

# Etude de la régulation de deux protéines kinases: GSK-3 et polo

Aline Primot

### ▶ To cite this version:

Aline Primot. Etude de la régulation de deux protéines kinases : GSK-3 et polo. Biologie cellulaire. Rennes 1, 2001. Français. NNT : . tel-01117984

# HAL Id: tel-01117984 https://hal.sorbonne-universite.fr/tel-01117984

Submitted on 18 Feb 2015

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers. L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

# Avertissement

Au vu de la législation sur les droits d'auteur, ce travail de thèse demeure la propriété de son auteur, et toute reproduction de cette oeuvre doit faire l'objet d'une autorisation de l'auteur. (cf Loi n°92-597; 1/07/1992. Journal Officiel, 2/07/1992)

100

N° d'ordre de la thèse : 2632

# Thèse

présentée

# DEVANT L'UNIVERSITE DE RENNES 1

pour obtenir

le grade de: Docteur de l'Université de Rennes 1

Mention: Biologie

par

# Aline PRIMOT

Equipe «Cycle Cellulaire»

Station Biologique de Roscoff

dirigée par le Dr Laurent MEIJER (CNRS, UPR 9042)

Ecole doctorale Vie-Agronomie-Santé (VAS)

# Etude de la régulation de deux protéines kinases: GSK-3 et Polo

SOUTENUE LE 3 Décembre 2001 devant la commission d'examen

Composition du jury:

Laurent MEIJER: Directeur de thèse

Patrick CORMIER: Rapporteur

Christian DOERIG: Rapporteur

Michel PHILIPPE: Membre



Pour papa, maman,

Laurent, mon petit Nathan,

Blandine, Céline, Oriane

et mes grand-parents.



# REMERCIEMENTS

Ce travail a été réalisé à la Station Biologique de Roscoff dans l'équipe «Cycle Cellulaire» (UPR 9042, CNRS) dirigée par le Dr Laurent Meijer.

Je tiens à remercier M. André Toulmond, directeur de la Station Biologique, de m'avoir accueillie.

Je remercie également Laurent Meijer de m'avoir permis d'effectuer mon stage de DEA et ma thèse dans son équipe, ainsi que pour son aide et son soutien. Merci beaucoup.

Je remercie très sincèrement Jean-Michel Vierfond, qui malgré son nouvel emploi du temps, a bien voulu être rapporteur. J'espère que cette lecture n'a pas été trop ennuyeuse. Merci beaucoup.

Je voudrais remercier également Christian Gache d'avoir accepté d'être rapporteur. Je sais que votre temps est précieux, merci de m'en avoir accordé.

Je remercie Christian Doerig de s'être si gentiment proposé pour être membre du jury et d'avoir fait le déplacement depuis la capitale. Merci beaucoup. Je suis très reconnaissante à Michel Philippe d'avoir accepté d'être membre du jury. Je sais que vous êtes très sollicité. Merci beaucoup.

Je tiens à remercier également Joël Boustie d'avoir bien voulu être membre du jury et d'apporter un regard extérieur sur ces travaux puisque la biologie moléculaire et la biochimie ne sont pas tout à fait vos domaines de prédilection. Merci beaucoup.

Un grand merci à toute l'équipe «Cycle Cellulaire»: Annie, Armelle, Blandine, Eliane, Eve, Lénaïck, Marie G (dite «La grande Marie»), Marie K (dite «La petite Marie»), Marc, Maryse, Mathieu, Mathilde, Morgan, Sophie. Merci de m'avoir si chaleureusement accueillie et supportée tout au long de ces quatre années. Merci beaucoup pour votre aide, votre soutien et votre amitié. Je vous souhaite à tous beaucoup de réussite et de bonheur.

Je tiens à remercier tout particulièrement Patrick Cormier de m'avoir accordé autant de temps. Je suis sincèrement désolée de n'avoir pu te compter parmis les membres de mon jury. Un grand merci également pour ton soutien et ton aide tout au long de ces années. Merci beaucoup.

Un grand merci à tout le personnel de la Station Biologique. Je ne citerai personne pour n'oublier personne, mais je vous suis très reconnaissante pour la bonne ambiance et l'aide que j'ai pu trouver auprès de chacun d'entre vous. Merci beaucoup.

C'est ainsi que se terminent ces 4 années parmis vous. Merci pour tout,

Aline.

# SOMMAIRE

LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX	5		
ABREVIATIONS			
CHAPITRE I	10		
BIOSYNTHÈSE ET STRUCTURE DE GSK-3			
I. CLONAGE ET BIOCHIMIE DE GSK-3 $\alpha$ et $\beta$	10		
II. REGULATION DE L'ACTIVITE DE GSK-3	10		
III. LES SUBSTRATS DE GSK-3	11		
CHAPITRE II	12		
LES ROLES BIOLOGIQUES DE GSK-3	12		
I. DECOUVERTE DE GSK-3: LA VOIE DE SYNTHESE DU GLYCOGENE	12		
II. LE CYCLE CELLULAIRE	15		
II.1. Généralités	15		
II.1.1. La transition G1/S	16		
II.1.2. La transition G2/M	17		
II.2. Implication de GSK-3 dans la régulation du cycle cellulaire	19		
II.2.1. GSK-3 et la cycline D1	19		
II.2.2. La voie Wnt: implication dans la régulation du cycle cellulaire	19		
II.2.3. Processus cancéreux et GSK-3	24		
III. L'APOPTOSE	27		
III.1. Définition de la mort cellulaire et rôles physiologiques			
III.2. L'apoptose et GSK-3 <b>b</b>			
III.3. Les maladies neurodégénératives			
III.3.1. La maladie d'Alzheimer			

III.3.2. GSK-3 et la maladie d'Alzheimer	
CHAPITRE III	
GSK-3b DE PLASMODIUM FALCIPARUM	
I. LE PALUDISME OU MALARIA	
I.1. Distribution géographique	
I.2. Le parasite, sa transmission et son cycle de reproduction	
II. GSK-3 $\beta$ et le paludisme	44
II.1. Le génome de Plasmodium falciparum	
II.2. GSK-3 de Plasmodium falciparum	
PARTIE II: LES PROTEINES DE LA FAMILLI	E POLO
	47
CHAPITRE I	47
DECOUVERTE DES PROTEINES POLO	47
I. LA PREMIERE PROTEINE DE LA FAMILLE: POLO DE DROSOPHILE	
II. LES AUTRES MEMBRES DE LA FAMILLE	49
II.1. Les protéines Polo de la transition G1/S	
II.2. Les protéines Polo de la transition G2/M	51
II.2.1. Xenopus laevis : Plx1	51
II.2.2. Les Polo de mammifères : hPlk1, mPlk1 et rPlk1	
II.2.3. Saccharomyces cerevisiae : cdc5	
II.2.4. Schizosaccharomyces pombe : Plo1	53
II.2.5. Trypanosoma brucei : TbPlk	53
II.2.6. Caenorhabditis elegans : Plc1/Plk1, Plk2 et Plc2	54
II.3. Homologie entre les différentes protéines de la famille Polo	
III. ROLES BIOLOGIQUES DE POLO	55
III.1. Substrats des protéines Polo de la transition G2/M	
III.2. Rôle de Polo dans la régulation de la transition G2/M	
III.2.1. Influence de Polo sur la localisation de la cycline B	57
III.2.2. L'auto-amplification du MPF	57
III.2.3. Polo et la protéine Pin1	
III.3. Formation du fuseau mitotique	

III.3.1. Généralités	60
III.3.2. Rôle de Polo dans la formation du fuseau mitotique	61
III.4. Cytokinèse	62
III.4.1. Généralités	62
III.4.2. Rôle de Polo dans la cytokinèse	63
III.5. Sortie de la mitose	64
III.5.1. Généralités	64
III.5.2. Rôle de Polo dans la sortie de la mitose	65
IV. REGULATION DE LA PROTEINE POLO	67
V. LOCALISATION INTRACELLULAIRE DES PROTEINES DE LA FAMILLE POLO	69
RESULTATS	71
CHAPITRE I	71
ETUDE DE LA PROTEINE GSK-3	71
I. PURIFICATION DE LA PROTEINE GSK-3 PAR CHROMATOGRAPHIE D'AFFINITE SUR DE	
L'AXINE IMMOBILISEE SUR DES BILLES	71
I.1. Introduction	71
I.2. Conclusion	75
I.3. Article 1	76
II. ETUDE DE LA GSK-3 DE PLASMODIUM FALCIPARUM	77
II.4. Introduction	77
II.5. Conclusion	79
II.6. Article 2	79
II.7. Clonage de l'adaptine	79
CHAPITRE II	86
ETUDE DE LA PROTEINE POLO	86
I. MATERIEL BIOLOGIQUE	86
II. CLONAGE DE L'HOMOLOGUE DE POLO CHEZ L'OURSIN, SPHAERICHINUS GRANULARIS	88
II.8. Obtention d'un fragment d'ADNc de Plu1	88
II.9. Analyse de la séquence protéique de Plu1 par rapport aux autres membres de l	a
famille Polo	93
II.10. Expression du peptide de Plu1	97

III. ANALYSE DE LA REGULATION DE PLU1 AU COURS DU CYCLE CELLULAIRE	
III.11. Utilisation des anticorps anti-Plu1	100
III.11.1. Synthèse de peptides et d'anticorps	
III.11.2. Immunoprécipitation	
III.12. Activité kinase de Plu1 et Plk	104
III.13. Myt1	106
CHAPITRE III	110
ETUDE DE LA PROTEINE SNK	110
I. ETUDE DES SUBSTRATS	
II. LA PHOSPHATASE CDC25A	111
CONCLUSION – PERSPECTIVES	114
I. GSK-3 DE PLASMODIUM FALCIPARUM	114
II. POLO D'OURSIN SPHAERICHINUS GRANULARIS	115
ANNEXE I	117
Composition des tampons et solutions	117
BIBLIOGRAPHIE	

# Liste des figures et tableaux

Tableau 1– Séquences des sites phosphorylés par GSK-3b1	1
Figure 1– Les différents rôles de GSK-3b.	12
Figure 2– Implication de GSK-3b dans la voie de synthèse du glycogène1	4
Figure 3- Les différentes interactions protéiques activatrices et inhibitrices au cours de	es
4 phases du cycle de division cellulaire1	16
Figure 4 - Régulation de l'entrée en phase M par le complexe p34 <sup>cdc2</sup> /cycline B1	18
Tableau 2- Liste des gènes cibles de la voie Wnt/b-caténine et incidence de l'activation of catte voie sur laur expression	de
Figure 5 Deprésentation schématique de la voie Writ	)2
Tableau 3- Comparaison des caractéristiques principales de la mort cellulaire po	iJ ar
nécrose et par apontose	аг )8
Figure & Représentation de l'importance du NGF dans la survie des neurones par so	n an
action inhibitrice de l'activité de GSK-3h	20
Figure 7– Représentation schématique des 6 protéines Tau produites par l'épissag	ло Ле
alternatif des exons 2, 3 et 10	,c 35
Figure 8- Carte de la distribution géographique du paludisme dans le monde	39
Figure 9- Représentation des cycles de reproduction de <i>Plasmodium falcinarum</i>	12
Figure 10- Dessins des différents stades du parasite <i>Plasmodium falciparum</i>	13
Figure 11- Schéma représentant les extrémités des chromosomes de <i>Plasmodiu</i>	m
falciparum	14
Figure 12– Alignement des séquences protéiques de GSK-3a et b humaines avec la	a
GSK-3 de <i>Plasmodium falciparum</i> identifiée après le séquençage du chromosome	3. 16
Figure 13. Implication des protéines de la famille Polo dans le contrôle du cyc	iu ile
cellulaire	17
Tableau 4- Les protéines de la famille Polo4	19
Figure 14- Arbre phylogénétique des protéines de la famille Polo.	50
Tableau 5– Pourcentages d'identité (en bleu) et d'homologie (en noir) entre 6   différentes protéines de la famille Polo 5 5 5 5	es 55
Figure 15- Schéma des différents domaines communs aux membres de la famille de	PS
nrotéines sérine/thréonine kinases Polo	55 55
Tableau 6- Substrats des protéines de la famille Polo	56
Figure 16- Schéma des 2 étapes de l'auto-amplification de l'activation du MPF	58
Figure 17– Formation du fuseau mitotique et son rôle au cours de la mitose	51
Tableau 7- Correspondance entre les protéines favorisant la séparation des chromatide	es
sœurs et celles favorisant la dégradation de la cycline B selon les espèces	57
Figure 18- Régulation de l'activité de Plk1 au cours du cycle cellulaire et comparaiso	n
avec celle du complexe p34 <sup>cdc2</sup> /cycline B6	58
Tableau 8- Localisation de la protéine Polo au cours de la mitose7	70
Figure 19- Schéma représentant les différents sites de fixation de diverses protéines su	ır
l'axine (109); (118)7	12
Tableau 9- Pourcentage d'identité et de similarité entre les différentes protéines axine.7	12
Figure 20- Alignement des séquences protéiques d'axine de différentes espèces7	15
Figure 21- Analyse de la présence de GSK-3 dans des lysats de différents stades d	le
Plasmodium falciparum7	/8
Figure 22 – Alignement de séquences protéiques d'adaptine de différentes espèces8	33
Tableau 10- Matrice d'identité et de similarité entre les acides aminés des protéine	es
adaptine de ces différentes espèces	34
Figure 23– Obtention de l'ADNg de l'adaptine	35

Figure 24- Cinétique de l'activation du MPF («M phase Promoting Factor», complexe
p34 <sup>cdc2</sup> /cycline B) au cours du cycle mitotique suivant la fécondation de l'ovule
d'ours in
Figure 25– Les différents stades de développement de l'embryon de l'oursin Sphaerechinus granularis
Figure 26- Comparaison de la séquence protéique obtenue chez l'oursin (Plu1) avec les
séquences protéiques des kinases de la famille POLO.
Figure 27- Analyse des produits issus de la RT-PCR
Figure 28- Carte du vecteur pCR <sup>TM</sup> 2.192
Figure 29- Séquence protéique du fragment de Plu1 déduite de la séquence
nucléotidique obtenue par séquençage de la bande de 850 pb
Figure 30– Alignement des différentes protéines de la famille Polo
Tableau 11- Pourcentage d'identité et de similarité entre les domaines compris entre
OHN20 et OHN21 des différentes Polo97
Figure 31- Analyse de l'expression et de la purification de la protéine fusion GST-Plu1.
Figure 32– Purification du peptide Plu1 en augmentant la stringence
Figure 33- Position des deux peptides, polo a et polo b (en rouge), synthétisés pour la
production d'anticorps anti-Plu1 sur le schéma caractéristique des protéines de la
famille Polo
Figure 34- Analyses des immunoprécipitations (IP) effectuées avec l'anticorps anti-
Plu1(19A)
Figure 35– Activité kinase de cdc2/cycline B au cours du développement de l'embryon
d'oursin
Figure 36– Analyse des proteines immunoprecipitees par l'anticorps anti-Plu1 104
Figure 37- Analyse de l'activité kinase de la proteine Polo d'oursin immunoprecipitée
sur la phosphatase Coc25A
Figure 56- Test d'activite kinase de Fik sur les pilospilatases Cuc25A, D et C105
Figure 39- Phosphorylation de Myti par la Kinase Pik
Pigure 40- Anaryse du pouvon potentienement infinitieur de plusieurs molecules sur l'activité kinase de Muti
Tablaau 12 Action das moléculas potentiallament inhibitricas de l'activité
d'autonhosphorylation de Myt1
Figure 41_ Test de l'activité kinase de la protéine Snk sur différents substrats 111
Figure 42. Test d'activité kinase de Snk sur les nhosnhatases Cdc25A R et C 112
Figure 43_ Alignement des séquences protéiques des protéines Cdc251,5 et C
i gure 45 mignement des sequences proteiques des proteines cue257, b et C

# Abréviations

Ac	Anticorps
ADN db	ADN double brin
ADN sb	ADN simple brin
ADN	Acide DésoxyriboNucléique
ADNc	ADN complémentaire
ADNg	ADN génomique
Akt ou PKB	Protein Kinase B
APC	Adenomatous Polyposis Coli
APC	Anaphase-Promoting Complex ou Cyclosome ou enzyme E3
APP	Amyloïd Precursor Protein
Armadillo	ou β-caténine
ARN	Acide RiboNucléique
ARNm	Acide RiboNucléique messager
Asp	Abnormal-spindle protein
ATP	Adénosine Tri Phosphate
Axine	ou Axil ou Conductine
BET	Bromure d'Ethidium
cdc	cell division cycle
CK1	Caséine kinase 1
CK2	Caséine kinase 2
cpm	coups par minute
CSF	Cytostatic Factor
dATP	désoxy Adénosine Tri Phosphate
dCTP	désoxy Cytidine Tri Phosphate
dGTP	désoxy Guanosine Tri Phosphate
dNTP	désoxy Nucléotides Tri Phosphate
dTTP	désoxy Thymidine Tri Phosphate
EDTA	Acide Ethylène Diamine Tétraacétique
Elk1	Facteur de transcription
ERK1	p44MAPK
ERK2	p42MAPK
Frat1	GBP humaine
GBP	GSK-3 Binding Protein

GFP	Green Fluorescent Protein
GSK-3	Glycogen Synthase Kinase-3 ou Shaggy ou Zeste-White3
HCC	carcinome hépatocellulaire
HMG	High Mobility Group
IPTG	Isopropylthio-β-D-Galactoside
LEF	Lymphocyte Enhancer-binding Factor
LTP	Long-Term Potentiation
MAP	Microtubules Associated Protein ou Mitogen Activating Protein
МАРК	Microtubule/Mitogen Activating Protein Kinase
Mb	Mégabase
MEK	МАРКК
M-KLP	Mouse-Kinesin Like Protein
MPF	M phase Promoting Factor /Maturation Promoting Factor
MSD2	Multicopy Suppressor gene of DBF4 mutation
NGF	Nerve Growth Factor
NIMA	Never In Mitosis A
Pav-KLP	Pavarotti-Kinesin Like Protein
pb	paire de bases
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDK	3' phosphoinositide-dependent kinase
Pf	<b>P</b> lasmodium <b>f</b> alciparum
PHF	Paires Hélicoïdales de Filaments
PI3 kinase	Phosphatidylinositol-3 kinase
Plc1 et Plc2	Polo-like kinase of Caenorhabditis elegans 1 et 2
Plk	Polo like kinase
Plu1	Polo like kinase of sea-urchin 1
Plx1	Polo like kinase of Xenopus 1
PM	Poids Moléculaire
PPIases	peptidyl-prolyl isomérases
Prk	Polo-related kinase ou Proliferation-related kinase
PS1	Présénéline 1
PS2	Présénéline 2
RNAi	RNA-mediated interference
RT	Reverse Transcription
SAP kinases	Stress Activating Protein kinases

SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate- PolyAcrylamide Gel Electrophoresis
SIDA	Syndrome d'ImmunoDéficience Acquise
Slimb	$\beta$ TRCP: Protéine E3 participant à l'ubiquitination des protéines
Snk	Serum-inducible kinase
SPB	Spindle Pole Body = centrosomes
TAE	Tris-Acétate/EDTA
TBE	Tris-Borate/EDTA
TBS	Tris-Borate/Saline
TCF	T-Cell Factor
ТЕ	Tris-EDTA
UBC	Ubiquitin-conjugating enzyme
Wnt	Wingless chez la drosophile ou Int1
ZAK1	Zaphod kinase 1

# INTRODUCTION

# **INTRODUCTION**

# **PARTIE I: GENERALITES SUR LA PROTEINE GSK-3**

### Chapitre I

# **BIOSYNTHÈSE ET STRUCTURE DE GSK-3**

#### I. Clonage et biochimie de GSK-3a et b

GSK-3 est une protéine présente en faible quantité dans les muscles squelettiques et le cerveau. L'enzyme a été purifiée à homogénéité pour la première fois en 1982, dans les muscles squelettiques, par Hemmings et ses collaborateurs (96). L'isolement de la protéine a été facilité par l'utilisation d'une colonne d'affinité contenant un peptide dont la séquence correspond aux sites de phosphorylation de la glycogène synthase. GSK-3 ne se fixe que sur le peptide préalablement phosphorylé par la caséine kinase II. Après séquençage de peptides, des amorces oligonucléotidiques ont été synthétisées et utilisées pour amplifier un fragment de l'ADNc (Acide DésoxyriboNucléique complémentaire) de GSK-3 par PCR («Polymerase Chain Reaction»). Ce fragment a ensuite servi de sonde pour cribler une banque d'ADNc de cerveau de rat. Deux séquences ont ainsi été isolées. La première code pour un polypeptide de 51 kDa dont la séquence correspond à une isoforme de GSK-3: GSK-3 $\alpha$ . Le deuxième ADNc possède une séquence codant pour une protéine de 47 kDa. Les 30 kDa centraux de la protéine sont identiques à 98 % à ceux de GSK-3 $\alpha$ . Cette protéine a été nommée GSK-3 $\beta$ . Ces deux GSK-3 sont deux protéines différentes issues de deux gènes différents.

#### II. Régulation de l'activité de GSK-3

Après avoir été isolée de différents tissus, GSK-3 demeure active, suggérant qu'elle ne nécessite pas de co-facteurs et qu'elle est active de façon constitutive. Le fait que GSK-3 inhibe la plupart de ses substrats est en accord avec une activité constitutive qui laisserait ces substrats dans un stade inactif jusqu'à une déphosphorylation activatrice.

L'activité de GSK-3 $\beta$  est inhibée par différentes voies de signalisation (la voie Wnt et la voie d'inhibition de l'apoptose passant par Akt) ainsi que par la phosphorylation par la protéine kinase C.

Par ailleurs, des études récentes ont montrées que l'inhibition de GSK-3 $\beta$  par le lithium réduit la phosphorylation de Tau (103, 126, 170, 233, 272, 283). Le lithium inhibe GSK-3 $\beta$  avec un Ki d'environ 2 mM, une concentration proche de celle utilisée en thérapie dans les cas de désordres bipolaires (psychose maniaco-dépressive) (126, 233).

#### III. Les substrats de GSK-3

GSK-3 $\beta$  phosphoryle plusieurs protéines qui interviennent dans des mécanismes cellulaires très variés. En effet, l'activité kinase de GSK-3 a pour cible IRS-1 (synthèse du glycogène) (55), le facteur d'initiation de la traduction eIF2B (264), les facteurs de transcription c-jun (173), CREB (64), NF-ATc (12),  $\beta$ -caténine (92), C/EBP $\alpha$  (207) et les protéines associées aux microtubules MAP-1B (77, 155) et Tau (104, 152, 231, 259) (également impliquées dans la maladie d'Alzheimer).

*In vitro*, GSK-3 phosphoryle c-Jun et c-Myc sur des sites également phosphorylés dans les cellules. Ces modifications de c-Jun empêchent sa fixation à l'ADN. Par ailleurs, *in vitro*, GSK-3 est inhibé par la protéine kinase C qui fait partie de la voie de réponse aux esters de phorbol comme c-Jun. (76).

La GSK-3 $\beta$  tend à phosphoryler des résidus Ser/Thr dans un environnement riche en proline. Cependant, les sites de phosphorylation des substrats de GSK-3 $\beta$  ne présentent pas de séquence consensus stricte (Tableaux 1).

RPA <b>S</b> VPP <b>S</b> P <b>S</b> L <b>S</b> RHS <b>S</b> PHQ <i>S</i> EDEE	Glycogène synthase
LLNASGSTS <b>T</b> PAP <b>S</b> RTASFSESR	ATP-citrate lyase
AIFKPGF <b>S</b> PQP <b>S</b> RRG <i>S</i> ESSEEVY	G-subunit
GLMKIDEPS <b>T</b> PYHSMIGDDDDAY	inhibiteur-2
KEEPQ <b>T</b> VPEMPGE <b>T</b> PPL <b>S</b> PIDME <b>S</b> QER	c-Jun
DIWKKFELLP <b>T</b> PPL <b>S</b> PSSRRSG	c-Myc
DIWKKFELVP <b>s</b> ppt <b>s</b> ppwGl	L-Myc

Tableau 1– Séquences des sites phosphorylés par GSK-3b.

### Chapitre II

#### **LES ROLES BIOLOGIQUES DE GSK-3**

La "Glycogen Synthase Kinase-3" (GSK-3) est une protéine sérine/thréonine kinase intervenant dans divers processus cellulaires aussi variés que le développement embryonnaire, la prolifération cellulaire, l'apoptose, les fonctions neuronales ou le rythme circadien (Figure 1). En raison de son activité ubiquitaire, GSK-3 est impliquée dans différentes maladies telles que les cancers, la maladie d'Alzheimer et le diabète.



#### Figure 1– Les différents rôles de GSK-3b.

#### I. Découverte de GSK-3: la voie de synthèse du glycogène

L'insuline est produite par les îlots de Langerhans du pancréas. Cette hormone joue un rôle essentiel dans la régulation de la glycémie en stimulant notamment la mise en réserve du glucose dans les cellules du foie, des muscles et des tissus graisseux. Sa sécrétion augmente lorsque le taux de sucre s'accroît dans le sang. La connaissance du mode d'action de l'insuline sur le plan moléculaire a permis d'élucider, au moins en partie, les mécanismes qui sous tendent les pathologies qui lui sont associées (diabète, obésité, hypertension) (13).

Lorsque l'insuline se lie à son récepteur, constitué de deux chaînes  $\alpha$  et  $\beta$ , deux événements clés, requis pour toute action de l'hormone, se produisent au niveau de la chaîne  $\beta$  intracytosolique. L'enchaînement des évènements après fixation de l'insuline sur son

récepteur suit un ordre temporel qui a aussi été décrit au niveau des récepteurs des facteurs de croissance. 1) phosphorylation de certaines tyrosines, 2) stimulation de l'activité tyrosine kinase intrinsèque. Dans le cas particulier de l'insuline, le récepteur peut alors phosphoryler les tyrosines de deux protéines cytosoliques: IRS1 (Insulin Receptor l) et Shc (Src homology2/alpha collagen). Ces dernières vont s'associer à des protéines possédant un ou plusieurs domaines SH2 (Src Homology 2). A ce niveau de la transmission du signal, il a été suggéré que la nature des complexes polypeptidiques associés à IRS 1 et Shc serait un élément déterminant dans la diversification des voies de signalisation qui conduisent aux effets biologiques. Trois réponses cellulaires ont été particulièrement étudiées: le transport du glucose, la synthèse du glycogène et la croissance cellulaire. L'augmentation du transport de glucose dans les tissus insulino-sensibles requiert tout d'abord l'association de IRS1 à la phosphatidyl-inositol 3 kinase (PI3K). La protéine Akt (ou PKB pour Protéine Kinase B), régulée par PI3K, intervient dans la translocation du transporteur de glucose (GLUT4) à la membrane plasmique, dans la synthèse de GLUT1 et dans l'activation de la 6 phosphofructo-2-kinase (238, 260). On peut alors observer la translocation des molécules transporteuses de glucose à partir d'un pool intracellulaire, vers la membrane plasmique. C'est l'augmentation du nombre de transporteurs au niveau de la membrane plasmique qui permet une entrée massive de glucose dans la cellule. La connaissance complète de cette voie de signalisation sera d'un grand intérêt pour la compréhension de la pathologie du diabète.

La voie de signalisation qui conduit à la synthèse de glycogène a été élucidée récemment. Dans un premier temps IRSI s'associe à une molécule adaptatrice Grb2 (Growth binding protein 2), puis ce complexe, par l'intermédiaire de la protéine Sos (Son of sevenless), active le produit du proto-oncogène Ras. Ras interagit alors avec Raf et une cascade de phosphorylations de protéines s'ensuit, impliquant dans l'ordre, la MAPKK (Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase), MAPK et la RSK (Ribosomal S6 kinase). La S6 kinase va phosphoryler la protéine phosphatase 1 (PP1) qui active la glycogène synthase.

Pour ce qui est du signal mitotique la première étape requiert l'association de Shc avec Grb2. Ce complexe active la voie Ras/MAPK. Cette dernière enzyme phosphoryle des facteurs qui régulent la transcription des gènes impliqués dans la progression du cycle cellulaire (c-fos, c-jun). Actuellement, pour expliquer les réponses multiples de l'insuline, on recherche de nouvelles molécules qui peuvent interagir avec le récepteur de l'insuline ainsi qu'avec IRS1 car elles peuvent représenter un mécanisme potentiel important de divergence des voies de signalisation. La voie de synthèse du glycogène est schématisée sur la figure 2.



Figure 2– Implication de GSK-3b dans la voie de synthèse du glycogène.

L'activation de la voie Ras/MAPK par l'insuline aboutit également à l'activation de la glycogène synthase (GS) en favorisant sa déphosphorylation par la protéine phosphatase 1 (PP1) (Figure 2). Des protéines kinases capables de phosphoryler et donc d'inhiber la glycogène synthase *in vitro* ont été identifiées par plusieurs équipes. Dans la nomenclature de Cohen, ce sont les «Glycogen Synthase Kinases» (GSK) 1 à 5:

•cAMP-dependent protein kinase

•phosphorylase kinase

•facteur A, ACLK (MFPK), shaggy, zeste-white3 = GSK-3

•none

•caséine kinase II

Les sites de la GS phosphorylés en absence d'insuline et déphosphorylés après traitement par cette hormone ont été identifiés dans les cellules musculaires squelettiques chez l'animal. Seule une GSK phosphoryle ces mêmes sites, la GSK-3 $\beta$ . L'insuline inhiberait donc GSK-3 $\beta$  et/ou activerait la phosphatase spécifique de ces sites.

GSK-3 $\beta$  phosphoryle et inactive GS, mais phosphoryle et active le complexe phosphatase-1/inhibiteur-2 qui déphosphoryle et active GS. C'est pourquoi la protéine GSK-3 est également appelée Facteur A (F<sub>A</sub>) pour sa capacité à activer la forme dépendante de Mg<sup>2+</sup>/ATP de la phosphatase PP-1 appelée F<sub>C</sub> (56).

Eldar-Finkelman et ses collaborateurs ont mis en évidence une interaction entre GSK-3 et IRS-1. GSK-3 phosphoryle IRS-1 de telle façon que cette protéine inhibe l'activité tyrosine kinase du récepteur à l'insuline, *in vitro*. Ainsi non seulement GSK-3 inhibe la Glycogène Synthase mais en plus elle atténue l'action de l'insuline sur son récepteur (55).

#### II. Le cycle cellulaire

#### II.1. Généralités

Chez les eucaryotes, le cycle cellulaire est composé de 4 phases: G1 (intégration des signaux mitogéniques ou antimitogéniques et préparation du processus de réplication de l'ADN), S (synthèse de l'ADN), G2 (préparation du processus de division) et M (Mitose: ségrégation dans deux noyaux séparés des chromosomes répliqués et cytokinèse). La mitose s'accompagne d'une réorganisation de la structure cellulaire avec rupture de l'enveloppe nucléaire, condensation de la chromatine, formation du fuseau de division et réorganisation du cytosquelette.

L'enchaînement correct des étapes successives du cycle cellulaire est assuré par une famille de sérine/thréonine kinases dépendantes des cyclines ou Cdk («cycline-dependent kinase», Cdk1 à 9) (Figure 3). L'activité des Cdks dépend, entre autre, de l'association avec une sous-unité régulatrice appelée cycline (cyclines A à H et T) dont l'expression ponctuelle conditionne la chronologie d'activation de ces kinases. D'autres protéines kinases (Polo, Myt1, Wee1...) et phosphatases (Cdc25A, Cdc25 B, Cdc25C, la phosphatase 2A...) contrôlent positivement ou négativement l'activité de ces complexes Cdk/cycline (Figure 3). L'interaction de ces complexes Cdk/cycline avec des protéines inhibitrices (CKI: «Cdk Kinase Inhibitor») constitue un autre système de régulation et entraîne l'inactivation des Cdks lors d'anomalies de la machinerie cellulaire. Certaines Cdks (Cdk 1, 2, 3, 4 et 6) sont impliquées dans la coordination du cycle par phosphorylation de substrats spécifiques (histone H1, lamines, pRb...etc). D'autres Cdks interviennent dans la régulation de la

transcription (Cdk 7, 8 et 9) ou encore dans les mécanismes de différenciation neuronale (Cdk5). D'autre part, les changements de localisation intracellulaire de ces différentes protéines jouent également un rôle prépondérant dans le déroulement du cycle de division.



Figure 3- Les différentes interactions protéiques activatrices et inhibitrices au cours des 4 phases du cycle de division cellulaire.

#### II.1.1. La transition G1/S

L'intégration des signaux mitogéniques et antimitogéniques extracellulaires se fait en phase G1 par le contrôle de l'activité des Cdks associées à la cycline D. Les cyclines de type D (D1, D2 et D3) sont synthétisées et se complexent avec Cdk4 ou Cdk6 en réponse à des facteurs de croissance. Ces complexes inactivent la protéine du rétinoblastome (Rb) en la phosphorylant, entraînant ainsi la libération du facteur de transcription E2F (93). Ces facteurs interviennent dans l'élaboration de nombreuses protéines nécessaires notamment à la progression du cycle cellulaire au niveau de la transition G1/S et de la phase S. Les complexes Cdk/cycline D ont également pour rôle de titrer les inhibiteurs de Cdk tels que

 $p27^{Kip1}$  ou  $p21^{Cip1/WAF1}$ , ce qui facilite l'activation du complexe Cdk2/cycline E et ainsi l'entrée en phase S (217).

La phosphatase Cdc25A est également nécessaire à la régulation des transitions G0/G1 et G1/S (101, 117). Elle déphosphoryle et active le complexe Cdk2/cycline E à la transition G1/S et Cdk2/cycline A en phase S. Le niveau de la protéine Cdc25A ne varie pas au cours du cycle cellulaire, mais son activité est régulée en fonction des phases du cycle de division. Cdc25A est très peu active en phase G1 mais son activité augmente à la transition G1/S. Cdc25A est phosphorylée et activée à la transition G1/S par le complexe Cdk2/cycline E. D'autre part, la phosphatase Cdc25A se lie à et déphosphoryle Cut, une protéine qui se lie au promoteur du gène codant pour la p21<sup>Cip1/WAF1</sup> et réprime son expression (36). Cette déphosphorylation de la protéine Cut entraîne une augmentation de la p21<sup>Cip1/WAF1</sup> facilite l'activation des complexes Cdk2/cycline E puis Cdk2/cycline A (174).

#### II.1.2. La transition G2/M

L'entrée en mitose est déclenchée par l'activation du MPF ou «M-phase Promoting Factor» (163, 176). Le MPF est un facteur intracellulaire universel responsable de la transition G2/M du cycle cellulaire. Des expériences de micro injection et de transfert de cytoplasme entre différentes espèces, ont montré que ce facteur est présent de la levure à l'homme et est dépourvu de spécificité d'espèce (52). Il est actif dans les cellules en division telles que les levures, les ovocytes d'étoile de mer, les œufs d'oursin et de xénope et les cellules de mammifères. Ce MPF est constitué de trois sous-unités protéiques: la protéine kinase p34<sup>cdc2</sup> (Cdk1 chez l'homme), sous-unité catalytique codée par le gène cdc2; la cycline B<sup>Cdc13</sup> est la sous-unité régulatrice et la protéine p9<sup>CHShs1/2</sup> qui appartient à la famille des CdkBP ("Cdk Binding Protein"). Cette protéine p9 interagit fortement avec p34<sup>cdc2</sup> et stabilise le complexe p34<sup>cdc2</sup>/cycline B. Après son activation, le complexe est dirigé vers le noyau et exerce son activité sur différents substrats (histone H1, lamines, c-abl,...etc) (35).

L'activation de la p34<sup>cdc2</sup> est due à la fixation de la cycline B (synthétisée à la fin de la G2 à phase et détruite en fin de mitose) et un mécanisme de phosphorylations/déphosphorylations. En effet, dans un premier temps, dès sa liaison à la cycline B, la p34<sup>cdc2</sup> est phosphorylée sur ses résidus thréonine-14 et tyrosine-15 (situés dans le domaine de fixation de l'ATP ou Adénosine TriPhosphate) ainsi que sur le résidu thréonine-161. Les kinases issues des gènes wee1, mik1 et myt1 sont responsables des phosphorylations des résidus thréonine-14 et tyrosine-15. La phosphorylation du résidu thréonine-161 est assurée par la CAK («Cdk-Activating Kinase» correspondant à la cdk7/cycline H ou p40<sup>MO15</sup>) (224). Ce complexe phosphorylé sur les trois sites, appelé pré-MPF, est inactif. Dans un second temps, l'activation du pré-MPF en MPF actif est réalisé par déphosphorylation de la tyrosine-15 et de la thréonine-14 par la phosphatase p80<sup>cdc25C</sup> ou Cdc25C (53). La phosphatase Cdc25C est donc directement responsable de l'entrée des cellules en phase M (116).

Cdc25C est activée par phosphorylation sur des sérines et des thréonines au cours de la transition G2/M (100, 113, 132). Chez l'homme, la protéine 14-3-3 se lie à Cdc25C phosphorylée sur la sérine-216 par la protéine kinase C-TAK1 (Cdc twenty-five C associated kinase). Cdc25C est phopshorylée sur la sérine-216 uniquement en interphase et pas en mitose et le complexe Cdc25C/14-3-3 n'est présent qu'en interphase et pas en mitose (191, 192). On retrouve chez le xénope (133). La protéine 14-3-3 inhibent Cdc25C avant l'entrée en mitose.

La phosphatase Cdc25C est également régulée par phosphorylation. La protéine kinase responsable de l'activation de Cdc25C a été isolée. Il s'agit de la protéine kinase Polo.

La régulation du MPF résulte donc de l'équilibre entre les effets inhibiteurs de kinases telles que p107<sup>wee1</sup> et Myt1 et les effets activateurs de phosphatases telle que Cdc25C. Le phénomène d'auto-amplification de l'activation du MPF pourrait s'expliquer par une rétro inhibition de la p107<sup>wee1</sup> et/ou par une rétro activation de Cdc25C exercée par les premières molécules de MPF activées (Figure 4).



**Figure 4 - Régulation de l'entrée en phase M par le complexe p34**<sup>cdc2</sup>/cycline B. Le complexe p34<sup>cdc2</sup>/cycline B est régulé par la phosphatase Cdc25 C, elle-même activée par la protéine kinase Polo.

#### II.2. Implication de GSK-3 dans la régulation du cycle cellulaire

La division des cellules est contrôlée par différentes voies de signalisation qui impliquent des facteurs extracellulaires et de nombreuses protéines internes à la cellule. Le cycle cellulaire est donc soumis à de nombreuses cascades d'activation et d'inhibition. L'intégration de toutes ces données par la cellule entraîne sa division, sa différenciation ou son maintien dans un stade quiescent. GSK-3 fait partie de ces protéines internes et intervient dans la régulation du cycle cellulaire au niveau de la transition G1/S (Figure 3).

#### II.2.1. GSK-3 et la cycline D1

La cycline D1, complexée aux différentes Cdks, se localise dans le noyau en phase G1 pour exercer son activité. Elle est ensuite exportée vers le cytoplasme lors de la transition G1/S du cycle cellulaire (10). Diehl et ses collaborateurs ont montré que la phosphorylation de la cycline D1 sur la thréonine-286 est nécessaire à la relocalisation de la protéine vers le cytoplasme (48). Cette phosphorylation sur le résidu thréonine-286 qui précède la proline-287 près de la région C-terminale de la protéine est également nécessaire à sa dégradation par protéolyse dépendante de l'ubiquitine due au protéasome. Or, il apparaît que la phosphorylation de la cycline D1 sur ce même résidu est assurée par GSK-3 $\beta$ . GSK-3 $\beta$  est localisée principalement dans le cytoplasme (15). Diehl et ses collaborateurs ont cependant montré par immunohistochimie que sa localisation intracellulaire varie au cours du cycle. En effet, GSK-3 $\beta$  est exclusivement cytoplasmique en phase G1 et apparaît ensuite à la fois cytoplasmique et nucléaire au niveau de la phase S. D'autre part, il a été rapporté que GSK-3β interviendrait dans l'export nucléaire dû au facteur de transcription NF-ATc par une phosphorylation directe (12). Toutes ces données suggèrent que GSK-3 $\beta$  est responsable de la translocation de la cycline D1 du noyau vers le cytoplasme en phase S et ainsi de sa dégradation par le protéasome.

D'autre part, lorsque la cascade des kinases Ras-Raf1-MEK-ERK-Elk1 est activée par un facteur de croissance, elle active la transcription de la cycline D1 et favorise sa liaison avec Cdk4 (4, 31, 261, 268). La protéine kinase Ras est également impliquée dans d'autres voies de signalisation. L'une d'elles passe par PI3K et Akt pour l'inhibition de GSK-3 $\beta$  (13). Cette voie agit de la même façon que la voie Wnt en inhibant GSK-3 $\beta$  pour favoriser la synthèse de cycline D1 et ainsi l'entrée des cellule dans le cycle de division.

#### II.2.2. La voie Wnt: implication dans la régulation du cycle cellulaire

Toutes les protéines impliquées dans la voie Wnt appartiennent à une cascade de phosphorylation/déphosphorylation aboutissant au contrôle de la division cellulaire en

réponse à des stimuli extérieurs à la cellule. Ces protéines sont impliquées dans deux processus biologiques majeurs chez les vertébrés: le développement embryonnaire précoce (269) et la tumorigenèse (199).

#### Mécanisme de signalisation de la voie Wnt:

Comme on peut le voir sur la figure 5 le signal est initié par la glycoprotéine secrétée Wnt (Wingless chez la drosophile) qui se lie à l'un des 11 récepteurs à 7 domaines transmembranaires codés par les gènes frizzled (Frz). L'activation de ce récepteur entraîne la phosphorylation de la protéine dishevelled (Dsh) qui, par son association à l'axine, inhibe GSK-3 $\beta$ . Chez les vertébrés, l'inactivation de GSK-3 $\beta$  résulte aussi de son interaction avec Frat1, une GBP («GSK-3 Binding Protein»). Les substrats de GSK-3β notamment l'axine et l'APC, ainsi que la  $\beta$ -caténine ne sont alors plus phosphorylés (24). En effet, l'axine possède des sites de liaison à la GSK-3 $\beta$ , l'APC et la  $\beta$ -caténine. Elle facilite ainsi la phosphorylation de l'APC et de la β-caténine par GSK-3β (92). La β-caténine est phosphorylée sur les sérines-33, 37, 45 et sur la thréonine-41 (279). Des mutations de ces sites de phosphorylation ont été retrouvées dans beaucoup de lignées cellulaires cancéreuses (166). Lorsque la β-caténine n'est pas phosphorylée, elle échappe à la reconnaissance par  $\beta$ -TRCP (ou Slimb), un constituant d'une E3 ubiquitine ligase, et est transportée dans le noyau où elle se lie à des facteurs de transcription tels que le TCF («T-Cell Factor») et le LEF («Lymphoid Enhancer Factor»). L'APC empêcherait l'accumulation de  $\beta$ -caténine dans le noyau en s'y associant et en la faisant ressortir par le récepteur d'export CRM1 (97). Lorsque les gènes cibles du complexe  $\beta$ -caténine/LEF-TCF sont activés (Cycline D, c-myc...), ils permettent la progression en phase G1 du cycle cellulaire. On peut citer d'autres protéines intervenant dans la voie de signalisation Wnt, telles que les caséine kinases I et II. Ces 2 protéines phosphoryleraient la protéine Dsh. La manière dont communiquent les récepteurs de Wnt avec Dsh est encore obscure.

L'activation de la voie Wnt entraîne donc l'augmentation ou la répression de l'expression de certains gènes impliqués dans l'entrée dans le cycle de division cellulaire ou dans la différenciation (Tableau 2).

Par ailleurs, une voie antagoniste à celle de la voie Wnt chez *Dictyostelium* fait intervenir la protéine tyrosine kinase ZAK1 (Zaphod kinase 1) (122). ZAK1 active GSK-3 $\beta$  alors que la voie Wnt l'inhibe. L'activation de ZAK1 passe par la stimulation par l'AMPc d'un récepteur à 7 domaines trans-membranaires (CAR3) (198). Cette voie favorise la différenciation cellulaire et le développement alors que l'activation de la voie Wnt provoque la division des cellules. Il est donc possible que des homologues de ZAK1 intervenant dans

des voies de signalisation parallèles à celle de Wnt aient un rôle important dans la différenciation cellulaire et dans la suppression de tumeurs dans d'autres modèles.

Gènes	Organismes ou systèmes	Action	Expression	Références
		directe	du gène	
c-myc	cancer du côlon humain	oui	+	(95)
Cycline D	cancer du côlon humain	oui	+	(223, 245)
Tcf-1	cancer du côlon humain	oui	+	(206)
PPARdelta	cancer du côlon humain	oui	+	(94)
c-jun	cancer du côlon humain	oui	+	(157)
fra-1	cancer du côlon humain	oui	+	(157)
uPAR	cancer du côlon humain	?	+	(157)
métalloprotéinase de	cancer du côlon humain	oui	+	(17)
la matrice MMP-7				(38)
CD44	cancer du côlon humain	?	+	(266)
Siamois	Xenope	oui	+	(19)
Fibronectine	Xenope	oui	+	(78)
BMP4	Xenope	?	_	(9)
bHLH myogénique	Xenope	?	+	(171)
engrailed-2	Xenope	oui	+	(158)
Xnr3	Xenope	oui	+	(159)
Connexine 43	Xenope		+	(253)
twin	Xenope	oui	+	(139)
Connexine 30	Xenope	?		(158)
Récepteur y de l'acide	Xenope	· ?		(158)
rétinoïque	Renope	•		(150)
nacre	Zebrafish	oui	+	(51)
WISP Wnt-1	Cellules de souris	oui, mais pas	+	(193)
transformed		par le TCF		(273)
		(Xu, 2000)		
Brachyury	Souris (Wnt-3A)	oui	+	(274)
				(7)
cyclooxygenase-2	Souris (Wnt-1)	?	+	(108)
				(83)
périostine	Souris Wnt-3	Pas par la β-	-	(83)
-		catenin?		
Cdx1	Souris Wnt-3A	oui	+	(149)
βTrCP		indépendant	+	(232)
P		de la		、 <i>,</i>
		transcription		
sFRP-2	Souris (Wnt-4)	?	+	
Connexine 43	Cardiomyocytes de rat	?	+	(2)
Ubx	Drosophile	oui	+ 01 -	(205)
wingless	Drosophile	?	+ ou -	(280)
Dnn	Drosophile	011	-	(277)
Engrailed	Drosophile	?	+	(105)
Dfrizzled?	Drosophile	· ?		(23)
shavenhahy	Drosophile	· ?		(187)
strine	Drosonhile			(197)
Surpe	Diosophilic	oui	-	(177)

Tableau 2- Liste des gènes cibles de la voie Wnt/b-caténine et incidence de l'activation de **cette voie sur leur expression.** (+: augmentation et -: diminution de l'expression du gène)





A-Activation de la voie Wnt. GSK-3 $\beta$  est inhibée par Frat1. La  $\beta$ -caténine peut donc activer l'expression de la cycline D1, entre autre, et permettre ainsi l'entrée en phase G1 du cycle de division cellulaire.

B- Inactivation de la voie Wnt. GSK-3 $\beta$  n'est plus inhibée et peut alors phosphoryler et inhiber la  $\beta$ -caténine. Celle-ci ne peut plus activer l'expression de la cycline D1 et la cellule n'entre donc pas dans le cycle de division cellulaire.

#### II.2.3. Processus cancéreux et GSK-3

Des altérations de protéines impliquées dans la voie Wnt sont associées à certains cancers, en particuliers les mélanomes et les carcinomes du sein, du côlon et du foie. Trois des gènes régulateurs de la voie Wnt sont mutés dans les cancers primaires humains: APC,  $\beta$ -caténine et axine. Ces mutations aboutissent à une activation anormale de la transcription des gènes par la  $\beta$ -caténine et ainsi à une progression des cellules en phase G1.

#### Wnt et les cancers:

L'effet proto-oncogénique de Wnt a été découvert en 1982 par Nusse et Varmus (177). Ceci a incité une recherche des rôles de Wnt dans les cancers humains. Il existe au moins 16 protéines Wnt chez les vertébrés. Les gènes Wnt mutés provoquent l'accumulation de  $\beta$ -caténine dans les cellules de mammifère en culture (219). Au moins 11 gènes frizzled ont été identifiés chez les vertébrés. Cependant, leurs différentes fonctions et leurs ligands ne sont pas encore bien connus. En plus des récepteurs frizzled, il existe une famille de protéines secrétées possédant une homologie avec le domaine extracellulaire, riche en cystéines, de frizzled. Ce sont les "frizzled-related protein" (sFRP), qui, à faible concentration, facilitent l'activation du signal par les protéines Wnt solubles alors qu'à forte concentration, elles sont inhibitrices de la voie Wnt (252).

#### **Dishevelled:**

La protéine Dishevelled (Dsh) est un médiateur positif de la voie Wnt, situé après le récepteur Frizzled de Wnt et avant la  $\beta$ -caténine. Cette protéine possède une  $2^{\text{ème}}$  fonction qui consiste à relayer le signal d'activation des kinases jun (147, 165). Alors que le mécanisme d'action de Dsh n'est pas encore bien connu, on sait que cette protéine interagit avec de nombreuses protéines, telles que la Caséine kinase 1 (CK1; (196)), la Caséine Kinase 2 (CK2; (267)) et Frat1 (147). Une interaction directe entre Dsh, Frat-1 et GSK-3 $\beta$  pourrait être une étape clé de l'inactivation de GSK-3 $\beta$  (147). Une possible connexion entre Dsh et le cancer passerait par la Caséine kinase 2, qui se lie à Dsh et la phosphoryle et ainsi favorise la formation de lymphomes quand elle est exprimée dans des souris transgéniques (214, 227, 267).

#### **GSK-3:**

 $GSK-3\beta$  se lie à plusieurs protéines de la voie Wnt et les phosphoryle. Elle régule négativement la  $\beta$ -caténine. Etant donné que  $GSK-3\beta$  est un régulateur négatif de la voie Wnt, cette kinase est potentiellement un suppresseur de tumeur. Cependant, aucune mutation ni délétion du gène codant pour GSK-3 $\beta$  n'ont été retrouvées dans une étude faite sur des tumeurs colorectales (230). GSK-3 $\alpha$  peut, peut-être dans ce cas, compenser la perte de GSK-3 $\beta$ . L'inactivation biallélique de ces deux gènes dans la même tumeur est peu probable.

GSK-3 $\beta$  est inhibé par association avec Frat-1. Frat-1 est un antagoniste de la voie Wnt dans les cellules de mammifères, puisqu'il est en compétition avec l'axine pour la liaison à GSK-3 $\beta$ . Ainsi, Frat-1 inhibe la phosphorylation et la dégradation de la  $\beta$ -caténine (147, 246). Dans le modèle de souris transgéniques, Frat-1 contribue à la progression de cancers. Cette contribution n'est pas documentée chez l'homme.

#### La **b**-caténine et l'APC:

Des mutations de la  $\beta$ -caténine sont retrouvées dans plusieurs types de cancers humains. Ces mutations affectent la région amino-terminale de la protéine et la rendent réfractaire à la régulation par l'APC. En effet, ces résidus sérines et thréonines, quand ils sont phosphorylés, jouent un rôle dans la dégradation de la protéine (199). Ces mutations empêchent l'interaction dépendante de la phosphorylation entre la  $\beta$ -caténine et un composé de l'ubiquitine ligase E3,  $\beta$ -TRCP, et ainsi entraînent une augmentation de la stabilité de la  $\beta$ -caténine. Dans certaines tumeurs, la région amino-terminale est éliminée entièrement. Ces mutations de la région régulatrice de la  $\beta$ -caténine sont retrouvées dans de nombreux types de cancers ainsi que dans les tumeurs animales induites par mutations chimiques ou génétiques.

On ne retrouve pas de mutations de la  $\beta$ -caténine et de l'APC dans les mêmes tumeurs. Ceci est particulièrement vérifié dans les tumeurs colorectales où on trouve une majorité de tumeurs contenant des mutations de l'APC et pas de la  $\beta$ -caténine. Cependant, lorsqu'on retrouve des mutations de la  $\beta$ -caténine, l'APC n'est pas muté (125, 209, 230). L'APC est un suppresseur de tumeur dans les cancers humains car il favorise la dégradation de la  $\beta$ -caténine.

Les fibromatoses agressives, autrement connues sous le nom de tumeurs desmoïdes, sont présentes avec une incidence plus élevée chez les patients atteints de «Adenomatous Polyposis coli familiale» (FAP). Les individus atteints de FAP portent des mutations de l'APC dans leurs lignées germinales et présentent de multiples adénomes intestinaux dès le plus jeune âge. Des mutations de la  $\beta$ -caténine ont été détectées dans des tumeurs desmoïdes sporadiques (221, 244). De plus, des mutations de la  $\beta$ -caténine ont été trouvées dans plus de la moitié des 42 tumeurs desmoïdes analysées, alors que des mutations inactivatrices de l'APC n'ont été retrouvées que dans 9 d'entre elles. Il n'y avait aucun chevauchement entre les mutations de la  $\beta$ -caténine et de l'APC.

Plusieurs mutations de la  $\beta$ -caténine ont été identifiées dans les cancers gastriques, dont l'incidence augmente chez les patients atteints de FAP (185). Dans cette étude, 27 % des cancers gastriques de type intestinal possèdent des mutations de la  $\beta$ -caténine. Dans 3 études séparées, des mutations de la  $\beta$ -caténine ont été identifiées avec une haute fréquence dans des hépatoblastomes, alors qu'aucune mutation d'APC n'a été trouvée (115, 127, 262).

Le carcinome hépatocellulaire (HCC) est devenu l'une des tumeurs les plus connues possédant des mutations dans la voie Wnt. Basée sur 5 études séparées, la fréquence de mutation de la  $\beta$ -caténine dans ces tumeurs est d'environ 20 % (45, 111, 144, 162, 172).

Les mutations de  $\beta$ -caténine associées à des cancers ovariens apparaissent comme étant confinées au sous-type endométrial. On trouve des mutations de la  $\beta$ -caténine dans d'autres types de cancers tels que les mélanomes et les cancers de la prostate mais avec des fréquences plus faibles. Enfin, le plus haut pourcentage de mutations de  $\beta$ -caténine est rencontré dans les tumeurs de la peau appelées pilomatricomes (27).

#### Axine:

L'axine est un inhibiteur de la voie Wnt. Cette protéine se lie directement à l'APC, la  $\beta$ -caténine, GSK-3 $\beta$  et Dsh (189, 200). L'axine a un rôle central dans la régulation négative de la  $\beta$ -caténine. En effet, elle facilite la phosphorylation de la  $\beta$ -caténine et de l'APC par GSK-3 $\beta$ . Ainsi, l'axine peut être vue comme un suppresseur de tumeur. Cette hypothèse a été vérifiée. L'inactivation biallélique de l'axine a été trouvée dans des cancers hépatocellulaires humains et des lignées cellulaires (210). Ces mutations ont été identifiées dans des cancers hépatocellulaires humains qui n'avaient pas de mutation de  $\beta$ -caténine. Toutes les mutations entraînent une élimination du site de fixation de la  $\beta$ -caténine sur l'axine. Ainsi, la  $\beta$ -caténine ne peut pas être dégradée. Les mutations de l'axine constituent le  $\hat{s}^{me}$  défaut génétique de la voie Wnt qui entraîne des cancers chez l'homme.

#### Les facteurs de transcription LEF/TCF:

Les facteurs de transcription LEF/TCF se lient directement à l'ADN par leurs domaines HMG (High Mobility Group). Ils sont incapables d'activer la transcription de gènes seuls. Ils ont besoin de co-facteurs tels que ALY et AML pour LEF. La  $\beta$ -caténine se lie à ces facteurs de transcription LEF/TCF et active ainsi la transcription de certains gènes cibles tels que ceux codant pour la cycline D, c-myc...

Des mutations des gènes codant pour LEF/TCF provoquant l'apparition de cancers chez l'homme restent encore à identifier. Cependant des mutations de TCF-4 ont été détectées dans un sous-groupe de tumeurs colorectales (54). Les mutations ont été identifiées également dans des lignées cellulaires, dont toutes possédaient des mutations soit dans l'APC soit dans la  $\beta$ -caténine. Ceci montre que les mutations de TCF ne se substituent pas à celles de l'APC ou de la  $\beta$ -caténine, mais qu'elles pourraient s'additionner.

#### III. L'apoptose

#### III.1. Définition de la mort cellulaire et rôles physiologiques

Quelque soit le type de cellule, on définit deux processus de mort cellulaire: la nécrose et l'apoptose. Ces deux processus se caractérisent par des circonstances de survenue, des modifications morphologiques et des mécanismes moléculaires distincts (Tableau 3).

La nécrose doit être considérée comme une réponse des cellules à une agression nonphysiologique physique ou chimique. Il s'ensuit rapidement une perte de contrôle du flux ionique. En conséquence, l'eau pénètre dans la cellule qui gonfle et la membrane plasmique devient alors beaucoup plus perméable puis éclate. Le gonflement des mitochondries est typique de cette mort cellulaire. Les autres organites se gonflent aussi, comme les lysozymes qui vont se lyser et déverser leur contenu dans la cellule, les enzymes hydrolytiques ainsi libérées détruisent la cellule. La membrane plasmique étant beaucoup plus perméable, les enzymes hydrolytiques détruisent également les cellules voisines, d'où une propagation de la lésion et une réaction inflammatoire qui laisse un tissu cicatriciel.

Le programme de mort cellulaire ou apoptose, observé lors d'un développement normal chez les mammifères, fut mis en évidence pour la Î<sup>ère</sup> fois en 1906 par Collin. Il a été établi que près de la moitié des neurones de l'axe neuronal et plus de 99,9 % du nombre total de cellules produites par un homme au cours de sa vie mourraient par un processus d'apoptose (255). L'induction de l'apoptose est un processus hautement régulé et peut être supprimé par de nombreux stimuli extracellulaires. Cependant, une fois engagé le processus d'autodestruction ne peut s'arrêter.

Caractéristiques	Nécrose	Apoptose
Condition de la mort	"Accidentelle"	Programmée
Mode	Passif	Actif (ATP-dépendant)
Volume de la cellule	Augmenté	Diminué
Densité cellulaire	Diminuée	Augmentée
Concentration cytoplasmique en Ca <sup>2+</sup>	Diminuée	Augmentée
Lyse de la membrane plasmique	Première étape	Dernière étape
Hydrolyse de l'ADN	Dernière étape	Première étape
Vitesse d'accomplissement	Rapide	Lente
Organites cellulaires	Lysés	Compacts
Réaction inflammatoire	Oui	Non
Cicatrisation	Cicatrice fibreuse	Pas de cicatrice

Tableau 3- Comparaison des caractéristiques principales de la mort cellulaire par nécrose et par apoptose.

L'apoptose, véritable suicide de la cellule, est une réponse à l'activation de messages internes résultant de l'intégration de différents signaux de l'environnement (carences, stimulations membranaires: TNF, Fas, NGF, IL2...) perceptibles par la cellule en fonction de son génotype et de son phénotype à un moment donné, œ qui rend compte de la distribution hétérogène au sein d'un tissu (par ailleurs sain). C'est un processus pouvant durer de 4 à 48 heures qui implique un enchaînement de réactions très bien régulées. La cellule participe activement à ce programme d'autodestruction. L'apoptose est contrôlée par un ensemble de gènes qui ont été particulièrement bien conservés au cours de l'évolution depuis les nématodes jusqu'à l'homme en passant par la drosophile. L'apoptose se traduit par une rétractation progressive de la cellule avec condensation de la chromatine et du cytoplasme, suivie d'une fragmentation caractéristique de l'ADN. L'ensemble de ce processus aboutit à la formation de corps apoptotiques dans lesquels les organites sont structurellement intacts. La formation de ces corps apoptotiques avec une membrane plasmique intacte prévient le relarguage des constituants intracellulaires et donc la réaction inflammatoire. Ces corps apoptotiques formés sont ensuite phagocytés par les macrophages ou les cellules épithéliales de voisinage normal. L'apoptose est donc une mort cellulaire physiologique qui intervient au cours du développement, dans l'homéostasie, les systèmes de défense et dans le vieillissement. (http://anocef.unice.fr/mini-revues.Apoptose/Apoptose.html)

L'apoptose joue un rôle très important tout au long de la vie avec des objectifs différents selon l'âge. En effet, en embryologie, le développement normal d'un organe s'effectue non pas par modelage mais par sculpture avec élimination par apoptose de cellules produites en excès selon des critères particuliers requis pour chaque organe. Par exemple, la formation de nos doigts résulte de l'apoptose des cellules qui les unissaient au stade embryonnaire. A l'âge adulte, l'apoptose est un mécanisme d'élimination des cellules impliquées dans un grand nombre de situations physiologiques: équilibre du système immunitaire, de l'érythropoïèse... Chez l'adulte, il est admis que dans de nombreux organes, dont la moelle osseuse, les cellules matures sont régulièrement remplacées. Le tissu se trouve ainsi dans un équilibre dynamique où, d'une part, des cellules souches, sous l'action de stimuli, se divisent puis se différencient en cellules matures; et d'autre part, les cellules matures, après un certain âge, un certain degré d'altération ou de vieillissement, disparaissent par apoptose. Enfin, le vieillissement est associé à une diminution du nombre de cellules dans la plupart des organes. Ce déficit cellulaire paraît être lié à l'apoptose. Il semble en effet, qu'il y ait un excès d'apoptose comparé aux tissus plus jeunes. Cet excès serait dû à plusieurs facteurs, notamment à une diminution de la sécrétion de facteurs de survie, essentiellement des facteurs de croissance. L'augmentation de l'apoptose résulte aussi d'un excès de sensibilité des cellules à l'apoptose. Ceci est en partie expliqué par une diminution de l'expression de bcl-2, un inhibiteur ubiquitaire de l'apoptose, mais aussi par une sensibilité accrue au stress oxydatif et un raccourcissement des télomères. De plus, il semble que l'apoptose se déclenche de façon inopportune dans des cellules saines des personnes âgées.

Cependant, dans certaines pathologies, l'apoptose n'est plus régulée. Elle apparaît être augmentée pour les maladies neurodégénératives (maladie de Parkinson) ou dans le cas du SIDA (Syndrome d'ImmunoDéficience Acquise), de maladies auto-immunes, de la sclérose latérale amyotrophique. A l'inverse, l'apoptose est réprimée dans un certain nombre de cancers. En effet, certains cancers semblent liés à l'inhibition de l'apoptose et non pas à un excès de divisions cellulaires. En effet, une mutation importante d'un régulateur de l'apoptose empêcherait ces cellules de s'autodétruire et la mutation serait entérinée dès la première division. Ainsi ces cellules peuvent subir plusieurs autres mutations sans entrer en apoptose. Les cancers pourraient donc avoir pour cause soit un excès de multiplications cellulaires, soit un déficit de mort de cellules transformées (dû en particulier à une surexpression de bcl-2, un inhibiteur de l'apoptose) ou les deux à la fois.

#### III.2. L'apoptose et GSK-3b

Un des facteurs de survie permettant aux cellules nerveuses d'échapper à l'apoptose est le NGF (Nerve Growth Factor), identifié dans les années 1950. Celui-ci se lie à un récepteur (une protéine tyrosine kinase) et active des voies de signalisation intracellulaires (Figure 6).
Une de ces voies met en jeu la production de phosphoinositides phosphorylés en 3' par la PI3K. Les phosphoinositides produits se lient alors à la protéine kinase Akt qui se fixe à la membrane plasmique. Par phosphorylation par une PDK (3' phosphoinositide-dependent kinase) liée également à la membrane plasmique, Akt est activée et peut phosphoryler GSK-3ß sur la sérine-9 (40, 44). Cette phosphorylation inhibe l'activité de GSK-3ß et ainsi de nombreux substrats impliqués dans différents métabolismes cellulaires, y compris la voie de synthèse du glycogène, sont régulés et permettent à la cellule de survivre (41). L'inhibition de GSK-3ß par la voie du NGF entraîne également une augmentation de la survie des cellules PC12 (cellules de phéochromocytome indifférenciées), de fibroblastes de rat et des neurones corticaux de rat (99, 184). Cependant, l'inhibition de GSK-3 $\beta$ , en l'absence de NGF, n'est pas suffisante pour empêcher l'apoptose. Ceci peut s'expliquer par le fait que le NGF contrôle plusieurs voies de survie. Par exemple, sous l'effet du NGF, les facteurs de transcription NF-kB (26) et CREB (69) activent la transcription de Bcl2, une protéine anti-apoptotique (204, 284). Par ailleurs en l'absence de NGF, même si GSK-3 $\beta$  est inhibé, par exemple par Frat1 (147) ou un inhibiteur chimique, la transcription de Bcl2 diminue et entraîne les cellules dans la voie de l'apoptose. D'autre part, la protéine Akt intervient également dans au moins une autre voie d'inhibition de l'apoptose en phosphorylant et en supprimant ainsi l'activité proapoptotique de la protéine BAD et du facteur de transcription Forhead (FKHRL1) (44).



Figure 6- Représentation de l'importance du NGF dans la survie des neurones par son action inhibitrice de l'activité de GSK-3**b**.

#### III.3. Les maladies neurodégénératives

Au cours de l'organogénèse chez les Vertébrés, le nombre de neurones produits est environ le double du nombre de neurones présents dans le système nerveux central mature. La mort programmée de 50 % des neurones produits survient de façon hautement reproductible dans le temps et dans l'espace et elle est conservée à travers les espèces. Cette mort neuronale apoptotique est capitale pour le développement du système nerveux car elle permet l'adaptation du nombre de neurones connectés aux cellules cibles et la correction des erreurs de connexion (11, 181).

A l'âge adulte, il semblerait que toutes les cellules du système nerveux central se soient engagées dans le processus de l'apoptose en arrivant à maturité. Cependant, la très grande majorité des cellules ne meurent pas car des facteurs de survie les en empêchent. Ces messagers sont essentiellement des facteurs protéiques sécrétés par les cellules voisines et plus particulièrement le facteur de croissance du système nerveux. Il semble que la stimulation synaptique inhibe aussi l'apoptose. Ainsi, la vie de chaque cellule dépend de ses voisines.

Par contre, dans les situations pathologiques, il apparaît de plus en plus évident que l'apoptose neuronale peut être déclenchée. Par exemple, après une ischémie cérébrale focalisée, la mort des neurones entourant le cœur de la lésion présente des caractéristiques apoptotiques telles que la fragmentation de la chromatine et l'activation des caspases (protéases effectrices de l'apoptose). Par ailleurs, l'apoptose pourrait être impliquée dans la mort neuronale observée au cours de certaines maladies neurodégénératives telles que la maladie de Parkinson, la sclérose latérale amyotrophique (SLA), la démence à corps de Lewy diffus, la maladie de Pick ou la maladie d'Alzheimer.

#### III.3.1. La maladie d'Alzheimer

Le Dr Alois Alzheimer décrivit pour la première fois en 1906 les symptômes d'une patiente, Auguste D., âgée de 51 ans, présentant une dégradation progressive de ses facultés cognitives, des hallucinations, un syndrome de confusion mentale et d'une inaptitude psychosociale. Cette maladie porte aujourd'hui son nom.

Le poids socio-économique de la maladie d'Alzheimer est considérable. Il y aurait environ 20 millions de personnes atteintes de cette maladie dans le monde. Elle touche plus de 4 millions de personnes aux Etats-Unis et la "National Foundation of Brain Research" en a évalué le coût en 1991 à environ 1 milliard de dollars. Plus de 360 000 personnes en seraient atteintes en France à ce jour, et près de 8 millions en Europe. C'est pourquoi il est indispensable de concentrer les recherches sur de nouveaux systèmes de diagnostic plus précoces ainsi que sur des traitements pouvant au moins ralentir sinon stopper la progression de la maladie.

La maladie d'Alzheimer est due à la dégénérescence de neurones qui interviennent dans la mémoire et les fonctions intellectuelles. Cette maladie incurable progresse le plus souvent vers la démence, c'est-à-dire une déchéance physique et mentale associée à une perte de l'autonomie. C'est une maladie qui apparaît le plus souvent tardivement dans la vie mais elle n'est pas due à l'âge. L'âge est un facteur de risque majeur parmi d'autres. Dans la majorité des cas, la maladie se déclare autour de 70 ans. Il existe des formes précoces (débutant avant 65 ans) beaucoup plus rares, mais qui ont habituellement une évolution rapide. La maladie d'Alzheimer dont l'origine est toujours inconnue résulte de la présence dans le cerveau de lésions histologiques maintenant bien décrites (les plaques séniles et les dégénérescences neurofibrillaires) associées à une perte importante de neurones notamment par apoptose. On observe au cours du vieillissement normal de telles lésions, mais la différence est essentiellement quantitative. Dans le vieillissement normal, ces lésions sont localisées et en nombre limité tandis que pour la maladie d'Alzheimer, elles sont beaucoup plus fréquentes, s'accumulent et se propagent en chaîne dans différentes parties du cortex cérébral (dans l'ordre chronologique: cortex enthorinal et hippocampe puis régions corticales et temporales) (16). La propagation de ces lésions induit à un certain stade une décompensation et la survenue de la maladie dont les symptômes s'aggravent inexorablement.

Les **plaques séniles** sont des lésions situées dans l'espace intracellulaires. Le cœur des plaques est constitué de dépôts anormaux d'une protéine dite  $\beta$ -amyloïde entourés de prolongements neuronaux en dégénérescence. Cette substance  $\beta$ -amyloïde est un fragment de dégradation d'une protéine précurseur dite APP («Amyloid Precursor Protein») dont le gène est situé sur le chromosome 21. Au fil des années, les plaques séniles se forment dans le cortex cérébral et induiraient progressivement par un effet toxique une destruction des neurones avoisinants.

Les **dégénérescences neurofibrillaires** sont des lésions présentes dans le cytoplasme des neurones, principalement des neurones pyramidaux. Elles correspondent à l'accumulation de filaments anormaux qui s'associent en hélice pour former les paires hélicoïdales de filaments (PHF). Les PHF sont constituées de protéines Tau («Microtubule-associated Protein») anormalement phosphorylées. Cette particularité biochimique provoque une perturbation grave du fonctionnement du neurone puis sa mort.

Le processus de dégénérescence neuronale débute probablement dans l'hippocampe et se propage progressivement dans l'ensemble du cortex cérébral (16). La mort de populations entières de neurones provoque l'apparition des signes cliniques: perte de mémoire qui évolue inéluctablement vers la démence. Il existe vraisemblablement un lien direct entre les plaques séniles qui apparaissent les premières et les dégénérescences neurofibrillaires. Ces deux lésions rendent compte de la mort cellulaire et de l'apparition de la démence dans la maladie d'Alzheimer. La connaissance fine des mécanismes moléculaires mis en jeu dans ces deux types de lésions a ouvert des pistes de recherche pour le diagnostic et le traitement de cette maladie.

De nombreux travaux suggèrent que l'apoptose serait impliquée dans la mort neuronale survenant au cours de la maladie d'Alzheimer. Le premier argument soutenant cette hypothèse est l'observation dans les cerveaux de patients atteints de la maladie d'Alzheimer d'un grand nombre de neurones présentant une fragmentation de l'ADN (5, 37, 134, 138, 235, 237). D'autre part, des gènes dont l'induction est impliquée dans la mort cellulaire apoptotique sont exprimés dans les cerveaux de patients atteints de la maladie d'Alzheimer:

• Le gène "pro-apoptotique" bax est largement exprimé dans les cerveaux malades par rapport aux cerveaux témoins.

• Les résultats concernant l'expression du gène bcl-2 dans les cerveaux de patients atteints de la maladie d'Alzheimer sont très controversés. Cependant, l'étude des ARN messagers de Bcl-2 ne montre pas de modification de leur expression dans les cerveaux de patients atteints de la maladie d'Alzheimer par rapport aux cerveaux témoins (257).

• Les gènes c-fos et c-jun, dont l'induction est observée au cours de l'apoptose neuronale expérimentale, sont plus fortement exprimés dans les cerveaux de patients atteints de la maladie d'Alzheimer que dans les cerveaux de sujets âgés non déments.

• Une augmentation de l'expression du gène p53 et du récepteur Fas/Apo1 a aussi été démontrée dans les cerveaux de patients atteints de la maladie d'Alzheimer par rapport aux cerveaux de sujets âgés non déments.

Un autre argument en faveur de l'implication de l'apoptose neuronale dans la maladie d'Alzheimer est apporté par une étude récente. Yang et collaborateurs (1998) ont mis au point une méthode de détection de l'apoptose neuronale basée sur la mise en évidence du clivage de l'actine (l'actine étant un des substrats des caspases qui sont activées au cours de la phase d'exécution de l'apoptose) (275). L'utilisation d'un anticorps dirigé contre les fragments d'actine permet un marquage hautement spécifique des neurones apoptotiques à la fois sur des cultures de neurones et sur des coupes de cerveaux. Les études immunohistochimiques réalisées avec cet anticorps sur des coupes de cerveaux malades révèlent le marquage de nombreux neurones particulièrement dans les zones riches en plaques séniles, alors qu'aucune immunoréactivité n'est observée dans les cerveaux témoins. Enfin, l'étude des gènes impliqués dans certaines formes familiales de maladies d'Alzheimer conduit à penser que l'apoptose neuronale pourrait être impliquée dans la pathogenèse de la maladie. Au stade actuel des connaissances, trois gènes ont été identifiés codant respectivement pour l'APP, la préséniline 1 (PS1) et la préséniline 2 (PS2). La plupart des mutations du gène de l'APP conduisent à une augmentation de production du peptide  $\beta$ -amyloïde pouvant provoquer l'apoptose neuronale *in vitro* dans certains modèles expérimentaux (91, 212). Quant aux mutations des gènes des présénilines, d'une part, elles semblent interférer avec le métabolisme de l'APP et conduisent à une production augmentée de peptide  $\beta$ -amyloïde (212). D'autre part, l'expression des gènes PS1 et PS2 mutés rend les neurones plus vulnérables à l'apoptose (80, 81, 271). La surexpression des gènes non mutés de ces protéines provoque aussi une augmentation de l'apoptose neuronale (42, 46).

Malgré l'ensemble de ces observations, l'implication de l'apoptose neuronale dans la pathogenèse de la maladie d'Alzheimer reste controversée au stade actuel des connaissances. En particulier, la durée de l'évolution de cette maladie semble difficilement compatible avec l'existence d'un processus apoptotique, classiquement caractérisé par sa rapidité. Cependant, le fait que les neurones soient des cellules non renouvelables, dont la perte, irréversible, peut avoir des conséquences dramatiques pour l'organisme, permet d'émettre l'hypothèse que ces cellules pourraient avoir développé un système particulier de contrôle de l'apoptose. Ainsi, l'apoptose des neurones adultes pourrait différer de celle des cellules prolifératives. Alors que cette dernière se produit très rapidement dans l'organisme, l'apoptose des neurones matures pourrait se dérouler sur une période beaucoup plus longue (plusieurs mois ou années?) grâce à l'existence de systèmes de régulation particuliers visant à protéger l'organisme (dans certaines limites) d'une perte neuronale massive.

## III.3.2. GSK-3 et la maladie d'Alzheimer

#### La protéine Tau

La protéine Tau est un constituant majeur des fibrilles responsables de la dégénérescence neurofibrillaire. Elle appartient à la famille des MAP («Microtubule-Associated Protein»). Elle est principalement neuronale et joue un rôle dans la polymérisation des microtubules. Le gène des protéines Tau est localisé sur le chromosome 17, à la position 17q21. Le transcrit primaire contient 16 exons. Dans le cerveau, les exons 4A, 6 et 8 ne sont pas traduits. Les exons 2, 3 et 10 sont épissés de manière alternative et sont spécifiques du tissu cérébral adulte. L'épissage alternatif de ces 3 exons produit 6 combinaisons possibles (Figure 7). Au niveau protéique, il y a donc six isoformes de protéines Tau dans le cerveau

adulte. Une seule isoforme est présente à la naissance. Après la naissance, les autres isoformes vont apparaître au cours du développement.



Figure 7– Représentation schématique des 6 protéines Tau produites par l'épissage alternatif des exons 2, 3 et 10.

Les protéines Tau sont très acides dans leur domaine N-terminal. Ce domaine N-terminal a un rôle mal connu. Il pourrait interagir avec la membrane plasmique et certains organites tels que les mitochondries. Le domaine C-terminal est, quant à lui, très basique. Son rôle est beaucoup mieux connu puisque les séquences répétitives codées par les exons 9 à 12, constituent le domaine de liaison aux microtubules. Il existe d'ailleurs une forte homologie de séquences avec les autres membres de la famille des MAP.

Il existe une cinquantaine de résidus sérine et thréonine sur la protéine Tau. Plus d'une vingtaine se sont révélés être phosphorylés. En particulier, les protéines Tau sont phosphorylées de part et d'autre des domaines de liaison aux microtubules. La phosphorylation est donc la principale modification post-traductionnelle de ces protéines. Elle a une grande importance puisqu'elle permettrait aux protéines Tau de réguler la polymérisation des microtubules. Ces protéines Tau sont différemment phosphorylées au sein de l'axone. Les kinases impliquées dans la phosphorylation de Tau *in vitro* sont nombreuses. Parmi les plus communes, citons Cdc2 et Cdk5, GSK-3 $\beta$ , les MAP kinases (Erk1 et Erk2), les MARK, la phosphorylase K, PKA, PKC, les SAP kinases («Stress Activating Protein»: SAPK1 $\gamma$  (JNK1), SAPK2 $\alpha$  (p38), SAPK2 $\beta$ , SAPK3 et SAPK4) et la Tau-tubuline kinase. *In vivo*, il existe également une balance phosphorylation-déphosphorylation médiée par les phosphatases 1, 2A et 2B.

Dans la maladie d'Alzheimer, les protéines Tau, dont une fraction est particulièrement insoluble, sont les constituants antigéniques majeurs des PHF dans les neurones en dégénérescence. Plusieurs équipes ont montré qu'une phosphorylation de ces protéines Tau était responsable de ces modifications. Leur caractérisation biochimique par la technique des immunoempreintes révèle la présence d'un triplet de protéines (Tau 55, 64 et 69), également appelé A68 ou Tau-PHF uniquement dans les cerveaux de patients atteints de la maladie d'Alzheimer. Plusieurs sites de phosphorylation sur les Tau-PHF ont été déterminés *in vivo*, par spectrométrie de masse et par l'utilisation de sondes immunologiques spécifiques des Tau-PHF dépendants de la phosphorylation. Ces sites de phosphorylation sont situés en dehors des régions de liaison aux microtubules, sauf la sérine-262. Ils sont essentiellement de type Sérine-Proline ou Thréonine-Proline. Morishima-Kawashima et ses collaborateurs ont démontré qu'il existait en plus, des sites phosphorylés non Sérine/Thréonine-Proline (167). Actuellement, 21 sites de phosphorylation ont été décrits, dont 10 sont de type non Sérine-Proline ou Thréonine-Proline.

Une étude cinétique de déphosphorylation entreprise sur des biopsies montre qu'après 2 heures à température ambiante, les anticorps monoclonaux dépendants de la phosphorylation ne reconnaissent plus les protéines Tau. Si le délai post-opératoire ou postmortem est supérieur à 2 ou 3 heures, les phosphatases encore actives, vont rapidement déphosphoryler les protéines Tau. Dans le tissu cérébral normal obtenu à l'autopsie, l'analyse des protéines Tau montre qu'elles ne sont pas phosphorylées. Au contraire, dans la maladie d'Alzheimer, le triplet de protéines Tau hyperphosphorylées (Tau-PHF) est constamment retrouvé, quel que soit le délai post-mortem. Suite à ces résultats, l'hypothèse d'une inactivation ou d'une baisse de l'activité des phosphatases dans la maladie d'Alzheimer a été suggérée. En conclusion, le terme d'hyperphosphorylation des protéines Tau dans la maladie d'Alzheimer est donc toujours valable. L'hyperphosphorylation des protéines Tau serait directement responsable de leur incapacité à se lier aux microtubules. Dans le neurone, la déstabilisation des microtubules perturberait des fonctions vitales, comme le transport axonal. Ainsi, le neurone ne pouvant plus assurer sa survie, dégénèrerait.

#### GSK-3b et Tau:

Des expériences, *in vivo*, ont permis de mettre en évidence l'importance de GSK-3 $\beta$  dans la phosphorylation de la protéine Tau (137). En effet, des cellules transfectées avec GSK-3 $\beta$  montrent une phosphorylation de Tau qui correspond à celle trouvée dans les cerveaux de personnes atteintes de la maladie d'Alzheimer (153). Des souris sur-exprimant GSK-3 $\beta$  présentent une augmentation de la phosphorylation de la protéine Tau au niveau de l'épitope reconnu par l'anticorps AT8, mais dans cette expérimentation aucune pathologie neurofibrillaire n'a été observée (22). D'autre part, l'inhibition de GSK-3 $\beta$  par le lithium dans

des neurones diminue la phosphorylation de Tau (103, 104, 126, 170, 233, 272, 283). De plus, GSK-3 $\beta$  et Tau se lient à PS-1 au niveau de régions où PS-1 subit des mutations qui peuvent amener à développer un phénotype de la maladie d'Alzheimer (82, 241, 242). Les mutants PS-1 peuvent induire ce phénotype, au moins en partie, en augmentant la capacité de GSK-3 $\beta$  à phosphoryler Tau. Des phosphorylations séquentielles de Tau par PKA et GSK-3 $\beta$  produisent des protéines Tau similaires à celles trouvées dans la maladie d'Alzheimer (258).

Pei et ses collaborateurs ont montré que GSK-3 $\beta$  active est retrouvée dans les zones du cerveau atteintes par l'hyperphosphorylation de Tau (188). GSK-3 $\beta$  pourrait donc être responsable de l'hyperphosphorylation de la protéine Tau et ainsi de la formation des plaques neurofibrillaires (152).

# Chapitre III

# GSK-3**b** de Plasmodium falciparum

## I. Le paludisme ou malaria

Le paludisme est une maladie endémique due à un parasite du type *Plasmodium* transmis par la femelle d'un moustique, l'anophèle. Cette maladie atteint près de 2 milliards de personnes et environ 300 millions de personnes sont infectées chaque année. Le paludisme est responsable de 2 à 3 millions de morts par an. Cliniquement, cette affection est caractérisée par des accès de fièvre et des complications parfois mortelles. Il n'existe pas, à l'heure actuelle, de vaccin efficace contre le paludisme. La prévention antipaludique repose sur une stratégie globale de lutte contre le vecteur (mesure d'assainissement, suppression des eaux stagnantes, utilisation d'insecticides,...) et contre le parasite lui-même. Plusieurs schémas prophylactiques sont possibles en fonction de l'espèce plasmodiale. Cependant, l'effet de ces thérapies préventives et curatives se trouve de plus en plus souvent altéré par l'apparition de chimiorésistances. Ceci nécessite donc la recherche de nouveaux axes thérapeutiques. La découverte d'une protéine homologue de GSK-3 humaine chez *Plasmodium falciparum* et l'existence d'inhibiteurs chimiques ciblant plus ou moins spécifiquement GSK-3 offrent de nouvelles perspectives de traitement.

#### I.1. Distribution géographique

Actuellement, l'infection touche une centaine de pays situés du 40 degré nord au 29 degré sud. En Europe, le paludisme a été éradiqué. Les quelques cas observés sont liés à l'immigration de personnes infectées. En Afrique, 48 pays sont concernés, soit 400 millions de personnes exposées et 80 millions de cas observés par an. En Asie et Océanie, 28 pays sont touchés, soit 2 millions de personnes exposées et 4 millions de personnes infectées par an. La maladie est également observée dans 21 pays d'Amérique latine et du sud, soit 100 millions de personnes exposées et 1 million de malades déclarés par an (Figure 8).



**Figure 8- Carte de la distribution géographique du paludisme dans le monde.** (vert: zone de sensibilité à la chloroquine, rouge: zone de résistance à la chloroquine, jaune: zone de résistance à plusieurs médicaments).

## I.2. Le parasite, sa transmission et son cycle de reproduction

Le parasite est véhiculé et transmis par l'intermédiaire d'un vecteur, l'anophèle, un moustique de l'ordre des Diptères. Il en existe environ 400 espèces (Meigen, 1818), dont seules 60 ont un rôle en tant que vecteur du paludisme. L'anophèle se trouve dans des zones humides et chaudes. C'est un moustique fortement anthropophile dont la répartition dépasse largement les zones d'endémie palustre. Seule la femelle hématophage qui pique le soir et la nuit et peut transmettre le parasite.

Les parasites responsables de la maladie sont des protozoaires sanguicoles du phylum des *Apicomplexa (Sporozoa)*, de la classe des *Haemosporidea* et de l'ordre des *Haemosporida*. Il existe plusieurs espèces de *Plasmodium: malariae, vivax, ovale* et *falciparum. Plasmodium falciparum,* découvert par Welch en 1897, est le plus redoutable et le plus intensément implanté. Il est répandu dans l'ensemble de la zone intertropicale et provoque le paludisme des "tropiques". Il sévit toute l'année dans les pays équatoriaux où il subit cependant des recrudescences saisonnières. Il ne survient qu'à la période chaude et humide dans les régions subtropicales. Son incubation est de 7 à 12 jours. Il est responsable de la fièvre tierce maligne, de l'accès pernicieux et, indirectement de la fièvre bilieuse hémoglobinurique. La longévité de cet hématozoaire est inférieure à un an.

# Cycle de reproduction de *Plasmodium falciparum*:

Le cycle de reproduction de Plasmodium falciparum est composé de 2 phases qui ont lieu dans 2 hôtes différents (Figure 9, page ). Le cycle asexué s'effectue par schizogonie dans l'organisme humain alors que le cycle sexué se fait par sporogonie chez l'anophèle. Le cycle asexué ou schizogonie comporte une phase pré ou exo-érythrocytaire et une phase érythrocytaire. Dans la phase exo-érythrocytaire, des sporozoïtes sont expulsés des glandes salivaires du moustique par l'anophèle femelle infectée et entrent dans la circulation sanguine de la personne au moment de la piqure. Ces sporozoïtes disparaissent de la circulation sanguine dans les 30 min qui suivent la piqure et pénètrent dans les hépatocytes. Pendant les 14 jours suivants, dans le cas de *Plasmodium falciparum*, les parasites du stade hépatique ("corps bleus" ou schizonte) se différencient et subissent une multiplication asexuée. Il en résulte la formation des dizaines de milliers de mérozoïtes qui vont être libérés des hépatocytes. Le cycle érythrocytaire commence alors, lorsque les mérozoïtes pénètrent dans les globules rouges (érythrocytes) où ils subissent une multiplication asexuée. Passant par les stades ring et trophozoïte et ils produisent chacun 12 à 16 mérozoïtes à l'intérieur d'un schizonte. La longueur de la phase érythrocytaire du cycle de reproduction du parasite dépend de l'espèce: 48 heures pour Plasmodium falciparum, Plasmodium vivax et Plasmodium ovale et 72 heures pour *Plasmodium malariae*. Les manifestations cliniques du paludisme, fièvres et sueurs, sont associées à la rupture synchrone des érythrocytes infectés. Tous les mérozoïtes, ainsi libérés, vont pénétrer dans d'autres érythrocytes. D'après Hotta et ses collaborateurs, le haut synchronisme de la maturation des parasites (stades ring puis trophozoïte puis schizonte) serait dû, au moins en partie, aux secrétions périodiques de mélatonine par l'organisme. En effet, la mélatonine favorise la formation des schizontes et donc la libération synchrone des mérozoïtes qui infestent d'autres érythrocytes (107).

Tous les mérozoïtes ne se divisent pas dans les schizontes, certains en se différenciant en formes sexuelles, **gamétocytes** mâles et femelles sont responsables du cycle sexué. Ces gamétocytes, restés latent dans le sang, sont ingérés par une femelle anophèle au cours d'un repas de sang infecté. A l'intérieur de l'appareil digestif du moustique, le gamétocyte mâle subit une rapide division nucléaire, produisant 8 **microgamètes**. Les **macrogamètes** femelles éjectent leur globule polaire dans l'estomac du moustique où ils peuvent alors être fécondés par les microgamètes. L'**ookinète** qui en résulte traverse la paroi du tube digestif du moustique et forme un **oocyste** au niveau de l'épithélium. Après la rupture de l'oocyste des centaines de sporozoïtes sont relargués dans la cavité générale du moustique où ils vont éventuellement migrer vers les glandes salivaires du moustique. Un cycle asexué peut alors reprendre chez l'homme comme précédemment indiqué. Les différents stades du parasite sont représentés sur la figure 10.



Figure 9- Représentation des cycles de reproduction de Plasmodium falciparum.



# Figure 10- Dessins des différents stades du parasite Plasmodium falciparum.

- 1: érythrocyte normal
- 2 à 10: stades "ring"
- 11 à 18: Trophozoïtes
- 19 à 26: Schizontes (la photo 26 montre un schizonte éclaté)
- 27 et 28: macrogamétocytes mâtures (femelle)
- 29 et 30: microgamétocytes mâtures (mâle).

Ces photos proviennent d'un site Web: <u>http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/Frames/M-R/Malaria/body\_malariadiagfind1.htm</u>. Les photos ont été prises par Coatney GR, Collins WE, Warren M, Contacos PG., un groupe travaillant sur les malarias des primates dans le département de la santé, de l'éducation et du bien-être américain, à Bethesda en 1971.

# II. GSK-3**b** et le paludisme

#### II.1. Le génome de Plasmodium falciparum

Les 30 mégabases du génome de *Plasmodium falciparum* sont distribuées en 14 chromosomes rangés par taille de 650 kb à 3,4 Mb:

•chromosomes de petit poids moléculaire (1, 2, 3, 4)

•les "blobs" ("gouttes") (5, 6, 7, 8, 9)

•chromosomes de poids moléculaire moyen (10, 11, 12)

•chromosomes de haut poids moléculaire (13, 14).

Le consortium international de séquençage du génome de *Plasmodium falciparum* a été créé en 1996 pour séquencer le clone 3D7. A cause de la taille et de la complexité de ce génome, le séquençage a été réparti parmi différentes institutions. Une stratégie de séquençage chromosome par chromosome a été choisi plutôt qu'une approche globale de l'ensemble du génome.

Le séquençage de l'ADN de ce parasite est rendu difficile par le fort pourcentage en nucléotides A (Adénine) et T (Thymidine), 82%. Les parties terminales des chromosomes sont caractérisées par une série de régions répétées (Figure 11). Les télomères ont une structure similaire à celle des autres eucaryotes et contiennent des séquences répétées d'heptanucléotides qui varient en nombre selon les chromosomes. Une région complexe de séquences répétées et une région non-répétitive suivent la région télomérique. La région rep-20 est constituée de répétitions de 21 pb, qui suivent la région non-répétitive et est séparée par un site de restriction ApaI. Les répétitions rep-20 peuvent constituer plus de 5 % du génome du parasite.



Figure 11- Schéma représentant les extrémités des chromosomes de *Plasmodium* falciparum.

Le séquençage a été effectué par trois groupes:

- "The Institute for Genomic Research" (TIGR) et le programme contre la malaria du centre de recherche médicale navale pour les chromosomes 2, 10, 11 et 14,

- "Sanger Center" pour les chromosomes 1, 3 à 9 et 13 et

- l'université de Stanford pour le chromosome 12.

Les données sur le génome de *Plasmodium falciparum* sont disponibles sur différents sites internet:

<u>http://plasmodiumdb.cis.upenn.edu/</u>: ce site de l'université de Pennsylvanie donne accès à toutes les données sur le génome produites par le consortium.

<u>http://www.tigr.org/tdb/edb2/pfa1/htmls/</u>: ce site donne accès à la séquence complète du chromosome 2 et aux séquences préliminaires obtenue pour les chromosomes 10, 11, et 14.
Actuellement, plus de 95 % du génome de *Plasmodium falciparum* a été séquencé.

#### II.2. GSK-3 de Plasmodium falciparum

Le séquençage nucléotidique du chromosome 3 a été achevé en 1999 (14). Il a permis de mettre en évidence l'existence d'un gène, PFC0525C, codant pour une protéine homologue à la GSK-3 humaine. En effet, la protéine GSK-3 de *Plasmodium falciparum (Pf*GSK-3) présente 38% d'identité et 49% d'homologie avec la protéine GSK-3 $\alpha$  humaine et 43% d'identité et 54,2% d'homologie avec GSK-3 $\beta$  humaine. Les protéines GSK-3 $\alpha$  et GSK-3 $\beta$  humaines présentent 66,7% d'identité et 72,9% d'homologie entre elles. Ces pourcentages ont été calculés par le logiciel MacShadeBox, à partir de l'alignement des séquences de ces trois protéines par le logiciel ClustalX (Figure 12). GSK-3 de *Plasmodium falciparum* est constitué d'une seule chaîne polypeptidique de 452 acides aminés et possède une masse molaire de 53,13 kDa. La comparaison des séquences protéiques de GSK-3 $\alpha$  et GSK-3 $\beta$  humaines avec celle de *Pf*GSK-3 montre une conservation stricte de 178 acides aminés. Cette conservation est beaucoup plus importante au niveau du domaine catalytique.

	<u> </u>	20	30	40	50 <u>.</u> .	60
hGSK-3 $\alpha$ ?	1:MSGGGPSGGGPGGSG	GRARTSS <mark>F</mark> AEP	GGGGGGGGGG	GPGGSASGPG	GTGGGKA <mark>S</mark> VO	GAMGGGV: 60
hGSK−3β?	1:MSG	RPRTTS <b>F</b> AES		.CKPVQQPS	FGSMKV <mark>S</mark> R.	: 30
PfGSK-3	1:MNRQKYM	IYIHKSL <mark>F</mark> CDI	NNEDIN.IYE	EEKNHTNNKNY	VNNFEM <mark>S</mark> DQ	QK: 46
consensus	1:!**	*-***!**-		***_*	-***!	: 60
		80	90	. 100	. 110	. 120
hGSK-3a?	61:GASSSGGGPGGSGGG	GSGGPGAGTS	FPPPGVKLG	RDSGKVTTVVI	ATLGQGPERS	SQEVAYT:120
hGSK-3β?	30:	• • • • • • • • • • •	Dr	DGSKVTTVVA	ATPGQGPDRI	QEVSYT: 57
PIGSK-3	46:	• • • • • • • • • • •	.DEEEYSHSS	SNRSEDEDEEF	<b>UTDNEINR</b> S	SPNKSYK: 80
consensus	61:		'	· · _ · · · · · · · · · · · · · · · · ·		****!*:120
	130	140	150	160	170	180
hagk-302			$\mathbf{A} \mathbf{I} \mathbf{K} \mathbf{K} \mathbf{M} \mathbf{O} \mathbf{D} \mathbf{K} \mathbf{I}$	PEKNEELOIME		PVFFV:180
hogy 282						DVFFY · 117
DFCGK-3	81:LCN ICNCSECVVV	ALCIDISCU.	ATKKVLOD <mark>D</mark>			
consensus	121:*-**!!!!!!!!!!	· ! * * _ * * _ ! * !	**	**!!!!!*!!*	*   *   *     * *	*!****!:180
competibub						
	190	. 200	. 210	. 220	. 230	. 240
hGSK-3 $\alpha$ ?	181:SSGE <mark>KK</mark> D <mark>ELYLN</mark> I	VLEYVPETVY	RVARHFTKA	(LTIPILY <mark>VK</mark> )	/YMYQLFRSI	AYTHSQ:238
hGSK−3β?	118:SSGEKKDEVYLNI	VLDYVPETVY	RVARHYSRAF	KOTLPVIYVKI	YMYOLFRSI	AYIHSF:175
PfGSK-3	141: TESF <mark>KK</mark> NEKNIFLNV	VMEYIPQTVH	KYMKYYSRNN	J QALPMFLVKI	YSYQLCRAI	SYIHSK:200
consensus	181:****!!*!**!!*	:!**!*!*!!*	* * * * * * * * * * *	***!***!!*	· ! * ! ! ! * ! * !	*!!!!-:240
	250	. 260	. 270	. 280	. 290	. 300
hGSK−3α?	239:GVCHRDIKPQNLLVI	DP <mark>DTAV</mark> LKLCD	FGSAK <mark>Q</mark> LVRO	EPNVSYICSF	RYYRAPELIE	GATDYT:298
hGSK−3β?	176:GICHRDIKPQNLLLI	OP <mark>DTAVLKLCD</mark>	FGSAK <mark>Q</mark> LVRO	EPN <mark>VSYICSF</mark>	YYRAPEL I F	GATDYT:235
PfGSK-3	201:FICHRDLKPQNLLI	PRTHTLKLCD	FGSAKNLLA	QRSVSYICSF	FYRAPELMI	GSTNYT:260
consensus	241:**!!!!*!!!!!!	!*!**!!!!!	!!!!!*!**!	***!!!!!!!	*!!!!!!**	*!*!*!!:300
	21.0	320	330	340	350	360
haar 200						
hcer 282		JULGQPIPPGD				
DfGSK-3	261: THIDIWSLOCIAE	IIIGQFIFFGD III.CVPIFSCO	SSVDOLVEIJ			DTKFPD: 320
consensus	301:**!!*!!*!!*	**!!*!!!*!*	*     *	×!!!!!!	**!!!!!!	***!!!*:360
00112011202						
	370	. 380	. 390	. 400	. 410	. 420
hGSK−3α?	359:IKAHPWTKVFKSRTI	PPEAIALCSSL	LEYTPSSRLS	SPLEACAHSFI	DELRCLGT	LPNNRP:418
hGSK−3β?	296:IKAHPWTKVFRPRTE	PEAIALCSRL	LEYTPTARL1	PLEACAHSFE	DELRDPNVK	HPNGRD:355
PfGSK-3	321:VKSKDLRKVFPKGTP	D <mark>EAI</mark> NLITQF	LKYEPLK <mark>RL</mark> N	JPIEALADPFF	DELRDPCIK	KLPKYID:380
consensus	361:*!*****!!!*-*!!	*!!!*!**-*	!*!*!*-!!*	*!*!!*!**!!	!!!!**-**	**!*-**:420
-	430	. 440	. 450	. 460	. 470 .	480
hGSK-3 $\alpha$ ?	418:.LPPLFNFSAGELSI	IQPSLNAILIP	PHLRSPAGT.	TTLTPSSQAL	TETPTSSDW	STDATP:477
hGSK−3β?	355:.TPALENETTQELSS	NPPLATILIP	PHARIQAAAS	STPTNATAASI	DANTGDRGQT	INNAASA:414
PfGSK-3	381:KLPELFNFCKEEIQE	MSMECRRK	PKNVYEEFLN	IVDENDNNIIN	DTISNDFNE	ESNLDTN:440
consensus	421:-^!-!!!!*!**-	**!*	! ^ _ ^ <del>*</del> * _ <sup>7</sup>	· · _ · · _ * * * * _	- ^ _ ^ _ * _	:480
	490					
hask-30	478: TLINSS : 49	33				
hask-2R	415:SAGNST .42	20				
pfGSK-3	441:NSNNKTHVITES:45	52				
consensus	481:*-*!**:49	2				



L'alignement des séquences de ces trois protéines a été réalisé par le logiciel ClustalX.

Les acides aminés surlignés en noir sont identiques pour les trois séquences (! pour la séquence consensus). Les acides aminés surlignés en gris foncé sont similaires pour les trois séquences (\* pour la séquence consensus). Les acides aminés surlignés en gris clair sont identiques pour deux séquences (\* pour la séquence consensus).

# PARTIE II: LES PROTEINES DE LA FAMILLE POLO

Chapitre I

# **DECOUVERTE DES PROTEINES POLO**

Comme nous l'avons vu précédemment, la division des cellules est contrôlée par de nombreuses protéines (Partie I, Chapitre II, paragraphe II.1., page 11). Les protéines de la famille Polo peuvent être divisées en 2 groupes: les protéines de la transition G1/S et celles de la transition G2/M (Figure 13).



# Figure 13- Implication des protéines de la famille Polo dans le contrôle du cycle cellulaire.

Le cycle de division cellulaire est contrôlé principalement par la famille des Cdk associées aux différentes cyclines. Ces complexes sont régulés par de petites protéines, les CKI, et par des phosphatases et des protéines kinases. Les protéines de la famille Polo interviennent en troisième position en contrôlant, entre autre, la régulation des phosphatases Cdc25.

# I. La première protéine de la famille: Polo de drosophile

La protéine kinase Polo a été identifiée pour la première fois chez la drosophile. En 1991, Llamazares et ses collaborateurs ont cloné le gène polo grâce à un mutant possédant un allèle portant un transposon, un élément P. Les ADNc séquencés correspondent aux transcrits du locus sauvage. Deux transcrits ont été trouvés (2,2 et 2,5 kb), ceci peut s'expliquer par les différentes tailles des parties 5' et 3'. Le locus de ce gène est localisé sur le chromosome 3. Le gène polo code pour une protéine de 577 acides aminés dans laquelle la séquence des 277 acides aminés du domaine N-terminal présente une identité importante avec le domaine catalytique des protéines kinases et contient les 11 sous-domaines conservés de ces protéines kinases (89). La séquence typique des protéines sérine/thréonine kinases a été trouvée dans la protéine Polo: GTANYIAPE (150).

En 1988, Sunkel et Glover ont décrit 2 mutations de Polo (polo1 et polo2) impliquées dans la diploïdie des cellules de larve de drosophile. La mutation polo1 a été isolée à partir d'un criblage génétique destiné à sélectionner des femelles stériles. Chez les mutants polo1, on constate que les pôles et les fuseaux mitotiques sont anormaux. Dans ces mutants polo1, trois sortes d'anomalies ont été observées en métaphase: un arrangement circulaire des chromosomes avec des chromosomes normaux, des noyaux polyploïdes et des figures aneuploïdes. Cependant, il n'y a pas de fragmentation de la chromatine et les chromosomes subissent une condensation normale. En anaphase, les chromosomes attachés à un des pôles du fuseau mitotique paraissent être orientés de façon aléatoire et ne sont pas liés à leurs télomères en pointant vers le centre du fuseau. Les larves homozygotes présentent également des divisions mitotiques aberrantes au niveau des cellules neuronales. De plus, les mâles homozygotes présentent des méioses anormales. En ce qui concerne la méiose, les mutants polo1/polo1 montrent des images tétra et multipolaires au lieu des images bipolaires observées dans le type sauvage. Les chromosomes sexuels ne sont pas séparés provoquant la stérilité chez les drosophiles mâles. En ce qui concerne la protéine Polo, cette protéine issue de l'allèle mutant polo1 n'est pas phosphorylée et, ainsi, a une activité kinase très réduite (243). L'allèle polo2 a été trouvé parmi une collection d'embryons dont la mort a été induite par un élément P. Ce second mutant, polo2, est un allèle plus fort qui cause la mort des larves homozygotes. Il a été montré que cet allèle contient une insertion au début du transcrit (150), ceci peut induire une complète absence de transcrit de la protéine Polo. Les larves hétérozygotes polo1/polo2 sont viables. Ces observations suggèrent que les mutations du gène polo affectent une protéine requise pour la formation correcte des centrosomes et leur bon fonctionnement (239). Les mutations de la protéine kinase Polo entraînent des anomalies de la division cellulaire (71).

# II. Les autres membres de la famille

La protéine Polo, isolée chez la Drosophile, est le premier membre d'une famille constituée aujourd'hui de 15 protéines trouvées dans des espèces très diverses allant de la levure à l'homme (71, 72, 79, 136, 183) (Tableau 4 et Figure 14).

Espèces	Nom	Taille (acides aminés)	Références	Numéro d'accession Gene - Bank:			
Transition G1/S							
Homo sapiens	hSnk	685	Anderson <i>et al.</i> , non publié	AAC14573			
Mus musculus	mSnk	682	(225)	AAF08366			
Homo sapiens	hPrk	607	(145)	AAC50637			
Mus musculus	hSak a	970	(65)	CAA73575			
	hSak b						
Mus musculus	mFnk	631	(50)	A57286			
Rattus norvegicus	rFnk	615	(121)	AAF08367			
Transition G2/M							
Drosophila melanogaster	Polo	576	(150)	CAA44963			
Homo sapiens	hPlk	603	(74)	CAA51837			
Mus musculus	mPlk	603	(34)	AAA56635			
Rattus norvegicus	rPlk	603	(135)	AAA18885			
Xenopus laevis	Plx1	598	(131)	AAC60017			
Saccharomyces cerevisiae	Cdc5	705	(124)	AAA02576			
Schizosaccharomyces pombe	Plo1	683	(178)	CAA59766			
Caenorhabditis elegans	Plc1/Plk1	648	(183)	AAC34661			
	Plc2	615	(183)	AAC14425			
	Plk2	632	(29)	AAF28314			
Trypanosoma brucei	TbPlk	767	(79)	CAA74301			
Protéine qui active Plx1							
Xenopus laevis	xPlkk	950	(203)	AAC95157			

Tableau 4- Les protéines de la famille Polo.



# Figure 14- Arbre phylogénétique des protéines de la famille Polo.

Cet arbre a été réalisé par le logiciel MacShadeBox, à partir de l'alignement des séquences protéiques de ces protéines par le logiciel ClustalX.

#### II.1. Les protéines Polo de la transition G1/S

Cinq protéines kinases affiliées à la famille Polo interviennent au niveau de la transition G1/S. Ces protéines (Snk, Fnk, Prk, Sak-a et Sak-b) possèdent la séquence caractéristique de protéines de la famille, la «Polo box», et présentent un pourcentage élevé d'homologie avec les protéines Polo de la transition G2/M. Ainsi, Snk présente 41% d'homologie avec la protéine Plk.

## Snk, la sortie de la phase Go et la transition G1/S

Le gène de la protéine Snk (<u>S</u>erum-<u>in</u>ducible <u>k</u>inase) a été cloné chez la souris par Simmons et ses collaborateurs (225). L'expression de ce gène précoce est fortement induite par ajout de sérum ou d'ester de phorbol dans le milieu de cellules en culture. Les ARNm codant pour la protéine Snk sont retrouvés dans le cerveau, les poumons et le cœur chez la souris adulte et dans les poumons, le cerveau, la rate, le foie et le cœur pour les tissus fœtaux. La protéine sérine/thréonine kinase Snk est exprimée au cours des phases G0, G1 et S du cycle de division cellulaire.

Les protéines Snk et Fnk sont également exprimées au niveau des neurones postmitotiques alors que Plk ne l'est pas. Il apparaît que Snk s'associe à une protéine qui lie les intégrines (Cib) et qu'ainsi elle intervient au niveau de la stabilisation de LTP («Long-Term Potentiation») dans les neurones. La protéine Snk interviendrait donc également dans d'autres voies que le cycle cellulaire (120).

Le séquençage complet du génome de *Saccharomyces cerevisiae* a permis de montrer que Snk/Fnk est absent et qu'apparemment Cdc5 est le seul membre de la famille Polo chez cette levure (112). Cette absence de Plk interphasique pourrait être une caractéristique des eucaryotes inférieurs. Cette hypothèse est soutenue par Ouyang et ses collaborateurs (183).

#### II.2. Les protéines Polo de la transition G2/M

#### II.2.1. Xenopus laevis : Plx1

En 1996, Kumagai et Dunphy ont isolé et purifié une protéine kinase qui régule l'activité de la phosphatase Cdc25C, à partir d'œufs de xénope. La purification a été réalisée par chromatographie d'affinité sur une colonne de phosphatase Cdc25C immobilisée associée à la recherche d'une activité kinase spécifique de Cdc25C. Ils ont trouvé une protéine de 67 kDa avec un ADNc correspondant de 2,4 kb (131). En comparant la séquence en acides aminés de cette protéine avec celles des protéines de la famille Polo (Polo, Plk1, Plo1, Cdc5...), ils ont constaté que cette kinase avait une forte homologie avec les kinases Polo et

l'ont intégré dans la famille Polo sous le nom de Plx1 («Polo-like kinase of *Xenopus laevis* 1») (150).

Plx1 est activée, *in vivo*, au cours de la maturation ovocytaire suivant la même cinétique que Cdc25C. Cependant, alors que l'injection d'anticorps anti-Plx1 inhibe complètement l'activité de Plx1, ils ne bloquent pas totalement l'activation de Cdc25C. Or, il a été montré, *in vitro*, que le complexe Cdc2/cycline B et Plx1 phosphoryle Cdc25C sur des épitopes MPM2 (130, 131). Il semble donc, qu'en plus de Plx1, Cdc2/cycline B et voire d'autres protéines kinases contribuent à l'activation de Cdc25C (21, 201).

#### II.2.2. Les Polo de mammifères : hPlk1, mPlk1 et rPlk1

Le gène Plu1 a été cloné chez différentes espèces de mammifère. Son promoteur a été analysé chez l'homme. Ce promoteur est activé en phase S et atteint un maximum d'activité à la transition G2/M (251). Ces auteurs ont identifié une région nécessaire à l'expression du gène. Elle se situe entre les nucléotides -33 à -93 et possède au moins trois éléments de régulation positive. Le premier élément ne contient pas de site consensus connu (-93 à -75), le second possède un élément riche en GC qui inclut un site SP1 (75 à -45) et le troisième un domaine CAATT (-45 à -33).

Ces protéines ne sont exprimées que dans les tissus à activité mitotique élevée: tissus embryonnaires, tissus adultes tels que le tissu hématopoïétique, les gonades, le placenta ou le thymus, ainsi que dans les cellules tumorales (102). D'après Wolf et ses collaborateurs, l'expression de Plk dans les cellules pulmonaires est un bon indicateur dans le pronostic du cancer des grandes cellules du poumon. Les patients dont les tumeurs montrent une expression modérée de Plk survivent significativement plus longtemps que ceux présentant une forte expression (270).

#### II.2.3. Saccharomyces cerevisiae : cdc5

Le gène codant pour l'homologue de la protéine Polo chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* a été découvert par complémentation de levure portant une mutation thermosensible pour le gène DBF4 (124). La séquence nucléotidique de ce gène, tout d'abord nommé MSD2 («Multicopy Suppressor gene of DBF4 mutation»), est identique à celle du gène cdc5. La protéine correspondante possède de grande similarité avec les domaines catalytiques des protéines kinases (89). De plus, en analysant la séquence protéique, Kitada et ces collaborateurs se sont aperçus que Cdc5 possède une homologie de séquence importante avec la protéine Cdc5 a donc été intégrée à la famille Polo. La quantité d'ARN de Cdc5 varie au cours du cycle avec un pic au niveau de la transition G2/M. La délétion de Cdc5 est

létale. Les levures mutantes présentent une morphologie en forme d'haltères avec des noyaux divisés mais toujours liés.

Grâce à ce modèle, les rôles des protéines de la famille Polo ont pu être un peu mieux compris. En effet, l'étude des mutants Cdc5 a permis de montrer que cette protéine intervient à plusieurs niveaux du cycle cellulaire: réplication de l'ADN (90), contrôle du cycle en cas de lésion de l'ADN (247), sortie de la mitose par régulation de l'activité de l'APC (28, 32, 220), cytokinèse (141, 142, 228, 229).

#### II.2.4. Schizosaccharomyces pombe : Plo1

Okhura et ses collaborateurs ont isolé un gène homologue à ceux codant pour les protéines de la famille Polo chez *Schizosaccharomyces pombe* (178). Plo1 est la première kinase identifiée qui soit essentielle pour la progression de la mitose chez la levure fissipare. Les phénotypes cellulaires dus à la perte de Plo1 montrent trois types de cellules anormales:

- des cellules avec un seul groupe de chromosomes condensés,
- des cellules sans septum avec deux noyaux en interphase,
- des cellules sans septum avec deux groupes de chromosomes condensés.

De plus, les mutants qui réalisent la première mitose, ne peuvent pas former de septum et sont alors bloqués au cours de la seconde mitose. Ainsi, Plo1 est nécessaire pour la progression de la mitose, la formation du fuseau mitotique bipolaire et du septum.

#### II.2.5. Trypanosoma brucei : TbPlk

En 1994, Hua et Wang ont amplifié un fragment de 195 pb d'ADN de *Trypanosoma brucei* codant pour un peptide de 65 acides aminés (110). Ce peptide présente 58% d'identité avec la séquence du gène polo de *Drosophila melanogaster*. En utilisant cette séquence, en 1998, Graham et ses collaborateurs ont pu isoler le gène codant pour la protéine Polo de *Trypanosoma brucei*, TbPlk (79). Ce gène code pour une protéine de 767 acides aminés. L'ARNm codant pour TbPlk fait 5,4 kb au lieu de 2,3 kb prévisibles en se basant sur la taille de la protéine. En fait, cet ARNm contient un grand nombre de séquences non traduites comme pour les autres ARNm de ce parasite (57). TbPlk présente 50,4% d'identité avec les protéines Plk de mammifère au niveau du domaine catalytique. Elle possède les 11 sous-domaines caractéristiques des protéines kinases (88, 89) et contient la séquence «GxGGFAxC» dans le sous-domaine I qui est également présente dans les autres protéines de la famille Polo. Au niveau du domaine C-terminal, la protéine TbPlk possède la «Polo-box» comme les autres Polo (136). Comme Cdc5 (*S. cerevisiae*) et Plo1 (*S. pombe*), TbPlk possède un plus grand domaine intermédiaire (entre le sous-domaine XI et la «Polo-box») que les autres Plk. De plus, La protéine TbPlk est exprimée à des niveaux comparables dans les deux

stades de *Trypanosoma brucei*: le stade procyclique chez l'insecte hôte (la mouche Tsetse) et le stade sanguin chez les mammifères infectés. Une analyse phylogénétique confirme l'appartenance de cette protéine à la famille Polo.

#### II.2.6. Caenorhabditis elegans : Plc1/Plk1, Plk2 et Plc2

Grâce à la banque de données du NCBI (National Center for Biotechnology Information) concernant le séquençage du génome de Caenorhabditis elegans, Ouyang et ses collaborateurs ont identifié deux protéines homologues des protéines Plk et Prk humaines (183). L'alignement des séquences protéiques de Plc1 et Plc2 ("Polo-like kinase from Caenorhabditis elegans" 1 et 2) a permis de mettre en évidence qu'il existe 46,2 % d'identité entre ces deux protéines (Tableau 6) et que Plc2 ne possède pas de «Polo box» complète. La comparaison avec les protéines Prk et Plk humaines permet de classer Plc1 et Plc2 dans la famille des protéines Polo. Les gènes plc1 et plc2 sont localisés sur le chromosome 3 et sont séparés de 200 kb. D'après Ouyang et ses collaborateurs, ceci suggère que ces deux gènes proviennent d'une duplication d'un gène ancestral suivie d'une évolution indépendante (183). Afin de caractériser les fonctions de Plc1, Chase et ses collaborateurs ont utilisé la technique du RNAi («RNA-mediated interference») pour obtenir des embryons de Caenorhabditis elegans Plc1<sup>-/-</sup> (29). Ces embryons, ne possédant plus de protéines Plc1, ne peuvent pas se diviser, et malgré la fécondation, ils présentent de nombreuses anomalies ne permettant pas de finir la méïose et ne forment pas de globule polaire. Ils présentent un retard dans la rupture de l'enveloppe nucléaire, qui peut être mimé par une injection d'ARN correspondant au gène ncc-1, par la technique du RNAi, dans des embryons sauvages (la protéine Ncc-1 est l'homologue de Cdc2). Il apparaît donc que Plc1 et Ncc-1 interviennent dans la même voie de signalisation ou dans deux voies qui agissent en parallèle. La localisation de Plc1 au cours de la mitose correspond à celle de la Plk humaine. Les anomalies dues à l'absence de la protéine Plc1 dans les embryons RNAi montrent que cette protéine joue plusieurs rôles: possibilité d'activation de Ncc-1 (à priori comme Plx1 chez le xénope par activation de Cdc25) donc entrée en mitose, ségrégation des chromosomes et cytokinèse (30). D'autre part, Chase et ses collaborateurs ont trouvé une troisième protéine appartenant à la famille Polo chez Caenorhabditis elegans (29), Plk2. Cette nouvelle protéine possède une «Polo box» et est plus homologue à Plc1 qu'à Plc2.

## II.3. Homologie entre les différentes protéines de la famille Polo

Le pourcentage d'homologie entre ces différentes protéines kinases varie de 37% entre hPlk1 et Cdc5 à 95% entre hPlk1, mPlk1 et rPlk1 (Tableau 5). Il existe des séquences consensus communes à toutes les protéines Polo, caractéristiques des sérine/thréonine kinases ou plus spécifiquement de la famille Polo (Figure 15).

	Plc1	Plc2	rPlk	mPlk	hPlk	Plx1	Polo	Cdc5	Plol	TbPlk
Plc1		56.3	46.6	47.4	46.9	47.9	46.6	31.9	34.3	29.7
Plc2	46.2		56.9	57.8	58.0	58.8	54.2	36.5	38.1	33.0
rPlk	35.7	44.5		97.8	95.4	85.3	61.4	37.5	39.8	35.1
mPlk	36.3	45.1	97.8		96.2	85.7	62.1	37.9	40.7	35.5
hPlk	35.6	45.4	93.9	94.7		86.7	61.9	37.6	40.2	35.5
Plx1	35.9	46.8	76.4	76.9	78.1		62.6	38.8	42.0	36.9
Polo	32.6	40.0	48.5	49.0	48.7	48.5		37.2	38.2	34.2
Cdc5	22.9	24.7	26.1	26.6	25.9	26.1	24.3		48.8	36.1
Plol	23.3	26.1	28.2	28.8	28.5	30.2	27.6	35.1		41.4
TbPlk	19.6	20.2	24.6	24.8	24.8	25.6	21.8	25.0	28.6	

Tableau 5– Pourcentages d'identité (en bleu) et d'homologie (en noir) entre les différentes protéines de la famille Polo.



Figure 15- Schéma des différents domaines communs aux membres de la famille des protéines sérine/thréonine kinases Polo.

En éliminant la séquence dite «inhibitrice de l'activité kinase», on augmente l'activité (169).

# III. Rôles biologiques de Polo

#### III.1. Substrats des protéines Polo de la transition G2/M

En tenant compte des différences inhérentes aux différentes espèces, toutes les protéines de la famille Polo ont les mêmes fonctions. En effet, elles sont toutes impliquées dans le cycle cellulaire au niveau de l'entrée et de la sortie en mitose et de la cytokinèse.

Polo phosphoryle, de la même façon, les résidus sérine et thréonine de la caséine, mais on détecte plus de phospho-thréonine sur la  $\beta$ -tubuline. Dans aucun des deux cas, on ne retrouve de phospho-tyrosine, confirmant que Polo est une sérine/thréonine kinase.

Les différents substrats de Polo sont tous relatifs à la transition G2/M et à la fin de la mitose (Tableau 6): la phosphatase Cdc25C, la tubuline, ainsi que les protéines mitotiques (DNA topoisomérase II, NimA, Wee1, Myt1, Cdc27 de l'APC...) contenant un des épitopes reconnus par l'anticorps monoclonal MPM2 deviennent phosphorylées à la transition G2/M et

sont déphosphorylées à la fin de la mitose. De plus, les protéines MPM2 sont localisées au niveau de plusieurs structures subcellulaires telles que les centrosomes, les kinétochores, l'axe des chromosomes et du fuseau mitotique [Davis, 1983 #359; Vandre, 1984 #360; Taagepera, 1993 #361; Taagepera, 1995 #362]. Chez la drosophile, elles ont la même localisation que Polo (151). Tout ceci tend à montrer que Polo serait une kinase MPM2 (135, 140, 182). En 1998, Logarinho et Sunkel ont montré que la protéine de drosophile, Polo, est nécessaire à la phosphorylation des épitopes MPM2. Le niveau d'immunoréactivité des épitopes MPM2 est directement corrélé à la sévérité des allèles mutants de Polo. Polo est nécessaire à la phosphorylation des épitopes MPM2, chez la drosophile, au niveau des centrosomes, des centromères et du fuseau mitotique. Ainsi, Polo doit être impliquée dans la coordination des changements dans l'architecture des cellules en mitose avec l'activité du MPF. Polo est l'une des kinases MPM2 liée de façon stable au cytosquelette qui peut être impliquée dans la rephosphorylation des épitopes MPM2.

Substrats de Polo	Rôles
β-tubuline	Formation du fuseau mitotique
MAP (Microtubule - Associated Protein, 85 kDa)	Formation du fuseau mitotique
Mid1	Formation du fuseau mitotique
M-KLP (Kinesin-Like Protein)	Formation du fuseau mitotique
Pav-KLP	Formation du fuseau mitotique
Asp (220 kDa)	Protéine du centrosome
Cdc25C	Activation du MPF et ainsi entrée en mitose
APC (Anaphase-Promoting Complex)	Dégradation de la cycline B et ainsi sortie de mitose
Cdc20	Cofacteur de l'APC
Cdc16 *	Constituant de l'APC
Cdc27 *	Constituant de l'APC
Tgs24 *	Constituant de l'APC
épitopes MPM2	Protéines phosphorylées en mitose
Pin1	Prolyl isomérase

# Tableau 6- Substrats des protéines de la famille Polo.

Le tableau regroupe les données de larticle de synthèse de Glover et ses collaborateurs de 1998 (70) sauf pour les protéines Cdc16, Cdc27 et Tgs24 marquées d'une \* (129).

#### III.2. Rôle de Polo dans la régulation de la transition G2/M

#### III.2.1. Influence de Polo sur la localisation de la cycline B

La localisation de la cycline B joue un rôle crucial dans l'activation du MPF. En effet, la cycline B se trouve dans le cytoplasme en interphase et pendant les phases G1 et S, puis passe dans le noyau en prophase où elle peut s'associer à Cdc2. La phosphorylation de la cycline B joue un rôle essentiel dans le translocation nucléaire de la protéine (84, 146, 276). La cycline B possède une séquence NES («Nuclear Export Signal») (85, 249, 276). Toyoshima-Morimoto et ses collaborateurs ont démontré, très récemment, que Plx1 phosphoryle la sérine-147 de la cycline B1 de xénope et permet ainsi la translocation de la cycline B1 du cytoplasme vers le noyau (250). En effet, ce résidu sérine est situé dans la séquence NES de la cycline B1. Il apparaît donc que Plx1 est impliqué dans la localisation du MPF dans le noyau en prophase.

#### III.2.2. L'auto-amplification du MPF

Plx1 participe à la boucle d'auto-amplification de l'activation du MPF. En 1998, Qian et ses collaborateurs ont purifié et cloné une protéine kinase qui phosphoryle et active Plx1, *in vitro* (203). La cinétique d'activation de cette kinase, xPlkk1, *in vivo*, correspond à celle de Plx1 (201). Plkk1 et Plx1 ne sont pas nécessaires pour l'activité basale de Cdc2/cycline B. Cependant, les kinases Plx1 et Cdc2/cycline B sont nécessaires pour l'auto-amplification du MPF. D'autre part, la phosphorylation de Cdc25C par Cdc2/cycline B est un pré-requis pour l'activation complète de Cdc25C et sa phosphorylation par Plx1 (1).

Cette auto-amplification de l'activation du MPF se fait en 2 étapes. La 1<sup>ère</sup> étape dépend uniquement de l'activité basale de la phosphatase Cdc25C qui permet une activation linéaire du MPF. Elle est indépendante de la phosphatase PP2A et de l'association du MPF avec Cdc25C par l'intermédiaire de la protéine p9<sup>Suc1/Cks</sup>. Les protéines kinases Plkk1 et Plx1 sont activées, lors de cette 1<sup>ère</sup> étape. La 2<sup>ème</sup> étape de l'auto-amplification dépend de l'inhibition de PP2A, de l'activité de Plx1 et de l'interaction de la protéine p9<sup>Suc1/Cks</sup> pour l'association du MPF avec la Cdc25C (119) (Figure 16).

Chez le xénope, l'activation de Plx1 est suffisante pour activer Cdc25C et initier la mitose. Par ailleurs, l'inactivation de Plx1 est requise pour la dégradation complète de la cycline B2 après l'anaphase et pour la fin de la cytokinèse (202).



Figure 16- Schéma des 2 étapes de l'auto-amplification de l'activation du MPF.

En résumé, l'activation de ce complexe est directement contrôlée par la phosphatase Cdc25C (52, 68, 161). La protéine Cdc25C est elle-même régulée par un système de phosphorylations/déphosphorylations qui fait notamment intervenir la sérine/thréonine kinase Plx1, chez le xénope (131, 132). Les protéines kinases de la famille Polo, qui régulent la phosphatase Cdc25C et par là même, l'activité du complexe p34<sup>cdc2</sup>/cycline B, contrôlent l'entrée en mitose.

Elles agissent sur la formation du fuseau mitotique et, dans le cas de Plx1, sur la localisation de la cycline B et sur la phosphatase Cdc25C, activateur du complexe  $p34^{cdc2}$ /cycline B.

#### III.2.3. Polo et la protéine Pin1

La protéine Pin1 est un nouveau régulateur négatif de la mitose, très bien conservée de la levure à l'homme (154). Le fait que l'homologue de Pin1 chez la drosophile, dodo, complémente un mutant de Pin1 chez la levure souligne encore la nature conservée de ces protéines (156). Pin1 est un membre de la famille des parvulines procaryotes des peptidyl-prolyl isomérases (PPIases). Les PPIases sont impliquées dans le trafic intracellulaire (213). Les PPIases eucaryotes de type parvuline, incluant Ess1 chez *S. cerevisiae* (87), dodo chez la drosophile (156) et Pin1 chez l'homme (154), possèdent un domaine WW en N-terminal de la séquence protéique, pouvant être responsable d'interactions protéine-protéine (236). Pin1 a été identifiée par criblage chez la levure par la technique du «double-hybride» comme une protéine interagissant avec la kinase mitotique NIMA («Never In Mitosis A») (278) et supprimant l'activité promitotique de NIMA (154). Ceci suggère que Pin1 exerce son effet de régulateur du cycle cellulaire par modulation d'une voie impliquant NIMA (154). De plus, Pin1 se co-localise avec NIMA dans le noyau et induit un arrêt de la mitose quand elle est sous-exprimée dans les cellules Hela (154).

Cependant, Pin1 empiète sur la voie de régulation du cycle cellulaire dépendante du MPF. En particulier, Pin1 peut interagir physiquement avec des régulateurs de Cdc2/cycline B tels que Cdc25, Plx1, Plk1, Myt1, Wee1, Cdc27... etc (234). Pin1 peut se lier à la phosphatase Cdc25C mitotique mais pas à celle d'un extrait d'œufs en interphase. Pin1 se lie sélectivement à la forme phosphorylée de Cdc25C et Cdc2/cycline B peut convertir la forme non phosphorylée de Cdc25C en une protéine capable d'interagir avec Pin1. D'autre part, la liaison de Plx1 à Pin1 peut se produire indépendamment de l'association à Cdc25C. Cependant, Plx1, transcrit *in vitro* dans un lysat de réticulocytes, ne peut pas se lier à Pin1 sans être d'abord incubé avec un extrait interphasique ou mitotique, ceci suggère la nécessité d'une ou plusieurs modification(s) post-traductionnelle(s) ou la liaison à une autre protéine pour l'interaction Plx1-Pin1. Le niveau de la protéine Pin1 est constant au cours du cycle cellulaire. Ainsi, l'interaction de Pin1 avec ses cibles est régulée par le cycle cellulaire et dépend des phosphorylations de ces protéines cible (216).

L'influence de Pin1 sur l'activité de Cdc25C est très controversée. En effet, Crenshaw et ses collaborateurs ont pu détecter une activité significative de Cdc25C sur des billes de Pin1 incubées dans un extrait mitotique, ils pensent donc que Pin1 n'affecte pas Cdc25C par une modification directe de son activité enzymatique (39). Cependant, Shen et ses collaborateurs ont démontré que Cdc25C, en présence de Pin1, ne peut pas activer le complexe Cdc2/cycline B (216).

#### III.3. Formation du fuseau mitotique

#### III.3.1. Généralités

Les cellules de l'organisme contiennent des protéines intervenant dans la morphogenèse en formant des assemblages variés en réponse à divers signaux. Parmis ces protéines, les microtubules constituent un réseau essentiel pour l'organisation du noyau et des organelles dans l'espace cytoplasmique. Les microtubules sont des hétérodimères d' $\alpha$ - et  $\beta$ tubuline qui subissent de nombreuses modifications post-traductionnelles. A l'occasion de la division cellulaire, la forme de la cellule est profondément modifiée et le cytosquelette est le siège de transformations majeures. En effet, lors de l'entrée en mitose induite par le complexe p34<sup>cdc2</sup>/cycline B, l'enveloppe du noyau se dissout, les chromosomes s'individualisent et le réseau de microtubules est détruit. De nouveaux microtubules s'assemblent à partir des centrosomes vers les chromosomes et forment le fuseau bipolaire ou mitotique (Figure 17). Quand tous les centromères, par l'intermédiaire des kinétochores, sont fixés à des microtubules, les deux chromatides de chaque chromosomes se séparent. Les microtubules vont alors se rétracter en entraînant les chromatides avec eux. A la fin de la mitose, les deux jeux de chromosomes sont séparés chacun à une extrémité de la cellule. Le fuseau mitotique se désorganise, la tubuline sert alors à reconstruire le cytosquelette des deux nouvelles cellules.

La stabilité des microtubules est principalement régulée par des protéines associées aux polymères de tubulines, les MAPs (66). Une phosphorylation des MAPs diminue leur affinité pour les microtubules et supprime leur activité stabilisatrice (67, 218). Une partie du complexe p34<sup>cdc2</sup>/cycline B est localisée sur les microtubules. Cette association se fait par l'intermédiaire de MAPs (MAP1B et MAP4) et de la cycline B du complexe, la cycline A n'est pas associée (60, 180, 248). MAP4 est phosphorylée par le complexe p34<sup>cdc2</sup>/cycline B, *in vitro*, ce qui n'inhibe pas sa liaison aux microtubules mais diminue son effet stabilisateur des microtubules (3, 179). La phosphorylation *in vivo* d'une MAP, serait due non seulement à l'action du complexe p34<sup>cdc2</sup>/cycline B, mais aussi à celle de la MAP kinase (218). La MAP kinase est en effet activée en même temps que le complexe p34<sup>cdc2</sup>/cycline B dans certaines cellules et notamment dans les ovocytes (190).

Comme expliqué précédemment, les chromosomes interagissent avec les fibres du fuseau, au niveau de leur centromère, par l'intermédiaire des kinétochores. Le kinétochore est un complexe multiprotéique comprenant, entre autre, des protéines motrices dépendantes de l'ATP de type kinésine et dynéine. Pendant la mitose, un certain nombre des protéines

présentes dans les kinétochores sont phosphorylées (240, 254) et une partie du MPF s'associe aux kinétochores. La protéine CENP-E, de type kinésine, est *in vivo* et *in vitro* substrat du complexe p34<sup>cdc2</sup>/cycline B. La phosphorylation de CENP-E inhibe sa capacité de liaison au microtubules (148) et participe ainsi au processus complexe qui conduit à la ségrégation des chromosomes (208). Une autre protéine moteur, la dynamine est, *in vitro*, phosphorylée par le complexe p34<sup>cdc2</sup>/cycline B ce qui diminue sa liaison au microtubules (106).



Formation du fuseau bipolaire

Anaphase

# Figure 17- Formation du fuseau mitotique et son rôle au cours de la mitose.

# III.3.2. Rôle de Polo dans la formation du fuseau mitotique

Les mutations des protéines kinases de la famille Polo entraînent des anomalies dans la division cellulaire (71) telles que des aberrations dans l'organisation du fuseau mitotique et dans la ségrégation des chromosomes comme des asymétries du fuseau mitotique (un seul centrosome mais un arrangement normal des microtubules), un fuseau mono ou multipolaire, des anomalies dans l'organisation des centrosomes, des problèmes dans la séparation des chromosomes pendant la méïose (spermatogenèse). Ces kinases sont donc impliquées dans l'organisation du fuseau mitotique, tout comme le complexe p34<sup>cdc2</sup>/cycline B. Elles agissent sur sa formation par phosphorylation de MAPs et de tubuline (61).

Il a été montré que la protéine Plo1 est associée aux centrosomes (SPB chez la levure pour «Spindle Pole Body») mitotiques mais pas interphasiques. Cette association est très forte du début de la mitose jusqu'au début de l'anaphase B, ensuite le signal de Plo1 devient très faible et finalement disparaît au moment de la dissociation du fuseau mitotique. L'association de Plo1 et des centrosomes est un événement mitotique précoce qui suit et nécessite l'activation du MPF, alors que leur dissociation requiert l'activité de l'APC (Anaphase Promoting Complex). Okhura et ses collaborateurs ont démontré que la variation de l'association de Plo1 avec les centrosomes, liée au cycle cellulaire, n'est pas due à l'altération de la stabilité de la protéine (178). En effet, le niveau de la protéine Plo1 ne varie pas au cours du cycle cellulaire.

Bälher et ses collaborateurs ont confirmé le rôle de Plo1 dans la formation du fuseau mitotique bipolaire et dans la formation et le positionnement de l'anneau médian, responsable de la cytokinèse. Ils ont identifié une cible de Plo1: la protéine Mid1. Cette protéine est présente dans le noyau, forme une bande corticale diffuse pendant la formation du fuseau mitotique et fusionne en un anneau avant l'anaphase. Elle est aussi retrouvée sous forme hyperphosphorylée (226). Plo1 est nécessaire à la fois pour l'export nucléaire de Mid1 et pour la formation de l'anneau de Mid1. Ainsi, Plo1 est impliquée, en régulant la formation spatiale et temporelle du septum, dans la coordination de la cytokinèse et de la mitose (8).

#### III.4. Cytokinèse

#### III.4.1. Généralités

Pour se multiplier, les cellules eucaryotes dupliquent leur contenu, puis se divisent en utilisant un anneau contractile formé notamment d'actine-F et de myosine II. Cette dernière étape du cycle cellulaire est appelée cytokinèse. La levure *Schizosaccharomyces pombe* est un modèle classique d'étude de ce phénomène. En effet, comme les organismes supérieurs, elle se divise grâce à un anneau d'actine-F placé au centre de la cellule, appelé l'anneau médian. Chez *S.pombe*, Spg1 code pour une GTPase de la famille de Ras, et induit la septation de façon dose-dépendente. En effet, elle peut induire la formation d'un septum à n'importe quel stade du cycle cellulaire, ce qui implique que son activité doit être fortement contrôlée au

cours du cycle cellulaire, afin de produire une cellule viable. Spg1 est un gène essentiel et les cellules qui en sont dépourvues ne forment pas de septum; en revanche, la croissance cellulaire et la division nucléaire ne sont pas inhibées, ce qui produit des cellules allongées et multinucléées. Spg1p interagit avec la protéine kinase Cdc7 (une kinase de la famille des MAPKKK). Toutes deux sont nécessaires pour donner le signal de la formation du septum, probablement via une cascade de protéines kinases. La forme Spg1-GTP est uniquement observée durant la mitose lorsqu'elle est liée à la protéine kinase Cdc7 afin d'activer le mécanisme de septation. Ce complexe est localisé aux pôles du fuseau mitotique, suggérant un rôle majeur de ces organelles dans la régulation de la cytokinèse. La localisation du complexe Spg1/Cdc7 devient asymétrique durant la phase finale de la mitose. Ce phénomène reste inexpliqué à l'heure actuelle.

#### III.4.2. Rôle de Polo dans la cytokinèse

La formation du septum, chez la levure *Schizosaccharomyces pombe*, nécessite deux évènements, la formation de l'anneau d'actine (régulée par les gènes tardifs de la septation) et la mise en place du matériel septal (régulée par les gènes précoces de la septation). Ces deux évènements sont, au moins partiellement, séparables. Plo1 semble intervenir en amont des gènes de septation précoces et tardifs. La capacité de Plo1 à induire la formation d'un septum dans des cellules en interphase qui sur-expriment Plo1 ne nécessite pas l'activation de Cdc2/cycline B. La kinase Plo1 agirait comme un facteur favorisant la formation du septum, chez *Schizosaccharomyces pombe* (178). De plus, la dissociation de Plo1 des centromères n'est pas nécessaire à la septation. Cependant, la localisation du régulateur de la septation, Spg1, au niveau des centrosomes augmente la probabilité que l'association de Plo1 avec les centrosomes au début de la mitose puisse permettre la voie de Spg1. Ainsi, ceci pourrait être un événement crucial dans la régulation de la septation (168).

L'inactivation de Plx1 est indispensable pour la dégradation complète de la cycline B après l'anaphase et pour la fin de la cytokinèse (202, 282). Brassac et ses collaborateurs ont montré que Plx1 n'est pas nécessaire pour l'activation initiale de l'APC. Cependant l'activité de Plx1 évite l'inactivation prématurée de la voie de protéolyse dépendante de l'APC en maintenant un niveau élevé de l'activité de l'APC (20). En 1996, Tavares, Sunkel et Glover ont mis en évidence de nouveaux substrats de Polo (243). Ils ont tout d'abord démontré que Polo devait être phosphorylée pour montrer une activité kinase. Ils ont pu détecter 3 substrats potentiels de 220, 85 et 54 kDa, phosphorylés par la Polo exogène de façon plus efficace dans les extraits d'embryons mutants que dans les extraits d'embryons sauvages. Une de ces protéines phosphorylées spécifiquement par Polo sous ces conditions a été identifié par

immunoprécipitation comme étant la  $\beta$ -tubuline (54 kDa). La  $\beta$ -tubuline est plus phosphorylée que l' $\alpha$ -tubuline. Polo se lie spécifiquement à une MAP de 85 kDa. Ainsi, Polo est impliquée dans les changements de l'organisation des microtubules qui ont lieu au cours de la mitose. En 1998, Carmena et ses collaborateurs ont montré l'implication de Polo dans la cytokinèse (25). En fait, Pav-KLP («Pavarotti-Kinesin-Like Protein») est une protéine moteur intervenant dans la cytokinèse qui est associée physiquement à Polo. D'autre part, Nislow, en 1990, a montré que M-KLP («Mouse-Kinesin Like Protein») est associé à Plk (175). Gonzales, Sunkel et Glover spéculent que la protéine Asp («Abnormal-spindle protein») pourrait être un substrat de la kinase Polo (75). Asp est une MAP de 220 kDa nécessaire au maintien de la structure du fuseau au niveau des pôles mitotiques. Cette protéine hautement basique s'associe aux microtubules de la région polaire du fuseau mitotique (211).

#### III.5. Sortie de la mitose

#### III.5.1. Généralités

L'initiation et la coordination des évènements tardifs de la mitose sont gouvernées par la protéolyse dépendante de l'ubiquitine des protéines clés régulatrices telles que la cycline B, les sécurines, Polo... Une étape majeure de cette destruction est catalysée par une protéine ligase d'ubiquitine multimérique connue sous le nom d'APC («Anaphase-Promoting Complex») ou Cyclosome ou encore enzyme E3 (33, 123) L'APC est associé à une enzyme activatrice d'ubiquitine (E1) et d'une enzyme E2 conjuguée à l'ubiquitine (ou UBC pour «Ubiquitin-conjugating enzyme») pour catalyser le transfert de molécules d'ubiquitine sur les chaînes de lysines des protéines cible. La chaîne d'ubiquitines est alors reconnue par le protéasome 26S qui dégrade ces protéines marquées (194, 195).

L'APC semble être le seul composant de la machinerie d'ubiquitination qui oscille pendant le cycle cellulaire. A la fois chez les levures (282) et dans les cellules somatiques des eucaryotes supérieurs (18), la voie de protéolyse dépendante de l'APC reste active du milieu de la phase M jusqu'à la fin de la phase G1, moment à laquelle elle devient inactive. L'activité de l'APC augmente brusquement en métaphase, ce qui conduit à la destruction des protéines cibles avec l'aide d'un facteur spécifique, Cdc20. Ces protéines cibles incluent les sécurines (Pds1 chez *S. cerevisiae*), qui sont nécessaires pour le maintien de la cohésion des chromatides sœurs. La dégradation des sécurines entraîne l'activation des séparines (ESP1 chez *S. cerevisiae*) qui favorisent le début de la séparation des chromatides sœurs. A ce moment, Cdc14, une phosphatase spécifique qui reste séquestrée au niveau du nucléole aux autres moments du cycle, est libérée (222, 256). Plusieurs substrats clés de Cdc14 ont été

identifiés. Ils incluent les inhibiteurs de Cdc2/cycline B, Sic1 et Hct1, dont la déphosphorylation permet une seconde vague d'activité de l'APC (114). Ainsi, l'activation de Cdc14 induit une expression stable des inhibiteurs du MPF et une seconde vague d'activation de l'APC, ceci fonctionne de manière redondante pour inhiber la cycline B (164, 282). La destruction dépendante de l'APC d'autres protéines régulatrices initie la dissociation du fuseau mitotique, la cytokinèse et la réinitialisation des origines de réplication pour le prochain cycle de division cellulaire.

L'activation de l'APC au milieu de la phase M dépend, directement ou indirectement (20, 59), de l'activité kinase du MPF, qui déclenche la phosphorylation des sous-unités de l'APC, événement permettant à l'APC de se lier à son activateur Cdc20 (128, 281). Xe-p9, l'homologue de la protéine Suc1/Cks chez le xénope, régule directement la phosphorylation de Cdc27, un composant de l'APC, par le complexe Cdc2/cycline B et ainsi, la dégradation de la cycline B (186). Le déroulement des évènements tardifs de la mitose résultent de l'activation séquentielle de l'APC par Cdc20 puis par Hct1. Chez la drosophile, Fizzy et «Fizzy-related» se lient respectivement à la forme phosphorylée et déphosphorylée de l'APC. Cet échange de sous-unités régulatrices maintient la voie d'ubiquitination dépendante de l'APC activée du début de l'anaphase jusqu'à la fin de la phase G1. Cdc20 stimule la destruction de la cycline B mitotique est importante pour la dissociation du fuseau mitotique, la cytokinèse et la re-réplication du génome. La protéolyse de Pds1 précède celle de la cycline B, ce qui aide à assurer que la cellule ne réplique jamais son génome avant d'avoir fini la séparation des chromatides sœurs au cours de la mitose précédente (164).

## III.5.2. Rôle de Polo dans la sortie de la mitose

Les protéines Cdc20 et Polo, qui régulent de façon positive l'activité de l'APC, restent constantes pendant les cycles cellulaires de l'embryon de xénope mais varient au cours de ceux des cellules de *S. cerevisiae* et humaines de façon similaire à la cycline B (79). L'activité kinase des Plk est régulée par le cycle cellulaire comme le niveau des protéines Plk de mammifère qui est très bas en G1 mais augmente progressivement pendant les phases G2 et M puis décroît radicalement quand les cellules entrent en anaphase et commencent la télophase (32, 79). Descombes et ses collaborateurs proposent que les Plk sont nécessaires à la destruction des protéines cibles par l'APC au moment de la sortie de la mitose (47). De plus, Ferris et ses collaborateurs ont démontré que la protéine Plk de souris est la cible, à la fin de la mitose, de la voie de dégradation due à l'ubiquitination et au protéasome (63).
Chez la levure *S. cerevisiae*, l'expression d'une forme non dégradable de Cdc5 empêche l'accumulation des cyclines mitotiques et la formation du fuseau mitotique suggérant que la dégradation de Cdc5 est importante pour l'inactivation de la dégradation des cyclines par l'APC quand les cellules entrent en phase S. L'ubiquitination et la dégradation de Cdc5 dépend de Hct1 et des deux séquences de boîte de destruction situées sur la protéine Cdc5 (28, 220). La dégradation de Cdc5 en G1 peut produire un mécanisme de rétro-contrôle par lequel l'APC détruit son activateur au début du cycle suivant (32).

De récentes études montrent que Plx1 est nécessaire à la sortie de la phase M (47). De plus, pendant l'anaphase, la protéine Plx1(T201D), un mutant environ 40 fois plus actif que la protéine sauvage, réduit préférentiellement la dégradation de la cycline B2 et retarde la diminution de l'activité kinase du complexe Cdc2/cycline B sur l'histone H1. Ces résultats suggèrent que Plx1 est requis pour la dégradation complète de la cycline B2 après l'anaphase (202). Brassac et ses collaborateurs ont démontré que Plx1 n'est pas nécessaire à l'activation initiale de l'APC, mais que cette kinase empêche la diminution ou l'inactivation de la voie de protéolyse dépendante de l'APC en maintenant l'activité de l'APC à un haut niveau. Une phosphatase sensible à la microcystine a un rôle antagoniste à Plx1 dans un extrait CSF («Cytostatic Factor»). Si l'activité de cette phosphatase est supprimée, la nécessité de Plx1 pour l'activation dépendante du Ca<sup>2+</sup> de la voie APC/protéasome est abolie. Ils concluent que Plx1 et cette phosphatase inconnue contrôlent de façon antagoniste la durée de la fenêtre de dégradation des cyclines mitotiques au cours du cycle cellulaire (20). De plus, la destruction de la cycline B2, mais pas celle de Pds1, dépend de Cdc5. Le facteur Cdc20 est essentiel pour la séparation des chromatides sœurs, alors que Cdc5 ne l'est pas. Cdc5 et Cdc20 sont des protéines instables dont la protéolyse est régulée par l'APC. Ces deux protéines s'accumulent pendant la fin de la phase G2 et disparaissent au dernier stade de l'anaphase. L'accumulation de Cdc20 contribue à l'activation de la protéolyse de Pds1 en métaphase et au début de l'anaphase A (215), alors que celle de Cdc5 favorise l'activation de la protéolyse de la cycline B, pour l'achèvement de l'anaphase B et de la cytokinèse (124). Le tableau 7 représente les différentes protéines impliquées dans la séparation des chromatides sœurs ou la dégradation de la cycline B, selon les espèces.

Fang et ses collaborateurs ont montré que Plk1 est aussi ubiquitinée par l'APC. Cependant elle ne possède pas de boîte de destruction évidente (58). Ainsi, les Plk sont à la fois activatrices et cibles de l'APC.

Espèces	Protéines favorisant la séparation des chromatides sœurs	Protéines favorisant la dégradation de la cycline B
Saccharomyces cerevisiae	Cdc20	Hct1/Cdh1
Drosophile et Xénope	Fizzy	Fizzy-related
Homme	p55Cdc/hCdc20	hCdh1
Schizosaccharomyces pombe	Slp1	Ste9/Srw1

Tableau 7- Correspondance entre les protéines favorisant la séparation des chromatides sœurs et celles favorisant la dégradation de la cycline B selon les espèces.

### IV. Régulation de la protéine Polo

En ce qui concerne la régulation post-traductionnelle, l'activité kinase des protéines Polo est régulée par phosphorylation. *In vitro*, le complexe Cdc2/cycline B peut phosphoryler Plk, mais cette phosphorylation n'est pas suffisante pour obtenir une activation complète de l'enzyme. Plk subit donc d'autres modifications au cours de la mitose (1). Hamanaka et ses collaborateurs ont montré qu'au cours de la mitose, *in vivo*, Plk1 est phosphorylée sur des résidus sérine (86). En effet, après traitement à la phosphatase 2A, la protéine Plk mitotique immunoprécipitée voit son activité chuter de 5 à 10 fois par rapport à son niveau normal. La protéine responsable de cette phosphorylation a été identifiée chez le xénope par Qian et ses collaborateurs en 1998, ils l'ont nommée Plkk pour «Polo-like kinase kinase» (203). Cette protéine de 950 acides aminés contient les 11 sous-domaines caractéristiques des protéines kinases.

Dans les cellules de mammifère en culture, le niveau protéique de Plk est très bas en G1 puis augmente progressivement pendant les phases G2 et M et enfin décroît après la mitose. La cinétique d'activation des protéines de la famille Polo est similaire à celle du complexe p34<sup>cdc2</sup>/cycline B. L'activation du MPF et celle de Plk sont intégrées à la réponse à des lésions de l'ADN, au niveau du point de restriction de G2 (1). L'activité kinase de Plk est donc régulée par le cycle cellulaire (Figure 18). Ceci est à corréler avec l'activation de l'APC (Anaphase Promoting Complex) par la kinase Polo à la fin de la mitose. En effet, l'APC est un complexe protéique qui dégrade des protéines par ubiquitination. Cette activation entraîne ainsi la dégradation de la cycline B, mais également celle de Polo et, par conséquent, la sortie de la mitose. En 1993, Fenton et Glover ont travaillé sur l'activité kinase de Polo chez la drosophile (62). La protéine Polo immunoprécipitée à partir d'extrait d'embryon de drosophile peut phosphoryler la caséine, *in vitro*. Cette activité kinase atteint son niveau le plus élevé de façon cyclique en fin d'anaphase/télophase. Ceci contraste avec l'activité

cyclique du complexe Cdc2/cycline B qui atteint son maximum à l'entrée en mitose pendant les cycles rapides de mitose dans le syncytium. Le stade mitotique pendant lequel apparaît l'activité maximale de Polo pourrait être cohérent avec le rôle de Polo dans l'organisation des microtubules qui a lieu en fin d'anaphase et en télophase.



Figure 18- Régulation de l'activité de Plk1 au cours du cycle cellulaire et comparaison avec celle du complexe p34<sup>cdc2</sup>/cycline B. (Courbes schématiques d'après (74, 143)).

Les protéines Polo présentent plusieurs sites de régulation de leur activité. En 1997, Mundt et ses collaborateurs ont déterminé que la fin de la région C terminale de Plk porte un domaine inhibiteur (Plk: 583-603) (Figure 15) (169). La délétion de cette séquence entraîne une activation de la kinase (6, 8). Certains sites de phosphorylation peuvent être situés dans cette région C terminale et ainsi accroître l'activité de Polo (1). Lee et Erickson se sont intéressés à la thréonine-182, située dans le sous-domaine VIII de la région catalytique, qui semble correspondre à la thréonine-161 de Cdc2 du MPF (140). Des expériences de mutations de la thréonine-210 de Plk1 de mammifère, correspondant à la thréonine-182 de la Polo de drosophile, ont montré l'importance de cet acide aminé dans la régulation de l'activité de Plk. En 1999, Qian et ses collaborateurs ont démontré que, chez le xénope, l'activation de Plx1 requiert la phosphorylation de la kinase sur les résidus sérine-128 et thréonine-201. Ils ont montré que cette activation était suffisante pour l'activation de Cdc25C au début de la mitose et que l'inactivation de Plx1 est nécessaire pour la dégradation complète de la cycline B2 après l'anaphase et l'achèvement de la cytokinèse (202).

### V. Localisation intracellulaire des protéines de la famille Polo

Au cours du cycle cellulaire, la localisation des kinases de la famille Polo suit la formation du fuseau mitotique (Tableau 8). Plk1 est située dans le cytoplasme en interphase, au niveau des pôles du fuseau mitotique (liée à la tubuline) en fin de prophase et en métaphase, sur le plan équatorial du fuseau en anaphase et sur le pont post-mitotique dans les cellules en fin de division (73, 74, 150).

En 1998, Herrmann et ses collaborateurs ont analysé la localisation de Polo au cours de la méïose, pour caractériser son rôle au cours de la spermatogenèse chez la drosophile, (98). Polo se localise au niveau des centrosomes, des centromères, des kinétochores des chromosomes condensés et de la plaque métaphasique du fuseau mitotique. Le marquage immunologique de plusieurs composés du fuseau mitotique indique que Polo est impliqué dans l'organisation du fuseau bipolaire pour les deux divisions méïotiques. Les mutations de Polo affectent plus sévèrement la méïose II que la méïose I. Ceci pourrait s'expliquer par à une accumulation d'anomalies au cours de la méïose I.

Chez l'homme, Plk1 est également associée à de multiples constituants du fuseau mitotique (73). L'utilisation d'une protéine Plk de fusion associée à la GFP («Green Fluorescent Protein») a permis de mettre en évidence la localisation de Plk au niveau des centromères des chromosomes mitotiques humains (6) et méïotiques dans les ovocytes de souris (265). Pendant le cycle cellulaire, la localisation de la kinase Polo suit la formation du fuseau mitotique. Il existe cependant quelques différences entre la localisation de Polo et de Plk1. Par exemple, Polo se localise au niveau des centrosomes dès le début de la prophase jusqu'à la fin de l'anaphase alors que Plk1 n'a été décrite à ce niveau qu'à partir de la métaphase.

Les mutations de la «Polo box» entraînent des modifications de la localisation de la protéine Polo. La région C terminale, contenant la "Polo Box", agirait sur la polarisation des cellules en division et sur la formation du septum (140). Cette hypothèse est supportée par le fait que les mutants T210D présentent plusieurs septa alors que ce n'est pas le cas pour les mutants T210D $\Delta$ C qui n'ont pas la région C terminale (140). En 1998, Lee et ses collaborateurs ont démontré que la «Polo box» et l'activité kinase de Polo sont toutes deux requises pour les fonctions mitotiques de la protéine. La «Polo box» est indispensable à la localisation de la protéine au niveau du fuseau mitotique et des centrosomes. Ainsi, elle intervient pour donner une localisation subcellulaire spécifique à la protéine et permettre l'interaction efficace entre le domaine catalytique de Polo et ses substrats et/ou ses activateurs. Les études faites sur Cdc5 confirment l'importance de cette «Polo box» pour induire et organiser la cytokinèse (141, 142, 228).

Phases de la mitose	Localisation de Polo
Interphase:	Cytoplasmique, aucun marquage nucléaire.
Prophase:	Fort marquage du noyau, association forte de Polo avec les centrosomes en séparation. Le marquage de Polo est aussi visible sur certains endroits des chromosomes condensés.
Pré-métaphase:	Le marquage de Polo est plus clairsemé mais clairement associé aux constructions primaires des chromosomes.
Pro-métaphase tardive:	Les centrosomes et les centromères restent fortement marqués et le marquage du fuseau commence à apparaître.
Métaphase:	Le marquage des centromères organisés en paires et placés au niveau de la plaque métaphasique est très élevé. De plus les centrosomes situés de part et d'autre de la plaque métaphasique sont également visibles. Polo est aussi associée au fuseau mitotique.
Début d'anaphase:	Les centromères sont très marqués.
Anaphase:	Polo commence à s'accumuler au niveau de la région équatoriale sur les microtubules et les centromères sont toujours marqués. Les centrosomes restent marqués jusqu'au début de la télophase.
Anaphase tardive:	Polo n'est plus située au niveau des centromères mais persiste dans la région correspondant au futur plan de clivage.
Télophase tardive:	Les anticorps anti-Polo restent concentrés près de la plaque équatoriale du pont post-mitotique connecté aux cellules filles, le marquage du cytoplasme devient plus visible alors que la coloration du noyau devient indétectable.

Tableau 8- Localisation de la protéine Polo au cours de la mitose.

# RESULTATS

# RESULTATS

# Chapitre I

## **ETUDE DE LA PROTEINE GSK-3**

# I. Purification de la protéine GSK-3 par chromatographie d'affinité sur de l'axine immobilisée sur des billes

### I.1. Introduction

La "Glycogen Synthase Kinase-3" (GSK-3) est un élément important de la voie Wnt. Parmis ses substrats, on trouve l'axine, l'APC et la  $\beta$ -caténine (24). L'axine possède des sites de liaison à la GSK-3 $\beta$ , l'APC et la  $\beta$ -caténine. Elle facilite ainsi la phosphorylation de l'APC et de la  $\beta$ -caténine par GSK-3 $\beta$  et, par conséquent, l'inhibition de l'action de la  $\beta$ -caténine sur la synthèse de cycline D (92).

Afin de pouvoir étudier la régulation et l'activité kinase de la protéine GSK-3 native, nous avons utilisé une méthode originale nous permettant de la purifiée par chromatographie d'affinité sur un fragment de la protéine axine liée de façon covalente à des billes de sépharose. Ce fragment de la protéine axine de souris contenant le site de fixation de la GSK-3 (Figure 19) présente des similitudes importantes avec les protéines axine de rat et de différentes autres espèces (Figure 20 et Tableau 9). La protéine GSK-3 provenant de différentes sources a ainsi pu être purifiée: la GSK-3 $\beta$  de rat recombinante surexprimée dans les cellules d'insecte HF («High Five») par la méthode du baculovirus, la protéine de la levure *Schizosaccharomyces pombe*, celle d'œufs d'oursin *Sphaerechinus granularis*, GSK-3 $\alpha$  et GSK-3 $\beta$  de cerveau de porc et GSK-3 $\beta$  de cellules humaines en culture MCF7. Ces différentes protéines GSK-3, ainsi purifiées, conserve une activité kinase sur le peptide GS-1.



Figure 19– Schéma représentant les différents sites de fixation de diverses protéines sur l'axine (109); (118).

Dvl : Dishevelled, APC : Adenomatous Polyposis Coli,  $\beta$ -Cat. :  $\beta$ -caténine, PP2A: «Protein Phosphatase 2A», RGS: , DIX: , peptide Axine-His6 : fragment protéine d'axine lié à 6 histidines.

				0/0	de si	milar	ité			
	Gg	Х	r	m	h	Dr	D			
Gg-Axin		86.6	83.1	69.6	75.5	79.9	29.3			
X-Axin	79.6		79.1	66.2	71.5	77.3	29.6			
r-Axin	76.0	70.9		82.8	82.0	76.0	29.6			
m-Axin	63.6	58.9	82.2		79.8	63.5	24.7			
h-Axin	68.4	63.2	79.9	77.6		68.2	26.6			
Dr-Axin	71.3	67.5	67.0	56.0	60.3		28.5			
D-Axin	17.5	16.8	17.6	14.7	15.5	16.3				
	% d'identité									

**Tableau 9- Pourcentage d'identité et de similarité entre les différentes protéines axine.** Ces pourcentages ont été calculés par le logiciel MacShadeBox.

	$\dots$ 130 $\dots$ 140 $\dots$ 150 $\dots$ 160 $\dots$ 170 $\dots$ 180
Gq-Axine	1:MNIOGKGFPLDLGRSFTEDAPRPVPGEEGELVSTDPRPVSHGFYSSKSDA: 51
X-Axine	1: MSWKGKGEPLDLGGSFTEDAPRPVPGEBGELTTTDORPESHTYYSLKNDG: 51
r-Axine	1: MOSPKMNVOEOGFPLDLGASFTEDAPRPPVPGEBGELVSTDSRPVNHSECSGKGTS: 56
m-Axine	121: HCSLMOSPKMNYOFOGFPLDI GASFTEDAPRPPVPGEEGELVSTDSRPVNHSFCSGKGTS: 180
h-Avine	
Dr-Avine	1: MSMSIMIEVSCICHLDAGSFTFDADDDDDDDDCEFCDIVSCACDOVNUSEVSSKSDS: 55
D-Avine	
D-AXIIIe	121. *** ****** ******* !!!!!!!!****** ** **
CONSCISUS	121:
	100 000 010 000 020 040
Co. Antino	
Gg-Axine	52. VRNETSTATPRRSDLDGTEPEGSASPTEPTIN VALSDATSLDDGTINERTFLAGED. 1110
x-Axine	52: TKNETSTATPRRPDLDLGYEPEGSASPTEPYLWAESDHSLDDODG THLFRTFLQGEN.: 110
r-Axine	57: IKSETSTATPRRSDLDLGYEPEGSASPTPPYLRWAESI ASLLDDQDGISLFRTFLKQPG. : 115
m-Axine	181: IKSETSTATPRRSDLDLGYEPEGSASPTPPYLRWAESTHSLLDDQDGISLFRTFLKQDG.: 239
h-Axine	89:IKGETSTATPRRSDLDLGYEPEGSASPTPPYLKWAESUHSLLDDQDGISLFRTFLKQDG.:147
Dr-Axine	56:LKNEASIATPRRPDLDLGYEPEGSASPTPPYLKWAESUHSULDDQDGIHLFRTFLKQDE.:114
D-Axine	29:RVKKMTEGVADTSKNSSESYLNWARTUNHILLEDRDGVELEKKYVEEDAP: 77
consensus	181:**-*******-*************************
	$\dots 250 \dots 260 \dots 270 \dots 280 \dots 290 \dots 300$
Gg-Axine	110:.CADLLDBWFACSGFRKLEPCVSNEEKRLKLAKAIYKKYILDNNGIVSRQIKPATKSFIK:169
X-Axine	110:.CADLLDFWFACSGFRKLEPNDSKVEKRLKLAKATYKKYVLDSNGIVSRQIKPATKSFIK:169
r-Axine	115:.CADLIDEWFACSGFRKLEPCDSNEEKRLKLARAIYRKYILDSNGIVSRQTKPATKSFIK:174
m-Axine	239:.CADLLDEWFACSGFRKLEPCDSNEEKRLKLARAIYRKYILDSNGIVSRQTKPATKSFIK:298
h-Axine	147:.CADLLDEWFACTGFRKLEPCDSNEEKRLKLARAIYRKYILDNNGIVSRQTKPATKSFIK:206
Dr-Axine	114:.CADMIDEWFACSGFRKQEANDGN.EKMLKLAKAIYKKYILDNNGIVSRQIKPATKSFIK:172
D-Axine	78:AYNDHINFYFACEGLKQ.QTDP.EKIKQIIGAIYR.FLRKSQLSISDDLRAQIKAIKT:132
consensus	241:**!*!*!!!!*!******_***_!!******!!!******
	site de fixation de l'APC
	$\dots$ 310 $\dots$ 320 $\dots$ 330 $\dots$ 340 $\dots$ 350 $\dots$ 360
Gg-Axine	170:DCVMKLQIDPDMFDQAQTEIQCMIEDNTYPLFLKSDIYLEYTRTGGESPKIYSDPSSGSG:229
X-Axine	170:DCVLRQQIDPAMFDQAQMEIQSMMEDNTYPVFIKSDIYLEYTTIGGESPKNYSDQSSGSG:229
r-Axine	175:DCVMKQQIDPAMFDQAQTEIQSTMEENTYPSFLKSDIYLEYTRTGSESPKVCSDQSSGSG:234
m-Axine	299:DCVMKQQIDPAMFDQAQTEIQSTMEENTYPSFLKSDIYLEYTRTGSESPKVCSDQSSGSG:358
h-Axine	207:GCIMKQLIDPAMFDQAQTEIQATMEENTYPSFLKSDIYLEYTRTGSESPKVCSDQSSGSG:266
Dr-Axine	173: DCVMKLHIDPAMFDQAQTEIQTMMEENTYPLFLKSDIYLEYTRTGGESPKLFSDQSSVSG:232
D-Axine	133:NPEIPLSPHIFDPMORHVEVTIRDNIYPTFLCSEMYILYIQQMSAQQERCTSSGA:187
consensus	301: *******!**!!**!*********************
	. $.$ $.$ $.$ $.$ $.$ $.$ $.$ $.$ $.$
Gg-Axine	230:TCKGLPCYLPTLNEDEEWKCDQDTEPEASRDSAPSSRLTQKLLLETATQRATSTRRYSEG:289
X-Axine	230:TGKGPSCYLPTLNEDEEWRCDQGGEHERERECIPSSLFSQKLALDSSSHCAGSNRRLSDG:289
r-Axine	235:TGKGMSCYLPTLNEDEEWKCDQDADEDDGRDSVPPSRLTQKLLLETAAPRAPSSRRYNEG:294
m-Axine	359:TCKGMSCYLPTLNEDEEWKCDQDADEDDGRDPLPPSRLTQKLLLETAAPRAPSSRRYNEG:418
h-Axine	267:TCKGISCYLPTLNEDEEWKCDQDMDEDDGRDAADPGRLPQKLLLETAAPRVSSSRRYSEG:326
Dr-Axine	233:NCKVLPCYLPTVIEDVEWRCDQEEEQIAESDPTPSNRLTQKLLLETVPQRVANSKRYQDN:292
D-Axine	188:TCSGSACSSGSGGSSLAGACALPPTTASGKQQLPQLVPPGAFINLPVSSVSGPPAGTCSA:247
consensus	361:*!***-!*******************************
	$\dots$ 430 $\dots$ 440 $\dots$ 450 $\dots$ 460 $\dots$ 470 $\dots$ 480
Gg-Axine	290:REFRHGSWREPVNPYYVNTGYAMAPATSANDSEQQSMSSDADTMSLTDSSIDCIPPYRLR:349
X-Axine	290:REFRPGTWREPVNPYYVNTGYAGAPVTSANDSEQQSMSSDADTMSLTDSSVDGIPPYRLR:349
r-Axine	295:RELRYGSWREPVNPYYVNSGYALAPATSANDSEQQSLSSDADTLSLTDSSVDCIPPYRIR:354
m-Axine	419:RELRYGSWREPVNPYYVNSGYALAPATSANDSEQQSLSSDADTLSLTDSSVDCIPPYRIR:478
h-Axine	327:REFRYGSWREPVNPYYVNAGYALAPATSANDSEQQSLSSDADTLSLTDSSVDCIPPYRIR:386
Dr-Axine	
	293: REYRHASWREPVNPYYVNSGYALAPATSANDSEQQSMSSDADTLSLTDSSVDCVPPYRYR: 352
D-Axine	293:REYRHASWREPVNPYYVNSGYALAPATSANDSEQQSMSSDADTLSLTDSSVDCVPPYRYR:352 248:SGSVYGPSTSASSSGSISATDTLPRSSTLPTLHEDSVLSLCDDFEKVQMQEGCGS:302
D-Axine consensus	293:REYRHASWREPVNPYYVNSGYALAPATSANDSEQQSMSSDADTLSLTDSSVDGVPPYRYR:352 248:SGSVYGPSTSASSSGSISATDTLPRSSTLPTLHEDSVLSLCDDFEKVQMQEGGGS:302 421:**-*-********************************

		490	. 500	. 510 .	520 .	530 .	540
Gg-Axine	350:	KQHRREMQE <mark>S</mark> AKA	NGRVPL <mark>P</mark> HIPF	RTYRMPKDI:	HVEPE <mark>K</mark> FAA <mark>E</mark>	LINRLEEVQK	EREAEEKL:409
X-Axine	350:	KHYRREMQE <mark>S</mark> ANA	NGRGPLPHIPF	RTYHMPKDI:	HVDPE <mark>K</mark> FAA <mark>E</mark>	LISRLEGVLR	DREAEQKL:409
r-Axine	355:	KQHRREMQE <mark>S</mark> VQV	NGRVPL <mark>P</mark> HIPF	RTYRMPKEI	RVEPQ <mark>K</mark> FAE <mark>E</mark>	LIHRLEAVQR	TREAEEKL:414
m-Axine	479:	KQHRREMQE <mark>S</mark> IQV	NGRVPL <mark>P</mark> HIPF	RTYRMPKEI	RVEPQ <mark>K</mark> FAE <mark>E</mark>	LIHRLEAVQR	TREAEEKL:538
h-Axine	387:	KOHRREMOE SAOV	NGRVPLPHIPR	TYRVPKEV	RVEPO <mark>K</mark> FAEE	LIHRLEAVOR	TREAEEKL:446
Dr-Axine	353:	KPHRREIHE <b>S</b> AKV	NGRVPLPHIPR	TNRIPKDI	HVEPEKFAAE	LISRLEGVLR	EREAOEKL:412
D-Axine	302:	LG <mark>S</mark> GSV	GAGARAPDYP.	.IRLTRDL	LIATOKRRL	IRP.PGAHGY	VYNPSTTN:352
consensus	481	*_******!*_*	*****!**!*	*******	****-!**-!	**_****	<b>-*****</b> :540
			Site de	fixation	de GSK-3		
		550	. 560	. 570 .	580 .	590 .	600
Gq-Axine	410:	EERLKRVRAEE	EDADISSCPSV	ISHKMPSA	OPFHHFAPR.	YSEMGCAGMC	MRDAHEEN:468
X-Axine	410:	EERLKRV <mark>R</mark> AEE <b>D</b> G	DDGDVSS <mark>G</mark> PSV	ISHKLPSG	$\tilde{P}PMHHFNSR$ .	YSETGCVGMC	IRDAHEEN:468
r-Axine	415:	EERLKRVRMEEDG	EDGEMPS <mark>G</mark> P.M	ASHKLPSV	PAWHHFPPR.	YVDMGCSG	LRDAHEEN:470
m-Axine	539:	EERLKRVRMEEDG	EDGEMPSGP M	ASHKLPSV	PAWHHFPPR	YVDMGCSG	LEDAHEEN: 594
h-Axine	447:	EERLKRVRMEERG	EDGDPSSGPPC	PCHKLPPA	PAWHHFPPRI	CWTWACAG.	LRDAHEEN: 504
Dr-Axine	413:	EERLKRVRLEEEG	DDADTSTOPSI	ANHRVPPA	VHVOHYGGR	YSEMSYNGLO	IRDAHEEN: 471
D-Axine	353:		RASVSSCRT	DSDTMSTS	S CSMDGRP	YTORRHSS	TESKATE:405
Congengus	541:	******	* * * * * * * + + - *	-*****		*_*_**_*_	********
CONSCIISUS	JII		Site	de five	tion de la	<b>h</b> -caténir	
	-		DICE	e de liza	cion de la		
		C10	620	620	C 1 0	C F O	660
Ca Arriva	160.			. 03U .		020 .	
Gg-Axine	409	PESILDEHVQRVM	KIPGCOSPGPG	RHSPKPRS.	PESGHLGK.L	SGILGIIPPG	HGKHIIKS·52/
x-Axine	469	PESILDEHVQRVM	KTPGCQSPGTG	RHSPKSRS.	PD.GHLSKTL	PGSLGTMQTG	HGKHSSKS:527
r-Axine	4/13	PESILDEHVQRVM	RTPGCOSPGPG	HRS.	PDSGHVAKT.	.AVLGGTASG	HGKHAPKL:523
m-Axine	595	PESILDEHVQRVM	RTPGCOSPGPG	HRS.	PDSGHVAKT.	.AVLGGTASG	HGKHVPKL:64/
h-Axine	505:	PESILDEHVQRVL	RTTGROSPGPG	HRS	PDSGHVAKMP	.VALGGAASG	HGKHVPKS:558
Dr-Axine	4723	PESILDEHVQRVM	KTPGCQSPGTG	RHSPKSRS.	PD.GLPAGKI	PGLMMPLSGG	QGKHQARQ:530
D-Axine	406	QSAMANKETNTFQ	VIPRTQRLHSN	і <b></b> ен <mark>к</mark> р	LKEEELVSLL	IPKLEEVKRK	QDLEERAR:461
consensus	601:	*****	*****!***-*	·!*	<mark>* * _ * * * * *</mark>	_*_**	*****-:660
	-						
		670	. 680	. 690 .	700 .	710 .	720
Gg-Axine	528:	GMKLDAAN	HVYHHIHHHSM	IMKPKEQIE.	AEATQRVQNS	FAWNVDSHNY	ATKSRNYS:587
X-Axine	528:	TAKVDSGNTHHHK	HVYHHVHHHGG	SVKP <mark>K</mark> EQID	GESTQRVQTN	FPWNVESHNY	ATKSRNYA:587
r-Axine	524:	GLKLDSAG <mark>L</mark> HHHR	HVHHHVHHN.S	SARPKEQME.	AEAARRVQSS	FSWGPETHGH	.AKPRSYS:581
m-Axine	648:	GLKLDTAG <mark>L</mark> HHHR	HVHHHVHHN.S	SARP <mark>K</mark> EQME	aevarr <b>v</b> qss	FSWGPETHGH	.AKPRSYS:705
h-Axine	559:	GAKLDAAG <mark>L</mark> HHHR	hvhhhvhhs.1	ARP <mark>K</mark> EQVE.	AEATRRAQSS	FAWGLEPHSH	GARSRGYS:617
Dr-Axine	531:	GPKGEAAHLHHHK	HIHH. THYAAA	GKP <mark>K</mark> EQAE	AEAAR . MHGG	FAWNTEQHHY	GPKSRNYA:588
D-Axine	462:	ERNPGAAL	SSASDRAFAEA	IRE <mark>K</mark> FALD	EDNDQDILDQ	HVSRVWKDQT	PHRSP:518
consensus	661:	: <u>*_***_*_!***</u>	**_*****	**!****	*****	*_**_*_	<u>*-*-</u> :720
	-						
730	•••	. 740 75	0760	) 7	70 7	80	
Gg-Axine	588:	ENLGMAPVPMDSL	GYSGKASLLSK	RNIKKTDS	GKSDGANYEM	PGSPEDVERN	QKILQWII:647
X-Axine	588:	ESMGMAPNPMDSL	AYSGKVSMLSK	RNAKKADL	GKSESASHEM	PVVPEDSERH	QKILQWIM:647
r-Axine	582:	ESTGTNPSAGD.L	AFGGKASAPSK	RNTKKAE S	GKNASAEV	PSTTEDAEKN	QKIMQWII:638
m-Axine	706:	ENAGTTLSAGD.L	PFGGKTSAPSK	RNTKKAE S	GKNANAEV	PSTTEDAEKN	QKIMQWII:762
h-Axine	618:	ESVGAAPNASDGL	AHSGKVGVACK	RNAKKAES	GKSASTEV	PGASEDAEKN	QKIMQWII:675
Dr-Axine	589:	DGMSVGPNTMDPM	GYSSKGSTLSK	(RPVRKGED	GRNFEMRE	PLPADDMERN	QKILQWMM:646
D-Axine	519:	GTMSPCP	PIPSR	RRTATHDS	GMVSDGAM	SLSGHSMKHS	KSMPDHSS:564
consensus	721:	*_***_	**_**_***	·!*-****	!****	***_***	<u>******</u> :780
			Site d	le fixatio	on de PP2A		
		790	. 800	. 810 .	820 .	830 .	840
Gg-Axine	648:	EGE <mark>K</mark> EISRHKKTN	HG <mark>S</mark> .SGVKKQI	SHDMVRPL	SIERPVAVHP	WVSAQLRNVV	QPSHPFIQ:706
X-Axine	648:	EGE <mark>K</mark> EIIRHKKSN	HS <mark>S</mark> .SSAKKQF	PTELARPL	SIERPGAVHP	WVSAQLRNVV	QPSHPFIQ:706
r-Axine	639:	EGE <mark>K</mark> EISRHRKAG	HG <mark>S</mark> .SGMRKQQ	AHESSRPL	SIERPGAVHP	WVSAQLRNSV	QPSHLFIQ:697
m-Axine	763	EGE <mark>K</mark> EISRHRKAG	HG <mark>S</mark> .SGLRKQQ	AHESSRPL	SIERPGAVHP	WVSAQLRNSV	QPSHLFIQ:821
h-Axine	676	EGE <mark>K</mark> EISRHRRTG	HG <mark>S</mark> .SGTRKPÇ	PHENSRPL	SLEHP	WAGPQLRTSV	QPSHLFIQ:729
Dr-Axine	647:	EGE <mark>K</mark> EAGRYKRSP	YG <mark>S</mark> ISGPKKAQ	GHEPARPS.	SVERLGAVHP	WVTAQLRNNV	QPSHPFIQ:706
D-Axine	565	CSR <mark>K</mark> LTNKWPSMN	TD <mark>SG</mark> ISMFS	SADTVTKYK	DASSR	SGSSTASKLE	EAKRRLED:617
consensus	781:	***!**_****	**!_**_**	_*****	*******	*******	<u>****-***</u> :840

		850	860 .	870 .	880	890	900	
Gg-Axine	707:DP	TMPPNP <mark>A</mark> PNPI	LTQ <mark>L</mark> EEAR.H	RRLEEEEKRA	GKLPLKQR.			.:744
X-Axine	707:DP	TMPPNPAPNPI	LTQ <mark>L</mark> VSKPGA	AR <mark>l</mark> eeeekka	AKMPQKQR .			.:745
r-Axine	698:DP	TMPPNP <mark>A</mark> PN <mark>P</mark> I	LTQ <mark>l</mark> eear.h	RR <mark>L</mark> EEEEKRA	NKLPSKQR.			.:735
m-Axine	822:DP	TMPPNP <mark>A</mark> PN <mark>P</mark> I	LTQ <mark>l</mark> eear.	RR <mark>L</mark> EEEEKRA	NKLPSKQRY	VQAVMQRGRT	CVRPACAPV	L:880
h-Axine	730:DP	TMPPHPAPNPI	LTQ <mark>l</mark> eear.	RR <mark>L</mark> EEEEKRA	SRAPSKORY	VQEVMRRGRA	CVRPACAPV	L:788
Dr-Axine	707:DP	TMPPNP <mark>A</mark> PN <mark>P</mark> I	LTQ <mark>l</mark> eear.h	RR <mark>L</mark> EEERRKS	GTLQAKQR.			.:744
D-Axine	618:EP	RRSRRY <mark>A</mark> QP <mark>P</mark> N	4QHLSQQP.	LASFSSSG	GSISLPHQ.			.:653
consensus	841: <u>*!</u>	*****	***!****-	**!******	_***_***			<b>-:</b> 900
		910	920 .	930 .	940	950	960	
Gg-Axine	744:		LKPQKRI	PGSGASQ <mark>P</mark> CE	NIV <mark>V</mark> AYY <mark>F</mark> (	GEPIPYRTLV.	K <mark>G</mark> RVVTLGQ	<b>:</b> 789
X-Axine	745:		LKPQKKI	NVSAPSQ <mark>P</mark> CD	NIV <mark>V</mark> AYY <mark>F</mark>	GEPIPYRTMV	K <mark>GRVVTL</mark> GQ	<b>F</b> :790
r-Axine	735:		TKSQRKA	AGG <mark>G</mark> SAP <mark>P</mark> CD	SIV <mark>V</mark> AYY <mark>F</mark>	GEPIPYRTLV.	R <mark>G</mark> RAVTLGQ	<b>:</b> 780
m-Axine	881:SV	VPAVSDLELSE	ETETKSQRKA	AGG <mark>G</mark> SAP <mark>P</mark> CD	SIV <mark>V</mark> GYYF(	GEPIPYRTLV.	R <mark>G</mark> RAVTLGQ	:940
h-Axine	789:HV	VPAVSDMELSE	ETETRSQRKV	VGG <mark>G</mark> SAQ <mark>P</mark> CD	SIV <mark>V</mark> AYY <mark>F(</mark>	GEPIPYRTLV	R <mark>G</mark> RAVTLGQ	<b>F</b> :848
Dr-Axine	744:		HKNMKK	Q <mark>P</mark> CE	NIT <mark>V</mark> AYY <mark>F</mark> (	GEPIPYRTSV	K <mark>G</mark> RIVTLGQ	<b>:</b> 783
D-Axine	653:		PPPLP	AK <mark>P</mark> PE	.TIVVFS <mark>F</mark> (	EEPVPYRIKI	P <mark>G</mark> TQP <mark>TL</mark> RQ	<b>:</b> 691
consensus	901: <u></u>		*_***	*	_**!***!	*!!*!!!***	*!*_*!!*!	<b>!</b> :960
			Site	de fixati	on de 1'	Axine		
		070	000	000	1000	1010		
~ - '		970	980 .	990 .	1000	1010		
Gg-Axine	790:KE	LL'I'KKGNYRY	TEKKVSDEF	DCGVVFEEVR	EDDTTLPIE	CEEKIIGKVEK	10:841	
x-Axine	791 · KE	LLTKKGNYRY	TFREVSDEF	DCGVVFEEVR	EDDMILPI	EEKIIGQVEK	10:842	
r-Axine	781:KE	LLTKKGSYRY	TEKKVSDEF	DCGVVFEEVR		CEEKLIGKVEK	VD:832	
m-Axine	941 · KE	LLTKKGSYRY	TFKKVSDEF	DCGVVFEEVR	EDEPVLPVI	'EEKLIGKVEK	VD:992	
n-Axine	849:KE	LITKKCSYRY	FKKVSDEFI	CGVVFHDVR	EDEAVLPVI	TEEKLIGKVEK	VD:900	
Dr-Axine	784:KE	LETKKCSYKYY	IFKKVSYEFI	DCGVVFEEVR	EDDAILPIE	TEEKIIGKVEK	VD:835	
D-Axine	692:KD	Y PRRCHFRFE	THKTHCEDP	DSPVIOFFIV	NDSDILPLE	GDKAMCLNKP	SD:/43	

# 

#### Figure 20- Alignement des séquences protéiques d'axine de différentes espèces.

poulet (Gg: *Gallus gallus*), xénope (X), rat (r), souris (m: mouse), humaine (h), *Danio rerio* (Dr) et drosophile (D).

Les alignements ont été effectués avec le logiciel ClustalX et mis en forme par le logiciel MacShadeBox.

Fond gris clair et lettre noire : acides aminés conservés

Fond gris foncé et lettre noire : acides aminés similaires

Fond noir et lettre blanche : acides aminés identiques

Séquence consensus bleue : site de fixation de la GSK-3 sur l'axine (109)

Séquence consensus violette : site de fixation de la  $\beta$ -caténine sur l'axine (109)

Séquence soulignée en bleu : peptide d'axine utilisé pour la chromatographie d'affinité permettant de purifier GSK-3 $\beta$ .

#### I.2. Conclusion

Des protéines GSK-3 natives de différentes espèces ont été purifiée par chromatographie d'affinité sur un fragment protéique d'axine fixé à des billes de sépharose. Cette méthode de purification présente de nombreux avantages. En effet, elle permet de purifier rapidement GSK-3 provenant de différentes sources (tissus ou organismes) sans altérer son activité. Elle est très économique puisque basée sur l'utilisation d'un fragment recombinant d'axine et de GSK-3 $\beta$  de rat. Ceci permet de tester de nombreux inhibiteurs potentiels de l'activité kinase de GSK-3 qui pourraient être utilisés dans le traitement de maladies impliquant GSK-3 telles que la maladie d'Alzheimer ou le diabète. D'autre part,

cette méthode permet l'analyse des variations relatives de l'activité et de l'abondance de GSK-3 native de différents tissus ou organismes puisque l'axine ne fixe que l'enzyme active.

### I.3. Article 1

Primot A., Baratte B., Gompel M., Borgne A., Liabeuf S., Romette J-L., Jho E., Costantini F. et Meijer L. (2000). Purification of GSK-3 by affinity chromatography on immobilized axin. *Protein Expression and Purification*, **20**, 394-404.

# Article 1

# Purification of GSK-3 by Affinity Chromatography on Immobilized Axin

Aline Primot,\* Blandine Baratte,\* Marie Gompel,\* Annie Borgne,\* Sylvie Liabeuf,† Jean-Louis Romette,† Eek-hoon Jho,‡ Frank Costantini,‡ and Laurent Meijer\*

\*Station Biologique, CNRS, BP 74, 29682 Roscoff cedex, Bretagne, France; †ESIL-GBMA, Faculte' des Sciences de Luminy, AFMB-DISP, 163, avenue de Luminy, 13288 Marseille Cedex 8, France; and ‡Department of Genetics and Development, Columbia University, 701 West 168th Street, New York, New York 10032

Received May 4, 2000, and in revised form August 9, 2000 Protein Expression and Purification **20**, 394–404 (2000) doi:10.1006/prep.2000.1321, available online at http://www.idealibrary.com on

Glycogen synthase kinase 3 (GSK-3), an element of the Wnt signalling pathway, plays a key role in numer-ous cellular processes including cell proliferation, em-bryonic development, and neuronal functions. It is di-rectly involved in diseases such as cancer (by controlling apoptosis and the levels of b-catenin and cyclin D1), Alzheimer's disease (tau hyperphosphory-lation), and diabetes (as a downstream element of in-sulin action, GSK-3 regulates glycogen and lipid syn-thesis). We describe here a rapid and efficient method for the purification of GSK-3 by affinity chromatogra-phy on an immobilized fragment of axin. Axin is a docking protein which interacts with GSK-3ß, b-cate-nin, phosphatase 2A, and APC. A polyhistidine-tagged axin peptide (residues 419-672) was produced in Esch-erichia coli and either immobilized on Ni-NTA agarose beads or purified and immobilized on CNBr-activated Sepharose 4B. These "Axin-His6" matrices were found to selectively bind recombinant rat GSK-3band native GSK-3 from yeast, sea urchin embryos, and porcine brain. The affinity-purified enzymes displayed high kinase activity. This single step purification method provides a convenient tool to follow the status of GSK-3 (protein level, phosphorylation state, kinase ac-tivity) under various physiological settings. It also provides a simple and efficient way to purify large amounts of active recombinant or native GSK-3 for screening purposes.

© 2000 Academic Press

*Key Words:* protein kinase; GSK-3b; axin; b-catenin; APC; WNT; armadillo; kinase inhibitors; screening; cancer; diabetes; Alzheimer's disease.

### II. Etude de la GSK-3 de Plasmodium falciparum

#### II.4. Introduction

L'étude de la protéine GSK-3 de *Plasmodium falciparum* a été motivée par la recherche de nouvelles cibles biochimiques permettant de trouver des molécules capables de soigner les malades atteints du paludisme.

Parmi les centaines d'espèces de *Plasmodium* décrites, seules quatre infectent l'homme. Le parasite le plus dangereux est *Plasmodium falciparum*, responsable du paludisme qui cause près de 3 millions de morts par an.

Cliniquement, cette affection est caractérisée par des accès de fièvre et des complications parfois mortelles. Il n'existe pas, à l'heure actuelle, de vaccin efficace contre le paludisme. L'effet des thérapies préventives et curatives se trouve de plus en plus souvent altéré par l'apparition de chimiorésistances. Ceci nécessite donc la recherche de nouvels axes thérapeutiques.

Le séquençage du génome *Plasmodium falciparum* était donc une priorité afin d'identifier de nouvelles cibles biochimiques pour pouvoir lutter contre ce parasite unicellulaire. Il est à présent terminé et nous a permis de cloner le gène *Pf*GSK-3 codant pour l'homologue de *Plasmodium falciparum* de la protéine GSK-3β. Plusieurs raisons nous ont poussé à étudier cette protéine. En effet, elle est très conservée et elle est impliquée dans de nombreux processus cellulaires chez les eucaryotes supérieurs: développement embryonnaire, la prolifération cellulaire, l'apoptose ou les fonctions neuronales. De plus, l'implication de cette protéine dans diverses maladies (maladie d'Alzheimer, diabète...) a suscité la recherche de molécules inhibitrices de son activité kinase.

Le clonage du gène PfGSK-3, réalisé par Eliane Droucheau, a permis d'obtenir une protéine recombinante qui possède une activité kinase sur certains des substrats que j'ai testés: la protéine Tau, le peptide GS-1 (Peptide dérivé du site de phosphorylation par GSK-3 de la Glycogène Synthase) et l'axine.

D'autre part, à partir des données obtenues après cristallographie de GSK-3 $\beta$  humaine (43) et de la séquence protéique de *Pf*GSK-3, un modèle tridimensionnel de la protéine PfGSK-3 a été réalisé par Chris Richardson et Laurence Pearl. Il nous apprend que les sites les plus important pour l'activité de la kinase sont conservés.

Le niveau d'expression de l'ARNm de PfGSK-3 a été évalué par la technique du «Northern blot» pour 3 stades de la phase érythrocytaire (ring, trophozoïte et schizonte), par Pietro Alano. Il apparaît que les niveaux d'expression de l'ARNm de PfGSK-3 ne sont pas

significativement différents. Nous avons donc étudier l'expression de la protéine PfGSK-3. Nous avons utilisé 3 anticorps différents pour identifier GSK-3 humaine et PfGSK-3. Aucun anticorps ne reconnaît de protéine dans les extraits de globules rouges non infectés alors qu'il existe bien une protéine GSK-3 dans les globules rouges infectés spécifique de *Plasmodium falciparum* (Figures 21, ci-dessous, et 6 de l'article 2) (la figure 6B a été réalisée par Marie Knockaert et Ali Jafarshad). La protéine PfGSK-3 est présente dans le parasite aux stades ring et trophozoïte.



# Figure 21– Analyse de la présence de GSK-3 dans des lysats de différents stades de *Plasmodium falciparum*.

Les extraits ont été passés (+) ou non (-) sur des billes de sépharose couplées à de l'axine. Ces billes ont été lavées et les protéines fixées ainsi que les extraits bruts ont été analysées par Western blot avec l'anticorps polyclonal anti GSK-3.1 : GSK-3 recombinante, 2 : Sang non infecté, 3 : Mélange de parasites aux stades Ring et Trophozoïtes.

La localisation intracellulaire de la protéine *Pf*GSK-3 a également été étudiée par immunofluorescence par Denise Mattéi. Il apparaît que la protéine est localisée au niveau de la membrane cytoplasmique du globule rouge infecté et coïncide avec des structures appelées «fentes de Mauer» qui interviennent dans les échanges protéiques.

Quelques inhibiteurs spécifiques de GSK-3 ont été identifiés (lithium, hyménialdisine, paullones, maléimides, indirubines). Eliane Droucheau les a testés sur l'activité de PfGSK-3 sur GS-1 dans l'espoir de trouver des inhibiteurs spécifiques de la forme plasmodiale de GSK-3. L'indirubine-3'-monoxime et l'hyménialdisine inhibent l'activité kinase de PfGSK-3, *in vitro*, mais également la prolifération du parasite en culture.

#### **II.5.** Conclusion

La recherche de nouvelles cibles moléculaires pour lutter contre le paludisme nous a amené à étudier la protéine GSK-3 de *Plasmodium falciparum*. Par comparaison à la structure cristalline humaine, on s'aperçoit que ces deux protéines sont très bien conservées, surtout au niveau des sites indispensables à leur activité kinase. *Pf*GSK-3 a été localisée au niveau de structures dont les propriétés se rapprochent de celles de l'appareil de Golgi. La recherche des substrats de *Pf*GSK-3 pourrait aider à comprendre son rôle au niveau de ces structures cellulaires. Les inhibiteurs testés ouvrent plusieurs voies de recherche de molécules spécifiques de la protéine GSK-3 de *Plasmodium falciparum*.

#### II.6. Article 2

Droucheau E., Primot A., Knockaert M., Mattei D., Alano P., Jafarshad A., Baratte B., Kunick C., Parzy D., Doerig C. et Meijer L. (2001). Glycogen synthase kinase-3 (GSK-3) of Plasmodium falciparum: expression, intracellular localisation and selective inhibitors.

#### II.7. Clonage de l'adaptine

Afin de mieux cerner le rôle de GSK-3 chez *Plasmodium falciparum*, la séquence de la  $\beta$ -caténine a été recherchée dans la banque de données regroupant les résultats du séquençage complet du génome du parasite (<u>http://plasmodiumdb.cis.upenn.edu/</u>). Aucune séquence de  $\beta$ -caténine n'est ressortie. Ce résultat nous permet de comprendre pourquoi la forme plasmodiale de GSK-3 ne peut pas être purifiée par chromatographie d'affinité sur les billes d'axine. Cependant, une séquence similaire à celle d'une protéine de *Caenorhabditis elegans* contenant des éléments de  $\beta$ -caténine (numéro d'accession: AAF36038) a été mises en évidence. Une recherche de similarité de la séquence de *Plasmodium falciparum* avec d'autres séquences a été effectuée par le logiciel Psi-Blast du site internet du NCBI («National Center for Biotechnology Information»). Il est alors apparu que cette protéine présente une grande similarité avec l'adaptine. L'alignement de la séquence de *Plasmodium falciparum* avec celles des différentes adaptines trouvées chez d'autres espèces confirme ce résultat (Figure 22 et tableau 10).

Arabidopsis thaliana 1		MSGH	DSKYFSTTK.	.KGEIPELKE	ELNSQYKDKR
Rattus norvegicus		MT	DSKYFTTNK.	.KGEIFELKA	ELNNEKKEKR
Homo sapiens 1		MT	DSKYFTTNK.	.KGEIFELKA	ELNNEKKEKR
Drosophila melanogaster		MT	DSKYFTTTK.	.KGEIFELKS	ELNNDKKEKK
Caenorhabditis elegans		MT	DSKYFTTTK.	.KGEIFELKN	ELNSDKKEKK
Plasmodium falciparum		MS	DLRYFOTTK	KGETHELKE	ELHSSHKEKK
Schizosaccharomyces pombe		MVDKI.F	OSSBEKTEK	KSETSELOK	GLUSOYAYER
Sagharomygog gorovisiao 1				CKCEI GEI DT	CIVEOVDOTTR
Trananasoma brugoj		I KONEDRGCC	COVEENTAI	DCECTALOU	GTASOLLOLU
Congongua	MEAVINICVEN	ERQIN RIISGG	GORPTNIAL.	.KGEGIADQII	т
Consensus	• • • • • • • • • • •	• • • • • • • • • • •	• • • • • • • • • • •		ш
Arabidongia thaliana 1	VDAUVVUTAA	MTTICKDUCCT		EN TETVVIU	VI VI TNVAVO
	KDAVKKVIAA	MENGKDVSSL	FDDIANONO		VI VI MIVAKO
Rallus norvegicus	KEAVKKVIAA	MIVGKDVSSL	FPDVVNCMQI	DN.LELKKLV	YLYLMNYAKS
Rollo Sapiens i	KEAVKKVIAA	MIVGROVSSL	FPDVVNCMQI	DN.LELKKLV	ILILMNIAKS
Drosophila melanogaster	KEAVKKVIAS	MTVGKDVSAL	FPDVVNCMQ1	DN.LELKKLV	YLYLMINYAKS
Caenorhabditis elegans	KEAVKKVIAS	MTVGKDVSAL	FPDVVNCMQT	DN.VELKKLV	YLYLMNYAKS
Plasmodium falciparum	KEAIKKIIAA	MTVGKDVSTL	FSDVVNCMQT	SN.IELKKLV	YLYVINYAKV
Schizosaccharomyces pombe	IDAVKRTIAA	MTVGKDVSSL	FPDVLKNLAT	RD.ITLKKLV	YLYLINYAKT
Saccharomyces cerevisiae 1	KDAIKKTIQQ	MTLGKDVSSL	FPDVLKNIAT	ID.VEQKKLV	YLYVMNYAET
Trypanosoma brucei	KNAVKRIIAG	MTMGRAVSHL	FMDVVKLGQT	TN.LALMKLV	YLYVLSIANF
Consensus	K	.T.GVS.L	F.DVT	KLV	YLYA
Arabidopsis thaliana 1	QPDLAILAVN	TFVKDSQDPN	PLIRALAVRT	MGCIRVDKIT	EYLCDPLQKC
Rattus norvegicus	QPDMAIMAVN	SFVKDCEDPN	PLIRALAVRT	MGCIRVDKIT	EYLCEPLRKC
Homo sapiens 1	QPDMAIMAVN	SFVKDCEDPN	PLIRALAVRT	MGCIRVDKIT	EYLCEPLRKC
Drosophila melanogaster	QPDMAIMAVN	TFVKDCEDSN	PLIRALAVRT	MGCIRVDKIT	EYLCEPLRKC
Caenorhabditis elegans	QPDLAIMAVN	TFVKDCEDPN	PLIRALAVRT	MGCIRVEKIT	EYLCDPLRRC
Plasmodium falciparum	OPELAILAVN	TFRKDSSDPN	PLIRALAIRT	MGCIRLEOIT	EYLIEPLRRC
Schizosaccharomyces pombe	<b>HPDLCILAVN</b>	TFVKDSEEYN	PTLRALAIRT	MGCIRVNKII	GYLADPLRKA
Saccharomyces cerevisiae 1	HPELCILAVN	TFITDAODPN	PLIRCMAIRT	MSMIRVDKIL	EYIETPLRRT
Trvpanosoma brucei	RPGKALMAVN	TFLODTTNPS	PVVRALAVRT	MMCVRVDSVT	EYTLEPLRRA
Consensus	.PAVN	~ .FD	P	MR	.YPL
Arabidopsis thaliana 1	LKDDDPYV	RKTAAICVAK	LFDINAELVE	DRGFLEALKD	LISDNNPMVV
Arabidopsis thaliana 1 Rattus norvegicus	LKDDDPYV	RKTAAICVAK RKTAAVCVAK	LFDINAELVE LHDINAOMVE	DRGFLEALKD	LISDNNPMVV
Arabidopsis thaliana 1 Rattus norvegicus Homo sapiens 1	LKDDDPYV LKDEDPYV	RKTAAICVAK RKTAAVCVAK	LFDINAELVE LHDINAQMVE	DRGFLEALKD DQGFLDSLRD DOGFLDSLRD	LISDNNPMVV LIADSNPMVV
Arabidopsis thaliana 1 Rattus norvegicus Homo sapiens 1 Drosophila melanogaster	LKDDDPYV LKDEDPYV LKDEDPYV	RKTAAICVAK RKTAAVCVAK RKTAAVCVAK	LFDINAELVE LHDINAQMVE LHDINAQMVE	DRGFLEALKD DQGFLDSLRD DQGFLDSLRD	LISDNNPMVV LIADSNPMVV LIADSNPMVV
Arabidopsis thaliana 1 Rattus norvegicus Homo sapiens 1 Drosophila melanogaster	LKDDDPYV LKDEDPYV LKDEDPYV LKDEDPYV	RKTAAICVAK RKTAAVCVAK RKTAAVCVAK RKTAAVCVAK	LFDINAELVE LHDINAQMVE LHDINAQMVE LYDISATMVE	DRGFLEALKD DQGFLDSLRD DQGFLDSLRD DQGFLDQLKD	LISDNNPMVV LIADSNPMVV LIADSNPMVV LLSDSNPMVV
Arabidopsis thaliana 1 Rattus norvegicus Homo sapiens 1 Drosophila melanogaster Caenorhabditis elegans Plasmodium falciparum	LKDDDPYV LKDEDPYV LKDEDPYV LKDEDPYV MKDEDPYV	RKTAAICVAK RKTAAVCVAK RKTAAVCVAK RKTAAVCVAK RKTAAVCVAK	LFDINAELVE LHDINAQMVE LHDINAQMVE LYDISATMVE LHDMNPALVK	DRGFLEALKD DQGFLDSLRD DQGFLDSLRD DQGFLDQLKD EQ.FVELLND	LISDNNPMVV LIADSNPMVV LIADSNPMVV LLSDSNPMVV LLSDANPMVV
Arabidopsis thaliana 1 Rattus norvegicus Homo sapiens 1 Drosophila melanogaster Caenorhabditis elegans Plasmodium falciparum	LKDDDPYV LKDEDP.YV LKDEDP.YV LKDEDP.YV LKDEDP.YV LKDEDP.YV	RKTAAICVAK RKTAAVCVAK RKTAAVCVAK RKTAAVCVAK RKTAAVCVAK RKTAVICIAK	LFDINAELVE LHDINAQMVE LHDINAQMVE LYDISATMVE LHDMNPALVK LYDISPKLVE	DRGFLEALKD DQGFLDSLRD DQGFLDSLRD DQGFLDQLKD EQ.FVELLND EEGFIDTLLD	LISDNNPMVV LIADSNPMVV LIADSNPMVV LLSDSNPMVV LLSDANPMVV ILDDNNAMVV
Arabidopsis thaliana 1 Rattus norvegicus Homo sapiens 1 Drosophila melanogaster Caenorhabditis elegans Plasmodium falciparum Schizosaccharomyces pombe	LKDDDPYV LKDEDP.YV LKDEDP.YV LKDEDP.YV LKDEDP.YV LKDEDP.YV LKDEHP.YV	RKTAAICVAK RKTAAVCVAK RKTAAVCVAK RKTAAVCVAK RKTAAVCVAK RKTAVICIAK RKAAAVCVVK	LFDINAELVE LHDINAQMVE LHDINAQMVE LYDISATMVE LHDMNPALVK LYDISPKLVE MYDLDREYCA LEOLNKDLCY	DRGFLEALKD DQGFLDSLRD DQGFLDSLRD DQGFLDQLKD EQ.FVELLND EEGFIDTLLD SNGFIEQLQA ELCWEDLVN	LISDNNPMVV LIADSNPMVV LIADSNPMVV LLSDSNPMVV LLSDANPMVV ILDDNNAMVV LVSDPNPVVV
Arabidopsis thaliana 1 Rattus norvegicus Homo sapiens 1 Drosophila melanogaster Caenorhabditis elegans Plasmodium falciparum Schizosaccharomyces pombe Saccharomyces cerevisiae 1	LKDDDPYV LKDEDPYV LKDEDPYV LKDEDPYV LKDEDPYV LKDEDPYV LKDEHPYV LHDDNAYV	RKTAAICVAK RKTAAVCVAK RKTAAVCVAK RKTAAVCVAK RKTAVICIAK RKTAVICIAK RKTAVICVAK RKTAVICVAK	LFDINAELVE LHDINAQMVE LHDINAQMVE LYDISATMVE LYDISATMVE LYDISPKLVE MYDLDREYCA LFQLNKDLCV LFUNSSOLVE	DRGFLEALKD DQGFLDSLRD DQGFLDSLRD DQGFLDQLKD EQ.FVELLND EEGFIDTLLD SNGFIEQLQA ELGVVEDLVN	LISDNNPMVV LIADSNPMVV LISDSNPMVV LLSDANPMVV ILDDNNAMVV LVSDPNPVVV ALDDSNPLVI
Arabidopsis thaliana 1 Rattus norvegicus Homo sapiens 1 Drosophila melanogaster Caenorhabditis elegans Plasmodium falciparum Schizosaccharomyces pombe Saccharomyces cerevisiae 1 Trypanosoma brucei	LKDDDPYV LKDEDP.YV LKDEDP.YV LKDEDP.YV LKDEDP.YV LKDEDP.YV LKDEHP.YV LHDDNA.YV	RKTAAICVAK RKTAAVCVAK RKTAAVCVAK RKTAAVCVAK RKTAVICIAK RKAAAVCVVK RKTAVICVAK RKNAVICIGIGK	LFDINAELVE LHDINAQMVE LHDINAQMVE LYDISATMVE LYDISATMVE LYDISPKLVE MYDLDREYCA LFQLNKDLCV LFHNSSQLYE	DRGFLEALKD DQGFLDSLRD DQGFLDQLKD EQ.FVELLND EEGFIDTLLD SNGFIEQLQA ELGVVEDLVN DQGFSTELLK	LISDNNPMVV LIADSNPMVV LISDSNPMVV LLSDANPMVV ILDDNNAMVV LVSDPNPVVV ALDDSNPLVI LLTDKAAVVV
Arabidopsis thaliana 1 Rattus norvegicus Homo sapiens 1 Drosophila melanogaster Caenorhabditis elegans Plasmodium falciparum Schizosaccharomyces pombe Saccharomyces cerevisiae 1 Trypanosoma brucei Consensus	LKDDDPYV LKDEDP.YV LKDEDP.YV LKDEDP.YV LKDEDP.YV LKDEDP.YV LKDEHP.YV LHDDNA.YV VNDLDP.YV	RKTAAICVAK RKTAAVCVAK RKTAAVCVAK RKTAAVCVAK RKTAVICIAK RKAAAVCVVK RKTAVICVAK RKNAVIGIGK RK.AK	LFDINAELVE LHDINAQMVE LHDINAQMVE LYDISATMVE LYDISATMVE LYDISPKLVE MYDLDREYCA LFQLNKDLCV LFHNSSQLYE	DRGFLEALKD DQGFLDSLRD DQGFLDQLKD EQ.FVELLND EEGFIDTLLD SNGFIEQLQA ELGVVEDLVN DQGFSTELLK	LISDNNPMVV LIADSNPMVV LISDSNPMVV LLSDANPMVV ILDDNNAMVV LVSDPNPVVV ALDDSNPLVI LLTDKAAVVV V.
Arabidopsis thaliana 1 Rattus norvegicus Homo sapiens 1 Drosophila melanogaster Caenorhabditis elegans Plasmodium falciparum Schizosaccharomyces pombe Saccharomyces cerevisiae 1 Trypanosoma brucei Consensus	LKDDDPYV LKDEDPYV LKDEDPYV LKDEDPYV LKDEDPYV LKDEDPYV LKDEHPYV LHDDNAYV VNDLDPYV YV	RKTAAICVAK RKTAAVCVAK RKTAAVCVAK RKTAAVCVAK RKTAVICIAK RKAAAVCVVK RKTAVICVAK RKNAVIGIGK RK.AK	LFDINAELVE LHDINAQMVE LHDINAQMVE LYDISATMVE LYDISATMVE LYDISPKLVE MYDLDREYCA LFQLNKDLCV LFHNSSQLYE	DRGFLEALKD DQGFLDSLRD DQGFLDSLRD DQGFLDQLKD EQ.FVELLND EEGFIDTLLD SNGFIEQLQA ELGVVEDLVN DQGFSTELLK	LISDNNPMVV LIADSNPMVV LISDSNPMVV LLSDANPMVV ILDDNNAMVV LVSDPNPVVV ALDDSNPLVI LLTDKAAVVV V.
Arabidopsis thaliana 1 Rattus norvegicus Homo sapiens 1 Drosophila melanogaster Caenorhabditis elegans Plasmodium falciparum Schizosaccharomyces pombe Saccharomyces cerevisiae 1 Trypanosoma brucei Consensus Arabidopsis thaliana 1 Pattus porpogious	LKDDDPYV LKDEDPYV LKDEDPYV LKDEDPYV LKDEDPYV LKDEDPYV LKDEHPYV LHDDNAYV VNDLDPYV YV ANAVAALAEI	RKTAAICVAK RKTAAVCVAK RKTAAVCVAK RKTAAVCVAK RKTAVICIAK RKAAAVCVVK RKTAVICVAK RKNAVIGIGK RK.AK QENSTSP	LFDINAELVE LHDINAQMVE LHDINAQMVE LYDISATMVE LYDISATMVE LYDISPKLVE MYDLDREYCA LFQLNKDLCV LFHNSSQLYE 	DRGFLEALKD DQGFLDSLRD DQGFLDSLRD DQGFLDQLKD EQ.FVELLND EEGFIDTLLD SNGFIEQLQA ELGVVEDLVN DQGFSTELLK  TKLLTALNEC	LISDNNPMVV LIADSNPMVV LIADSNPMVV LLSDSNPMVV LLSDANPMVV LLSDANPMVV LVSDPNPVVV ALDDSNPLVI LLTDKAAVVV V. TEWGQVFILD
Arabidopsis thaliana 1 Rattus norvegicus Homo sapiens 1 Drosophila melanogaster Caenorhabditis elegans Plasmodium falciparum Schizosaccharomyces pombe Saccharomyces cerevisiae 1 Trypanosoma brucei Consensus Arabidopsis thaliana 1 Rattus norvegicus	LKDDDPYV LKDEDPYV LKDEDPYV LKDEDPYV LKDEDPYV LKDEHPYV LKDEHPYV LHDDNAYV VNDLDPYV YV ANAVAALAEI ANAVAALAEI	RKTAAICVAK RKTAAVCVAK RKTAAVCVAK RKTAAVCVAK RKTAVICIAK RKAAAVCVVK RKTAVICVAK RKNAVIGIGK RK.AK QENSTSP SESHPNSN	LFDINAELVE LHDINAQMVE LHDINAQMVE LYDISATMVE LYDISATMVE LYDISPKLVE MYDLDREYCA LFQLNKDLCV LFHNSSQLYE 	DRGFLEALKD DQGFLDSLRD DQGFLDSLRD DQGFLDQLKD EQ.FVELLND EEGFIDTLLD SNGFIEQLQA ELGVVEDLVN DQGFSTELLK  TKLLTALNEC NKLLTALNEC	LISDNNPMVV LIADSNPMVV LIADSNPMVV LLSDSNPMVV LLSDANPMVV LVSDPNPVVV ALDDSNPLVI LLTDKAAVVV V. TEWGQVFILD TEWGQIFILD
Arabidopsis thaliana 1 Rattus norvegicus Homo sapiens 1 Drosophila melanogaster Caenorhabditis elegans Plasmodium falciparum Schizosaccharomyces pombe Saccharomyces cerevisiae 1 Trypanosoma brucei Consensus Arabidopsis thaliana 1 Rattus norvegicus Homo sapiens 1 Drogenbila melanogaster	LKDDDPYV LKDEDPYV LKDEDPYV LKDEDPYV LKDEDPYV LKDEDPYV LKDEHPYV LHDDNAYV VNDLDPYV YV ANAVAALAEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI	RKTAAICVAK RKTAAVCVAK RKTAAVCVAK RKTAAVCVAK RKTAVICIAK RKAAAVCVVK RKTAVICVAK RKNAVIGIGK RK.AK QENSTSP SESHPNSN SESHPNSN	LFDINAELVE LHDINAQMVE LHDINAQMVE LYDISATMVE LYDISATMVE LYDISPKLVE MYDLDREYCA LFQLNKDLCV LFHNSSQLYE 	DRGFLEALKD DQGFLDSLRD DQGFLDSLRD DQGFLDQLKD EQ.FVELLND EEGFIDTLLD SNGFIEQLQA ELGVVEDLVN DQGFSTELLK  TKLLTALNEC NKLLTALNEC NKLLTALNEC	LISDNNPMVV LIADSNPMVV LISDSNPMVV LLSDSNPMVV LLSDANPMVV LLSDANPMVV LVSDPNPVVV ALDDSNPLVI LLTDKAAVVV V. TEWGQVFILD TEWGQIFILD TEWGQIFILD
Arabidopsis thaliana 1 Rattus norvegicus Homo sapiens 1 Drosophila melanogaster Caenorhabditis elegans Plasmodium falciparum Schizosaccharomyces pombe Saccharomyces cerevisiae 1 Trypanosoma brucei Consensus Arabidopsis thaliana 1 Rattus norvegicus Homo sapiens 1 Drosophila melanogaster	LKDDDPYV LKDEDPYV LKDEDPYV LKDEDPYV LKDEDPYV LKDEDPYV LKDEHPYV LHDDNAYV VNDLDPYV YV ANAVAALAEI ANAVAALAEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI	RKTAAICVAK RKTAAVCVAK RKTAAVCVAK RKTAAVCVAK RKTAVICIAK RKAAAVCVVK RKTAVICVAK RKNAVIGIGK RK.AK QENSTSP SESHPNSN SESHPNSN NEASQSGQP.	LFDINAELVE LHDINAQMVE LHDINAQMVE LYDISATMVE LYDISATMVE LYDISPKLVE MYDLDREYCA LFQLNKDLCV LFHNSSQLYE 	DRGFLEALKD DQGFLDSLRD DQGFLDSLRD DQGFLDQLKD EQ.FVELLND EEGFIDTLLD SNGFIEQLQA ELGVVEDLVN DQGFSTELLK  TKLLTALNEC NKLLTALNEC NKLLTALNEC NKLLTALNEC	LISDNNPMVV LIADSNPMVV LIADSNPMVV LLSDANPMVV ILDDNNAMVV LVSDPNPVVV ALDDSNPLVI LLTDKAAVVV V. TEWGQVFILD TEWGQIFILD TEWGQIFILD TEWGQVFILD
Arabidopsis thaliana 1 Rattus norvegicus Homo sapiens 1 Drosophila melanogaster Caenorhabditis elegans Plasmodium falciparum Schizosaccharomyces pombe Saccharomyces cerevisiae 1 Trypanosoma brucei Consensus Arabidopsis thaliana 1 Rattus norvegicus Homo sapiens 1 Drosophila melanogaster Caenorhabditis elegans	LKDDDPYV LKDEDPYV LKDEDPYV LKDEDPYV LKDEDPYV LKDEDPYV LKDEHPYV LHDDNAYV VNDLDPYV YV ANAVAALAEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI	RKTAAICVAK RKTAAVCVAK RKTAAVCVAK RKTAAVCVAK RKTAVICIAK RKAAAVCVVK RKTAVICVAK RKNAVIGIGK RK.AK QENSTSP SESHPNSN SESHPNSN NEASQSGQP. NEQQ.T	LFDINAELVE LHDINAQMVE LHDINAQMVE LYDISATMVE LHDMNPALVK LYDISPKLVE MYDLDREYCA LFQLNKDLCV LFHNSSQLYE 	DRGFLEALKD DQGFLDSLRD DQGFLDSLRD DQGFLDQLKD EQ.FVELLND EEGFIDTLLD SNGFIEQLQA ELGVVEDLVN DQGFSTELLK  TKLLTALNEC NKLLTALNEC NKLLTALNEC NKLLTALNEC	LISDNNPMVV LIADSNPMVV LIADSNPMVV LLSDSNPMVV LLSDANPMVV LVSDPNPVVV ALDDSNPLVI LLTDKAAVVV V. TEWGQVFILD TEWGQIFILD TEWGQVFILD TEWGQVFILD TEWGQVFILD
Arabidopsis thaliana 1 Rattus norvegicus Homo sapiens 1 Drosophila melanogaster Caenorhabditis elegans Plasmodium falciparum Schizosaccharomyces pombe Saccharomyces cerevisiae 1 Trypanosoma brucei Consensus Arabidopsis thaliana 1 Rattus norvegicus Homo sapiens 1 Drosophila melanogaster Caenorhabditis elegans Plasmodium falciparum	LKDDDPYV LKDEDPYV LKDEDPYV LKDEDPYV LKDEDPYV LKDEDPYV LKDEHPYV LHDDNAYV VNDLDPYV YV ANAVAALAEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI	RKTAAICVAK RKTAAVCVAK RKTAAVCVAK RKTAAVCVAK RKTAVICIAK RKAAAVCVVK RKTAVICVAK RKNAVIGIGK RK.AK QENSTSP SESHPNSN SESHPNSN NEASQSGQP. NEQQ.T CENSNKSILK UDODDEKC	LFDINAELVE LHDINAQMVE LHDINAQMVE LYDISATMVE LHDMNPALVK LYDISPKLVE MYDLDREYCA LFQLNKDLCV LFHNSSQLYE 	DRGFLEALKD DQGFLDSLRD DQGFLDSLRD DQGFLDQLKD EQ.FVELLND EEGFIDTLLD SNGFIEQLQA ELGVVEDLVN DQGFSTELLK  TKLLTALNEC NKLLTALNEC NKLLTALNEC NKLLTALNEC NKLLTALNEC NKLLTALNEC NKLLTALNEC	LISDNNPMVV LIADSNPMVV LIADSNPMVV LLSDSNPMVV LLSDANPMVV LLSDANPMVV LVSDPNPVVV ALDDSNPLVI LLTDKAAVVV V. TEWGQVFILD TEWGQVFILD TEWGQVFILD TEWGQVFILD VEWGQVFILD
Arabidopsis thaliana 1 Rattus norvegicus Homo sapiens 1 Drosophila melanogaster Caenorhabditis elegans Plasmodium falciparum Schizosaccharomyces pombe Saccharomyces cerevisiae 1 Trypanosoma brucei Consensus Arabidopsis thaliana 1 Rattus norvegicus Homo sapiens 1 Drosophila melanogaster Caenorhabditis elegans Plasmodium falciparum Schizosaccharomyces pombe	LKDDDPYV LKDEDPYV LKDEDPYV LKDEDPYV LKDEDPYV LKDEDPYV LKDEHPYV LKDEHPYV LHDDNAYV VNDLDPYV YV ANAVAALAEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI	RKTAAICVAK RKTAAVCVAK RKTAAVCVAK RKTAAVCVAK RKTAAVCVAK RKTAVICIAK RKAAAVCVVK RKTAVICVAK RKNAVIGIGK RK.AK QENSTSP SESHPNSN SESHPNSN NEASQSGQP. NEQQ.T CENSNKSILK HDQDPEKG.	LFDINAELVE LHDINAQMVE LHDINAQMVE LYDISATMVE LYDISATMVE LHDMNPALVK LYDISPKLVE MYDLDREYCA LFQLNKDLCV LFHNSSQLYE 	DRGFLEALKD DQGFLDSLRD DQGFLDSLRD DQGFLDQLKD EQ.FVELLND EEGFIDTLLD SNGFIEQLQA ELGVVEDLVN DQGFSTELLK  TKLLTALNEC NKLLTALNEC NKLLTALNEC NKLLTALNEC NKLLTALNEC NKLLTALNEC NKLLTALNEC ORLUNAISEC	LISDNNPMVV LIADSNPMVV LIADSNPMVV LLSDSNPMVV LLSDANPMVV LLSDANPMVV LVSDPNPVVV ALDDSNPLVI LLTDKAAVVV V. TEWGQVFILD TEWGQVFILD TEWGQVFILD TEWGQVFILD NEWGQVFILD NEWGQVFILD
Arabidopsis thaliana 1 Rattus norvegicus Homo sapiens 1 Drosophila melanogaster Caenorhabditis elegans Plasmodium falciparum Schizosaccharomyces pombe Saccharomyces cerevisiae 1 Trypanosoma brucei Consensus Arabidopsis thaliana 1 Rattus norvegicus Homo sapiens 1 Drosophila melanogaster Caenorhabditis elegans Plasmodium falciparum Schizosaccharomyces pombe Saccharomyces cerevisiae 1	LKDDDPYV LKDEDPYV LKDEDPYV LKDEDPYV LKDEDPYV LKDEDPYV LKDEHPYV LHDDNAYV VNDLDPYV YV ANAVAALAEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALTEM ANAVSLAEI ANAVRSLAEI ANATAALIEI	RKTAAICVAK RKTAAVCVAK RKTAAVCVAK RKTAAVCVAK RKTAAVCVAK RKTAVICIAK RKAAAVCVVK RKTAVICVAK RKNAVIGIGK RK.AK QENSTSP SESHPNSN SESHPNSN NEASQSGQP. NEQQ.T CENSNKSILK HDQDPEKG HNMDMDAVD.	LFDINAELVE LHDINAQMVE LHDINAQMVE LYDISATMVE LYDISATMVE LHDMNPALVK LYDISPKLVE MYDLDREYCA LFQLNKDLCV LFHNSSQLYE 	DRGFLEALKD DQGFLDSLRD DQGFLDSLRD DQGFLDQLKD EQ.FVELLND EEGFIDTLLD SNGFIEQLQA ELGVVEDLVN DQGFSTELLK  TKLLTALNEC NKLLTALNEC NKLLTALNEC NKLLTALNEC NKLLTALNEC NKLLTALNEC NKLLTALNEC SQFLLALNEC	LISDNNPMVV LIADSNPMVV LIADSNPMVV LLSDSNPMVV LLSDANPMVV LLSDANPMVV LVSDPNPVVV ALDDSNPLVI LLTDKAAVVV V. TEWGQVFILD TEWGQVFILD TEWGQVFILD TEWGQVFILD NEWGRITILN TEWGRITILN
Arabidopsis thaliana 1 Rattus norvegicus Homo sapiens 1 Drosophila melanogaster Caenorhabditis elegans Plasmodium falciparum Schizosaccharomyces pombe Saccharomyces cerevisiae 1 Trypanosoma brucei Consensus Arabidopsis thaliana 1 Rattus norvegicus Homo sapiens 1 Drosophila melanogaster Caenorhabditis elegans Plasmodium falciparum Schizosaccharomyces pombe Saccharomyces cerevisiae 1 Trypanosoma brucei	LKDDDPYV LKDEDPYV LKDEDPYV LKDEDPYV LKDEDPYV LKDEDPYV LKDEHPYV LHDDNAYV VNDLDPYV YV ANAVAALAEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI	RKTAAICVAK RKTAAVCVAK RKTAAVCVAK RKTAAVCVAK RKTAAVCVAK RKTAVICIAK RKAAAVCVVK RKTAVICVAK RKNAVIGIGK RK.AK QENSTSP SESHPNSN SESHPNSN NEASQSGQP. NEQQ.T CENSNKSILK HDQDPEKG HNMDMDAVD. TTNAGLQ	LFDINAELVE LHDINAQMVE LHDINAQMVE LYDISATMVE LYDISATMVE LHDMNPALVK LYDISPKLVE MYDLDREYCA LFQLNKDLCV LFHNSSQLYE 	DRGFLEALKD DQGFLDSLRD DQGFLDSLRD DQGFLDQLKD EQ.FVELLND EEGFIDTLLD SNGFIEQLQA ELGVVEDLVN DQGFSTELLK  TKLLTALNEC NKLLTALNEC NKLLTALNEC NKLLTALNEC NKLLTALNEC NKLLTALNEC NKLLTALNEC DRLMVALSEC SQFLLALNEC MHLLDQKPGT	LISDNNPMVV LIADSNPMVV LIADSNPMVV LLSDSNPMVV LLSDANPMVV LLSDANPMVV LVSDPNPVVV ALDDSNPLVI LLTDKAAVVV V. TEWGQVFILD TEWGQVFILD TEWGQVFILD TEWGQVFILD NEWGRITILN TEWGQLNILE
Arabidopsis thaliana 1 Rattus norvegicus Homo sapiens 1 Drosophila melanogaster Caenorhabditis elegans Plasmodium falciparum Schizosaccharomyces pombe Saccharomyces cerevisiae 1 Trypanosoma brucei Consensus Arabidopsis thaliana 1 Rattus norvegicus Homo sapiens 1 Drosophila melanogaster Caenorhabditis elegans Plasmodium falciparum Schizosaccharomyces pombe Saccharomyces cerevisiae 1 Trypanosoma brucei Consensus	LKDDDPYV LKDEDPYV LKDEDPYV LKDEDPYV LKDEDPYV LKDEDPYV LKDEHPYV LHDDNAYV VNDLDPYV YV ANAVAALAEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI SNAAAVVMEV .NA	RKTAAICVAK RKTAAVCVAK RKTAAVCVAK RKTAAVCVAK RKTAAVCVAK RKTAVICIAK RKAAAVCVVK RKTAVICVAK RKNAVIGIGK RK.AK QENSTSP SESHPNSN SESHPNSN NEASQSGQP. NEQQ.T CENSNKSILK HDQDPEKG HNMDMDAVD. TTNAGLQ	LFDINAELVE LHDINAQMVE LHDINAQMVE LYDISATMVE LYDISATMVE LHDMNPALVK LYDISPKLVE MYDLDREYCA LFQLNKDLCV LFHNSSQLYE 	DRGFLEALKD DQGFLDSLRD DQGFLDSLRD DQGFLDQLKD EQ.FVELLND EEGFIDTLLD SNGFIEQLQA ELGVVEDLVN DQGFSTELLK  TKLLTALNEC NKLLTALNEC NKLLTALNEC NKLLTALNEC NKLLTALNEC NKLLTALNEC DRLMVALSEC SQFLLALNEC MHLLDQKPGT	LISDNNPMVV LIADSNPMVV LIADSNPMVV LLSDSNPMVV LLSDANPMVV LLSDANPMVV LVSDPNPVVV ALDDSNPLVI LLTDKAAVVV V. TEWGQVFILD TEWGQVFILD TEWGQVFILD TEWGQVFILD NEWGRITILN TEWARIIILG TEWGQLNILE W
Arabidopsis thaliana 1 Rattus norvegicus Homo sapiens 1 Drosophila melanogaster Caenorhabditis elegans Plasmodium falciparum Schizosaccharomyces pombe Saccharomyces cerevisiae 1 Trypanosoma brucei Consensus Arabidopsis thaliana 1 Rattus norvegicus Homo sapiens 1 Drosophila melanogaster Caenorhabditis elegans Plasmodium falciparum Schizosaccharomyces pombe Saccharomyces cerevisiae 1 Trypanosoma brucei Consensus	LKDDDPYV LKDEDPYV LKDEDPYV LKDEDPYV LKDEDPYV LKDEDPYV LKDEHPYV LHDDNAYV VNDLDPYV YV ANAVAALAEI ANAVAALAEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI	RKTAAICVAK RKTAAVCVAK RKTAAVCVAK RKTAAVCVAK RKTAAVCVAK RKTAVICIAK RKAAAVCVVK RKTAVICVAK RKNAVIGIGK RK.AK QENSTSP SESHPNSN SESHPNSN NEASQSGQP. NEQQ.T CENSNKSILK HDQDPEKG HNMDMDAVD. TTNAGLQ	LFDINAELVE LHDINAQMVE LHDINAQMVE LYDISATMVE LYDISATMVE LHDMNPALVK LYDISPKLVE MYDLDREYCA LFQLNKDLCV LFHNSSQLYE 	DRGFLEALKD DQGFLDSLRD DQGFLDSLRD DQGFLDQLKD EQ.FVELLND EEGFIDTLLD SNGFIEQLQA ELGVVEDLVN DQGFSTELLK  TKLLTALNEC NKLLTALNEC NKLLTALNEC NKLLTALNEC NKLLTALNEC NKLLTALNEC DRLMVALSEC SQFLLALNEC MHLLDQKPGT	LISDNNPMVV LIADSNPMVV LIADSNPMVV LLSDSNPMVV LLSDANPMVV LLSDANPMVV LVSDPNPVVV ALDDSNPLVI LLTDKAAVVV V. TEWGQVFILD TEWGQVFILD TEWGQVFILD TEWGQVFILD NEWGRITILN TEWGQVFILD NEWGRITILN TEWARIIILG TEWGQLNILE W
Arabidopsis thaliana 1 Rattus norvegicus Homo sapiens 1 Drosophila melanogaster Caenorhabditis elegans Plasmodium falciparum Schizosaccharomyces pombe Saccharomyces cerevisiae 1 Trypanosoma brucei Consensus Arabidopsis thaliana 1 Rattus norvegicus Homo sapiens 1 Drosophila melanogaster Caenorhabditis elegans Plasmodium falciparum Schizosaccharomyces pombe Saccharomyces cerevisiae 1 Trypanosoma brucei Consensus Arabidopsis thaliana 1 Pattua parmogicus	LKDDDPYV LKDEDPYV LKDEDPYV LKDEDPYV LKDEDPYV LKDEDPYV LKDEHPYV LHDDNAYV VNDLDPYV ANAVAALAEI ANAVAALAEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVANANAVANANANAVANAVANANANANANANANANA	RKTAAICVAK RKTAAVCVAK RKTAAVCVAK RKTAAVCVAK RKTAAVCVAK RKTAVICIAK RKAAAVCVVK RKTAVICVAK RKNAVIGIGK RK.AK QENSTSP SESHPNSN SESHPNSN SESHPNSN NEASQSGQP. NEQQ.T CENSNKSILK HDQDPEKG HNMDMDAVD. TTNAGLQ PREAENIVER	LFDINAELVE LHDINAQMVE LHDINAQMVE LYDISATMVE LYDISATMVE LHDMNPALVK LYDISPKLVE MYDLDREYCA LFQLNKDLCV LFHNSSQLYE 	DRGFLEALKD DQGFLDSLRD DQGFLDSLRD DQGFLDQLKD EQ.FVELLND EEGFIDTLLD SNGFIEQLQA ELGVVEDLVN DQGFSTELLK  TKLLTALNEC NKLLTALNEC NKLLTALNEC NKLLTALNEC NKLLTALNEC NKLLTALNEC NKLLTALNEC DRLMVALSEC SQFLLALNEC MHLLDQKPGT 	LISDNNPMVV LIADSNPMVV LIADSNPMVV LLSDSNPMVV LLSDANPMVV LLSDANPMVV LVSDPNPVVV ALDDSNPLVI LLTDKAAVVV V. TEWGQVFILD TEWGQVFILD TEWGQVFILD TEWGQVFILD NEWGRITILN TEWARIIILG TEWGQLNILE W
Arabidopsis thaliana 1 Rattus norvegicus Homo sapiens 1 Drosophila melanogaster Caenorhabditis elegans Plasmodium falciparum Schizosaccharomyces pombe Saccharomyces cerevisiae 1 Trypanosoma brucei Consensus Arabidopsis thaliana 1 Rattus norvegicus Homo sapiens 1 Drosophila melanogaster Caenorhabditis elegans Plasmodium falciparum Schizosaccharomyces pombe Saccharomyces cerevisiae 1 Trypanosoma brucei Consensus Arabidopsis thaliana 1 Rattus norvegicus	LKDDDPYV LKDEDPYV LKDEDPYV LKDEDPYV LKDEDPYV LKDEDPYV LKDEHPYV LHDDNAYV VNDLDPYV YV ANAVAALAEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVA	RKTAAICVAK RKTAAVCVAK RKTAAVCVAK RKTAAVCVAK RKTAAVCVAK RKTAVICIAK RKAAAVCVVK RKTAVICVAK RKNAVIGIGK RK.AK QENSTSP SESHPNSN SESHPNSN SESHPNSN NEASQSGQP. NEQQ.T CENSNKSILK HDQDPEKG HNMDMDAVD. TTNAGLQ PREAENIVER DREAQSICER	LFDINAELVE LHDINAQMVE LHDINAQMVE LYDISATMVE LYDISATMVE LYDISPKLVE MYDLDREYCA LFQLNKDLCV LFHNSSQLYE 	DRGFLEALKD DQGFLDSLRD DQGFLDSLRD DQGFLDQLKD EQ.FVELLND EEGFIDTLLD SNGFIEQLQA ELGVVEDLVN DQGFSTELLK  TKLLTALNEC NKLLTALNEC NKLLTALNEC NKLLTALNEC NKLLTALNEC NKLLTALNEC NKLLTALNEC NKLLTALNEC SQFLLALNEC MHLLDQKPGT 	LISDNNPMVV LIADSNPMVV LIADSNPMVV LLSDSNPMVV LLSDANPMVV LLSDANPMVV LVSDPNPVVV ALDDSNPLVI LLTDKAAVVV V. TEWGQVFILD TEWGQVFILD TEWGQVFILD TEWGQVFILD TEWGQVFILD NEWGRITILN TEWARIIILG TEWGQLNILE W
Arabidopsis thaliana 1 Rattus norvegicus Homo sapiens 1 Drosophila melanogaster Caenorhabditis elegans Plasmodium falciparum Schizosaccharomyces pombe Saccharomyces cerevisiae 1 Trypanosoma brucei Consensus Arabidopsis thaliana 1 Rattus norvegicus Homo sapiens 1 Drosophila melanogaster Caenorhabditis elegans Plasmodium falciparum Schizosaccharomyces pombe Saccharomyces cerevisiae 1 Trypanosoma brucei Consensus Arabidopsis thaliana 1 Rattus norvegicus Homo sapiens 1 Puesensus	LKDDDPYV LKDEDPYV LKDEDPYV LKDEDPYV LKDEDPYV LKDEDPYV LKDEHPYV LKDEHPYV LHDDNAYV VNDLDPYV YV ANAVAALAEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSE	RKTAAICVAK RKTAAVCVAK RKTAAVCVAK RKTAAVCVAK RKTAAVCVAK RKTAVICIAK RKAAAVCVVK RKTAVICVAK RKNAVIGIGK RK.AK QENSTSP SESHPNSN SESHPNSN SESHPNSN NEASQSGQP. NEQQ.T CENSNKSILK HDQDPEKG HNMDMDAVD. TTNAGLQ PREAENIVER DREAQSICER DREAQSICER	LFDINAELVE LHDINAQMVE LHDINAQMVE LYDISATMVE LYDISATMVE LYDISATMVE LYDISPKLVE MYDLDREYCA LFQLNKDLCV LFHNSSQLYE 	DRGFLEALKD DQGFLDSLRD DQGFLDSLRD DQGFLDQLKD EQ.FVELLND EEGFIDTLLD SNGFIEQLQA ELGVVEDLVN DQGFSTELLK  TKLLTALNEC NKLLTALNEC NKLLTALNEC NKLLTALNEC NKLLTALNEC NKLLTALNEC NKLLTALNEC NKLLTALNEC SQFLLALNEC MHLLDQKPGT  AVVLSAVKVL AVVLSAVKVL	LISDNNPMVV LIADSNPMVV LIADSNPMVV LLSDSNPMVV LLSDANPMVV LLSDANPMVV LLSDANPMVV LVSDPNPVVV ALDDSNPLVI LLTDKAAVVV V. TEWGQVFILD TEWGQVFILD TEWGQVFILD TEWGQVFILD TEWGQVFILD NEWGRITILN TEWARIIILG TEWGQLNILE W LSKYILLSGI MKFLELLPKD
Arabidopsis thaliana 1 Rattus norvegicus Homo sapiens 1 Drosophila melanogaster Caenorhabditis elegans Plasmodium falciparum Schizosaccharomyces pombe Saccharomyces cerevisiae 1 Trypanosoma brucei Consensus Arabidopsis thaliana 1 Rattus norvegicus Homo sapiens 1 Drosophila melanogaster Caenorhabditis elegans Plasmodium falciparum Schizosaccharomyces pombe Saccharomyces cerevisiae 1 Trypanosoma brucei Consensus Arabidopsis thaliana 1 Rattus norvegicus Homo sapiens 1 Drosophila melanogaster	LKDDDPYV LKDEDPYV LKDEDPYV LKDEDPYV LKDEDPYV LKDEDPYV LKDEHPYV LKDEHPYV LHDDNAYV VNDLDPYV YV ANAVAALAEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSE	RKTAAICVAK RKTAAVCVAK RKTAAVCVAK RKTAAVCVAK RKTAAVCVAK RKTAVICIAK RKAAAVCVVK RKTAVICVAK RKNAVIGIGK RK.AK QENSTSP SESHPNSN SESHPNSN SESHPNSN SESHPNSN NEASQSGQP. NEQQ.T CENSNKSILK HDQDPEKG HNMDMDAVD. TTNAGLQ PREAENIVER DREAQSICER EREAQSICER EREAQSICER	LFDINAELVE LHDINAQMVE LHDINAQMVE LYDISATMVE LYDISATMVE LHDMNPALVK LYDISPKLVE MYDLDREYCA LFQLNKDLCV LFHNSSQLYE 	DRGFLEALKD DQGFLDSLRD DQGFLDSLRD DQGFLDQLKD EQ.FVELLND EEGFIDTLLD SNGFIEQLQA ELGVVEDLVN DQGFSTELLK  TKLLTALNEC NKLLTALNEC NKLLTALNEC NKLLTALNEC NKLLTALNEC NKLLTALNEC NKLLTALNEC NKLLTALNEC NKLLTALNEC NKLLALNEC NKLLALNEC NKLLALNEC NKLLALNEC NKLLALNEC NKLLALNEC NKLLALNEC NKLLANEC NKLLANEC NKLLANEC NKLLANEC NKLLANEC NKLLANEC NKLLANEC NKLLANEC NKLLANEC NKLLANEC NKLLANEC NKLLANEC	LISDNNPMVV LIADSNPMVV LIADSNPMVV LLSDSNPMVV LLSDANPMVV LLSDANPMVV LLSDANPMVV LVSDPNPVVV ALDDSNPLVI LLTDKAAVVV V. TEWGQVFILD TEWGQVFILD TEWGQVFILD TEWGQVFILD TEWGQVFILD NEWGRITILN TEWARIIILG TEWGQLNILE W LSKYILLSGI MKFLELLPKD MKFLELLPKD
Arabidopsis thaliana 1 Rattus norvegicus Homo sapiens 1 Drosophila melanogaster Caenorhabditis elegans Plasmodium falciparum Schizosaccharomyces pombe Saccharomyces cerevisiae 1 Trypanosoma brucei Consensus Arabidopsis thaliana 1 Rattus norvegicus Homo sapiens 1 Drosophila melanogaster Caenorhabditis elegans Plasmodium falciparum Schizosaccharomyces pombe Saccharomyces cerevisiae 1 Trypanosoma brucei Consensus Arabidopsis thaliana 1 Rattus norvegicus Homo sapiens 1 Drosophila melanogaster Caenorhabditis elegans	LKDDDPYV LKDEDPYV LKDEDPYV LKDEDPYV LKDEDPYV LKDEDPYV LKDEHPYV LKDEHPYV LHDDNAYV VNDLDPYV YV ANAVAALAEI ANAVAALAEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVA	RKTAAICVAK RKTAAVCVAK RKTAAVCVAK RKTAAVCVAK RKTAAVCVAK RKTAVICIAK RKAAAVCVVK RKTAVICVAK RKNAVIGIGK RK.AK QENSTSP SESHPNSN SESHPNSN SESHPNSN SESHPNSN NEASQSGQP. NEQQ.T CENSNKSILK HDQDPEKG HNMDMDAVD. TTNAGLQ PREAENIVER DREAQSICER EREAQSICER EREAQSICER EREAQSICER	LFDINAELVE LHDINAQMVE LHDINAQMVE LYDISATMVE LYDISATMVE LYDISATMVE LYDISPKLVE MYDLDREYCA LFQLNKDLCV LFHNSSQLYE 	DRGFLEALKD DQGFLDSLRD DQGFLDSLRD DQGFLDQLKD EQ.FVELLND EEGFIDTLLD SNGFIEQLQA ELGVVEDLVN DQGFSTELLK  TKLLTALNEC NKLLTALNEC NKLLTALNEC NKLLTALNEC NKLLTALNEC NKLLTALNEC NKLLTALNEC NKLLTALNEC NKLLTALNEC NKLLAINEC NKLLAINEC NKLLANEC NKLLANEC NKLLANEC NKLLANEC NKLLANEC NKLLANEC NKLLANEC NKLLANEC NKLLANEC NKLLANEC NKLLANEC NKLLANEC NKLLANEC NKLLANEC NKLLANEC NKLLANEC NKLLANEC NKLLANEC NKLLANEC NKLLANEC NKLLANEC NKLLANEC NKLLANEC NKLLANEC NKLLANEC NKLLANEC	LISDNNPMVV LIADSNPMVV LIADSNPMVV LLSDSNPMVV LLSDANPMVV LLSDANPMVV LLSDANPMVV LVSDPNPVVV ALDDSNPLVI LLTDKAAVVV V. TEWGQVFILD TEWGQVFILD TEWGQVFILD TEWGQVFILD TEWGQVFILD TEWGQVFILD NEWGRITILN TEWARIIILG TEWGQLNILE W LSKYILLSGI MKFLELLPKD MKFLELLPKD MKLLEMLSSD
Arabidopsis thaliana 1 Rattus norvegicus Homo sapiens 1 Drosophila melanogaster Caenorhabditis elegans Plasmodium falciparum Schizosaccharomyces pombe Saccharomyces cerevisiae 1 Trypanosoma brucei Consensus Arabidopsis thaliana 1 Rattus norvegicus Homo sapiens 1 Drosophila melanogaster Caenorhabditis elegans Plasmodium falciparum Schizosaccharomyces pombe Saccharomyces cerevisiae 1 Trypanosoma brucei Consensus Arabidopsis thaliana 1 Rattus norvegicus Homo sapiens 1 Drosophila melanogaster Caenorhabditis elegans Plasmodium falciparum	LKDDDPYV LKDEDPYV LKDEDPYV LKDEDPYV LKDEDPYV LKDEDPYV LKDEHPYV LKDEHPYV LHDDNAYV VNDLDPYV YV ANAVAALAEI ANAVAALAEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSE	RKTAAICVAK RKTAAVCVAK RKTAAVCVAK RKTAAVCVAK RKTAAVCVAK RKTAVICIAK RKAAAVCVVK RKTAVICVAK RKNAVIGIGK RK.AK QENSTSP SESHPNSN SESHPNSN SESHPNSN NEASQSGQP. NEQQ.T CENSNKSILK HDQDPEKG HNMDMDAVD. TTNAGLQ PREAENIVER DREAQSICER EREAQSICER EREAQSICER ERETQNICER SKDAERVLER	LFDINAELVE LHDINAQMVE LHDINAQMVE LHDINAQMVE LYDISATMVE LHDMNPALVK LYDISPKLVE MYDLDREYCA LFQLNKDLCV LFHNSSQLYE 	DRGFLEALKD DQGFLDSLRD DQGFLDSLRD DQGFLDQLKD EQ.FVELLND EEGFIDTLLD SNGFIEQLQA ELGVVEDLVN DQGFSTELLK  TKLLTALNEC NKLLTALNEC NKLLTALNEC NKLLTALNEC NKLLTALNEC NKLLTALNEC NKLLTALNEC NKLLTALNEC NKLLTALNEC NKLLAINEC NKLLAINEC NKLLANEC NKLLANEC NKLLANEC NKLLANEC NKLLANEC NKLLANEC NKLLANEC NKLLANEC NKLLANEC NKLLANEC NKLLANEC NKLLANEC NKLLANEC NKLLANEC NKLLANEC NKLLANEC NKLLANEC NKLLANEC NKLLANEC NKLLANEC NKLLANEC NKLLANEC NKLLANEC NKLLANEC NKLLANEC NKLLANEC NKLLANEC NKLLANEC NKLLANEC NKLLANEC NKLLANEC	LISDNNPMVV LIADSNPMVV LIADSNPMVV LLSDSNPMVV LLSDANPMVV LLSDANPMVV LLSDANPMVV LLSDANPVVV ALDDSNPLVI LLTDKAAVVV V. TEWGQVFILD TEWGQVFILD TEWGQVFILD TEWGQVFILD TEWGQVFILD TEWGQVFILD NEWGRITILN TEWGQLNILE W LSKYILLSGI MKFLELLPKD MKFLELLPKD MKLLEMLSSD MKLIDMMPAD LCLLDKIN.D
Arabidopsis thaliana 1 Rattus norvegicus Homo sapiens 1 Drosophila melanogaster Caenorhabditis elegans Plasmodium falciparum Schizosaccharomyces pombe Saccharomyces cerevisiae 1 Trypanosoma brucei Consensus Arabidopsis thaliana 1 Rattus norvegicus Homo sapiens 1 Drosophila melanogaster Caenorhabditis elegans Plasmodium falciparum Schizosaccharomyces pombe Saccharomyces cerevisiae 1 Trypanosoma brucei Consensus Arabidopsis thaliana 1 Rattus norvegicus Homo sapiens 1 Drosophila melanogaster Caenorhabditis elegans Plasmodium falciparum Schizosaccharomyces pombe	LKDDDPYV LKDEDPYV LKDEDPYV LKDEDPYV LKDEDPYV LKDEDPYV LKDEHPYV LKDEHPYV LHDDNAYV VNDLDPYV YV ANAVAALAEI ANAVAALAEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSE	RKTAAICVAK RKTAAVCVAK RKTAAVCVAK RKTAAVCVAK RKTAAVCVAK RKTAVICIAK RKAAAVCVVK RKTAVICVAK RKNAVIGIGK RK.AK QENSTSP SESHPNSN SESHPNSN SESHPNSN NEASQSGQP. NEQQ.T CENSNKSILK HDQDPEKG HNMDMDAVD. TTNAGLQ PREAENIVER DREAQSICER DREAQSICER EREAQSICER ERETQNICER SKDAERVLER IKEAEYVCER	LFDINAELVE LHDINAQMVE LHDINAQMVE LYDISATMVE LYDISATMVE LYDISATMVE LYDISPKLVE MYDLDREYCA LFQLNKDLCV LFHNSSQLYE 	DRGFLEALKD DQGFLDSLRD DQGFLDSLRD DQGFLDQLKD EQ.FVELLND EEGFIDTLLD SNGFIEQLQA ELGVVEDLVN DQGFSTELLK  TKLLTALNEC NKLLTALNEC NKLLTALNEC NKLLTALNEC NKLLTALNEC NKLLTALNEC NKLLTALNEC NKLLTALNEC NKLLTALNEC NKLLAINEC NKLLAINEC NKLLANEC NKLLANEC NKLLANEC NKLLANEC NKLLANEC NKLLANEC NKLLANEC NKLLANEC NKLLANEC NKLLANEC NKLLANEC NKLLANEC NKLLANEC NKLLANEC NKLLANEC NKLLANEC NKLLANEC NKLLANEC NKLLANEC NKLLANEC NKLLANEC NKLLANEC NKLLANEC NKLLANEC NKLLANEC NKLLANEC NKLLANEC NKLLANEC NKLLANEC NKLLANEC NKLLANEC	LISDNNPMVV LIADSNPMVV LIADSNPMVV LLSDSNPMVV LLSDANPMVV LLSDANPMVV LLSDANPVVV ALDDSNPLVI LLTDKAAVVV V. TEWGQVFILD TEWGQVFILD TEWGQVFILD TEWGQVFILD TEWGQVFILD TEWGQVFILD TEWGQVFILD NEWGRITILN TEWARIIILG TEWGQLNILE W LSKYILLSGI MKFLELLPKD MKFLELLPKD MKLLEMLSSD MKLIDMMPAD LCLLDKIN.D MVHIPLFS
Arabidopsis thaliana 1 Rattus norvegicus Homo sapiens 1 Drosophila melanogaster Caenorhabditis elegans Plasmodium falciparum Schizosaccharomyces pombe Saccharomyces cerevisiae 1 Trypanosoma brucei Consensus Arabidopsis thaliana 1 Rattus norvegicus Homo sapiens 1 Drosophila melanogaster Caenorhabditis elegans Plasmodium falciparum Schizosaccharomyces pombe Saccharomyces cerevisiae 1 Trypanosoma brucei Consensus Arabidopsis thaliana 1 Rattus norvegicus Homo sapiens 1 Drosophila melanogaster Caenorhabditis elegans Plasmodium falciparum Schizosaccharomyces pombe Saccharomyces cerevisiae 1	LKDDDPYV LKDEDPYV LKDEDPYV LKDEDPYV LKDEDPYV LKDEDPYV LKDEHPYV LKDEHPYV LHDDNAYV VNDLDPYV YV ANAVAALAEI ANAVAALAEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVANANANANAVANANANANANAVANANANA	RKTAAICVAK RKTAAVCVAK RKTAAVCVAK RKTAAVCVAK RKTAAVCVAK RKTAVICIAK RKAAAVCVVK RKTAVICVAK RKNAVIGIGK RK.AK QENSTSP SESHPNSN SESHPNSN SESHPNSN NEASQSGQP. NEQQ.T CENSNKSILK HDQDPEKG HNMDMDAVD. TTNAGLQ PREAENIVER DREAQSICER DREAQSICER EREAQSICER EREAQSICER ERETQNICER SKDAERVLER IKEAEYVCER SLEAQDIIDR	LFDINAELVE LHDINAQMVE LHDINAQMVE LHDINAQMVE LYDISATMVE LHDMNPALVK LYDISPKLVE MYDLDREYCA LFQLNKDLCV LFHNSSQLYE 	DRGFLEALKD DQGFLDSLRD DQGFLDSLRD DQGFLDQLKD EQ.FVELLND EEGFIDTLLD SNGFIEQLQA ELGVVEDLVN DQGFSTELLK  TKLLTALNEC NKLLTALNEC NKLLTALNEC NKLLTALNEC NKLLTALNEC NKLLTALNEC NKLLTALNEC NKLLTALNEC NKLLTALNEC NKLLAINEC NKLLAINEC NKLLANEC NKLLAINEC NKLLANEC NKLLANEC NKLLANEC NKLLANEC NKLLANEC NKLLANEC NKLLANEC NKLLANEC NKLLANEC NKLLANEC NKLLANEC NKLLANEC NKLLANEC NKLLANEC NKLLANEC NKLLANEC NKLLANEC NKLLANEC NKLLANEC NKLLANEC NKLLANEC NKLLANEC NKLLANEC NKLLANEC NKLLANEC NKLLANEC NKLLANEC NKLLANEC NKLLANEC	LISDNNPMVV LIADSNPMVV LIADSNPMVV LLSDSNPMVV LLSDANPMVV LLSDANPMVV LLSDANPMVV LVSDPNPVVV ALDDSNPLVI LLTDKAAVVV V. TEWGQVFILD TEWGQVFILD TEWGQVFILD TEWGQVFILD TEWGQVFILD TEWGQVFILD TEWGQVFILD NEWGRITILN TEWARIIILG TEWGQLNILE W LSKYILLSGI MKFLELLPKD MKFLELLPKD MKLLEMLSSD MKLIDMMPAD LCLLDKIN.D MVHIPLFS VRNLPQIEYS
Arabidopsis thaliana 1 Rattus norvegicus Homo sapiens 1 Drosophila melanogaster Caenorhabditis elegans Plasmodium falciparum Schizosaccharomyces pombe Saccharomyces cerevisiae 1 Trypanosoma brucei Consensus Arabidopsis thaliana 1 Rattus norvegicus Homo sapiens 1 Drosophila melanogaster Caenorhabditis elegans Plasmodium falciparum Schizosaccharomyces pombe Saccharomyces cerevisiae 1 Trypanosoma brucei Consensus Arabidopsis thaliana 1 Rattus norvegicus Homo sapiens 1 Drosophila melanogaster Caenorhabditis elegans Plasmodium falciparum Schizosaccharomyces pombe Saccharomyces cerevisiae 1 Trypanosoma brucei Caenorhabditis elegans Plasmodium falciparum Schizosaccharomyces pombe Saccharomyces cerevisiae 1 Trypanosoma brucei	LKDDDPYV LKDEDPYV LKDEDPYV LKDEDPYV LKDEDPYV LKDEDPYV LKDEHPYV LKDEHPYV LHDDNAYV VNDLDPYV YV ANAVAALAEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSEI ANAVAALSE	RKTAAICVAK RKTAAVCVAK RKTAAVCVAK RKTAAVCVAK RKTAAVCVAK RKTAVICIAK RKAAAVCVVK RKTAVICVAK RKNAVIGIGK RK.AK QENSTSP SESHPNSN SESHPNSN SESHPNSN SESHPNSN NEASQSGQP. NEQQ.T CENSNKSILK HDQDPEKG HNMDMDAVD. TTNAGLQ PREAENIVER DREAQSICER EREAQSICER EREAQSICER EREAQSICER EREAQSICER SKDAERVLER IKEAEYVCER SLEAQDIDR DRFAEDVVSR	LFDINAELVE LHDINAQMVE LHDINAQMVE LHDINAQMVE LYDISATMVE LHDMNPALVK LYDISPKLVE MYDLDREYCA LFQLNKDLCV LFHNSSQLYE 	DRGFLEALKD DQGFLDSLRD DQGFLDSLRD DQGFLDQLKD EQ.FVELLND EEGFIDTLLD SNGFIEQLQA ELGVVEDLVN DQGFSTELLK  TKLLTALNEC NKLLTALNEC NKLLTALNEC NKLLTALNEC NKLLTALNEC NKLLTALNEC NKLLTALNEC NKLLTALNEC NKLLTALNEC NKLLTALNEC NKLLANEC NKLLANEC NKLLANEC NKLLANEC NKLLANEC NKLLANEC NKLLANEC NKLLANEC NKLLANEC NKLLANEC NKLLANEC NKLLANEC NKLLANEC NKLLANEC NKLLANEC NKLLANEC NKLLANEC NKLLANEC NKLLANEC NKLLANEC NKLLANEC NKLLANEC NKLLANEC NKLLANEC NKLLANEC NKLLANEC NKLLANEC NKLLANEC NKLLANEC NKLLANEC NKLLANEC NKLLANEC NKLLANEC NKLLANEC NKLLANEC	LISDNNPMVV LIADSNPMVV LIADSNPMVV LLSDSNPMVV LLSDANPMVV LLSDANPMVV LLSDANPMVV LLSDANPVVV ALDDSNPLVI LLTDKAAVVV V. TEWGQVFILD TEWGQVFILD TEWGQVFILD TEWGQVFILD TEWGQVFILD TEWGQVFILD TEWGQVFILD NEWGRITILN TEWARIIILG TEWGQLNILE W LSKYILLSGI MKFLELLPKD MKFLELLPKD MKLLEMLSSD MKLIDMMPAD LCLLDKIN.D MVHIPLFS VRNLPQIEYS INYLPHCG.

Arabidopsis thaliana 1	TDVIRNLCKK	MAPPLVTLLS	AEPEIQYVAL	RNINLIVQKR	.PTILAHEIK
Rattus norvegicus	SDYYNMLLKK	LAPPLVTLLS	GEPEVQYVAL	RNINLIVQKR	.PEILKQEIK
Homo sapiens 1	SDYYNMLLKK	LAPPLVTLLS	GEPEVQYVAL	RNINLIVQKR	.PEILKQEIK
Drosophila melanogaster	SDFCATLTKK	LAPPLVTLLS	SEPEVQYVAL	RNINLIVQKR	.PDILKHEMK
Caenorhabditis elegans	SDFITQLTKK	LAPPMVTLLS	AEPEIQYVAL	RNINLIVQKR	.PDILKQEMK
Plasmodium falciparum	KEFIKNVHKK	LSPSLVTLLS	AEPEIQYIAL	RNINLITQKL	.PNMLSDKIN
Schizosaccharomyces pombe	SDFTDFLYKK	MAPPLLTLLS	TDSEIQYVAL	RNINLILQKR	.PSIFDVKTR
Saccharomyces cerevisiae 1	SNSLIMKR	LSSAFVSLMS	TPPEMQYVAL	KNIRIILEKY	.PELLTKELR
Trypanosoma brucei	QSTVNEVGVR	INSALVTLSR	GDPEAQYVVC	KNIHALLVIF	.PNLLINNLD
Consensus			E.QY	.NI	. P
Arabidopsis thaliana 1	VFFCKYNDPI	YVKMEKLEIM	IKLASDRNID	QVLLEFK	EYATEVDVDF
Rattus norvegicus	VFFVKYNDPI	YVKLEKLDIM	IRLASQANIA	QVLAELK	EYATEVDVDF
Homo sapiens 1	VFFVKYNDPI	YVKLEKLDIM	IRLASQANIA	QVLAELK	EYATEVDVDF
Drosophila melanogaster	VFFVKYNDPI	YVKLEKLDIM	IRLANQSNIA	QVLSELK	EYATEVDVDF
Caenorhabditis elegans	VFFVKYNDPI	YVKMEKLDIM	IRLAQQNNIA	QVLSELK	EYATEVDVDF
Plasmodium falciparum	MFFCKYNEPA	YVKMEKLDII	IRLVSDKNVD	LVLYELK	EYSTEVDVEF
Schizosaccharomyces pombe	VF'F'CKYNDPL	YIKMEKLKII	TMLACDENIN	ETISELR	AYVSEVELEF
Saccharomyces cerevisiae 1	1FYVKFNDPL	YVKLEKIDIL	VRLVDPSNLK	QCILLLITELK	EYAMEYEPEF
Trypanosoma brucei	SFIVRFSDPP	YVKLEKLRLL	LKLVSNSSAN	GILKELE	EYSTEVDPFF
Consensus	P	.YEK		····ビ··	.YEF
Arabidopsis thaliana 1	VRKAVRAIGR	CAIKLERA	AERCISVLLE	LIKIKVNYVV	QEAIIVIKDI
Rattus norvegicus	VRKAVRAIGR	CAIKVEQS	AERCVSTLLD	LIQTKVNYVV	QEAIVVIRDI
Homo sapiens 1	VRKAVRAIGR	CAIKVEQS	AERCVSTLLD	LIQTKVNYVV	QEAIVVIRDI
Drosophila melanogaster	VRKAVRAIGR	CAIKVEPS	AERCVSTLLD	LIQTKVNYVV	QEAIVVIKDI
Caenorhabditis elegans	VRKSVRAIGR	CAIKVEAS	SERCVQTLLE	LIQTKVNYVV	QEAVVVIKDI
Plasmodium falciparum	VKKSVRAIGS	CAIKLPQS	SEKCINILLD	LIDTKINYVI	QECIVVIKDI
Schizosaccharomyces pombe	VKQTIKCLGD	VALKVPSV	INDCISIFLE	IYELNISYMV	QEVTVVMETV
Saccharomyces cerevisiae 1	VSRAIQALSQ	LGIKYAQESF	VSKVLDILLE	LLE.RQDTIK	DDCCISLCDL
Trypanosoma brucei	VEEVVKGIAE	LALKIDSV	AQSCVALLLR	IVK.NRPELL	PQVVTSCKNI
Consensus	V	K	L.	• • • • • • • • • • •	• • • • • • • • • • •
Arabidopsis thaliana 1	FRRYP	.NTYESIIAT	LCES.LDTLD	EPEAKASMIW	IIGEYAERID
Arabidopsis thaliana 1 Rattus norvegicus	FRRYP	.NTYESIIAT .NKYESIIAT	LCES.LDTLD LCEN.LDSLD	EPEAKASMIW EPDARAAMIW	IIGEYAERID IVGEYAERID
Arabidopsis thaliana 1 Rattus norvegicus Homo sapiens 1	FRRYP FRKYP FRKYP	.NTYESIIAT .NKYESIIAT .NKYESIIAT	LCES.LDTLD LCEN.LDSLD LCEN.LDSLD	EPEAKASMIW EPDARAAMIW EPDARAAMIW	IIGEYAERID IVGEYAERID IVGEYAERID
Arabidopsis thaliana 1 Rattus norvegicus Homo sapiens 1 Drosophila melanogaster	FRRYP FRKYP FRKYP FRKYP	.NTYESIIAT .NKYESIIAT .NKYESIIAT .NKYESIIST	LCES.LDTLD LCEN.LDSLD LCEN.LDSLD LCEN.LDTLD	EPEAKASMIW EPDARAAMIW EPDARAAMIW EPEARASMVW	IIGEYAERID IVGEYAERID IVGEYAERID IIGEYAERID
Arabidopsis thaliana 1 Rattus norvegicus Homo sapiens 1 Drosophila melanogaster Caenorhabditis elegans	FRRYP FRKYP FRKYP FRKYP	.NTYESIIAT .NKYESIIAT .NKYESIIAT .NKYESIIST .NRYESIISA	LCES.LDTLD LCEN.LDSLD LCEN.LDSLD LCEN.LDTLD LCEN.LDTLD	EPEAKASMIW EPDARAAMIW EPEARASMVW EPEARASMIW	IIGEYAERID IVGEYAERID IVGEYAERID IIGEYAERID IIGEYAERID
Arabidopsis thaliana 1 Rattus norvegicus Homo sapiens 1 Drosophila melanogaster Caenorhabditis elegans Plasmodium falciparum	FRRYP FRKYP FRKYP FRKYP FRKYP	.NTYESIIAT .NKYESIIAT .NKYESIIAT .NKYESIIST .NRYESIISA .NKYESIITI	LCES.LDTLD LCEN.LDSLD LCEN.LDSLD LCEN.LDTLD LCEN.LDTLD LCEN.LESLD	EPEAKASMIW EPDARAAMIW EPEARASMVW EPEARASMIW ESNAKASLIW	IIGEYAERID IVGEYAERID IVGEYAERID IIGEYAERID IIGEYAERID IIGEYVERID
Arabidopsis thaliana 1 Rattus norvegicus Homo sapiens 1 Drosophila melanogaster Caenorhabditis elegans Plasmodium falciparum Schizosaccharomyces pombe	FRRYP FRKYP FRKYP FRKYP FRKYP LRKYP	.NTYESIIAT .NKYESIIAT .NKYESIIAT .NKYESIIST .NRYESIISA .NKYESIITI .QKIDLLLPY	LCES.LDTLD LCEN.LDSLD LCEN.LDSLD LCEN.LDTLD LCEN.LDTLD LCEN.LESLD LSRV.IEELG	EPEAKASMIW EPDARAAMIW EPEARASMVW EPEARASMIW ESNAKASLIW DPRARSSMAW	IIGEYAERID IVGEYAERID IVGEYAERID IIGEYAERID IIGEYAERID IIGEYVERID ILGEFSHVIP
Arabidopsis thaliana 1 Rattus norvegicus Homo sapiens 1 Drosophila melanogaster Caenorhabditis elegans Plasmodium falciparum Schizosaccharomyces pombe Saccharomyces cerevisiae 1	FRRYP FRKYP FRKYP FRKYP FRKYP LRKYP LRHCPGNDKM	.NTYESIIAT .NKYESIIAT .NKYESIIAT .NKYESIIST .NRYESIISA .NKYESIITI .QKIDLLLPY AKQVCAVFNT	LCES.LDTLD LCEN.LDSLD LCEN.LDSLD LCEN.LDTLD LCEN.LDTLD LCEN.LESLD LSRV.IEELG WSNP.EVLLQ	EPEAKASMIW EPDARAAMIW EPEARASMVW EPEARASMIW ESNAKASLIW DPRARSSMAW SDIAKCNYVW	IIGEYAERID IVGEYAERID IVGEYAERID IIGEYAERID IIGEYAERID IIGEFSHVIP LLGQHPNNFS
Arabidopsis thaliana 1 Rattus norvegicus Homo sapiens 1 Drosophila melanogaster Caenorhabditis elegans Plasmodium falciparum Schizosaccharomyces pombe Saccharomyces cerevisiae 1 Trypanosoma brucei	FRRYP FRKYP FRKYP FRKYP FRKYP LRKYP LRHCPGNDKM TRKYP	.NTYESIIAT .NKYESIIAT .NKYESIIAT .NKYESIIST .NRYESIISA .NKYESIITI .QKIDLLLPY AKQVCAVFNT KLLVLGTL	LCES.LDTLD LCEN.LDSLD LCEN.LDSLD LCEN.LDTLD LCEN.LDTLD LCEN.LESLD LSRV.IEELG WSNP.EVLLQ ISECGADGVV	EPEAKASMIW EPDARAAMIW EPEARASMVW EPEARASMIW ESNAKASLIW DPRARSSMAW SDIAKCNYVW EEEAKVSLIW	IIGEYAERID IVGEYAERID IVGEYAERID IIGEYAERID IIGEYAERID IIGEFSHVIP LLGQHPNNFS MLGEFCEFVE
Arabidopsis thaliana 1 Rattus norvegicus Homo sapiens 1 Drosophila melanogaster Caenorhabditis elegans Plasmodium falciparum Schizosaccharomyces pombe Saccharomyces cerevisiae 1 Trypanosoma brucei Consensus	FRRYP FRKYP FRKYP FRKYP FRKYP LRKYP LRHCPGNDKM TRKYP .RP	.NTYESIIAT .NKYESIIAT .NKYESIIAT .NKYESIIST .NRYESIISA .NKYESIITI .QKIDLLPY AKQVCAVFNT KLLVLGTL	LCES.LDTLD LCEN.LDSLD LCEN.LDTLD LCEN.LDTLD LCEN.LDTLD LCEN.LESLD LSRV.IEELG WSNP.EVLLQ ISECGADGVV	EPEAKASMIW EPDARAAMIW EPEARASMVW EPEARASMIW ESNAKASLIW DPRARSSMAW SDIAKCNYVW EEEAKVSLIW	IIGEYAERID IVGEYAERID IIGEYAERID IIGEYAERID IIGEYAERID ILGEFSHVIP LLGQHPNNFS MLGEFCEFVE
Arabidopsis thaliana 1 Rattus norvegicus Homo sapiens 1 Drosophila melanogaster Caenorhabditis elegans Plasmodium falciparum Schizosaccharomyces pombe Saccharomyces cerevisiae 1 Trypanosoma brucei Consensus Arabidopsis thaliana 1	FRRYP FRKYP FRKYP FRKYP FRKYP LRKYP LRHCPGNDKM TRKYP .RP NADELLESFL	.NTYESIIAT .NKYESIIAT .NKYESIIAT .NKYESIIST .NRYESIISA .NKYESIITI .QKIDLLLPY AKQVCAVFNT KLLVLGTL 	LCES.LDTLD LCEN.LDSLD LCEN.LDSLD LCEN.LDTLD LCEN.LDTLD LCEN.LESLD LSRV.IEELG WSNP.EVLLQ ISECGADGVV 	EPEAKASMIW EPDARAAMIW EPEARASMVW EPEARASMIW ESNAKASLIW DPRARSSMAW SDIAKCNYVW EEEAKVSLIW 	IIGEYAERID IVGEYAERID IVGEYAERID IIGEYAERID IIGEYAERID IIGEFSHVIP LLGQHPNNFS MLGEFCEFVE 
Arabidopsis thaliana 1 Rattus norvegicus Homo sapiens 1 Drosophila melanogaster Caenorhabditis elegans Plasmodium falciparum Schizosaccharomyces pombe Saccharomyces cerevisiae 1 Trypanosoma brucei Consensus Arabidopsis thaliana 1 Rattus norvegicus	FRRYP FRKYP FRKYP FRKYP FRKYP LRKYP LRHCPGNDKM TRKYP .RP NADELLESFL NADELLESFL	.NTYESIIAT .NKYESIIAT .NKYESIIAT .NKYESIISA .NRYESIISA .NKYESIITI .QKIDLLLPY AKQVCAVFNT KLLVLGTL 	LCES.LDTLD LCEN.LDSLD LCEN.LDTLD LCEN.LDTLD LCEN.LESLD LSRV.IEELG WSNP.EVLLQ ISECGADGVV  QLQLLTATVK QLTLLTAIVK	EPEAKASMIW EPDARAAMIW EPEARASMVW EPEARASMIW ESNAKASLIW DPRARSSMAW SDIAKCNYVW EEEAKVSLIW  LFLKKPTEGP LFLKKPSE.T	IIGEYAERID IVGEYAERID IVGEYAERID IIGEYAERID IIGEYAERID IIGEFSHVIP LLGQHPNNFS MLGEFCEFVE  QQMIQVVLNN QELVQQVLSL
Arabidopsis thaliana 1 Rattus norvegicus Homo sapiens 1 Drosophila melanogaster Caenorhabditis elegans Plasmodium falciparum Schizosaccharomyces pombe Saccharomyces cerevisiae 1 Trypanosoma brucei Consensus Arabidopsis thaliana 1 Rattus norvegicus Homo sapiens 1	FRRYP FRKYP FRKYP FRKYP FRKYP LRKYP LRHCPGNDKM TRKYP .RP NADELLESFL NADELLESFL	.NTYESIIAT .NKYESIIAT .NKYESIIAT .NKYESIIST .NRYESIISA .NKYESIITI .QKIDLLLPY AKQVCAVFNT KLLVLGTL  ENFPEEPAQV EGFHDESTQV EGFHDESTQV	LCES.LDTLD LCEN.LDSLD LCEN.LDTLD LCEN.LDTLD LCEN.LESLD LSRV.IEELG WSNP.EVLLQ ISECGADGVV  QLQLLTATVK QLTLLTAIVK	EPEAKASMIW EPDARAAMIW EPEARASMVW EPEARASMIW ESNAKASLIW DPRARSSMAW SDIAKCNYVW EEEAKVSLIW  LFLKKPTEGP LFLKKPSE.T LFLKKPSE.T	IIGEYAERID IVGEYAERID IIGEYAERID IIGEYAERID IIGEYAERID ILGEFSHVIP LLGQHPNNFS MLGEFCEFVE  QQMIQVVLNN QELVQQVLSL QELVQQVLSL
Arabidopsis thaliana 1 Rattus norvegicus Homo sapiens 1 Drosophila melanogaster Caenorhabditis elegans Plasmodium falciparum Schizosaccharomyces pombe Saccharomyces cerevisiae 1 Trypanosoma brucei Consensus Arabidopsis thaliana 1 Rattus norvegicus Homo sapiens 1 Drosophila melanogaster	FRRYP FRKYP FRKYP FRKYP FRKYP LRKYP LRHCPGNDKM TRKYP .RP NADELLESFL NADELLESFL NADELLESFL NADELLESFL	.NTYESIIAT .NKYESIIAT .NKYESIIAT .NKYESIIST .NRYESIISA .NKYESIITI .QKIDLLLPY AKQVCAVFNT KLLVLGTL 	LCES.LDTLD LCEN.LDSLD LCEN.LDTLD LCEN.LDTLD LCEN.LESLD LSRV.IEELG WSNP.EVLLQ ISECGADGVV  QLQLLTATVK QLTLLTAIVK QLQLLTAVVK	EPEAKASMIW EPDARAAMIW EPEARASMVW EPEARASMIW ESNAKASLIW DPRARSSMAW SDIAKCNYVW EEEAKVSLIW  LFLKKPTEGP LFLKKPSE.T LFLKKPSE.T LFLKRPSD.T	IIGEYAERID IVGEYAERID IVGEYAERID IIGEYAERID IIGEYAERID ILGEFSHVIP LLGQHPNNFS MLGEFCEFVE  QQMIQVVLNN QELVQQVLSL QELVQQVLSL QELVQHVLSL
Arabidopsis thaliana 1 Rattus norvegicus Homo sapiens 1 Drosophila melanogaster Caenorhabditis elegans Plasmodium falciparum Schizosaccharomyces pombe Saccharomyces cerevisiae 1 Trypanosoma brucei Consensus Arabidopsis thaliana 1 Rattus norvegicus Homo sapiens 1 Drosophila melanogaster Caenorhabditis elegans	FRRYP FRKYP FRKYP FRKYP FRKYP LRKYP LRHCPGNDKM TRKYP .RP NADELLESFL NADELLESFL NADELLESFL NADELLESFL NADELLESFV	.NTYESIIAT .NKYESIIAT .NKYESIIAT .NKYESIISA .NRYESIISA .NKYESIITI .QKIDLLLPY AKQVCAVFNT KLLVLGTL  ENFPEEPAQV EGFHDESTQV EGFHDESTQV EGFHDESTQV EGFHDENTQV	LCES.LDTLD LCEN.LDSLD LCEN.LDTLD LCEN.LDTLD LCEN.LESLD LSRV.IEELG WSNP.EVLLQ ISECGADGVV  QLQLLTATVK QLTLLTAIVK QLQLLTAVVK QLQLLTAVVK	EPEAKASMIW EPDARAAMIW EPEARASMVW EPEARASMIW ESNAKASLIW DPRARSSMAW SDIAKCNYVW EEEAKVSLIW  LFLKKPTEGP LFLKKPSE.T LFLKKPSD.T LFLKRPGV.A	IIGEYAERID IVGEYAERID IVGEYAERID IIGEYAERID IIGEYAERID ILGEFSHVIP LLGQHPNNFS MLGEFCEFVE  QQMIQVVLNN QELVQQVLSL QELVQQVLSL QELVQHVLSL QALVQRVLSL
Arabidopsis thaliana 1 Rattus norvegicus Homo sapiens 1 Drosophila melanogaster Caenorhabditis elegans Plasmodium falciparum Schizosaccharomyces pombe Saccharomyces cerevisiae 1 Trypanosoma brucei Consensus Arabidopsis thaliana 1 Rattus norvegicus Homo sapiens 1 Drosophila melanogaster Caenorhabditis elegans Plasmodium falciparum	FRRYP FRKYP FRKYP FRKYP FRKYP LRKYP LRHCPGNDKM TRKYP .RP NADELLESFL NADELLESFL NADELLESFL NADELLESFV NADELLESFV	.NTYESIIAT .NKYESIIAT .NKYESIIAT .NKYESIISA .NRYESIISA .NKYESIITI .QKIDLLLPY AKQVCAVFNT KLLVLGTL  ENFPEEPAQV EGFHDESTQV EGFHDESTQV EGFHDENTQV EGFHDENTQV ENFSDEPYNV	LCES.LDTLD LCEN.LDSLD LCEN.LDTLD LCEN.LDTLD LCEN.LESLD LSRV.IEELG WSNP.EVLLQ ISECGADGVV  QLQLLTATVK QLTLLTAIVK QLQLLTAVVK QLQLLTAVVK QLQLLTAVVK	EPEAKASMIW EPDARAAMIW EPEARASMVW EPEARASMIW DPRARSSMAW SDIAKCNYVW EEEAKVSLIW  LFLKKPTEGP LFLKKPSE.T LFLKKPSE.T LFLKRPSD.T LFLKRPGV.A LFLKCSKN.T	IIGEYAERID IVGEYAERID IVGEYAERID IIGEYAERID IIGEYAERID ILGEFSHVIP LLGQHPNNFS MLGEFCEFVE  QQMIQVVLNN QELVQQVLSL QELVQQVLSL QELVQHVLSL QALVQRVLSL KDIITKVLKL
Arabidopsis thaliana 1 Rattus norvegicus Homo sapiens 1 Drosophila melanogaster Caenorhabditis elegans Plasmodium falciparum Schizosaccharomyces pombe Saccharomyces cerevisiae 1 Trypanosoma brucei Consensus Arabidopsis thaliana 1 Rattus norvegicus Homo sapiens 1 Drosophila melanogaster Caenorhabditis elegans Plasmodium falciparum Schizosaccharomyces pombe	FRRYP FRKYP FRKYP FRKYP FRKYP LRKYP LRHCPGNDKM TRKYP .RP NADELLESFL NADELLESFL NADELLESFL NADELLESFV NADELLDSFL TSSKLLSEMI	.NTYESIIAT .NKYESIIAT .NKYESIIAT .NKYESIISA .NRYESIISA .NKYESIITI .QKIDLLLPY AKQVCAVFNT KLLVLGTL  ENFPEEPAQV EGFHDESTQV EGFHDESTQV EGFHDENTQV EGFHDENTQV ENFSDEPYNV STMADEDLQI	LCES.LDTLD LCEN.LDSLD LCEN.LDTLD LCEN.LDTLD LCEN.LESLD LSRV.IEELG WSNP.EVLLQ ISECGADGVV  QLQLLTATVK QLTLLTAIVK QLQLLTAVVK QLQLLTAVVK QLQLLTAVVK QLQLLTAVVK	EPEAKASMIW EPDARAAMIW EPEARASMVW EPEARASMIW ESNAKASLIW DPRARSSMAW SDIAKCNYVW EEEAKVSLIW  LFLKKPTEGP LFLKKPSE.T LFLKKPSE.T LFLKRPSD.T LFLKRPGV.A LFLKCSKN.T LSLMNGKGND	IIGEYAERID IVGEYAERID IVGEYAERID IIGEYAERID IIGEYAERID IIGEFSHVIP LLGQHPNNFS MLGEFCEFVE  QQMIQVVLNN QELVQQVLSL QELVQQVLSL QELVQRVLSL QALVQRVLSL EELVQKVLNY
Arabidopsis thaliana 1 Rattus norvegicus Homo sapiens 1 Drosophila melanogaster Caenorhabditis elegans Plasmodium falciparum Schizosaccharomyces pombe Saccharomyces cerevisiae 1 Trypanosoma brucei Consensus Arabidopsis thaliana 1 Rattus norvegicus Homo sapiens 1 Drosophila melanogaster Caenorhabditis elegans Plasmodium falciparum Schizosaccharomyces pombe Saccharomyces cerevisiae 1	FRRYP FRKYP FRKYP FRKYP FRKYP LRKYP LRHCPGNDKM TRKYP .RP NADELLESFL NADELLESFL NADELLESFL NADELLESFL NADELLESFV NADELLDSFL TSSKLLSEMI DLESKINIFI	.NTYESIIAT .NKYESIIAT .NKYESIIAT .NKYESIIST .NRYESIISA .NKYESIITI .QKIDLLLPY AKQVCAVFNT KLLVLGTL  ENFPEEPAQV EGFHDESTQV EGFHDESTQV EGFHDESTQV EGFHDENTQV ENFSDEPYNV STMADEDLQI ENFVQEEALT	LCES.LDTLD LCEN.LDSLD LCEN.LDTLD LCEN.LDTLD LCEN.LESLD LSRV.IEELG WSNP.EVLLQ ISECGADGVV  QLQLLTATVK QLTLLTAIVK QLQLLTAVVK QLQLLTAVVK QLQLLTAVVK QLQLLTAVVK QLALLTAVVK QMSLLMTIVR	EPEAKASMIW EPDARAAMIW EPEARASMVW EPEARASMIW DPRARSSMAW SDIAKCNYVW EEEAKVSLIW  LFLKKPTEGP LFLKKPSE.T LFLKKPSE.T LFLKRPSD.T LFLKRPGV.A LFLKCSKN.T LSLMNGKGND LHATLTGS.	IIGEYAERID IVGEYAERID IVGEYAERID IIGEYAERID IIGEYAERID IIGEYAERID ILGEFSHVIP LLGQHPNNFS MLGEFCEFVE  QQMIQVVLNN QELVQQVLSL QELVQQVLSL QELVQQVLSL QALVQRVLSL KDIITKVLKL EELVQKVLNY MLQSVLEL
Arabidopsis thaliana 1 Rattus norvegicus Homo sapiens 1 Drosophila melanogaster Caenorhabditis elegans Plasmodium falciparum Schizosaccharomyces pombe Saccharomyces cerevisiae 1 Trypanosoma brucei Consensus Arabidopsis thaliana 1 Rattus norvegicus Homo sapiens 1 Drosophila melanogaster Caenorhabditis elegans Plasmodium falciparum Schizosaccharomyces pombe Saccharomyces cerevisiae 1 Trypanosoma brucei	FRRYP FRKYP FRKYP FRKYP FRKYP LRKYP LRHCPGNDKM TRKYP .RP NADELLESFL NADELLESFL NADELLESFL NADELLESFL NADELLESFV NADELLDSFL TSSKLLSEMI DLESKINIFI NGMDIIRKYI	.NTYESIIAT .NKYESIIAT .NKYESIIAT .NKYESIIST .NRYESIISA .NKYESIITI .QKIDLLLPY AKQVCAVFNT KLLVLGTL  ENFPEEPAQV EGFHDESTQV EGFHDESTQV EGFHDENTQV EGFHDENTQV EMFSDEPYNV STMADEDLQI ENFVQEEALT EELMLHEPPV	LCES.LDTLD LCEN.LDSLD LCEN.LDTLD LCEN.LDTLD LCEN.LESLD LSRV.IEELG WSNP.EVLLQ ISECGADGVV  QLQLLTATVK QLTLLTAIVK QLQLLTAVVK QLQLLTAVVK QLQLLTAVVK QLQLLTAVVK QLALLTAVVK QLSILSAVIK	EPEAKASMIW EPDARAAMIW EPDARAAMIW EPEARASMVW EPEARASMIW DPRARSSMAW SDIAKCNYVW EEEAKVSLIW  LFLKKPTEGP LFLKKPSE.T LFLKKPSE.T LFLKRPGV.A LFLKCSKN.T LSLMNGKGND LHATLTGS. MFLRDPQG.M	IIGEYAERID IVGEYAERID IVGEYAERID IIGEYAERID IIGEYAERID IIGEYAERID ILGEFSHVIP LLGQHPNNFS MLGEFCEFVE  QQMIQVVLNN QELVQQVLSL QELVQQVLSL QELVQQVLSL QALVQRVLSL KDIITKVLKL EELVQKVLNY MLQSVLEL EPTLNTVLDA
Arabidopsis thaliana 1 Rattus norvegicus Homo sapiens 1 Drosophila melanogaster Caenorhabditis elegans Plasmodium falciparum Schizosaccharomyces pombe Saccharomyces cerevisiae 1 Trypanosoma brucei Consensus Arabidopsis thaliana 1 Rattus norvegicus Homo sapiens 1 Drosophila melanogaster Caenorhabditis elegans Plasmodium falciparum Schizosaccharomyces pombe Saccharomyces cerevisiae 1 Trypanosoma brucei Consensus	FRRYP FRKYP FRKYP FRKYP FRKYP LRKYP LRHCPGNDKM TRKYP .RP NADELLESFL NADELLESFL NADELLESFL NADELLESFL NADELLESFL NADELLESFV NADELLESFV NADELLESFV NADELLESFV NADELLESFV NADELLESFV NADELLESFV NADELLESFV NADELLESFV NADELLESFV NADELLESFV NADELLESFV NADELLESFV NADELLESFV NADELLESFV NADELLESFV	.NTYESIIAT .NKYESIIAT .NKYESIIAT .NKYESIIST .NRYESIISA .NKYESIITI .QKIDLLLPY AKQVCAVFNT KLLVLGTL KLLVLGTL EGFHDESTQV EGFHDESTQV EGFHDESTQV EGFHDENTQV EGFHDENTQV STMADEDLQI ENFVQEEALT EELMLHEPPV	LCES.LDTLD LCEN.LDSLD LCEN.LDSLD LCEN.LDTLD LCEN.LESLD LSRV.IEELG WSNP.EVLLQ ISECGADGVV  QLQLLTATVK QLTLLTAIVK QLQLLTAVVK QLQLLTAVVK QLQLLTAVVK QLALLTAVVK QLSILSAVIK Q	EPEAKASMIW EPDARAAMIW EPDARAAMIW EPEARASMIW ESNAKASLIW DPRARSSMAW SDIAKCNYVW EEEAKVSLIW  LFLKKPTEGP LFLKKPSE.T LFLKKPSE.T LFLKRPSD.T LFLKRPSD.T LFLKRPSD.T LFLKCSKN.T LSLMNGKGND LHATLTGS MFLRDPQG.M	IIGEYAERID IVGEYAERID IVGEYAERID IIGEYAERID IIGEYAERID ILGEFSHVIP LLGQHPNNFS MLGEFCEFVE  QQMIQVVLNN QELVQQVLSL QELVQQVLSL QALVQRVLSL KDIITKVLKL EELVQKVLNY MLQSVLEL EPTLNTVLDA
Arabidopsis thaliana 1 Rattus norvegicus Homo sapiens 1 Drosophila melanogaster Caenorhabditis elegans Plasmodium falciparum Schizosaccharomyces pombe Saccharomyces cerevisiae 1 Trypanosoma brucei Consensus Arabidopsis thaliana 1 Rattus norvegicus Homo sapiens 1 Drosophila melanogaster Caenorhabditis elegans Plasmodium falciparum Schizosaccharomyces pombe Saccharomyces cerevisiae 1 Trypanosoma brucei Consensus Arabidopsis thaliana 1	FRRYP FRKYP FRKYP FRKYP FRKYP LRKYP LRHCPGNDKM TRKYP .RP NADELLESFL NADELLESFL NADELLESFL NADELLESFL NADELLESFV NADELLOSFL TSSKLLSEMI DLESKINIFI NGMDIIRKYI 	.NTYESIIAT .NKYESIIAT .NKYESIIAT .NKYESIISA .NRYESIISA .NKYESIITI .QKIDLLLPY AKQVCAVFNT KLLVLGTL 	LCES.LDTLD LCEN.LDSLD LCEN.LDSLD LCEN.LDTLD LCEN.LESLD LSRV.IEELG WSNP.EVLLQ ISECGADGVV  QLQLLTATVK QLTLLTAIVK QLQLLTAVVK QLQLLTAVVK QLQLLTAVVK QLQLLTAVVK QLALLTAVVK QLSILSAVIK Q LS	EPEAKASMIW EPDARAAMIW EPDARAAMIW EPEARASMVW EPEARASMIW DPRARSSMAW SDIAKCNYVW EEEAKVSLIW  LFLKKPTEGP LFLKKPSE.T LFLKRPSD.T LFLKRPGV.A LFLKCSKN.T LSLMNGKGND LHATLTGS MFLRDPQG.M 	IIGEYAERID IVGEYAERID IVGEYAERID IIGEYAERID IIGEYAERID IIGEYAERID ILGEFSHVIP LLGQHPNNFS MLGEFCEFVE  QQMIQVVLNN QELVQQVLSL QELVQQVLSL QELVQQVLSL QALVQRVLSL KDIITKVLKL EELVQKVLNY MLQSVLEL EPTLNTVLDA 
Arabidopsis thaliana 1 Rattus norvegicus Homo sapiens 1 Drosophila melanogaster Caenorhabditis elegans Plasmodium falciparum Schizosaccharomyces pombe Saccharomyces cerevisiae 1 Trypanosoma brucei Consensus Arabidopsis thaliana 1 Rattus norvegicus Homo sapiens 1 Drosophila melanogaster Caenorhabditis elegans Plasmodium falciparum Schizosaccharomyces pombe Saccharomyces cerevisiae 1 Trypanosoma brucei Consensus Arabidopsis thaliana 1 Rattus norvegicus	FRRYP FRKYP FRKYP FRKYP FRKYP LRKYP LRHCPGNDKM TRKYP .RP NADELLESFL NADELLESFL NADELLESFL NADELLDSFL TSSKLLSEMI DLESKINIFI NGMDIIRKYI  ATVETDNPDL ATQDSDNPDL	.NTYESIIAT .NKYESIIAT .NKYESIIAT .NKYESIIST .NRYESIISA .NKYESIITI .QKIDLLLPY AKQVCAVFNT KLLVLGTL 	LCES.LDTLD LCEN.LDSLD LCEN.LDSLD LCEN.LDTLD LCEN.LESLD LSRV.IEELG WSNP.EVLLQ ISECGADGVV  QLQLLTATVK QLTLLTAIVK QLQLLTAVVK QLQLLTAVVK QLQLLTAVVK QLQLLTAVVK QLALLTAVVK QLSILSAVIK Q LS	EPEAKASMIW EPDARAAMIW EPDARAAMIW EPEARASMVW EPEARASMIW DPRARSSMAW SDIAKCNYVW EEEAKVSLIW  LFLKKPTEGP LFLKKPSE.T LFLKRPSD.T LFLKRPGV.A LFLKCSKN.T LSLMNGKGND LHATLTGS MFLRDPQG.M 	IIGEYAERID IVGEYAERID IVGEYAERID IIGEYAERID IIGEYAERID IIGEYAERID ILGEFSHVIP LLGQHPNNFS MLGEFCEFVE  QQMIQVVLNN QELVQQVLSL QELVQQVLSL QELVQQVLSL QALVQRVLSL KDIITKVLKL EELVQKVLNY MLQSVLEL EPTLNTVLDA 
Arabidopsis thaliana 1 Rattus norvegicus Homo sapiens 1 Drosophila melanogaster Caenorhabditis elegans Plasmodium falciparum Schizosaccharomyces pombe Saccharomyces cerevisiae 1 Trypanosoma brucei Consensus Arabidopsis thaliana 1 Rattus norvegicus Homo sapiens 1 Drosophila melanogaster Caenorhabditis elegans Plasmodium falciparum Schizosaccharomyces pombe Saccharomyces cerevisiae 1 Trypanosoma brucei Consensus Arabidopsis thaliana 1 Rattus norvegicus Homo sapiens 1	FRRYP FRKYP FRKYP FRKYP FRKYP LRKYP LRHCPGNDKM TRKYP .RP NADELLESFL NADELLESFL NADELLESFL NADELLESFL NADELLDSFL TSSKLLSEMI DLESKINIFI NGMDIIRKYI  ATVETDNPDL ATQDSDNPDL	.NTYESIIAT .NKYESIIAT .NKYESIIAT .NKYESIISA .NRYESIISA .NKYESIITI .QKIDLLLPY AKQVCAVFNT KLLVLGTL  ENFPEEPAQV EGFHDESTQV EGFHDESTQV EGFHDENTQV EGFHDENTQV EMFSDEPYNV STMADEDLQI ENFVQEEALT EELMLHEPPV  RDRAYIYWRL RDRGYIYWRL	LCES.LDTLD LCEN.LDSLD LCEN.LDSLD LCEN.LDTLD LCEN.LDTLD LCEN.LESLD LSRV.IEELG WSNP.EVLLQ ISECGADGVV  QLQLLTATVK QLTLLTAIVK QLQLLTAVVK QLQLLTAVVK QLQLLTAVVK QLQLLTAVVK QLQLLTAVVK QLALLTAVVK QLSILSAVIK Q LS LS	EPEAKASMIW EPDARAAMIW EPDARAAMIW EPEARASMVW EPEARASMIW DPRARSSMAW SDIAKCNYVW EEEAKVSLIW  LFLKKPTEGP LFLKKPSE.T LFLKRPSD.T LFLKRPGV.A LFLKCSKN.T LSLMNGKGND LHATLTGS MFLRDPQG.M  TDPEAAKD TDPVTAKE TDPVTAKE	IIGEYAERID IVGEYAERID IVGEYAERID IIGEYAERID IIGEYAERID IIGEYAERID ILGEFSHVIP LLGQHPNNFS MLGEFCEFVE  QQMIQVVLNN QELVQQVLSL QELVQQVLSL QELVQQVLSL QALVQRVLSL KDIITKVLKL EELVQKVLNY MLQSVLEL EPTLNTVLDA  VVLAEKPVIT VVLSEKPLIS
Arabidopsis thaliana 1 Rattus norvegicus Homo sapiens 1 Drosophila melanogaster Caenorhabditis elegans Plasmodium falciparum Schizosaccharomyces pombe Saccharomyces cerevisiae 1 Trypanosoma brucei Consensus Arabidopsis thaliana 1 Rattus norvegicus Homo sapiens 1 Drosophila melanogaster Caenorhabditis elegans Plasmodium falciparum Schizosaccharomyces pombe Saccharomyces cerevisiae 1 Trypanosoma brucei Consensus Arabidopsis thaliana 1 Rattus norvegicus Homo sapiens 1 Drosophila melanogaster	FRRYP FRKYP FRKYP FRKYP FRKYP LRHCPGNDKM TRKYP .RP NADELLESFL NADELLESFL NADELLESFL NADELLESFL NADELLOSFL TSSKLLSEMI DLESKINIFI NGMDIIRKYI  ATVETDNPDL ATQDSDNPDL ATQDSDNPDL	.NTYESIIAT .NKYESIIAT .NKYESIIAT .NKYESIISA .NRYESIISA .NKYESIITI .QKIDLLLPY AKQVCAVFNT KLLVLGTL  ENFPEEPAQV EGFHDESTQV EGFHDESTQV EGFHDENTQV EGFHDENTQV EMFSDEPYNV STMADEDLQI ENFVQEEALT EELMLHEPPV  RDRAYIYWRL RDRGYIYWRL RDRGYIYWRL	LCES.LDTLD LCEN.LDSLD LCEN.LDSLD LCEN.LDTLD LCEN.LESLD LSRV.IEELG WSNP.EVLLQ ISECGADGVV  QLQLLTATVK QLTLLTAIVK QLQLLTAVVK QLQLLTAVVK QLQLLTAVVK QLQLLTAVVK QLALLTAVVK QLSILSAVIK Q LS LS	EPEAKASMIW EPDARAAMIW EPDARAAMIW EPEARASMVW EPEARASMIW DPRARSSMAW SDIAKCNYVW EEEAKVSLIW  LFLKKPTEGP LFLKKPSE.T LFLKRPGV.A LFLKCSKN.T LSLMNGKGND LHATLTGS MFLRDPQG.M  TDPEAAKD TDPVTAKE TDPVTAKE TDPVTAKE	IIGEYAERID IVGEYAERID IVGEYAERID IIGEYAERID IIGEYAERID IIGEYAERID ILGEFSHVIP LLGQHPNNFS MLGEFCEFVE  QQMIQVVLNN QELVQQVLSL QELVQQVLSL QELVQQVLSL QELVQRVLSL KDIITKVLKL EELVQKVLNY MLQSVLEL EPTLNTVLDA  VVLAEKPVIT VVLSEKPLIS VVLSEKPLIS
Arabidopsis thaliana 1 Rattus norvegicus Homo sapiens 1 Drosophila melanogaster Caenorhabditis elegans Plasmodium falciparum Schizosaccharomyces pombe Saccharomyces cerevisiae 1 Trypanosoma brucei Consensus Arabidopsis thaliana 1 Rattus norvegicus Homo sapiens 1 Drosophila melanogaster Caenorhabditis elegans Plasmodium falciparum Schizosaccharomyces pombe Saccharomyces cerevisiae 1 Trypanosoma brucei Consensus Arabidopsis thaliana 1 Rattus norvegicus Homo sapiens 1 Drosophila melanogaster Caenorhabditis elegans	FRRYP FRKYP FRKYP FRKYP FRKYP LRKYP LRHCPGNDKM TRKYP .RP NADELLESFL NADELLESFL NADELLESFL NADELLESFL NADELLDSFL TSSKLLSEMI DLESKINIFI NGMDIIRKYI  ATVETDNPDL ATQDSDNPDL ATQDSDNPDL	.NTYESIIAT .NKYESIIAT .NKYESIIAT .NKYESIISA .NRYESIISA .NKYESIITI .QKIDLLLPY AKQVCAVFNT KLLVLGTL  ENFPEEPAQV EGFHDESTQV EGFHDESTQV EGFHDENTQV EGFHDENTQV EMFSDEPYNV STMADEDLQI ENFVQEEALT EELMLHEPPV  RDRAYIYWRL RDRGYIYWRL RDRGFIYWRL	LCES.LDTLD LCEN.LDSLD LCEN.LDSLD LCEN.LDTLD LCEN.LESLD LSRV.IEELG WSNP.EVLLQ ISECGADGVV  QLQLLTATVK QLTLLTAIVK QLQLLTAVVK QLQLLTAVVK QLQLLTAVVK QLQLLTAVVK QLQLLTAVVK QLALLTAVVK QLSILSAVIK Q LS LS LS	EPEAKASMIW EPDARAAMIW EPDARAAMIW EPEARASMVW EPEARASMIW DPRARSSMAW SDIAKCNYVW EEEAKVSLIW  LFLKKPTEGP LFLKKPSE.T LFLKRPGV.A LFLKRPGV.A LFLKCSKN.T LSLMNGKGND LHATLTGS MFLRDPQG.M  TDPEAAKD TDPVTAKE TDPVTAKE TDPVTAKE ADPAAKKN	IIGEYAERID IVGEYAERID IVGEYAERID IIGEYAERID IIGEYAERID IIGEYAERID ILGEFSHVIP LLGQHPNNFS MLGEFCEFVE  QQMIQVVLNN QELVQQVLSL QELVQQVLSL QELVQQVLSL QELVQQVLSL QELVQRVLSL KDIITKVLKL EELVQKVLNY MLQSVLEL EPTLNTVLDA  VVLAEKPVIT VVLSEKPLIS VVLSEKPLIS
Arabidopsis thaliana 1 Rattus norvegicus Homo sapiens 1 Drosophila melanogaster Caenorhabditis elegans Plasmodium falciparum Schizosaccharomyces pombe Saccharomyces cerevisiae 1 Trypanosoma brucei Consensus Arabidopsis thaliana 1 Rattus norvegicus Homo sapiens 1 Drosophila melanogaster Caenorhabditis elegans Plasmodium falciparum Schizosaccharomyces pombe Saccharomyces cerevisiae 1 Trypanosoma brucei Consensus Arabidopsis thaliana 1 Rattus norvegicus Homo sapiens 1 Drosophila melanogaster Caenorhabditis elegans Plasmodium falciparum	FRRYP FRKYP FRKYP FRKYP FRKYP LRKYP LRHCPGNDKM TRKYP .RP NADELLESFL NADELLESFL NADELLESFL NADELLESFL NADELLESFL NADELLESFV NADELLDSFL TSSKLLSEMI DLESKINIFI NGMDIIRKYI  ATVETDNPDL ATQDSDNPDL ATQDSDNPDL STEESDNPDL	.NTYESIIAT .NKYESIIAT .NKYESIIAT .NKYESIISA .NRYESIISA .NKYESIITI .QKIDLLLPY AKQVCAVFNT KLLVLGTL  ENFPEEPAQV EGFHDESTQV EGFHDESTQV EGFHDENTQV EGFHDENTQV EMFSDEPYNV STMADEDLQI ENFVQEEALT EELMLHEPPV  RDRAYIYWRL RDRGYIYWRL RDRGFIYWRL RDRGFIYWRL	LCES.LDTLD LCEN.LDSLD LCEN.LDTLD LCEN.LDTLD LCEN.LESLD LSRV.IEELG WSNP.EVLLQ ISECGADGVV  QLQLLTATVK QLTLLTAIVK QLQLLTAVVK QLQLLTAVVK QLQLLTAVVK QLQLLTAVVK QLQLLTAVVK QLALLTAVVK QLSILSAVIK Q LS LS LS	EPEAKASMIW EPDARAAMIW EPDARAAMIW EPEARASMVW EPEARASMIW DPRARSSMAW SDIAKCNYVW EEEAKVSLIW  LFLKKPTEGP LFLKKPSE.T LFLKRPGV.A LFLKRPGV.A LFLKCSKN.T LSLMNGKGND LHATLTGS MFLRDPQG.M  TDPEAAKD TDPVTAKE TDPVTAKE TDPVTAKE ADPAAKKN KNIDVAKK	IIGEYAERID IVGEYAERID IVGEYAERID IIGEYAERID IIGEYAERID IIGEYAERID ILGEFSHVIP LLGQHPNNFS MLGEFCEFVE  QQMIQVVLNN QELVQQVLSL QELVQQVLSL QELVQQVLSL QELVQQVLSL QELVQQVLSL QELVQQVLSL QELVQQVLSL QELVQQVLSL QELVQQVLSL VULY VVLSEV EPTLNTVLDA  VVLAEKPVIT VVLSEKPLIS VVLSEKPLIS VVLADKPPIQ
Arabidopsis thaliana 1 Rattus norvegicus Homo sapiens 1 Drosophila melanogaster Caenorhabditis elegans Plasmodium falciparum Schizosaccharomyces pombe Saccharomyces cerevisiae 1 Trypanosoma brucei Consensus Arabidopsis thaliana 1 Rattus norvegicus Homo sapiens 1 Drosophila melanogaster Caenorhabditis elegans Plasmodium falciparum Schizosaccharomyces pombe Saccharomyces cerevisiae 1 Trypanosoma brucei Consensus Arabidopsis thaliana 1 Rattus norvegicus Homo sapiens 1 Drosophila melanogaster Caenorhabditis elegans Plasmodium falciparum Schizosaccharomyces pombe	FRRYP FRKYP FRKYP FRKYP FRKYP LRHCPGNDKM TRKYP .RP NADELLESFL NADELLESFL NADELLESFL NADELLESFL NADELLESFL NADELLESFV NADELLDSFL TSSKLLSEMI DLESKINIFI NGMDIIRKYI  ATVETDNPDL ATQDSDNPDL ATQDSDNPDL ATQDSDNPDL ATQDSDNPDL ATQDSDNPDL ATQDSDNPDL ATQDSNPDL ATQDSNPDL	.NTYESIIAT .NKYESIIAT .NKYESIIAT .NKYESIIST .NRYESIISA .NKYESIITI .QKIDLLLPY AKQVCAVFNT KLLVLGTL  ENFPEEPAQV EGFHDESTQV EGFHDESTQV EGFHDENTQV EGFHDENTQV EMFSDEPYNV STMADEDLQI ENFVQEEALT EELMLHEPPV  RDRAYIYWRL RDRGYIYWRL RDRGFIYWRL RDRGFIYWRL RDRGFIYWRL RDRAFAYQRL	LCES.LDTLD LCEN.LDSLD LCEN.LDSLD LCEN.LDTLD LCEN.LESLD LSRV.IEELG WSNP.EVLLQ ISECGADGVV  QLQLLTATVK QLTLLTAIVK QLQLLTAVVK QLQLLTAVVK QLQLLTAVVK QLQLLTAVVK QLQLLTAVVK QLALLTAVVK QLSILSAVIK Q LS LS LS LS LS	EPEAKASMIW EPDARAAMIW EPDARAAMIW EPEARASMVW EPEARASMIW DPRARSSMAW SDIAKCNYVW EEEAKVSLIW  LFLKKPTEGP LFLKKPSE.T LFLKRPGV.A LFLKRPGV.A LFLKCSKN.T LSLMNGKGND LHATLTGS MFLRDPQG.M  TDPEAAKD TDPVTAKE TDPVTAKE TDPVTAKE ADPAAKK KNIDVAKK ENVRKAQK	IIGEYAERID IVGEYAERID IVGEYAERID IIGEYAERID IIGEYAERID IIGEYAERID ILGEFSHVIP LLGQHPNNFS MLGEFCEFVE  QQMIQVVLNN QELVQQVLSL QELVQQVLSL QELVQQVLSL QELVQQVLSL QELVQQVLSL QELVQQVLSL QELVQQVLSL QELVQVLSL VULY VVLSEV EPTLNTVLDA  VVLAEKPVIT VVLSEKPLIS VVLSEKPLIS VVLADKPLIS IVLADKPPIQ IVCCEKPSVS
Arabidopsis thaliana 1 Rattus norvegicus Homo sapiens 1 Drosophila melanogaster Caenorhabditis elegans Plasmodium falciparum Schizosaccharomyces pombe Saccharomyces cerevisiae 1 Trypanosoma brucei Consensus Arabidopsis thaliana 1 Rattus norvegicus Homo sapiens 1 Drosophila melanogaster Caenorhabditis elegans Plasmodium falciparum Schizosaccharomyces pombe Saccharomyces cerevisiae 1 Trypanosoma brucei Consensus Arabidopsis thaliana 1 Rattus norvegicus Homo sapiens 1 Drosophila melanogaster Caenorhabditis elegans Plasmodium falciparum Schizosaccharomyces pombe Saccharomyces cerevisiae 1	FRRYP FRKYP FRKYP FRKYP FRKYP LRHCPGNDKM TRKYP .RP NADELLESFL NADELLESFL NADELLESFL NADELLESFL NADELLESFL NADELLESFV NADELLDSFL TSSKLLSEMI DLESKINIFI NGMDIIRKYI  ATVETDNPDL ATQDSDNPDL ATQDSDNPDL ATQDSDNPDL STEESDNPDL AINQSSNQDL ATQQTHELDV	.NTYESIIAT .NKYESIIAT .NKYESIIAT .NKYESIIST .NRYESIISA .NKYESIITI .QKIDLLLPY AKQVCAVFNT KLLVLGTL  ENFPEEPAQV EGFHDESTQV EGFHDESTQV EGFHDENTQV EGFHDENTQV EMFSDEPYNV STMADEDLQI ENFVQEEALT EELMLHEPPV  RDRAYIYWRL RDRGYIYWRL RDRGFIYWRL RDRGFIYWRL RDRGFIYWRL RDRAFAYQRL RDMAMMYWRC	LCES.LDTLD LCEN.LDSLD LCEN.LDSLD LCEN.LDTLD LCEN.LESLD LSRV.IEELG WSNP.EVLLQ ISECGADGVV  QLQLLTATVK QLTLLTAIVK QLQLLTAVVK QLQLLTAVVK QLQLLTAVVK QLQLLTAVVK QLQLLTAVVK QLALLTAVVK QLSILSAVIK Q LS LS LS LS LS LS LS	EPEAKASMIW EPDARAAMIW EPDARAAMIW EPEARASMVW EPEARASMIW DPRARSSMAW SDIAKCNYVW EEEAKVSLIW  LFLKKPTEGP LFLKKPSE.T LFLKRPGV.A LFLKRPGV.A LFLKCSKN.T LSLMNGKGND LHATLTGS. MFLRDPQG.M  TDPEAAKD TDPVTAKE TDPVTAKE TDPVTAKE TDPVTAKE TDPVAAKE ADPAAAKN KNIDVAKK ENVRKAQK .PNNESLVND	IIGEYAERID IVGEYAERID IVGEYAERID IIGEYAERID IIGEYAERID IIGEYAERID ILGEFSHVIP LLGQHPNNFS MLGEFCEFVE  QQMIQVVLNN QELVQQVLSL QELVQQVLSL QELVQQVLSL QELVQQVLSL QELVQQVLSL QELVQQVLSL QELVQQVLSL QELVQVLSL VULY VVLSEV EPTLNTVLDA  VVLAEKPVIT VVLSEKPLIS VVLSEKPLIS VVLADKPLIS IVLADKPPIQ IVCCEKPSVS LCQNKLPMIS
Arabidopsis thaliana 1 Rattus norvegicus Homo sapiens 1 Drosophila melanogaster Caenorhabditis elegans Plasmodium falciparum Schizosaccharomyces pombe Saccharomyces cerevisiae 1 Trypanosoma brucei Consensus Arabidopsis thaliana 1 Rattus norvegicus Homo sapiens 1 Drosophila melanogaster Caenorhabditis elegans Plasmodium falciparum Schizosaccharomyces pombe Saccharomyces cerevisiae 1 Trypanosoma brucei Consensus Arabidopsis thaliana 1 Rattus norvegicus Homo sapiens 1 Drosophila melanogaster Caenorhabditis elegans Plasmodium falciparum Schizosaccharomyces pombe Saccharomyces cerevisiae 1 Trypanosoma brucei	FRRYP FRKYP FRKYP FRKYP FRKYP LRHCPGNDKM TRKYP .RP NADELLESFL NADELLESFL NADELLESFL NADELLESFL NADELLESFL NADELLESFV NADELLDSFL TSSKLLSEMI DLESKINIFI NGMDIIRKYI  ATVETDNPDL ATQDSDNPDL ATQDSDNPDL ATQDSDNPDL STEESDNPDL AINQSSNQDL ATQQTHELDV LTTQSSDPDI	.NTYESIIAT .NKYESIIAT .NKYESIIAT .NKYESIIST .NRYESIISA .NKYESIITI .QKIDLLLPY AKQVCAVFNT KLLVLGTL  ENFPEEPAQV EGFHDESTQV EGFHDESTQV EGFHDENTQV EGFHDENTQV EMFSDEPYNV STMADEDLQI ENFVQEEALT EELMLHEPPV  RDRAYIYWRL RDRGYIYWRL RDRGFIYWRL RDRGFIYWRL RDRGFIYWRL RDRAFAYQRL RDRAFAYQRL RDMAMMYWRC RDRAYAYWRL	LCES.LDTLD LCEN.LDSLD LCEN.LDSLD LCEN.LDTLD LCEN.LDTLD LCEN.LESLD LSRV.IEELG WSNP.EVLLQ ISECGADGVV  QLQLLTATVK QLTLLTAIVK QLQLLTAVVK QLQLLTAVVK QLQLLTAVVK QLQLLTAVVK QLQLLTAVVK QLQLLTAVVK QLQLLTAVVK QLQLLTAVVK QLQLLTAVVK QLQLLTAVVK QLQLLTAVVK QLQLLTAVVK QLQLLTAVVK QLQLLTAVVK QLQLLTAVVK QLQLLTAVVK QLQLLTAVVK QLQLLTAVVK QLQLLTAVVK QLQLLTAVVK QLQLLTAVVK QLQLLTAVVK QLQLLTAVVK QLQLLTAVVK QLQLLTAVVK QLQLLTAVVK QLQLLTAVVK QLQLLTAVVK QLQLLTAVVK QLQLLTAVVK QLQLLTAVVK QLQLLTAVVK QLQLLTAVVK QLQLLTAVVK QLQLLTAVVK QLQLLTAVVK QLQLLTAVVK QLQLLTAVVK QLQLLTAVVK QLQLLTAVVK QLQLLTAVVK QLQLLTAVVK QLQLLTAVVK QLQLLTAVVK QLQLLTAVVK QLQLLTAVVK QLQLLTAVVK QLQLLTAVVK QLQLLTAVVK QLQLLTAVVK QLQLLTAVVK QLQLLTAVVK QLQLLTAVVK QLQLLTAVVK QLQLLTAVVK QLQLLTAVVK QLQLLTAVVK QLQLLTAVVK QLQLLTAVVK QLQLLTAVVK QLQLLTAVVK QLQLLTAVVK QLQLLTAVVK QLQLLTAVVK QLQLLTAVVK QLQLLTAVVK QLQLLTAVVK QLQLLTAVVK QLQLLTAVVK QLQLLTAVVK QLQLLTAVVK QLQLLTAVVK QLQLLTAVVK QLALLTAVVK QLALLTAVVK QLSI QLSI LS	EPEAKASMIW EPDARAAMIW EPDARAAMIW EPEARASMVW EPEARASMVW DPRARSSMAW SDIAKCNYVW EEEAKVSLIW  LFLKKPTEGP LFLKKPSE.T LFLKRPGV.A LFLKRPGV.A LFLKCSKN.T LSLMNGKGND LHATLTGS MFLRDPQG.M  TDPEAAKD TDPVTAKE TDPVTAKE TDPVTAKE TDPVTAKE TDPVTAKE TDPVAAKE ADPAAAKN KNIDVAKK ENVRKAQK .PNNESLVND .GIGVAKMKE	IIGEYAERID IVGEYAERID IVGEYAERID IIGEYAERID IIGEYAERID IIGEYAERID IIGEYAERID ILGEFSHVIP LLGQHPNNFS MLGEFCEFVE  QQMIQVVLNN QELVQQVLSL QELVQQVLSL QELVQQVLSL QELVQQVLSL QELVQQVLSL QELVQQVLSL QELVQQVLSL QELVQQVLSL QELVQQVLSL VULY VVLSE VULSE VVLAEKPVIT VVLSEKPLIS VVLSEKPLIS VVLAEKPLIS IVLADKPPIQ IVCCEKPSVS LCQNKLPMIS IVHGHHAAVA

Arabidopsis thaliana 1	DDSNQLDPSL	LDELLANIST	LSSVYHKPPE	AFVTRLKTTV	QKTEDEDY
Rattus norvegicus Homo sapiens 1	EETDLIEPTL EETDLIEPTL	LDELICHIGS LDELICHIGS	LASVYHKPPN LASVYHKPPN	AFVEGSHGIH AFVEGSHGIH	RKHLPIHHGS RKHLPIHHGS
Drosophila melanogaster	EETDLLEPTL	LDELICHISS	LASVYHKPPT	AFVEGRGAGV	RKSLPNRAAG
Caenorhabditis elegans	EETDLLEPSL	LEOLVCHIGT	LASVYHKPPS	AFIDPAKAPL	ROINPIPAAK
Plasmodium falciparum	EENKITDTKV	LNKLIKNISM	LSSVYHKLPE	TFISKKNSYS	LNSDNNNDHM
Schizosaccharomyces pombe Saccharomyces cerevisiae 1	YNNN.LPEAL NTLEKFSPEV	LDALLCEITT LEKLLMELGT	LASVYHKLPE ISSIYFKPDS	SFIGQGKFGA NRRKGKKYVQ	DAIQRRAV NIVKGKHIEE
Trypanosoma brucei	VESTFSDAMT	MGDLLKVYQH	GCSGYSQDPP	SRFSHPTASS	LRTGNDEEEE
Consensus					
Arabidopsis thaliana 1	VEGSETG	YPEASG	NPVDGAASPS	ATTGYVTKLA	A.APAPVP
Rattus norvegicus	TDAGDSP.VG	TTTATNL	EQPQVIPSQG	DLLGDLLNLD	LGPPVNVP
Homo sapiens 1	TDAGDSP.VG	TTTATNL	EQPQVIPSQG	DLLGDLLNLD	LGPPVNVP
Drosophila melanogaster	SAAGAE	QAENAAG	SEAMVIPNQE	SLIGDLLSMD	INAPAMPS
Caenorhabditis elegans	FGSSLLDTSS	TPNAARNGSA	AAPTVIPSQD	QVIADLLSLD	LNAPAASANT
Plasmodium falciparum	QDDH		YDDDDYDKDN	HVLKIKKQMD	KQKYDSYS
Schizosaccharomyces pombe	EELN	IEEAN	VHEAIEKG	ANVENLLDLD	FTDPGATS
Saccharomyces cerevisiae 1	LES		.MAKNEISSK	ANDDVLLDFD	ERDDVTNT
Trypanosoma brucei	DEEAE	PQ	SSEPQVGSTE	AAQPSLFDFG	PPAASSCRRD
Consensus					
Arabidopsis thaliana 1		DLLGDL	MG		
Rattus norvegicus	QVSSMQMGAV	DLLGGGLDSL	LGSDLGGGIG	GSPAVGQSFI	PSS
Homo sapiens 1	QVSSMQMGAV	DLLGGGLDSL	VG	QSFI	PSS
Drosophila melanogaster	APAATSNV	DLLGGGLDIL	LG		GP
Caenorhabditis elegans	GAFGGAMSGT	TSMGG.LDDL	LG.LGGDPMP	AAPTNSASYN	PFDGLGGLGG
Plasmodium falciparum					
Schizosaccharomyces pombe					
Saccharomyces cerevisiae 1					
Trypanosoma brucei	QNNAAAGAAA	TSHRDPLEDL	LG		GG
Consensus					
conscisus					
Arabidopsis thaliana 1	SDN	AAIL			H
Arabidopsis thaliana 1 Rattus norvegicus	SDN VPATFAPSPT	AAIL PAVVSSGLND	LFELSTGIGM	APGGYVAPKA	H VWLPAVKAKG
Arabidopsis thaliana 1 Rattus norvegicus Homo sapiens 1	SDN VPATFAPSPT VPATFAPSPT	AAIL PAVVSSGLND PAVVSSGLND	LFELSTGIGM	APGGYVAPKA APGGYVAPKA	H VWLPAVKAKG VWLPAVKAKG
Arabidopsis thaliana 1 Rattus norvegicus Homo sapiens 1 Drosophila melanogaster	SDN VPATFAPSPT VPATFAPSPT .PAEAAPGGA	AAIL PAVVSSGLND PAVVSSGLND TSLLGD	LFELSTGIGM LFELSTGIGM IFGLGGAT	APGGYVAPKA APGGYVAPKA LSVGVQIPKV	H VWLPAVKAKG VWLPAVKAKG TWLPAEKGKG
Arabidopsis thaliana 1 Rattus norvegicus Homo sapiens 1 Drosophila melanogaster Caenorhabditis elegans	SDN VPATFAPSPT VPATFAPSPT .PAEAAPGGA AAPAAPPSQQ	AAIL PAVVSSGLND PAVVSSGLND TSLLGD PASIG.GLAE	LFELSTGIGM LFELSTGIGM IFGLGGAT IFGSGGFG	APGGYVAPKA APGGYVAPKA LSVGVQIPKV GSSGITYPKE	H VWLPAVKAKG VWLPAVKAKG TWLPAEKGKG LWLDASKAMG
Arabidopsis thaliana 1 Rattus norvegicus Homo sapiens 1 Drosophila melanogaster Caenorhabditis elegans Plasmodium falciparum	SDN VPATFAPSPT VPATFAPSPT .PAEAAPGGA AAPAAPPSQQ SDN	AAIL PAVVSSGLND PAVVSSGLND TSLLGD PASIG.GLAE KKSN	LFELSTGIGM LFELSTGIGM IFGLGG.AT IFGSGG.FG	APGGYVAPKA APGGYVAPKA LSVGVQIPKV GSSGITYPKE	H VWLPAVKAKG VWLPAVKAKG TWLPAEKGKG LWLDASKAMG HSKS.S
Arabidopsis thaliana 1 Rattus norvegicus Homo sapiens 1 Drosophila melanogaster Caenorhabditis elegans Plasmodium falciparum Schizosaccharomyces pombe	SDN VPATFAPSPT VPATFAPSPT .PAEAAPGGA AAPAAPPSQQ SDN ASDS	AAIL PAVVSSGLND PAVVSSGLND TSLLGD PASIG.GLAE KKSN PITS	LFELSTGIGM LFELSTGIGM IFGLGGAT IFGSGGFG	APGGYVAPKA APGGYVAPKA LSVGVQIPKV GSSGITYPKE	H VWLPAVKAKG VWLPAVKAKG TWLPAEKGKG LWLDASKAMG HSKS.S AQPQS.G
Arabidopsis thaliana 1 Rattus norvegicus Homo sapiens 1 Drosophila melanogaster Caenorhabditis elegans Plasmodium falciparum Schizosaccharomyces pombe Saccharomyces cerevisiae 1	SDN VPATFAPSPT VPATFAPSPT .PAEAAPGGA AAPAAPPSQQ SDN ASDS NA	AAIL PAVVSSGLND PAVVSSGLND TSLLGD PASIG.GLAE KKSN PITS GMLN	LFELSTGIGM LFELSTGIGM IFGLGG.AT IFGSGG.FG	APGGYVAPKA APGGYVAPKA LSVGVQIPKV GSSGITYPKE	H VWLPAVKAKG VWLPAVKAKG TWLPAEKGKG LWLDASKAMG HSKS.S AQPQS.G TLTTLG
Arabidopsis thaliana 1 Rattus norvegicus Homo sapiens 1 Drosophila melanogaster Caenorhabditis elegans Plasmodium falciparum Schizosaccharomyces pombe Saccharomyces cerevisiae 1 Trypanosoma brucei	SDN VPATFAPSPT VPATFAPSPT .PAEAAPGGA AAPAAPPSQQ SDN ASDS NA LPAAPPKP	AAIL PAVVSSGLND PAVVSSGLND TSLLGD PASIG.GLAE KKSN PITS GMLN VVQQASTLDD	LFELSTGIGM LFELSTGIGM IFGLGG.AT IFGSGG.FG  LFSSREEKVN	APGGYVAPKA APGGYVAPKA LSVGVQIPKV GSSGITYPKE  APNPQLLPHR	H VWLPAVKAKG VWLPAVKAKG TWLPAEKGKG LWLDASKAMG HSKS.S AQPQS.G TLTTLG SSSLYVPFPL
Arabidopsis thaliana 1 Rattus norvegicus Homo sapiens 1 Drosophila melanogaster Caenorhabditis elegans Plasmodium falciparum Schizosaccharomyces pombe Saccharomyces cerevisiae 1 Trypanosoma brucei Consensus	SDN VPATFAPSPT VPATFAPSPT .PAEAAPGGA AAPAAPPSQQ SDN ASDS NA .LPAAPPKP	AAIL PAVVSSGLND PAVVSSGLND TSLLGD PASIG.GLAE KKSN PITS GMLN VVQQASTLDD	LFELSTGIGM LFELSTGIGM IFGLGG.AT IFGSGG.FG  LFSSREEKVN	APGGYVAPKA APGGYVAPKA LSVGVQIPKV GSSGITYPKE  APNPQLLPHR	H VWLPAVKAKG VWLPAVKAKG TWLPAEKGKG LWLDASKAMG HSKS.S AQPQS.G TLTTLG SSSLYVPFPL 
Arabidopsis thaliana 1 Rattus norvegicus Homo sapiens 1 Drosophila melanogaster Caenorhabditis elegans Plasmodium falciparum Schizosaccharomyces pombe Saccharomyces cerevisiae 1 Trypanosoma brucei Consensus	SDN VPATFAPSPT VPATFAPSPT .PAEAAPGGA AAPAAPPSQQ ASDS NA .LPAAPPKP 	AAIL PAVVSSGLND PAVVSSGLND TSLLGD PASIG.GLAE KKSN PITS GMLN VVQQASTLDD	LFELSTGIGM LFELSTGIGM IFGLGG.AT IFGSGG.FG  LFSSREEKVN	APGGYVAPKA APGGYVAPKA LSVGVQIPKV GSSGITYPKE  APNPQLLPHR	H VWLPAVKAKG VWLPAVKAKG TWLPAEKGKG LWLDASKAMG HSKS.S AQPQS.G TLTTLG SSSLYVPFPL 
Arabidopsis thaliana 1 Rattus norvegicus Homo sapiens 1 Drosophila melanogaster Caenorhabditis elegans Plasmodium falciparum Schizosaccharomyces pombe Saccharomyces cerevisiae 1 Trypanosoma brucei Consensus Arabidopsis thaliana 1	SDN VPATFAPSPT VPATFAPSPT .PAEAAPGGA AAPAAPPSQQ ASDS NA .LPAAPPKP 	AAIL PAVVSSGLND PAVVSSGLND TSLLGD PASIG.GLAE KKSN PITS GMLN VVQQASTLDD D	LFELSTGIGM LFELSTGIGM IFGLGG.AT IFGSGG.FG  LFSSREEKVN	APGGYVAPKA APGGYVAPKA LSVGVQIPKV GSSGITYPKE  APNPQLLPHR	H VWLPAVKAKG VWLPAVKAKG TWLPAEKGKG LWLDASKAMG HSKS.S AQPQS.G TLTTLG SSSLYVPFPL SVQQ
Arabidopsis thaliana 1 Rattus norvegicus Homo sapiens 1 Drosophila melanogaster Caenorhabditis elegans Plasmodium falciparum Schizosaccharomyces pombe Saccharomyces cerevisiae 1 Trypanosoma brucei Consensus Arabidopsis thaliana 1 Rattus norvegicus	SDN VPATFAPSPT VPATFAPSPT .PAEAAPGGA AAPAAPPSQQ ASDS NA .LPAAPPKP LEISGTFTHR LEISGTFTHR	AAIL PAVVSSGLND PAVVSSGLND TSLLGD PASIG.GLAE KKSN PITS GMLN VVQQASTLDD D QGHIYMEMNF	LFELSTGIGM LFELSTGIGM IFGLGG.AT IFGSGG.FG  LFSSREEKVN  TNKALQHMTD	APGGYVAPKA APGGYVAPKA LSVGVQIPKV GSSGITYPKE  APNPQLLPHR  FAIQFNKNSF	H VWLPAVKAKG VWLPAVKAKG TWLPAEKGKG LWLDASKAMG HSKS.S AQPQS.G TLTTLG SSSLYVPFPL  SVQQ GVIPSTPLAI
Arabidopsis thaliana 1 Rattus norvegicus Homo sapiens 1 Drosophila melanogaster Caenorhabditis elegans Plasmodium falciparum Schizosaccharomyces pombe Saccharomyces cerevisiae 1 Trypanosoma brucei Consensus Arabidopsis thaliana 1 Rattus norvegicus Homo sapiens 1 Drosophila melanogastor	SDN VPATFAPSPT VPATFAPSPT .PAEAAPGGA AAPAAPPSQQ ASDS NA .LPAAPPKP  LEISGTFTHR LEISGTFTHR LEISGTFTHR	AAIL PAVVSSGLND PAVVSSGLND TSLLGD PASIG.GLAE KKSN PITS GMLN VVQQASTLDD D QGHIYMEMNF QGHIYMEMNF NGEVEMDMTI	LFELSTGIGM LFELSTGIGM IFGLGG.AT IFGSGG.FG  LFSSREEKVN  TNKALQHMTD TNKALQHMTD	APGGYVAPKA APGGYVAPKA LSVGVQIPKV GSSGITYPKE  APNPQLLPHR  FAIQFNKNSF FAIQFNKNSF	H VWLPAVKAKG VWLPAVKAKG TWLPAEKGKG LWLDASKAMG HSKS.S AQPQS.G TLTTLG SSSLYVPFPL  GVIPSTPLAI GVIPSTPLAI CLVDASDMOA
Arabidopsis thaliana 1 Rattus norvegicus Homo sapiens 1 Drosophila melanogaster Caenorhabditis elegans Plasmodium falciparum Schizosaccharomyces pombe Saccharomyces cerevisiae 1 Trypanosoma brucei Consensus Arabidopsis thaliana 1 Rattus norvegicus Homo sapiens 1 Drosophila melanogaster	SDN VPATFAPSPT VPATFAPSPT .PAEAAPGGA AAPAAPPSQQ ASDS NA .LPAAPPKP  LEISGTFTHR LEISGTFTHR LEIQGTFSRR MOVECTEVPP	AAIL PAVVSSGLND PAVVSSGLND TSLLGD PASIG.GLAE KKSN PITS GMLN VVQQASTLDD D QGHIYMEMNF QGHIYMEMNF NGEVFMDMTL CCKIEMEMTI	LFELSTGIGM LFELSTGIGM IFGLGG.AT IFGSGG.FG  LFSSREEKVN  TNKALQHMTD TNKALQHMTD TNKAMQPMTN	APGGYVAPKA APGGYVAPKA LSVGVQIPKV GSSGITYPKE  APNPQLLPHR  FAIQFNKNSF FAIQFNKNSF FAIQFNKNSF	H VWLPAVKAKG VWLPAVKAKG TWLPAEKGKG LWLDASKAMG HSKS.S AQPQS.G TLTTLG SSSLYVPFPL  GVIPSTPLAI GVIPSTPLAI GLVPASPMQA CLIDVFOVMD
Arabidopsis thaliana 1 Rattus norvegicus Homo sapiens 1 Drosophila melanogaster Caenorhabditis elegans Plasmodium falciparum Schizosaccharomyces pombe Saccharomyces cerevisiae 1 Trypanosoma brucei Consensus Arabidopsis thaliana 1 Rattus norvegicus Homo sapiens 1 Drosophila melanogaster Caenorhabditis elegans Plasmodium falciparum	SDN VPATFAPSPT VPATFAPSPT .PAEAAPGGA AAPAAPPSQQ ASDS NA .LPAAPPKP  LEISGTFTHR LEISGTFTHR LEIQGTFSRR MQVEGTFVRR	AAIL PAVVSSGLND PAVVSSGLND TSLLGD PASIG.GLAE KKSN PITS GMLN VVQQASTLDD D QGHIYMEMNF QGHIYMEMNF NGEVFMDMTL GGKIFMEMTI SDEFINDLDD	LFELSTGIGM LFELSTGIGM IFGLGG.AT IFGSGG.FG  LFSSREEKVN  TNKALQHMTD TNKALQHMTD TNKALQHMTD TNKAMQPMTN TNRAMQAISG	APGGYVAPKA APGGYVAPKA LSVGVQIPKV GSSGITYPKE  APNPQLLPHR  FAIQFNKNSF FAIQFNKNSF FAIQFNKNSF FAIQLNKNSF	H VWLPAVKAKG VWLPAVKAKG TWLPAEKGKG LWLDASKAMG HSKS.S AQPQS.G TLTTLG SSSLYVPFPL  SVQQ GVIPSTPLAI GVIPSTPLAI GLVPASPMQA GLIPVEQVNP
Arabidopsis thaliana 1 Rattus norvegicus Homo sapiens 1 Drosophila melanogaster Caenorhabditis elegans Plasmodium falciparum Schizosaccharomyces pombe Saccharomyces cerevisiae 1 Trypanosoma brucei Consensus Arabidopsis thaliana 1 Rattus norvegicus Homo sapiens 1 Drosophila melanogaster Caenorhabditis elegans Plasmodium falciparum Schizosaccharomyces pombe	SDN VPATFAPSPT VPATFAPSPT .PAEAAPGGA AAPAAPPSQQ ASDS NA .LPAAPPKP  LEISGTFTHR LEISGTFTHR LEIQGTFSRR MQVEGTFVRR SDSYNNS	AAIL PAVVSSGLND PAVVSSGLND TSLLGD PASIG.GLAE KKSN PITS GMLN VVQQASTLDD D QGHIYMEMNF QGHIYMEMNF NGEVFMDMTL GGKIFMEMTI SDEFNNDIDD AMDLFMAFFA	LFELSTGIGM LFELSTGIGM IFGLGG.AT IFGSGG.FG  LFSSREEKVN  TNKALQHMTD TNKALQHMTD TNKALQHMTD TNKAMQPMTN TNRAMQAISG ADDS.	APGGYVAPKA APGGYVAPKA LSVGVQIPKV GSSGITYPKE APNPQLLPHR FAIQFNKNSF FAIQFNKNSF FAIQFNKNSF FALQFNKNSF KKSM	H VWLPAVKAKG VWLPAVKAKG TWLPAEKGKG LWLDASKAMG HSKS.S AQPQS.G TLTTLG SSSLYVPFPL SVQQ GVIPSTPLAI GVIPSTPLAI GLIPSTPLAI GLIPVEQVNP DLIGLNDDES
Arabidopsis thaliana 1 Rattus norvegicus Homo sapiens 1 Drosophila melanogaster Caenorhabditis elegans Plasmodium falciparum Schizosaccharomyces pombe Saccharomyces cerevisiae 1 Trypanosoma brucei Consensus Arabidopsis thaliana 1 Rattus norvegicus Homo sapiens 1 Drosophila melanogaster Caenorhabditis elegans Plasmodium falciparum Schizosaccharomyces pombe Saccharomyces cerevisiae 1	SDN VPATFAPSPT VPATFAPSPT .PAEAAPGGA AAPAAPPSQQ ASDS NA .LPAAPPKP  LEISGTFTHR LEISGTFTHR LEIQGTFSRR MQVEGTFVRR SDSYNNS SNS DLDLEDEG	AAIL PAVVSSGLND PAVVSSGLND TSLLGD PASIG.GLAE KKSN PITS GMLN VVQQASTLDD D QGHIYMEMNF QGHIYMEMNF NGEVFMDMTL GGKIFMEMTI SDEFNNDIDD AMDLFMAFEA PSEDATOINT	LFELSTGIGM LFELSTGIGM IFGLGG.AT IFGSGG.FG  LFSSREEKVN  TNKALQHMTD TNKALQHMTD TNKALQHMTD TNKAMQPMTN TNRAMQAISG ADDS. PS N	APGGYVAPKA APGGYVAPKA LSVGVQIPKV GSSGITYPKE APNPQLLPHR FAIQFNKNSF FAIQFNKNSF FAIQFNKNSF FALQFNKNSF KKSM	H VWLPAVKAKG VWLPAVKAKG TWLPAEKGKG LWLDASKAMG HSKS.S AQPQS.G TLTTLG SSSLYVPFPL SVQQ GVIPSTPLAI GVIPSTPLAI GLIPVEQVNP DLIGLNDDES 
Arabidopsis thaliana 1 Rattus norvegicus Homo sapiens 1 Drosophila melanogaster Caenorhabditis elegans Plasmodium falciparum Schizosaccharomyces pombe Saccharomyces cerevisiae 1 Trypanosoma brucei Consensus Arabidopsis thaliana 1 Rattus norvegicus Homo sapiens 1 Drosophila melanogaster Caenorhabditis elegans Plasmodium falciparum Schizosaccharomyces pombe Saccharomyces cerevisiae 1 Trypanosoma brucei	SDN VPATFAPSPT VPATFAPSPT .PAEAAPGGA AAPAAPPSQQ SDN NA LPAAPPKP  LEISGTFTHR LEISGTFTHR LEIQGTFSRR MQVEGTFVRR SDSYNNS SNS .DLDDLFDFG LDCVDGLCFS	AAIL PAVVSSGLND PAVVSSGLND TSLLGD PASIG.GLAE KKSN PITS GMLN VVQQASTLDD D QGHIYMEMNF QGHIYMEMNF NGEVFMDMTL GGKIFMEMTI SDEFNNDIDD AMDLFMAFEA PSEDATQINT RPGSFECFLF	LFELSTGIGM LFELSTGIGM IFGLGG.AT IFGSGG.FG  LFSSREEKVN  TNKALQHMTD TNKALQHMTD TNKALQHMTD TNKAMQPMTN TNRAMQAISG ADDS. PS N	APGGYVAPKA APGGYVAPKA LSVGVQIPKV GSSGITYPKE  APNPQLLPHR  FAIQFNKNSF FAIQFNKNSF FAIQFNKNSF FAIQLNKNSF FALQFNKNSF LLCREWRRRS	H VWLPAVKAKG VWLPAVKAKG TWLPAEKGKG LWLDASKAMG HSKS.S AQPQS.G TLTTLG SSSLYVPFPL  SVQQ GVIPSTPLAI GVIPSTPLAI GLIPVEQVNP DLIGLNDDES  AKKKEDKSKW
Arabidopsis thaliana 1 Rattus norvegicus Homo sapiens 1 Drosophila melanogaster Caenorhabditis elegans Plasmodium falciparum Schizosaccharomyces pombe Saccharomyces cerevisiae 1 Trypanosoma brucei Consensus Arabidopsis thaliana 1 Rattus norvegicus Homo sapiens 1 Drosophila melanogaster Caenorhabditis elegans Plasmodium falciparum Schizosaccharomyces pombe Saccharomyces cerevisiae 1 Trypanosoma brucei	SDN VPATFAPSPT VPATFAPSPT .PAEAAPGGA AAPAAPPSQQ SDN NA LPAAPPKP  LEISGTFTHR LEISGTFTHR LEIQGTFSRR MQVEGTFVRR SDSYNNS SNS .DLDDLFDFG LDCVDGLCFS	AAIL PAVVSSGLND PAVVSSGLND TSLLGD PASIG.GLAE KKSN GMLN VVQQASTLDD D QGHIYMEMNF QGHIYMEMNF NGEVFMDMTL GGKIFMEMTI SDEFNNDIDD AMDLFMAFEA PSEDATQINT RPGSFECFLF	LFELSTGIGM LFELSTGIGM IFGLGG.AT IFGSGG.FG  LFSSREEKVN  TNKALQHMTD TNKALQHMTD TNKALQHMTD TNRAMQAISG ADDS. PS N	APGGYVAPKA APGGYVAPKA LSVGVQIPKV GSSGITYPKE  APNPQLLPHR  FAIQFNKNSF FAIQFNKNSF FAIQLNKNSF FAIQLNKNSF FALQFNKNSF LLCREWRRRS	H VWLPAVKAKG VWLPAVKAKG TWLPAEKGKG LWLDASKAMG HSKS.S AQPQS.G TLTTLG SSSLYVPFPL  SVQQ GVIPSTPLAI GVIPSTPLAI GLIPVEQVNP DLIGLNDDES  AKKKEDKSKW
Arabidopsis thaliana 1 Rattus norvegicus Homo sapiens 1 Drosophila melanogaster Caenorhabditis elegans Plasmodium falciparum Schizosaccharomyces pombe Saccharomyces cerevisiae 1 Trypanosoma brucei Consensus Arabidopsis thaliana 1 Rattus norvegicus Homo sapiens 1 Drosophila melanogaster Caenorhabditis elegans Plasmodium falciparum Schizosaccharomyces pombe Saccharomyces cerevisiae 1 Trypanosoma brucei Consensus	SDN VPATFAPSPT VPATFAPSPT .PAEAAPGGA AAPAAPPSQQ SDN NA LPAAPPKP  LEISGTFTHR LEISGTFTHR LEIQGTFSRR MQVEGTFVRR SDSYNNS SNS .DLDDLFDFG LDCVDGLCFS 	AAIL PAVVSSGLND PAVVSSGLND TSLLGD PASIG.GLAE KKSN GMLN VVQQASTLDD D QGHIYMEMNF QGHIYMEMNF NGEVFMDMTL GGKIFMEMTI SDEFNNDIDD AMDLFMAFEA PSEDATQINT RPGSFECFLF 	LFELSTGIGM LFELSTGIGM IFGLGG.AT IFGSGG.FG  LFSSREEKVN  TNKALQHMTD TNKALQHMTD TNKALQHMTD TNKAMQPMTN TNRAMQAISG ADDS. PS FYPYCCSLSL	APGGYVAPKA APGGYVAPKA LSVGVQIPKV GSSGITYPKE APNPQLLPHR FAIQFNKNSF FAIQFNKNSF FAIQLNKNSF FAIQLNKNSF FALQFNKNSF LLCREWRRRS	H VWLPAVKAKG VWLPAVKAKG TWLPAEKGKG LWLDASKAMG HSKS.S AQPQS.G TLTTLG SSSLYVPFPL  SVQQ GVIPSTPLAI GVIPSTPLAI GLIPVEQVNP DLIGLNDDES  AKKKEDKSKW
Arabidopsis thaliana 1 Rattus norvegicus Homo sapiens 1 Drosophila melanogaster Caenorhabditis elegans Plasmodium falciparum Schizosaccharomyces pombe Saccharomyces cerevisiae 1 Trypanosoma brucei Consensus Arabidopsis thaliana 1 Rattus norvegicus Homo sapiens 1 Drosophila melanogaster Caenorhabditis elegans Plasmodium falciparum Schizosaccharomyces pombe Saccharomyces cerevisiae 1 Trypanosoma brucei Consensus Arabidopsis thaliana 1	SDN VPATFAPSPT VPATFAPSPT .PAEAAPGGA AAPAAPPSQQ SDN ASDS NA LPAAPPKP  LEISGTFTHR LEISGTFTHR LEIQGTFSRR MQVEGTFVRR SDSYNNS .DLDDLFDFG LDCVDGLCFS 	AAIL PAVVSSGLND PAVVSSGLND TSLLGD PASIG.GLAE KKSN GMLN VVQQASTLDD D QGHIYMEMNF QGHIYMEMNF NGEVFMDMTL GGKIFMEMTI SDEFNNDIDD AMDLFMAFEA PSEDATQINT RPGSFECFLF  R	LFELSTGIGM LFELSTGIGM IFGLGG.AT IFGSGG.FG  LFSSREEKVN  TNKALQHMTD TNKALQHMTD TNKALQHMTD TNKAMQPMTN TNRAMQAISG ADDS. PS FYPYCCSLSL ITSGSA	APGGYVAPKA APGGYVAPKA LSVGVQIPKV GSSGITYPKE APNPQLLPHR FAIQFNKNSF FAIQFNKNSF FAIQLNKNSF FAIQLNKNSF FALQFNKNSF KKSM SM LLCREWRRRS SATRSICQDN	H VWLPAVKAKG VWLPAVKAKG TWLPAEKGKG LWLDASKAMG HSKS.S AQPQS.G TLTTLG SSSLYVPFPL  SVQQ GVIPSTPLAI GVIPSTPLAI GLIPVEQVNP DLIGLNDDES  AKKKEDKSKW
Arabidopsis thaliana 1 Rattus norvegicus Homo sapiens 1 Drosophila melanogaster Caenorhabditis elegans Plasmodium falciparum Schizosaccharomyces pombe Saccharomyces cerevisiae 1 Trypanosoma brucei Consensus Arabidopsis thaliana 1 Rattus norvegicus Homo sapiens 1 Drosophila melanogaster Caenorhabditis elegans Plasmodium falciparum Schizosaccharomyces pombe Saccharomyces cerevisiae 1 Trypanosoma brucei Consensus Arabidopsis thaliana 1 Rattus norvegicus	SDN VPATFAPSPT VPATFAPSPT .PAEAAPGGA AAPAAPPSQQ ASDS NA LPAAPPKP  LEISGTFTHR LEISGTFTHR LEIQGTFSRR MQVEGTFVRR SDSYNNS .DLDDLFDFG LDCVDGLCFS  .KLIRP.CSC HTPLMPNQSI	AAIL PAVVSSGLND PAVVSSGLND TSLLGD PASIG.GLAE KKSN GMLN VVQQASTLDD D QGHIYMEMNF QGHIYMEMNF NGEVFMDMTL GGKIFMEMTI SDEFNNDIDD AMDLFMAFEA PSEDATQINT RPGSFECFLF  R	LFELSTGIGM LFELSTGIGM IFGLGG.AT IFGSGG.FG  LFSSREEKVN  TNKALQHMTD TNKALQHMTD TNKALQHMTD TNKAMQPMTN TNRAMQAISG ADDS. PS FYPYCCSLSL ITSGSA TLGPVMKMEP	APGGYVAPKA APGGYVAPKA LSVGVQIPKV GSSGITYPKE  APNPQLLPHR  FAIQFNKNSF FAIQFNKNSF FAIQLNKNSF FALQFNKNSF KKSM  LLCREWRRRS  SATRSICQDN LNNLQVAVKN	H VWLPAVKAKG VWLPAVKAKG TWLPAEKGKG LWLDASKAMG HSKS.S AQPQS.G TLTTLG SSSLYVPFPL  SVQQ GVIPSTPLAI GVIPSTPLAI GLIPVEQVNP DLIGLNDDES  AKKKEDKSKW  N.IDVFYFSC
Arabidopsis thaliana 1 Rattus norvegicus Homo sapiens 1 Drosophila melanogaster Caenorhabditis elegans Plasmodium falciparum Schizosaccharomyces pombe Saccharomyces cerevisiae 1 Trypanosoma brucei Consensus Arabidopsis thaliana 1 Rattus norvegicus Homo sapiens 1 Drosophila melanogaster Caenorhabditis elegans Plasmodium falciparum Schizosaccharomyces pombe Saccharomyces cerevisiae 1 Trypanosoma brucei Consensus Arabidopsis thaliana 1 Rattus norvegicus Homo sapiens 1	SDN VPATFAPSPT VPATFAPSPT .PAEAAPGGA AAPAAPPSQQ ASDS NA LPAAPPKP  LEISGTFTHR LEISGTFTHR LEIQGTFSRR MQVEGTFVRR SDSYNNS .DLDDLFDFG LDCVDGLCFS  .KLIRP.CSC HTPLMPNQSI HTPLMPNQSI	AAIL PAVVSSGLND PAVVSSGLND TSLLGD PASIG.GLAE KKSN GMLN VVQQASTLDD D QGHIYMEMNF QGHIYMEMNF NGEVFMDMTL GGKIFMEMTI SDEFNNDIDD AMDLFMAFEA PSEDATQINT RPGSFECFLF  R DVSLPLN	LFELSTGIGM LFELSTGIGM IFGLGG.AT IFGSGG.FG  LFSSREEKVN  TNKALQHMTD TNKALQHMTD TNKALQHMTD TNKAMQPMTN TNRAMQAISG ADDS. PS FYPYCCSLSL ITSGSA TLGPVMKMEP TLGPVMKMEP	APGGYVAPKA APGGYVAPKA LSVGVQIPKV GSSGITYPKE APNPQLLPHR APNPQLLPHR FAIQFNKNSF FAIQFNKNSF FAIQLNKNSF FALQFNKNSF KKSM  LLCREWRRRS SATRSICQDN LNNLQVAVKN	H VWLPAVKAKG VWLPAVKAKG TWLPAEKGKG LWLDASKAMG HSKS.S AQPQS.G TLTTLG SSSLYVPFPL  SVQQ GVIPSTPLAI GVIPSTPLAI GLIPVEQVNP DLIGLNDDES  AKKKEDKSKW  N.IDVFYFSC N.IDVFYFSC
Arabidopsis thaliana 1 Rattus norvegicus Homo sapiens 1 Drosophila melanogaster Caenorhabditis elegans Plasmodium falciparum Schizosaccharomyces pombe Saccharomyces cerevisiae 1 Trypanosoma brucei Consensus Arabidopsis thaliana 1 Rattus norvegicus Homo sapiens 1 Drosophila melanogaster Caenorhabditis elegans Plasmodium falciparum Schizosaccharomyces pombe Saccharomyces cerevisiae 1 Trypanosoma brucei Consensus Arabidopsis thaliana 1 Rattus norvegicus Homo sapiens 1 Drosophila melanogaster	SDN VPATFAPSPT VPATFAPSPT .PAEAAPGGA AAPAAPPSQQ SDN ASDS NA LPAAPPKP  LEISGTFTHR LEISGTFTHR LEIQGTFSRR MQVEGTFVRR SDSYNNS .DLDDLFDFG LDCVDGLCFS  .KLIRP.CSC HTPLMPNQSI HTPLMPNQSI .APLPPNQSI	AAIL PAVVSSGLND PAVVSSGLND TSLLGD PASIG.GLAE KKSN GMLN VVQQASTLDD D QGHIYMEMNF QGHIYMEMNF NGEVFMDMTL GGKIFMEMTI SDEFNNDIDD AMDLFMAFEA PSEDATQINT RPGSFECFLF  R DVSLPLN EVSMALG	LFELSTGIGM LFELSTGIGM IFGLGG.AT IFGSGG.FG  LFSSREEKVN  TNKALQHMTD TNKALQHMTD TNKALQHMTD TNKALQHMTD TNRAMQAISG ADDS. PS FYPYCCSLSL  ITSGSA TLGPVMKMEP TLGPVMKMEP TNGPIQRMEP	APGGYVAPKA APGGYVAPKA LSVGVQIPKV GSSGITYPKE APNPQLLPHR FAIQFNKNSF FAIQFNKNSF FAIQFNKNSF FAIQLNKNSF FALQFNKNSF KKSM  LLCREWRRRS SATRSICQDN LNNLQVAVKN LNNLQVAVKN	H VWLPAVKAKG VWLPAVKAKG TWLPAEKGKG LWLDASKAMG HSKS.S AQPQS.G TLTTLG SSSLYVPFPL  SVQQ GVIPSTPLAI GVIPSTPLAI GLIPVEQVNP DLIGLNDDES  AKKKEDKSKW  N.IDVFYFSC N.IDVFYFSC N.IDIFYFAC
Arabidopsis thaliana 1 Rattus norvegicus Homo sapiens 1 Drosophila melanogaster Caenorhabditis elegans Plasmodium falciparum Schizosaccharomyces pombe Saccharomyces cerevisiae 1 Trypanosoma brucei Consensus Arabidopsis thaliana 1 Rattus norvegicus Homo sapiens 1 Drosophila melanogaster Caenorhabditis elegans Plasmodium falciparum Schizosaccharomyces pombe Saccharomyces cerevisiae 1 Trypanosoma brucei Consensus Arabidopsis thaliana 1 Rattus norvegicus Homo sapiens 1 Drosophila melanogaster Caenorhabditis elegans	SDN VPATFAPSPT VPATFAPSPT .PAEAAPGGA AAPAAPPSQQ SDN ASDS NA LPAAPPKP  LEISGTFTHR LEISGTFTHR LEIQGTFSRR MQVEGTFVRR SDSYNNS .DLDDLFDFG LDCVDGLCFS  .KLIRP.CSC HTPLMPNQSI .APLPPNQSI .APILPNQSQ	AAIL PAVVSSGLND PAVVSSGLND TSLLGD PASIG.GLAE KKSN GMLN VVQQASTLDD D QGHIYMEMNF QGHIYMEMNF NGEVFMDMTL GGKIFMEMTI SDEFNNDIDD AMDLFMAFEA PSEDATQINT RPGSFECFLF  R DVSLPLN DVSLPLN EVSMALG NYTIACD	LFELSTGIGM LFELSTGIGM IFGLGG.AT IFGSGG.FG  LFSSREEKVN  TNKALQHMTD TNKALQHMTD TNKALQHMTD TNKALQHMTD TNKAMQPMTN TNRAMQAISG ADD.S. PS FYPYCCSLSL ITSGSA TLGPVMKMEP TLGPVMKMEP TLGPVMKMEP	APGGYVAPKA APGGYVAPKA LSVGVQIPKV GSSGITYPKE APNPQLLPHR FAIQFNKNSF FAIQFNKNSF FAIQFNKNSF FAIQLNKNSF FALQFNKNSF SATRSICQDN LNCQVAVKN LNNLQVAVKN LNNLQVAVKN LNNLQVAVKN	H VWLPAVKAKG VWLPAVKAKG TWLPAEKGKG LWLDASKAMG HSKS.S AQPQS.G TLTTLG SSSLYVPFPL  SVQQ GVIPSTPLAI GVIPSTPLAI GLIPVEQVNP DLIGLNDDES  AKKKEDKSKW  N.IDVFYFSC N.IDVFYFSC N.IDIFYFAC 
Arabidopsis thaliana 1 Rattus norvegicus Homo sapiens 1 Drosophila melanogaster Caenorhabditis elegans Plasmodium falciparum Schizosaccharomyces pombe Saccharomyces cerevisiae 1 Trypanosoma brucei Consensus Arabidopsis thaliana 1 Rattus norvegicus Homo sapiens 1 Drosophila melanogaster Caenorhabditis elegans Plasmodium falciparum Schizosaccharomyces pombe Saccharomyces cerevisiae 1 Trypanosoma brucei Consensus Arabidopsis thaliana 1 Rattus norvegicus Homo sapiens 1 Drosophila melanogaster Caenorhabditis elegans Plasmodium falciparum	SDN VPATFAPSPT VPATFAPSPT .PAEAAPGGA AAPAAPPSQQ ASDS NA LPAAPPKP  LEISGTFTHR LEISGTFTHR LEIQGTFSRR MQVEGTFVRR SDSYNNS .DLDDLFDFG LDCVDGLCFS  .KLIRP.CSC HTPLMPNQSI .APLPPNQSI .APLPPNQSI 	AAIL PAVVSSGLND PAVVSSGLND TSLLGD PASIG.GLAE KKSN GMLN VVQQASTLDD D QGHIYMEMNF QGHIYMEMNF QGHIYMEMNF NGEVFMDMTL GGKIFMEMTI SDEFNNDIDD AMDLFMAFEA PSEDATQINT RPGSFECFLF  R DVSLPLN DVSLPLN EVSMALG NYTIACD P	LFELSTGIGM LFELSTGIGM IFGLGG.AT IFGSGG.FG  LFSSREEKVN  TNKALQHMTD TNKALQHMTD TNKALQHMTD TNKALQHMTD TNKAMQPMTN TNRAMQAISG ADD.S. PS FYPYCCSLSL ITSGSA TLGPVMKMEP TLGPVMKMEP TLGPVMKMEP TTGAVQVTTP PVKMVQV	APGGYVAPKA APGGYVAPKA LSVGVQIPKV GSSGITYPKE APNPQLLPHR FAIQFNKNSF FAIQFNKNSF FAIQFNKNSF FAIQLNKNSF FALQFNKNSF SATRSICQDN LNCQVAVKN LNNLQVAVKN LNNLQVAVKN LNNLQVAVKN LNNLQVAVKN	H VWLPAVKAKG VWLPAVKAKG TWLPAEKGKG LWLDASKAMG HSKS.S AQPQS.G TLTTLG SSSLYVPFPL  GVIPSTPLAI GVIPSTPLAI GLIPVEQVNP DLIGLNDDES  AKKKEDKSKW  N.IDVFYFSC N.IDVFYFSC N.IDIFYFAC 
Arabidopsis thaliana 1 Rattus norvegicus Homo sapiens 1 Drosophila melanogaster Caenorhabditis elegans Plasmodium falciparum Schizosaccharomyces pombe Saccharomyces cerevisiae 1 Trypanosoma brucei Consensus Arabidopsis thaliana 1 Rattus norvegicus Homo sapiens 1 Drosophila melanogaster Caenorhabditis elegans Plasmodium falciparum Schizosaccharomyces pombe Saccharomyces cerevisiae 1 Trypanosoma brucei Consensus Arabidopsis thaliana 1 Rattus norvegicus Homo sapiens 1 Drosophila melanogaster Caenorhabditis elegans Plasmodium falciparum Schizosaccharomyces pombe	SDN VPATFAPSPT VPATFAPSPT .PAEAAPGGA AAPAAPPSQQ SDN ASDS NA LPAAPPKP  LEISGTFTHR LEISGTFTHR LEIQGTFSRR MQVEGTFVRR SDSYNNS .DLDDLFDFG LDCVDGLCFS  .KLIRP.CSC HTPLMPNQSI .APLPPNQSI .APLPPNQSI .APILPNQSQ TNNAE	AAIL PAVVSSGLND PAVVSSGLND TSLLGD PASIG.GLAE KKSN GMLN VVQQASTLDD D QGHIYMEMNF QGHIYMEMNF QGHIYMEMNF NGEVFMDMTL GGKIFMEMTI SDEFNNDIDD AMDLFMAFEA PSEDATQINT RPGSFECFLF  R DVSLPLN DVSLPLN EVSMALG NYTIACD P	LFELSTGIGM LFELSTGIGM IFGLGG.AT IFGSGG.FG  LFSSREEKVN  TNKALQHMTD TNKALQHMTD TNKALQHMTD TNKAMQPMTN TNRAMQAISG ADD.S. PS. N. FYPYCCSLSL  FYPYCCSLSL  TLGPVMKMEP TLGPVMKMEP TLGPVMKMEP TLGPVMKMEP TLGPVMKMEP	APGGYVAPKA APGGYVAPKA LSVGVQIPKV GSSGITYPKE APNPQLLPHR FAIQFNKNSF FAIQFNKNSF FAIQFNKNSF FAIQLNKNSF FAIQLNKNSF FALQFNKNSF SATRSICQDN LNNLQVAVKN LNNLQVAVKN LNNLQVAVKN LNNLQVAVKN LNNLQVAVKN	H VWLPAVKAKG VWLPAVKAKG TWLPAEKGKG LWLDASKAMG HSKS.S AQPQS.G TLTTLG SSSLYVPFPL  SVQQ GVIPSTPLAI GVIPSTPLAI GLIPVEQVNP DLIGLNDDES  AKKKEDKSKW  N.IDVFYFSC N.IDVFYFSC N.IDIFYFAC 
Arabidopsis thaliana 1 Rattus norvegicus Homo sapiens 1 Drosophila melanogaster Caenorhabditis elegans Plasmodium falciparum Schizosaccharomyces pombe Saccharomyces cerevisiae 1 Trypanosoma brucei Consensus Arabidopsis thaliana 1 Rattus norvegicus Homo sapiens 1 Drosophila melanogaster Caenorhabditis elegans Plasmodium falciparum Schizosaccharomyces pombe Saccharomyces cerevisiae 1 Trypanosoma brucei Consensus Arabidopsis thaliana 1 Rattus norvegicus Homo sapiens 1 Drosophila melanogaster Caenorhabditis elegans Plasmodium falciparum Schizosaccharomyces pombe Saccharomyces cerevisiae 1	SDN VPATFAPSPT VPATFAPSPT .PAEAAPGGA AAPAAPPSQQ ASDS NA LPAAPPKP  LEISGTFTHR LEISGTFTHR LEIQGTFSRR MQVEGTFVRR SNS .DLDDLFDFG LDCVDGLCFS  .KLIRP.CSC HTPLMPNQSI .APLPPNQSI .APLPPNQSI .APILPNQSQ TNNAE TNNAE 	AAIL PAVVSSGLND PAVVSSGLND TSLLGD PASIG.GLAE KKSN GMLN VVQQASTLDD D QGHIYMEMNF QGHIYMEMNF QGHIYMEMNF NGEVFMDMTL GGKIFMEMTI SDEFNNDIDD AMDLFMAFEA PSEDATQINT RPGSFECFLF  R DVSLPLN DVSLPLN EVSMALG NYTIACD P QG	LFELSTGIGM LFELSTGIGM IFGLGG.AT IFGSGG.FG  LFSSREEKVN  TNKALQHMTD TNKALQHMTD TNKALQHMTD TNKALQHMTD TNKAMQPMTN TNRAMQAISG ADD.S. PS.  FYPYCCSLSL  FYPYCCSLSL  FYPYCCSLSL  FYDYCCSLSL  FYDYCCSLSL  FYDYCCSLSL  FYDYCCSLSL  FYDYCCSLSL  FYDYCCSLSL  FYDYCCSLSL  FYDYCCSLSL  FYDYCCSLSL  FYDYCCSLSL  FYDYCCSLSL  FYDYCCSLSL  FYDYCCSLSL  FYDYCCSLSL  FYDYCCSLSL  FYDYCCSLSL  FYDYCCSLSL  FYDYCCSLSL  FYDYCCSLSL  FYDYCCSLSL  FYDYCCSLSL  FYDYCCSLSL  FYDYCCSLSL  FYDYCCSLSL  FYDYCCSLSL  FYDYCCSLSL  FYDYCCSLSL  FYDYCCSLSL  FYDYCCSLSL  FYDYCCSLSL  FYDYCCSLSL  FYDYCCSLSL  FYDYCCSLSL  FYDYCCSLSL  FYDYCCSLSL  FYDYCCSLSL  FYDYCCSLSL  FYDYCCSLSL  FYDYCCSLSL  FYDYCCSLSL  FYDYCCSLSL  FYDYCCSLSL  FYDYCCSLSL  FYDYCCSLSL  FYDYCCSLSL  FYDYCCSLSL  FYDYCCSLSL  FYDYCCSLSL  FYDYCCSLSL  FYDYCCSLSL  FYDYCCSLSL  FYDYCCSLSL  FYDYCCSLSL  FYDYCCSLSL  FYDYCCSLSL  FYDYCCSLSL  FYDYCCSLSL  FYDYCCSLSL  FYDYCCSLSL  FYDYCCSLSL  FYDYCCSLSL  FYDYCCSLSL  FYDYCCSLSL  FYDYCCSLSL  FYDYCCSLSL  FYDYCCSLSL  FYDYCCSLSL  FYDYCCSLSL  FYDYCCSLSL  FYDYCCSLSL  FYDYCCSLSL  FYDYCCSLSL  FYDYCCSLSL  FYDYCCSLSL  FYDYCCSLSL  FYDYCCSLSL  FYDYCCSLSL  FYDYCCSLSL  FYDYCCSLSL  FYDYCCSLSL  FYDYCCSLSL  FYDYCCSLSL  FYDYCCSLSL  FYDYCCSLSL  FYDYCCSLSL  FYDYCCSLSL  FYDYCCSLSL  FYDYCSL  FYDYCSL  FYDYCSL  FYDYCSL  FYDYCSL  FYDYCSL  FYDYCSL  FYDYCSL  FYDYCSL  FYDYCSL  FYDYCSL  FYDYCSL  FYDYCSL  FYDYCSL  FYDYCSL 	APGGYVAPKA APGGYVAPKA LSVGVQIPKV GSSGITYPKE APNPQLLPHR  FAIQFNKNSF FAIQFNKNSF FAIQLNKNSF FAIQLNKNSF FAIQLNKNSF SATRSICQDN LNCQVAVKN LNNLQVAVKN LNNLQVAVKN LNNLQVAVKN LNNLQVAVKN LNNLQVAVKN LNNLQVAVKN	H VWLPAVKAKG VWLPAVKAKG TWLPAEKGKG LWLDASKAMG HSKS.S AQPQS.G TLTTLG SSSLYVPFPL  SVQQ GVIPSTPLAI GVIPSTPLAI GLIPVEQVNP DLIGLNDDES  AKKKEDKSKW  N.IDVFYFSC N.IDVFYFSC N.IDIFYFAC  N
Arabidopsis thaliana 1 Rattus norvegicus Homo sapiens 1 Drosophila melanogaster Caenorhabditis elegans Plasmodium falciparum Schizosaccharomyces pombe Saccharomyces cerevisiae 1 Trypanosoma brucei Consensus Arabidopsis thaliana 1 Rattus norvegicus Homo sapiens 1 Drosophila melanogaster Caenorhabditis elegans Plasmodium falciparum Schizosaccharomyces pombe Saccharomyces cerevisiae 1 Trypanosoma brucei Consensus Arabidopsis thaliana 1 Rattus norvegicus Homo sapiens 1 Drosophila melanogaster Caenorhabditis elegans Plasmodium falciparum Schizosaccharomyces pombe Saccharomyces cerevisiae 1 Trypanosoma brucei	SDN VPATFAPSPT VPATFAPSPT .PAEAAPGGA AAPAAPPSQQ SDN ASDS NA LPAAPPKP  LEISGTFTHR LEISGTFTHR LEIQGTFSRR MQVEGTFVRR SDSYNNS .DLDDLFDFG LDCVDGLCFS SNS .DLDDLFDFG LDCVDGLCFS SNS .DLDDLFDFG LDCVDGLCFS  .KLIRP.CSC HTPLMPNQSI .APLPPNQSI .APLPPNQSI .APLPPNQSI .APILPNQSQ TNNAE DTKAV GKGKKKRKDR	AAIL PAVVSSGLND PAVVSSGLND TSLLGD PASIG.GLAE KKSN GMLN VVQQASTLDD D QGHIYMEMNF QGHIYMEMNF QGHIYMEMNF NGEVFMDMTL GGKIFMEMTI SDEFNNDIDD AMDLFMAFEA PSEDATQINT RPGSFECFLF  R PVSLPLN DVSLPLN EVSMALG NYTIACD P QG TLIIKVPCAE	LFELSTGIGM LFELSTGIGM IFGLGG.AT IFGSGG.FG  LFSSREEKVN  TNKALQHMTD TNKALQHMTD TNKALQHMTD TNKALQHMTD TNKALQHMTD TNKAMQPMTN TNRAMQAISG ADD.S. PS FYPYCCSLSL  FYPYCCSLSL  FYPYCCSLSL  FYDYCCSLSL  FYDYCCSLSL  FYDYCCSLSL  FYDYCCSLSL  FYDYCCSLSL  FYDYCCSLSL  FYDYCCSLSL  FYDYCCSLSL  FYDYCCSLSL  FYDYCCSLSL  FYDYCCSLSL  FYDYCCSLSL  FYDYCCSLSL  FYDYCCSLSL  FYDYCCSLSL  FYDYCCSLSL  FYDYCCSLSL  FYDYCCSLSL  FYDYCCSLSL  FYDYCCSLSL  FYDYCCSLSL  FYDYCCSLSL  FYDYCCSLSL  FYDYCCSLSL  FYDYCCSLSL  FYDYCCSLSL  FYDYCCSLSL  FYDYCCSLSL  FYDYCCSLSL  FYDYCCSLSL  FYDYCCSLSL  FYDYCCSLSL  FYDYCCSLSL  FYDYCCSLSL  FYDYCCSLSL  FYDYCCSLSL  FYDYCCSLSL  FYDYCCSLSL  FYDYCCSLSL  FYDYCCSLSL  FYDYCCSLSL  FYDYCCSLSL  FYDYCCSLSL  FYDYCCSLSL  FYDYCCSLSL  FYDYCCSLSL  FYDYCCSLSL  FYDYCCSLSL  FYDYCCSLSL  FYDYCCSLSL  FYDYCCSLSL  FYDYCCSLSL  FYDYCCSLSL  FYDYCCSLSL  FYDYCCSLSL  FYDYCCSLSL  FYDYCCSLSL  FYDYCCSLSL  FYDYCCSLSL  FYDYCCSLSL  FYDYCCSLSL  FYDYCCSLSL  FYDYCCSLSL  FYDYCCSLSL  FYDYCCSLSL  FYDYCCSLSL  FYDYCCSLSL  FYDYCCSLSL  FYDYCCSLSL  FYDYCCSLSL  FYDYCCSLSL  FYDYCCSLSL  FYDYCCSLSL  FYDYCCSLSL  FYDYCCSLSL  FYDYCCSLSL  FYDYCCSLSL  FYDYCCSLSL  FYDYCSL  FYDYCSL  FYDYCSL  FYDYCSL  FYDYCSL  FYDYCSL  FYDYCSL 	APGGYVAPKA APGGYVAPKA LSVGVQIPKV GSSGITYPKE APNPQLLPHR  FAIQFNKNSF FAIQFNKNSF FAIQLNKNSF FAIQLNKNSF FAIQLNKNSF SATRSICQDN LNCQVAVKN LNNLQVAVKN LNNLQVAVKN LNNLQVAVKN LNNLQVAVKN LNNLQVAVKN LNNLQVAVKN LNNLQVAVKN LNNLQVAVKN LNNLQVAVKN LNNLQVAVKN LNNLQVAVKN LNNLQVAVKN LNNLQVAVKN LNNLQVAVKN LNNLQVAVKN LNNLQVAVKN LNNLQVAVKN LNNLQVAVKN LNNLQVAVKN LNNLQVAVKN LNNLQVAVKN	H VWLPAVKAKG VWLPAVKAKG TWLPAEKGKG LWLDASKAMG HSKS.S AQPQS.G TLTTLG SSSLYVPFPL  GVIPSTPLAI GVIPSTPLAI GLIPVEQVNP DLIGLNDDES  AKKKEDKSKW  N.IDVFYFSC N.IDVFYFSC N.IDIFYFAC  N.IDIFYFAC  N WYIFLLYATC

Arabidopsis thaliana 1		D			
Rattus norvegicus	LIPLNVLFVE	DGKMERQVFL	ATWKDIPNEN	ELQFQIKECH	LN.ADTVSSK
Homo sapiens 1	LIPLNVLFVE	DGKMERQVFL	ATWKDIPNEN	ELQFQIKECH	LN.ADTVSSK
Drosophila melanogaster	LVHGNVLFAE	DGQLDKRVFL	NTWKEIPAAN	ELQYTLSGVI	GT.TDGIASK
Caenorhabditis elegans					
Plasmodium falciparum					
Schizosaccharomyces pombe					
Saccharomyces cerevisiae 1					
Trypanosoma brucei	PVPPPPQLVF	LFLLVVNPPV	VEKKKGIVCP	HFLMQAVWGR	IHAEMRLPVL
Consensus					
Arabidopsis thaliana 1		AN	GIVPKHV	YWLHQLGI	ASC
Rattus norvegicus	LQNNNVYTIA	KRNVEGQDML	YQSLKLTNGI	WILAELRIQP	GNPNYTL
Homo sapiens 1	LQNNNVYTIA	KRNVEGQDML	YQSLKLTNGI	WILAELRIQP	GNPNYTL
Drosophila melanogaster	MTTNNIFTIA	KRNVEGQDML	YQSLKLTNNI	WVLLELKLQP	GNPEATL
Caenorhabditis elegans					
Plasmodium falciparum			QTGL	SIFASINRID	<u>SKKK</u>
Schizosaccharomyces pombe					
Saccharomyces cerevisiae 1			P.DVSGGN	IVSQDLLDLF	
Trypanosoma brucei	NSNRTLSVRC	FICSGKKNSH	YIQNHWLTLF	GPECEIQSHY	PLYLCQTVCY
Consensus					
Arabidopsis thaliana 1	RQKQPAA	CLVLRG			
Rattus norvegicus	SLKCRAPEVS	QYIYQVYDSI	LKN.		
Homo sapiens 1	SLKCRAPEVS	QYIYQVYDSI	LKN.		
Drosophila melanogaster	SLKSRSVEVA	NIIFAAYEAI	IRSP		
Caenorhabditis elegans					
Plasmodium falciparum	ккккк				
Schizosaccharomyces pombe					
Saccharomyces cerevisiae 1					
Trypanosoma brucei	QGGVKFPTKA	GIFPAETETP	PDLG		
Consensus					

## Figure 22 – Alignement de séquences protéiques d'adaptine de différentes espèces.

La séquence protéique correspondant à la séquence nucléotidique de l'armorce PfCat1 est indiquée en rouge et celle de PfCat2 en vert. Ces amorces ont été utilisées pour le clonage de l'ADN de l'adaptine. La séquence de l'adaptine de *Plasmodium falciparum* est indiquée en bleu.

	At1	At2	Rn	Hs1	Hs2	Hs3	Dm	Ce	Pf	Sp	Sc1	Tb	Sc
At1		75.8	66.4	67.3	66.4	67.3	68.4	58.3	<b>54.1</b>	44.2	39.8	39.9	30.5
At2	73.8		55.6	56.4	56.9	56.4	57.9	59.6	61.6	52.6	45.3	36.6	35.2
Rn	56.2	47.9		98.5	87.4	89.4	79.4	66.4	50.8	40.6	38.2	40.1	28.8
Hs1	57.0	48.6	98.4		87.4	89.5	80.6	66.0	51.6	41.3	38.8	40.7	29.2
Hs2	57.4	49.9	81.4	81.4		97.2	79.5	68.6	52.0	41.6	39.4	39.1	29.7
Hs3	57.9	49.5	83.2	83.2	97.2		81.0	66.7	51.1	40.4	38.3	39.7	28.9
Dm	57.6	49.9	71.6	72.5	72.3	73.2		68.0	52.7	42.4	39.3	39.7	29.5
Ce	48.8	50.9	57.2	56.9	59.3	57.7	60.4		56.0	47.0	40.5	36.0	32.7
Pf	43.5	49.9	40.5	41.1	41.8	41.0	42.4	45.1		50.7	44.6	36.6	35.1
Sp	34.0	40.9	30.8	31.3	32.1	31.2	32.4	36.1	36.6		45.8	31.2	35.5
Sc1	27.4	31.8	25.8	26.1	27.0	26.2	25.9	27.2	30.5	31.0		31.0	32.6
Tb	25.6	24.1	25.8	26.1	25.6	25.9	26.1	23.2	24.3	20.5	20.0		25.1
Sc	19.9	22.9	18.6	18.8	19.1	18.6	18.8	20.4	22.2	19.8	17.8	13.2	

 Tableau 10- Matrice d'identité et de similarité entre les acides aminés des protéines adaptine de ces différentes espèces.

At1 : Arabidopsis thaliana 1, At2 : Arabidopsis thaliana 2, Rn :Rattus norvegicus, Hs1 : Homo sapiens 1, Hs2 : Homo sapiens 2, Hs3 : Homo sapiens 3, Dm : Drosophila melanogaster, Ce : Caenorhabditis elegans, Pf : Plasmodium falciparum, Sp : Schizosaccharomyces pombe, Sc : Saccharomyces cerevisiae 1, Tb : Trypanosoma brucei, Sc : Saccharomyces cerevisiae.

Les pourcentages de similarité sont indiqués en bleu et les pourcentages d'identité en noir.

Le clonage de l'ADNc de cette protéine a été facilité par la connaissance de la séquence nucléotidique correspondante. Les amorces utilisées pour la PCR sont représentées sur la figure 22:

Pfcat1: 5' GCG GGA TCC ATG TCT GAT TTA CGC TAC TTT CAA 3'

Pfcat2: 5' GGG CGG CCG CAA ACT GTC AAT ACG ATT TAT TGA GGC 3'

La PCR a été effectuée sur l'ADN d'une banque génomique de *Plasmodium falciparum* (fournie par Christian Doerig, adresse) (Figure 23).



Figure 23– Obtention de l'ADNg de l'adaptine.

La bande indiquée par une flèche sur ce gel d'agarose à 0,8% est le produit de la PCR réalisée sur la banque d'ADN génomique fournie par Christian Doerig avec les amorces PfCat1 et PfCat2.

# Article 2

**J. Biol. Chem.** Submitted October 20, 2001 ?

# Plasmodium falciparum glycogen synthase kinase -3 (PfGSK-3): molecular model, expression, intracellular localisation and selective inhibitors.

# Eliane **DROUCHEAU**<sup>1</sup>, Aline **PRIMOT**<sup>1</sup>, Denise **MATTEI**<sup>2</sup>, Marie **KNOCKAERT**<sup>1</sup>, Chris **RICHARDSON**<sup>3</sup>, Pietro **ALANO**<sup>4</sup>, Ali **JAFARSHAD**<sup>5</sup>, Blandine **BARATTE**<sup>1</sup>, Conrad **KUNICK**<sup>6</sup>, Daniel **PARZY**<sup>7</sup>, Laurence **PEARL**<sup>3</sup>, Christian **DOERIG**<sup>5</sup> & Laurent **MEIJER**\*<sup>1</sup>

- 1. C.N.R.S., Cell Cycle Group, Station Biologique, B.P. 74, 29682 Roscoff cedex, Bretagne, France.
- 2. Unité de Biologie des Interactions Hôte-Parasite, Institut Pasteur, 25, rue du Docteur Roux, 75724 Paris cedex 15, France.
- 3. Istituto Superiore di Sanita, Viale Regina Helena 299, Roma 0161, Italy.
- 4. Unité INSERM U511, La Pitié-Salpétrière, 91 Bd de l'Hôpital, 75643 Paris cedex 13, France.
- 5. Section of Structural Biology, Institute of Cancer Research, Chester Beatty Laboratories, London SW3 6JB, United Kingdom.
- 6. Institut für Pharmazie, Universität Hamburg, Bundesstraβe 45, D-20146-Hamburg, Germany.
- 7. Institut de Médecine Tropicale du Service de Santé des Armées, Le Pharo, Marseille, France.

\*Correspondence should be addressed to L. Meijer (e-mail: <meijer@sb-roscoff.fr>)

Running Title: GSK-3 in Plasmodium falciparum

Key Words: Plasmodium, malaria, glycogen synthase kinase, GSK-3, kinase inhibitors.

**Abbreviations:** GSK-3, glycogen synthase kinase -3; LB, Luria Bertani medium; PBS, phosphatebuffered saline; RBC, red blood cell; TBS, Tris-buffered saline.

## Chapitre II

## **ETUDE DE LA PROTEINE POLO**

### I. Matériel biologique

#### L'oursin: Sphaerechinus granularis

Cette famille de protéines Ser/Thr kinases semble être un chaînon essentiel de la régulation de l'entrée en mitose et par conséquent un élément important dans le contrôle de la division cellulaire. Il nous est donc apparu intéressant de rechercher et d'étudier la protéine homologue de Polo chez l'oursin, modèle étudié au laboratoire. En effet, les œufs d'oursin (*Sphaerechinus granularis*) présentent plusieurs avantages pour l'étude de la régulation du cycle cellulaire.

Les ovocytes d'oursin subissent les divisions méiotiques dans les gonades. Les œufs sont conservés dans les ovaires. Ils sont naturellement bloqués en interphase post-méiotique (stade ovotide). Leur fécondation active la synthèse protéique et induit une série de division mitotiques rapides et hautement synchronisées. La figure 24 montre que la transition G/M de ces cellules est accompagnée d'une importante augmentation de l'activité du complexe p34<sup>cdc2</sup>/cycline B, qui diminue rapidement à la fin de la mitose, juste avant que les œufs subissent la cytodiérèse.

La synchronie naturelle de ces cellules rend ce modèle parfaitement adapté à l'étude des évènements qui soutendent le déroulement de la division cellulaire. De plus, ces cellules sont disponibles en grande quantité ce qui permet la purification de protéines en vue d'analyses biochimiques. Enfin, ces ovocytes de part leur transparence et leur grande taille (90 µm de diamètre) sont très adaptés aux expériences de microinjection intracellulaire.



Figure 24- Cinétique de l'activation du MPF («M phase Promoting Factor», complexe p34<sup>cdc2</sup>/cycline B) au cours du cycle mitotique suivant la fécondation de l'ovule d'oursin. Le MPF, dosé dans des lysats cellulaires bruts, subit une activation transitoire au niveau de la transition G2/M (exprimée en taux de stimulation par rapport au MPF des œufs non fécondés). La cycline est synthétisée continuellement mais subit une phosphorylation qui commence avant la rupture de l'enveloppe nucléaire (E.N.) et une protéolyse quand les cellules sortent de métaphase (D'après (160)).

Les ovocytes d'oursin, *Sphaerechinus granularis*, sont obtenus par injection d'acétylcholine dans la cavité générale de l'animal. Afin d'éliminer les grosses impuretés, ils sont lavés 3 fois avec de l'eau de nær filtrée (D'après (160)). Les embryons obtenus après fécondation de ces ovocytes sont prélevés à différents stades au cours de leur développement pour permettre des analyses biochimiques.



# Figure 25– Les différents stades de développement de l'embryon de l'oursin *Sphaerechinus granularis*.

Seules les trois premières heures de développement ont été utilisés pour les expériences de biologie moléculaire et de biochimie.

## II. Clonage de l'homologue de Polo chez l'oursin, Sphaerichinus granularis

### II.8. Obtention d'un fragment d'ADNc de Plu1

La séquence nucléotidique d'un fragment de 864 paires de bases (pb) de l'ADNc de la protéine Polo d'oursin a été obtenue par RT-PCR («Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction») sur des ARN totaux d'ovocytes d'oursin non fécondés (extraits selon le protocole du kit Invitrogen, "S.N.A.P. Total RNA Isolation Kit"). La «reverse transcription» a été faite avec les amorces oligo dT et poly d(N)<sub>6</sub> (hexamères). Deux amorces dégénérées, OHN20 et OHN21, issues de l'ADNc codant pour la protéine Polo de drosophile, ont été utilisées pour l'amplification du fragment de l'ADNc de Plu1 par PCR. Ces amorces ont été choisies en fonction des régions hautement conservées de 7 protéines de la famille Polo (hPlk, mPlk, rPlk, Polo, Plx1, cdc5 et Plo1) (Figure 26):

- OHN20 [5' GCGGAATTCAA(AG)AT(ACT)GG(ACGT)GA(CT) 3'] correspond à la séquence nucléotidique codant pour une partie du domaine VII de la région catalytique de la protéine Polo.

- OHN21 [5' (GC)(AT)(AG)TA(AG)TC(ACGT)ACCCA(CT)TT 3'] correspond à la séquence nucléotidique codant pour un domaine très conservé de la région extra catalytique nommé "Polo Box".

Ces amorces nous ont été fournies par le Dr. Alvaro Tavares et le Dr. David Glover (Cell Cycle Genetics Group, Medical Science Institute, The University of Dundee, Grande Bretagne).

CDC5 Plo1 Plk souris plk rat PLK hum Plx1 <b>consensus</b> Domaines	HHHQPAQKKKREKLSALCKTPPSLIKTRGKDYHRGHFLGEGGFARCFQIKD.DSGEIF EPKTAITPKKKSKASRLCFTPPTNLHNNKKNIFYTRYDCIGEGGFARCFRVKD.NYGNIY GGVLGDAAPSAPVAAPLAKEILEVLVDPRSRQYIRGRFLGKGGFAKCFEISDADTKEVF GGVPGDAVPGAPVAAPLAKEIPEVLVDPRSRQQYVRGRFLGKGGFAKCFEISDSDTKEVF AGVPGVAAPGAPAAAPPAKEIPEVLVDPRSRRYVRGRFLGKGGFAKCFEISDADTKEVF VAPEAAKPPGIPGSSSAVKEIPEILVDPRTRRYLRGRFLGKGGFAKCYEITDLESREVF 	108 66 79 79 79 70
CDC5 Plo1 Plk souris plk rat PLK hum Plx1 Polo <b>consensus</b> Domaines	AAKTVAKASIKSEKTRKKLLSEIQIHKSMSHPNIVQFIDCFEDDSNVYILLEICPNGSLM AAKVIAKRSLQNDKTKLKLFGEIKVHQSMSHPNIVGFIDCFEDSTNIYLILELCEHKSLM AGKIVPKSLLLKPHQKEKMSMEISIHRSLAHQHVVGFHDFFEDSDFVFVVLELCRRRSLL PGKIVPKSLLLKPHQKEKMSMETSIHRSLEHQHVVGFHGFFEDSDFVFVVLELCRRRSLL AGKIVPKSLLLKPHQREKMSMEISIHRSLAHQHVVGFHGFFEDNDFVFVVLELCRRRSLL AGKIVPKSLLLKPHQKEKMSMEISIHRSLAHQHVVGFHGFFEDNDFVFVVLELCRRRSLL AGKIVPKTMLLKPHQKDKMTMEIAIQRSLDHRHVVGFHGFFEDNDFVYVVLELCRRRSLL AGKIVSKKLMIKHNQKEKTAQEITIHRSLNHPNIVKFHNYFEDSQNIYIVLELCKKRSMM KKKEIS.HV.FFEDLE.CS 	168 126 139 139 139 130 111
CDC5 Plo1 Plk souris plk rat PLK hum Plx1 Polo <b>consensus</b> Domaines	ELLKRRKVLTEPEVRFFTTQI-CGAIKYMHSRRVIHRDLKLGNIFFDSNYNLKIGDFGLA ELLRKRKQLTEPEVRYLMQIL-GALKYMHKKRVIHRDLKLGNIMLDESNNVKIGDFGLA ELHKRRKALTEPEARYYLRQIVLGC-QYLHRNQVIHRDLKLGNLFLNEDLEVKIGDFGLA ELHKRRKALTEPEARYYLRQIVLGC-QYLHRNQVIHRDLKLGNLFLNEDLEVKIGDFGLA ELHKRRKALTEPEARYYLRQIVLGC-QYLHRNRVIHRDLKLGNLFLNEDLEVKIGDFGLA ELHKRRKAVTEPEARYYLRQIVLGC-QYLHSNRVIHRDLKLGNLFLNDEMEVKIGDFGLA ELHKRRKAVTEPEARYYLKQTISGC-QYLHSNRVIHRDLKLGNLFLNDEMEVKIGDFGLA ELHKRRKSITEFECRYYIYQIIQG-VKYLHDNRIIHRDLKLGNLFLNDLLHVKIGDFGLA ELRKTE.E.RQIY.HIHRDLKLGNKIGDFGLA	227 185 198 198 198 189 170
CDC5 Plo1 Plk souris plk rat PLK hum Plx1 Polo <b>consensus</b> Domaines	AVLANESERKYTICGTPNYIAPEVLMGKHSGHSFEVDIWSLGVMLYALLIGKPPFQARDV ALLMDDEERKMTICGTPNYIAPEILFNSKEGHSFEVDLWSAGVVMYALLIGKPPFQDKEV TKVEYEGERKKTLCGTPNYIAPEVLSKKGHSFEVDVWSIGCIMYTLLVGKPPFETSCL TKVEYEGERKKTLCGTPNYIAPEVLSKKGHSFEVDVWSIGCIMYTLLVGKPPFETSCL TKVEYDGERKKTLCGTPNYIAPEVLSKKGHSFEVDVWSIGCIMYTLLVGKPPFETSCL TKVEYDGERKKTLCGTPNYIAPEVLGKKGHSFEVDIWSIGCIMYTLLVGKPPFETSCL TRIEYEGERKKTLCGTANYIAPEILTKKGHSFEVDIWSIGCVMYTLLVGQPPFETKTL RK.T.CGT.NYIAPE.LGHSFE.D.W.GY.L.G.PF VII/VIII/IX/_	287 245 256 256 256 247 228
CDC5 Plo1 Plk souris plk rat PLK hum Plx1 Polo <b>consensus</b>	NTIYERIKCRDFSFPRD-KPISDEGKILIRDILSLDPIERPSLTEIMDYVWFRGTF-PPS KTIYRKIKANSYSFPSNVD-ISAEAKDLISSLLTHDPSIRPSIDDIVDHEFFHTGYMAST KETYLRIKKNEYSIPKHINPVAA-SLIQKMLQTDPTARPTIHELLNDEFFTSGYIPAR KETYLRIKKNEYSIPKHINPVAA-SLIQKMLQTDPTARPTIHELLNDEFFTSGYIPAR KETYLRIKKNEYSIPKHINPVAA-SLIQKMLQTDPTARPTINELLNDEFFTSGYIPAR KETYMRIKKNEYSIPKHINPVAA-ALIQKMLSDPTSRPTIDDLLNDEFFTSGYIPSR KDTYSKIKKCEYRVPSYLR-KPA-A-DMVIAMLQPNPESRPAIGQLLNFEFLKGSKVPMF Y.IKPL.P.RP.	345 304 313 313 313 304 285
Domaines	X/XI/	

CDC5	IPST-VMSEAPNFEDIPEEQSLVNFKDCMEKSLLLESMSSDKIQRQKRDYISSIKSSIDK	404
Plo1	LPDE-ILHSMPIWPSSQSKSSFQRNLDFVASASGVGFGNSAGVEKNK	350
Plk souris	LPIT-CLTIPPRFSIAPSS-LDP-SS-RKPLKVLNKGVENPLPDRPR	356
plk rat	LPIT-CLTIPPRFSIAPSS-LDP-SN-RKPLTVLNKGVENPLPDRPR	356
PLK hum	LPIT-CLTIPPRFSIAPSS-LDP-SN-RKPLTVLNKGLENPLPERPR	356
Plx1	I.PTT-CI.TVPPRESTAP-ST-TDO-SIRKPI.TATNKGODSPI.VEKOVAPA	350
Polo	LPSS-CLTMAPRIGSND-TI-EDSMHRKPLMEMNGTRP	320
1010		520
consensus		
CDCE		155
		406
		200
PIK SOULIS		282
PIK Iat		202
PLK hum	EKEEPVVRETGEVVDCHLSDMLQQLHSVNASKPSERG	393
Plxl	KEEEMQQPEFTEPADCYLSEMLQQLTCLNAVKPSERA	387
Polo	DDT-RLESTFLKANLHDAITASAQVCRHSEDYRSDIESLYQQLTNLING-KPR-	371
consensus		
CDC5	LRKELIATSTNVIKSEI-SLRILASECHLTLNGIVEA-EAQYKMGGLPKSRL	505
Plo1	LGSRVKVLREE-SQSFVPT-KSAVTEQVEPIQLI-RSLSAN-TVSRLSKVGNMKSDIWIS	462
Plk souris	LVRQEE-A-EDPA	404
plk rat	LVRQEE-A-EDPA	404
PLK hum	LVRQEE-A-EDPA	404
Plx1	LIRQEE-A-EDPA	398
Polo	IL-OGNLG-DENTDPA	385
	~	
consensus	•••••••••••••••••••••••••••••••••••••••	
CDC5	PKT-KHPMT-VTKWVDYSNKHGESYOLST	532
Plo1		512
Plk courie		120
plk souris		429
PIK Iat		429
		429
PIXI		423
P010	AQPLFWISKWVDYSDKYGFGYQLCD	410
consensus		
	/ polo Box	
CDC5	EDICULENNCTTULELADAFEFWYISYDDECWUASHVILSFK DEFI.SEHLEUUDFFAKY	592
Plo1	EDIGVIENNOTTVIKIADAELEFWIISIDDKEGWVASHIISSEKEKEISKIISEVVDFAKI	572
Plk courie		100
PIK SOULIS		409
pik rat	NSVGVLFNDSTRLILINDGDSLQYIERDGTESYLTVSSHPNSLMKKITLLNYFRNYMSEH	489
PLK num	NSVGVLFNDSTRLILYNDGDSLQYIERDGTESYLTVSSHPNSLMKKITLLKYFRNYMSEH	489
PIXI	NSVGVLFNDSTRLIMYNDGDSLQYIERNNTESYLNVRSYPTTLTKKITLLKYFRNYMSEH	483
POIO	EGIGVMFNDTTKLILLPNQINVHFIDKDGKETYMTTTDYCKSLDKKMKLLSYFKRYMIEH	470
consensus	GV.FNT	
	/	
CDC5	MKANI, SRUSTECREEVIKDDUELDRVTRVKDEVMEET. SDCTEOENEVDUUKMATS	647
		620
FIUL COUNTS		03Z
FIN SOULIS		544
pik rat	LLVAGANTTPREGDELARLPILKIWFKIKSALLLHLSNGIVQIN-FFQDHTKLIRG	544
PLK HUM	LLAGANTIPREGDELARIPILKIWERIKSATILHLSNGSVQIN-FFQDHTKLILC	544
LIXT	LLKAGANTTPREGDELARLPFLRTWFRTRSAIILHLSNGTVQIN-FFQDHTKIILC	538
POTO	LVKAGANNVNIESDQISRMPHLHSWFRTTCAVVMHLTNGSVQLN-FSDHMKLILC	524
consensus	DH	

consensus		
Polo	PRMSAITYMDQEKNFRTYRFSTIVENGVSKDLYQKIRYAQEKLRKMLEKMFT	576
Plx1	PLMAAVSYIDEKREFRTYKLSLIQEFGCCKELASRLRYARTMVEKLQSSKSAVAHVKASA	598
PLK hum	PLMAAVTYIDEKRDFRTYRLSLLEEYGCCKELASRLRYARTMVDKLLSSRSASNRLKAS.	603
plk rat	PLMAAVTYINEKRDFRTYRLSLLEEYGCCKELASRLRYARTMVDKLLSSRSACNRLKAS.	603
Plk souris	PLMAAVTYINEKRDFQTYRLSLLEEYGCCKELASRLRYARTMVDKLLSSRSASNRLKAS.	603
CDC5 Plo1	DGGKLVTYISPSHESTTYPLVEVLKYGEIPGYPESNFREKLTLIKEGLKQKSTIVTVD STARKIIVLDKERERVELPLQEASAFSEDLRSRLKYIRETLESWASKMEVS	683
~~~~		

# Figure 26- Comparaison de la séquence protéique obtenue chez l'oursin (Plu1) avec les séquences protéiques des kinases de la famille POLO.

Alignement des séquences de: *Saccharomyces cerevisiae* (CDC5), *Schizosaccharomyces pombe* (Plo1), souris (Plk), rat (plk), homme (PLK), *Xenopus laevis* (Plx1), *Drosophila melanogaster* (Polo) et *Sphaerechinus granularis* (Plu1). La séquence consensus correspond aux acides aminés communs à ces huit protéines. Nous y retrouvons les motifs caractéristiques des Ser/Thr kinases (soulignés) et les séquences spécifiques des protéines de la famille POLO (ex: la "polo box", la séquence GHSFE-D-W), ainsi que les séquences des amorces utilisées pour cloner l'ADNc de la protéine Polo d'oursin (en rouge). Les chiffres romains indiquent les onze sous-domaines des régions conservées dans les protéines kinases ((89)). La région catalytique (N terminale) est située entre le début de la séquence protéique et la fin du domaine XI. La région C terminale débute au niveau de la "polo box" et se termine à la fin de la protéine. La partie intermédiaire a une taille très variable selon les protéines. Les lettres noires (E, D, N et Q) représentent les acides aminés hydrophiles; les lettres vertes (I, V, L et M ), les acides aminés hydrophobes; les lettres roses (T, P, S, G et A), les acides aminés polaires; les lettres bleues (W, F et Y), les acides aminés aromatiques; les lettres bleues clair (R, K et H), les acides aminés chargés positivement et la lettre rouge (C), la cystéine.

L'analyse électrophorétique des produits de la PCR a révélée deux bandes de taille apparente respective de 700 et 850 pb (Figure 27).



#### Figure 27- Analyse des produits issus de la RT-PCR.

Electrophorèse en gel d'agarose à 0.8% (tampon TAE 1X, coloration au BET) de la totalité (40 µl) des produits de ré amplification p(UdT) (à partir des ADNc produits par RT avec les amorces oligo dT) et p(UH) (à partir des ADNc produits par RT avec les amorces poly d(N)<sub>6</sub>). Les deux bandes d'intérêt de 850 et 700 pb ont été découpées et purifiées.

Ces deux fragments d'ADNc ont été purifiés, clonés dans le vecteur pCR<sup>TM</sup>2.1 d'Invitrogen. (Figure 28) puis amplifié dans les bactéries XL1Blue.



#### Figure 28- Carte du vecteur pCR<sup>TM</sup>2.1.

La séquence du site multiple de clonage est présentée avec l'insert (Produit PCR).

Le séquençage de ces deux bandes a permis de mettre en évidence une forte identité de la séquence protéique déduite (288 acides aminés) du fragment de 850 pb avec les protéines de la famille Polo. Cette nouvelle protéine de la famille Polo a été nommée Plu1 («Polo-like kinase of sea-urchin 1») (Figure 29). L'analyse par les banques de données de la séquence en acides aminés des cadres ouverts de lecture correspondants à l'ADNc de 700 pb n'a révélée aucune homologie avec une protéine connue

A E F K I G D F G L A P K L E F E G D R K R 1 т м GCG GAA TTC AAG ATA GGG GAT TTC GGC TTA GCG CCC AAA CTG GAG TTT GAG GGA GAT AGA AAA AGA ACG ATG 1 Ρ V 25 C Ν Y K F G т Ρ Ι А E L G Τ G Η S E Δ D v W 73 TGT GGC ACT CCA AAC TAT ATA GCC CCT GAA GTG CTG GGT AAG ATA GGG CAC AGC TTT GAG GCA GAT GTT TGG G C I M Y T M L V G S T P F 49 A Е Т S S 145 GCA TTA GGT TGT ATA ATG TAC ACA ATG TTA GTC GGA AGC ACT CCG TTT GAA ACC AGC TCA CTT AAG GAA ACC К Н Ν К Y Н F P Е т S P v 73 Y А R т Τ. Δ ĸ E т т S 217 TAT GCA CGC ATC AAA CAC AAA TAT CAC TTC CCG GAA ACC CTT TCC CCT GTT GCC AAG GAA ATT ATT TCG L E V V Ρ Е E R Р Р 97 D S D Ι DHEFFTO L L S 289 GAC TTA TTA TCC TCA GAT CCA GAG GAA CGA CCA CCC TTA GAG GTG GTC ATT GAT CAT GAA TTT TTC ACA CAG P S A C V T A P D F P I 121 G F V P ETLS т К V L 361 GGT TTT GTC CCG GAG ACG TTG TCT CCG TCG GCG TGC GTG ACA GCG CCA GAC TTT CCA ATC ACC AAG GTT CTT TNEFCRL 145 I S D R K G D L V K R E S т L R 433 ATA AGC GAT CGC AAG GGA GAT CTC GTC ACA AAT GAA TTC TGT AGG TTA AAA CGG GAA AGC ACG CTC CAG AGG VТ A P L S D T T N N E S S Q P v S 179 R D G S N 505 AGA GAT GTG ACG GCT CCG CTG TCG GAT ATT AAT AAT GAG AGT AGC CAG CCA GTA TCG GGA TCT AAT ACA 203 0 S G K P T S Q PKLRTRI N AGSR P М т Ρ 577 CAA AAC TCG GGC AAA CCT ACC AGT CAA CCA AAG CTC AGA ACG AGG ATA GCA GGG TCA AGA CCT ATG ACC CCA 227 V N V I E т Т K Т А М V K R S А т V т М К 649 GTG ACC TCC GCC ATC AAG ACA GCC ATG GTG AAC GTC ATA GAG AAG AGA AGT GCA ACT GTG ACC ATG GTC AAA M D K V YE N T 251 S А S T C S М T. C L E н М Ρ К E 721 AGT GCA TCA ACC TGT TCA ATG GAC AAG GTC TAT GAG ATG CTG AAT ACA TGC TTA GAA CAC ATG CCA AAA GAA 275 D HR т ΤΡΚΥΚΡΝΡSΕνν W V т к V D W 793 GAT CAC CGT ACC ACA CCC AAA TAC AAA CCC AAC CCA AGT GAG GTC GTC TGG GTC ATT AAG TGG GTT GAC TAC

# Figure 29- Séquence protéique du fragment de Plu1 déduite de la séquence nucléotidique obtenue par séquençage de la bande de 850 pb.

Nous avons utilisé le code génétique universel et le code à 1 lettre pour les acides aminés.

# II.9. Analyse de la séquence protéique de Plu1 par rapport aux autres membres de la famille Polo

L'alignement de la séquence protéique du fragment de Plu1 avec les séquences des autres Polo a permis de mettre en évidence que Plu1 conserve les séquences consensus caractéristiques de ces protéines et que l'ADNc cloné est différent de celui codant pour la protéine humaine (Figure 30 et Tableau 11).

		190	200	210	220	230	240
Cepik1/pla1			. 200 תמעדדמות דע	MKICNIEIN			. 270 W·102
						ATTONOD.ER	
CEPIKZ	132. IEPEARIE	TIQIVEGVL	I LHNLKI VHRD		DELQVKIGDFGI	ATICOND.ER	K · 190
CePicz	131 · TEHEARFY	TIQVAEGVK.	HLHNLQIIHRD	LKLGNLFLN	EHLQVKIGDFGI	ATFCERN.EK	K:189
rPlk	149:TEPEARYY	LRQIVLGCQ	YLHRNQVIHRD	LKLGNLFLN	EDLEVKIG <b>DFG</b> I	-ATKVEYEGER	K:208
mPlk	149:TEPEARYY	LRQIVLGCQ	YLHRNQ <mark>VI</mark> HRD	LKLGNLFLN	EDLEV <mark>K</mark> IG <mark>DFG</mark> I	LA <mark>TKVEYEGER</mark>	к:208
hPlk	149:TEPEARYY	LRQIVLGCQ	YLHRNR <mark>VI</mark> HRD	LKLGNLFLN	EDLEV <mark>K</mark> IG <mark>DFG</mark> I	L <mark>A</mark> TKVEYDGER	к:208
Plx1	140:TEPEARYY	LKQTISGCQ	YLHSNRVIHRD	LKLGNLFLN	DEMEV <mark>K</mark> IG <mark>DFG</mark> I	LATKVEYDGER	к:199
Polo	121:TEFECRYY	IYOIIOGVK	YLHDNRIIHRD	LKLGNLFLN	DLLHVKIGDFGI	ATRIEYEGER	K:180
Cdc5	177:TEPEVREE	TTOTCGATK	YMHSRRVTHRD	TKLGNTEED	SNYNI KIGDEGI	AVLANESER	к:236
	126 · TEDEV	MMOTICALK	VMUKKDUTUDD	I KI CNIMI D	FSNNVKICDECI		<b>W</b> • 105
Tholk				T KT CNTMMD	ANTANTARTCDECI		W · 106
						AALLQIDGER	R.190
rSnk	175 TEPEVRY	LRQIVSGLK	YLHEQUILHRD	LKLGNFFIN	EAMELKVGDFGI	ARLEPLEHR	R:234
mSnk	1/5:TEPEVRY	CLRQIVSGLK	A THEÕE I THKD	LKLGNFF IN	EAMELKVGDFGI	ARLEPLEHR	R:234
hSnk	178:TEPEVRYY	LRQIVSGLK	YLHEQEILHRD	LKLGNFFIN	EAMELKVGDFGI	LAARLEPLEHR	<b>R</b> :237
rFnk	127:LEPEVRYY	LRQILSGLK	YLHQRG <mark>IL</mark> HRD	LKLGNFFIT	DNMELKVGDFGI	LAARLEPPEQR	K:186
Plu1	1:				AEF <mark>KIGDFGI</mark>	LAPKLEFEGDRI	K: 21
mSak-a	109:SEREARHF	MHQIITGML	YLHSHGILHRD	LTLSNILLT	RNMNIKIADFGI	LATQLNMPHEK	н:168
mSak-b	109:SEREARHE	MHOIITGML	YLHSHGILHRD	LTLSNILLT	RNMNIKIADFGI	<b>ATOLNMPHEK</b>	<b>H</b> :168
hSak	109:SENEARHE		YT.HSHGTT.HRD	TTISNTITT	RNMNTKTADECI		<b>H:</b> 168
Concending	181:***-**	*****	*******	********	*_*_* **	* * * *	*:240
conscisus	101.	VΤ		1	 17T T		• 2 10
		v			VII	I	
	25	0	260	270	. 280	290	. 300
CePlk1/Plc1	193:KTLCGTPN	IYIAPEVIN.	. KAGHSFEVDI	WAVGCILYI	LLEGOPPEESKS	SLEETYSRIRH	N:250
CePlk2		IYTAPEVIN.	KIGHSFEVDL	WATGCTLYT	LLECHPPFESKS	SLEETYSRIKN	N:248
CeDlc2			FTCHAFFVDT	WATCCILYV	LIFCSDDFFSPI		N: 247
vD1k			VELCERVDU	WEIGCINYT	III'GSFFFESKI		N. 266
	209 · NILCGIPN		. KKGHSFEVDV	WSIGCIMII	LIVGRPPFEISC		
mpik	209 KILCGIPK	YIAPEVLS.	.KKGHSFEVDV	WSIGCIMAL	LLVGKPPFETSC	LKETYLRIKK	N:266
hPlk	209:KTLCGTPN	IYIAPEVLS.	.KKEHSFEVDV	WSIGCIMYT	LLVGKPPFETS	CLKETYLRIKK	N:266
Plx1	200:KTLCGTPN	IYIAPEVLG.	.KKGHSFEVDI	WSIGCIMYT	LLVGKPPFETS	CLKETYMRIKK	N:257
Polo	181:KTLCGTAN	IYIA <mark>PE</mark> ILT.	.KKGHSFEVDI	WSI <mark>G</mark> CVMYT	L <b>LVG</b> QPPFETK:	<b>FLKDTYSKIK</b> K	C:238
Cdc5	237:YTICGTPN	IYIAPEVLMG	KHSG <mark>H</mark> SFEVDI	WSL <mark>G</mark> VMLYA	L <b>LIG</b> KP <b>PF</b> QARI	OVNTIYERIKC	R:296
Plo1	196:MTICGTPN	IYIAPEILFN:	SKEGHSFEVDL	WSAGVVMYA	LLIGKPPFODKI	EVKTIYRKIKA	N:255
TbPlk		INTAPETTEG	SREGHSYEVDV	WSLGVILYT	LUVGEPPFOTSI	OVKATYRETEO	C:256
rSnk	235 : RTTCCTPN	IVT.SDFVT.N	KOGHGCESDT	WALCOVMYT	MILCRODEETT	MI.KETYRCIRE	∆:292
menic			KOCHCCESDI			U VETVOCIOE	7.000
hCal			· KQGHGCHSDI			ILKEIIKCIKE	A•292
	230·KIICGIPK		. KQG GC SDI	WALGOVMIT			A•295
rFnk	187:KIICGIPK	YVAPEVLL.	.RQGHGPEADV	WSLGCVMYT	LLCGSPPFETAI	JEKETYRCIKQ	V:244
Plul	22:RTMCGTPN	YIAPEVLG.	.KIGHSFEADV	WALCIMYT	MLVGSTPFETSS	SLKETYARIKH	N: 79
mSak-a	169:YTLCGTPN	IYISPEIAT.	.RSAHGLESDI	WSLCCMSYT	LLIGRPPFDTD:	IVKNTLNKVVL	A:226
mSak-b	169:YTLCGTPN	IYISPEIAT.	.RSAHGLESDI	WSLGCMSYT	LLIGRPPFDTD.	IVKNTLNKVVL	A:226
hSak	169:YTLCGTPN	NYISPEIAT.	.RSAHGLESDV	WSL <mark>G</mark> CMFYT	LLIGRPPFDTD:	IVKNTLNKVVL	A:226
consensus	241:*!**!!*!	!**!!**	_*_ <u>*!</u> _*!	!**!***!*	*!*!**!!**	_****_**_	-:300
	VIII	1	IX			х	
	31	0	320	330	. 340	350	. 360
CePlk1/Plc1	251:NYTIPSI.	.ATOPAASL	IRKMI DPEPTR	RPTAKOVOR	DGFFKSGFMPT	RLPVSCLTMVP	K:308
CePlk2	249:NVVTPTS	TUSEREE		RENARAVCE	DHEEKSGEMDAI		н:306
CePlc2	248: DYWPEN	ASPTANRI.		RPTAFAVI.I.		VDDV HOO	T.: 301
	240.DIVIELN.						
	207.EISTERH.	. INPVAASL		RPITHELLN	DEFFISGIIPA		R·324
mPIK	267:EYSIPKH.	.INPVAASL	LQKMLQTDPTA	RP.I.THELLIN	DEFFTSGYIPA	KUDTICUTIPP	R:324
hPIK	267:EYSIPKH.	. INPVAASL	TŐKWTŐ.LŐB.LA	RP.I.INELLN	DEFFTSGYIPA	STDTLCT.LTDD	R:324
Plx1	258:EYSIPKH.	.INPVAAAL	IQKMIRSDPTS	RPTIDDLLN	DEFFTSGYIPSE	RLPTTCLTVPP	R:315
Polo	239:EYRVPSY.	.LRKPAADM	VIAM <mark>I</mark> QPN <mark>P</mark> ES	RPAIGQLLN	FEFLKGSKVPM	FLPSSCLTMAP	R:296
Cdc5	297:DFSF <mark>P</mark> RDK	(PISDE <mark>G</mark> KIL)	IRDILSLDPIE	RPSLTEIMD	YVWFR.GTFPPS	SIPSTVMSEAP	N:355
Plo1	256:SYSFPSNV	DISAEAKDL	ISSLLTHDPSI	RPSIDDIVD	HEFFHTGYMAS:	<b>FLPDEIL</b> HSMP	I:315
TbPlk	257:RYEFPSHV	DVPESGKEL	IHSILOSRPDO	RPTLLEIRS	HPFFRLPPPT	FAPTTLFYSSR	R:316
rSnk	293:RYTMDSS	LLAPAKHI	TASMISKNDED	RPSLODITR	HDFFIOGETPI	RUSSSCCHTVD	D:350
mSnk	293:RYTMDSS.	TTAPAKHT.	TASMLSKNDFD	RPSLODITR	HDFFI.OGETEDI	RUSSSCCHTVD	D:350
hSnk	296: DVTMDCC	TTADAVUT	TASMICKNIP	PDSIDDIT			2:350
		T OT DADOT		POTEOTED	IDEEEVCOURD		CCC • C
	245.HIILEAS.	. LSLPARQL	LAATI KASPRD	PSILQIIR	UFFFIKGYTPD		
FIUL	SU·KTHFET.	. DSPVAKEL	ISDIESSDEEE	RP. DEVVID	HEFFIQGEVPE	- SPSACVTAP	D.132
msak-a	22/:DYEMPAF.	.LSREAQDL	THOLL RRNPAD	RLSLSSVLD	HPFMSRNPSPKS	SKDVG'IVEDSM	D:284
mSak-b	227:DYEMPAF.	.LSREAQDL	IHQLI RRNPAD	RÍSISSVID	HPFMSRNPSPKS	SKDVGTVEDSM	D:284
hSak	227:DYEMPTF.	.LSIEAKDL	IHQL <mark>I</mark> RRN <mark>P</mark> AD	RLSLSSVLD	HPFMSRNSSTKS	SKDLGTVEDSI	D:284
consensus	301:-*-*!	***	**!!	!*****-	****_*_	_**_*_**	-:360
			37.7	1			

	370	380	390	. 400	. 410 .	420
CePlk1/Plc1	309:FGGHETS				MM	EENVA:322
CePlk2	307:LNDDE				ŸA	EENVS:318
CePlc2	302:HK				•••••	EQDVK:308
rPlk	325:FSIAPSS				LD	PSNRK:338
mPlk	325:FSIAPSS				LD	PSSRK:338
hPlk	325:FSIAPSS				LD	PSNRK:338
Plx1	316:FSIAPST				<b>I</b> D	QSLRK:329
Polo	297:IGSNDTI				ĒD	SMHRK:310
Cdc5	356:FEDIPEEQSLVN			FKDCMEKSLLL	ESMSSDKIQ	RQKRD:392
Plo1	316:WPSSQSKSSFQR		1	ILDFVASASGV	GFGNSAG <mark>V</mark> E	KNKPY:352
TbPlk	317: RQHSDDPRGHAQGPLP	LRRQKSGD	IQAALQKQTPQF	RRQPQSQPKSVI	EAVRCISSP	RVSRE:376
rSnk	351:FHLSSPA		KNFFKKAAAA	ALFGGKKDKAR	YNDTHNK <mark>V</mark> SI	KEDED:391
mSnk	351:FHLSSPA		KNFFKKAAAA	ALFGGKKDKAR	yndthnk <mark>v</mark> si	KEDED:391
hSnk	354:FHLSSPA		KNFFKKAAAA	ALFGGKKDKAR	YIDTHNR <mark>V</mark> SI	KEDED:394
rFnk	303:LTPPNPA		RSLFAKVTKS	SLFGRRKSKN.	KNHS	EEQDN:337
Plu1	136:FPIT		KVLISDRKGI	DLVTNEFCRLK	REST	LQRRD:168
mSak-a	285:SGHATLS		TTIT#	ASSGTSLSGSL	LD.RRLLVG	QPLPN:319
mSak-b	285:SGHATLS		TTIT#	ASSGTSLSGSL	LD.RRLL <mark>V</mark> G	QPLPN:319
hSak	285:SGHATIS		TAIT#	ASSSTSISGSL	FDKRRLLIG	QPLPN:320
consensus	361:				*_	:420
	430	440	450	460	470	480
Ceplk1/plc1		110 C	. 450		LDOHIVS	400
CePlk2		G	•••••	I.GD.	TDAHLVS	RNSER: 350
CeDlc2		0			TVOFVAN	FFTSF: 338
rDlk			•••••			DDEKE.320
mDlk			•••••	ND		DREKE: 359
hDlk		• • • • • • • • •	•••••			DDEKE:320
Plx1		• • • • • • • • •	•••••		LVEKOVA	PAKEE:353
Dolo		••••	•••••	סבו. נידיס		7
FOID	2TT · E DIJURINGTKEDDIKTE					DATIA: 340

393:YISSIKSSIDKLEEYHQ.....NRPFLPHSLS..PGGTK:424

353:ALRTDEVDNDRILPSVLSP.....RDRVNPVMKIG..PETKP:387

377: VLQPISTNLPKTDRYHLKPSCPAVASARFHGALGGDCNNNNNNNNNNNNAIN..PINSA: 434

392:IYKLRHDLKKTSITQQPSKHRTDEELQ.PPPTT:423392:IYKLRHDLKKVSITQQPSKHRADEEPQ.PPPTT:423

395:IYKLRHDLKKTSITQQP.....SKHRTDEELQ..PPTTT:426

338:VSCLVSGLMRTSIGHPD.....VRPEAPAASA..LAPVS:369 169:VTAPLSDIINNESSQPV....SGSNTQNSGK..PTSQP:200

320:KITVFQKNKNSSDFSS.....GDGSNFCTQWGNPEQEANS:354

320:KITVFQKNKNSSDFSS.....GDGSNFCTQWGNPEQEANS:354 321:KMTVFPKNKSSTDFSSS.....GDGNSFYTQWGN..QETSN:354

421:-----:480

	490 500 .	510	520 530 540
CePlk1/Plc1	355: ERAQQQAAEATFREPEDAYLSQI	FHQVAVLLE	QRIPGLEEEEAALDGYQS:404
CePlk2	350:QQTHRMEAYRQPTDCYLSNI	LAQVNDLLA	TPTADIDDAEAALDSYQS:397
CePlc2	338:IRRFVKTEQASSFGDELSQI	QAQISHILQ	NVVASKNKSSTRFGLNHS:385
rPlk	359:EPVVRETNEAIECHLSDI	LQQLTSVNA	SKPSERGLVRQEEAED:402
mPlk	359:EPVVRETNEAIECHLSDI	LQQLTSVNA	SKPSERGLVRQEEAED:402
hPlk	359:EPVVRETGEVVDCHLSD	ILQQLHSVNA	SKPSERGLVRQEEAED:402
Plx1	353:EMQQPEFTEPADCYLSEM	ILQQLTCLNA	VKPSERALIRQEEAED:396
Polo	340:SAQVCRHSEDYRSDIES	YQQLTNLIN	GKPRILQGNLGDENTD:383
Cdc5	425:QKYKEVVDIEAQRRLNDLAREAF	RIRRAQQAVLRK	.ELIATSTNVIKSEISLRILASEC:481
Plo1	388:VPSKLSTALHAARKSTDGSLGSF	RVKVLREESQ	.SFVPTKSAVTEQVEPIQLIRSLS:442
TbPlk	435:AVSIPSPRADAIRPLTQVAAPGO	GADESAETTATTPR	VQLRPHPAIEEEEKNELTAVHDQL:494
rSnk	424:FAKSGTSAVENKQQIGDAIRMI	RGTLGSCSSSS	ECLEDSTMGSVADTVARVLRGC: 479
mSnk	424:VARSGTSAVENKQQIGDAIRMI	RGTLGSCSSSS	ECLEDSTMGSVADTVARVLRGC: 479
hSnk	427:VARSGTPAVENKQQIGDAIRMI	RGTLGSCSSSS	ECLEDSTMGSVADTVARVLRGC: 482
rFnk	370:LVETAAEDSS	RGTLASSGDG	FEEGLTVTTVVESALCALRNC:411
Plul	201:KLRTRIAGSRPMTPVTSAIKTAN	IVNVIEKRSAT	VTMKSASTCSMDKVYEMLNTC:254
mSak-a	355:RGRGRVIEDAEERPHSRYLRRAH	ISSDRASPSN	QSRAKTYSVERCHSVEMLS:405
mSak-b	355:RGRGRVIEDAEERPHSRYLRRAH	ISSDRASPSN	QSRAKTYSVERCHSVEMLS:405
hSak	355:SGRGRVIQDAEERPHSRYLRRAY	SSDRSGTSNS	QSQAKTYTMERCHSAEMLS:406
consensus	481:*	**	:540

Cdc5

Plo1

TbPlk

rSnk

mSnk hSnk

rFnk

Plu1 mSak-a

hSak consensus

mSak-b

	550	) 560	570 .	580	. 590	600
CePlk1/Plc1	405:PECLP					:409
CePlk2	398:PEALP					:402
CePlc2	386:PEATP					:390
rPlk	403:PACIP					:407
mPlk	403:PACIP					:407
hPlk	403:PACIP					:407
Plx1	397:PASIP					:401
Polo	384:PAAQP					:388
Cdc5	482:HLTLN	.G	IVEAEAQYF	KMGGLPKSRLPKI	<u> КНР</u>	:511
Plo1	443:ANTVSRLSKV	/GNMKSDIW	ISVKKTALF	KIGMALEAHTHAI	LTSEDADSE	:489
TbPlk	495:HQTLREIGD	LSP.REVAT	RTQTKRSPQ	QVAPLPVANSPT	<b>ISTVPALTPRCE</b>	DEPA:547
rSnk	480:LENMPEADC	IPKEQLS			.TS	:497
mSnk	480:LENMPEADC	LPKEQLS			.TS	:497
hSnk	483:LENMPEADC	IPKEQLS			.TS	:500
rFnk	412:VAFMPPAEQ	NPAPLAQ			.PEP	:430
Plul	255:LEHMPKEDH	RTTPKYKN			.PSE	:274
mSak-a	406:KPRRS			LDENQ	DHSSNHHCLGKT	CPFPF:430
mSak-b	406:KPRRS			LDENÇ		:418
hSak	407:VSKRSGGGEN	VEERYSPTDNNA	NIFNFFKEKTSS	SSSGSFERPDNN	DALSNHLCPGKT	PFPF:466
consensus	541:**					:600
	610	)620	630 .	640	. 650	660
CePlk1/Plc1	409:VFW	ISKWVDYSDK	.YGIGYQLCDNS	SVGVLFNDNSRIN	ILDQAGNELTYI	EKSN:460
CePlk2	402:VFW	ISKWVDYSDK	.YGIGYQLCDNS	SVGVLFNDNSRIN	4LDTAGTQLTYI	EKTE:453
CePlc2	390:IFW	/SQWVHFPN	.HGIGYRLCENS	SSGMLFNDNTQMF	(VNSAGNQLTFV	DENN:440
rPlk	407:IFW	/SKWVDYSDK	.YGLGYQLCDNS	SVGVLFNDSTRLI	ILYNDGDSLQYI	ERDG:458
mPlk	407:IFW	/SKWVDYSDK	.YGLGYQLCDNS	SVGVLFNDSTRLI	ILYNDGDSLQYI	ERDG:458
hPlk	407:IFW	/SKWVDYSDK	.YGLGYQLCDNS	SVGVLFNDSTRLI	ILYNDGDSLQYI	ERDG:458
Plx1	401:IFW	LSKWVDYSDK	.YGLGYQLCDNS	SVGVLFNDSTRL	IMYNDGDSLQYI	ERNN:452
Polo	388:LFW	ISKWVDYSDK	.YGFGYQLCDEC	GIGVMFNDTTKL	ILLPNQINVHFI	DKDG:439
Cdc5	511:MIV	TKWVDYSNK	.HGFSYQLSTEI	DIGVLFNNGTTVI	LRLADAEEFWYI	SYDD:561
Plo1	489:PVLF	ITKWVDYSNK	.YGLGYQLSDES	SVGVHFNDDTSLI	LFSADEEVVEY <i>F</i>	LHPK:541
TbPlk	548:PSLPLPTVW	/TSFADFSEK	.YGLCYRLSTGH	HTGVHFNDSTKM	WEPITNRVEYY	MRVK:604
rSnk	497:FQW	JTKWVDYSNK	.YGFGYQLSDHI	rvgvlfnngahms	SLLPDKKT <b>V</b> HYY	AELG:548
mSnk	497:FQWV	JTKWVDYSNK	.YGFGYQLSDHI	<b>FV</b> GVLFNNGAHMS	SLLPDKKT <b>V</b> HYY	AELG:548
hSnk	500:FQW	TKWVDYSNK	.YGFGYQLSDH	rvgvlfnngahms	SLLPDKKT <b>V</b> HYY	AELG:551
rFnk	430:LVW	/SKWVDYSNK	.FGFGYQLSSRF	RVAVLFNDGTHM	ALSANRKT <b>V</b> HYN	IPTST:481
Plul	274: <b>v</b> vwv	JIKWVDY	· · <u>·</u> · · · <u>·</u> · · · · ·			:284
mSak-a	431:ADQTPQMEM	/QQWFGNLQMNAI	HLGETNEHHTVS	SPNRDFQDYPDL	Q.DTLRNAWTD1	RASK:489
mSak-b	418:		Y	SP		:421
hSak	467:ADPTPQTET	/QQWFGNLQINAI	HLRKTTEYDSI	SPNRDFQGHPDL	OKDTSKNAWTDI	KVKK:526
consensus	601:*-*-	*******_*	_**_****_*_*	*******	_**_*_*_	<b>:</b> 660
			Polo Box	K		

\_\_\_\_Polo Box\_\_\_\_\_

#### Figure 30- Alignement des différentes protéines de la famille Polo.

Cet alignement a été réalisé par le logiciel clustalX et mis en forme par MacShadeBox. Les domaines I à XI soulignés (en bleu) sont les régions caractéristiques des protéines kinases décrites par Hanks et ses collaborateurs (89). La «Polo box» est également soulignée (en violet). Les acides aminés surlignés en noir sont conservés pour toutes les protéines. Les acides aminés surlignés en gris clair sont identiques à au moins 60% des séquences alignées. Les acides aminés surlignés en gris foncé appartiennent à la même famille dans au moins 60% des séquences.

- ! : représente les acides aminés identiques dans toutes les séquences.
- \* : représente des acides aminés similaires dans les séquences alignées.
- : représente des acides aminés différents dans plus de 40% des séquences.
|       | mPlk | rPlk | hPlk | Plx1 | Polo | Plu1 | Plc2 | Plol | TbPlk | Cdc5 |
|-------|------|------|------|------|------|------|------|------|-------|------|
| mPlk  |      | 98.7 | 97.0 | 86.3 | 59.0 | 44.2 | 53.5 | 35.6 | 27.3  | 36.7 |
| rPlk  | 98.7 |      | 97.4 | 86.3 | 59.0 | 44.6 | 52.7 | 35.6 | 27.3  | 37.0 |
| hPlk  | 94.3 | 94.8 |      | 85.8 | 58.2 | 43.5 | 52.3 | 35.6 | 27.0  | 36.4 |
| Plx1  | 77.7 | 77.7 | 79.0 |      | 61.1 | 45.6 | 53.5 | 37.7 | 27.3  | 37.0 |
| Polo  | 49.4 | 49.4 | 48.1 | 49.8 |      | 43.9 | 52.2 | 35.0 | 28.6  | 36.4 |
| Plu1  | 34.0 | 34.0 | 32.6 | 33.3 | 29.5 |      | 39.9 | 38.5 | 30.5  | 36.2 |
| Plc2  | 42.0 | 41.6 | 41.6 | 43.2 | 39.2 | 30.6 |      | 35.0 | 26.0  | 35.4 |
| Plo1  | 27.6 | 27.6 | 27.0 | 30.1 | 25.8 | 27.0 | 27.3 |      | 35.9  | 39.9 |
| TbPlk | 20.8 | 20.8 | 20.8 | 21.3 | 19.2 | 20.2 | 17.9 | 25.8 |       | 30.3 |
| Cdc5  | 26.3 | 26.3 | 25.3 | 25.6 | 23.1 | 26.9 | 24.4 | 27.6 | 22.4  |      |

## Tableau 11- Pourcentage d'identité et de similarité entre les domaines compris entre OHN20 et OHN21 des différentes Polo.

Ces pourcentages ont été obtenu d'après l'alignement effectué avec le logiciel clustalX.

En bleu les pourcentages de similarité, en noir les pourcentages d'identité.

mPlk : Protéine Polo de souris, rPlk : Polo de rat, hPlk : Polo humaine, Plx1 : Polo de xénope, Polo : Polo de drosophile, Plu1 : Polo d'oursin, Plc2 : Polo de *Caenorhabditis elegans*, Plo1 : Polo de *Schizosaccharomyces pombe*, TbPlk : Polo de *Trypanosoma brucei*, Cdc5 : Polo de *Saccharomyces cerevisiae*.

#### II.10. Expression du peptide de Plu1

Le fragment d'ADNc de Plu1 a été cloné dans un vecteur pTrcHis pour obtenir une protéine de fusion His-Plu1 facile à purifier sur billes d'agarose sur lesquelles sont fixées des ions  $Nr^{2+}$  (Ni-NTA). Or il s'est avéré que cette protéine fusion, His-Plu1, est insoluble. Afin de rendre Plu1 soluble, l'ADN codant pour ce fragment a été cloné dans le vecteur pGex-4T1 qui contient l'ADN codant pour la GST. La GST est une protéine hydrophile de 26 kDa utilisée comme fusion car elle permet de purifier la protéine de fusion par des billes de GSH (Gluthation). La protéine de fusion GST-Plu1 a été exprimée dans les bactéries *Escherichia coli* BL21(DE3) (Figure 31).



**Figure 31- Analyse de l'expression et de la purification de la protéine fusion GST-Plu1. A-** Expression de la protéine GST-Plu1.

La bande située entre 74 et 49,8 kDa, au niveau des puits T3/C, semble correspondre à la protéine de fusion GST-Plu1 surexprimée par les bactéries. En effet, on attendait une bande à environ 57,7 kDa (GST= 26 kDa et Plu1= 31,7 kDa).

S: Surnageant (protéines solubles), C: Culot (Protéines insolubles), To: Prélèvement de 1 ml effectué avant l'induction de l'expression, T3: Prélèvement de 1 ml effectué après 3 heures d'induction.

**B**- Purification de la protéine GST-Plu1.

Culot: culot obtenu après l'extraction, Av: surnageant de l'extraction avant le passage sur les billes de GSH-sépharose, Ap: surnageant de l'extraction après le passage sur les billes de GSH-sépharose, E1 et E2: Elution 1 et 2 des billes, B: Billes après élution. PM: Poids Moléculaire.

Il apparaît clairement sur la figure 34B que la protéine de fusion GST-Plu1, dans ces conditions d'expression (culture à 37°C et expression à 30°C avec 0,1 mM d'IPTG), est insoluble puisqu'elle reste dans le culot après extraction. Les conditions ont été optimisées pour augmenter sa solubilité (culture à 20°C et expression avec 0,4 mM d'IPTG à 20°C). La protéine reste insoluble malgré des conditions d'extraction drastiques (Figure 32).





Les bactéries d'une culture de 500 ml sont tout d'abord lysées par la solution A, les protéines solubles sont analysées **ligne 1**. Le culot résultant de cette première étape est à son tour traité par la solution B. Les protéines solubilisées par cette deuxième étape sont visualisées **ligne 2** Le culot restant est alors traité par la solution C. Les protéines solubilisées par cette troisième étape sont analysées **ligne 3**. Le culot de protéines encore insolubles est traité par la solution D. Les protéines solubilisées sont visualisées **ligne 4**. Le culot résultant est à nouveau traité par la solution D et les protéines solubles sont visibles **ligne 5**. Le culot est alors traité par de l'eau. Les protéines solubilisées sont analysées **ligne 6**. Cette étape est répétée une nouvelle fois sur le culot restant. Les protéines solubilisées par cette dernière étape sont visibles **ligne 7**. Les protéines du culot résultant de ces sept étapes successives sont analysé **ligne 8**.

 $30 \ \mu l$  de chaque surnageant ( $15 \ \mu l$  d'échantillon et  $15 \ \mu l$  de tampon de dépôt) et  $30 \ \mu l$  du dernier culot dissout dans 1 ml de tampon de dépôt ont été déposés sur un gel d'acrylamide (SDS-PAGE). Le gel a ensuite été coloré au bleu de Coomassie.

Solution A : 10 mM HEPES, 2 mM MgCl2 et 100 µg/ml final de Lysosyme

Solution B: 50mM TrispH8.5, 1M NaCl

Solution C: 50mM Tris, 2.5M NaCl

Solution D: 1 M NaCl, 5% tritonX100, 5 mM EDTA

#### III. Analyse de la régulation de Plu1 au cours du cycle cellulaire

#### III.11. Utilisation des anticorps anti-Plu1

#### III.11.1. Synthèse de peptides et d'anticorps

L'expression du fragment de la protéine Plu1 étant rendue difficile par son insolubilité, la synthèse de peptides spécifiques de Plu1 pour la synthèse d'anticorps (Ac) paraissait être la meilleure solution et la plus rapide pour obtenir des anticorps anti-Plu1. Le choix des peptides s'est fait par rapport au profil d'hydrophobicité et aux séquences consensus des différentes Polo (Figure 33). Ces deux anticorps ont été fabriqués par Philippe Robert (SmithKline Beecham, Rennes).

Le peptide Polo a (68-83) est situé dans une région homologue aux différentes protéines Polo:

Nter-CSLKETYARIRHNKYH-Cter (16 acides aminés)

Le peptide Polo b (259-274) est situé dans une région spécifique de Plu1:

Nter-CEHMPKEDHRTTPKYKPN-Cter (18 acides aminés)

Ces deux peptides sont couplés en N terminal à une cystéine.



Figure 33- Position des deux peptides, polo a et polo b (en rouge), synthétisés pour la production d'anticorps anti-Plu1 sur le schéma caractéristique des protéines de la famille Polo.

Les deux anticorps anti-Plu1 ont été purifiés par affinité pour la protéine A et testés en Western blot sur le peptide correspondant au fragment de 864 pb exprimé en système bactérien puis sur un lysat d'œufs d'oursin non fécondés. Les deux anticorps reconnaissent une protéine dans les deux cas.

#### III.11.2. Immunoprécipitation

Pour effectuer l'immunoprécipitation, deux possibilités sont envisageables. Tout d'abord, il est possible d'utiliser les anticorps en solution. Cette méthode présente un inconvénient majeur, les anticorps apparaissent sur les gels d'acrylamide et peuvent masquer des protéines de même poids moléculaire. L'utilisation des anticorps fixés de façon covalente aux billes de protéine A permet de ne pas éluer les anticorps en même temps que les protéines immunoprécipitées.

Dans un premier temps, afin d'isoler la protéine Plu1 native, des immunoprécipitations avec des anticorps en solution ont été effectuées sur 4 mg de protéines d'un lysat d'œufs d'oursin non fécondés (Figure 34).



Figure 34- Analyses des immunoprécipitations (IP) effectuées avec l'anticorps anti-Plu1(19A).

Les 40  $\mu$ l de billes de protéines A, servant à récupérer l'anticorps dans le lysat après l'immunoprécipitation, sont lavées puis reprises dans 100  $\mu$ l de tampon de Laemmli. 40  $\mu$ l des 100  $\mu$ l sont déposés en gel SDS-PAGE pour une coloration au nitrate d'argent (\*: Plu1) (A) et 20  $\mu$ l pour le western blot avec l'anticorps anti-Plu1(19A) (B). NF: IP sur 4 mg de protéines d'œufs d'oursin non fécondés, EA: billes sans anticorps (témoin négatif), T: billes avec anticorps avant passage dans l'extrait protéique (témoin négatif), B: IP sur 4 mg de protéines d'embryon d'oursin au stade blastula, PM: Poids Moléculaire.

Les variations de la quantité de protéine Plu1 au cours du cycle cellulaire et du développement ont été évaluées par immunoprécipitation sur une quantité fixe de protéines d'œufs d'oursin à différents stades de division. La première division après la fécondation dure environ 120 min, ce qui permet de faire des prélèvements aux différentes phases du cycle et d'étudier les variations d'activité et de synthèse/dégradation des protéines telles que Plu1.

Pour se situer dans le cycle cellulaire au cours des premières divisions et du développement des embryons d'oursin, l'activité de cdc2/cycline B a été évaluée sur les mêmes extraits d'œufs ayant servi aux immunoprécipitations avec l'anticorps anti-Plu1. Il est

possible de purifier le complexe MPF actif par chromatographie d'affinité pour la protéine p9 liées à des billes de sépharose. L'activité du MPF est ensuite mesurée par évaluation de la phosphorylation de l'histone H1 (Figure 35). L'activité du complexe apparaît en fin de phase G2 pour atteindre un maximum en mitose et diminuer dès la fin de lanaphase. Au contraire, la protéine cdc2 reste stable tout au long du cycle, c'est la cycline B qui par sa synthèse et sa dégradation régule l'activité du complexe.

Les protéines immunoprécipitées par les anticorps anti-Plu1 sont visualisées sur un gel SDS-PAGE à 10% après coloration au nitrate d'argent (Figure 36). Il apparaît que plusieurs protéines co-précipitent avec Plu1. Deux protéines de haut poids moléculaire (environ 220 kDa et 150 kDa) cyclent au cours des différentes divisions.

La protéine de 220 kDa qui co-précipite avec Plu1 est de même poids moléculaire que la protéine Asp («Abnormal-spindle protein») trouvée chez la drosophile (49). Cette protéine co-précipite avec la protéine Polo de drosophile. D'autre part, Tavares et ses collaborateurs ont démontré que Asp est un substrat de Polo (243). D'autres expériences ont montré qu'après phosphorylation par Polo, in vitro et in vivo, Asp devient un épitope MPM2 (49). Il apparaît également que Asp intervient dans les mêmes processus cellulaires que Polo tels que la formation du fuseau mitotique et des centrosomes. Ceci a été en partie démontré par le synergisme des doubles mutants (75). De plus Polo et Asp co-localisent au niveau des centrosomes.

Il est probable que la protéine Klp (Kinesin-like protein) soit la protéine de haut poids moléculaire d'environ 150 kDa, par analogie avec ce qui a été démontré chez la drosophile (Tavares A. et al, poster, Conférence Jacques Monod «Cell cycle» Roscoff 2000). Cette protéine intervient au niveau de la formation du fuseau mitotique et des centrosomes ce qui est tout à fait compatible avec les rôles des protéines Polo.



Figure 35– Activité kinase de cdc2/cycline B au cours du développement de l'embryon d'oursin.



**Figure 36– Analyse des protéines immunoprécipitées par l'anticorps anti-Plu1. A-** Les protéines immunoprécipitées avec l'anticorps anti-Plu1 ont été séparées sur un gel SDS-PAGE à 10% qui a été coloré au nitrate d'argent **B-** Représentation des variations des protéines de haut PM au cours du développement de

**B**- Représentation des variations des protéines de haut PM au cours du développement de l'embryon d'oursin.

#### III.12. Activité kinase de Plu1 et Plk

La protéine Plx1 (protéine Polo du xénope) phosphoryle la phosphatase Cdc25C (131). L'activité kinase des immunoprécipités de la protéine Plu1 a donc été testée sur la protéine phosphatase Cdc25A, que nous possédions au laboratoire (Figure 37). L'autoradiographie du gel SDS-PAGE coloré au bleu de Coomassie montre que Plu1 immunoprécipitée phosphoryle Cdc25A.



## Figure 37- Analyse de l'activité kinase de la protéine Polo d'oursin immunoprécipitée sur la phosphatase Cdc25A.

Après immunoprécipitation, les anticorps sont récupérés avec 25  $\mu$ l de billes de protéine A. Ces billes sont lavées dans du tampon B puis dans du tampon C. Le dosage de l'activité kinase se fait dans un volume final de 55  $\mu$ l (25  $\mu$ l de billes, 2  $\mu$ l de Cdc25A, 23  $\mu$ l de tampon C et 5  $\mu$ l d' $\gamma^{32}$ P-ATP à 90  $\mu$ M) pendant 15 min à 30°C. Les billes et le surnageant sont séparés par une brève centrifugation. 100  $\mu$ l de tampon de Laemmli 2X sont ajoutés aux 25  $\mu$ l de billes et 30  $\mu$ l de tampon de Laemmli 2X sont ajoutés au 30  $\mu$ l de surnageant. 60  $\mu$ l de chaque échantillons sont déposés en SDS-PAGE. Le gel est coloré au bleu de Coomassie (Bas) puis autoradiographié (Haut).

Afin de savoir si la Polo humaine (Plk) possède les mêmes propriétés, nous avons testé l'activité kinase de Plk sur Cdc25A, Cdc25B et Cdc25C (Figure 38).



**Figure 38- Test d'activité kinase de Plk sur les phosphatases Cdc25A, B et C.** En haut, le gel SDS-PAGE a été coloré au bleu de Coomassie puis autoradiographié, en bas.

La protéine Plk phosphoryle bien Cdc25C mais aussi Cdc25A et très peu Cdc25B. Les trois phosphatases faisant partie de la même famille multigénique présentent de fortes homologies de séquences. Il est donc possible qu'elles aient, toutes trois, des sites phosphorylables par Plk. Cependant, elles n'interviennent pas au même moment du cycle et

seule Cdc25C se trouve présente en même temps que Plk. Il en est sans doute de même pour Plu1.

#### III.13. Myt1

La protéine kinase Myt1 est un régulateur négatif du complexe Cdk1/cycline B, localisée au niveau de la membrane plasmique (263). Myt1 se lie par son domaine C-terminale à Cdk1/cycline B et ainsi séquestre le complexe dans le cytoplasme. De plus, Myt1 inhibe Cdk1/cycline B par phosphorylation des résidus thréonine 14 et tyrosine 15 de Cdk1 (263). Lors de l'auto-amplification de l'activation du MPF, Myt1 est phosphorylé et inhibé par Cdk1/cycline B. Cependant, il est paru intéressant de savoir s'il n'y avait pas d'autres voies d'inhibitions de Myt1. L'activité kinase de Plk a donc été testée sur Myt1 (Figure 39).



#### Figure 39- Phosphorylation de Myt1 par la kinase Plk.

Une quantité croissante de Plk est mise en présence d'une quantité fixe de Myt1. Le test se fait dans un volume final de 30  $\mu$ l (Tampon C qsp 30  $\mu$ l, Plk, Myt1, d' $\gamma^{32}$ P-ATP à 90  $\mu$ M) pendant 15 min à 30°C. Le tout est déposé en SDS-PAGE. Le gel est coloré au bleu de Coomassie (en haut) et autoradiographié (en bas).

L'autoradiographie démontre que Myt1 s'autophosphoryle et qu'elle est phosphorylée par Plk. Il reste à savoir si cette phosphorylation a un effet sur l'activité kinase de Myt1. Nous avons alors testé l'activité de Myt1 après phosphorylation par Plk sur cdc2/cycline B. Cependant, il est apparu que la protéine Myt1 recombinante ne possède pas le site de fixation à cdc2/cycline B.

Des molécules potentiellement inhibitrices de l'activité kinase de Myt1 ont été testées en mesurant leur effet sur l'autophosphorylation de l'enzyme (Figures 40, Tableau 12).





Flavopiridol (nM)

107

#### B

Olomoucine ( $\mu$ M)



Figure 40- Analyse du pouvoir potentiellement inhibiteur de plusieurs molécules sur l'activité kinase de Myt1.

A- L'activité inhibitrice des différentes molécules 1 à 17 a été testée sur l'activité d'autophosphorylation de Myt1 par autoradiographie de SDS-PAGE colorés au bleu de Coomassie.

**B**- L'activité inhibitrice de l'olomoucine, du purvalanol, de la roscovitine, de HD et de différents analogues de HD a été évaluée sur l'autophosphorylation de Myt1 par autoradiographie de SDS-PAGE colorés au bleu de Coomassie.

Différentes quantités d'inhibiteur sont mises en présence d'une quantité fixe de Myt1. Le test se fait dans un volume final de 30  $\mu$ l (Tampon C qsp 30  $\mu$ l, Plk, Myt1, d' $\gamma^{32}$ P-ATP à 90  $\mu$ M) pendant 15 min à 30°C. Le tout est déposé en SDS-PAGE. Le gel est coloré au bleu de Coomassie (en bas) et autoradiographié (en haut).

Inhibiteurs	Action sur Myt1	Dose
Olomoucine	-	1000 µM
Purvalanol	-	1 μM
Roscovitine	-	33,33 µM
HD	+++	1 μM
HD 661201	-	10 µM
HD 628191	-	10 µM
HD 639187	-	10 µM
HD 668605	-	10 µM
HD 662255	-	10 µM
HD 38643	-	10 µM
HD 22709	-	10 µM
HD 575278	-	10 µM
HD 671403	+	10 µM
Agelastatin	+	10 µM
Agelasin	+	1 μM
Dibromophakellstatin	-	10 µM
Axinohydantoin	+++	1 μM
Oroidina	++	10 µM
GRP 18566	+++	1 μM
GRP 18510	+++	1 μM
GRP 18594	+++	1 μM
Odilina	+	10 µM
GRP 28190	+	10 µM
Hymenidin	+	10 µM
GRP 28191	+	1 μM
Dibromoageliferin	-	10 µM
Sceptrina	-	1 μM
Dispacamide	-	1 μM
Agelongina	+	10 µM
Flavopiridol	-	1 μM

## Tableau12---Actiondesmoléculespotentiellementinhibitricesdel'activitéd'autophosphorylation de Myt1.

Les doses correspondent à la quantité de produit nécessaire pour obtenir une inhibition de 50% ou à la quantité maximale testée dans le cas d'une absence d'inhibition.

La protéine Myt1 est inhibée à 50% de son activité par 1  $\mu$ M HD, Axinohydantoïne, GRP 18566, GRP 18510 et GRP 18594 (Tableau 12).

#### Chapitre III

#### ETUDE DE LA PROTEINE SNK

#### I. Etude des substrats

Différentes protéines potentiellement phosphorylables par Snk ont été testées (MBP, Tau, Histone H1, caséine, cycline D1, HMGI, p9 et la glycogène synthase). Les tests consistent à incuber, 30 min à 30°C, Snk, substrat, tampon et  $\gamma P^{32}ATP$ . Pour arrêter la réaction on ajoute 30 µl de tampon de Laemmli. Puis on dépose les 60 µl du test dans un gel SDS-PAGE à 10 %. Ce gel est coloré au bleu de Coomassie, séché et exposé pour une autoradiographie à -80°C afin de détecter les protéines phosphorylées. La révélation se fait au bout de 24 heures environ, temps variable en fonction de la quantité de radioactivité utilisée (Figure 41). On peut constater que Snk s'autophosphoryle et qu'elle phosphoryle également la MBP, l'histone H1 et la caséine. En ce qui concerne la glycogen synthase (GS), des tests complémentaires ont été effectués et il s'avère qu'elle s'autophosphoryle. D'autre part, on ne constate pas d'augmentation de la phosphorylation avec Snk. La glycogène synthase n'est donc pas phosphorylée par Snk.



Figure 41– Test de l'activité kinase de la protéine Snk sur différents substrats. Le test se fait dans un volume final de 30  $\mu$ l (Tampon C qsp 30  $\mu$ l, substrat potentiel, Snk en quantité fixe, d' $\gamma^{32}$ P-ATP à 90  $\mu$ M) pendant 15 min à 30°C. Le tout est déposé en SDS-PAGE. Le gel est coloré au bleu de Coomassie (en bas) et autoradiographié (en haut).

- A- Gel SDS-PAGE à 12% d'acrylamide.
- B- Gel SDS-PAGE à 10% d'acrylamide.

#### II. La phosphatase Cdc25A

Afin de connaître le ou les substrats de la protéine kinase Snk, des tests, *in vitro*, ont été effectués sur différentes molécules. J'ai ainsi montré que Snk s'autophosphoryle et qu'elle phosphoryle la phosphatase Cdc25A (Figure 41). Cdc25A intervient au niveau de la transition G1/S en déphosphorylant les complexes Cdk2/cycline E et Cdk2/cycline A. Pour s'assurer de la spécificité de la phosphorylation de Snk sur Cdc25A, le même test a été fait sur les phosphatases Cdc25E et Cdc25C (Figure 42).



Figure 42- Test d'activité kinase de Snk sur les phosphatases Cdc25A,B et C.

En haut, le gel SDS-PAGE a été coloré au bleu de Coomassie puis autoradiographié, en bas.

Snk phosphoryle donc bien Cdc25A mais aussi Cdc25B et très peu Cdc25C. Cela peut s'expliquer par l'existence de différents sites de phosphorylation spécifiques de chaque enzyme. La phosphorylation de Cdc25A par Snk se fait sur la Ser 292 (Figure 43). On retrouve des Ser avec un environnement en acides aminés similaire dans les séquences des protéines Cdc25B et C. Cependant, il faudrait identifier les acides aminés phosphorylés par Snk sur les trois phosphatases pour confirmer la spécificité de Snk pour Cdc25A.

CDC25A MELG-PSPAPRRLLF A---CSPP--PASOP VV----KALFGAS-- --AAGGLSPVTNLTV TMDOLOGLGSDYEOP --LEVKNNSNLORMG 74 CDC25B MEVPOPEPAPGSALS PAGVCGGAORPGHLP GLLLGSHGLLGSPV- --RAAASSPVTTLTO TMHDLAGLGSRSRLT H-LSLSRRASESSLS 86 CDC25C ----- ---- ---- -MS---TELFSSTRE EGSSGSGPSFRSNOR KMLNLL-LERDTSFT VCPDVPRTPVGKFL-54 --SSESTDSGFCLDS PGPLDSK------ -----ENLENP MRRIHS--LPQKLLG CSPALKR-SHSDSLD HDIFQ-----LIDP CDC25A 136 CDC25B SESSESSDAGLCMDS PSPMDPHMAEOTFEQ AIQAASRIIRNEQFA IRRFQS--MPVRLLG HSPVLRNITNSQAPD GRRKSEAGSGAASSS 174 CDC25C CDC25A DENKENEAFEFKKPV RPVSRGCLHSHGLOE ---GKDLFTORONSA -OLGMLSSNERDSSE PGNFIPLFTPOSPVT ATLSD--EDDGFVDL 220 CDC25B GEDKENDGFVFKMPW KPTHPS--STHALAE WASRREAFAORPSSA PDLMCLSPDRKMEVE --ELSPLALGRFSLT PAEGDTEEDDGFVDI 260 CDC25C GMNHDOHLMKCSPAO LLCS----TPNGLDR -----GHRKRDA --MCSSSANKENDN- ----GNLVDSEMKYL GSP---I---TTVPK 175 CDC25A LDGE-NLKNEEETPS CMASLWTAPLV--MR TTN----LDNRC-K LFDSPSLCSSSTRSV LKRPERSQEESPPGS TKRRKSMSGASPKES 301 CDC25B LES--DLKDDDAVPP GMESLISAPLVKTLE KEEEKDLVMYSKCOR LFRSPSMPCSVIRPI LKRLERPODRDTPVO NKRRRSVT--PPEEO 346 CDC25C LDKNPNLGEDOAE-E ISDELMEFSL----K DOE---AKVSRS--G LYRSPSMPENLNRPR LKOVEKFKDNTIPDK VKKKYFSG-----O 249 CDC25A TNPEKAHETLHOSLS LASSPKGTIENILDN DPR--DLIGDFSKGY LFHTVAGKHODLKYI SPEIMASVLNGKFAN LIKEFVIIDCRYPYE 389 CDC25B OEAEEPKARVLRSKS LCHD---EIENLLDS DHR--ELIGDYSKAF LLOTVDGKHODLKYI SPETMVALLTGKFSN IVDKFVIVDCRYPYE 431 CDC25C GKLRKG-LCLKKTVS LCD---ITITOMLEE DSNOGHLIGDFSKVC ALPTVSGKHODLKYV NPETVAALLSGKFOG LIEKFYVIDCRYPYE 335 CDC25A YEGGHIKGAVNLHME EEVEDFLLKKPIVP- TDGKRVIVVFHCEFS SERGPRMCRYVRERD RLGNEYPKLHYPELY VLKGGYKEFFMKCQS 478 CDC25B YEGGHIKTAVNLPLE RDAESFLLKSPIAPC SLDKRVILIFHCEFS SERGPRMCRFIRERD RAVNDYPSLYYPEMY ILKGGYKEFFPOHPN 521 CDC25C YLGGHIOGALNLYSO EELFNFFLKKPIVPL DTOKRIIIVFHCEFS SERGPRMCRCLREED RSLNOYPALYYPELY ILKGGYRDFFPEYME 425 Consensus Y...GGHI.....A.NL.......F.LK...PI...P...KR..I.....FHCEFS SERGPRMCR.....RE...D R.....N...YP...L..YPE...Y LKGGY.....FF...... **Domaine** Catalytique CDC25A YCEPPSYRPMHHEDF KEDLKKFRTKSRTWA GEKSKREMYSRLKKL --- 523 CDC25B FCEPODYRPMNHEAF KDELKTFRLKTRSWA GERSRRELCSRLODO --- 566 CDC25C LCEPOSYCPMHHODH KTELLRCRSOSKVOE GEROLREQIALLVKD MSP 473 

#### Figure 43- Alignement des séquences protéiques des protéines Cdc25A, B et C.

La sérine 292 en violet est l'acide aminé phosphorylé par Snk que nous avons identifié.

Les sérines inscrites en rouge représentent des sérines correspondant potentiellement à la sérine 292 de Cdc25A.

# CONCLUSION - PERSPECTIVES

### **CONCLUSION – PERSPECTIVES**

Les résultats obtenus au cours de ma thèse amènent de nombreuses questions et ouvrent plusieurs axes de recherche. En ce qui concerne la suite des travaux sur GSK-3, il apparaît indispensable de préciser le rôle exact de la protéine *Pf*GSK-3 dans les relations entre le parasite *Plasmodium falciparum* et le globule rouge de l'hôte, notamment dans le but d'évaluer l'intérêt de la recherche de nouvelles molécules à visée antipaludéenne ciblant cette protéine. Quant à l'orientation des travaux concernant Polo, il pourrait être intéressant, dans le cadre de la recherche en oncologie, d'effectuer un large criblage de molécules pouvant inhiber cette protéine et les protéines interagissant avec Polo afin d'identifier de nouvelles molécules à visée antimitotique.

#### I. GSK-3 de Plasmodium falciparum

La purification des protéines GSK-3 de différentes espèces par chromatographie d'affinité sur la protéine axine immobilisée sur des billes de sépharose a permis de mettre au point un test de mesure de l'activité kinase de GSK-3 native de cerveau de porc et de plusieurs autres espèces (levure, oursin et cellules MCF7) (Article 1). I est important de noter que cette méthode de purification ne permet pas de séparer GSK-3 $\alpha$  de GSK-3 $\beta$ . Ce test est utilisé pour évaluer l'effet inhibiteur de différentes molécules. Ceci pourrait permettre une étude approfondie des rôles de GSK-3 et de l'effet de son inhibition sur les cellules, le but final étant de pouvoir traiter des maladies impliquant GSK-3 telles que la maladie d'Alzheimer ou le diabète.

La protéine GSK-3 du parasite responsable du paludisme, *Plasmodium falciparum*, a été clonée au laboratoire. *Pf*GSK-3 représente une nouvelle cible thérapeutique. Cependant, il est indispensable de comprendre les fonctions de cette protéine, bien connu chez l'homme. Pour cela, il est nécessaire de préciser sa localisation exacte au niveau de la membrane du globule rouge infecté. Ceci est possible grâce à la microscopie électronique qui utilise des anticorps marqués spécifiques de la protéine à étudier, en l'occurrence *Pf*GSK-3. Il semble également indispensable de connaître les différentes voies et les compartiments utilisé par la protéine pour arriver à sa localisation finale. Ceci pourrait donner des indications quant aux cibles de *Pf*GSK-3. En effet, comme indiqué dans l'article 2, plusieurs protéines sont associées aux «Mauer's clefts» et pourraient être des substrats de *Pf*GSK-3. D'autre part, l'adaptine de *Plasmodium falciparum*, protéine également associée à la membrane plasmique, pourrait être un substrat de *Pf*GSK-3.

L'obtention de la protéine PfGSK-3 recombinante, possédant une activité kinase, a permis la mise au point d'un criblage de molécules inhibitrices de l'activité kinase de cette protéine. Par comparaison avec l'effet de ces molécules sur l'activité de GSK-3 native de porc, très proche de la protéine humaine, nous pouvons espérer trouver une ou plusieurs molécules capables d'inhiber spécifiquement la protéine plasmodiale sans intervenir sur l'activité de la protéine humaine. Cependant, puisque ces deux protéines sont très proches tant au niveau séquence qu'au niveau structure tridimensionnelle, il serait plus judicieux de trouver un inhibiteur efficace sur la protéine plasmodiale et d'y fixer une «tête chercheuse» pour cibler spécifiquement les globules rouges. En effet, les globules rouges sains ne contiennent pas de GSK-3. Ils ne seraient donc pas affectés par l'inhibiteur. Cette technique est déjà employée pour certains traitements anticancéreux. Ainsi, les globules rouges infectés seraient détruits sans que le reste de l'organisme ne subisse d'effet secondaire trop important. En effet, dans un premier temps, les molécules présentant un effet inhibiteur sur l'activité kinase de PfGSK-3 in vitro seront testé sur des cellules humaines en culture afin d'évaluer leurs effets sur des cellules saines. Dans le cas où on n'observerait pas d'effet notable sur des cellules saines, le produit sera testé sur des globules rouges infectés, puis sur l'animal et, en cas de succès, sur l'homme.

#### II. Polo d'oursin Sphaerichinus granularis

Le fragment de l'ADNc de Plu1 cloné n'est pas suffisant pour obtenir une protéine kinase active. Le clonage de l'ADNc complet de Plu1 permettrait d'obtenir une protéine recombinante facilement utilisable pour des études d'interaction avec d'autres protéines et des tests d'activité kinase sur différents substrats potentiels. De plus, un criblage de molécules potentiellement inhibitrices est à envisager afin de trouver de nouveaux antimitotiques pouvant intervenir dans les traitements de certains cancers.

Après immunoprécipitation, il est apparu que 2 protéines de haut poids moléculaire sont associées à Plu1. Il est probable que la protéine de 220 kDa soit Asp et celle de 150 kDa soit KLP. Cependant, il est indispensable d'identifier ces 2 protéines de façon certaine pour pouvoir continuer l'étude biochimique et enzymatique de Plu1.

L'interaction entre Polo et Myt1 au moment de l'entrée en mitose pourrait être décisive en cas d'anomalie du cycle cellulaire. En effet, Myt1 inhibe l'entrée en mitose en séquestrant le MPF dans le cytoplasme. Les résultats obtenus au cours de ma thèse ont mis en évidence une phosphorylation de Myt1 par Polo. On peut donc émettre l'hypothèse qu'en phosphorylant Myt1, Polo lève l'inhibition et permet l'entrée en mitose. Tout ceci reste à vérifier. Il faudrait cloner l'ADNc complet de Myt1 afin de pouvoir réaliser les tests de

phosphorylation et d'inhibiton sur le MPF. Nous aurions alors confirmation, ou non, de cette hypothèse.

Il est maintenant connu que Snk intervient au niveau de la phase G0 et de la transition G1/S. Les tests effectués sur l'activité kinase de Snk sur différents substrats ont montré que Snk phosphoryle Cdc25A. Il serait intéressant d'identifier tous les sites phosphorylés sur Cdc25A par Snk et de connaître le rôle de ces phosphorylations sur le déroulement du cycle cellulaire.

# ANNEXE I

### **ANNEXE I**

#### Composition des tampons et solutions

- Tampon d'homogénéisation: 60 mM β-glycérophosphate, 25 mM MOPS pH 7.2, 15 mM Nitrophénylphosphate, 15 mM EGTA, 15 mM MgCb, 2 mM DTT, 1 mM Na Vanadate, 1 mM NaF, 1 mM diNa phénylphosphate, 10 μg/ml Leupeptine, 10 μg/ml Aprotinine, 10 μg/ml SBTI, 100 μM Benzamidine.
- **Tampon C**: 60 mM β-glycérophosphate, 25 mM MOPS pH 7.0, 30 mM Nitrophénylphosphate, 5 mM EGTA, 15 mM MgCb, 1 mM DTT, 0,1 mM Na Vanadate.
- Tampon de charge (2x): 4 ml eau distillée, 1 ml Tris HCl 0.5 M pH 6.8, 0.8 ml Glycérol, 1.6 ml SDS 10%, 0.4 ml β-mercaptoéthanol, 0.2 ml Bleu de bromophénol 0.1%.
- "Tris Buffer Saline Tween-20" (TBST): 50 mM Tris pH 7.4, 150 mM NaCl, 0,1% de Tween 20.

Les marqueurs précolorés de poids moléculaires des protéines proviennent de Bio Rad (Prestained SDS-PAGE Standards).

# BIBLIOGRAPHIE

### **BIBLIOGRAPHIE**

#### Livres:

- Association Française des Professeurs de Parasitologie, 1992 (5è édition). Parasitologie, Mycologie: Maladies parasitaires et fongiques. Edition C. et R., 79 rue Faidherbe 59110 La Madeleine.

- Coordonnateur, Christian Ripert.1996. Epidémiologie des maladies parasitaires, 1 Protozooses. Editions EM inter.

- Carlos T. Hotta; Marcos L. Gazarini; Flavio H. Beraldo; Fernando P. Varotti; Cristiane Lopes; Regina P Markus, Tullio Pozzan et Célia R.S. Garcia. (2000) Calcium-dependent modulation by melatonin of the circadian rhythm in malarial parasites. Nature Cell Biology Volume 2 Number 7 Page 466 - 468

#### Sites Web:

http://www.biosci.ohio-state.edu/~parasite/falciparum\_images.html

<u>http://plasmodiumdb.cis.upenn.edu/</u>: ce site de l'université de Pennsylvanie donne accès à toutes les données sur le génome produites par le consortium.

<u>http://www.tigr.org/tdb/edb2/pfa1/htmls/</u>: ce site donne accès à la séquence complète du chromosome 2 et aux séquences préliminaires obtenue pour les chromosomes 10, 11, et 14.

#### Articles:

- Abrieu, A., T. Brassac, S. Galas, D. Fisher, J. C. Labbe, and M. Doree 1998. The Polo-like kinase Plx1 is a component of the MPF amplification loop at the G2/Mphase transition of the cell cycle in Xenopus eggs J Cell Sci. 111:1751-7.
- 2. Ai, Z., A. Fischer, D. C. Spray, A. M. Brown, and G. I. Fishman 2000. Wnt-1 regulation of connexin43 in cardiac myocytes J Clin Invest. **105**:161-71.
- 3. Aizawa, H., M. Kamijo, Y. Ohba, A. Mori, K. Okuhara, H. Kawasaki, H. Murofushi, K. Suzuki, and H. Yasuda 1991. Microtubule destabilization by cdc2/H1 histone kinase: phosphorylation of a "pro-rich region" in the microtubule-binding domain of MAP-4 Biochem Biophys Res Commun. 179:1620-6.
- Aktas, H., H. Cai, and G. M. Cooper 1997. Ras links growth factor signaling to the cell cycle machinery via regulation of cyclin D1 and the Cdk inhibitor p27KIP1 Mol Cell Biol. 17:3850-7.

- Anderson, A. J., J. H. Su, and C. W. Cotman 1996. DNA damage and apoptosis in Alzheimer's disease: colocalization with c- Jun immunoreactivity, relationship to brain area, and effect of postmortem delay J Neurosci. 16:1710-9.
- Arnaud, L., J. Pines, and E. A. Nigg 1998. GFP tagging reveals human Polo-like kinase 1 at the kinetochore/centromere region of mitotic chromosomes Chromosoma. 107:424-9.
- Arnold, S. J., J. Stappert, A. Bauer, A. Kispert, B. G. Herrmann, and R. Kemler 2000. Brachyury is a target gene of the Wnt/beta-catenin signaling pathway Mech Dev. 91:249-58.
- Bahler, J., A. B. Steever, S. Wheatley, Y. Wang, J. R. Pringle, K. L. Gould, and D. McCollum 1998. Role of polo kinase and Mid1p in determining the site of cell division in fission yeast J Cell Biol. 143:1603-16.
- Baker, J. C., R. S. Beddington, and R. M. Harland 1999. Wnt signaling in Xenopus embryos inhibits bmp4 expression and activates neural development Genes Dev. 13:3149-59.
- 10. Baldin, V., J. Lukas, M. J. Marcote, M. Pagano, and G. Draetta 1993. Cyclin D1 is a nuclear protein required for cell cycle progression in G1 Genes Dev. 7:812-21.
- 11. Barde, Y. A. 1989. Trophic factors and neuronal survival Neuron. 2:1525-34.
- Beals, C. R., C. M. Sheridan, C. W. Turck, P. Gardner, and G. R. Crabtree 1997. Nuclear export of NF-ATc enhanced by glycogen synthase kinase-3 Science. 275:1930-4.
- 13. Bevan, P. 2001. Insulin signalling J Cell Sci. 114:1429-30.
- Bowman, S., D. Lawson, D. Basham, D. Brown, T. Chillingworth, C. M. Churcher, A. Craig, R. M. Davies, K. Devlin, T. Feltwell, S. Gentles, R. Gwilliam, N. Hamlin, D. Harris, S. Holroyd, T. Hornsby, P. Horrocks, K. Jagels, B. Jassal, S. Kyes, J. McLean, S. Moule, K. Mungall, L. Murphy, B. G. Barrell, and et al. 1999. The complete nucleotide sequence of chromosome 3 of Plasmodium falciparum Nature. 400:532-8.
- Boyle, W. J., T. Smeal, L. H. Defize, P. Angel, J. R. Woodgett, M. Karin, and T. Hunter 1991. Activation of protein kinase C decreases phosphorylation of c-Jun at sites that negatively regulate its DNA-binding activity Cell. 64:573-84.
- 16. **Braak, H., and E. Braak** 1991. Neuropathological stageing of Alzheimer-related changes Acta Neuropathol. **82:**239-59.

- Brabletz, T., A. Jung, S. Dag, F. Hlubek, and T. Kirchner 1999. beta-catenin regulates the expression of the matrix metalloproteinase-7 in human colorectal cancer Am J Pathol. 155:1033-8.
- 18. **Brandeis, M., and T. Hunt** 1996. The proteolysis of mitotic cyclins in mammalian cells persists from the end of mitosis until the onset of S phase Embo J. **15**:5280-9.
- Brannon, M., M. Gomperts, L. Sumoy, R. T. Moon, and D. Kimelman 1997. A beta-catenin/XTcf-3 complex binds to the siamois promoter to regulate dorsal axis specification in Xenopus Genes Dev. 11:2359-70.
- Brassac, T., A. Castro, T. Lorca, C. Le Peuch, M. Doree, J. C. Labbe, and S. Galas 2000. The polo-like kinase Plx1 prevents premature inactivation of the APC(Fizzy)-dependent pathway in the early Xenopus cell cycle Oncogene. 19:3782-90.
- 21. **Brauninger, A., K. Strebhardt, and H. Rubsamen-Waigmann** 1995. Identification and functional characterization of the human and murine polo-like kinase (Plk) promoter Oncogene. **11**:1793-800.
- Brownlees, J., N. G. Irving, J. P. Brion, B. J. Gibb, U. Wagner, J. Woodgett, and C. C. Miller 1997. Tau phosphorylation in transgenic mice expressing glycogen synthase kinase-3beta transgenes Neuroreport. 8:3251-5.
- Cadigan, K. M., M. P. Fish, E. J. Rulifson, and R. Nusse 1998. Wingless repression of Drosophila frizzled 2 expression shapes the Wingless morphogen gradient in the wing Cell. 93:767-77.
- 24. Cadigan, K. M., and R. Nusse 1997. Wnt signaling: a common theme in animal development Genes Dev. 11:3286-305.
- Carmena, M., M. G. Riparbelli, G. Minestrini, A. M. Tavares, R. Adams, G. Callaini, and D. M. Glover 1998. Drosophila polo kinase is required for cytokinesis J Cell Biol. 143:659-71.
- Carter, B. D., C. Kaltschmidt, B. Kaltschmidt, N. Offenhauser, R. Bohm-Matthaei, P. A. Baeuerle, and Y. A. Barde 1996. Selective activation of NF-kappa B by nerve growth factor through the neurotrophin receptor p75 [see comments] Science. 272:542-5.
- 27. Chan, E. F., U. Gat, J. M. McNiff, and E. Fuchs 1999. A common human skin tumour is caused by activating mutations in beta- catenin Nat Genet. 21:410-3.
- Charles, J. F., S. L. Jaspersen, R. L. Tinker-Kulberg, L. Hwang, A. Szidon, and D. O. Morgan 1998. The Polo-related kinase Cdc5 activates and is destroyed by the mitotic cyclin destruction machinery in S. cerevisiae Curr Biol. 8:497-507.

- 29. Chase, D., A. Golden, G. Heidecker, and D. K. Ferris 2000. Caenorhabditis elegans contains a third polo-like kinase gene [In Process Citation] DNA Seq. 11:327-34.
- 30. Chase, D., C. Serafinas, N. Ashcroft, M. Kosinski, D. Longo, D. K. Ferris, and A. Golden 2000. The polo-like kinase PLK-1 is required for nuclear envelope breakdown and the completion of meiosis in Caenorhabditis elegans Genesis. 26:26-41.
- Cheng, A. L., S. E. Chuang, R. L. Fine, K. H. Yeh, C. M. Liao, J. D. Lay, and D. S. Chen 1998. Inhibition of the membrane translocation and activation of protein kinase C, and potentiation of doxorubicin-induced apoptosis of hepatocellular carcinoma cells by tamoxifen Biochem Pharmacol. 55:523-31.
- 32. Cheng, L., L. Hunke, and C. F. J. Hardy 1998. Cell cycle regulation of the Saccharomyces cerevisiae polo-like kinase cdc5p Mol Cell Biol. 18:7360-70.
- 33. Ciechanover, A., and A. L. Schwartz 1994. The ubiquitin-mediated proteolytic pathway: mechanisms of recognition of the proteolytic substrate and involvement in the degradation of native cellular proteins Faseb J. 8:182-91.
- 34. Clay, F. J., S. J. McEwen, I. Bertoncello, A. F. Wilks, and A. R. Dunn 1993. Identification and cloning of a protein kinase-encoding mouse gene, Plk, related to the polo gene of Drosophila Proc Natl Acad Sci U S A. 90:4882-6.
- 35. Coleman, T. R., and W. G. Dunphy 1994. Cdc2 regulatory factors. Current Opinion in Cell Biology. 6:877-882.
- 36. **Coqueret, O., G. Berube, and A. Nepveu** 1998. The mammalian Cut homeodomain protein functions as a cell-cycle- dependent transcriptional repressor which downmodulates p21WAF1/CIP1/SDI1 in S phase Embo J. **17**:4680-94.
- Cotman, C. W., and A. J. Anderson 1995. A potential role for apoptosis in neurodegeneration and Alzheimer's disease Mol Neurobiol. 10:19-45.
- Crawford, H. C., B. M. Fingleton, L. A. Rudolph-Owen, K. J. Goss, B. Rubinfeld,
   P. Polakis, and L. M. Matrisian 1999. The metalloproteinase matrilysin is a target of beta-catenin transactivation in intestinal tumors Oncogene. 18:2883-91.
- Crenshaw, D. G., J. Yang, A. R. Means, and S. Kornbluth 1998. The mitotic peptidyl-propyl isomerase, Pin1, interacts with Cdc25 and Plx1. The EMBO Journal. 17:1315-1327.
- Cross, D. A., D. R. Alessi, P. Cohen, M. Andjelkovich, and B. A. Hemmings 1995. Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B Nature. 378:785-9.
- 41. Crowder, R. J., and R. S. Freeman 2000. Glycogen synthase kinase-3beta activity is critical for neuronal death caused by inhibiting phosphatidylinositol 3-kinase or akt

but not for death caused by nerve growth factor withdrawal [In Process Citation] J Biol Chem. **275:**34266-71.

- Czech, C., M. Lesort, G. Tremp, F. Terro, V. Blanchard, B. Schombert, N. Carpentier, S. Dreisler, B. Bonici, A. Takashima, S. Moussaoui, J. Hugon, and L. Pradier 1998. Characterization of human presenilin 1 transgenic rats: increased sensitivity to apoptosis in primary neuronal cultures Neuroscience. 87:325-36.
- 43. Dajani, R., E. Fraser, S. M. Roe, N. Young, V. Good, T. C. Dale, and L. H. Pearl 2001. Crystal structure of glycogen synthase kinase 3 beta: structural basis for phosphate-primed substrate specificity and autoinhibition Cell. 105:721-32.
- 44. Datta, S. R., A. Brunet, and M. E. Greenberg 1999. Cellular survival: a play in three Akts Genes Dev. 13:2905-27.
- 45. de La Coste, A., B. Romagnolo, P. Billuart, C. A. Renard, M. A. Buendia, O. Soubrane, M. Fabre, J. Chelly, C. Beldjord, A. Kahn, and C. Perret 1998. Somatic mutations of the beta-catenin gene are frequent in mouse and human hepatocellular carcinomas Proc Natl Acad Sci U S A. 95:8847-51.
- 46. **Deng, G., C. J. Pike, and C. W. Cotman** 1996. Alzheimer-associated presenilin-2 confers increased sensitivity to apoptosis in PC12 cells FEBS Lett. **397:5**0-4.
- 47. Descombes, P., and E. A. Nigg 1998. The polo-like kinase Plx1 is required for M phase exit and destruction of mitotic regulators in Xenopus egg extracts Embo J. 17:1328-35.
- Diehl, J. A., M. Cheng, M. F. Roussel, and C. J. Sherr 1998. Glycogen synthase kinase-3beta regulates cyclin D1 proteolysis and subcellular localization Genes Dev. 12:3499-511.
- 49. do Carmo Avides, M., A. Tavares, and D. M. Glover 2001. Polo kinase and Asp are needed to promote the mitotic organizing activity of centrosomes Nat Cell Biol. 3:421-4.
- 50. **Donohue, P. J., G. F. Alberts, Y. Guo, and J. A. Winkles** 1995. Identification by targeted differential display of an immediate early gene encoding a putative serine/threonine kinase J Biol Chem. **270**:10351-7.
- 51. Dorsky, R. I., D. W. Raible, and R. T. Moon 2000. Direct regulation of nacre, a zebrafish MITF homolog required for pigment cell formation, by the Wnt pathway Genes Dev. 14:158-62.
- Draetta, G., P.-W. H., D. Morrison, B. Druker, T. Roberts, and D. Beach 1988.
   Human cdc2 protein kinase is a major cell-cycle regulated tyrosine kinase substrate.
   *Nature*. 336:738-744.

- 53. **Dunphy, W. G., and A. Kumagai** 1991. The cdc25 protein contains an intrinsic phosphatase activity Cell. **67:**189-96.
- 54. **Duval, A., J. Gayet, X. P. Zhou, B. Iacopetta, G. Thomas, and R. Hamelin** 1999. Frequent frameshift mutations of the TCF-4 gene in colorectal cancers with microsatellite instability Cancer Res. **59**:4213-5.
- 55. Eldar-Finkelman, H., and E. G. Krebs 1997. Phosphorylation of insulin receptor substrate 1 by glycogen synthase kinase 3 impairs insulin action Proc Natl Acad Sci U S A. 94:9660-4.
- 56. Embi, N., D. B. Rylatt, and P. Cohen 1980. Glycogen synthase kinase-3 from rabbit skeletal muscle. Separation from cyclic-AMP-dependent protein kinase and phosphorylase kinase Eur J Biochem. **107:**519-27.
- 57. Erondu, N. E., and J. E. Donelson 1991. Characterisation of trypanosome protein phosphatase 1 and 2A catalytic subunits. Mol. Biochem. Parasitol. **49**:303-314.
- 58. Fang, G., H. Yu, and M. W. Kirschner 1998. Direct binding of CDC20 protein family members activates the anaphase- promoting complex in mitosis and G1 Mol Cell. 2:163-71.
- Felix, M. A., J. C. Labbe, M. Doree, T. Hunt, and E. Karsenti 1990. Triggering of cyclin degradation in interphase extracts of amphibian eggs by cdc2 kinase Nature. 346:379-82.
- 60. Fellous, A., M. Kubelka, C. Thibier, F. Taieb, O. Haccard, and C. Jessus 1994. Association of p34cdc2 kinase and MAP kinase with microtubules during the meiotic maturation of Xenopus oocytes Int J Dev Biol. 38:651-9.
- 61. Feng, Y., D. R. Hodge, G. Palmieri, D. L. Chase, D. L. Longo, and D. K. Ferris 1999. Association of polo-like kinase with alpha-, beta- and gamma-tubulins in a stable complex Biochem J. **339**:435-42.
- 62. Fenton, B., and D. M. Glover 1993. A conserved mitotic kinase active at late anaphase-telophase in syncytial Drosophila embryos Nature. **363**:637-40.
- 63. Ferris, D. K., S. C. Maloid, and C. C. Li 1998. Ubiquitination and proteasome mediated degradation of polo-like kinase Biochem Biophys Res Commun. 252:340-4.
- 64. Fiol, C. J., J. S. Williams, C. H. Chou, Q. M. Wang, P. J. Roach, and O. M. Andrisani 1994. A secondary phosphorylation of CREB341 at Ser129 is required for the cAMP-mediated control of gene expression. A role for glycogen synthase kinase-3 in the control of gene expression J Biol Chem. 269:32187-93.

- 65. Fode, C., B. Motro, S. Yousefi, M. Heffernan, and J. W. Dennis 1994. Sak, a murine protein-serine/threonine kinase that is related to the Drosophila polo kinase and involved in cell proliferation Proc Natl Acad Sci U S A. **91**:6388-92.
- 66. Gard, D. L., and M. W. Kirschner 1987. Microtubule assembly in cytoplasmic extracts of Xenopus oocytes and eggs J Cell Biol. **105**:2191-201.
- Gard, D. L., and M. W. Kirschner 1987. A microtubule-associated protein from Xenopus eggs that specifically promotes assembly at the plus-end J Cell Biol. 105:2203-15.
- Gautier, J., M. J. Solomon, R. N. Booher, J. F. Bazan, and M. W. Kirschner 1991.
   cdc25 is a specific tyrosine phosphatase that directly activates p34cdc2. *Cell.* 67:197-211.
- Ginty, D. D., A. Bonni, and M. E. Greenberg 1994. Nerve growth factor activates a Ras-dependent protein kinase that stimulates c-fos transcription via phosphorylation of CREB Cell. 77:713-25.
- 70. Glover, D. M., I. M. Hagan, and A. Tavares 1998. Polo-like kinases: a team that plays throughout mitosis. *Gene and Development*. 12:3777-3787.
- Glover, D. M., H. Ohkura, and A. Tavares 1996. Polo kinase: the choreographer of the mitotic stage? J Cell Biol. 135:1681-4.
- 72. Golsteyn, R. M., H. A. Lane, K. E. Mundt, L. Arnaud, and E. A. Nigg 1996. The familly of Polo-like kinases. *In* G. S. a. V. L. MEIJER 1., eds. (ed.), Progress in Cell Cycle Research 2. Plenum Press, New York, USA.
- 73. Golsteyn, R. M., K. E. Mundt, A. M. Fry, and E. A. Nigg 1995. Cell cycle regulation of the activity and subcellular localization of Plk1, a human protein kinase implicated in mitotic spindle function J Cell Biol. **129**:1617-28.
- 74. Golsteyn, R. M., S. J. Schultz, B. J., A. Ziemiecki, T. Ried, and E. A. Nigg 1994. Cell cycle analysis and chromosomal localization of human PLK1, a putative homolog of the mitotic kinases *Drosophila* polo and *Saccharomyces cerevisiae* cdc5. *Journal of Cell Science*. 107:1509-1517.
- 75. **Gonzalez, C., C. E. Sunkel, and D. M. Glover** 1998. Interactions between mgr, asp, and polo: asp function modulated by polo and needed to maintain the poles of monopolar and bipolar spindles Chromosoma. **107**:452-60.
- 76. Goode, N., K. Hughes, J. R. Woodgett, and P. J. Parker 1992. Differential regulation of glycogen synthase kinase-3 beta by protein kinase C isotypes J Biol Chem. 267:16878-82.

- 77. Goold, R. G., R. Owen, and P. R. Gordon-Weeks 1999. Glycogen synthase kinase 3beta phosphorylation of microtubule- associated protein 1B regulates the stability of microtubules in growth cones J Cell Sci. 112:3373-84.
- 78. **Gradl, D., M. Kuhl, and D. Wedlich** 1999. The Wnt/Wg signal transducer betacatenin controls fibronectin expression Mol Cell Biol. **19**:5576-87.
- 79. Graham, T. M., A. Tait, and G. Hide 1998. Characterisation of a polo-like protein kinase gene homologue from an evolutionary divergent eukaryote, Trypanosoma brucei Gene. 207:71-7.
- Guo, Q., K. Furukawa, B. L. Sopher, D. G. Pham, J. Xie, N. Robinson, G. M. Martin, and M. P. Mattson 1996. Alzheimer's PS-1 mutation perturbs calcium homeostasis and sensitizes PC12 cells to death induced by amyloid beta-peptide Neuroreport. 8:379-83.
- 81. Guo, Q., B. L. Sopher, K. Furukawa, D. G. Pham, N. Robinson, G. M. Martin, and M. P. Mattson 1997. Alzheimer's presenilin mutation sensitizes neural cells to apoptosis induced by trophic factor withdrawal and amyloid beta-peptide: involvement of calcium and oxyradicals J Neurosci. 17:4212-22.
- 82. Haass, C. 1997. Presenilins: genes for life and death Neuron. 18:687-90.
- Haertel-Wiesmann, M., Y. Liang, W. J. Fantl, and L. T. Williams 2000. Regulation of cyclooxygenase-2 and periostin by wnt-3 in mouse mammary epithelial cells J Biol Chem. 275:32046-51.
- Hagting, A., M. Jackman, K. Simpson, and J. Pines 1999. Translocation of cyclin B1 to the nucleus at prophase requires a phosphorylation-dependent nuclear import signal Curr Biol. 9:680-9.
- 85. **Hagting, A., C. Karlsson, P. Clute, M. Jackman, and J. Pines** 1998. MPF localization is controlled by nuclear export Embo J. **17**:4127-38.
- 86. Hamanaka, R., M. R. Smith, P. M. O'Connor, S. Maloid, K. Mihalic, J. L. Spivak, L. D.L., and D. K. Ferris 1995. Polo like kinase is a cell cycle regulated kinase activated during mitosis. *The Journal of Biological Chemistry*. 270:21086-21091.
- Hanes, S. D., P. R. Shank, and K. A. Bostian 1989. Sequence and mutational analysis of ESS1, a gene essential for growth in Saccharomyces cerevisiae Yeast. 5:55-72.
- 88. Hanks, S. K., and T. Hunter 1995. Protein kinases 6. The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification Faseb J. 9:576-96.

- Hanks, S. K., A. M. Quinn, and T. Hunter 1988. The protein kinase family: conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains. *Science*. 241:42-52.
- 90. Hardy, C. F., and A. Pautz 1996. A novel role for Cdc5p in DNA replication Mol Cell Biol. 16:6775-82.
- Hardy, J. 1997. Amyloid, the presenilins and Alzheimer's disease [see comments] Trends Neurosci. 20:154-9.
- 92. Hart, M. J., R. de los Santos, I. N. Albert, B. Rubinfeld, and P. Polakis 1998. Downregulation of beta-catenin by human Axin and its association with the APC tumor suppressor, beta-catenin and GSK3 beta Curr Biol. 8:573-81.
- Hatakeyama, M., and R. A. Weinberg 1995. The role of RB in cell cycle control Prog Cell Cycle Res. 1:9-19.
- 94. He, T. C., T. A. Chan, B. Vogelstein, and K. W. Kinzler 1999. PPARdelta is an APC-regulated target of nonsteroidal anti-inflammatory drugs Cell. **99**:335-45.
- 95. He, T. C., A. B. Sparks, C. Rago, H. Hermeking, L. Zawel, L. T. da Costa, P. J. Morin, B. Vogelstein, and K. W. Kinzler 1998. Identification of c-MYC as a target of the APC pathway Science. 281:1509-12.
- 96. Hemmings, B. A., A. Aitken, P. Cohen, M. Rymond, and F. Hofmann 1982. Phosphorylation of the type-II regulatory subunit of cyclic-AMP- dependent protein kinase by glycogen synthase kinase 3 and glycogen synthase kinase 5 Eur J Biochem. 127:473-81.
- 97. **Henderson, B. R.** 2000. Nuclear-cytoplasmic shuttling of APC regulates beta-catenin subcellular localization and turnover Nat Cell Biol. **2:**653-60.
- Herrmann, S., I. Amorim, and C. E. Sunkel 1998. The Polo kinase is required at multiple stages during spermatogenesis in Drosophila melanogaster *Chromosoma*. 107:440-51.
- Hetman, M., J. E. Cavanaugh, D. Kimelman, and Z. Xia 2000. Role of glycogen synthase kinase-3beta in neuronal apoptosis induced by trophic withdrawal J Neurosci. 20:2567-74.
- 100. Hoffmann, I., P. R. Clarke, M. J. Marcote, E. Karsenti, and G. Draetta 1993. Phosphorylation and activation of human cdc25-C by cdc2-cyclin B and its involvement in the self-amplification of MPF at mitosis Embo J. 12:53-63.
- 101. Hoffmann, I., G. Draetta, and E. Karsenti 1994. Activation of the phosphatase activity of human cdc25A by a cdk2-cyclin E dependent phosphorylation at the G1/S transition Embo J. 13:4302-10.

- 102. Holtrich, U., G. Wolf, A. Brauninger, T. Karn, B. Bohme, H. Rubsamen-Waigmann, and K. Strebhardt 1994. Induction and down-regulation of PLK, a human serine/threonine kinase expressed in proliferating cells and tumors Proc Natl Acad Sci U S A. 91:1736-40.
- Hong, M., D. C. Chen, P. S. Klein, and V. M. Lee 1997. Lithium reduces tau phosphorylation by inhibition of glycogen synthase kinase-3 J Biol Chem. 272:25326-32.
- 104. Hong, M., and V. M. Lee 1997. Insulin and insulin-like growth factor-1 regulate tau phosphorylation in cultured human neurons J Biol Chem. 272:19547-53.
- Hooper, J. E. 1994. Distinct pathways for autocrine and paracrine Wingless signalling in Drosophila embryos Nature. 372:461-4.
- Hosoya, H., S. Komatsu, T. Shimizu, M. Inagaki, M. Ikegami, and K. Yazaki 1994. Phosphorylation of dynamin by cdc2 kinase Biochem Biophys Res Commun. 202:1127-33.
- Hotta, C. T., M. L. Gazarini, F. H. Beraldo, F. P. Varotti, C. Lopes, R. P. Markus, T. Pozzan, and C. R. Garcia 2000. Calcium-dependent modulation by melatonin of the circadian rhythm in malarial parasites Nat Cell Biol. 2:466-8.
- 108. Howe, L. R., K. Subbaramaiah, W. J. Chung, A. J. Dannenberg, and A. M. Brown 1999. Transcriptional activation of cyclooxygenase-2 in Wnt-1-transformed mouse mammary epithelial cells Cancer Res. 59:1572-7.
- 109. Hsu, W., L. Zeng, and F. Costantini 1999. Identification of a domain of Axin that binds to the serine/threonine protein phosphatase 2A and a self-binding domain J Biol Chem. 274:3439-45.
- 110. Hua, S. B., and C. C. Wang 1994. Differential accumulation of a protein kinase homolog in Trypanosoma brucei J Cell Biochem. **54**:20-31.
- 111. Huang, H., H. Fujii, A. Sankila, B. M. Mahler-Araujo, M. Matsuda, G. Cathomas, and H. Ohgaki 1999. Beta-catenin mutations are frequent in human hepatocellular carcinomas associated with hepatitis C virus infection Am J Pathol. 155:1795-801.
- 112. Hunter, T., and G. D. Plowman 1997. The protein kinases of budding yeast : six score and more. *Trends Biochem. Sci.* 22:18-22.
- Izumi, T., D. H. Walker, and J. L. Maller 1992. Periodic changes in phosphorylation of the Xenopus cdc25 phosphatase regulate its activity Mol Biol Cell. 3:927-39.

- 114. Jaspersen, S., J. Charles, and D. Morgan 1999. Inhibitory phosphorylation of the APC regulator Hct1 is controlled by the kinase Cdc28 and the phosphatase Cdc14. Curr. Biol. 9:227-236.
- 115. Jeng, Y. M., M. Z. Wu, T. L. Mao, M. H. Chang, and H. C. Hsu 2000. Somatic mutations of beta-catenin play a crucial role in the tumorigenesis of sporadic hepatoblastoma Cancer Lett. **152**:45-51.
- 116. Jessus, C., and R. Ozon 1995. Function and regulation of cdc25 protein phosphatase through mitosis and meiosis. *In* G. S. a. T. H. Y. L. MEIJER l., eds. (ed.), Progress in Cell Cycle Research 1. Plenum Press, New York, USA.
- 117. Jinno, S., K. Suto, A. Nagata, M. Igarashi, Y. Kanaoka, H. Nojima, and H. Okayama 1994. Cdc25A is a novel phosphatase functioning early in the cell cycle Embo J. 13:1549-56.
- 118. Julius, M. A., B. Schelbert, W. Hsu, E. Fitzpatrick, E. Jho, F. Fagotto, F. Costantini, and J. Kitajewski 2000. Domains of axin and disheveled required for interaction and function in wnt signaling Biochem Biophys Res Commun. 276:1162-9.
- Karaiskou, A., C. Jessus, T. Brassac, and R. Ozon 1999. Phosphatase 2A and polo kinase, two antagonistic regulators of cdc25 activation and MPF auto-amplification J Cell Sci. 112:3747-56.
- 120. Kauselmann, G., M. Weiler, P. Wulff, S. Jessberger, U. Konietzko, J. Scafidi, U. Staubli, J. Bereiter-Hahn, K. Strebahardt, and D. Kuhl 1999. The polo-like protein kinases Fnk and Snk associate with a Ca(2+)- and integrin-binding protein are regulated dynamically with synaptic plasticity. *EMBO Journal*. 18:5528-5539.
- 121. Kauselmann, G., M. Weiler, P. Wulff, S. Jessberger, U. Konietzko, J. Scafidi, U. Staubli, J. Bereiter-Hahn, K. Strebhardt, and D. Kuhl 1999. The polo-like protein kinases Fnk and Snk associate with a Ca(2+)- and integrin-binding protein and are regulated dynamically with synaptic plasticity Embo J. 18:5528-39.
- Kim, L., J. Liu, and A. R. Kimmel 1999. The novel tyrosine kinase ZAK1 activates GSK3 to direct cell fate specification Cell. 99:399-408.
- 123. King, R. W., M. Glotzer, and M. W. Kirschner 1996. Mutagenic analysis of the destruction signal of mitotic cyclins and structural characterization of ubiquitinated intermediates Mol Biol Cell. 7:1343-57.
- 124. Kitada, K., A. L. Johnson, L. H. Johnston, and A. Sgino 1993. A multicopy suppressor gene of the *Saccharomyces cerevisiae* G1 cell cycle mutant gene *dbf* 4 encodes a protein kinase and is identified as CDC5. *Molecular and Cellular Biology*. 13:4445-4457.

- 125. Kitaeva, M. N., L. Grogan, J. P. Williams, E. Dimond, K. Nakahara, P. Hausner, J. W. DeNobile, P. W. Soballe, and I. R. Kirsch 1997. Mutations in beta-catenin are uncommon in colorectal cancer occurring in occasional replication error-positive tumors Cancer Res. 57:4478-81.
- 126. Klein, P. S., and D. A. Melton 1996. A molecular mechanism for the effect of lithium on development Proc Natl Acad Sci U S A. 93:8455-9.
- 127. Koch, A., D. Denkhaus, S. Albrecht, I. Leuschner, D. von Schweinitz, and T. Pietsch 1999. Childhood hepatoblastomas frequently carry a mutated degradation targeting box of the beta-catenin gene Cancer Res. 59:269-73.
- 128. Kotani, S., H. Tanaka, H. Yasuda, and K. Todokoro 1999. Regulation of APC activity by phosphorylation and regulatory factors J Cell Biol. **146:**791-800.
- 129. Kotani, S., S. Tugendreich, M. Fujii, P. M. Jorgensen, N. Watanabe, C. Hoog, P. Hieter, and K. Todokoro 1998. PKA and MPF-activated polo-like kinase regulate anaphase-promoting complex activity and mitosis progression Mol Cell. 1:371-80.
- 130. Kuang, J., C. L. Ashorn, M. Gonzalez-Kuyvenhoven, and J. E. Penkala 1994. cdc25 is one of the MPM-2 antigens involved in the activation of maturationpromoting factor [published erratum appears in Mol Biol Cell 1994 May;5(5):611] Mol Biol Cell. 5:135-45.
- Kumagai, A., and W. G. Dunphy 1996. Purification and molecular cloning of Plx1, a Cdc25-regulatory kinase from Xenopus egg extracts Science. 273:1377-80.
- Kumagai, A., and W. G. Dunphy 1992. Regulation of the cdc25 protein during the cell cycle in Xenopus extracts Cell. 70:139-51.
- 133. Kumagai, A., P. S. Yakowec, and W. G. Dunphy 1998. 14-3-3 proteins act as negative regulators of the mitotic inducer Cdc25 in Xenopus egg extracts Mol Biol Cell. 9:345-54.
- Kusiak, J. W., J. A. Izzo, and B. Zhao 1996. Neurodegeneration in Alzheimer disease. Is apoptosis involved? Mol Chem Neuropathol. 28:153-62.
- 135. Lake, R. J., and W. R. Jelinek 1993. Cell cycle- and terminal differentiationassociated regulation of the mouse mRNA encoding a conserved mitotic protein kinase Mol Cell Biol. 13:7793-801.
- 136. Lane, H. A., and E. A. Nigg 1997. Cell-cycle control: POLO-like kinase join the outer circle. *Trends in Cell Biology*. **7**:63-68.
- 137. Larner, A. J. 1999. Tau protein as a therapeutic target in Alzheimer's disease and other neurodegenerative disorders. Exp. Opin. Ther. Patents. 9:1359-1370.
- 138. Lassmann, H., C. Bancher, H. Breitschopf, J. Wegiel, M. Bobinski, K. Jellinger, and H. M. Wisniewski 1995. Cell death in Alzheimer's disease evaluated by DNA fragmentation in situ Acta Neuropathol. 89:35-41.
- 139. Laurent, M. N., I. L. Blitz, C. Hashimoto, U. Rothbacher, and K. W. Cho 1997. The Xenopus homeobox gene twin mediates Wnt induction of goosecoid in establishment of Spemann's organizer Development. 124:4905-16.
- Lee, K. S., and R. L. Erikson 1997. Plk is a functional homolog of Saccharomyces cerevisiae Cdc5, and elevated Plk activity induces multiple septation structures Mol Cell Biol. 17:3408-17.
- 141. Lee, K. S., T. Z. Grenfell, F. R. Yarm, and R L. Erikson 1998. Mutation of the polo-box disrupts localization and mitotic functions of the mammalian polo kinase Plk Proc Natl Acad Sci U S A. 95:9301-6.
- 142. Lee, K. S., S. Song, and R. L. Erikson 1999. The polo-box-dependent induction of ectopic septal structures by a mammalian polo kinase, plk, in Saccharomyces cerevisiae Proc Natl Acad Sci U S A. 96:14360-5.
- 143. Lee, K. S., Y. L. Yuan, R. Kuriyama, and R. L. Erikson 1995. Plk is an M-phasespecific protein kinase and interacts with a kinesin- like protein, CHO1/MKLP-1 Mol Cell Biol. 15:7143-51.
- 144. Legoix, P., O. Bluteau, J. Bayer, C. Perret, C. Balabaud, J. Belghiti, D. Franco, G. Thomas, P. Laurent-Puig, and J. Zucman-Rossi 1999. Beta-catenin mutations in hepatocellular carcinoma correlate with a low rate of loss of heterozygosity Oncogene. 18:4044-6.
- 145. Li, B., B. Ouyang, H. Pan, P. T. Reissmann, D. J. Slamon, R. Arceci, L. Lu, and W. Dai 1996. Prk, a cytokine-inducible human protein serine/threonine kinase whose expression appears to be down-regulated in lung carcinomas J Biol Chem. 271:19402-8.
- 146. Li, J., A. N. Meyer, and D. J. Donoghue 1997. Nuclear localization of cyclin B1 mediates its biological activity and is regulated by phosphorylation Proc Natl Acad Sci U S A. 94:502-7.
- 147. Li, L., H. Yuan, C. D. Weaver, J. Mao, G. H. Farr, 3rd, D. J. Sussman, J. Jonkers, D. Kimelman, and D. Wu 1999. Axin and Frat1 interact with dvl and GSK, bridging Dvl to GSK in Wnt- mediated regulation of LEF-1 Embo J. 18:4233-40.
- Liao, H., G. Li, and T. J. Yen 1994. Mitotic regulation of microtubule cross-linking activity of CENP-E kinetochore protein Science. 265:394-8.

- 149. Lickert, H., C. Domon, G. Huls, C. Wehrle, I. Duluc, H. Clevers, B. I. Meyer, J. N. Freund, and R. Kemler 2000. Wnt/(beta)-catenin signaling regulates the expression of the homeobox gene Cdx1 in embryonic intestine Development. 127:3805-13.
- Llamazares, S., A. Moreira, A. Tavares, C. Girdham, B. A. Spruce, C. Gonzalez,
   R. E. Karess, D. M. Glover, and C. E. Sunkel 1991. polo encodes a protein kinase homolog required for mitosis in Drosophila Genes Dev. 5:2153-65.
- 151. Logarinho, E., and C. Sunkel 1998. The Drosophila POLO kinase localises to multiple compartments of the mitotic apparatus and is required for the phosphorylation of MPM2 reactive epitopes. *Journal of Cell Science*. **111**:2897-2909.
- 152. Lovestone, S., C. L. Hartley, J. Pearce, and B. H. Anderton 1996. Phosphorylation of tau by glycogen synthase kinase-3 beta in intact mammalian cells: the effects on the organization and stability of microtubules Neuroscience. **73**:1145-57.
- 153. Lovestone, S., C. H. Reynolds, D. Latimer, D. R. Davis, B. H. Anderton, J. M. Gallo, D. Hanger, S. Mulot, B. Marquardt, S. Stabel, and et al. 1994. Alzheimer's disease-like phosphorylation of the microtubule-associated protein tau by glycogen synthase kinase-3 in transfected mammalian cells Curr Biol. 4:1077-86.
- 154. Lu, K. P., S. D. Hanes, and T. Hunter 1996. A human peptidyl-prolyl isomerase essential for regulation of mitosis Nature. **380**:544-7.
- 155. Lucas, F. R., R. G. Goold, P. R. Gordon-Weeks, and P. C. Salinas 1998. Inhibition of GSK-3beta leading to the loss of phosphorylated MAP-1B is an early event in axonal remodelling induced by WNT-7a or lithium J Cell Sci. **111**:1351-61.
- 156. Maleszka, R., S. D. Hanes, R. L. Hackett, H. G. de Couet, and G. L. Miklos 1996. The Drosophila melanogaster dodo (dod) gene, conserved in humans, is functionally interchangeable with the ESS1 cell division gene of Saccharomyces cerevisiae Proc Natl Acad Sci U S A. 93:447-51.
- 157. Mann, B., M. Gelos, A. Siedow, M. L. Hanski, A. Gratchev, M. Ilyas, W. F. Bodmer, M. P. Moyer, E. O. Riecken, H. J. Buhr, and C. Hanski 1999. Target genes of beta-catenin-T cell-factor/lymphoid-enhancer-factor signaling in human colorectal carcinomas Proc Natl Acad Sci U S A. 96:1603-8.
- 158. McGrew, L. L., K. Takemaru, R. Bates, and R. T. Moon 1999. Direct regulation of the Xenopus engrailed-2 promoter by the Wnt signaling pathway, and a molecular screen for Wnt-responsive genes, confirm a role for Wnt signaling during neural patterning in Xenopus Mech Dev. 87:21-32.

- 159. McKendry, R., S. C. Hsu, R. M. Harland, and R. Grosschedl 1997. LEF-1/TCF proteins mediate wnt-inducible transcription from the Xenopus nodal-related 3 promoter Dev Biol. 192:420-31.
- 160. Meijer, L., D. Arion, R. Golsteyn, J. Pines, L. Brizuela, T. Hunt, and D. Beach 1989. Cyclin is a component of the sea urchin egg M-phase specific histone H1 kinase. *The EMBO Journal*. 8:2275-2282.
- 161. Millar, J. B. A., C. H. McGowan, G. Lenaers, R. Jones, and P. Russell 1991. p80cdc25 mitotic inducer is the tyrosine phosphatase that activates p34cdc2 kinase in fission yeast. *The EMBO Journal*. **10**:4301-4309.
- 162. Miyoshi, Y., K. Iwao, G. Nawa, H. Yoshikawa, T. Ochi, and Y. Nakamura 1998. Frequent mutations in the beta-catenin gene in desmoid tumors from patients without familial adenomatous polyposis Oncol Res. 10:591-4.
- 163. Morgan, D. O. 1995. Principles of CDK regulation. *Nature*. 374:131-134.
- Morgan, D. O. 1999. Regulation of the APC and the exit from mitosis. Nature Cell Biologie. 1:47-53.
- 165. Moriguchi, T., K. Kawachi, S. Kamakura, N. Masuyama, H. Yamanaka, K. Matsumoto, A. Kikuchi, and E. Nishida 1999. Distinct domains of mouse dishevelled are responsible for the c-Jun N- terminal kinase/stress-activated protein kinase activation and the axis formation in vertebrates J Biol Chem. 274:30957-62.
- 166. Morin, P. J., A. B. Sparks, V. Korinek, N. Barker, H. Clevers, B. Vogelstein, and K. W. Kinzler 1997. Activation of beta-catenin-Tcf signaling in colon cancer by mutations in beta-catenin or APC [see comments] Science. 275:1787-90.
- 167. Morishima-Kawashima, M., M. Hasegawa, K. Takio, M. Suzuki, H. Yoshida, K. Titani, and Y. Ihara 1995. Proline-directed and non-proline-directed phosphorylation of PHF-tau J Biol Chem. 270:823-9.
- 168. Mulvihill, D. P., J. Petersen, H. Ohkura, D. M. Glover, and I. M. Hagan 1999. Plo1 kinase recruitment to the spindle pole body and its role in cell division in Schizosaccharomyces pombe Mol Biol Cell. 10:2771-85.
- 169. Mundt, K. E., R. M. Golsteyn, H. A. Lane, and E. A. Nigg 1997. On the regulation and function of human polo-like kinase 1 (PLK1): effects of overexpression on cell cycle progression Biochem Biophys Res Commun. 239:377-85.
- Munoz-Montano, J. R., F. J. Moreno, J. Avila, and J. Diaz-Nido 1997. Lithium inhibits Alzheimer's disease-like tau protein phosphorylation in neurons FEBS Lett. 411:183-8.

- 171. Munsterberg, A. E., J. Kitajewski, D. A. Bumcrot, A. P. McMahon, and A. B. Lassar 1995. Combinatorial signaling by Sonic hedgehog and Wnt family members induces myogenic bHLH gene expression in the somite Genes Dev. 9:2911-22.
- 172. Nhieu, J. T., C. A. Renard, Y. Wei, D. Cherqui, E. S. Zafrani, and M. A. Buendia 1999. Nuclear accumulation of mutated beta-catenin in hepatocellular carcinoma is associated with increased cell proliferation Am J Pathol. 155:703-10.
- 173. Nikolakaki, E., P. J. Coffer, R. Hemelsoet, J. R. Woodgett, and L. H. Defize 1993. Glycogen synthase kinase 3 phosphorylates Jun family members in vitro and negatively regulates their transactivating potential in intact cells Oncogene. 8:833-40.
- 174. Nilsson, I., and I. Hoffmann 2000. Cell cycle regulation by the Cdc25 phosphatase family Prog Cell Cycle Res. 4:107-14.
- 175. Nislow, C., C. Sellitto, R. Kuriyama, and J. R. McIntosh 1990. A monoclonal antibody to a mitotic microtubule-associated protein blocks mitotic progression J Cell Biol. 111:511-22.
- Nurse, P. 1990. Universal control mechanism regulating onset of M-phase. *Nature*. 344:503-508.
- Nusse, R., and H. E. Varmus 1982. Many tumors induced by the mouse mammary tumor virus contain a provirus integrated in the same region of the host genome Cell. 31:99-109.
- 178. Ohkura, H., I. M. Hagan, and D. M. Glover 1995. The conserved Schizosaccharomyces pombe kinase plo1, required to form a bipolar spindle, the actin ring, and septum, can drive septum formation in G1 and G2 cells Genes Dev. 9:1059-73.
- 179. Ookata, K., S. Hisanaga, J. C. Bulinski, H. Murofushi, H. Aizawa, T. J. Itoh, H. Hotani, E. Okumura, K. Tachibana, and T. Kishimoto 1995. Cyclin B interaction with microtubule-associated protein 4 (MAP4) targets p34cdc2 kinase to microtubules and is a potential regulator of M-phase microtubule dynamics J Cell Biol. 128:849-62.
- Ookata, K., S. Hisanaga, E. Okumura, and T. Kishimoto 1993. Association of p34cdc2/cyclin B complex with microtubules in starfish oocytes J Cell Sci. 105:873-81.
- 181. Oppenheim, R. W., D. Prevette, Q. W. Yin, F. Collins, and J. MacDonald 1991. Control of embryonic motoneuron survival in vivo by ciliary neurotrophic factor Science. 251:1616-8.

- 182. Ouyang, B., H. Pan, L. Lu, J. Li, P. Stambrook, B. Li, and W. Dai 1997. Human Prk is a conserved protein serine/threonine kinase involved in regulating M phase functions J Biol Chem. 272:28646-51.
- 183. Ouyang, B., Y. Wang, and D. Wei 1999. Caenorhabditis elegans contains structural homologs of human prk and plk DNA Seq. 10:109-13.
- 184. Pap, M., and G. M. Cooper 1998. Role of glycogen synthase kinase-3 in the phosphatidylinositol 3- Kinase/Akt cell survival pathway J Biol Chem. 273:19929-32.
- 185. Park, W. S., R. R. Oh, J. Y. Park, S. H. Lee, M. S. Shin, Y. S. Kim, S. Y. Kim, H. K. Lee, P. J. Kim, S. T. Oh, N. J. Yoo, and J. Y. Lee 1999. Frequent somatic mutations of the beta-catenin gene in intestinal-type gastric cancer Cancer Res. 59:4257-60.
- 186. **Patra, D., and W. G. Dunphy** 1998. Xe-p9, a Xenopus Suc1/Cks protein, is essential for the Cdc2-dependent phosphorylation of the anaphase- promoting complex at mitosis Genes Dev. **12**:2549-59.
- 187. Payre, F., A. Vincent, and S. Carreno 1999. ovo/svb integrates Wingless and DER pathways to control epidermis differentiation Nature. 400:271-5.
- 188. Pei, J. J., E. Braak, H. Braak, I. Grundke-Iqbal, K. Iqbal, B. Winblad, and R. F. Cowburn 1999. Distribution of active glycogen synthase kinase 3beta (GSK-3beta) in brains staged for Alzheimer disease neurofibrillary changes J Neuropathol Exp Neurol. 58:1010-9.
- Peifer, M., and P. Polakis 2000. Wnt signaling in oncogenesis and embryogenesis--a look outside the nucleus Science. 287:1606-9.
- Pelech, S. L., and D. L. Charest 1995. MAP kinase-dependent pathways in cell cycle control Prog Cell Cycle Res. 1:33-52.
- 191. Peng, C. Y., P. R. Graves, S. Ogg, R. S. Thoma, M. J. Byrnes, 3rd, Z. Wu, M. T. Stephenson, and H. Piwnica-Worms 1998. C-TAK1 protein kinase phosphorylates human Cdc25C on serine 216 and promotes 14-3-3 protein binding Cell Growth Differ. 9:197-208.
- 192. Peng, C. Y., P. R. Graves, R. S. Thoma, Z. Wu, A. S. Shaw, and H. Piwnica-Worms 1997. Mitotic and G2 checkpoint control: regulation of 14-3-3 protein binding by phosphorylation of Cdc25C on serine-216 [see comments] Science. 277:1501-5.
- 193. Pennica, D., T. A. Swanson, J. W. Welsh, M. A. Roy, D. A. Lawrence, J. Lee, J. Brush, L. A. Taneyhill, B. Deuel, M. Lew, C. Watanabe, R. L. Cohen, M. F. Melhem, G. G. Finley, P. Quirke, A. D. Goddard, K. J. Hillan, A. L. Gurney, D. Botstein, and A. J. Levine 1998. WISP genes are members of the connective tissue

growth factor family that are up-regulated in wnt-1-transformed cells and aberrantly expressed in human colon tumors Proc Natl Acad Sci U S A. **95**:14717-22.

- Peters, J. M. 1994. Proteasomes: protein degradation machines of the cell Trends Biochem Sci. 19:377-82.
- 195. Peters, J. M., W. W. Franke, and J. A. Kleinschmidt 1994. Distinct 19 S and 20 S subcomplexes of the 26 S proteasome and their distribution in the nucleus and the cytoplasm J Biol Chem. 269:7709-18.
- 196. Peters, J. M., R. M. McKay, J. P. McKay, and J. M. Graff 1999. Casein kinase I transduces Wnt signals Nature. 401:345-50.
- Piepenburg, O., G. Vorbruggen, and H. Jackle 2000. Drosophila segment borders result from unilateral repression of hedgehog activity by wingless signaling Mol Cell. 6:203-9.
- 198. Plyte, S. E., E. O'Donovan, J. R. Woodgett, and A. J. Harwood 1999. Glycogen synthase kinase-3 (GSK-3) is regulated during Dictyostelium development via the serpentine receptor cAR3 Development. **126**:325-33.
- 199. Polakis, P. 1999. The oncogenic activation of beta-catenin Curr Opin Genet Dev. 9:15-21.
- 200. Polakis, P. 2000. Wnt signaling and cancer Genes Dev. 14:1837-51.
- Qian, Y. W., E. Erikson, C. Li, and J. L. Maller 1998. Activated polo-like kinase Plx1 is required at multiple points during mitosis in Xenopus laevis Mol Cell Biol. 18:4262-71.
- 202. Qian, Y. W., E. Erikson, and J. L. Maller 1999. Mitotic effects of a constitutively active mutant of the Xenopus polo- like kinase Plx1 Mol Cell Biol. **19**:8625-32.
- 203. Qian, Y. W., E. Erikson, and J. L. Maller 1998. Purification and cloning of a protein kinase that phosphorylates and activates the polo-like kinase Plx1 Science. 282:1701-4.
- 204. Riccio, A., S. Ahn, C. M. Davenport, J. A. Blendy, and D. D. Ginty 1999. Mediation by a CREB family transcription factor of NGF-dependent survival of sympathetic neurons Science. 286:2358-61.
- 205. Riese, J., X. Yu, A. Munnerlyn, S. Eresh, S. C. Hsu, R. Grosschedl, and M. Bienz 1997. LEF-1, a nuclear factor coordinating signaling inputs from wingless and decapentaplegic Cell. 88:777-87.
- 206. Roose, J., and H. Clevers 1999. TCF transcription factors: molecular switches in carcinogenesis Biochim Biophys Acta. 1424:M23-37.

- 207. Ross, S. E., R. L. Erickson, N. Hemati, and O. A. MacDougald 1999. Glycogen synthase kinase 3 is an insulin-regulated C/EBPalpha kinase Mol Cell Biol. 19:8433-41.
- 208. Sakai, H. 1994. Microtubules in mitosis Cell Struct Funct. 19:57-62.
- 209. Samowitz, W. S., M. D. Powers, L. N. Spirio, F. Nollet, F. van Roy, and M. L. Slattery 1999. Beta-catenin mutations are more frequent in small colorectal adenomas than in larger adenomas and invasive carcinomas Cancer Res. 59:1442-4.
- 210. Satoh, S., Y. Daigo, Y. Furukawa, T. Kato, N. Miwa, T. Nishiwaki, T. Kawasoe, H. Ishiguro, M. Fujita, T. Tokino, Y. Sasaki, S. Imaoka, M. Murata, T. Shimano, Y. Yamaoka, and Y. Nakamura 2000. AXIN1 mutations in hepatocellular carcinomas, and growth suppression in cancer cells by virus-mediated transfer of AXIN1 Nat Genet. 24:245-50.
- 211. Saunders, R. D., M. C. Avides, T. Howard, C. Gonzalez, and D. M. Glover 1997. The Drosophila gene abnormal spindle encodes a novel microtubule- associated protein that associates with the polar regions of the mitotic spindle J Cell Biol. 137:881-90.
- 212. Scheuner, D., C. Eckman, M. Jensen, X. Song, M. Citron, N. Suzuki, T. D. Bird, J. Hardy, M. Hutton, W. Kukull, E. Larson, E. Levy-Lahad, M. Viitanen, E. Peskind, P. Poorkaj, G. Schellenberg, R. Tanzi, W. Wasco, L. Lannfelt, D. Selkoe, and S. Younkin 1996. Secreted amyloid beta-protein similar to that in the senile plaques of Alzheimer's disease is increased in vivo by the presenilin 1 and 2 and APP mutations linked to familial Alzheimer's disease [see comments] Nat Med. 2:864-70.
- 213. Schmid, F. X. 1995. Protein folding. Prolyl isomerases join the fold Curr Biol. 5:993-4.
- 214. Seldin, D. C., and P. Leder 1995. Casein kinase II alpha transgene-induced murine lymphoma: relation to theileriosis in cattle [see comments] Science. 267:894-7.
- Sethi, N., M. C. Monteagudo, D. Koshland, E. Hogan, and D. J. Burke 1991. The CDC20 gene product of Saccharomyces cerevisiae, a beta-transducin homolog, is required for a subset of microtubule-dependent cellular processes Mol Cell Biol. 11:5592-602.
- 216. Shen, M., P. T. Stukenberg, M. W. Kirschner, and K. P. Lu 1998. The essential mitotic peptidyl-prolyl isomerase Pin1 binds and regulates mitosis-specific phosphoproteins Genes Dev. 12:706-20.
- Sherr, C. J., and J. M. Roberts 1995. Inhibitors of mammalian G1 cyclin-dependent kinases Genes Dev. 9:1149-63.

- 218. Shiina, N., T. Moriguchi, K. Ohta, Y. Gotoh, and E. Nishida 1992. Regulation of a major microtubule-associated protein by MPF and MAP kinase Embo J. 11:3977-84.
- 219. Shimizu, H., M. A. Julius, M. Giarre, Z. Zheng, A. M. Brown, and J. Kitajewski 1997. Transformation by Wnt family proteins correlates with regulation of betacatenin Cell Growth Differ. 8:1349-58.
- 220. Shirayama, M., W. Zachariae, R. Ciosk, and N. K. 1998. The Polo-like kinase Cdc5p and the WD-repeat protein Cdc20p/fizzy are regulators and substrates of the anaphase promoting complex in *Saccharomyces cerevisiae*. *The EMBO Journal*. 17:1336-1349.
- 221. Shitoh, K., F. Konishi, T. Iijima, T. Ohdaira, K. Sakai, K. Kanazawa, and M. Miyaki 1999. A novel case of a sporadic desmoid tumour with mutation of the beta catenin gene J Clin Pathol. 52:695-6.
- 222. Shou, W., J. H. Seol, A. Shevchenko, C. Baskerville, D. Moazed, Z. W. Chen, J. Jang, H. Charbonneau, and R. J. Deshaies 1999. Exit from mitosis is triggered by Tem1-dependent release of the protein phosphatase Cdc14 from nucleolar RENT complex Cell. 97:233-44.
- 223. Shtutman, M., J. Zhurinsky, I. Simcha, C. Albanese, M. D'Amico, R. Pestell, and A. Ben-Ze'ev 1999. The cyclin D1 gene is a target of the beta-catenin/LEF-1 pathway Proc Natl Acad Sci U S A. 96:5522-7.
- 224. Shuttleworth, J. 1995. The regulation and functions of cdk7 Prog Cell Cycle Res.1:229-40.
- 225. Simmons, D. L., B. G. Neel, R. Stevens, G. Evett, and R. L. Erikson 1992. Identification of an early-growth-response gene encoding a novel putative protein kinase. *Molecumlar and Cellular Biology*. 12:4164-4169.
- 226. Sohrmann, M., C. Fankhauser, C. Brodbeck, and V. Simanis 1996. The dmf1/mid1 gene is essential for correct positioning of the division septum in fission yeast Genes Dev. 10:2707-19.
- 227. Song, D. H., D. J. Sussman, and D. C. Seldin 2000. Endogenous protein kinase CK2 participates in Wnt signaling in mammary epithelial cells J Biol Chem. 275:23790-7.
- 228. Song, S., T. Z. Grenfell, S. Garfield, R. L. Erikson, and K. S. Lee 2000. Essential function of the polo box of Cdc5 in subcellular localization and induction of cytokinetic structures Mol Cell Biol. **20**:286-98.
- Song, S., and K. S. Lee 2001. A Novel Function of Saccharomyces cerevisiae CDC5 in Cytokinesis J Cell Biol. 152:451-470.

- Sparks, A. B., P. J. Morin, B. Vogelstein, and K. W. Kinzler 1998. Mutational analysis of the APC/beta-catenin/Tcf pathway in colorectal cancer Cancer Res. 58:1130-4.
- Sperber, B. R., S. Leight, M. Goedert, and V. M. Lee 1995. Glycogen synthase kinase-3 beta phosphorylates tau protein at multiple sites in intact cells Neurosci Lett. 197:149-53.
- 232. Spiegelman, V. S., T. J. Slaga, M. Pagano, T. Minamoto, Z. Ronai, and S. Y. Fuchs 2000. Wnt/beta-catenin signaling induces the expression and activity of betaTrCP ubiquitin ligase receptor Mol Cell. 5:877-82.
- 233. **Stambolic, V., L. Ruel, and J. R. Woodgett** 1996. Lithium inhibits glycogen synthase kinase-3 activity and mimics wingless signalling in intact cells [published erratum appears in Curr Biol 1997 Mar 1;7(3):196] Curr Biol. **6**:1664-8.
- 234. Stukenberg, P. T., K. D. Lustig, T. J. McGarry, R. W. King, J. Kuang, and M. W. Kirschner 1997. Systematic identification of mitotic phosphoproteins. *Current Biology*. 7:338-348.
- 235. Su, J. H., A. J. Anderson, B. J. Cummings, and C. W. Cotman 1994. Immunohistochemical evidence for apoptosis in Alzheimer's disease Neuroreport. 5:2529-33.
- 236. Sudol, M. 1996. Structure and function of the WW domain Prog Biophys Mol Biol.65:113-32.
- 237. Sugaya, K., M. Reeves, and M. McKinney 1997. Topographic associations between DNA fragmentation and Alzheimer's disease neuropathology in the hippocampus Neurochem Int. 31:275-81.
- Summers, S. A., L. A. Garza, H. Zhou, and M. J. Birnbaum 1998. Regulation of insulin-stimulated glucose transporter GLUT4 translocation and Akt kinase activity by ceramide Mol Cell Biol. 18:5457-64.
- 239. Sunkel, C. E., and D. M. Glover 1988. Polo, a mitotic mutant of *Drosophila* displaying abnormal spindle poles. *Journal of Cell Sciences*. **89:**25-38.
- 240. **Taagepera, S., M. S. Campbell, and G. J. Gorbsky** 1995. Cell-cycle-regulated localization of tyrosine and threonine phosphoepitopes at the kinetochores of mitotic chromosomes Exp Cell Res. **221**:249-60.
- 241. Takashima 1999. Alzheimer's Disease: Etiology, Pathogenesis and Therapeutics., Wiley, Chichester, UK, 323-331.
- 242. Takashima, A., M. Murayama, O. Murayama, T. Kohno, T. Honda, K. Yasutake,N. Nihonmatsu, M. Mercken, H. Yamaguchi, S. Sugihara, and B. Wolozin 1998.

Presenilin 1 associates with glycogen synthase kinase-3beta and its substrate tau Proc Natl Acad Sci U S A. **95:**9637-41.

- 243. **Tavares, A. A., D. M. Glover, and C. E. Sunkel** 1996. The conserved mitotic kinase polo is regulated by phosphorylation and has preferred microtubule-associated substrates in Drosophila embryo extracts Embo J. **15**:4873-83.
- 244. Tejpar, S., F. Nollet, C. Li, J. S. Wunder, G. Michils, P. dal Cin, E. Van Cutsem,
  B. Bapat, F. van Roy, J. J. Cassiman, and B. A. Alman 1999. Predominance of beta-catenin mutations and beta-catenin dysregulation in sporadic aggressive fibromatosis (desmoid tumor) Oncogene. 18:6615-20.
- 245. **Tetsu, O., and F. McCormick** 1999. Beta-catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells Nature. **398:**422-6.
- 246. Thomas, G. M., S. Frame, M. Goedert, I. Nathke, P. Polakis, and P. Cohen 1999. A GSK3-binding peptide from FRAT1 selectively inhibits the GSK3- catalysed phosphorylation of axin and beta-catenin FEBS Lett. 458:247-51.
- 247. Toczyski, D. P., D. J. Galgoczy, and L. H. Hartwell 1997. CDC5 and CKII control adaptation to the yeast DNA damage checkpoint Cell. **90**:1097-106.
- 248. Tombes, R. M., J. G. Peloquin, and G. G. Borisy 1991. Specific association of an M-phase kinase with isolated mitotic spindles and identification of two of its substrates as MAP4 and MAP1B Cell Regul. 2:861-74.
- 249. Toyoshima, F., T. Moriguchi, A. Wada, M. Fukuda, and E. Nishida 1998. Nuclear export of cyclin B1 and its possible role in the DNA damage- induced G2 checkpoint Embo J. 17:2728-35.
- 250. Toyoshima-Morimoto, F., E. Taniguchi, N. Shinya, A. Iwamatsu, and E. Nishida 2001. Polo-like kinase 1 phosphorylates cyclin B1 and targets it to the nucleus during prophase Nature. 410:215-220.
- 251. Uchiumi, T., D. L. Longo, and D. K. Ferris 1997. Cell cycle regulation of the human polo-like kinase (PLK) promoter J Biol Chem. 272:9166-74.
- 252. Uren, A., F. Reichsman, V. Anest, W. G. Taylor, K. Muraiso, D. P. Bottaro, S. Cumberledge, and J. S. Rubin 2000. Secreted frizzled-related protein-1 binds directly to Wingless and is a biphasic modulator of Wnt signaling J Biol Chem. 275:4374-82.
- 253. van der Heyden, M. A., M. B. Rook, M. M. Hermans, G. Rijksen, J. Boonstra, L. H. Defize, and O. H. Destree 1998. Identification of connexin43 as a functional target for Wnt signalling J Cell Sci. 111:1741-9.

- Vandre, D. D., F. M. Davis, P. N. Rao, and G. G. Borisy 1984. Phosphoproteins are components of mitotic microtubule organizing centers Proc Natl Acad Sci U S A. 81:4439-43.
- 255. Vaux, D. L., and S. J. Korsmeyer 1999. Cell death in development Cell. 96:245-54.
- Visintin, R., E. S. Hwang, and A. Amon 1999. Cfi1 prevents premature exit from mitosis by anchoring Cdc14 phosphatase in the nucleolus [see comments] Nature. 398:818-23.
- 257. Vyas, S., F. Javoy-Agid, M. T. Herrero, O. Strada, F. Boissiere, U. Hibner, and Y. Agid 1997. Expression of Bcl-2 in adult human brain regions with special reference to neurodegenerative disorders J Neurochem. 69:223-31.
- 258. **Wang** 1999., p. 311-321, Alzheimer's Disease: Etiology, Pathogenesis and Therapeutics. Iqbal et al. (Eds), Wiley, Chichester, UK,.
- 259. Wang, J. Z., Q. Wu, A. Smith, I. Grundke-Iqbal, and K. Iqbal 1998. Tau is phosphorylated by GSK-3 at several sites found in Alzheimer disease and its biological activity markedly inhibited only after it is prephosphorylated by A-kinase FEBS Lett. **436**:28-34.
- 260. Wang, Q., R. Somwar, P. J. Bilan, Z. Liu, J. Jin, J. R. Woodgett, and A. Klip 1999. Protein kinase B/Akt participates in GLUT4 translocation by insulin in L6 myoblasts Mol Cell Biol. 19:4008-18.
- 261. Weber, J. D., W. Hu, S. C. Jefcoat, Jr., D. M. Raben, and J. J. Baldassare 1997. Ras-stimulated extracellular signal-related kinase 1 and RhoA activities coordinate platelet-derived growth factor-induced G1 progression through the independent regulation of cyclin D1 and p27 J Biol Chem. 272:32966-71.
- Wei, Y., M. Fabre, S. Branchereau, F. Gauthier, G. Perilongo, and M. A. Buendia 2000. Activation of beta-catenin in epithelial and mesenchymal hepatoblastomas Oncogene. 19:498-504.
- 263. Wells, N. J., N. Watanabe, T. Tokusumi, W. Jiang, M. A. Verdecia, and T. Hunter 1999. The C-terminal domain of the Cdc2 inhibitory kinase Myt1 interacts with Cdc2 complexes and is required for inhibition of G(2)/M progression J Cell Sci. 112:3361-71.
- 264. Welsh, G. I., C. M. Miller, A. J. Loughlin, N. T. Price, and C. G. Proud 1998. Regulation of eukaryotic initiation factor eIF2B: glycogen synthase kinase-3 phosphorylates a conserved serine which undergoes dephosphorylation in response to insulin FEBS Lett. 421:125-30.

- Wianny, F., A. Tavares, M. J. Evans, D. M. Glover, and M. Zernicka-Goetz 1998. Mouse polo-like kinase 1 associates with the acentriolar spindle poles, meiotic chromosomes and spindle midzone during oocyte maturation Chromosoma. 107:430-9.
- 266. Wielenga, V. J., R. Smits, V. Korinek, L. Smit, M. Kielman, R. Fodde, H. Clevers, and S. T. Pals 1999. Expression of CD44 in Apc and Tcf mutant mice implies regulation by the WNT pathway Am J Pathol. 154:515-23.
- 267. Willert, K., M. Brink, A. Wodarz, H. Varmus, and R. Nusse 1997. Casein kinase 2 associates with and phosphorylates dishevelled Embo J. 16:3089-96.
- Winston, J. T., S. R. Coats, Y. Z. Wang, and W. J. Pledger 1996. Regulation of the cell cycle machinery by oncogenic ras Oncogene. 12:127-34.
- Wodarz, A., and R. Nusse 1998. Mechanisms of Wnt signaling in development Annu Rev Cell Dev Biol. 14:59-88.
- 270. Wolf, G., R. Elez, A. Doermer, U. Holtrich, H. Ackermann, H. J. Stutte, H. M. Altmannsberger, H. Rubsamen-Waigmann, and K. Strebhardt 1997. Prognostic significance of polo-like kinase (PLK) expression in non- small cell lung cancer Oncogene. 14:543-9.
- Wolozin, B., K. Iwasaki, P. Vito, J. K. Ganjei, E. Lacana, T. Sunderland, B. Zhao, J. W. Kusiak, W. Wasco, and L. D'Adamio 1996. Participation of presenilin 2 in apoptosis: enhanced basal activity conferred by an Alzheimer mutation Science. 274:1710-3.
- 272. Xie, H., J. M. Litersky, J. A. Hartigan, R. S. Jope, and G. V. Johnson 1998. The interrelationship between selective tau phosphorylation and microtubule association Brain Res. **798**:173-83.
- 273. Xu, L., R. B. Corcoran, J. W. Welsh, D. Pennica, and A. J. Levine 2000. WISP-1 is a Wnt-1- and beta-catenin-responsive oncogene Genes Dev. 14:585-95.
- 274. Yamaguchi, T. P., S. Takada, Y. Yoshikawa, N. Wu, and A. P. McMahon 1999. T (Brachyury) is a direct target of Wnt3a during paraxial mesoderm specification Genes Dev. 13:3185-90.
- 275. Yang, F., X. Sun, W. Beech, B. Teter, S. Wu, J. Sigel, H. V. Vinters, S. A. Frautschy, and G. M. Cole 1998. Antibody to caspase-cleaved actin detects apoptosis in differentiated neuroblastoma and plaque-associated neurons and microglia in Alzheimer's disease [see comments] Am J Pathol. 152:379-89.

- 276. Yang, J., E. S. Bardes, J. D. Moore, J. Brennan, M. A. Powers, and S. Kornbluth 1998. Control of cyclin B1 localization through regulated binding of the nuclear export factor CRM1 Genes Dev. 12:2131-43.
- 277. Yang, X., M. van Beest, H. Clevers, T. Jones, D. A. Hursh, and M. A. Mortin 2000. decapentaplegic is a direct target of dTcf repression in the Drosophila visceral mesoderm Development. 127:3695-702.
- 278. Ye, X. S., G. Xu, R. T. Pu, R. R. Fincher, S. L. McGuire, A. H. Osmani, and S. A. Osmani 1995. The NIMA protein kinase is hyperphosphorylated and activated downstream of p34cdc2/cyclin B: coordination of two mitosis promoting kinases Embo J. 14:986-94.
- 279. Yost, C., M. Torres, J. R. Miller, E. Huang, D. Kimelman, and R. T. Moon 1996. The axis-inducing activity, stability, and subcellular distribution of beta-catenin is regulated in Xenopus embryos by glycogen synthase kinase 3 Genes Dev. 10:1443-54.
- Yu, X., J. Riese, S. Eresh, and M. Bienz 1998. Transcriptional repression due to high levels of Wingless signalling Embo J. 17:7021-32.
- Zachariae, W. 1999. Progression into and out of mitosis [see comments] Curr Opin Cell Biol. 11:708-16.
- 282. Zachariae, W., and K. Nasmyth 1999. Whose end is destruction: cell division and the anaphase-promoting complex Genes Dev. 13:2039-58.
- 283. Zheng-Fischhofer, Q., J. Biernat, E. M. Mandelkow, S. Illenberger, R. Godemann, and E. Mandelkow 1998. Sequential phosphorylation of Tau by glycogen synthase kinase-3beta and protein kinase A at Thr212 and Ser214 generates the Alzheimer-specific epitope of antibody AT100 and requires a paired-helical-filament-like conformation Eur J Biochem. 252:542-52.
- 284. Zong, W. X., L. C. Edelstein, C. Chen, J. Bash, and C. Gelinas 1999. The prosurvival Bcl-2 homolog Bfl-1/A1 is a direct transcriptional target of NF-kappaB that blocks TNFalpha-induced apoptosis Genes Dev. 13:382-7.

## Résumé

Nous avons étudié deux familles de protéines kinases impliquées dans des fonctions physiologiques importantes.

La "Glycogen Synthase Kinase-3" (GSK-3) est une protéine très conservée chez de nombreuses espèces. Elle intervient dans divers processus cellulaires tels que le développement embryonnaire, la prolifération cellulaire, l'apoptose, les fonctions neuronales, le rythme circadien. Nous avons démontré que GSK-3 peut être purifiée par chromatographie d'affinité sur axine fixée sur des billes de sépharose.

Le paludisme, dû au parasite *Plasmodium falciparum*, est responsable de 2 à 3 millions de morts par an. L'effet des thérapies préventives et curatives est affaibli par l'apparition de chimiorésistances.

Le clonage de l'ADN d'une protéine homologue de GSK-3 humaine chez ce parasite (PfGSK-3) a permis de mettre en place un test pour évaluer l'effet inhibiteur de diverses molécules. Le modèle de la structure tridimensionnelle de PfGSK-3 permet d'affirmer que cette protéine est très conservée par rapport à GSK-3 humaine. L'expression de l'ARNm ne varie pas dans les 3 stades érythrocytaires étudiés. Les érythrocytes sains ne possèdent pas de GSK-3. PfGSK-3 est localisée au niveau de structures de la membrane plasmique de l'érythrocyte, les «fentes de Mauer», et à l'intérieur du parasite. Le marquage de PfGSK-3 augmente quand le parasite se développe du stade ring, au stade trophozoïte puis schizonte.

Polo est une protéine kinase très conservée qui intervient à différents niveaux de la régulation du cycle cellulaire (transition G2/M et mitose).

Le clonage d'une partie de l'ADNc de Polo d'oursin (Plu1) a permis la synthèse d'anticorps spécifiques. L'immunoprécipitation de la protéine Plu1 au cours des premières divisions de l'embryon d'oursin a révélé que Plu1 est exprimée tout au long du cycle cellulaire. Elle se lie à différentes protéines au cours du cycle dont l'identité reste à vérifier (Asp? et Klp?) et pourrait donc réguler ou/et être régulée par ces protéines.