contrôle du cdc par l'horloge circadienne se fait sur l'un de ces régulateurs.

Objectifs :

- Isoler des gènes de *Lingulodinium polyedrum* potentiellement impliqués dans le contrôle de son cycle cellulaire.
- Caractériser le rôle de ces gènes chez *Lingulodinium*.

Approche :

- Établir un système de complémentation fonctionnelle de la levure avec des gènes de *Lingulodinium* pour cribler des mutants conditionnels du cycle cellulaire.

2 Publication #1 : Isolation of a dinoflagellate mitotic cyclin by functional complementation in yeast

Thierry Bertomeu and David Morse

Publié dans : Biochemical and Biophysical Research Communications **323** (2004)
1172-1183

Toutes les procédures expérimentales furent effectuées par moi et cet article a été écrit conjointement avec D.M.

2.1 Abstract

Dinoflagellates are protists with permanently condensed chromosomes that lack histones and whose nuclear membrane remains intact during mitosis. These unusual nuclear characters have suggested that the typical cell cycle regulators might be slightly different than those in more typical eukaryotes. To test this, a cyclin has been isolated from the dinoflagellate *Gonyaulax polyedra* by functional complementation in *cln123* mutant yeast. This GpCyc1 sequence contains two cyclin domains in its C-terminal region and a degradation box typical of mitotic cyclins. Similar to other dinoflagellate genes, GpCyc1 has a high copy number, with ~ 5000 copies found in the *Gonyaulax* genome. An antibody raised against the N-terminal region of the GpCYC1 reacts with a 68 kDa protein on Western blots that is more abundant in cell cultures enriched for G2-phase cells than in those containing primarily G1-phase cells, indicating its cellular level follows a pattern expected for a mitotic cyclin. This is the first report of a cell cycle regulator cloned and sequenced from a dinoflagellate, and our results suggest control of the dinoflagellate cell cycle will be very similar to that of other organisms.

2.2 Introduction

The cell cycle, and in particular entry into M and S phases, is tightly regulated in eukaryotic cells. Regulation relies on activation and subsequent inactivation of cyclin-dependent kinases (CDKs), a family of serine/threonine protein kinases whose activity depends on protein partners termed cyclins (Morgan 1997; McGowan 2003). Cyclins regulate the total activity of the kinase subunit, and individual members of the cyclin family are thought to allow the cell to control the timing and location of the activated kinase (Murray 2004). Eukaryotes in general

contain several types of cyclins, each defined by many factors including the stage of the cell cycle at which they activate a CDK. Budding yeast for example, use members of the G1/S cyclin family (CLN1,2,3) to permit entry into S phase while members of the mitotic cyclin family (CLB1,2,3,4) promote entry into mitosis.

Cyclins derive their name from their periodic synthesis and degradation, and in principle, these changes in cyclin levels are necessary and sufficient to regulate CDK activity. However, in practice, additional post-translational controls are overlaid on top of the oscillating cyclin levels. For example, several additional proteins can act as CDK inhibitors. In addition, both activatory and inhibitory phosphorylation events contribute to the final levels of CDK activity. A CDK-activating kinase is required for activity, while the Wee1 kinase and the Cdc25 phosphatase act to add or remove an inhibitory phosphate, respectively.

To date, no molecular players in the dinoflagellate cell cycle have been cloned and sequenced. Dinoflagellates are eukaryotic protists with a number of nuclear features that, taken together, suggest their cell cycle regulation may have some unusual modifications. First, their DNA is organized inside the nucleus without histones (Rizzo 1991), so that unlike the beads-on-a-string arrangement characterized by the presence of nucleosomes, dinoflagellate chromatin is observed as smooth threads. This suggests that the histone code for defining different functional regions in the genome is not used in dinoflagellates (Wargo and Rizzo 2001) and that the histone kinase activity associated with CDKs is without functional significance in these organisms. Secondly, dinoflagellate chromosomes remain condensed at all phases of the cell cycle, suggesting that condensins, if present, will not be CDK substrates. It is possible that the chromosomes may experience transient unwinding in order to allow replication to occur (Spector, Vasconcelos et al. 1981), and filaments protruding from the core have been

proposed to account for transcription (Soyer-Gobillard, Gillet et al. 1999). Indeed, general transcription rates may be low, as two dinoflagellate genes occur as multiple copy (> 1000) tandem repeats (Le, Markovic et al. 1997; Li and Hastings 1998). Interestingly, the tandem repeat structure has been exploited to isolate potential upstream transcriptional regulatory sequences. These intergenic sequences contain no known regulatory sequence motifs, including the TATA box sequence often found in the promoters of other eukaryotic genes. This later may be explained by the recent observation that dinoflagellates express a form of the TATA box-binding protein (normally part of the TFIID complex) that displays an unusually high affinity for the sequence TTTT (Guillebault, Sasorith et al. 2002). Lastly, the mechanics of mitosis itself in dinoflagellates is different from what is normally seen in other cells. The nuclear membrane remains intact during mitosis, implying that components of the nuclear lamina are also unlikely to be CDK substrates. The mechanism of chromosome separation involves an extranuclear spindle that traverses the nucleus inside cytoplasmic channels (Fritz and Treimer 1983). The chromosomes bind to the inside of the nuclear envelope, while the spindle microtubules bind to kinetochores assembled on the cytoplasmic surface of the envelope. This is reminiscent of the segregation of prokaryotic genomes, which occurs concurrently with elongation of the nucleus.

Despite these differences, there is considerable evidence to suggest the cell cycle in dinoflagellates will be found to be similar to that in other organisms. For example, the cell cycle is known to involve discrete S and M phases (Homma and Hastings 1989; Bhaud, Barbier et al. 1994), and entry into these different phases must thus be tightly controlled. It has been shown that passage through G1/S boundary in many species is inhibited by olomoucine, a competitive inhibitor of ATP binding to the p34^{cdc2} kinase (Abraham, Acquarone et al. 1995; Van Dolah and

Leighfield 1999). Furthermore, inhibition of the microtubule polymerization by nocodazole prolongs metaphase and suggests that dinoflagellates have a spindle checkpoint during M phase (Yeung, New et al. 2000). There is also evidence supporting the presence of a cdc2-like kinase. First, histone kinase activity can be purified from dinoflagellate extracts by p13^{suc1} chromatography. The p13^{suc1} clearly binds strongly to the CDK in yeast, although its role is not yet clear (Vogel and Baratte 1996), and phosphorylation of histones is considered a hallmark of the CDK activity. In *C. cohnii*, a peak of histone kinase activity has been reported in S phase (Leveson, Wong et al. 1997) and in M phase (Bhaud, Barbier et al. 1994). Furthermore, several studies have identified a protein of 34 kDa in dinoflagellate extracts that cross-reacts with an anti-PSTAIR antibody (Rodriguez, Cho et al. 1993; Bhaud, Barbier et al. 1994; Van Dolah, Leighfield et al. 1995). The PSTAIR motif, implicated in cyclin binding, is a highly conserved feature of the kinase subunit (Morgan 1997), although a caveat to these observations is that a 34 kDa protein cross-reacting with the anti-PSTAIR antibody previously cloned from *Gonyaulax* had no conserved kinase motifs (Salois and Morse 1996). Lastly, protein extracts from *C. cohnii* have been shown to cross react with antibodies raised against the 56 kDa cyclin B from clam (Barbier, Albert et al. 1995; Leveson, Wong et al. 1997; Barbier, Geraud et al. 1998). A caveat here is that experimental results appear to depend on the antibody used. In some studies, only a single band of 56 kDa is seen on Westerns (Barbier, Albert et al. 1995) while in other studies bands at 50, 65, 75 and 90 kDa have been observed (Leveson, Wong et al. 1997). Furthermore, the levels of immunoreactive protein have been reported to either be low in M phase (Leveson, Wong et al. 1997) or constant throughout the cell cycle (Barbier, Albert et al. 1995; Barbier, Leighfield et al. 2003).

As a first step to understanding the cell cycle regulation in dinoflagellates, we report here the first cyclin sequence isolated from this group of organisms. Our sequence, called GpCyc1, is similar to other mitotic cyclins and can complement Cln123 mutant yeast, underscoring the conservation in regulation cell cycle in eukaryotes. Identification of an authentic dinoflagellate cyclin thus opens the way to extensive immunological characterization and two-hybrid screening for interacting partners, including the CDK itself. These studies are important from a basic science perspective, as it is possible that the basic cell cycle machinery has been modified to accommodate the unusual features of dinoflagellate chromosome architecture and mitosis. Second, from a practical point of view, the control of cell proliferation will ultimately rely on understanding how the basic machinery operates. This is especially important for the “red tide” species, which can also pose substantial health risks because of their ability to proliferate to extremely high levels in ocean waters and produce a variety of potent toxins (Van Dolah 2000).

2.3 Experimental Procedures

Cell culture. Cultures of *Gonyaulax polyedra* (now *Lingulodinium polyedrum*, CCMP 1936) were obtained from the Provasoli-Guillard Culture Center and grown in f/2 medium under 12 h light (40 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ cool white fluorescent lights) and 12 h dark at a temperature of 18 ± 1 °C to a cell density of 12-14,000 cells/mL. The timing of cells samples taken under the light regime are termed LD, with LD 0 corresponding to lights on and LD 12 to lights off. For filtration selection of different cell cycle phases, cells were filtered through a 41 μm pore size Nitex nylon membrane as previously described (Homma and Hastings 1988). Mitosis in *Gonyaulax* occurs at LD1, just after dawn, at which time the cell volume is halved (Homma and Hastings 1989). These studies demonstrated that large cells retained

at LD 22 could be considered as enriched in G2-phase cells, while small cells passing through the filter at LD 4 could be considered as enriched in G1-phase cells. To verify the enrichment protocol, cells were examined using a Nikon Eclipse TE2000-U equipped with a CoolSnap CCD. Cell areas, quantitated using Image-Pro plus from randomly selected microscope fields, were used to calculate cell volumes.

Yeast transformation. Transformation of yeast used the standard protocol developed by the Geitz laboratory (Agatep, Kirkpatrick et al. 1998). The yeast strain mutant in *Clb1, 2, 3 & 4* (strain SBY175, a gift from Dr. S. Reed, Scripps Research Institute) contains mutations in four *Clb* genes (*Clb1234*) but is able to express a *Clb1* from the *Gal1* promoter (Richardson, Lew et al. 1992). The yeast strain mutant in *Cln1, 2 & 3* (strain BF305-15d, a gift from Dr. B. Futcher, Cold Spring Harbor Laboratories) is mutated in *Cln1, Cln2* and *Cln3*, and expresses a *Cln3* from a *Gal1* promoter (Xiong, Connolly et al. 1991).

Antibody production. The cyclin cDNA was digested with *PvuII*, a blunt ended fragment corresponding to 150 amino acids from the N-terminal end of the proteins (lacking the cyclin domains) was cloned into the *SmaI* site of pQE31 (Qiagen) and the clone was verified by sequencing. This N-terminal region of GpCYC1 has no homology to any known sequence in BLAST searches. The His-tag fusion protein expressed by the bacteria was purified by Ni-NTA affinity chromatography. Rabbit polyclonal antibodies were prepared by National Biological Laboratory (Dugald, Man, Canada) using their standard protocol and purified by protein A chromatography (Millipore) prior to use. Western blots were performed with a 1/300 dilution of this antibody. Affinity purified antibody was prepared from the IgG fraction using nitrocellulose membranes to which had been transferred the

purified fusion protein after electrophoresis on SDS gels (Plaxton 1989). This antibody was also used at a 1/300 dilution.

Preparation of library. RNA, extracted from cells at LD 23, was purified using standard methods (Jones, Dunsmuir et al. 1985) and enriched for polyadenylated RNA by oligo(dT) chromatography. A directional cDNA synthesis kit (Stratagene) was used to synthesize cDNA from 5 µg mRNA. The cDNAs were cloned into a yeast expression vector derived from the pYES2 (Invitrogen). The inducible Gal1 promoter was excised from this vector by *SpeI* digestion, the ends blunted with Klenow fragment, and the remaining vector ligated to a blunt-ended GPD promoter prepared from the p426GPD (Vernet, Dignard et al. 1987) vector by *SacI-XbaI* double digest followed by treatment with Klenow. The GPD promoter is strong and constitutive. Sequencing confirmed that the promoter initiates transcription toward a multiple cloning site containing first *EcoRI* and then *XhoI*. The titer of the bank prior to amplification was 4×10^6 independent clones of which ~ 90 % contained an insert.

Sequence analysis. All sequences were analyzed using MacVector (Accelrys). The sequences used for phylogenetic analysis were : *Anopheles* (EAA00183), *Arabidopsis* (D96505), *Asterina* (BAA14010), *Bos* (CAA48398), *Brassica* (AAA51660), *Carassius* (AAF82778), *Danio* (AAK15021), *Dictyostelium* (AAC46498), *Drosophila* (P14785), *Gallus* (P43449), *Giardia* (EAA41683), *Gonyaulax* (this study; deposited under accession number AY618995), *H. sapiens* (AAH36346), *Hydra* (P51986), *Leishmania* (CAD20131), *Mus* (P51943), *Neurospora* (EAA34615), *Nicotiana* (T02968), *Oryza* (AAR87212), *Paramecium* (AAD08957), *Patella* (P24861), *Pisum* (CAB77269), *Plasmodium* (PF13_0022), *Pneumocystis* (AAC78639), *Saccharomyces* (CAA49202), *Schizosaccharomyces pombe* (A34948), *Strongylocentrotus* (AAF67075), *Trypanosoma* (CAD43046),

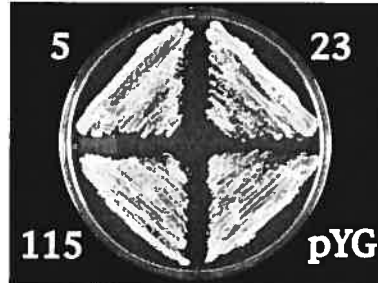
Xenopus (P47827). All sequences were truncated to roughly 280 amino acids (containing the two cyclin boxes) and aligned using Clustal W before preparation of a neighbor-joining tree (Poisson corrected with gap sites ignored). The nodes where bootstrap support in 10,000 replicates exceeded 90% were marked.

2.4 Results

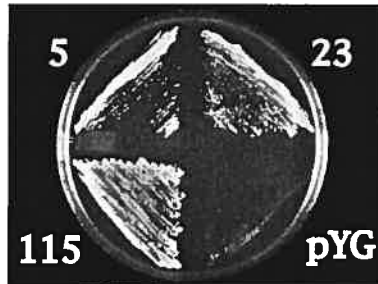
2.4.1 Functional cloning of a mitotic cyclin

We transformed yeasts carrying conditional mutations in cyclin genes with a *Gonyaulax* cDNA library inserted into a yeast expression vector. Thus, growth of transformed cells under restrictive conditions indicated that the *Gonyaulax* library had supplied a functional replacement for the yeast mutant gene. Yeast cells carrying mutations in Clb1234 and Cln123 were transformed and tested for growth under selective conditions. These screens were successful for the Cln123 mutant, where 136 independent clones were recovered from ~ 6,000,000 colonies screened (1.5 fold coverage of the library). No functional rescue of the Clb1234 mutant yeast was observed, even when clones capable of functional rescue in the Cln123 mutant yeast were used (Figure 2.1, p.46). This phenotype initially suggested that we had isolated S phase cyclins.

A CLN123, -Ura +Gal



B CLN123, -Ura



C CLB1234, -Ura

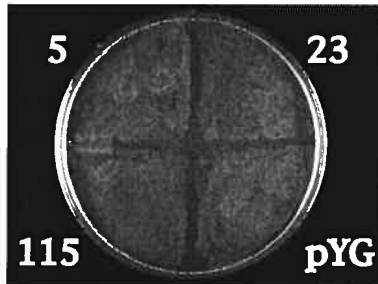


Figure 2.1 Rescue of the Cln123 mutant yeast phenotype by *Gonyaulax* cDNAs.

Yeast transformed with *Gonyaulax* cyclin clones of three different lengths or the expression vector pYG alone were allowed to grow under (A) non-selective (-Ura + Gal) or (B,C) selective (-Ura) conditions. The yeast cells carried mutations in either (A, B) Cln123 cyclins or (C) Clb1234 cyclins.

A detailed analysis of the 136 clones (numbered from Cyc1 through Cyc136) was carried out by first placing the clones into groups with identical restriction maps based on digestion with both *EcoRI* and *XhoI*. One member of each group was then completely sequenced (19 clones sequenced in total). Of the 136 recovered sequences, 131 sequences fell into a single group that had different lengths at the 5' end but were otherwise identical. We have called this common sequence GpCyc1. All GpCyc1 members had two conserved cyclin domains that shared ~ 30 % amino acid identity with corresponding domains from various organisms, and all but two clones (designated Cyc3 and Cyc23) also possessed the degradation box motif (RxxLxxlxN) typical of mitotic cyclins (Figure 2.2, p.49). These characteristics indicated that we had cloned a mitotic cyclin instead of an S phase cyclin. The presence of mitotic cyclins in a screen for G1/S cyclins might be related to the finding that mitotic cyclins have been observed to promote S phase as well as mitosis in budding yeast (Haase and Reed 1999; Moore, Kirk et al. 2003).

Figure 2.2 *Gonyaulax* cyclin contains two conserved cyclin domains and a degradation box.

(A) Schematic comparison of the longest *Gonyaulax* cyclin sequence with that of yeast CLB1 shows a similar orientation of the degradation box (D box) and the two cyclin domains. The positions corresponding to the 5' end of the 19 sequenced clones are shown by clone number (lines) as well as the position of the first three ATG codons (circles, marked as Met since all three are in frame) for the *Gonyaulax* cyclin. Shaded boxes mark the position of the degradation box and the two cyclin domains. (B) The nucleotide and derived amino acid sequence of GpCyc115. Translation has been assumed to start at the first ATG.

It is important to note that the cloning vector used lacks an initiation codon, so that any transcript produced must contain its own in-frame AUG in order to be translated. Indeed, this may be the reason why an S phase cyclin was not picked up by our screen. There are three AUGs in the N-terminal region of the deduced protein sequence of the longest clone (Figure 2.2A, p.49). The first is immediately downstream from the 5'end of clone Cyc115, while the second and third are located close together at the beginning of the first cyclin domain. The length of clones Cyc115, Cyc5 and Cyc23 is such that they could initiate translation from the first, second and third AUG, respectively. There is no detectable phenotypic difference between the three clones. Interestingly, no shorter sequences were recovered in our screen. It is possible that no shorter sequences were synthesized during the cDNA synthesis reaction. However, it seems more likely that a GpCYC1 produced by translation initiation from the next methionine (inside the first cyclin domain) is too short to function properly. In any event, it seems clear that the degradation box is not required for phenotypic rescue as Cyc23 lacks this sequence element.

To test the size of the transcript from which the clones were derived, the entire cDNA sequence was radiolabeled and hybridized to poly(A) RNA on Northern blots. Interestingly, two bands were observed instead of the one expected (Figure 2.3, p.52). The upper band, at 2.2 kb, is large enough to encode the 1.83 kb Cyc115 clone isolated from the genetic screen while the smaller band, at 1.6 kb appears too short. We also observed that the smaller of the two hybridization signals was not obtained when a probe derived from the 3' UTR was used, suggesting that this band lacks much of the roughly 600 nucleotide 3' UTR found in all the sequenced clones. Although it is theoretically possible that the smaller

mRNA may represent a post-transcriptionally modified form of GpCyc1, this seems unlikely given that it was not recovered in our genetic screen. Instead, it seems more probable that the sequence represents a different cyclin box-containing sequence that was not identified in our screen because of the requirement for an in-frame methionine upstream of the cyclin domains. The size of the larger RNA in this analysis also suggests that the GpCyc1 sequence is still missing roughly 370 bp from the 5' end.

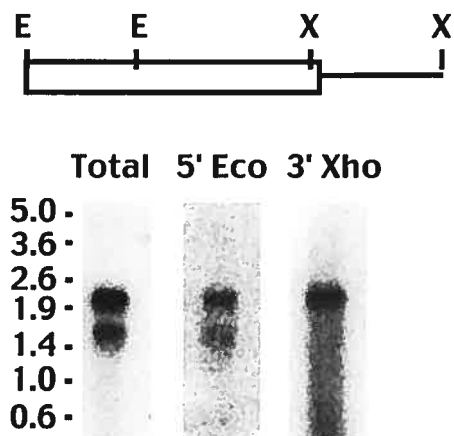


Figure 2.3 Two different *Gonyaulax* cyclin genes are expressed.

One μg polyadenylated-enriched RNA from *Gonyaulax* was hybridized to a probe derived from (A) the total cDNA (B) a 5' end EcoRI fragment or (C) a 3' end XhoI fragment. A schematic view of the cDNA places the location of the EcoRI (E) and XhoI (X) sites above the open reading frame (box) and 3' UTR (line).

Slight differences were also observed in the length of the 3' end of the clones. All sequences recovered had minor differences in the position of the poly(A) tract, with 20 nucleotides separating the shortest from the longest clone. However, as the sequence was identical up to the poly(A) tract, either site recognition for polyadenylation is somewhat leaky or we have cloned transcripts expressed from different genes, each with a slightly different location for their putative polyadenylation signal. This behavior has not been previously noted in other analyses of dinoflagellate gene expression, such as for the sequences PCP (Le, Markovic et al. 1997) or LBP (Machabee, Wall et al. 1994), and to date the polyadenylation signal has not been defined for any dinoflagellate transcript.

The remaining 5 clones isolated from the screen fall into a second group of identical sequences with different 5' end lengths. Unlike the first group, these sequences share no homology with known cyclins, despite being able to complement the yeast Cln123 mutation. Curiously, the only similar sequences currently available in GenBank contain an uncharacterized SpoIIIAA (ATPase) domain conserved in prokaryotes and a putative protein-encoding gene from *Arabidopsis*. The identity of this clone and the mechanism whereby it is able to rescue the mutation in the cln123 yeast strain are not yet known (see discussion).

2.4.2 The cyclin sequences are derived from dinoflagellates

Five lines of evidence support the contention that the clones isolated did indeed correspond to authentic dinoflagellate cyclins. First, the sequences are 66.5 % GC-rich, as are other nuclear encoded *Gonyaulax* genes (Machabee, Wall et al. 1994; Le, Markovic et al. 1997). Second, the codon usage in the cyclin cDNA is

consistent with that found in a compendium of all other known *Gonyaulax* coding sequences currently available in GenBank (Table 1, p.55; $R^2 = 0.528$). Third, a search of dinoflagellate EST sequences recovered one cyclin sequence with 77 % amino acid sequence identity to the C-terminal end of the *Gonyaulax* sequence from 6000 non-redundant *Alexandrium* ESTs (these ESTs were sequenced from the 3'end (Hackett, Yoon et al. 2004)). Although only a short fragment of the sequence is available, this is the highest level of sequence identity found with any organism and is roughly equivalent to the degree of identity found between cyclins found in plants, in fungi or in animals (boxed areas in Table 2, p.56). In contrast, the level of sequence identity between GpCyc1 and any other cyclin is uniformly low (~30 %), as is the similarity between cyclins from different groups. Fourth, measurement of the number of gene copies per dinoflagellate nucleus suggest that ~5000 gene copies are present (Figure 2.4, p.57). This is consistent with the generally high copy number of dinoflagellate genes, including the 1000 copies of the luciferin binding protein (LBP) gene (Lee, Mittag et al. 1993) and the 5000 copies of the peridinin-chlorophyll *a*-binding protein (PCP) gene (Le, Markovic et al. 1997).

Table 1 Codon usage of Cyc115 compared to other *Gonyaulax* genes

AA	Codon	Av (%)	Cyc (%)
A	GCT	1.6	2.1
	GCC	4.0	6.6
	GCA	1.9	3.4
	GCG	2.7	3.8
C	TGT	0.2	0.2
	TGC	1.7	2.6
D	GAT	1.6	0.9
	GAC	4.5	3.2
E	GAA	1.1	0.6
	GAG	4.8	7.0
F	TTT	0.7	0.2
	TTC	3.1	1.9
G	GGT	1.6	0.6
	GGC	4.8	2.6
	GGA	0.7	0.4
	GGG	0.9	1.3
H	CAT	0.4	0.6
	CAC	1.6	3.2
I	ATT	1.0	0.2
	ATC	3.3	1.7
	ATA	0.2	0.0
K	AAA	1.0	0.2
	AAG	5.4	1.9
L	TTA	0.0	0.0
	TTG	1.2	0.6
	CTT	0.9	0.9
	CTC	2.6	4.9
	CTA	0.1	0.4
	CTG	2.2	4.3
M	ATG	2.9	2.3
N	AAT	0.7	0.2
	AAC	2.5	1.5
P	CCT	0.7	1.3
	CCC	1.7	1.5
	CCA	0.8	1.5
	CCG	1.7	3.6
Q	CAA	0.3	0.6
	CAG	3.1	3.4
R	CGT	1.0	0.9
	CGC	2.2	2.1
	CGA	0.3	0.4
	CGG	0.7	2.6
	AGA	0.2	0.4
	AGG	0.6	1.3
S	TCT	0.7	0.2
	TCC	2.0	2.8
	TCA	0.4	0.6
	TCG	1.2	1.5
S	AGT	0.3	0.0
	AGC	1.6	2.3
T	ACT	0.9	0.0
	ACC	2.1	1.1
	ACA	1.0	1.1
	ACG	2.0	1.5
V	GTT	1.3	1.1
	GTC	2.9	1.7
	GTA	0.3	0.0
	GTG	3.4	2.6
W	TGG	1.4	1.1
Y	TAT	0.6	0.4
	TAC	2.5	1.9
•	TAA	0.0	0
•	TAG	0.1	0
•	TGA	0.2	0.02

Table 2 Sequence identities in cyclin domains

	Ara	Pea	Nic	Bra	Ory	Mus	Gal	Bos	Hum	Nen	Gol	Dan	Lim	Pat	Str	Hyd	Dro	Gon	Try	Lei	Dic	Par	Clb	Neu	Pnc	Pom
<i>Pea</i>	52																									
<i>Nicotiana</i>	53	67																								
<i>Brassica</i>	88	51	51																							
<i>Oryza</i>	54	62	68	54																						
<i>Mus</i>	33	36	36	34	35																					
<i>Galus</i>	33	36	34	34	35	85																				
<i>Bos</i>	34	36	36	34	36	94	87																			
<i>Human</i>	33	35	35	31	36	67	65	67																		
<i>Acropus</i>	34	38	38	34	36	75	77	77	63																	
<i>Goldfish</i>	35	38	37	34	36	79	79	81	65	80																
<i>Dunn</i>	35	37	36	34	36	80	79	82	65	79	93															
<i>Lampet</i>	33	36	34	32	34	62	64	63	61	59	62	63														
<i>Panella</i>	34	31	34	32	33	56	59	57	56	54	57	58	60													
<i>Strongylocentrotus</i>	37	36	33	35	33	55	56	55	56	53	57	58	58	67												
<i>Hydra</i>	35	37	37	34	34	54	54	55	53	52	54	56	56	54	54											
<i>Drosophila</i>	34	34	32	32	33	48	48	48	47	48	48	50	48	48	45	48										
<i>Gonyaulax</i>	40	29	40	40	31	35	33	35	34	34	34	35	34	34	29	32	32									
<i>Trypanosoma</i>	37	34	45	36	33	31	31	32	31	30	32	32	31	34	31	32	29	31								
<i>Leishmania</i>	24	22	25	22	24	28	26	27	27	26	26	27	26	27	26	28	27	26	30							
<i>Dictyostelium</i>	31	29	27	29	28	29	30	30	31	30	31	31	30	31	30	30	30	30	29	33	26					
<i>Paramicium</i>	35	31	31	31	31	30	30	30	32	31	32	32	33	32	32	31	29	31	29	26	36					
<i>Yeast (Clb4)</i>	22	20	23	21	22	25	26	26	29	26	27	28	27	29	27	29	27	28	25	25	29	31				
<i>Neurospora</i>	24	23	24	25	22	30	31	31	32	31	32	32	30	32	32	30	30	28	23	24	34	28	42			
<i>Pneumocytis</i>	29	24	29	29	25	30	29	31	31	29	29	30	29	32	29	30	29	29	29	25	34	31	40	60		
<i>S. pombe</i>	28	25	25	29	24	31	31	31	31	30	31	32	33	34	32	30	31	30	26	24	29	29	44	63	71	
<i>Plasmodium</i>	8	11	10	7	10	10	9	9	9	10	9	9	8	6	8	9	8	10	7	8	8	11	12	12	10	11

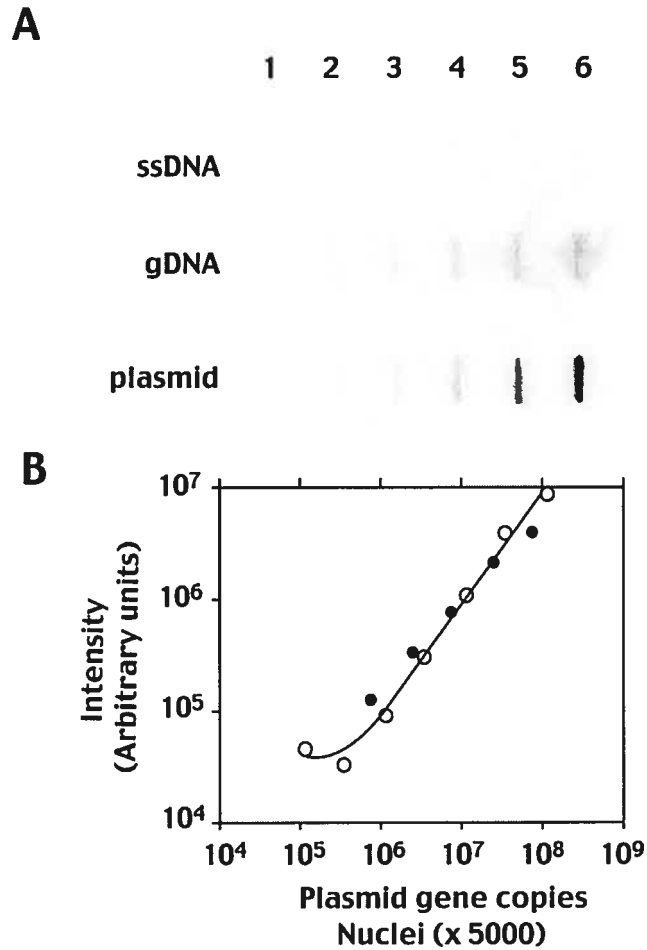


Figure 2.4 *Gonyaulax* contains multiple cyclin genes.

Slot blot analysis with a *Cyc115* probe and (A) salmon sperm ssDNA (lane 5; 1 μ g; lane 6; 3 μ g), *Gonyaulax* nuclear ($\sim 10^{11}$ bp per nucleus) gDNA (lane 2; 0.03 μ g; lane 3; 0.1 μ g; lane 4; 0.3 μ g; lane 5; 1 μ g; lane 6; 3 μ g), GpCyc1 plasmid (6 kbp per plasmid) DNA (lane 1; 3 pg; lane 2; 10 pg; lane 3; 30 pg; lane 4; 100 pg; lane 5; 300 pg; lane 6; 1000 pg). (B) Slot blots were quantitated by phosphorimager and the signal intensity plotted as a function of gene copies for both plasmid and nuclear DNA (assuming 5000 gene copies per *Gonyaulax* nucleus).

Lastly, we performed phylogenetic analysis with the dinoflagellate cyclin sequence to see if the predicted phylogenetic relationships were compatible with those determined using other sequences. Mitotic cyclin sequences were selected to represent the widest range of available taxa, and the sequences truncated to contain the cyclin fold (roughly 250 amino acids). Our phylogeny recovers the major groups of fungi, plants and animals with high bootstrap support (Figure 2.5, p.59). The GpCyc1 sequence falls outside these three clades as expected (Baldauf, Roger et al. 2000; Van de Peer, Baldauf et al. 2000). However, we also expected the dinoflagellate sequence to group within a clade containing ciliate and apicomplexan sequences. The ciliates are represented in our analyses by *Paramecium*, and although ciliates do not form a clade with our *Gonyaulax* cyclin, there is no significant bootstrap support for excluding *Gonyaulax* from such a relationship. Clearly, the low degree in phylogenetic discrimination found in the conserved cyclin domains precludes making a definite statement as to the relationship between ciliates and dinoflagellates. The apicomplexan cyclin is represented in our analysis by the cyclin4 sequence from *Plasmodium*, the only apicomplexan sequence with two cyclin domains. This sequence shares little homology with the dinoflagellate sequence, and indeed, is used as an outgroup in this analysis. This is presumably due to the very low (7-12 %) sequence identity between the apicomplexan sequence and other cyclins (Table 2, p.56), and it has been suggested that the unusual cell cycle of *Plasmodium* may have led to highly derived cyclin sequences (Merckx, Le Roch et al. 2003). Our analysis is thus not inconsistent with the established phylogenetic position of the dinoflagellates. Taken together, therefore, our data provide compelling evidence that GpCyc1 is a *bone fide* dinoflagellate cyclin.

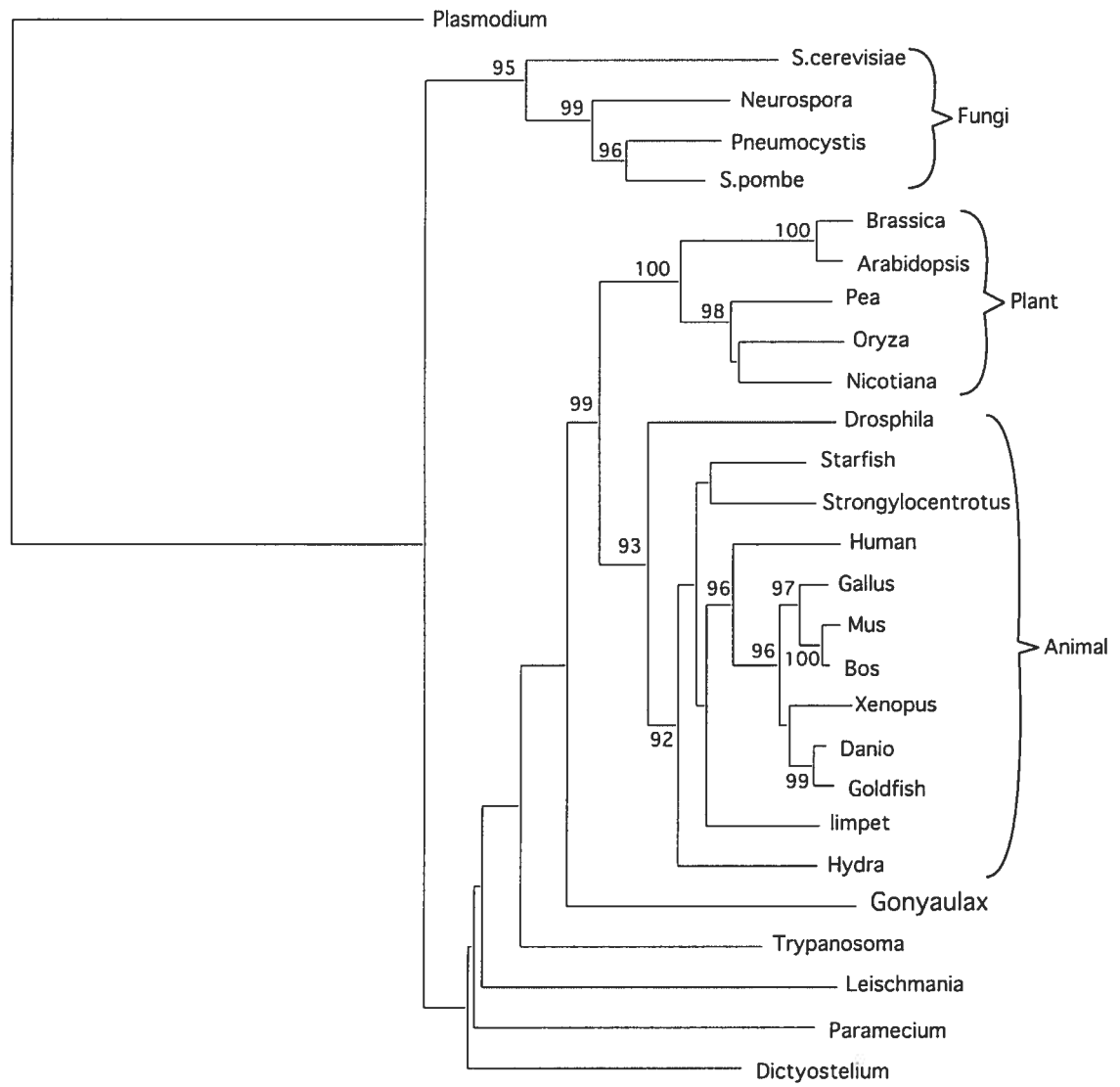


Figure 2.5 Phylogeny of *Gonyaulax* cyclin sequence is consistent with known relationships.

Protein sequences were aligned by ClustalW and analyzed using neighbor joining. The *Gonyaulax* cyclin is not part of the clusters representing fungi, animals and higher plants.

2.4.3 Cyclin expression is controlled post translationally

To address the issue of cyclin expression at the protein level, a rabbit polyclonal antibody was raised against the N-terminal region of GpCYC1 for use on Western blots. We anticipated that a mitotic cyclin synthesized from our clone should have a molecular weight of roughly ~64 kDa and should vary in amount over the course of the cell cycle. However, cells under our growth conditions have a roughly five day doubling time (Figure 2.6A, p.61). Thus, even though mitosis occurs only in a window of several hours just following dawn (Homma and Hastings 1989), the cells are not synchronized with respect to the cell cycle. We therefore prepared samples enriched for G2 or G1 cells using a modification of a previously described filtration protocol (Homma and Hastings 1988) (Figure 2.6B, p.61). The average cell volume in samples enriched for G2 phase cells is roughly twofold greater than in samples enriched for G1 phase cells as expected (Figure 2.6D, p.61). Western blots analysis of G1- and G2-enriched cell extracts using an antibody raised against the N-terminal region of the cyclin showed that a band at 68 kDa increased in abundance from G1-enriched to G2-enriched cell extracts (Figure 2.6C, p.61). Preincubation of the antibody with the bacterially expressed GpCYC1 N-terminus specifically reduced the level of reaction with the 68 kDa band, while affinity purification of the antibody using the bacterially expressed protein transferred to nitrocellulose after SDS-PAGE reduced the level of reaction with all bands other than that at 68 kDa. We conclude from this experiment that GpCyc1 encodes a protein of ~68 kDa that accumulates to higher levels in cells prior to mitosis compared to recently divided cells. Thus, our sequence has the characteristic properties expected for a mitotic cyclin.

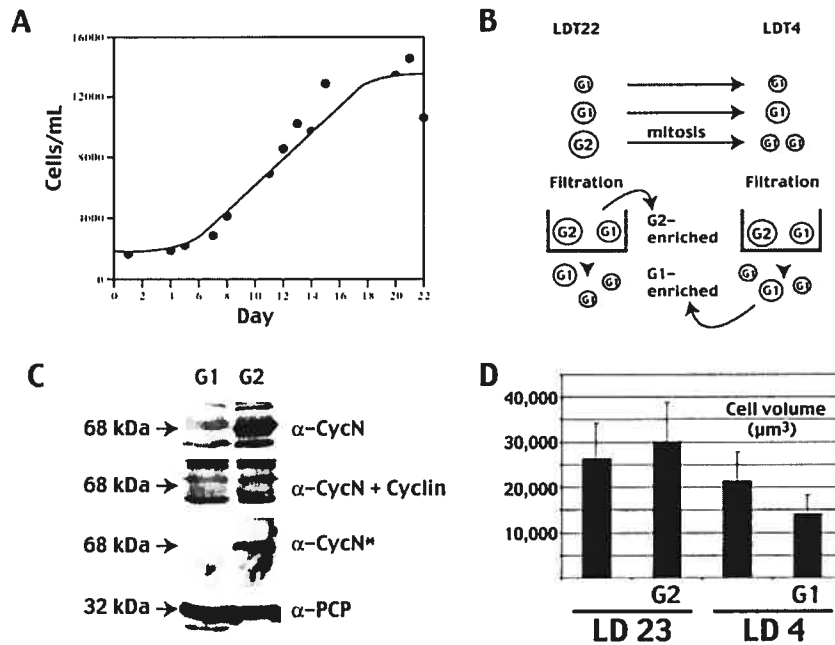


Figure 2.6 *Gonyaulax* cyclin is more abundant in G2 cells.

(A) Cell concentration measured daily over a three-week interval shows a roughly five day doubling time. (B) Scheme of filter-enrichment for G2-phase cells uses cells harvested prior to mitosis and retained by filtration, while filter-enrichment for G1-phase cells uses cells harvested following mitosis that pass through the filter. (C) Western blot of *Gonyaulax* extracts enriched for G1 or G2-phase cells probed with an antibody raised against the N-terminal region of the *Gonyaulax* cyclin (α -CycN), the same antibody preincubated with bacterially-produced cyclin (α -CycN + cyclin), the same antibody affinity purified on nitrocellulose membranes (α -CycN*) or α -PCP as a control for protein loading. All lanes had similar amounts of protein as judged by Ponceau red staining. (D) Cell volumes were calculated from measurements of cell area on over 100 cells in random microscope fields using cell samples taken from LD 23, either enriched for G2 cells or not, and from LD 4, either enriched for G1 cells or not.

2.5 Discussion

The purpose of the present study was to isolate a dinoflagellate cyclin and to determine if it possessed any distinguishing features that might be related to the unusual nuclear features of dinoflagellates. To this end, we screened a dinoflagellate cDNA library for cDNAs able to functionally complement yeast harboring mutations in either G1 phase or M phase cyclins. Although screens for mitotic cyclins were not successful, our screens for functional complementation of G1 cyclins produced a single cyclin sequence. Roughly one cyclin clone was recovered for every 50,000 clones screened, but it is important to recognize that this may not necessarily reflect cyclin clone abundance. Indeed, this number probably underestimates the total number of clones since our expression vector begins translation of the inserted sequence from its first AUG. Other cyclin genes could be present and yet might not be selected by the screen if, for example, they are not long enough to reach the authentic initiation codon and do not have an AUG in-frame. Our Northern blots showing two distinct size classes of mRNA hybridizing to the full length cyclin cDNA suggests that at least one additional cyclin not recovered by our screen may indeed be present.

The second group of sequences able to rescue the mutant cyclin phenotype was recovered from our screen with a much lower frequency (less than 1 clone per million screened). This clone does not share any sequence similarity with known cyclins BLAST searches. Instead, significant sequence identity was observed only with proteins of unknown function in prokaryotes that contain a SpoIIIAA (ATP-binding) domain (an E -value of $4 \times e^{-20}$) and *Arabidopsis* protein with a putative ATPase activity. It should be noted that other non-cyclin proteins such as RINGO

(Karaiskou, Perez et al. 2001) have been shown to activate CDKs, presumably because of a three-dimensional structure similar to the cyclin fold. We will attempt to address the function of these clones using two-hybrid assays to look for interactions with an authentic yeast CDK as well as by examining the phenotype of homozygous *Arabidopsis* mutants whose copy of the gene has been inactivated by a T-element insertion. For the present work, we have concentrated our efforts on the sequence clearly identified as a cyclin by sequence homology.

With respect to the sequence of the dinoflagellate cyclin, its N-terminal cyclin domain shares ~ 30 % sequence similarity with mitotic cyclins from other organisms (Table 2, p.56). Clearly, both sequence analysis and the presence of a degradation box place our sequence among the mitotic cyclins. Our sequence shares 54 % amino acid sequence identity in the N-terminal cyclin domain with the sequence AAB92250, reported to be from the dinoflagellate *Alexandrium*. However, the full sequence corresponding to this fragment was not reported, and more recently, a cyclin gene fragment (CK432882) was found in an *Alexandrium* EST project whose 79 C-terminal amino acids shared 70 % sequence identity at the amino acid level with GpCyc1. This level of sequence homology is consistent with the high levels of sequence identity found in members of the plants, animals, and fungi (Table 2, p.56). It is not possible to determine the degree of similarity between the two reported *Alexandrium* sequences as they correspond to different regions of the mature protein.

The phylogenetic analysis of GpCYC1 was expected to place the dinoflagellates next to the apicomplexans and ciliates, consistent with the molecular phylogeny of multiple protein and rRNA sequences (Baldauf, Roger et al. 2000; Van de Peer, Baldauf et al. 2000). However, the only available Apicomplexan cyclin containing two cyclin domains shares very limited sequence

similarity with our *Gonyaulax* sequence (Merckx, Le Roch et al. 2003) (10 % sequence identity at the amino acid level). This low degree of similarity presumably reflects the unusual nature of the apicomplexan sequences, which also share little homology with cyclins from other organisms (7-12 % sequence identity). It must be noted that a relationship with *Paramecium* is not excluded by our data, since the cyclin domains contain too many conserved residues to have much discriminative power. *Paramecium*, as a representative of the ciliates, would have been expected to be the next closest relative to the dinoflagellates after the Apicomplexans. It is clear, however, that there is strong bootstrap support for the clade representing plant and animal cyclins, and that the GpCYC1 does not form a part of this group. Our sequence is thus consistent with established relationships given the limited number of informative characters in the sequence used.

It is also important to note that the unusual nuclear architecture of the dinoflagellates has not resulted in highly atypical cyclin sequences, as found in the widely divergent *Plasmodium* sequence for example. It is thus reasonable to expect the CDK sequences might possibly also display similar phylogeny. If so, then our phylogenetic analyses impart an important new direction in our application of PCR based strategies to isolate dinoflagellate CDKs. Our previous work in this regard, to date unsuccessful, has been based on similarity with yeast homologs of the cell cycle machinery. This phylogenetic analysis now suggests that either plant or animal sequences should instead be employed as a basis for the selection of conserved regions. It is interesting, in this regard, that immunological studies using antibodies directed against heterologous cyclins (see below) give results more closely approximating those described here when antibodies directed against clam cyclins rather than yeast cyclins are used.

The screening protocols that were tested in the present study included both a screen for mitotic cyclins (the Clb1234) and the G1 cyclins (Cln123). The screen for mitotic cyclins was unsuccessful, and furthermore, even when the mitotic cyclins isolated from the Cln123 screen were directly tested in the Clb1234 mutant, no functional rescue was observed. The Clb mutations appear quite complex phenotypically, and it has been previously shown that both Clb1 and Clb3 are required to complement a mutation in Clb2 (Fitch, Dahmann et al. 1992). Perhaps our *Gonyaulax* cyclin alone is unable to substitute for the lack of the four Clb genes. In contrast, the Cln123 mutant appears more amenable to functional complementation. Indeed, this mutation has been previously used to isolate various cyclins (including mitotic cyclins) from human (Lew, Dulic et al. 1991) and *Arabidopsis* libraries (Day, Reddy et al. 1996).

The observation that our N-terminal antibody recognizes a protein whose abundance changes over the course of the cell cycle is different from a series of studies in *C. cohnii* and *K. brevis* using a polyclonal antibody raised against the cdc13 gene product of *S. pombe*. Here, the immunoreactive cyclins were observed to have a molecular weight of 56 kDa and to be present at all times over the cell cycle (Barbier, Geraud et al. 1998; Barbier, Leighfield et al. 2003). This molecular weight is lower than that seen in our analyses, but it must be noted that the fission yeast cyclin domains share only 30 % sequence identity with our sequence over the region encompassing the two cyclin domains. Another series of studies with the same organism used monoclonal antibodies directed against a 36 amino acid stretch in the cyclin domain of sea urchin cyclin B. In these experiments, the antibody reacted with three bands at 97, 66 and 46 kDa (Yeung, New et al. 2000). The bands at 97 and 66 were low in mitosis and high in G2, as we find with our antibody, and the band at 66 kDa is similar in molecular weight to that seen with

our antibody. The peptide used to generate this commercial antibody shares 58% sequence identity with GpCYC1, although the degree of similarity between *Gonyaulax* and *C. cohnii* cyclins is not yet known. We raised our antibody to the N-terminal domain of the protein deliberately, reasoning that the lack of sequence homology to any sequence in GenBank would render it unlikely to cross-react with any other proteins. Antibodies raised against a conserved cyclin domain, on the other hand, might react with a number of different cyclins each having a different distribution over the cell cycle. Indeed, if other cyclins were present in the dinoflagellates, an antibody recognizing several cyclins might make cell cycle variations in a mitotic cyclin difficult to detect.

The cyclin protein is not readily detectable by standard protein stains after SDS-PAGE, suggesting that the cyclin is not as abundant as the proteins LBP (~1% total protein in night phase cells) or PCP (up to 5% total protein). It is thus a little surprising to find that the number of cyclin gene copies is similar to the ~5000 copies found for PCP, as a part of the rationale previously invoked to account for the large number of gene copies was protein abundance. This suggests instead that numerous gene copies are a more fundamental feature of nuclear architecture in *Gonyaulax*. This unusual gene structure may be related to the unusual components of the transcriptional machinery identified in the dinoflagellates (Guillebault, Sasorith et al. 2002) or the lack of recognizable motifs for transcription factor binding in the putative promoters of the LBP (Lee, Mittag et al. 1993), PCP (Le, Markovic et al. 1997) or luciferase (Li and Hastings 1998) genes. A definite examination of the transcriptional activity of these putative promoters must await a reproducible transformation system so that their roles can be assessed *in vivo*. However, it must be noted that our Northern blot analyses suggest that two distinct

size of transcript are present. Therefore, it is possible that the cyclin sequence reported here may constitute only half the ~5000 gene copies measured.

We currently have no data concerning the subcellular location of our cyclin. However, our sequence has no recognizable nuclear localization sequence, and is thus unlikely to enter the nucleus unless accompanied by another protein that is able to promote nuclear entry. In agreement with this, cyclin B is not normally able to enter the nucleus in animal cells, and will not unless an NLS is added (Moore, Kirk et al. 2003). The recent finding that the 56 kDa antigen reacting with the anti-cdc13 is located in the nucleolus of *K. brevis* is thus puzzling (Barbier, Leighfield et al. 2003). Possibly this antibody recognizes a different cyclin in the dinoflagellates. The cell cycle in dinoflagellates is of considerable interest because of the potential impact on human health of the massive summer blooms of toxic species (Van Dolah 2000), but molecular studies have been hampered by the lack of authentic cell cycle regulators.

The cell cycle is also of particular interest in *Gonyaulax* because of the delicate interplay between the cell cycle and the circadian (daily) clock. In this organism, mitosis always occurs just after dawn even though the cell cycle can last several days. Thus a window of opportunity opens at dawn for cells of sufficient size to enter M phase, and mitosis is said to be “gated” by the circadian clock. The mechanism for this is not known in dinoflagellates, although in regenerating liver cells, activation of cdc2 kinase activity correlates with a decrease in expression of *wee1* RNA and protein (Matsuo, Yamaguchi et al. 2003). The transcription of the *wee1* kinase, whose activity results in inactivation of the kinase/cyclin complex, is inhibited by the oscillating activity of the clock components CLOCK/BMAL. Furthermore, the presence of the inhibitory phosphate on Tyr15 of cdc2 can be directly measured and is circadian in regenerating liver. Thus in liver cells, the

circadian window of opportunity opens during decreased levels of the *wee1* kinase, an inhibitor of *cdc2* kinase activity. Therefore, isolation of the regulatory elements of dinoflagellate cell cycle regulation is a prerequisite to our long-term goal of understanding the impact of the circadian clock on cell cycle control in dinoflagellates.

2.6 Acknowledgements

We thank Drs. P. Belhumeur and M. Raymond for technical advice and yeast vectors, Drs. S. Dorion and J. Rivoal for assistance with the antibody production and purification, and M. O'Brien for advice on cDNA synthesis and RNA purification. We gratefully acknowledge the financial support of the National Science and Engineering Research Council of Canada.

3 Publication #2 : A Dinoflagellate AAA Family Member Rescues a Conditional Yeast G1/S Phase Cyclin Mutant through Increased *CLB5* Accumulation

Thierry Bertomeu and David Morse

Accepté chez Protist, sous presse en juillet 2007

Toutes les procédures expérimentales furent effectuées par moi et cet article a été écrit conjointement avec D.M.

3.1 Abstract

An AAA protein from the dinoflagellate *Gonyaulax polyedra* (GpAAA) with the unusual ability to rescue the phenotype of a yeast mutant lacking G1/S phase cyclins (*cln1cln2cln3*) has been isolated and the mechanism of rescue was characterized. We find that GpAAA is not a cyclin and has no similarity to any known cell cycle regulators. Instead, GpAAA forms a novel and strongly supported clade with bacterial spoIIIAA proteins and an *Arabidopsis* gene of unknown function. Since dinoflagellates cannot be transformed, we took advantage of the powerful genetic tools available for yeast. We find that rescue of the *cln1cln2cln3* phenotype does not involve an effect on the CDK-inhibitor (CKI) Sic1p, as GpAAA does not alter the sensitivity to an inducible *SIC1*. Instead, Northern blot analyses show that GpAAA expression increases levels of *CLB5*, in agreement with the observation that GpAAA is unable to rescue the quadruple mutant *cln1cln2cln3clb5*. We propose that the increased transcription of *CLB5* may be due to a protein remodeling function of GpAAA alleviating inhibition of the transcription factor SBF. Thus, although no known equivalents to the yeast SBF have been documented in dinoflagellates, we conclude that dinoflagellates could indeed utilize GpAAA as a cell cycle regulator.

3.2 Introduction

Given the wealth of knowledge on control of cell cycle in mammalian cells and model eukaryotes such as yeast, it is surprising that almost nothing is known about control of the cell cycle in dinoflagellates. This is unfortunate, as dinoflagellates are major contributors to the phytoplankton in the oceans (Taylor and Pollinger 1987), and more importantly, rampant cell division can result in

large blooms, termed red tides, that can have a serious impact on the environment and public health (Friedman and Levin 2005). Furthermore, the key mechanisms regulating the cell cycle are also of interest in order to understand how they have been modified to accommodate the characteristic permanently condensed chromosomes of dinoflagellates and the fact that the nuclear membrane remains intact through mitosis while having a cytoplasmic mitotic spindle (Moreno Diaz de la Espina, Alverca et al. 2005). Unfortunately, the study of dinoflagellate biochemistry is hampered by an inability to exploit forward and reverse genetic tools, so we have instead chosen to analyze the function of dinoflagellate genes that affect progression of the cell cycle in yeast.

To facilitate interpretation of our analyses, a brief review of the yeast cell cycle is required. As for other eukaryotes, the cell cycle of *Saccharomyces cerevisiae* (budding yeast) is regulated by activation of the cyclin-dependent kinase Cdc28p (also termed CDK1) (Morgan 1997). This CDK is involved in regulating passage through both the G1/S phase boundary and the G2/M phase boundary. The passage between each of the boundaries requires CDK activation through binding to the regulatory cyclins that are expressed at the appropriate times to allow this passage. Once activated, CDKs phosphorylate a range of substrates whose phosphorylation allows cells to initiate either DNA replication (S phase) or mitosis (M phase), and the substrate specificity is dictated, at least in part, by the cyclin subunit bound to the CDK (Loog and Morgan 2005). Three G1 cyclins, called Cln1, Cln2 and Cln3 are involved in transitions across the G1/S-phase boundary (START) (Hadwiger, Wittenberg et al. 1989), with the *CLN3* gene acting upstream from *CLN1* and *CLN2* (Tyers, Tokiwa et al. 1993). Budding yeast also contains six B-type cyclins, 2 involved in DNA replication (*CLB5* and *CLB6*) (Toone, Aerne et al.

1997), 2 in spindle morphogenesis (*CLB3* and *CLB4*) (Richardson, Lew et al. 1992) and 2 in mitosis (*CLB1* and *CLB2*) (Surana, Robitsch et al. 1991).

There are many factors that influence CDK activity, in keeping with the primordial role of this enzyme in ensuring an orderly progression through the cell cycle (Mendenhall and Hodge 1998). In addition to the activatory interaction with cyclins, there are also inhibitory interactions with CDK inhibitors (CKIs). One example is Sic1p, which binds and inactivates Clb/Cdc28 (Schwob, Bohm et al. 1994). Sic1p is normally inactivated by Cln/Cdc28 phosphorylation allowing the cell to initiate DNA replication. Furthermore, overlaid on the regulation conferred by protein-protein interactions are post-translational modifications that affect the conformation and activity of the kinase subunit. These modifications include an activatory phosphorylation of a conserved residue in the T-loop of the CDK (Lim, Loy et al. 1996), and the inhibitory phosphorylation of conserved residues in the ATP-binding pocket whose functional significance is clear in fission yeast (Enoch and Nurse 1990) yet less so in budding yeast, despite changes through the cell cycle (Amon, Surana et al. 1992).

Interestingly, recent studies have described non-cyclin proteins able to bind and activate some CDKs. In neurons, for example, CDK5 can be activated by p35 (Lew, Huang et al. 1994; Tsai, Delalle et al. 1994), although the contribution of p35 activation of CDK to regulation of the cell cycle progression is not yet clear (Dhavan and Tsai 2001). In addition, members of the Ringo/Speedy family have also been shown to bind and activate CDKs (Ferby, Blazquez et al. 1999; Lenormand, Dellinger et al. 1999). The Ringo/Speedy proteins appear to play an important role in regulation of the meiotic cycle in *Xenopus* oocytes (Ferby, Blazquez et al. 1999). These proteins are only marginally similar to the cyclin consensus, and the mechanism whereby they activate CDKs remains unclear.

The partial redundancy of the three yeast *CLN* genes has been exploited for the development of a yeast strain (*cln1cln2cln3*), which contains only one G1/S-phase cyclin (*CLN3*), placed under control of an inducible galactose-regulated promoter. Such a strain has been used to successfully isolate cyclin homologs from a number of different organisms by functional complementation (Koff, Cross et al. 1991; Lahue, Smith et al. 1991; Leopold and O'Farrell 1991; Lew, Dulic et al. 1991; Soni, Carmichael et al. 1995). In this technique, libraries are screened for heterologous genes able to overcome a requirement for an endogenous *CLN* in cells grown in the presence of glucose. The isolation of non-cyclin sequences through screening has been reported only once, and the *Drosophila* Cdc28p homolog that was isolated was suggested to have a *CLN*-independent function in yeast (Leopold and O'Farrell 1991). Interestingly, yeast lacking Sic1p will grow even when none of the three *CLN* genes is expressed, indicating that this CKI is essential for imposing the requirement for G1 cyclins at START (Tyers 1996).

The molecular events occurring as yeast cells pass START involve substantial changes in the pattern of gene transcription (Cho, Campbell et al. 1998; Spellman, Sherlock et al. 1998). These changes result from activation of two transcription factors, termed MBF and SBF, each of which recognizes different binding sites in the promoters of the regulated genes (Iyer, Horak et al. 2001). Curiously, these transcription factors are not directly substrates of Cln/Cdc28 (Wijnen, Landman et al. 2002). Instead, the causal link between transcription factor activation and CDK activation may involve phosphorylation and inactivation of a repressor, such as the Whi5 repressor of SBF (Costanzo, Nishikawa et al. 2004).

The findings reported here are a part of an ongoing program to isolate regulators of the dinoflagellate cell cycle by functional complementation (Bertomeu and Morse 2004). In this study we have characterized a dinoflagellate AAA family

member that was able to complement a G1 cyclin mutant *cln1cln2cln3* (Bertomeu and Morse 2004). This protein, termed GpAAA, lacks any homology to known cyclins. In general, members of the AAA family of ATPases are ubiquitous proteins that exploit ATP hydrolysis for degrading or inducing conformational changes in a wide range of protein substrates (Sauer, Bolon et al. 2004; Hanson and Whiteheart 2005). Our analysis of the mechanism of phenotypic rescue by GpAAA is consistent with this, as our data point to a role in alleviating repression of SBF activity thus allowing *CLB5* transcription and progression through the yeast cell cycle. We advance the intriguing possibility that a similar role might be played by GpAAA within the dinoflagellates.

3.3 Results

3.3.1 A *Gonyaulax* AAA protein rescues the yeast *cln1cln2cln3* mutant phenotype

The yeast triple mutant *cln1cln2cln3* carries a mutation in all three G1/S phase cyclins, and grows in the presence of galactose due to induction of an additional *CLN3* gene under control of an inducible *GAL* promoter. This strain was transformed with a *Gonyaulax* cDNA library in a yeast expression vector, and roughly 6×10^6 clones (1.5-fold coverage of the library) were screened in the presence of glucose to inhibit normal growth. The reversion frequency of this strain on selective glucose plates is less than 10^{-6} (Xiong, Connolly et al. 1991). The screen yielded 136 positive clones that were placed into one of two families of identical sequences by restriction enzyme analysis. One group, comprising 131 clones, was found to encode an authentic dinoflagellate cyclin (LpCyc1) by sequence similarity and functional analysis (Bertomeu and Morse 2004). However, the smaller second family (the remaining 5 clones) had no sequence similarity to

cyclins, or indeed to any known cell cycle regulators. Sequencing revealed that the five clones isolated represented two different lengths of an otherwise identical sequence, two of 2 kb (*Cyc17* and *25*) and three of 1.5 kb (*Cyc31*, *35* and *110*). Clones of both lengths allowed proliferation of *cln1cln2cln3* (Figure 3.1A, p.77) and neither were able to rescue *clb1clb2clb3clb4* (Figure 3.1A, p.77) as previously found for LpCyc1 (Bertomeu and Morse 2004). The low frequency of recovery of these clones suggests they are of low abundance, and indeed, Northern blots of poly(A)-enriched *Gonyaulax* RNA using *Cyc17* sequence as a probe did not show detectable levels of the transcript (data not shown). The longest clone recovered is ~65% GC-rich, similar to all other genes isolated from this organism.

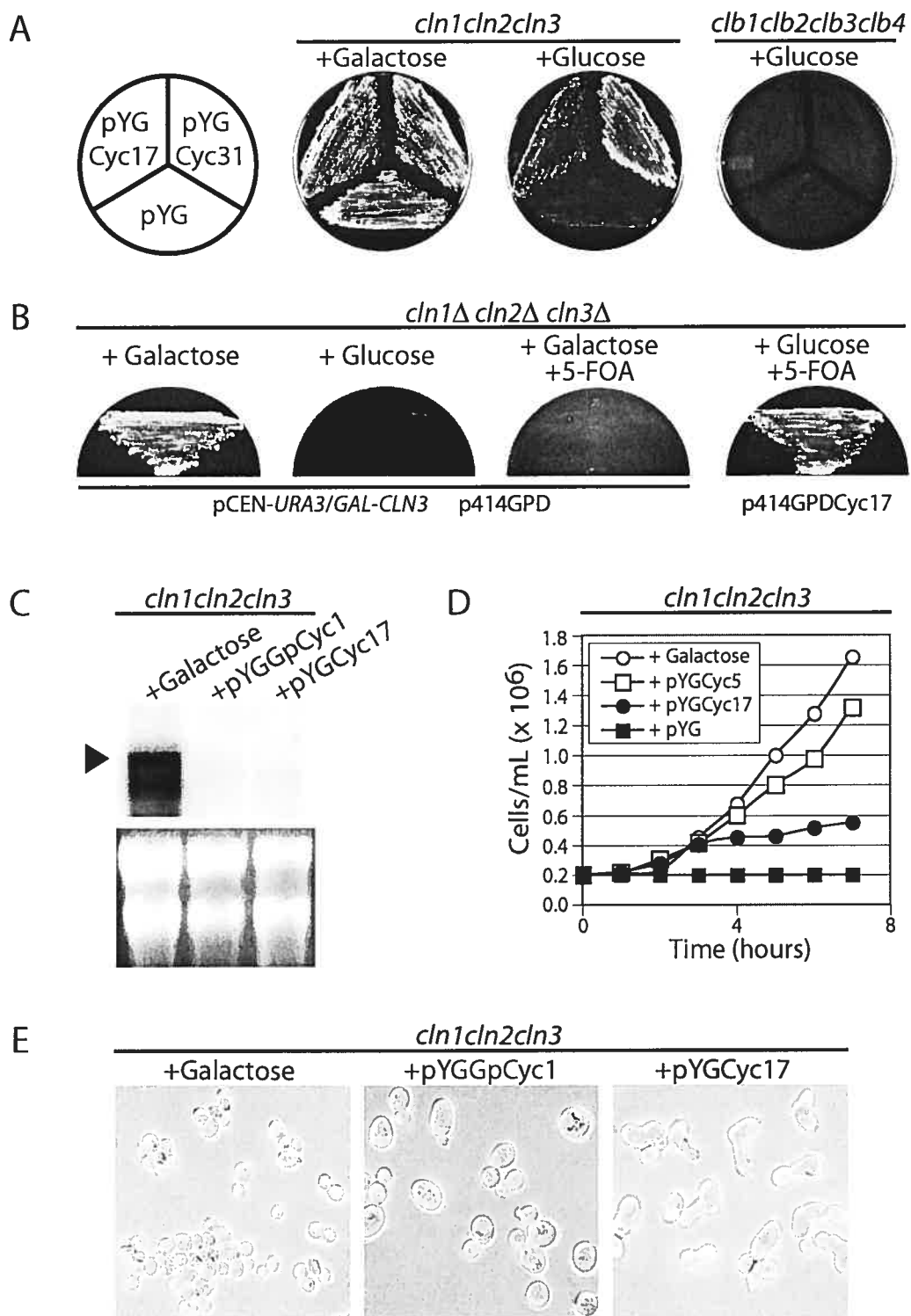


Figure 3.1 Partial rescue of *cln1cln2cln3* mutant phenotype by a dinoflagellate cDNA.

(A) The yeast mutant *cln1::HIS3 cln2::TRP1 cln3::URA3-GAL-CLN3* normally requires galactose for growth (left panel), although in the presence of glucose, dinoflagellate cDNAs *Cyc17* and *Cyc31* in yeast expression vector pYG can substitute for the lack of *CLN3* expression (middle panel). Growth of *clb1::URA3 clb2::LEU2 clb3::TRP1 clb4::HIS2 GAL-CLB1-LEU2* is not rescued by either cDNA (right panel). (B) The yeast mutant *cln1Δ cln2Δ cln3Δ pCEN-URA3/GAL-CLN3* does not grow on Glucose medium or on Galactose medium supplemented with 5-FOA. Transformation with p414GPDCyc17, followed by growth for 2 days in liquid medium allowing for loss of *pCEN-URA3/GAL-CLN3*, result in yeast able to grow on Glucose supplemented with 5-FOA, demonstrating rescue in the complete absence of *CLN3*. (C) Northern blot using *CLN3* as a probe on 5 μg total RNA obtained from *cln1cln2cln3* grown either with galactose (left lane), or with glucose after transformation with the authentic dinoflagellate cyclin pYGLpCyc1 (middle lane) or pYGCyc17 (right lane). (D) The *cln1cln2cln3* mutant transformed with pYGCyc17 (closed circles) grows more slowly in glucose than does *cln1cln2cln3* cells transformed with pYGLpCyc1 (open squares), and more slowly than *cln1cln2cln3* cells grown in galactose (open circles). (E) *cln1cln2cln3* cells grown in glucose after transformation with pYGCyc17 (right panel) have an unusual extended bud phenotype not observed when cell express authentic cyclins (left and middle panels). All photographs are at the same scale.

To ensure that the rescue of *cln1cln2cln3* by *Cyc17* was not due to spurious activation of *CLN3* transcription, we transformed a *cln1Δ cln2Δ cln3Δ* bearing a *URA3* plasmid expressing *CLN3* from a *GAL* promoter, with the *Cyc17* sequence subcloned into a plasmid bearing the *TRP* marker (p414GPDCyc17). Transformants were grown for two days in liquid medium containing uracil but lacking tryptophan to allow the pCEN-*URA3/GAL-CLN3* to be lost, and were then plated onto medium containing 5-fluoroorotic acid (5-FOA). 5-FOA is toxic for yeast bearing the *URA3* marker, so cell growth (Figure 3.1B, p.77) demonstrates that *Cyc17* acts independently of any *CLN* gene. This is in agreement with Northern analysis using *CLN3* as a probe showing no expression of *CLN3* in the *cln1cln2cln3* strain bearing pYGCyc17 (Figure 3.1C, p.77).

Curiously, while permitting growth of the *cln1cln2cln3* mutant yeast under restrictive conditions, a complete rescue of the wild type phenotype was not obtained. For example, cells transformed with *Cyc17* have a markedly lower growth rate than do cells rescued by expression of *Cln3* or the authentic dinoflagellate cyclin *LpCyc1* (Figure 3.1D, p.77). We also observe that the transformed cells have an unusual and striking morphology. Mother cells are typically more elongated than the usually rounded or slightly elliptical form. Furthermore, while normal buds of haploid cells are also elliptical with the same general shape as the mother cell, buds in cells transformed with *Cyc17* are elongated and often bulbous at their extremity (Figure 3.1E, p.77). This particular phenotype has no equivalent in the yeast mutant database (<http://scmd.gi.k.u-tokyo.ac.jp/datamine/>) and is clearly distinct from the slightly larger but otherwise normal cells found after rescue of the mutant phenotype with the cyclin *LpCyc1* (Figure 3.1E, p.77). The longest clone recovered is ~65% GC-rich, similar to all other genes isolated from this organism.

The schematic view of the longest cDNA sequence presented here (Figure 3.2A, p.81) shows the 5' end of the two lengths of clones isolated and the position of the translational start site (ATG) immediately downstream from the end of these clones. Both of these ATG codons are in frame, and have an appropriate Kozak context (Kozak 1989). They presumably represent the start of translation since the cloning vector itself does not contain an initiation codon after the promoter. Database searches using BLASTP (Altschul, Madden et al. 1997) revealed that the N-terminal end of the protein had no similarity to any known protein. Curiously, a block of ~75 amino acids was found repeated three times within this region (Figure 3.2A-B, p.81). In contrast to the N-terminal end, a 230 residue region in the C-terminal end of the predicted protein had significant sequence identity with many hypothetical and uncharacterized ATPases from bacteria (E value $5e^{-25}$) and gene *At1g73170* from *Arabidopsis thaliana* (E value $4e^{-20}$), a higher plant. This region shares ~32% amino acid sequence identity (~52% sequence similarity) with the SpoIIIAA domain from bacteria. The function of this domain is still unknown but it is found in the first gene of operon SpoIII from many bacteria in which a defect stops sporulation at stage 3. We thus tested if either of these two domains alone could rescue *cln1cln2cln3*. A convenient Bcl1 restriction enzyme site (Figure 3.2A, p.81) was exploited to clone the N and C-terminal regions separately into the expression vector. Neither of the two regions alone was able to rescue the *cln1cln2cln3* phenotype (Figure 3.2C, p.81). We also note that, since the shorter form (*Cyc31*) can also rescue, two of the three repeats in addition to the C terminal end are sufficient for activity.

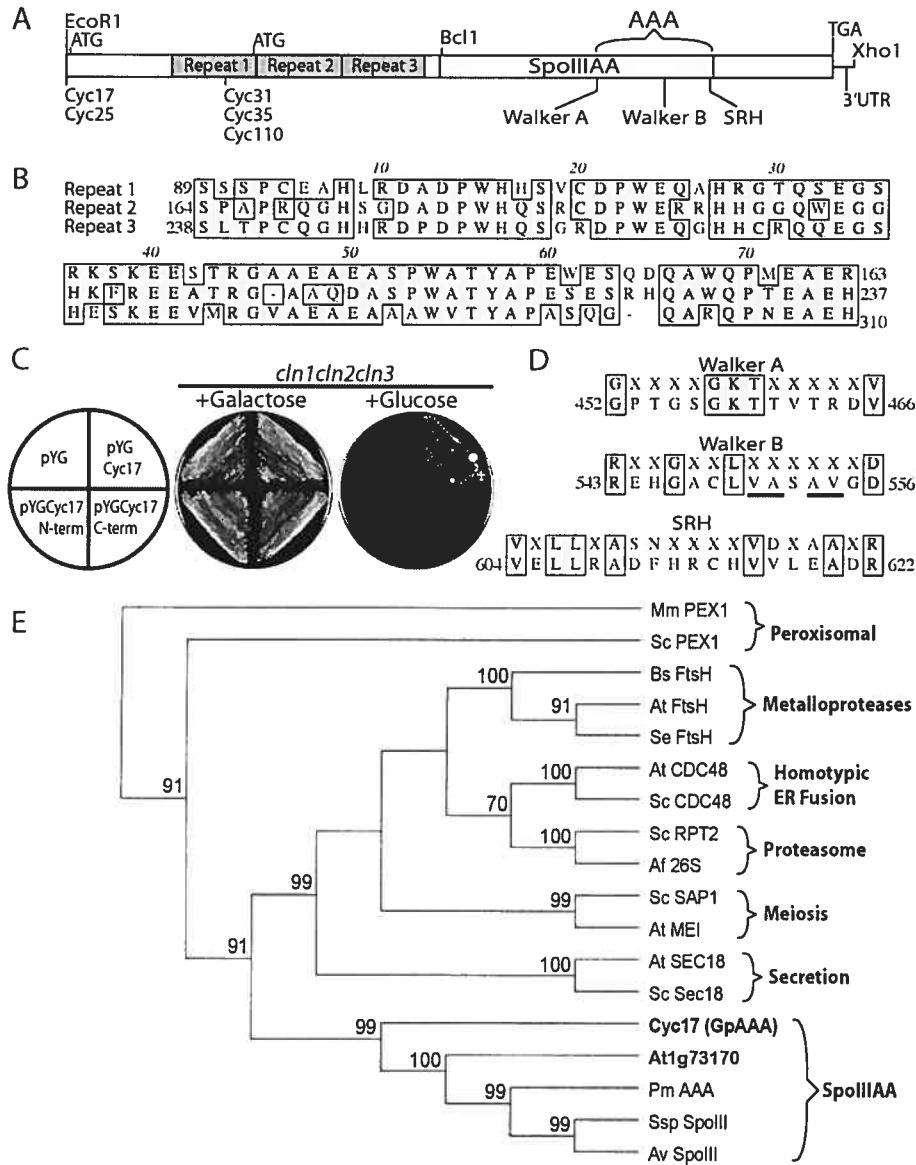


Figure 3.2 *Cyc17* encodes an AAA protein.

A schematic view of the longest cDNA sequence showing the position of the 5' ends of each of the clones isolated. The position of the nearest downstream start codon (ATG) for each of the two different clone lengths is shown and is predicted to produce a protein of either 656 (long clone) or 521 (short clone) amino acids. The cloning sites surrounding the insert (a 5' EcoRI and a 3' XhoI) as well as an internal BclI site used for subcloning are also shown. The positions of the three-repeat domain (89-310), the SpoIIIAA domain (326-556), and the signature AAA domain motifs and the predicted 3' untranslated region (3' UTR) are illustrated. (B) Sequence alignment of the three N-terminal repeats domains. (C) Growth of *cln1cln2cln3* on glucose-containing plates is not rescued by either the N-terminal (EcoRI-BclI fragment) or the C-terminal (BclI-XhoI) domains alone. (D) Sequence comparisons between the Walker A, Walker B and SRH consensus motifs and the corresponding *Cyc17* sequence. Identical amino acids are boxed and characteristic hydrophobic amino acids are underlined. (E) Neighbor joining phylogenetic reconstructions of selected AAA domains group *Cyc17* (*GpAAA*) and an *Arabidopsis* sequence of unknown function (At1g73170) in a clade distinct from previously described AAA families.

The second half of the SpolIIAA domain contains two conserved motifs (Walker A and B) that form a ATP/GTP binding site (a P-loop) (Walker, Saraste et al. 1982), as well as a SRH motif (Second region of homology) (Figure 3.2A-D, p.81) (Patel and Latterich 1998). These three motifs are found in members of the AAA (ATPases Associated with different cellular Activities) superfamily whose members include metalloproteases, components of the 26S proteasome, and proteins involved in membrane trafficking or organelle biogenesis. Interestingly, these different functions are reflected in primary sequence homologies and can thus be recovered using molecular phylogenetic analysis (Frohlich 2001). Using only a small subset of sequences to represent the known different AAA family members, as well as the Cyc17, At1g73170 and various SpolIIAA-containing bacterial sequences, we recover the same general functional classes documented previously (Frohlich 2001) with high bootstrap support (Figure 3.2E, p.81). This phylogeny clusters the Cyc17 sequence, together with the SpolIIAA domain-containing proteins, firmly outside the previously recognized AAA groups. This suggests that both Cyc17 and the *Arabidopsis* sequence may constitute members of a new functional class of AAA proteins within the eukaryotic lineage. Taken together, our analyses indicate that the *Gonyaulax* cDNA isolated here is a *bone fide* member of the AAA superfamily and it has therefore been named GpAAA.

3.3.2 The level of Sic1p necessary to inhibit cell growth is not altered by GpAAA

We have considered three possible mechanisms by which GpAAA could allow passage through START in yeast (Figure 3.3, p.84). The first mechanism is suggested by the viability of the quadruple mutant *cln1cln2cln3sic1* (Tyers 1996), as the lack of the CDK inhibitor Sic1p allows activation of the Clb5/Cdc28 complex

and thus enables the mutant to overcome the normal requirement for Cln1, Cln2 and Cln3. To test if GpAAA might act to alleviate the inhibition of Cdc28/Clb5 by Sic1p (Figure 3.3 mechanism 1, p.84), either by inhibiting Sic1p binding to Cdc28p or by promoting Sic1p degradation, we employed a *cln1cln2 GAL1-SIC1* strain that overexpresses this CKI when supplied with galactose. Since this strain contains a *CLN3* gene on a plasmid containing the *URA3* selectable marker, we used plasmid p414GPDGpAAA, which contains the compatible *TRP* selectable marker. GpAAA from this vector was already shown to be active (Figure 3.1B, p.77). We then titrated galactose-induced expression of *SIC1* with glucose. The growth of the *cln1cln2 GAL1-SIC1* on galactose-containing plates is inhibited at low levels of glucose, as expected (Figure 3.4, p.85). More importantly, expression of GpAAA from the strong GPD promoter does not change the amount of glucose required to inhibit the growth of these cells. We conclude that GpAAA does not rescue *cln1cln2cln3* by blocking the CKI activity of Sic1p.

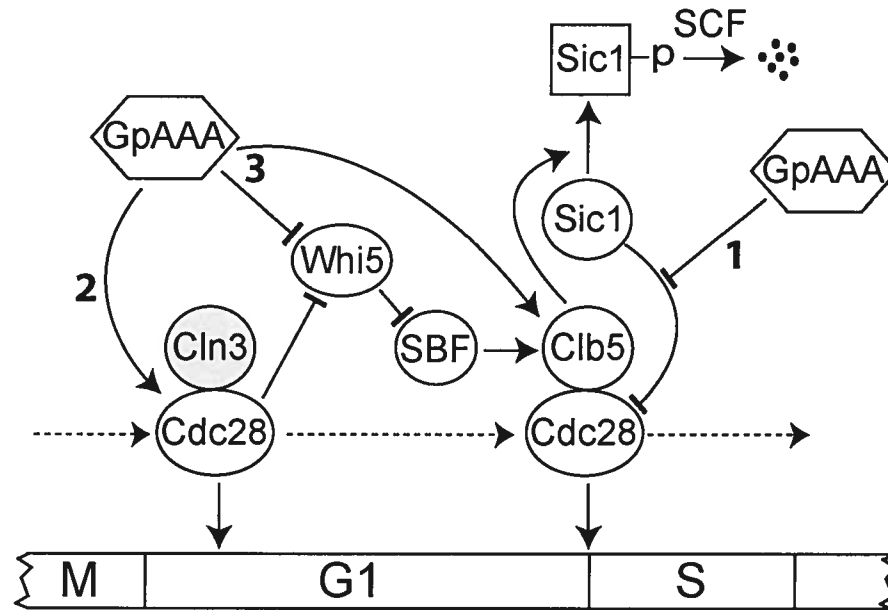


Figure 3.3 Schematic representation of possible mechanisms allowing GpAAA to pass the START checkpoint in the absence of CLN3.

- (1) GpAAA might bind and inactivate the CKI Sic1p or promote Sic1p degradation.
- (2) GpAAA might substitute for CLN3 in activating and targeting Cdc28p to its normal substrates.
- (3) GpAAA might activate *CLB5* transcription, either by direct activation of the *CLB5* transcription factor SBF or by inactivation of the SBF repressor Whi5.

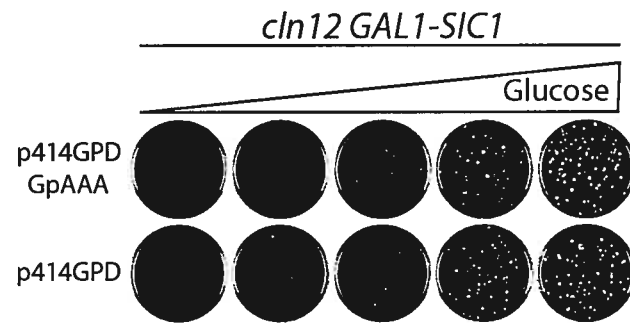


Figure 3.4 GpAAA does not compete with the CKI Sic1p.

Expression of GpAAA does not affect the sensitivity of cell cycle progression to the level of SIC1 induced in *cln12 GAL1-SIC1* cells by varying glucose concentrations. Glucose concentrations are, from left, 0.3, 1, 3, 10 and 30 mM.

3.3.3 GpAAA interacts only weakly with Cdc28p in a two-hybrid assay

To test for a possible interaction between Cdc28p and GpAAA, as demonstrated for other non-cyclin proteins such as RINGO/SPEEDY (Ferby, Blazquez et al. 1999; Lenormand, Dellinger et al. 1999), we asked if GpAAA was able to directly bind Cdc28p itself in a two hybrid assay. An interaction would be required if GpAAA were to activate Cdc28p as if it were a cyclin (Figure 3.3 mechanism 2, p.84). We therefore constructed plasmids producing fusion proteins between the Activation-Domain of Gal4 and GpAAA (pADGpAAA) and between the Binding-Domain of Gal4 and Cdc28p (pBDCdc28) for use in the yeast strain PJ69-4a. This strain carries the *HIS3* and *ADE1* selectable markers under a *GAL* promoter, allowing growth if there is interaction between the two fusion proteins. We observe growth in the absence of histidine but not in the absence of adenine (Figure 3.5A, p.88). Since adenine auxotrophy represents more stringent conditions than histidine auxotrophy (James, Halladay et al. 1996), these results could indicate a weak interaction between Cdc28p and GpAAA. Growth on medium lacking histidine but not on medium lacking adenine has been shown in a two-hybrid assay between Clb5 and Cdc28p (Cross and Jacobson 2000). Thus mechanism 2 cannot be definitely ruled out, although it is important to stress that there is no primary sequence similarity between GpAAA and any known cyclin. Furthermore, the predicted secondary structure has nothing resembling a cyclin-fold (data not shown), in contrast to that proposed to explain the ability of p35 to activate CDK5 (Lew, Huang et al. 1994; Tsai, Delalle et al. 1994).

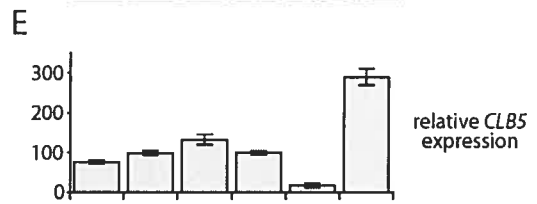
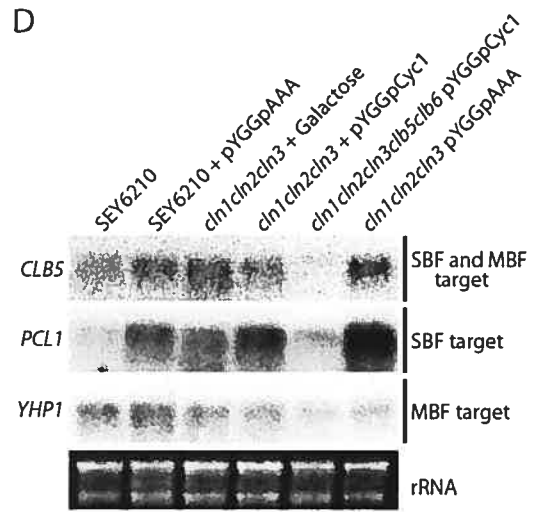
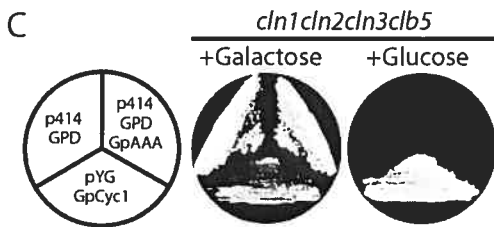
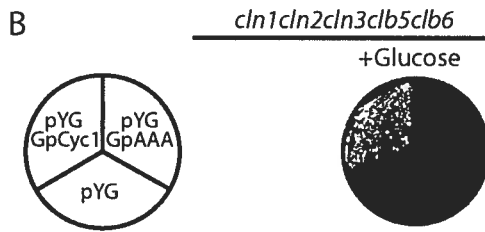


Figure 3.5 GpAAA activates *CLB5* transcription.

(A) Yeast two-hybrid assay with pADGpAAA and pBDCdc28 shows a weak interaction, allowing growth on medium lacking histidine but not on medium lacking adenine. pBDp53 and pADSV40 were used as a positive control, while pBDLaminC and pADSV40 were used as a negative control. Neither pADGpAAA nor pBDCdc28p alone grow on –His plates. (B) pYGGpAAA does not allow growth of *cln1Δ cln2Δ cln3Δ clb5::ARG4 clb6::ADE1 pCEN-URA3/GAL1-CLN1* in restrictive conditions. The authentic cyclin *LpCyc1* was used as a positive control and the empty vector as a negative control. (C) pYGGpAAA does not allow growth of *cln1Δ cln2Δ cln3Δ clb5::ARG4 pCEN-URA3/GAL1-CLN1* in restrictive conditions. (D) Northern blot analysis of 4 μg of poly(A) enriched RNA of yeast strains grown in SC-medium (supplemented with galactose instead of Glucose in the third lane) probed with *CLB5*, *PCL1* or *YHP1*. rRNA remaining in the samples was used as a loading control. (E) PhosphorImager quantification of accumulated *CLB5* RNA levels in panel D.

3.3.4 GpAAA rescues the *cln1cln2cln3* phenotype by increasing *CLB5* transcript levels

A third possibility to explain phenotypic rescue of *cln1cln2cln3* mutants by GpAAA involves activation of *CLB5* expression (Figure 3.3 mechanism 3, p.84). This gene was originally isolated from a screen of *S. cerevisiae* genes able to rescue *cln1cln2cln3* (Epstein and Cross 1992). We therefore tested the ability of GpAAA to rescue the quintuple cyclin mutant *cln1cln2cln3clb5clb6* (Figure 3.5B, p.88) and quadruple mutant *cln1cln2cln3clb5* (Figure 3.5C, p.88). These strains, although rescued by overexpression of cyclin *LpCyc1*, could not be rescued by GpAAA. The inability of GpAAA to rescue the quadruple mutant indicates that *CLB6* alone is insufficient to effect rescue of the *cln1cln2cln3* phenotype. This is in agreement with the observation that *CLB5* and not *CLB6* was recovered from a screen of *S. cerevisiae* genes able to overcome the *cln1cln2cln3* phenotype (Epstein and Cross 1992).

To confirm that the rescue of *cln1cln2cln3* involved *CLB5* transcription, we next tested the effect of GpAAA on expression of different G1/S activated genes. Northern blot analyses (Figure 3.5D, p.88) showed a stronger expression of *CLB5* in *cln1cln2cln3* cells overexpressing *CLN3*, as expected in the presence of Galactose (de Bruin, McDonald et al. 2004), as well as in *LpCyc1* and in cells bearing a GpAAA construct. The size of the faint signal observed within the *CLB5* probe in the *cln1cln2cln3clb5clb6* sample is indicative of hybridization with ribosomal RNA. Since *CLB5* transcription is activated by both SBF and MBF transcription factors (Bean, Siggia et al. 2005), the expression of genes specifically activated by the two factors separately were also tested. The expression pattern of *PCL1*, a gene specifically transcribed at the G1/S transition and activated only by

SBF (Iyer, Horak et al. 2001) mirrors that of *CLB5*, while *YHP1*, another G1/S activated genes that is exclusively an MBF target does not (Bean, Siggia et al. 2005). We conclude from this that GpAAA is likely to rescue the *clin1clin2clin3* mutant phenotype by induction of *CLB5* expression.

3.4 Discussion

We report here the isolation of a dinoflagellate AAA encoding gene GpAAA, which, when expressed in budding yeast, allows passage through the G1/S checkpoint in the absence of G1/S phase cyclins. In a functional complementation screen to rescue growth of the *clin1clin2clin3* mutant yeast, GpAAA clones were isolated five times from 6×10^6 clones, although based on their sequence, only two different clones were actually retrieved. By comparison, a dinoflagellate cyclin was recovered 131 times during the same screen (Bertomeu and Morse 2004). This shows that the GpAAA was poorly represented in the library, possibly due to weak expression in the cells. In agreement with this later idea, Northern blots using the GpAAA cDNA as a probe were unable to detect any expression of the gene. The GpAAA thus appears to be a low abundance mRNA in our dinoflagellate.

The ability of GpAAA to rescue the *clin1clin2clin3* mutant phenotype is remarkable since GpAAA does not share any sequence similarity with any known cyclins. Indeed, previous studies using libraries prepared from other organisms to screen similar mutant yeast recovered only cyclins (Koff, Cross et al. 1991; Lahue, Smith et al. 1991; Leopold and O'Farrell 1991; Lew, Dulic et al. 1991; Soni, Carmichael et al. 1995) with the sole exception of a drosophila Cdc28p homolog that could apparently exhibit basal levels of activity without G1 cyclins (Leopold and O'Farrell 1991). The sequence of GpAAA itself yields no clue as to its function, as the only feature that can be identified is a domain found in AAA proteins. The AAA

proteins have too large a spectrum of activities to provide any solid basis for predicting the function of GpAAA (Hanson and Whiteheart 2005); the only feature common to AAA family members is their ability to use ATP to induce conformational changes in specific target proteins.

To address the mechanism underlying GpAAA action in yeast, a number of different possibilities were evaluated. First, it has been previously shown that Sic1p is an inhibitor of Cdc28-Clb complexes, and that a *cln1cln2cln3sic1* yeast strain grows because Sic1p degradation is an essential function of *CLN* genes (Schneider, Yang et al. 1996; Tyers 1996). However, although members of AAA superfamily are involved in protein degradation (Sauer, Bolon et al. 2004; Hanson and Whiteheart 2005), it is unlikely that GpAAA acts to degrade Sic1 because the inhibition of cell growth during titration of Sic1p expression is unaffected by the presence of GpAAA (Figure 3.4, p.85).

Another possibility was that GpAAA might directly activate the CDK in a CLN-independent manner. Indeed, there are now several examples in the literature where non-cyclin proteins have been observed to activate a CDK. One of these, RINGO, activates both Cdc2 and CDK2, and plays a key role in allowing meiotic G2/M progression in *Xenopus* oocytes, although the mechanism underlying this activation is still unknown (Ferby, Blazquez et al. 1999). A second, SPEEDY, appear to act similarly (Lenormand, Dellinger et al. 1999) and may in fact be related to RINGO. A third, termed p35, has been found to activate Cdk5 in neurons (Lew, Huang et al. 1994; Tsai, Delalle et al. 1994). While the physiological importance of this activation is still unclear, the mechanism may result from a similarity in the three dimensional structure of the protein to a cyclin-fold, the domain that binds and activates CDKs, an idea supported by the similarity in the predicted alpha-helical nature of p35 and cyclins. The observation that GpAAA

interacts with Cdc28p in our two-hybrid assay could potentially support a CDK activation by a non-cyclin protein. However, the predicted secondary structure of GpAAA has no similarity at all to known cyclins (data not shown). Furthermore, while activation of CDK kinase activity by a non-cyclin protein is possible, it is difficult to imagine how CDK activity could then be directed toward the substrates whose phosphorylation is prerequisite for entry into S-phase entry. Lastly, and most importantly, any direct activation of Cdc28p by GpAAA would be expected to be independent of the presence of Clb5, a prediction in direct contrast to the data in Figure 3.5C. These considerations lead us to conclude that a mechanism involving direct activation of Cdc28p by GpAAA is extremely unlikely.

The last possibility tested was that GpAAA might activate *CLB5* transcription in a CDK-independent manner. It was recently reported that activation of the transcription factor SBF may involve Cln3-Cdc28 dependent phosphorylation of a Whi5 repressor subunit, a mechanism conceptually similar to that of the retinoblastoma protein Rb (Costanzo, Nishikawa et al. 2004; de Bruin, McDonald et al. 2004). These new findings explain activation of SBF by Cln3-Cdc28 despite the lack of any evidence for direct phosphorylation of SBF or direct interaction between Cln3-Cdc28 and SBF (Wijnen, Landman et al. 2002). We find that GpAAA expression does indeed augment the level of *CLB5* transcript accumulation to levels above those found in all the other strains tested. The *cln1cln2cln3* rescue is clearly due to *CLB5* transcription activation as GpAAA cannot rescue *cln1cln2cln3clb5* mutant and the *CLB5* expression has already been shown to rescue a *CLN*-deficient yeast. Furthermore, the expression of *PCL1*, a specific target of SBF and not MBF, follows the same pattern as *CLB5*, while the abundance of a MBF-specific gene, *YHP1*, is not significantly greater in yeast expressing GpAAA. It thus seems likely that cells expressing GpAAA have higher

SBF activity without affecting the activity of MBF. Based on the role of AAA proteins in protein remodeling, we propose that this activation may be due to GpAAA-induced remodeling or degradation of Whi5.

The group of AAA proteins to which GpAAA belongs includes bacterial SpoIIIAA proteins as well as an *Arabidopsis* gene. The bacterial proteins are encoded by the first of eight genes in the *spolIIA* operon, and mutants block spore formation at a stage termed engulfment (Jedrzejewski and Huang 2003). Mutants blocked during this stage do not activate the specific sigma factors required to allow the continuing changes in gene expression required for completing the cell differentiation program. Although the function of SpoIIIAA is currently not known, it is an intriguing possibility that SpoIIIAA may help to modulate the changing sigma factor activities in a manner similar to the prokaryotic transcription activator PspF, a AAA protein believed to be involved in restructuring a σ^{54} -RNA polymerase-promoter complex (Rappas, Schumacher et al. 2006). Thus, in bacterial systems there is clear evidence for a role of AAA proteins in regulating gene expression. Does the *Arabidopsis thaliana* At1g73170 have a similar action on transcription? Homozygous *Arabidopsis* mutants have no apparent phenotype and the At1g73170 cDNA does not rescue the yeast *cln1cln2cln3* mutant phenotype (data not shown). However, we note that At1g73170 has significant similarity only with the C-terminal AAA domain, and we further note that both N-terminal and C-terminal moieties of GpAAA are necessary for rescue (Figure 3.2C, p.81). Thus, even if it were to act in regulating transcription, the At1g73170 may have an alternate target not detected in our functional complementation assay. It is tempting to speculate that GpAAA may represent a new class of AAA functionalities involved in regulating transcription in both prokaryotes and eukaryotes. It is important to note in this regard that the yeast AAA protein Sap1p associates with the

transcriptional repressor Sin1p (Liberzon, Shpungin et al. 1996), thus potentially acting to alter gene expression.

To date, the only characterized cell cycle regulator from a dinoflagellate is a cyclin most similar to mitotic cyclins (Bertomeu and Morse 2004). However, a search of the public EST databases revealed that there is at least one sequence with homology to cyclin dependent kinases. Thus, it seems likely that dinoflagellates will use cell cycle regulators similar to those of other eukaryotes. This being the case, it is tempting to speculate that GpAAA might play a role in regulation of the dinoflagellate cell cycle that is similar that reported here in yeast. Unambiguously proving this contention will require tools not currently available, however. For example, there are no other known regulators of the dinoflagellate cell cycle, precluding tests of interactions with GpAAA. More importantly, the lack of transformation systems for dinoflagellates precludes analysis of cell behavior after introduction of a gene in sense or antisense orientations. Clearly, given these limitations, the application of yeast genetics to study of the dinoflagellate cell cycle represents a particularly valuable experimental approach.

3.5 Methods

Construction and screening of a yeast expression library : The construction of a dinoflagellate cDNA library in the yeast expression vector pYG, containing the 2 μ origin of replication and the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GPD) promoter, has been previously described, as has the *cln1cln2cln3* mutant functional complementation protocol which yielded an authentic dinoflagellate cyclin, LpCyc1 (Bertomeu and Morse 2004). The Cyc17/GpAAA sequence described here has been deposited in GenBank with the accession number DQ515200.

Yeast strains, cultures and transformations : Mutant yeast strains used here include (i) strain SBY175 (obtained from Dr. S. Reed, Scripps Research Institute) MAT α *his2 leu2 trp1 ura3 clb1::URA3 clb2::LEU2 clb3::TRP1 clb4::HIS2 GAL-CLB1-LEU2* (called *clb1clb2clb3clb4* in this study) (Richardson, Lew et al. 1992), (ii) strain BF305-15d (obtained from Dr. B. Futcher, Cold Spring Harbor Laboratories) MAT α *his3 leu2 trp1 ura3 cln1::HIS3 cln2::TRP1 cln3::URA3-GAL-CLN3* (called *cln1cln2cln3* in this study) (Xiong, Connolly et al. 1991), (iii) strain 1227-3A (obtained from Dr. F. Cross, Rockefeller University) MAT α *cln1 Δ cln2 Δ cln3 Δ* pCEN-*URA3/GAL-CLN3* (called *cln1 Δ cln2 Δ cln3 Δ* in this study) (iv) strain 1851-1 (Dr. F. Cross) MAT α *cln1 Δ cln2 Δ cln3 Δ GAL1-SIC1* pCEN-*URA3/CLN3* (called *cln1cln2 GAL1-SIC1* in this study) (Cross and Levine 1998), (v) strain 1581-2C (Dr. F. Cross) MAT α *cln1 Δ cln2 Δ cln3 Δ clb5::ARG4 clb6::ADE1* pCEN-*URA3/GAL1-CLN1* (called *cln1cln2cln3clb5clb6* in this study) (Cross and Levine 1998), (vi) strain 1581-6A (Dr. F. Cross) MAT α *cln1 Δ cln2 Δ cln3 Δ clb5::ARG4* pCEN-*URA3/GAL1-CLN1* (called *cln1cln2cln3clb5* in this study); strains from the Cross laboratory are based on the A364A background (Hartwell 1967). Strain SEY6210 (from Dr. P. Belhumeur, Université de Montréal), used as wild-type for this study, MAT α *his3 Δ 200 leu3-3,112 lys2-801 trp1 Δ 901 suc2 Δ 9 ura3-52*, (used as wild-type for this study). Yeast were grown in Synthetic Complete medium (SC) lacking the appropriate auxotrophic nutrients with different amounts of glucose and/or galactose. Yeasts were transformed using a lithium acetate procedure (Gietz and Woods 2002).

Phylogenetic analysis : AAA family sequences were obtained from GenBank using a previously described tree (Frohlich 2001) to define the major families, and aligned using CLUSTALW. Phylogenetic reconstruction was performed using

Neighbor joining with absolute number of differences using MacVector (Accelrys). Bootstrap values for 10000 repetitions are reported for values of more than 70.

Plasmid construction : To produce pYGCyc17 N-term, pYGCyc17 (prepared from New England Biolabs Dam negative *E. coli* strain ER2925) was digested with Bcl1 and Xho1 to remove the second half of *Cyc17* then recircularized by ligation with a dimerized pair of oligonucleotides (5'-GATCTGATTGGGGATCCATT-3' and 5'-TCGAAATGGATCCCCAATCA-3') bearing a new stop codon. To produce pYGCyc17 C-term, pYGCyc17 was digested with EcoR1 and Bcl1 to remove the first half of *Cyc17* then recircularized by ligation with a dimerized pair of oligonucleotides (5'-AATTGCCATGGGACTGGATGAGTT -3' and 5'-GATCAACTCATCCAGTCCCATGGC -3'), bearing a new start codon and the nucleotides necessary to encode the first five amino acids of the SpollIAA domain that were cut with Bcl1. For pADGpAAA construction, pYGCyc17 was digested with EcoR1 and Xho1 to liberate the full length cDNA which was directionally cloned in frame in pAD also digested with EcoR1 and Xho1. For construction of pBDCdc28 *CDC28* was PCR-amplified with Pwo polymerase (5'-CATGAATTCATGAGCGGTGAATTAGCAAATTAC-3' and 5'-TAACTGCAGTTATGATTCTTGGGAAGTAGGGGTG-3') from a plasmid bearing the complete cDNA and after digestion with EcoR1 and Pst1, ligated into EcoR1 and Pst1 digested pBDGal4. The construct p414GPDGpAAA (also called p414GPDcyc17) was prepared by directional cloning of an EcoR1 and Xho1 digestion fragment of pYGCyc17 into p414GPD (Mumberg, Muller et al. 1995), a centromeric vector containing a GPD promoter and a *TRP1* auxotrophic marker. All constructs were confirmed by sequencing.

Two-Hybrid Assays : The yeast strain PJ69-4a (James, Halladay et al. 1996) specifically designed for two-hybrid assays was used for the Gal4-based protein-

interaction experiments. It contains the markers *HIS3* and *ADE1* under a *GAL* promoter. Plasmids pBD-Gal4 and pAD-Gal4 (called pBD and pAD in this study) and pBDLaminC, pBDp53 and pADSV40 are constructs from the HybriZAP two-hybrid system (Stratagene).

Northern Blots : Yeast cultures (200 ml) were grown to an O.D. 600 of 1.0, and the cells pelleted and kept at -80°C until use. Cells were lysed in TRIzol reagent (Invitrogen) using zirconium beads and a Bead Beater and treated according to the manufacturer's recommendations. Poly(A) RNA was enriched using oligo-dT column chromatography, and either 4 µg of poly(A)-enriched RNA or 5 µg total RNA was run on formamide/formaldehyde agarose gels and transferred to positively charged nylon. The blots were hybridized against a radiolabeled probe made against a DNA fragment obtained by PCR on SEY6210 genomic DNA using the yeast Research Genetics flanking primers (YPR120C-FOR and YPR120C-REV for *CLB5*, YAL040C-FOR and YAL040C-REV for *CLN3*, YNL289W-FOR and YNL289W-REV for *PCL1* and YDR451C-FOR and YDR451C-REV for *YHP1*). The membranes were exposed for 1 to 5 days on a Phosphorimager screen and scanned on a Typhoon 9200 (GE Healthcare).

3.6 Acknowledgements

We thank S. Reed, B. Futcher, P. Belhumeur and specially F. Cross for yeast strains and helpful advice. We gratefully acknowledge the financial support of the National Science and Engineering Research Council of Canada.

4 Publication #3 : A dinoflagellate CDK5-like cyclin-dependent kinase

Thierry Bertomeu, Jean Rivoal and David Morse

Accepté chez *Biology of the Cell*, sous presse en juillet 2007

Toutes les procédures expérimentales furent effectuées par moi et cet article a été écrit conjointement par les trois auteurs.

4.1 Abstract

Background information. Mitosis during the dinoflagellate cell cycle is unusual in that the nuclear envelope remains intact and segregation of the permanently condensed chromosomes uses a cytoplasmic mitotic spindle. To examine regulation of the dinoflagellate cell cycle in the context of these unusual nuclear features, it is necessary to isolate and characterize known cell cycle regulators such as CDK (cyclin-dependent kinase).

Results. We report here the characterization of a CDK from the dinoflagellate *Lingulodinium polyedrum*. This CDK reacts with an anti-PSTAIRE antibody and was identified by protein microsequencing after partial purification. The protein microsequence shows homology toward the Pho85/CDK5 clade of CDKs. Neither the amount nor the phosphorylation state changed over the course of the cell cycle, in agreement with results reported for CDK5 family members in other systems.

Conclusions. We conclude we likely isolated a CDK5-like protein. The data reported here support identification of this protein as a CDK5 homolog, and suggest that dinoflagellates may contain several CDK families.

4.2 Introduction

The cell cycle of dinoflagellates is of interest from both health and basic science perspectives. First, many species of dinoflagellates are responsible for causing harmful algal blooms (Wong and Kwok 2005) and a detailed knowledge of the cell cycle of dinoflagellates could lead to better understanding, monitoring and/or preventing this phenomenon. Second, all dinoflagellates show a number of

very unusual cell cycle-related characteristics: they are devoid of histones (Herzog and Soyer 1981), their chromosomes are permanently condensed throughout the cell cycle, their nuclear envelope remains intact during mitosis, and chromosome segregation uses an extra-nuclear spindle that passes through nuclear invaginations and makes indirect contact to the chromosomes attached to the inside of the nuclear membrane (Bhaud, Guillebault et al. 2000). Finally, since mitosis in dinoflagellates is under circadian control, identifying the cell cycle regulators is a necessary prerequisite to uncovering the mechanism by which the circadian clock controls this rhythm.

In eukaryotic cells, transition between the different phases of the cell cycle is tightly controlled by the activity of different CDKs (Sanchez and Dynlacht 2005). The yeast *Saccharomyces cerevisiae* has 5 CDKs, of which only two (Cdc28 and Pho85), are involved in cell cycle control (Toh-e and Nishizawa 2001). Cdc28 associates with different cell cycle phase-specific cyclins and is required for all the phase transitions throughout the cell cycle (Mendenhall and Hodge 1998). Pho85 also appears to play a role in the G1/S transition (Espinoza, Ogas et al. 1994), and in particular, has been found to be involved in the degradation of the CDK inhibitor (CKI) Sic1 which normally acts to inhibit entry into S phase (Wysocki, Javaheri et al. 2006). In contrast, mammalian cells use many different CDKs at different steps of the cell cycle, such as CDK4 and CDK6 for passage through G1, CDK2 for entry into and progression through S phase, and CDK1 for the G2/M transition (Obaya and Sedivy 2002). CDK1 is a Cdc28 homologue, while CDK5 is homologous to Pho85 (Liu and Kipreos 2000). CDK5 is unrelated to the control of the cell cycle in mammalian cells and appears instead to be involved in neuronal development (Smith and Tsai 2002) and other diverse functions (Rosales and Lee 2006).

Most members of the CDK group of serine/threonine protein kinases are themselves regulated post-translationally by phosphorylation. An inhibitory phosphorylation site is located within the P-loop at the N-terminal region of CDKs, while an activating phosphorylation site is located in the T-Loop which otherwise blocks the active site cleft. CDK5 in mammalian cells is a notable exception to this type of regulation, as it does not require phosphorylation in the T-loop for activation (Qi, Huang et al. 1995; Dhavan and Tsai 2001), and phosphorylation of Tyr¹⁵ in the P-loop increases rather than decreases activity of the enzyme (Zukerberg, Patrick et al. 2000). This behavior is also observed for Pho85 in yeast, which is also activated by phosphorylation in the P-loop and does not require T-loop phosphorylation for activity (Toh-e and Nishizawa 2001).

The activity of CDKs are also regulated by protein-protein interactions. Cyclins, a group of proteins originally isolated because their abundance varied throughout the cell cycle, are absolutely required for CDK activity. They bind CDKs through interactions with their PSTAIRE motif (Glu-Gly-Val-Pro-Ser-Thr-Ala-Ile-Arg-Glu-Ile-Ser-Leu-Leu-Lys-Glu motif) on the CDK. In addition, a group of proteins called CDK inhibitors (CKIs) can bind CDKs, either bound with a cyclin or not, and block their activity.

The cell cycle of dinoflagellates has been the subject of several previous studies using as a model the rapidly dividing heterotroph *Cryptothecodinium cohnii*. This species contains a 34 kDa protein reacting to an anti-PSTAIRE antibody and both this signal and histone H1 kinase activity can be enriched using p13^{suc1} immunoprecipitation (Rodriguez, Cho et al. 1993). A modest increase (less than 2-fold) in histone H1 kinase activity of proteins immunoprecipitated with p13^{suc1} was found in M phase compared with interphase cell extracts (Bhaud, Barbier et al. 1994). Interestingly, an antibody raised against a *Schizosaccharomyces pombe*

cyclin (Cdc13) was found to cross react with a 56 kDa band in *C. cohnii* extracts and this same antibody was able to immunoprecipitate a higher histone H1 kinase activity (Barbier, Albert et al. 1995). Using an anti-(cyclin-box) antibody, four cross-reacting bands were found (Leveson, Wong et al. 1997), of which two (at 50 and 65 kDa) accumulated in G2 and disappeared after M phase. Only the 50 kDa band could be immunoprecipitated using p13^{suc1} binding.

In *Gambierdiscus toxicus*, an anti-PSTAIRE antibody was used to demonstrate the presence of a 34 kDa reacting band whose quantity did not vary over time (Van Dolah, Leighfield et al. 1995). This same antibody used for immunoprecipitation was able to enrich histone H1 kinase activity, and kinase activity was at its maximum when extracts from cells in M phase were used.

An anti-PSTAIRE reactive protein at around 32 kDa was also found in the dinoflagellate *Lingulodinium polyedrum*, although cloning and analysis of the sequence demonstrated clearly that it was not a CDK (Salois and Morse 1996). More recently, a cyclin called GpCyc1 has been cloned by functional complementation from this same species (Bertomeu and Morse 2004). Since *Gonyaulax polyedra* has been renamed as *Lingulodinium polyedrum*, we shall now further refer to this cyclin as LpCyc1. LpCyc1 rescues a mutant of *S. cerevisiae* deficient in the G1/S cyclins Cln1, Cln2 and Cln3. The presence of a destruction-box in its N-terminal sequence together with the more than 10-fold decrease in amounts from G2-enriched to G1-enriched cells, indicated this clone likely encodes a mitotic cyclin. This protein was the first (and so far the only) cell cycle regulating protein cloned and characterized from a dinoflagellate.

Interestingly, an EST (expressed sequence tag) project of *Karenia brevis* (with 7001 independent ESTs) was found to contain the first potential dinoflagellate

CDK sequence (Accession number CO060059) (Lidie, Ryan et al. 2005). This sequence is clearly a Serine/Threonine protein kinase with similarity (E value: $2e^{-10}$) to the *Drosophila melanogaster* CDK1-homologue. However, this sequence lacks the first 100 amino acids normally containing the characteristic PSTAIRE motif and its potential identity as a CDK is thus unconfirmed.

We report here the first biochemical isolation of a dinoflagellate CDK and its identification by protein microsequencing. The microsequence data clearly shows the conserved PSTAIRE motif and thus confirms the sequence as a CDK. The sequence has, as expected, high similarity to a *Toxoplasma gondii* CDK based on the phylogenetic relationships of dinoflagellates and apicomplexans. The sequence also appears most similar to the CDK5/Pho85 group of CDKs in phylogenetic analyses. Furthermore, the abundance and phosphorylation state of this CDK is constant over the cell cycle, similar to what is found with CDK5 from other species. As this CDK does not seem to associate with LpCyc1, we conclude that dinoflagellates are likely to express a number of different CDKs, as found for other organisms.

4.3 Results

The *L. polyedrum* strain used here is different from that whose cell cycle events were studied previously (Homma and Hastings 1989). We therefore used flow cytometry to characterize the cell cycle in our strain. For the present study, cells were maintained in exponential phase growth by 2-fold dilution of the cells every 3 days. Under these conditions, cells have a shorter doubling time than previously reported (Bertomeu and Morse 2004), with approx. 30% of the cells entering S phase during the early night phase (Figure 4.1A-B, p.105). In agreement with previous observations, S phase was found to occur within a 4 hour period

around LD (light/dark) 18 (Homma and Hastings 1989) and M phase occurs around LD1, 1 hour after the start of the light phase (Sweeney and Hastings 1958). M phase can be observed either as the disappearance of cells in G2/M (Figure 4.1B, p.105) or as the appearance of dividing cells, a population with the same FL2-A (fluorescence amplitude) as G2 cells but a FL2-W (fluorescence width) intermediate between G2 cells and G1 doublets (Figure 4.1C, p.105).

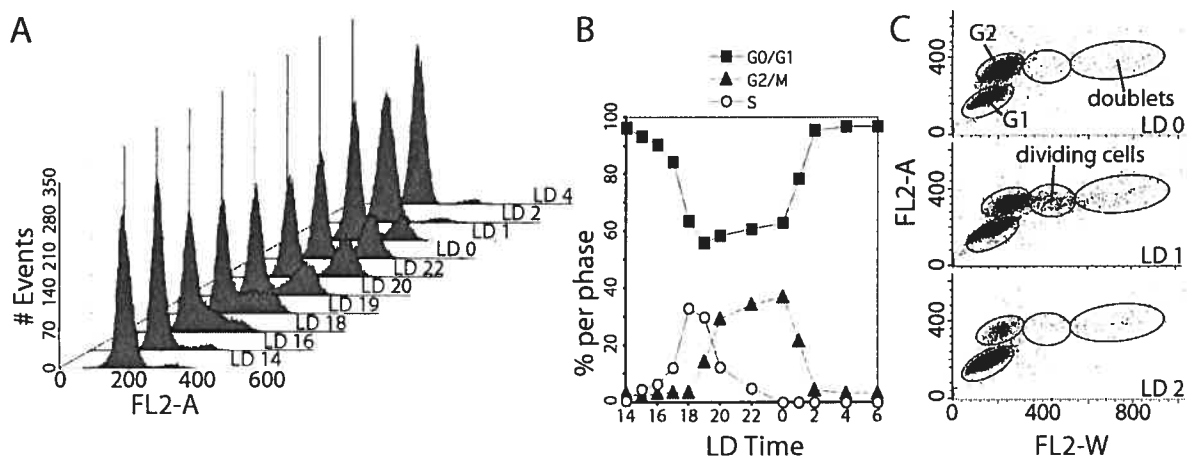


Figure 4.1 Cell cycle analysis of *L. polyedrum* over time.

(A) DNA content per cell was measured by PI staining in 20000 events counted by flow cytometry using cells collected at different times during an LD cycle. (B) Percentages of cells in G0/G1, G2/M and S phases, determined using the ModFit software, plotted over time. (C) FL2-W versus FL2-A readings of cells in LD 0, LD 1 and LD 2 shows abundant dividing cells at LD 1.

Interestingly, although most of the G2 phase cells divided at LD 1, a small percentage of G2 phase cells can be found at all time points measured between LD 1 and LD 14. Indeed, depending on the particular experiment, up to 8% of G2 phase cells could be found during the day phase (data not shown). This observation reinforces the idea that M phase is clock-controlled and does not simply occur at a fixed time following S phase.

As an initial approach to isolation of a dinoflagellate CDK, we thought to use binding to the dinoflagellate cyclin LpCyc1 (Bertomeu and Morse 2004) as a molecular marker that could be monitored following fractionation by column chromatography. The presence of LpCyc1 was determined by an anti-LpCyc1 antibody reaction. A crude protein extract from cells at LD 0.5 was first subjected to ammonium sulfate precipitation, with proteins precipitating between 17 to 40% containing all the polypeptides immunoreacting with the anti-LpCyc1 serum (data not shown). The precipitate was resuspended, desalted and subjected to anion-exchange chromatography. A single band at 68 kDa was recognized by the anti-LpCyc1 antibody and the LpCyc1 protein routinely eluted within a major peak on 12 fractions (30 to 41) (Figure 4.2A, p.108). A non-reproducible and minor LpCyc1-reactive species is occasionally noted at a position prior (25 to 28) to the main peak. Interestingly, challenging the same fractions with an anti-PSTAIRES antibody identified a single peak of immunoreactive protein whose apparent molecular weight on SDS-PAGE was 34 kDa, although this immunoreactive protein was only found associated with the first several fractions of the major cyclin-containing peak. The majority of anti-LpCyc1 reactive fractions (30 to 41) were then pooled and fractionated by gel-filtration chromatography. The cyclin eluted within four fractions (22 to 25) (Figure 4.2B, p.108) corresponding to an apparent molecular size of 160

± 20 kDa (data not shown). However, the anti-PSTAIRE signal was no longer associated with the cyclin, as the immunoreactive protein eluted at a position corresponding to an apparent molecular size of 34 kDa.

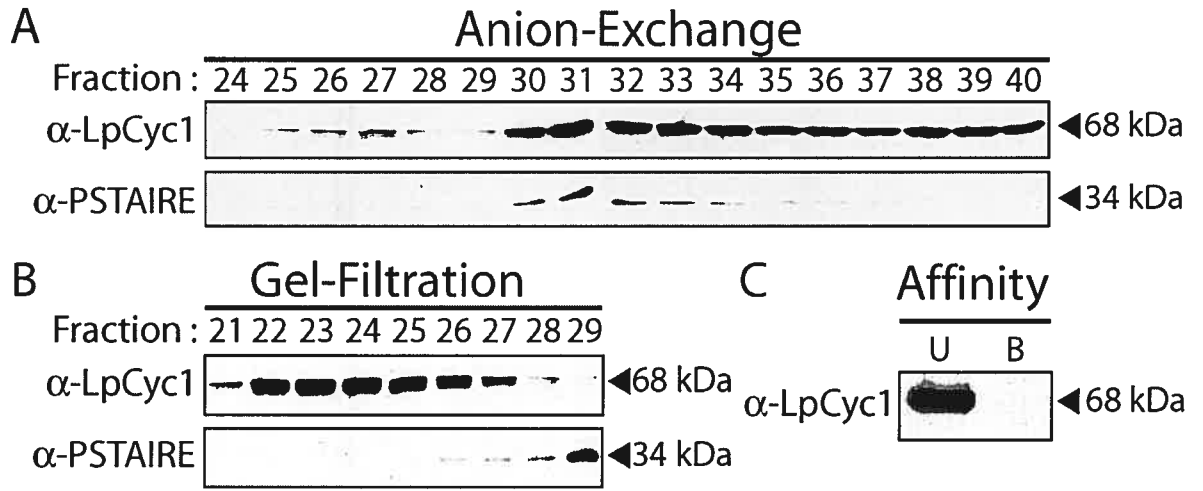


Figure 4.2 Chromatography of LpCyc1 and an anti-PSTAIR reactive protein.

(A) After fractionation by anion-exchange chromatography, LpCyc1 elutes in a single broad peak (fractions 30 to 41) as detected by Western blotting, whereas a protein reacting to an anti-PSTAIR antibody co-elutes in the first five of these fractions. (B) The gel-filtration chromatography of the partially purified LpCyc1 shows separation of LpCyc1 and the anti-PSTAIR reacting proteins. (C) LpCyc1, partially purified by gel-filtration does not bind to a p13^{suc1} affinity chromatography resin. U, unbound; B, bound.

These results suggested that our initial hypothesis of a CDK-LpCyc1 interaction might have been incorrect. To verify if our experimental conditions had disrupted the CDK-cyclin binding, we tested for LpCyc1 binding to p13^{suc1}-Sepharose beads. Cyclin binding to this affinity column is thought to require CDK-cyclin interaction (Vogel L. 2002), but LpCyc1 failed to bind this resin as judged by Western blot analysis (Figure 4.2C, p.108). We also tested for co-elution of anti-cyclin and anti-PSTAIRE immunoreactivity on gel filtration on Sepharose CL4-B using the crude extract directly, to ensure that the purification procedure itself did not decrease association of the two proteins. The two were again found in different fractions (data not shown), consistent with a lack of interaction between LpCyc1 and the anti-PSTAIRE reactive protein.

To test if a CDK not identifiable by anti-PSTAIRE immunoreactivity was present in the extracts, p13^{suc1} chromatography was performed on a crude protein extract (Figure 4.3, p.111). The identification of all protein bands visible by Coomassie blue staining was then attempted by MS sequencing. Only 5 of the eleven bands corresponding to *Lingulodinium* proteins could be identified by significant sequence identity. Notably, neither cyclin (around 56 kDa) nor cdc2-like (around 34 kDa) sequences were recovered in this analysis suggesting that appreciable levels of CDK did not bind to p13^{suc1} under these conditions.

At this point in our analysis, we reasoned that it might be possible to identify the anti-PSTAIRE reactive protein enriched through the two columns in Figure 4.2 (p.108) by MS sequencing. Indeed, a Coomassie stained spot corresponding to the cyclin, as judged by an anti-LpCyc1 Western done in parallel, was readily detected (Figure 4.4A, p.112). Since a Coomassie stained spot was observed at the position

of the anti-PSTAIRE signal after two-dimensional SDS/PAGE (Figure 4.4B, p.112), this protein was excised from the gel and microsequenced.

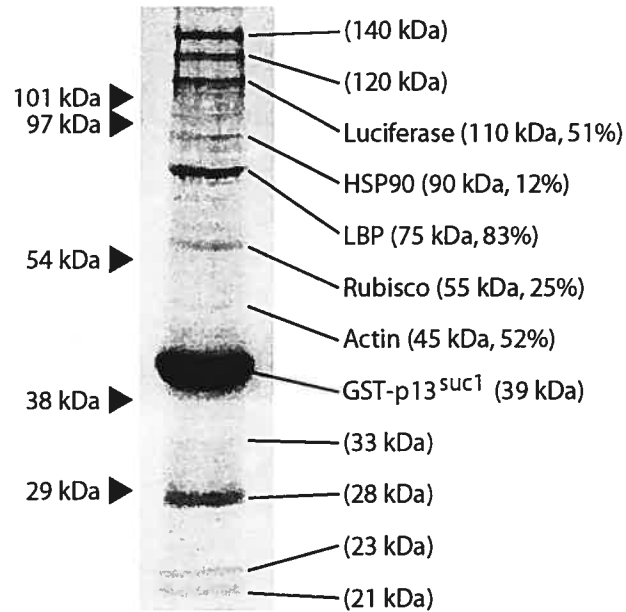


Figure 4.3 Microsequence analysis of proteins bound to p13^{suc1}-Sepharose beads.

A crude protein extract was bound to p13^{suc1} and the specific eluate resolved by SDS/PAGE. Shown are the 11 *Lingulodinium* bands that were excised and microsequenced as well as the GST-p13^{suc1}, which was also eluted from the beads. Identity of the protein is written when MS sequencing yielded sufficient homology to known proteins. The molecular weight of the bands and the percentage of sequence coverage by MS are shown in parentheses.

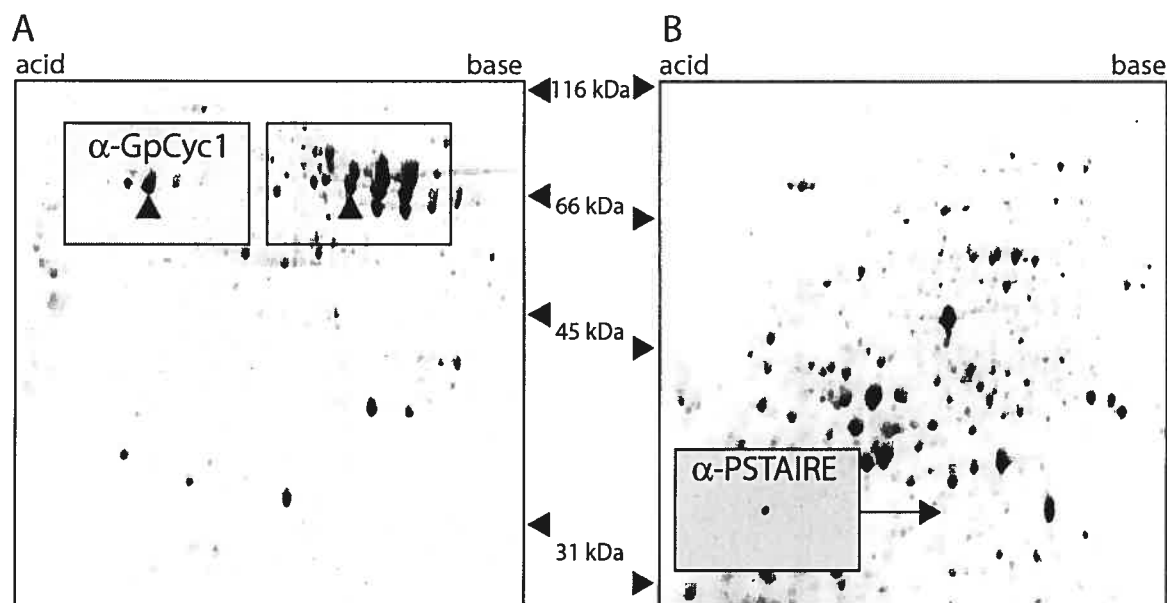


Figure 4.4 Identification of an anti-PSTAIR reactive protein following two dimensional SDS/PAGE.

Partially purified proteins after anion-exchange and gel-filtration containing LpCyc1 (A) or the anti-PSTAIR signal (B) were resolved by two dimensional SDS/PAGE and stained with Coomassie blue. Spots marked by arrowheads represent those reacting to the respective antibodies. The anti-PSTAIR reacting spot was excised from the two dimensional SDS/PAGE gel and identified by protein microsequencing.

The peptide sequences obtained were very similar to a variety of different CDKs, with the highest similarity (BLASTP E value: 1^{e-37}) obtained with a *Toxoplasma gondii* cdc2-like CDK (see Supplementary Figure S1 at <http://www.biolcell.org/boc/099/boc099xxxadd.htm> or Supplementary Figure 4.8, p.128 of this thesis). This was encouraging, as the apicomplexans (to which *T. gondii* belong) are the closest relatives to dinoflagellates in phylogenetic analyses. Curiously, however, when the protein sequence was compared with the thoroughly sequenced genomes of *Caenorhabditis elegans*, *Danio rerio*, *D. melanogaster*, *S. cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe*, a higher degree of homology was reproducibly found with the CDK5/Pho85 rather than the CDK1 family of CDKs. This relationship is best illustrated by a phylogenetic analysis of selected CDK1 and CDK5 sequences. The inclusion of our *Lingulodinium* sequence within a well supported CDK5/Pho85 clade (Figure 4.5B, p.114) suggested that our protein might correspond to a CDK5-like. Unfortunately, exhaustive attempts to clone a DNA fragment of LpCDK5-like using degenerate PCR primers on genomic and complementary DNA, or using radio-labeled degenerate oligonucleotides to screen a cDNA library were unsuccessful, thus precluding a more detailed analysis of the homology. However, it is important to note that the peptide sequence reported here covers around 35% of the expected amino acid sequence, and includes the characteristic PSTAIRE motif that unambiguously identifies the protein as a CDK.

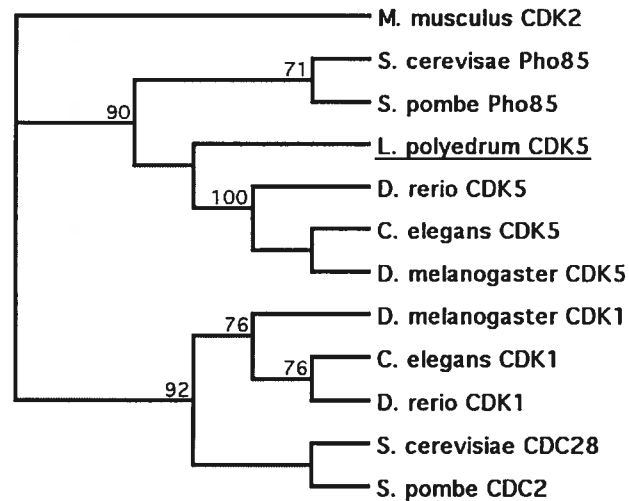


Figure 4.5 Anti-PSTAIRe reactive protein corresponds to a CDK5 isoform.

Protein sequences representative of CDK5/Pho85 and CDK1/CDC2/Cdc28 from *S. pombe*, *S. cerevisiae*, *D. rerio*, *D. melanogaster* and *C. elegans*, all truncated to match LpCDK5-like microsequence data, were used for phylogenetic analysis. The inclusion of the *Lingulodinium* sequence within the CDK5/Pho85 clade has high bootstrap support.

The reaction of the anti-PSTAIRE with a protein identified as a *bona fide* CDK by microsequence suggested that the antibody could be used to characterize the behavior of the enzyme. We first tested LpCDK5-like expression over a daily period in *Lingulodinium* cells grown under an LD cycle, where mitosis is clearly rhythmic. No major difference in the expression of LpCDK5-like was detected in unsynchronized exponentially growing cells (Figure 4.6, p.116). Since CDKs can be post-translationally modified by phosphorylation events, the isoelectric point of LpCDK5-like through a cell cycle was also determined. However, no reproducible changes in CDK phosphorylation could be observed. At low exposure times (Figure 4.7A, p.117), antibody reaction with the two dimensional SDS/PAGE gave rise to a single specific band. Longer exposures of the films revealed several other spots (Figure 4.7B, p.117) at molecular masses compatible with CDKs, mostly at LD 0 and LD 12. However, the mobility of all proteins detected in the over exposed films does not change after incubation with CIP (calf intestinal phosphatase) phosphatase, indicating they do not correspond to differentially phosphorylated isoforms of LpCDK5-like (Figure 4.7C, p.117). We had anticipated that an isoform representing a major part of LpCDK5 in 30% of the cells entering mitosis at LD 0 would have been readily detected with this technique if this kinase was differentially phosphorylated at mitosis. This observation is in agreement with our assignment of the *Lingulodinium* protein to the CDK5 family, which, unlike its CDK1 relative, does not undergo differential phosphorylation during different phases of the cell cycle.

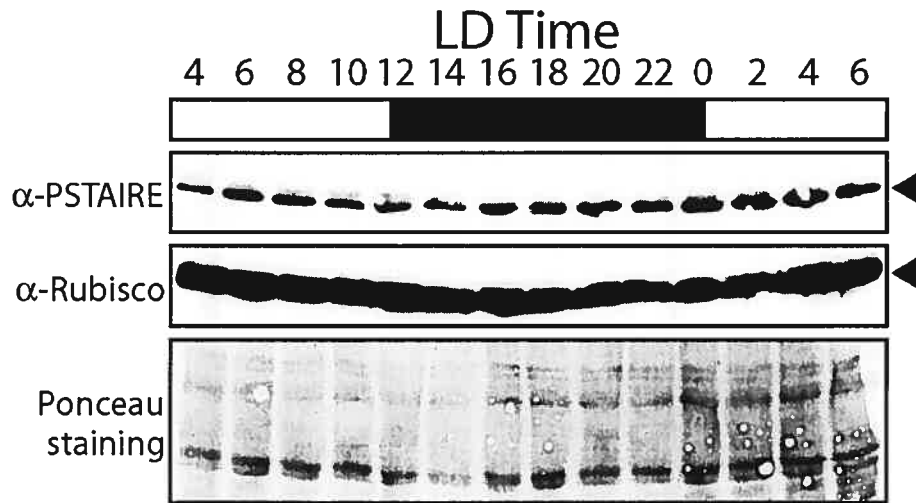


Figure 4.6 No variation upon the expression of LpCDK5-like is detected over time.

Protein samples of *Lingulodinium* collected at different LD times were resolved by SDS/PAGE and the Western blot was probed with either anti-PSTAIR or anti-RuBisCO antibodies. Arrow heads respectively represent either the 34 kDa or 55 kDa bands for the upper and middle panels respectively. The PVDF membrane stained with Ponceau red is shown in the lower panel.

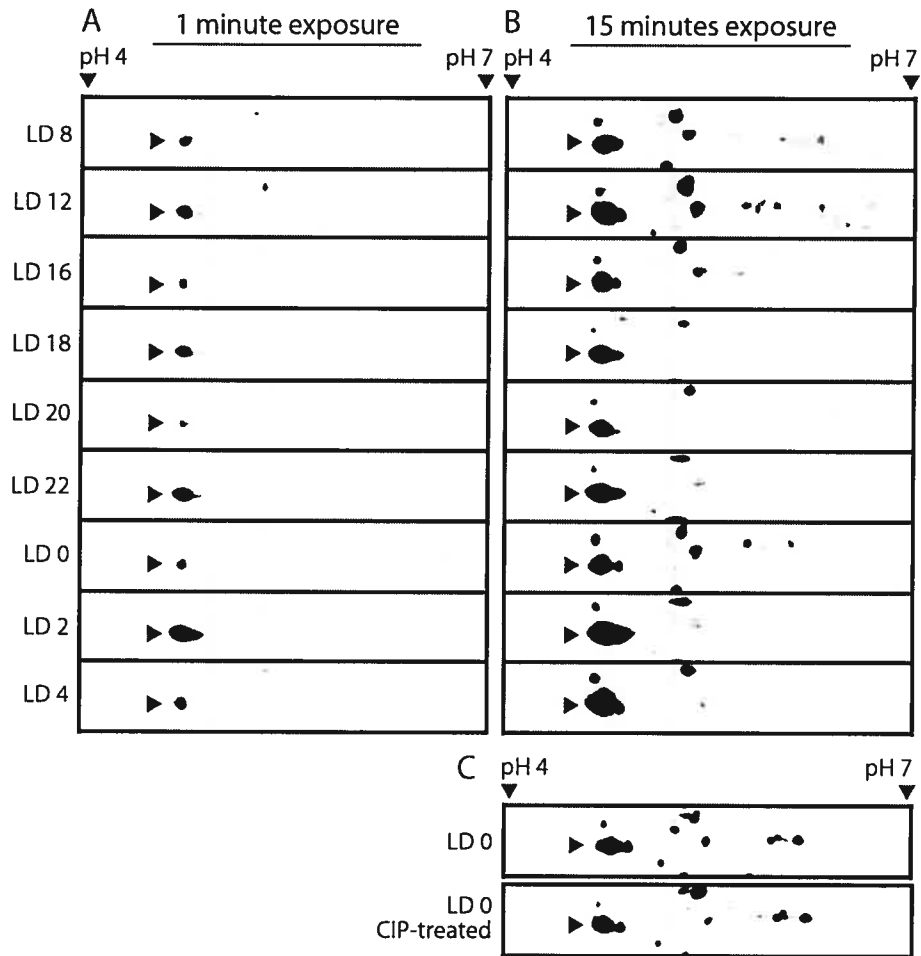


Figure 4.7 Isoelectric point of LpCDK5-like is invariant over time.

Chemiluminescence of Western blots of two dimensional SDS/PAGE (pH 4-7, linear) using proteins taken each 2 hours from LD 8 up to LD 4 were hybridized to an anti-PSTAIRE antibody and exposed to film for either 1 minute (**A**) or 15 minutes (**B**). Arrowheads indicate the major 34 kDa reacting spot. An LD 0 protein sample treated with CIP does not affect the electrophoretic mobility of the LpCDK5-like protein. Gels from two different experiments (one from times 0, 4, 8, 16 and 20, and the other from times 2, 12, 18 and 22) are shown.

4.4 Discussion

It has long been known that mitosis of *L. polyedrum* grown in a laboratory setting is under circadian control. Under 12 h light/12 h dark (LD::12:12) conditions, mitosis is restricted to 1 h after lights are turned on (LD 1). Since the generation time of a single cell is typically greater than 24 h (Sweeney and Hastings 1958), the cell cycle is said to be “gated” rather than controlled directly by the circadian clock. All cells are thus given an opportunity to enter M phase each day, but only the cells in an appropriate position in the cell cycle will do so. Flow cytometric measurements of exponentially growing *Lingulodinium* confirm this, as although most cells in G2 phase undergo mitosis at this time (Fig. 1C), some G2 phase cells do not divide at LD 1 and can be found later during the day phase. Interestingly, these observations argue against the model of Homma and Hastings (Homma and Hastings 1989), in which M phase was proposed to follow at a fixed time interval from a circadian controlled S phase. G2 phase cells during day phase suggest they were not ready to undergo mitosis at LD 1 and were thus obligated to wait for the subsequent mitotic window.

With respect to S phase, our data showing onset of S phase approx. 9 h prior to mitosis and lasting for approx. 4 h confirms previous observations (Homma and Hastings 1989). Additional flow cytometry measurements of cells grown in different lighting conditions will be required to assess definitively if there is a circadian control over both S and M phases.

To date, only one study has identified a dinoflagellate cDNA as a CDK (Lidie, Ryan et al. 2005) and this identification is based on an incomplete EST

sequence. Curiously, if this sequence were completed using the N-terminal region of the *Drosophila* CDK1 sequence, the predicted protein would have a molecular mass of 43 kDa, much larger than the 34 kDa expected for CDKs. Moreover, this kinase lacks the RD sequence in subdomain VIb present in all CDKs (Ferrari 2006). Thus it seems unlikely that this sequence corresponds to a true CDK. There are, however, three other potential CDK sequences that can be found by screening the dinoflagellate EST databanks. One, in *Karenia brevis* (CO061088), contains a PLTAIRE motif with some similarity with CDK9. Two others, one in *Oxyrrhis marina* (EG741876) and the other in *Karlodinium micrum* (KME00004803), contain a PSTAIRE motif with some similarity with CDK1. These sequences thus support our contention that dinoflagellates have many different CDKs as do other eukaryotes.

We report here protein microsequence data that confirms the identity of an anti-PSTAIRE reactive protein as a CDK from a dinoflagellate. Our results do not support an interaction of this CDK with the cyclin LpCyc1 previously reported from this organism. LpCyc1 and LpCDK5-like do not co-elute during gel-filtration, either before or after partial purification on anion-exchange chromatography (Figure 4.2B, p.108 and data not shown). The apparent molecular mass of the cyclin following gel-filtration (around 160 kDa) suggests that LpCyc1 may be part of a protein complex, possibly encompassing a CDK interacting with LpCyc1, as the cyclin monomer is expected to be 68 kDa. However, no other protein in the mixture reacts to the anti-PSTAIRE antibody and LpCyc1 does not bind to p13^{suc1} affinity resin (Figure 4.2C, p.108).

The protein identified here by microsequence data appears most similar to the Pho85/CDK5 family members. This conclusion is supported by phylogenetic analysis with the sequence, albeit incomplete, that is currently available, as LpCDK5-like is found in a CDK5/Pho85 clade with high bootstrap support.

Furthermore, the invariance of phosphorylation state at important cell cycle transitions times is in agreement with a CDK not implicated in cell cycle control, such as CDK5, whereas CDK1 is the recognized key regulator of entry into M phase. Since CDK1 and CDK5 types of cyclins are very closely related (Manning, Whyte et al. 2002), a definite classification of dinoflagellates CDKs will require a more complete catalog of dinoflagellate sequences.

The anti-PSTAIRE used in this study recognizes a single major protein of 34 kDa that elutes as a single peak after anion-exchange and gel-filtration. This immunoreactive protein thus differs from that found in a previous study (Salois and Morse 1996) in which an anti-PSTAIRE antibody (from another supplier) was found to react with a 32 kDa band. This discrepancy may be due to differences in the amino acids flanking the PSTAIRE antigen used for raising the different antibodies. This suggests that care should be exercised in use of these antibodies to assess the dinoflagellate cell cycle (Rodriguez, Cho et al. 1993; Van Dolah, Leighfield et al. 1995) unless independent confirmation of the identity of the immunoreactive protein can be obtained. It is unfortunate that we were unable to recover cDNA or genomic sequence corresponding to our protein microsequence. It is possible that the gene is of low abundance in the RNA complement of the cell and thus may be absent from our cDNA library. Furthermore, the genomic copy may contain a large number of intervening sequences precluding amplification by PCR. We note however that the lack of a complete LpCDK5 sequence does not preclude use of the antibody to assess the levels and phosphorylation state of the protein.

4.5 Methods

Cell culture. Cultures of *L. polyedrum* (formerly *G. polyedra*) CCMP 1936 were obtained from the Provasoli-Guillard National Center for Culture of Marine

Phytoplankton (Booth Bay Harbor, Maine, U.S.A.) and grown in F/2 medium under 12 h light (40 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\cdot\text{s}$ cool white fluorescent light) and 12 h dark at a temperature of $18 \pm 1^\circ\text{C}$. The timing of cell samples taken under this light regime is termed LD, with LD 0 corresponding to lights on and LD 12 to lights off.

Flow Cytometry Analysis. 100 ml of cell cultures (approximately 8000 cells/ml) were centrifuged at 1000 g for 1 min and resuspended in 50 ml of 70% (v/v) ethanol. This centrifugation and ethanol wash was repeated twice with the cells in the last wash exposed to culture room lights for 30 min with gentle shaking to bleach residual pigments. Cell samples were stored at 4°C until use, when they were washed twice with water, treated with 40 mg/ml RNase A for 30 min at 37°C and stained for 1 h in the dark with 50 mg/ml Propidium Iodide (Sigma). For each time point, 20000 events were read for exponentially growing cells using a FACScan (BD BioSciences) equipped with a 488 nm laser and a 586 nm filter for the FL2 channel. Data was acquired using the CellQuest Pro software (BD BioSciences). Cellular debris was excluded from our analysis using a gating window in Forward and Side Scatter plots and cell doublets were excluded using a gating window in FL2-area (FL2-A) versus FL2-width (FL2-W) plots. The percentage of cells in each phase of the cell cycle was calculated using the ModFit software (BD BioSciences).

Western analysis. Protein samples were boiled for 5 min in five packed cell volumes of 2% (w/v) SDS, 0.7 mM 2-Mercaptoethanol, 62.5 mM Tris/HCl (pH 6.8) and 10% (v/v) glycerol and resolved by SDS/PAGE at 150 V on 12% gels. The proteins were then transferred electrophoretically to a PVDF membrane for 20 min at 20 V using a semi-dry transfer cell (BioRad) and stained with Ponceau Red to confirm transfer. Membranes were blocked for 10 min in TBS-T (Tris-buffered saline containing Tween 20; 5 mM Tris/Hcl, pH 8.0, 137 mM NaCl, 2.5 mM KCl and

0.05% Tween 20) containing 5% (w/v) non-fat dry milk and incubated with antibodies overnight at 4°C diluted in fresh buffer. The antibodies used in this study were a previously described polyclonal antibody against the N-terminal region of LpCyc1 (Bertomeu and Morse 2004), a 1/4000 dilution of a commercially available rabbit polyclonal antibody raised against a 15 amino acids epitope of human CDK1 encompassing the PSTAIRE sequence (Santa Cruz Biotechnology; SC-53) and a 1/8000 dilution of anti-(form II RuBisCO) (Nassoury, Fritz et al. 2001) were used as primary antibodies. Membranes were washed 3 times for 10 min each in TBS-T, incubated with 1/4000 goat anti-rabbit antibody coupled to peroxidase (Sigma), washed three times and the position of antibody binding detected with the ECL® Plus substrate (GE Healthcare). Films were exposed for between 20 s to 15 min depending upon the intensity of the signal.

Biochemical purification of a CDK. Lingulodinium cells at LD 0.5 were recovered from culture medium by filtration on Whatman 541 paper and were frozen in liquid N₂ for later use. All procedures were carried out at 4°C. The cells (10 g from approx. 50 l of actively growing cultures), were broken in 35 ml of extraction buffer (20 mM Hepes pH 8.0, 20 mM β-Glycerophosphate, 25 mM NaF, 2mM EGTA, 1.5 mM MgCl₂, 300 mM PMSF, 3 mg/ml Leupeptin, 1 mM DTT (dithiothreitol), 10 mg/ml cytochalasin B and 1 mM [γ-S] ATP) by two runs through a French Press (Thermo Electron Corporation) at 16000 psi in a 40 K cell. The extract was clarified by centrifugation at 30000 g for 10 min, and the supernatant mixed with 0.2 vol. of 100% saturated (NH₄)₂SO₄ solution to yield a 17% solution. Following a 10 min incubation on ice, the solution was centrifuged 10 min at 30000 g, and the supernatant mixed with 0.38 vol. of 100% saturated (NH₄)₂SO₄ to yield a 40% solution. Following a 10 min incubation on ice, the solution was centrifuged at 30000 g for 10 min and the pellet resuspended in 2 ml of buffer A (20 mM HEPES

pH 8.0, 2 mM EGTA, 1.5 mM MgCl₂, 300 μM PMSF, 3 mg/ml Leupeptin, 1 mM DTT). The sample was desalted in one ml aliquots through PD-10 desalting columns (GE Healthcare) pre-equilibrated in buffer A. The desalted fraction was loaded onto an 8 ml Fractogel EMD DEAE-650 (S) (VWR) column equilibrated with buffer A. Chromatographic separation was performed with a FPLC (GE Healthcare) running at 0.5 ml/min using a 0-50% linear gradient of buffer B (buffer A containing 20 mM β-Glycerophosphate, 25 mM NaF and 1 M KCl). A total of 77 1 ml fractions were collected, with LpCyc1 detected by western analysis in a major peak of 12 ml centered at around fraction 35. This chromatographic step resulted in a 8-fold enrichment of the antibody reactive signal compared to the total protein content in the sample. The fractions containing this peak was then concentrated to 500 μl using an Amicon Ultra-15 10000 (Millipore) and loaded onto a prepacked Superdex 200 high resolution 10/30 gel filtration column equilibrated with buffer A containing 100 mM KCl at a flow rate of 0.4 ml/min. Fractions of 0.5 ml were collected from the start of loading and resulted in a further 5-fold enrichment of cyclin.

p13^{suc1} affinity purification. Partially purified LpCyc1 was loaded onto a Tricorn 5/20 column (GE Healthcare) containing 200 μl GST(glutathione S-transferase)-p13^{suc1} coupled to Sepharose beads (Upstate) at 0.1 ml/min and washed with 20 column volumes of solution A with 100 mM KCl. Fresh *L. polyedrum* (2 g) collected at LD 0.5 were broken in 8 ml extraction buffer, cleared and precipitated with (NH₄)₂SO₄ as determined above, then resuspended in 1 ml PBS (pH 7.4) and loaded on a PD-10 column equilibrated with PBS (pH 7.4) to remove residual (NH₄)₂SO₄. The resulting 1.3 ml sample was rocked gently with 200 μl GST-p13^{suc1} beads 3 hours at 4°C. The beads were washed four times for 10 min with PBS (pH 7.4). Protein was eluted by a 10 min incubation in Western denaturing solution at 95°C.

Two-dimensional gel electrophoresis. Partially purified protein samples from gel filtration chromatography (fractions 22 to 25, which contained the majority of the LpCyc1 signal and fractions 28 to 31, which contained the anti-PSTAIRE signal) were precipitated with 3 vol. of acetone and the pellets dried and resuspended in 265 μ l of 8M Urea, 4% Chaps, 20 mM DTT and 0.5% pH 3-10 non-linear (NL) immobilized pH gradient (IPG) buffer. Most (250 μ l) of this sample was used to rehydrate a 13 cm IPG strip pH 3-10 NL and was electrophoresed using an IPGphor isoelectric focusing system (GE Healthcare) for 20000 Volt-hours. For the second dimension, strips were incubated 20 min in SDS equilibration buffer (50 mM Tris/HCl, pH 8.8, 6 M Urea, 30% (v/v) glycerol and 2% (w/v) SDS) and then resolved by SDS/PAGE (12% gel). The gels were stained with Coomassie Blue and scanned. The rest of the protein sample (15 μ l) was diluted to 250 μ l using the same buffer and treated similarly, except that the second dimension was transferred on to a PVDF membrane for immunoblotting instead of Coomassie Blue staining. The single protein reacting with the anti-PSTAIRE was microsequenced after identification of the corresponding spot on the Coomassie Blue-stained gel. To determine the isoelectric points of the CDK as a function of time, 200 ml of *Lingulodium* cultures (around 8000 cells/ml) from each time point were centrifuged and frozen in liquid N₂. The cell pellets were broken in 1 ml buffer (80 mM β -Glycerophosphate, 25 mM NaF, 20 mM Hepes, pH 8.0, 5 mM EGTA, 300 mM PMSF, 3 mg/ml Leupeptin, 1 mM DTT and 1% phosphatase inhibitor cocktail 1 and 2 (Sigma)) with approx. 200 μ l 0.5 mm zirconium beads in a Bead Beater for three times 1 min at 4°C. After centrifugation at 20000 g for 10 min at 4 °C, the supernatant was desalted by sequential addition of 4 vol. methanol, 1 vol. chloroform and 3 vol. H₂O, with vortexing between each addition. The samples were then centrifuged for 2 min at 10000g and the supernatant, containing the

methanol, water and salts was discarded. An additional 4 vol. of methanol was added to the chloroform and denatured proteins, vortexed and centrifuged again. The dried pellets were resuspended in 400 μ l 8M Urea, 4% (w/v) Chaps, 20 mM DTT and 0.5% pH 4-7 IPG buffer and 125 μ l were resolved on 7 cm IPG strips pH 4-7. For the dephosphorylation experiment, 0.5 g of cells at LD 0 were broken either in the same buffer described and kept on ice or into 1 ml of Promega's 1X CIP buffer containing 300 mM PMSF and 3 mg/ml Leupeptin and centrifuged 5 min at 20000 g. The supernatant was incubated 1 hour at 37°C with 100 units of CIP (Promega) and then analyzed by two dimensional gel electrophoresis. The SDS/PAGE gels were all run simultaneously using a Mini-PROTEAN 3 Dodeca Cell (BioRad).

Protein microsequencing. Proteins were excised from the Coomassie Blue-stained gel, extensively destained, subjected to trypsin digestion and the tryptic fragments sequenced by MS. Sample preparation and analysis was performed by the Harvard Microchemistry Facility (Cambridge, MA, U.S.A.) for LpCDK5-like and the Institut de Recherche en Immunologie et en Cancérologie (Montreal, Qc, Canada) for all others.

Phylogenic tree. Sequences were analyzed using the MacVector software (Accelrys). The sequences used for the phylogenic tree were: *S. pombe* (Pho85: 074456 and CDC2: P04551), *S. cerevisiae* (Pho85: NP_015294 and Cdc28: NP_009718), *D. rerio* (CDK5: AAH85381 and CDK1: NP_997729), *C. elegans* (CDK5: AAD37121 and CDK1: AAC60520), *D. melanogaster* (CDK5: AAA63754 and CDK1: NP_476797) and *M. musculus* (CDK2: NP_904326). Sequences were aligned using Clustal W and amino acids for which we had no LpCDK5-like sequence data were removed before the neighbor-joining tree was done (Poisson corrected).

4.6 Acknowledgements

The authors gratefully acknowledge the financial support of the National Science and Engineering Research Council of Canada (171382-03, D.M.).

Sc 1 MSGELANYKRLEKVGEGTYGVVYKA 25
 Tg 1 MEKYQKLEKIGEGTYGVVYKA 21

Sc 26 LDLRPGQGQRVVALKKIR LES EDEG 50
 Tg 22 QDHSG - - - EISALKKIR LEAEDEG 42
 Lp LEAEDEG

Sc 51 VPSTAIREISLLKEL KDD NIVR LYD 75
 Tg 43 IPSTAIREISLLKEL HHP NIVR LRD 67
 Lp IPSTAIREISLLKEL HHP NIVR

Sc 76 IVHSDAH KLY LVFE FLD LDL DLK RYME 100
 Tg 68 VIHTD - R R LTLVFEYLD QDLK K LLD 91
 Lp KLT LVFEYLD QDLK K

Sc 101 GIPKDQPLGADIVKK FMM QL CKGI A 125
 Tg 92 - - VCDGGLEPSTTK SFL FQL L CGI A 114
 Lp SFL YQL L R

Sc 126 YCHSHRILHR DLKPQNLLIN K DGNL 150
 Tg 115 YCHEHRVLHR DLKPQNLLIN R EGAL 139
 Lp DLKPQNLLIN R

Sc 151 K LGD DFGLAR AFGVPLRAYTHEIVTL 175
 Tg 140 K LAD DFGLAR AFGIPVRSYTHEVVTL 164
 Lp LAD DFGLAR

Sc 176 WYR APE VLL G GKQ YST GV D TWS L IGC 200
 Tg 165 WYR APD VLM GS SKT YST P V D IWS VGC 189
 Lp APD VLM GS R K YST P I D M WS VGC

Sc 201 IFAEM C N R K P I F S G D S E I D Q I F K I F 225
 Tg 190 IFAEM V N G R P L F P G T G N E D Q L M K I F 214
 Lp 94 IFAEM V N G R

Sc 226 RVLGTPNEA IWPDI VYLPDFKPSFP 250
 Tg 215 KVLGTPQVSEHPQLAELPHWNRDFP 239

Sc 251 QWRRKDL S QVVP SLDPRGIDL LDKL 275
 Tg 240 QFPPLPWDQVVPKLDPLGTDLLSRM 264

Sc 276 LAYDPINRISARRAAIHPYFQES 298
 Tg 265 LRFDSNQRISARQAMQHPYFSDLAD 289

Tg 290 NIKRLATFRGE 300

Supplementary Figure 4.8 LpCDK5 partial sequence alignment.

The LpCDK5 partial microsequence shares extensive homology to a *Toxoplasma gondii* CDK (**Tg**), and Cdc28 from *Saccharomyces cerevisiae* (**Sc**). Amino acids identical to those of LpCDK5 are boxed.

5 Discussion générale et perspectives

La stratégie d'utilisation de la génétique de la levure comme technique d'isolement de gènes régulateurs du cycle cellulaire d'un dinoflagellé fut couronnée de succès avec la découverte de la cycline LpCyc1. La présence dans cette protéine d'une boîte de destruction cycline et une plus grande abondance de celle-ci dans des extraits protéiques de cellules à majorité en G2 comparées à des cellules surtout en G1 prouve qu'il s'agit d'une cycline mitotique. Il s'agit, encore à ce jour, de la seule composante de contrôle du cdc d'un dinoflagellé jamais publiée. Sa découverte confirme un contrôle du cdc chez les dinoflagellés d'un système utilisant CDKs et cyclines.

La CDK que la cycline LpCyc1 est censée activer n'a pas encore été découverte. Il en va évidemment de même pour les substrats phosphorylés par ce complexe CDK-cycline. Il serait intéressant de connaître l'identité de ces substrats puisque nous pourrions ainsi expliquer les changements biochimiques requis pour engendrer une mitose dans un contexte où le noyau reste intact et la ségrégation des chromosomes se fait à partir d'un fuseau mitotique cytoplasmique. En relation avec l'identification potentielle des substrats du complexe LpCyc1/CDK, il serait très intéressant de savoir à quels endroits dans la cellule LpCyc1 est localisée. En effet, certaines cyclines mitotiques de mammifères sont transférées au noyau juste avant l'entrée en phase M. Pour un organisme chez qui le fuseau mitotique est cytoplasmique, il est tentant de penser que cette protéine est exclusivement cytoplasmique. Notre anticorps (article #1) ne nous permettait pas de tester une telle localisation cytologique. Toutefois, d'autres antisérums dirigés contre LpCyc1 mériteraient définitivement d'être testés pour cette application.

Des analyses préliminaires sur le patron d'expression de LpCyc1 dans le temps, en utilisant des extraits protéiques de cellules synchronisées par leur cycle circadien mais pas dans leur cycle cellulaire, montrent des changements dans l'abondance de LpCyc1 avec un large sommet proche du moment de la mitose. Les niveaux d'expression les plus bas de LpCyc1 ne descendent jamais jusqu'à zéro, même chez des cellules enrichies en G1 post-mitotiques. C'est à première vue plutôt étrange pour une protéine devant être activement dégradée pour effectivement permettre la sortie de l'état mitotique. Plusieurs hypothèses peuvent expliquer une telle observation. La première vient du fait que seule une partie des cellules entre en phase M à chaque aube et que certaines cellules sont en phase G2 durant le jour. Ainsi, il se pourrait que les quantités détectées de LpCyc1 le jour proviennent des quelques cellules en G2 ne s'étant pas divisées durant l'aube et que celles-ci aient déjà accumulé LpCyc1 en prévision de leur prochaine fenêtre d'opportunité d'entrer en mitose à l'aube suivante. Alternativement, l'observation d'un signal envers notre anticorps anti-LpCyc1 sur des extraits provenant de cellules de jour vient peut-être d'une dégradation lente de LpCyc1 chez des cellules venant tout juste de se diviser. Finalement, une expression basale minimale de LpCyc1 à travers tout le cycle cellulaire, tel que pour Cln3 de *S. cerevisiae* est aussi possible. L'établissement d'une méthode de synchronisation efficace pour *Lingulodinium* facilitera la poursuite de l'étude de l'expression de cette cycline.

Au cours de mes études, le mécanisme de contrôle circadien d'entrée en phase M chez des cellules de foie de souris a été rapporté (Matsuo, Yamaguchi et al. 2003). Chez cet animal, une composante de l'horloge circadienne induit directement la transcription du gène *WEE1*, codant pour la kinase inhibitrice de CDK1, qu'à certains moments du jour. Ainsi, même chez des cellules de foie ne

devant pas se diviser dans la journée, on retrouve une modulation circadienne de la transcription de *WEE1* par l'horloge. Ce mécanisme par lequel l'horloge circadienne donne une occasion au cycle cellulaire d'entrer en phase M une fois par jour est justement le reflet de notre hypothèse de « fenêtres d'opportunités ». Si une kinase inhibitrice Wee1 était sous contrôle circadien chez *Lingulodinium*, nous serions capables de vérifier son action en regardant le patron de phosphorylation de son substrat CDK1. Une modification de son activité, même dans des cellules ne devant pas se diviser dans la journée, confirmerait que ce changement biochimique est la source du contrôle circadien de l'entrée en mitose. Une schématisation d'un tel système de contrôle chez *Lingulodinium* est présenté dans la Figure 5.1 (p.132). De plus, en utilisant la séquence d'ADN en amont d'un gène *WEE1*, nous pourrions même espérer pouvoir isoler une composante de l'horloge circadienne de dinoflagellé si celle-ci était, comme chez la souris, un facteur de transcription se liant au promoteur de *WEE1*.

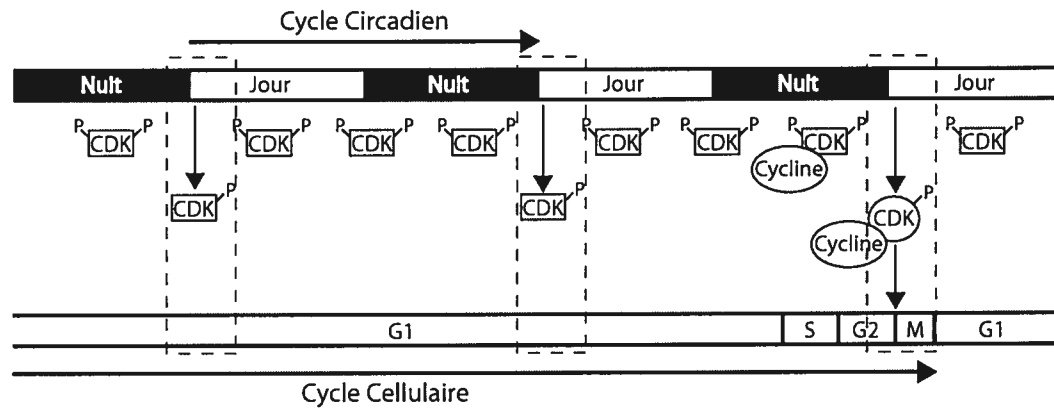


Figure 5.1 Hypothèse de la fenêtre d'opportunité du cycle circadien donnée au cycle cellulaire pour le contrôle du moment d'entrée en mitose via l'enlèvement du phosphate inhibiteur de la CDK1.

Une fois par jour, l'horloge biologique de *Lingulodinium* donne l'opportunité (encadrés en lignes pointillées) au cycle cellulaire de ce dinoflagellé d'effectuer la transition G2/M. L'horloge biologique enlève tous les phosphates inactivateurs de la CDK1 de ce dinoflagellé à l'aube. Toutefois, la CDK1 ne devient active (représentée dans la figure par CDK entourée d'un cercle et non d'un rectangle) que lorsque le phosphate inhibiteur est enlevé et qu'elle est aussi associée à une cycline mitotique.

Il est décevant que le criblage de *S. cerevisiae* thermoconditionnelle létale pour sa CDK Cdc28 avec les ADNc de *Lingulodinium* n'ait pas fonctionné. Toutefois, les mutants conditionnels létaux de cette levure, au nombre incessamment grandissant, deviennent autant d'outils disponibles à l'isolement d'autres gènes de dinoflagellés avec la banque déjà construite. Par exemple, des mutants conditionnels létaux des gènes homologues à *WEE1* (Bouquin, Barral et al. 2000) et *CDC25* (McMillan, Longtine et al. 1999) de *S. cerevisiae*, un inhibiteur et un activateur respectivement de CDK1, seraient très utiles. Aussi, il est possible qu'une autre banque d'ADNc de *Lingulodinium*, construite différemment avec un promoteur moins fort ou inductible ou encore avec un codon initiateur ATG fournis en amont du site d'insertion des ADNc, serve à l'isolement de gènes pour lesquels la banque actuelle ne fonctionnerait pas. En parallèle, le criblage de gènes de dinoflagellés chez *S. pombe*, chez qui beaucoup de mutants sont aussi disponibles, pourrait aussi devenir un système permettant l'isolement de gènes spécifiques. D'ailleurs, les mutants arrêtant le cdc en phase M sont beaucoup mieux caractérisés chez la levure fissipare que chez la levure bourgeonnante. Il suffirait de fabriquer une autre banque d'ADNc dans un vecteur d'expression compatible avec la levure fissipare.

Il est très probable que *Lingulodinium* exprime une CDK1. En effet, il est logique de penser que la découverte de la cycline mitotique LpCyc1 implique la présence de la protéine régulée par celle-ci. De même, un EST récemment disponible du dinoflagellé *Karlodinium micrum* encode justement une CDK1. Dans ces conditions, on peut se questionner sur les raisons pouvant expliquer l'échec du criblage fonctionnel pour la CDK1 de *Lingulodinium* chez *S. cerevisiae* mutante pour *CDC28*. Il se pourrait que ce gène soit très faiblement exprimé, et donc

absent de la banque d'ADNc, ou encore qu'il représente un faible pourcentage de celle-ci malgré son excellent titre primaire de 4 millions de clones indépendants. En accord avec cette hypothèse, un criblage d'interaction deux-hybrides chez la levure avec LpCyc1 comme appât n'a pas réussi à isoler d'interactants spécifiques, dont évidemment la CDK.

Aussi, il se pourrait que l'expression des clones codants pour la CDK1 soit compromise chez la levure. En effet, les ADNc utilisés pour faire la banque étaient incomplets, n'ayant pas la totalité de leur extrémité 5'. Ce phénomène est dû à la propriété inhérente du système de synthèse d'ADNc utilisé qui utilise l'ARNase H pour générer l'amorce nécessaire à la synthèse du second brin. En plus, la présence de structures secondaires fortes dans un transcrit pourrait empêcher la progression de la transcriptase inverse lors de la synthèse du premier brin et produire un clone tronqué. Ainsi, l'absence du codon initiateur de clones de cette banque empêche la traduction de la totalité de leur séquence codante et peut donc empêcher une complémentation. Quant au criblage de LpCyc1 elle-même, la présence dans ce gène d'un codon méthionine dans le bon cadre de lecture en amont du domaine repliement-cycline a permis l'isolement de 131 clones sans qu'aucun de ceux-ci n'aient la totalité de leur région 5' non-traduite.

Mis-à-part les raisons liées aux propriétés de la banque d'ADNc, il se pourrait que la CDK1 de *Lingulodinium* n'arrive simplement pas à compléter la levure bourgeonnante sans Cdc28. En effet, il a été trouvé récemment que des CDKs peuvent présenter différentes spécificité de substrats à phosphoryler. Par exemple, les CDK4 et CDK6 humaines, même si liées séparément à la même cycline D, phosphorylent des substrats différents (Takaki, Fukasawa et al. 2005), introduisant le concept que les CDKs, en plus des cyclines, déterminent aussi la spécificité du substrat. On peut donc penser qu'il est possible que la spécificité de

substrat dictée par la CDK1 de *Lingulodinium* ne soit pas compatible avec la phosphorylation des substrats nécessaires à la poursuite du cycle cellulaire de la levure en absence de sa propre CDK1.

Lors du criblage de gènes de *Lingulodinium* complétant *S. cerevisiae* n'exprimant plus ses cyclines Cln1, Cln2 et Cln3, nous avons isolé un ADNc qui ne codait pas pour une cycline. Cette protéine fait partie de la famille des AAA et nous l'avons donc appelée LpAAA. Parmi tous les criblages fonctionnels de *S. cerevisiae* mutant pour ses cyclines avec des banques d'ADNc d'autres organismes publiés, il n'est rapporté que l'isolement de cyclines, à l'exception d'une CDK de Drosophile. La découverte d'une protéine non-cycline qu'est LpAAA était étonnante et représentait potentiellement un nouvel outil pour l'étude du mécanisme de contrôle du point de transition START de la levure bourgeonnante. Nous avons donc décidé de découvrir comment LpAAA arrivait à faire continuer le cdc de la levure au-delà du point START en condition d'absence de cyclines G1/S.

Les mécanismes de contrôle de la transition G1/S sont assez bien compris chez *S. cerevisiae*. À partir des connaissances actuelles, nous avons émis trois hypothèses selon lesquelles LpAAA pourrait faire surpasser le manque de cyclines G1/S et nous les avons mises à l'épreuve. Sachant qu'un quadruple mutant pour les gènes *CLN1*, *CLN2*, *CLN3* et *SIC1* est viable, nous avons testé la capacité de LpAAA à inhiber ou à compétitionner avec la CKI Sic1 dans le triple mutant *cln1Δ*, *cln2Δ* et *cln3Δ*. L'expression ou non de LpAAA ne change en rien les niveaux d'expression de Sic1 nécessaires à l'inhibition de la croissance, tel que modulé par un gradient de glucose inhibiteur du promoteur Gal chez un triple mutant *cln1Δ*, *cln2Δ* et *cln3Δ* avec *SIC1* sous promoteur Gal. LpAAA agit donc indépendamment de l'activité de Sic1.

La deuxième possibilité d'action de LpAAA aurait pu être que cette protéine non-cycline arrive quand même à lier et activer la CDK Cdc28, tout comme le fait une cycline. En effet, des protéines telles que p35 et Ringo/Speedy, n'étant pas considérées comme des cyclines, arrivent à lier et activer des CDKs. Toutefois, ces protéines possèdent une structure secondaire très similaire aux cyclines, formant possiblement un domaine ressemblant à un repliement-cycline. LpAAA arrive à lier faiblement Cdc28 dans un essai deux-hybrides, tout comme doivent le faire les cyclines, mais est dépourvue d'une structure secondaire ressemblant à un repliement-cycline. Aussi, LpAAA n'arrive pas à compléter le quadruple mutant *cln1Δ*, *cln2Δ*, *cln3Δ* et *clb5Δ*, tandis que la cycline authentique LpCyc1 y arrive. Étant donné que la surexpression d'une cycline arrive à compléter ce quadruple mutant mais que la surexpression de LpAAA n'y arrive pas, il est peu probable que LpAAA active Cdc28 directement comme le fait une cycline.

Le fait que LpAAA puisse compléter le triple mutant *cln1Δ*, *cln2Δ* et *cln3Δ* mais pas le quadruple mutant *cln1Δ*, *cln2Δ*, *cln3Δ* et *clb5Δ* nous donnait une forte évidence génétique que la fonction de LpAAA était liée à *CLB5*. Il est à noter que la cycline Clb5 avait originellement été isolée d'un criblage de gènes de *S. cerevisiae* complétant l'absence des 3 cyclines G1/S. Ainsi, il était possible que LpAAA affecte l'expression de *CLB5* endogène au triple mutant *cln1Δ*, *cln2Δ* et *cln3Δ*. En confirmation de cette hypothèse, une plus grande accumulation de *CLB5* est détectée dans les lignées de levures exprimant LpAAA par analyses Northern. Nous avons également pu montrer par des Northern sur d'autres gènes que cette activation de la transcription est probablement liée à l'activation du facteur de transcription SBF et non MBF, les deux facteurs de transcription connus de *CLB5*.

Puisque les protéines AAA sont reconnues entre autres comme ayant un rôle de remodelage de la structure tridimensionnelle des protéines, nous proposons que LpAAA puisse activer la transcription de *CLB5* en remodelant et inactivant un inhibiteur du facteur de transcription SBF. Or, Whi5 a récemment été identifiée comme inhibiteur du facteur de transcription SBF. Cet inhibiteur semble avoir un rôle analogue à la protéine de mammifères Rb qui lie et inactive le facteur de transcription E2F (Cross et Roberts 2001), responsable de l'initiation de la transcription des gènes en G1/S permettant la poursuite du cdc. Il est donc tentant de spéculer que LpAAA puisse inactiver Whi5. Nous ne pouvons cependant pas nous prononcer sur la possibilité qu'un tel remodelage de Whi5 ait effectivement lieu chez la levure de type sauvage. Il y a plusieurs protéines AAA propres à la levure bourgeonnante, mais aucune d'entre elles ne présente d'homologie frappante envers LpAAA. Nous ne pouvons pas non plus impliquer LpAAA dans le contrôle du cdc chez les dinoflagellés. L'absence de techniques d'obtention d'organismes transgéniques et le manque de données de séquences chez les dinoflagellés (dont l'homologue de la protéine Rb) nous empêche de tester le rôle proposé de LpAAA chez *Lingulodinium*. Étant donné l'état de nos connaissances du cdc chez les dinoflagellés, on ne peut pas non plus exclure qu'il se pourrait que LpAAA ait une activité similaire chez *Lingulodinium* à celle que nous avons découverte chez la levure bourgeonnante.

Afin de contourner les difficultés rencontrées pour l'isolement de la CDK1 de *Lingulodinium* par criblage génétique, nous avons entrepris une purification chromatographique de cette kinase pensant qu'elle puisse être en complexe avec la cycline. Après l'utilisation d'une colonne échangeuse d'anions et une colonne de filtration sur gel, un enrichissement partiel de LpCyc1 d'un facteur d'environ 80 fois a été atteint. L'analyse des protéines purifiées montrait un patron trop complexe

pour envisager de microséquencer toutes les protéines d'environ 34 kDa, la taille attendue des CDKs. Nous avons donc décidé d'utiliser un anticorps anti-PSTAIRE pour voir si nous pouvions diagnostiquer laquelle des protéines était celle que nous recherchions. L'anticorps anti-PSTAIRE reconnaît une protéine de 34 kDa par SDS-PAGE, taille compatible avec une CDK. Cette protéine reconnue semble coéluer avec LpCyc1 seulement avec la colonne échangeuse d'anions et pas celle de filtration sur gel. Aussi, en séparant les protéines totales de *Lingulodinium* directement sur une colonne de filtration sur gel, la protéine reconnue par l'anticorps anti-PSTAIRE élue à une taille d'environ 34 kDa, clairement séparée de LpCyc1 qui fait partie d'un complexe éluant aux alentours de 160 kDa.

La dissociation des signaux immunoréactifs anti-PSTAIRE et anti-LpCyc1 était surprenante mais la réaction spécifique envers l'anticorps anti-PSTAIRE et sa taille compatible avec celle des CDKs nous ont convaincu d'entreprendre son identification par microséquençage. La séquence obtenue couvre près de 30% de la protéine attendue et nous confirme que nous avons bel et bien isolé une CDK. Malheureusement, de nombreuses tentatives pour cloner un ADNc codant pour cette protéine ont échoué.

En comparant la séquence disponible de cette CDK avec les autres CDKs d'organismes exhaustivement séquencés, nous trouvons systématiquement plus d'homologie entre notre CDK et la CDK5. Nous avons donc appelé cette protéine LpCDK5-like. Les CDK1 et CDK5 sont très proches phylogénétiquement l'une de l'autre mais seule la CDK1 est impliquée dans les étapes de transition du cycle cellulaire. Les CDK5 chez les mammifères sont impliquées dans le métabolisme des neurones et pas du tout dans le cycle cellulaire. L'homologue de levure de la CDK5 est la protéine Pho85 qui est impliquée, entre autres, dans la régulation de la transcription amenant un métabolisme du phosphate plus efficace. Finalement,

nous ne notons aucun changement des points isoélectriques de LpCDK5-like dans le temps par analyses Western sur gel SDS-PAGE bidimensionnels. Les CDKs impliquées à la transition mitotique subissent une phosphorylation activatrice ainsi qu'une déphosphorylation activatrice. L'homologie de LpCDK5-like envers les CDK5 de même qu'une absence de changements dans son état de phosphorylation au moment de la mitose nous fait conclure que nous avons isolé une CDK non-reliée au contrôle du cdc. La stratégie d'isolement de la CDK1 en purifiant LpCyc1 reste quand même une stratégie valide. D'ailleurs, le poids moléculaire de 160 kDa d'éluion de LpCyc1 après filtration sur gel, alors que cette protéine fait seulement 68 kDa, nous laisse croire qu'il est toujours possible de purifier les protéines associées à cette cycline. Il ne faudrait pas cette fois-ci se fier seulement à une liaison à un anticorps anti-PSTAIRE pour choisir quelle protéine séquencer et probablement ajouter une ou deux autres étapes de purification chromatographique. La récente possibilité d'effectuer le microséquençage de protéines au sein de notre propre université, à des coûts 20 à 30 fois inférieurs qu'auparavant, rend maintenant cette approche faisable.

En 2007, la révolution génomique que le monde de la biologie subit commence à peine à rejoindre les dinoflagellés. On retrouve désormais plus de 50000 séquences d'ADN de dinoflagellés sur Genbank. Les espèces pour lesquelles on retrouve le plus de séquences d'ADN disponibles publiquement sont indiquées au Tableau 3 (p.140). Plus de 90% de ces séquences proviennent de plusieurs projets de séquençage d'ESTs (Bachvaroff, Concepcion et al. 2004; Hackett, Yoon et al. 2004; Tanikawa, Akimoto et al. 2004; Lidie, Ryan et al. 2005; Patron, Waller et al. 2005) ainsi que deux projets toujours en cours du Dr. Patrick Keeling et du Dr. David Yellowlees (voir Tableau 4, p.141)

	"CoreNucleotide"	EST	Total
<i>Alexandrium catenella</i>	134	1	135
<i>Alexandrium tamarense</i>	208	10885	11093
<i>Amphidinium carterae</i>	91	3381	3472
<i>Crypthecodinium cohnii</i>	79	29	108
<i>Gymnodinium beii</i>	163	0	163
<i>Heterocapsa triquetra</i>	158	6807	6965
<i>Karenia brevis</i>	105	6986	7091
<i>Karlodinium micrum</i>	144	16532	16676
<i>Lingulodinium polyedrum</i>	22	3631	3653
<i>Pfiesteria piscicida</i>	349	0	349
<i>Prorocentrum donghaiense</i>	19	306	325
<i>Prorocentrum minimum</i>	168	0	168
<i>Pyrocystis lunula</i>	26	306	332
<i>Symbiodinium sp. C3</i>	20	2704	2724

Tableau 3 Nombre de séquences nucléotidiques disponibles sur GenBank par espèces de dinoflagellés.

Seules les espèces pour lesquelles plus de 100 séquences au total sont disponibles sont indiquées. Les espèces pour lesquelles il y a plus de 1000 séquences sont en caractère gras. CoreNucleotide : séquences qui ne sont pas issues d'ESTs; données disponibles au 2 juillet 2007.

	Auteurs	# ESTs	Contigs	Norm.	Extr.
<i>Alexandrium tamarense</i>	Hackett 2004	10632	6480	Oui	3'
<i>Amphidinium carterae</i>	Bachvaroff 2004	3380	2143		5' et 3'
<i>Heterocapsa triquetra</i>	Patron 2005	6765	2022		5'
<i>Karenia brevis</i>	Lidie 2005	7001	5280		5'
<i>Karlodinium micrum</i>	Keeling, en cours	16532	?		?
<i>L. polyedrum</i>	Tanikaya 2004	4324	2111	Oui	5'
<i>L. polyedrum</i>	Bachvaroff 2004	1519	1012		5' et 3'
<i>Symbiodinium sp. C3</i>	Yellowlees, en cours	2704	?	Oui	3'

Tableau 4 Projets de séquençage d'ESTs de dinoflagellés publiés ou en cours de réalisation.

La normalisation (Norm.) des ADNc, avant leur clonage pour séquençage, est indiquée, de même que l'extrémité (Extr.) des clones séquencés.

Ayant maintenant accès à ces données, il est possible de voir si l'approche par complémentation fonctionnelle que nous avons développée était plus appropriée à la recherche de composantes du cdc des dinoflagellés qu'une approche génomique plus empirique. Parmi les 58000 séquences disponibles de dinoflagellés, on ne retrouve aucune séquence encodant un homologue des régulateurs classiques Wee1 et Cdc25 de la levure fissipare. Aussi, outre la séquence d'ADN de LpCyc1 que nous avons découverte, deux autres séquences codent pour une cycline : CK432882 et KML00011220. CK432882 d'*Alexandrium tamarense*, à cause de sa très grande similarité de séquence avec LpCyc1, est probablement l'équivalent de LpCyc1 chez *Alexandrium*. Toutefois, si nous avons eu seulement cet EST d'*Alexandrium* sans pouvoir comparer sa séquence avec celle de LpCyc1, l'identification de cette séquence en tant que cycline aurait pu être manquée. En effet, un BLASTX de cette séquence donne une valeur E de seulement 0.002 envers une cycline d'euglène. Quant à KML00011220, elle possède un domaine de repliement-cycline atypique qui n'a pas encore été associé à une protéine ayant un rôle défini au cours de cycle cellulaire. Pour ce qui est de CDK1, une séquence de *Karlodinium micrum* (KME00004803) encode sans équivoque une kinase homologue. Ainsi, le séquençage d'ESTs commence à mettre à jour des acteurs du cdc de dinoflagellés. Toutefois, il aura fallu plus de 50000 séquences pour trouver qu'une seule CDK et une seule cycline liée au cdc. La complémentation fonctionnelle semble donc être une technique demandant moins de ressources que les projets de génération d'ESTs. Aussi, sa propriété de pouvoir faire découvrir des fonctionnalités différentes et inattendues aux gènes isolés autrement que simplement par comparaison de séquences, tel que ça a été le cas pour LpAAA, rend cet outil précieux.

Il est indéniable que la disponibilité d'outils génomiques plus complets sur les dinoflagellés faciliterait par beaucoup l'étude de leur cycle cellulaire. Par contre, avec un organisme possédant 30 fois plus d'ADN que l'humain, seule une analyse des séquences transcrites semble être envisageable à court terme. Dans un contexte où il faut générer plus de 58000 ESTs pour trouver seulement 2 intervenants du cdc, il faudrait prévoir un nombre de séquences beaucoup plus grand pour espérer tous les trouver. Une nouvelle méthode de séquençage, mise au point par la compagnie 454 Life Sequences, permet justement la génération de près de 400000 séquences en moins d'une semaine, réduisant les coûts traditionnels par paires de bases d'un facteur de près de 50. Ces séquences sont longues de 300 nucléotides en moyenne, dans le cas d'organismes A-T riches ou G-C riches tels que *Lingulodinium*, permettant une identification des clones par BLASTX. Le grand nombre de séquences générées par cette technique, par comparaison aux ESTs, augmenterait de beaucoup les chances de repérer une séquence rare au sein d'une population d'ADNc, normalisée ou non. De plus, puisque la génération des fragments d'ADN à séquencer se fait suite à un bris mécanique par nébulisation, le séquençage plus fréquent de sections codantes et non pas de régions non-traduites faciliterait d'autant plus l'identification de ces fragments. Finalement, avec une telle technique, l'établissement d'un transcriptome complet d'un dinoflagellé semble pour la première fois à notre portée.

Dans le futur, il serait intéressant de savoir quels pourraient être les substrats de MPF chez les dinoflagellés par une recherche des protéines contenant la séquence consensus de phosphorylation par CDK1. En effet, il est difficile de croire que la phosphorylation de certains substrats classiques, tels que les lamines nucléaires, les histones et les condensines, ait lieu chez un organisme

à la mitose fermée et à l'ADN constamment condensé. On peut penser que la phosphorylation des MAPs et de certains types de lamines nucléaires pourrait expliquer le fonctionnement biochimique d'établissement d'invaginations à travers du noyau à la mitose de même que la mise en place de l'attachement des chromosomes à la paroi interne du noyau. Les dinoflagellés étant la seule classe d'organisme à avoir une dinomitose, ce mécanisme doit forcément leur être propre.

Nous ne savons toujours pas quel est le mécanisme de contrôle du rythme circadien de division cellulaire. Jusqu'à présent, parmi LpCyc1, LpAAA et LpCDK5-like, seule la cycline constitue un régulateur du cdc dont une caractérisation chez *Lingulodinium* est en accord avec un contrôle du cdc. Toutefois, son expression semble être plus en accord avec un contrôle par le cycle cellulaire que par un cycle circadien.

Avec comme objectif à très long terme l'établissement d'une technique permettant de détecter la potentialité dans un échantillon marin de l'apparition d'une marée rouge, un anticorps anti-LpCyc1 ou encore un système d'amplification par RT-PCR du transcrite LpCyc1 pourrait peut-être servir d'outil pour mesurer la vitesse de croissance de *Lingulodinium*. Avec la découverte d'un EST d'*Alexandrium* à la séquence des plus similaires à LpCyc1, on peut même penser qu'un tel système puisse être utilisé pour mesurer l'activité du cdc de tous les dinoflagellés; quoique la présence universelle de LpCyc1 chez tous les dinoflagellés n'ait pas encore été démontrée. Aussi, s'il s'avérait que le rôle proposé de LpAAA de remodelage d'un inhibiteur d'entrée en phase G1/S, tel que Whi5 ou RB, soit effectivement vérifié chez les dinoflagellés, son potentiel d'outil de détection de HABs en devenir serait très grand. En effet, on s'explique encore mal pourquoi les dinoflagellés ont un taux de croissance très élevé dans certaines conditions. Peut-être que LpAAA, surexprimée lorsque certaines conditions se

présentent, permet la surpopulation explosive des HABs, par analogie à l'apparition d'un cancer chez les mammifères causé par un mauvais fonctionnement de RB. Finalement, lorsque nous aurons une idée d'ensemble de tous les mécanismes biochimiques du cycle cellulaire des dinoflagellés, peut-être nous sera-t-il possible de produire un inhibiteur spécifique d'une réaction clé du cycle cellulaire et d'effectivement utiliser cet inhibiteur pour contrôler l'apparition de marées rouges indésirables.

6 Bibliographie

- Abraham, R. T., M. Acquarone, et al. (1995). "Cellular effects of olomoucine, an inhibitor of cyclin-dependent kinases." Biol Cell **83**(2-3): 105-20.
- Agatep, R., R. D. Kirkpatrick, et al. (1998). "Transformation of *Saccharomyces cerevisiae* by the lithium acetate/single-stranded carrier DNA/polyethylene glycol (LiAc/ss-DNA/PEG) protocol." Technical Tips Online (<http://tto.trends.com>).
- Alberts, B., A. Johnson, et al. (2002). Molecular Biology of the Cell. New York, Garland Science.
- Altschul, S. F., T. L. Madden, et al. (1997). "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs." Nucleic Acids Res **25**(17): 3389-402.
- Amon, A., U. Surana, et al. (1992). "Regulation of p34^{CDC28} tyrosine phosphorylation is not required for entry into mitosis in *S. cerevisiae*." Nature **355**(6358): 368-71.
- Asano, S., J. E. Park, et al. (2005). "Concerted mechanism of Swi1/Wee1 regulation by multiple kinases in budding yeast." EMBO J. **24**(12): 2194-2204.
- Bachvaroff, T. R., G. T. Concepcion, et al. (2004). "Dinoflagellate Expressed Sequence Tag Data Indicate Massive Transfer of Chloroplast Genes to the Nuclear Genome." Protist **155**(1): 65-78.
- Bae, Y. M. and J. W. Hastings (1994). "Cloning, sequencing and expression of dinoflagellate luciferase DNA from a marine alga, *Gonyaulax polyedra*." Biochimica et Biophysica Acta **1219**(2): 449-456.
- Baldauf, S. L., A. J. Roger, et al. (2000). "A kingdom-level phylogeny of eukaryotes based on combined protein data." Science **290**(5493): 972-7.
- Barbier, M., M. Albert, et al. (1995). "Cell cycle regulation of the primitive dinoflagellate *Cryptocodinium cohnii* biebeler - evidence for the presence of an homolog of cyclin b." Biology of the Cell **84**(1-2): 35-42.
- Barbier, M., M. L. Geraud, et al. (1998). "Colocalization of the cyclin b homologue p56 and beta-tubulin during the cell cycle in a unicellular eucaryote dinoflagellate." Biology of the Cell **90**(1): 63-76.
- Barbier, M., T. A. Leighfield, et al. (2003). "Permanent expression of a cyclin B homologue in the cell cycle of the dinoflagellate *Karenia brevis*." Journal of Eukaryotic Microbiology **50**(2): 123-131.
- Bean, J. M., E. D. Siggia, et al. (2005). "High functional overlap between MluI cell-cycle box binding factor and Swi4/6 cell-cycle box binding factor in the G1/S transcriptional program in *Saccharomyces cerevisiae*." Genetics **171**(1): 49-61.
- Belmont, A. S. (2006). "Mitotic chromosome structure and condensation." Current Opinion in Cell Biology **18**(6): 632-638.
- Bertomeu, T. and D. Morse (2004). "Isolation of a dinoflagellate mitotic cyclin by functional complementation in yeast." Biochemical & Biophysical Research Communications **323**(4): 1172-1183.

- Bhaud, Y., M. Barbier, et al. (1994). "A detailed study of the complex cell cycle of the dinoflagellate *Cryptothecodinium cohnii* biecheler and evidence for variation in histone h1 kinase activity." Journal of Eukaryotic Microbiology **41**(5): 519-526.
- Bhaud, Y., D. Guillebault, et al. (2000). "Morphology and behaviour of dinoflagellate chromosomes during the cell cycle and mitosis." Journal of Cell Science **113**(7): 1231-1239.
- Bhaud, Y., J.-M. Salmon, et al. (1991). "The Complex Cell Cycle of the Dinoflagellate Protoctist *Cryptothecodinium Cohnii* as Studied In Vivo and by Cytofluorimetry." J Cell Sci **100**(3): 675-682.
- Bloom, J. and F. R. Cross (2007). "Multiple levels of cyclin specificity in cell-cycle control." Nat Rev Mol Cell Biol **8**(2): 149-160.
- Booher, R. N., R. J. Deshaies, et al. (1993). "Properties of *Saccharomyces cerevisiae* wee1 and its differential regulation of p34CDC28 in response to G1 and G2 cyclins." EMBO J **12**(9): 3417-3426.
- Bouquin, N., Y. Barral, et al. (2000). "Regulation of cytokinesis by the Elm1 protein kinase in *Saccharomyces cerevisiae*." Journal of Cell Science **113**(8): 1435-1445.
- Cavalier-Smith, T. (1993). "Kingdom protozoa and its 18 phyla." Microbiol Rev **57**(4): 953-94.
- Chatton, E. (1920). "Les péridiniens parasites. Morphologie, reproduction, éthologie." Arch. Zool. Exp. Gen. **59**: 1-475.
- Cho, R. J., M. J. Campbell, et al. (1998). "A genome-wide transcriptional analysis of the mitotic cell cycle." Mol Cell **2**(1): 65-73.
- Chudnovsky, Y., J. Li, et al. (2002). "Cloning, expression, and characterization of a histone-like protein from the marine dinoflagellate *Lingulodinium polyedrum* (Dinophyceae)." J. Phycology **38**: 543-550.
- Colette, G. (1984). "The fifth base: A natural feature of dinoflagellate DNA." Origins of Life and Evolution of Biospheres (Formerly Origins of Life and Evolution of the Biosphere) **V13**(3): 195-203.
- Costanzo, M., J. L. Nishikawa, et al. (2004). "CDK activity antagonizes Whi5, an inhibitor of G1/S transcription in yeast." Cell **117**(7): 899-913.
- Costas, E. and V. Goyanes (2005). "Architecture and evolution of dinoflagellate chromosomes: an enigmatic origin." Cytogenet Genome Res **109**: 268-275.
- Cross, F. R. (1995). "Starting the cell cycle - what's the point." Current Opinion in Cell Biology **7**(6): 790-797.
- Cross, F. R. and M. D. Jacobson (2000). "Conservation and function of a potential substrate-binding domain in the yeast Clb5 B-type cyclin." Mol Cell Biol **20**(13): 4782-90.
- Cross, F. R. and K. Levine (1998). "Molecular evolution allows bypass of the requirement for activation loop phosphorylation of the Cdc28 cyclin-dependent kinase." Mol Cell Biol **18**(5): 2923-31.
- Cross, F. R. and J. M. Roberts (2001). "Retinoblastoma protein: Combating algal bloom." Current Biology **11**(20): R824-R827.
- Daugbjerg, N., G. Hansen, et al. (2000). "Phylogeny of some of the major genera of dinoflagellates based on ultrastructure and partial LSU rDNA sequence data,

- including the erection of three new genera of unarmoured dinoflagellates." Phycologia **39**(4): 302-317.
- Day, I. S., A. S. Reddy, et al. (1996). "Isolation of a new mitotic-like cyclin from Arabidopsis: complementation of a yeast cyclin mutant with a plant cyclin." Plant Mol Biol **30**(3): 565-75.
- de Bruin, R. A. M., W. H. McDonald, et al. (2004). "Cln3 activates G1-specific transcription via phosphorylation of the SBF transcription bound repressor Whi5." Cell **117**(7): 887-898.
- Dhavan, R. and L. H. Tsai (2001). "A decade of CDK5." Nat Rev Mol Cell Biol **2**(10): 749-59.
- Dodge, J. D. (1965). "Chromosome structure in the dinoflagellate and the problem of the mesokaryotic cell." Excerpta med. int. Congr. Ser. **91**: 339.
- Dodge, J. D., Ed. (1966). The Dinophyceae. The chromosomes of the algae.
- Donaldson, A. D. and J. J. Blow (1999). "The regulation of replication origin activation." Current Opinion in Genetics & Development **9**(1): 62-68.
- Enoch, T. and P. Nurse (1990). "Mutation of fission yeast cell cycle control genes abolishes dependence of mitosis on DNA replication." Cell **60**(4): 665-73.
- Epstein, C. B. and F. R. Cross (1992). "CLB5: a novel B cyclin from budding yeast with a role in S phase." Genes & Development **6**(9): 1695-1706.
- Espinoza, F. H., J. Ogas, et al. (1994). "Cell cycle control by a complex of the cyclin hcs26 (pcl1) and the kinase pho85." Science **266**(5189): 1388-1391.
- Evans, T., E. Rosenthal, et al. (1983). "Cyclin: a protein specified by maternal mRNA in sea urchin eggs that is destroyed at each cleavage division." Cell **33**: 389-396.
- Ferby, I., M. Blazquez, et al. (1999). "A novel p34(cdc2)-binding and activating protein that is necessary and sufficient to trigger G(2)/M progression in Xenopus oocytes." Genes Dev **13**(16): 2177-89.
- Ferrari, S. (2006). "Protein kinases controlling the onset of mitosis." Cellular & Molecular Life Sciences **63**(7-8): 781-795.
- Fitch, I., C. Dahmann, et al. (1992). "Characterization of four B-type cyclin genes of the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*." Mol Biol Cell **3**(7): 805-18.
- Friedman, M. A. and B. E. Levin (2005). "Neurobehavioral effects of harmful algal bloom (HAB) toxins: a critical review." J Int Neuropsychol Soc **11**(3): 331-8.
- Fritz, L. and R. E. Treimer (1983). "An ultrastructural study of mitosis in a marine dinoflagellate *Prorocentrum minimum*." J. Protozool. **30**: 437-444.
- Frohlich, K. U. (2001). "An AAA family tree." J Cell Sci **114**(Pt 9): 1601-2.
- Gautier, J., C. Norbury, et al. (1988). "Purified maturation-promoting factor contains the product of a xenopus homolog of the fission yeast cell cycle control *cdc2+*." Cell **54**: 433-439.
- Gautier, J. J., J. J. Minshull, et al. (1990). "Cyclin is a component of maturation-promoting factor from Xenopus." Cell **60**(3): 487-494.
- Gietz, R. D. and R. A. Woods (2002). "Transformation of yeast by lithium acetate/single-stranded carrier DNA/polyethylene glycol method." Methods Enzymol **350**: 87-96.
- Glotzer, M. M., A. A. W. Murray, et al. (1991). "Cyclin is degraded by the ubiquitin pathway." Nature **349**(6305): 132-138.

- Guillebault, D., S. Sasorith, et al. (2002). "A new class of transcription initiation factors, intermediate between TATA box-binding proteins (TBPs) and TBP-like factors (TLFs), is present in the marine unicellular organism, the dinoflagellate *Cryptothecodinium cohnii*." Journal of Biological Chemistry **277**(43): 40881-40886.
- Haase, S. B. and S. I. Reed (1999). "Evidence that a free-running oscillator drives G1 events in the budding yeast cell cycle." Nature **401**(6751): 394-7.
- Hackett, J. D., D. M. Anderson, et al. (2004). "Dinoflagellates: a remarkable evolutionary experiment." Am. J. Bot. **91**(10): 1523-1534.
- Hackett, J. D., H. S. Yoon, et al. (2004). "Migration of the plastid genome to the nucleus in a peridinin dinoflagellate." Curr Biol **14**(3): 213-8.
- Hadwiger, J. A., C. Wittenberg, et al. (1989). "A family of cyclin homologs that control the G1 phase in yeast." Proc Natl Acad Sci U S A **86**(16): 6255-9.
- Hanson, P. I. and S. W. Whiteheart (2005). "AAA+ proteins: have engine, will work." Nat Rev Mol Cell Biol **6**(7): 519-29.
- Hartwell, L. and T. Weinert (1989). "Checkpoints: controls that ensure the order of cell cycle events." Science **246**: 629-634.
- Hartwell, L. H. (1967). "Macromolecule Synthesis in Temperature-sensitive Mutants of Yeast." J. Bacteriol. **93**(5): 1662-1670.
- Hastings, J. W. (2001). "The Colin S. Pittendrigh Lecture - Presented at the Seventh Meeting of the Society for Research on Biological Rhythms, Amelia Island, Florida, May 13, 2000 - Fifty years of fun." Journal of Biological Rhythms **16**(1): 5-18.
- Herzog, M. and M.-O. Soyer (1981). "Distinctive features of dinoflagellate chromatin. Absence of nucleosomes in a primitive species *Prorocentrum micans*." Eur. J. Cell Biol. **23**: 295-302.
- Hofmann, E., P. M. Wrench, et al. (1996). "Structural basis of light harvesting by carotenoids: peridinin-chlorophyll-protein from *Amphidinium carterae*." Science **272**(5269): 1788-91.
- Homma, K. and J. W. Hastings (1988). "Cell cycle-synchronization of *Gonyaulax polyedra* by filtration: quantized generation times." J. Biol. Rhythms **3**: 49-58.
- Homma, K. and J. W. Hastings (1989). "Cell growth kinetics, division asymmetry and volume control at division in the marine dinoflagellate *Gonyaulax polyedra*: a model of circadian clock control of the cell cycle." J Cell Sci **92**(2): 303-318.
- Homma, K. and J. W. Hastings (1989). "The S phase is discrete and is controlled by the circadian clock in the marine dinoflagellate *Gonyaulax polyedra*." Experimental Cell Research **182**(2): 635-644.
- Howard, A. and S. R. Pelc (1951). "Nuclear incorporation of ³²P as demonstrated by autoradiographs." Exp. Cell Res. **2**(178-187).
- Iyer, V. R., C. E. Horak, et al. (2001). "Genomic binding sites of the yeast cell-cycle transcription factors SBF and MBF." Nature **409**(6819): 533-538.
- James, P., J. Halladay, et al. (1996). "Genomic libraries and a host strain designed for highly efficient two-hybrid selection in yeast." Genetics **144**(4): 1425-36.
- Jedrzejewski, M. J. and W. J. Huang (2003). "Bacillus species proteins involved in spore formation and degradation: from identification in the genome, to sequence analysis,

- and determination of function and structure." Crit Rev Biochem Mol Biol **38**(3): 173-98.
- Jeffrey, P. D., A. A. Ruso, et al. (1995). "Mechanism of cdk activation revealed by the structure of a cyclin A-cdk2 complex." Nature **376**(6538): 313-320.
- Johnson, C. H., J. F. Roeber, et al. (1984). "Circadian Changes in Enzyme Concentration Account for Rhythm of Enzyme Activity in *Gonyaulax*." Science **223**(4643): 1428-1430.
- Johnson, R. T. and P. N. Rao (1970). "Mammalian cell fusion: induction of premature chromosome condensation in interphase nuclei." Nature **226**: 717-722.
- Jones, J., P. Dunsmuir, et al. (1985). "High level expression of introduced chimeric genes in regenerated transformed plants." EMBO J. **4**: 2411-2418.
- Kaelin, W. G. J. (1999). "Functions of the retinoblastoma protein." Bioessays **21**(11): 950-958.
- Karaiskou, A., L. H. Perez, et al. (2001). "Differential regulation of Cdc2 and Cdk2 by RINGO and cyclins." J Biol Chem **276**(38): 36028-34.
- Kobayashi, H., E. Stewart, et al. (1992). "Identification of the domains in cyclin A required for binding to, and activation of, p34cdc2 and p32cdk2 protein kinase subunits." Mol. Biol. Cell **3**(11): 1279-1294.
- Koff, A., F. Cross, et al. (1991). "Human cyclin E, a new cyclin that interacts with two members of the CDC2 gene family." Cell **66**(6): 1217-28.
- Kozak, M. (1989). "The scanning model for translation: an update." J. Cell Biol. **108**: 229-241.
- Lahue, E. E., A. V. Smith, et al. (1991). "A novel cyclin gene from *Drosophila* complements CLN function in yeast." Genes Dev **5**(12A): 2166-75.
- Le, Q. H., P. Markovic, et al. (1997). "Structure and organization of the peridinin chlorophyll a binding protein gene in *Gonyaulax polyedra*." Molecular & General Genetics **255**(6): 595-604.
- Lee, D.-H., M. Mittag, et al. (1993). "Molecular cloning and genomic organization of a gene for luciferin-binding protein from the dinoflagellate *Gonyaulax polyedra*." Journal of Biological Chemistry **268**(12): 8842-8850.
- Lee, M. and P. Nurse (1988). "Cell cycle control genes in fission yeast and mammalian cells." Trends in Genetics **4**: 287-290.
- Lenormand, J. L., R. W. Dellinger, et al. (1999). "Speedy: a novel cell cycle regulator of the G2/M transition." Embo J **18**(7): 1869-77.
- Leopold, P. and P. H. O'Farrell (1991). "An evolutionarily conserved cyclin homolog from *Drosophila* rescues yeast deficient in G1 cyclins." Cell **66**(6): 1207-16.
- Leveson, A., F. Wong, et al. (1997). "Cyclins in a dinoflagellate cell cycle." Molecular Marine Biology & Biotechnology **6**(3): 172-179.
- Lew, D. D. J., V. V., et al. (1991). "Isolation of three novel human cyclins by rescue of G1 cyclin (Cln) function in yeast." Cell **66**(6): 1197-1206.
- Lew, D. J., V. Dulic, et al. (1991). "Isolation of three novel human cyclins by rescue of G1 cyclin (Cln) function in yeast." Cell **66**(6): 1197-206.
- Lew, J., Q. Q. Huang, et al. (1994). "A brain-specific activator of cyclin-dependent kinase 5." Nature **371**(6496): 423-6.

- Lewin, B. (2004). Genes VIII. Upper Saddle River, Pearson Education.
- Li, L. M. and J. W. Hastings (1998). "The structure and organization of the luciferase gene in the photosynthetic dinoflagellate *Gonyaulax polyedra*." Plant Molecular Biology **36**(2): 275-284.
- Liberzon, A., S. Shpungin, et al. (1996). "Association of yeast SAP1, a novel member of the 'AAA' ATPase family of proteins, with the chromatin protein SIN1." FEBS Lett **388**(1): 5-10.
- Lidie, K. B., J. C. Ryan, et al. (2005). "Gene expression in Florida red tide dinoflagellate *Karenia brevis*: Analysis of an expressed sequence tag library and development of DNA microarray." Marine Biotechnology **7**(5): 481-493.
- Lim, H. H., C. J. Loy, et al. (1996). "Dephosphorylation of threonine 169 of Cdc28 is not required for exit from mitosis but may be necessary for start in *Saccharomyces cerevisiae*." Mol Cell Biol **16**(8): 4573-83.
- Liu, J. and E. T. Kipreos (2000). "Evolution of cyclin-dependent kinases (CDKs) and CDK-activating kinases (CAKs): Differential conservation of CAKs in yeast and metazoa." Molecular Biology & Evolution **17**(7): 1061-1074.
- Lohka, M. M. J., M. M. K. Hayes, et al. (1988). "Purification of maturation-promoting factor, an intracellular regulator of early mitotic events." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **85**(9): 3009-3013.
- Loog, M. and D. O. Morgan (2005). "Cyclin specificity in the phosphorylation of cyclin-dependent kinase substrates." Nature **434**(7029): 104-8.
- Machabee, S., L. Wall, et al. (1994). "Expression and genomic organization of a dinoflagellate gene family." Plant Molecular Biology **25**(1): 23-31.
- Manning, G., D. B. Whyte, et al. (2002). "The protein kinase complement of the human genome." Science **298**(5600): 1912-+.
- Masui, Y. and C. L. Markert (1971). "Cytoplasmic control of nuclear behavior during meiotic maturation of frog oocytes." J. exp. Zool. **177**: 129-146.
- Masumoto, H., S. Muramatsu, et al. (2002). "S-Cdk-dependent phosphorylation of Sld2 essential for chromosomal DNA replication in budding yeast." Nature **415**(6872): 651-655.
- Matsuo, T., S. Yamaguchi, et al. (2003). "Control mechanism of the circadian clock for timing of cell division in vivo." Science **302**(5643): 255-259.
- McGowan, C. H. (2003). "Regulation of the eukaryotic cell cycle." Prog Cell Cycle Res **5**: 1-4.
- McMillan, J. N., M. S. Longtine, et al. (1999). "The morphogenesis checkpoint in *Saccharomyces cerevisiae*: Cell cycle control of Swp1 degradation by Hsl1p and Hsl7p." Molecular & Cellular Biology **19**(10): 6929-6939.
- McMurry, L. and J. W. Hastings (1972). "No desynchronization among four circadian rhythms in the unicellular alga, *Gonyaulax polyedra*." Science **175**: 1137-1139.
- Measday, V. and B. Andrews (1998). "The cyclin family of budding yeast: abundant use of a good idea." Trends in Genetics **14**: 66-72.
- Mendenhall, M. D. and A. E. Hodge (1998). "Regulation of cdc28 cyclin-dependent protein kinase activity during the cell cycle of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*." Microbiology & Molecular Biology Reviews **62**(4): 1191-1243.

- Merckx, A., K. Le Roch, et al. (2003). "Identification and initial characterization of three novel cyclin-related proteins of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*." J Biol Chem **278**(41): 39839-50.
- Mesinger, A. F. and J. F. Case (1992). "Dinoflagellate luminescence increases susceptibility of zooplankton to teleost predation." Marine Biology **112**(2): 207-210.
- Millar, J. J. B., C. C. H. McGowan, et al. (1991). "p80cdc25 mitotic inducer is the tyrosine phosphatase that activates p34cdc2 kinase in fission yeast." The EMBO journal **10**(13): 4301-4309.
- Moore, J. D., J. A. Kirk, et al. (2003). "Unmasking the S-phase-promoting potential of cyclin B1." Science **300**(5621): 987-90.
- Moreno Diaz de la Espina, S., E. Alverca, et al. (2005). "Organization of the genome and gene expression in a nuclear environment lacking histones and nucleosomes: the amazing dinoflagellates." Eur J Cell Biol **84**(2-3): 137-49.
- Moreno, S., J. Hayles, et al. (1989). "Regulation of p34cdc2 protein kinase during mitosis." Cell **58**: 361-372.
- Morgan, D. O. (1997). "Cyclin-dependent kinases: engines, clocks, and microprocessors." Annu Rev Cell Dev Biol **13**: 261-91.
- Morse, D., P. Salois, et al. (1995). "A nuclear-encoded form II RuBisCo in dinoflagellates." Science **265**(5217): 1622-1624.
- Morse, D. D., P. P. M. Milos, et al. (1989). "Circadian regulation of bioluminescence in *Gonyaulax* involves translational control." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **86**(1): 172-176.
- Mumberg, D., R. Muller, et al. (1995). "Yeast vectors for the controlled expression of heterologous proteins in different genetic backgrounds." Gene **156**(1): 119-22.
- Murray, A. W. (2004). "Recycling the cell cycle: Cyclins revisited." Cell **116**(2): 221-234.
- Nash, P., X. Tang, et al. (2001). "Multisite phosphorylation of a CDK inhibitor sets a threshold for the onset of DNA replication." Nature **414**(6863): 514-521.
- Nassoury, N., M. Cappadocia, et al. (2003). "Plastid ultrastructure defines the protein import pathway in dinoflagellates." Journal of Cell Science **116**(14): 2867-2874.
- Nassoury, N., L. Fritz, et al. (2001). "Circadian changes in ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase distribution inside individual chloroplasts can account for the rhythm in dinoflagellate carbon fixation." Plant Cell **13**(4): 923-934.
- Nurse, P. (1990). "Universal control mechanism regulating onset of M-phase." Nature **344**: 503-508.
- Nurse, P. (1994). "Ordering S phase and M phase in the cell cycle." Cell **79**(4): 547-550.
- Obaya, A. J. and J. M. Sedivy (2002). "Regulation of cyclin-Cdk activity in mammalian cells." Cellular & Molecular Life Sciences **59**(1): 126-142.
- Parker, L. L., S. Atherton-Fessler, et al. (1992). "p107wee1 is a dual-specificity kinase that phosphorylates p34cdc2 on tyrosine 15." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **89**(7): 2917-2921.
- Partridge, J. F., G. E. Mikesell, et al. (1997). "Cell cycle-dependent transcription of *cln1* involves *swi4* binding to *mcb*-like elements." Journal of Biological Chemistry **272**(14): 9071-9077.

- Patel, S. and M. Latterich (1998). "The AAA team: related ATPases with diverse functions." Trends Cell Biol **8**(2): 65-71.
- Patron, N. J., R. F. Waller, et al. (2005). "Complex protein targeting to dinoflagellate plastids." J Mol Biol **348**(4): 1015-24.
- Patron, N. J., R. F. Waller, et al. (2005). "Complex Protein Targeting to Dinoflagellate Plastids." Journal of Molecular Biology **348**(4): 1015-1024.
- Peters, J. M. (1999). "Subunits and substrates of the anaphase-promoting complex." Experimental Cell Research **248**(2): 339-349.
- Pines, J. (1995). "Cyclins and cyclin-dependent kinases: a biochemical view." Biochem J. **308**: 697-711.
- Pines, J. (2006). "Mitosis: a matter of getting rid of the right protein at the right time." Trends in Cell Biology **16**(1): 55-63.
- Pines, J. and T. Hunter (1990). "Human cyclin A is adenovirus E1A-associated protein p60 and behaves differently from cyclin B." Nature **346**(6286): 760-763.
- Plaxton, W. C. (1989). "Molecular and immunological characterization of plastid and cytosolic pyruvate kinase isozymes from castor-oil-plant endosperm and leaf." Eur J Biochem **181**(2): 443-51.
- Qi, Z., Q.-Q. Huang, et al. (1995). "Reconstitution of neuronal Cdc2-like kinase from bacteria-expressed Cdk5 and an active fragment of the brain-specific activator: Kinase activation in the absence of Cdk5 phosphorylation." Journal of Biological Chemistry **270**(18): 10847-10854.
- Rae, P. M. (1970). "The nature and processing of ribosomal ribonucleic acid in a dinoflagellate." J. Cell Biol. **46**(1): 106-113.
- Rappas, M., J. Schumacher, et al. (2006). "Structural basis of the nucleotide driven conformational changes in the AAA+ domain of transcription activator PspF." J Mol Biol **357**(2): 481-92.
- Richardson, H., D. J. Lew, et al. (1992). "Cyclin-B homologs in *Saccharomyces cerevisiae* function in S phase and in G2." Genes & Development **6**(11): 2021-34.
- Rizzo, P. (1987). Biochemistry of the dinoflagellate nucleus. The biology of dinoflagellates. F. J. R. Taylor. Oxford, Blackwell Scientific: 143-173.
- Rizzo, P. (1991). "The enigma of the dinoflagellate chromosome." J. Protozool. **38**: 246-252.
- Rodriguez, M., J. W. Cho, et al. (1993). "Evidence for the presence of a cdc2 like protein kinase in the dinoflagellate *Cryptothecodinium cohnii*." J. Eukaryot. Microbiol. **40**(1): 91-96.
- Rosales, J. L. and K. Y. Lee (2006). "Extraneuronal roles of cyclin-dependent kinase 5." Bioessays **28**(10): 1023-1034.
- Sala-Rovira, M., M. L. Geraud, et al. (1991). "Molecular cloning and immunolocalization of two variants of the major basic nuclear protein (HCc) from the histone-less eukaryote *Cryptothecodinium cohnii* (Pyrrophyta)." Chromosoma **100**(8): 510-518.
- Salois, P. and D. Morse (1996). "Do dinoflagellates contain a Cdc2-like protein kinase?" Molecular Marine Biology & Biotechnology **5**(1): 52-61.

- Salois, P. and D. Morse (1997). "Characterization and molecular phylogeny of a protein kinase cDNA from the dinoflagellate *Gonyaulax* (dinophyceae)." Journal of Phycology **33**(6): 1063-1072.
- Samuelsson, G., B. M. Sweeney, et al. (1983). "Changes in photosystem II account for the circadian rhythm in photosynthesis in *Gonyaulax polyedra*." Plant Physiol. **73**: 329-331.
- Sanchez, I. and B. D. Dynlacht (2005). "New insights into cyclins, CDKs, and cell cycle control." Seminars in Cell & Developmental Biology **16**(3): 311-321.
- Sauer, R. T., D. N. Bolon, et al. (2004). "Sculpting the proteome with AAA(+) proteases and disassembly machines." Cell **119**(1): 9-18.
- Schneider, B. L., Q. H. Yang, et al. (1996). "Linkage of replication to start by the Cdk inhibitor Sic1." Science **272**(5261): 560-2.
- Schwob, E., T. Bohm, et al. (1994). "The B-type cyclin kinase inhibitor p40SIC1 controls the G1 to S transition in *S. cerevisiae*." Cell **79**(2): 233-244.
- Sigee, D. C. (1983). "Structural DNA and genetically active DNA in dinoflagellate chromosomes." Biosystems **16**(3-4): 203-210.
- Smith, D. S. and L. H. Tsai (2002). "Cdk5 behind the wheel: a role in trafficking and transport?" Trends in Cell Biology **12**(1): 28-36.
- Smits, V. A. J. and R. H. Medema (2001). "Checking out the G2/M transition." Biochimica et Biophysica Acta - Gene Structure & Expression **1519**(1-2): 1-12.
- Soni, R., J. P. Carmichael, et al. (1995). "A family of cyclin D homologs from plants differentially controlled by growth regulators and containing the conserved retinoblastoma protein interaction motif." Plant Cell **7**(1): 85-103.
- Soyer-Gobillard, M. O., M. L. Geraud, et al. (1990). "Location of B- and Z-DNA in the chromosomes of a primitive eukaryote dinoflagellate." J. Cell Biol. **111**(2): 293-304.
- Soyer-Gobillard, M. O., B. Gillet, et al. (1999). "Dinoflagellate chromosome behaviour during stages of replication." Int Microbiol **2**(2): 93-102.
- Spector, D., Ed. (1984). Dinoflagellates. New York, Academic Press.
- Spector, D., A. Vasconcelos, et al. (1981). "DNA duplication and chromosome structure in the dinoflagellates." Protoplasma **105**: 185-195.
- Spellman, P. T., G. Sherlock, et al. (1998). "Comprehensive identification of cell cycle-regulated genes of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* by microarray hybridization." Mol Biol Cell **9**(12): 3273-97.
- Stein, G. S., R. Baserga, et al. (1998). The Molecular Basis of Cell Cycle and Growth Control. New York.
- Surana, U., H. Robitsch, et al. (1991). "The role of CDC28 and cyclins during mitosis in the budding yeast *S. cerevisiae*." Cell **65**(1): 145-161.
- Sweeney, B. M. and J. W. Hastings (1958). "Rhythmic cell division in populations of *Gonyaulax polyedra*." J. Protozool. **5**: 217-224.
- Tachibana, K., N. Yanagishima, et al. (1987). "Preliminary characterization of maturation-promoting factor from yeast *Saccharomyces cerevisiae*." J. Cell Sci. **88**: 273-281.

- Takaki, T., K. Fukasawa, et al. (2005). "Preferences for Phosphorylation Sites in the Retinoblastoma Protein of D-Type Cyclin-Dependent Kinases, Cdk4 and Cdk6, In Vitro." J Biochem (Tokyo) **137**(3): 381-386.
- Tanikawa, N., H. Akimoto, et al. (2004). "Expressed Sequence Tag Analysis of the Dinoflagellate *Lingulodinium polyedrum* During Dark Phase." Photochemistry and Photobiology **80**(1): 31-35.
- Taroncher-Oldenburg, G. and D. M. Anderson (2000). "Identification and characterization of three differentially expressed genes, encoding S-adenosylhomocysteine hydrolase, methionine aminopeptidase, and a histone-like protein, in the toxic dinoflagellate *Alexandrium fundyense*." Applied & Environmental Microbiology **66**(5): 2105-2112.
- Taylor, F. J. R. and U. Pollinger (1987). Ecology of dinoflagellates. The biology of dinoflagellates. F. J. R. Taylor. Oxford, Blackwell Scientific. **21**: 398-529.
- Toh-e, A. and M. Nishizawa (2001). "Structure and function of cyclin-dependent Pho85 kinase of *Saccharomyces cerevisiae*." Journal of General & Applied Microbiology **47**(3): 107-117.
- Toone, W. M., B. L. Aerne, et al. (1997). "Getting started: regulating the initiation of DNA replication in yeast." Annu Rev Microbiol **51**: 125-49.
- Tsai, L. H., I. Delalle, et al. (1994). "p35 is a neural-specific regulatory subunit of cyclin-dependent kinase 5." Nature **371**(6496): 419-23.
- Tyers, M. (1996). "The cyclin-dependent kinase inhibitor p40(sic1) imposes the requirement for cln g1 cyclin function at start." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **93**(15): 7772-7776.
- Tyers, M., G. Tokiwa, et al. (1993). "Comparison of the *Saccharomyces cerevisiae* G1 cyclins: Cln3 may be an upstream activator of Cln1, Cln2 and other cyclins." EMBO J. **12**(5): 1955-1968.
- Ubersax, J. A., E. L. Woodbury, et al. (2003). "Targets of the cyclin-dependent kinase Cdk1." Nature **425**(6960): 859-864.
- Van de Peer, Y., S. L. Baldauf, et al. (2000). "An updated and comprehensive rRNA phylogeny of (crown) eukaryotes based on rate-calibrated evolutionary distances." J Mol Evol **51**(6): 565-76.
- Van Dolah, F. M. (2000). "Marine algal toxins: origins, health effects, and their increased occurrence." Environ Health Perspect **108 Suppl 1**: 133-41.
- Van Dolah, F. M. and T. A. Leighfield (1999). "Diel phasing of the cell-cycle in the Florida red tide dinoflagellate, *Gymnodinium breve*." Journal of Phycology **35**(6): 1404-1411.
- Van Dolah, F. M., T. A. Leighfield, et al. (1995). "Cell division in the dinoflagellate *Gambierdiscus toxicus* is phased to the diurnal cycle and accompanied by activation of the cell cycle regulatory protein, CDC2 kinase." Journal of Phycology **31**(3): 395-400.
- Verma, R., R. S. Annan, et al. (1997). "Phosphorylation of Sic1p by G1 Cdk Required for Its Degradation and Entry into S Phase." Science **278**(5337): 455-460.
- Vernet, T., D. Dignard, et al. (1987). "A family of yeast expression vectors containing the phage fl intergenic region." Gene **52**: 225-233.

- Vogel, L. and B. Baratte (1996). "Spc1: cdc2 affinity reagent or essential cdk adaptor protein?" Prog Cell Cycle Res **2**: 129-35.
- Vogel L., B. B., Detivaud L., Azzi L., Leopold P. and Meijer L. (2002). "Molecular cloning and characterisation of p15CDK-BP, a novel CDK-binding protein." Biochimica et Biophysica Acta (BBA)/Molecular Cell Research **1589**: 219 - 231.
- Walker, J. E., M. Saraste, et al. (1982). "Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold." Embo J **1**(8): 945-51.
- Wang, Y. and D. Morse (2006). "Rampant polyuridylation of plastid gene transcripts in the dinoflagellate *Lingulodinium*." Nucleic Acids Research **34**(2): 613-619.
- Wargo, M. J. and P. J. Rizzo (2001). "Exception to eukaryotic rules." Science **294**(5551): 2477.
- Weinreich, M., C. Liang, et al. (2001). "Inaugural Article: Binding of cyclin-dependent kinases to ORC and Cdc6p regulates the chromosome replication cycle." PNAS **98**(20): 11211-11217.
- Whitney, S. M., D. C. Shaw, et al. (1995). "Evidence that some dinoflagellates contain a ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase related to that of the alpha-proteobacteria." Proc Biol Sci **259**(1356): 271-5.
- Wijnen, H., A. Landman, et al. (2002). "The G(1) cyclin Cln3 promotes cell cycle entry via the transcription factor Swi6." Mol Cell Biol **22**(12): 4402-18.
- Winzeler, E. A., D. D. Shoemaker, et al. (1999). "Functional Characterization of the *S. cerevisiae* Genome by Gene Deletion and Parallel Analysis." Science **285**(5429): 901-906.
- Wittmann, T., A. Hyman, et al. (2001). "The spindle: a dynamic assembly of microtubules and motors." Nat Cell Biol **3**(1): E28-E34.
- Wong, J. T. Y. and A. C. M. Kwok (2005). "Proliferation of dinoflagellates: blooming or bleaching." Bioessays **27**(7): 730-740.
- Wong, J. T. Y., D. C. New, et al. (2003). "Histone-Like Proteins of the Dinoflagellate *Cryptocodinium cohnii* Have Homologies to Bacterial DNA-Binding Proteins." Eukaryotic Cell **2**(3): 646-650.
- Wysocki, R., A. Javaheri, et al. (2006). "CDK Pho85 targets CDK inhibitor Sic1 to relieve yeast G1 checkpoint arrest after DNA damage." Nature Structural & Molecular Biology **13**(10): 908-914.
- Xiong, Y., T. Connolly, et al. (1991). "Human D-type cyclin." Cell **65**(4): 691-9.
- Yeung, P. K. K., D. C. New, et al. (2000). "The spindle checkpoint in the dinoflagellate *Cryptocodinium cohnii*." Experimental Cell Research **254**(1): 120-129.
- Zhang, H., Y. Hou, et al. (2007). "Spliced leader RNA trans-splicing in dinoflagellates." PNAS **104**(11): 4618-4623.
- Zhang, Z., B. R. Green, et al. (1999). "Single gene circles in dinoflagellate chloroplast genomes." Nature **400**(6740): 155-9.
- Zukerberg, L. R., G. N. Patrick, et al. (2000). "Cables links Cdk5 and c-Abl and facilitates Cdk5 tyrosine phosphorylation, kinase upregulation, and neurite outgrowth." Neuron **26**(3): 633-646.

