

Université de Montréal

**Nouveaux modes de régulation
des voies MAP kinase eucaryotes
par phosphorylation**

par

Mathieu Arcand

Département de Pharmacologie

Faculté de Médecine

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de *Philosophiae Doctor* (Ph.D.)
en pharmacologie

Janvier, 2008

© Mathieu Arcand, 2008



W

4

U58

2008

V. 013

Direction des bibliothèques

AVIS

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

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

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

NOTICE

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

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

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

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée :

Nouveaux modes de régulation
des voies MAP kinase eucaryotes
par phosphorylation

présentée par :
Mathieu Arcand

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Jean-François Gauchat, président-rapporteur
Sylvain Meloche, directeur de recherche
André De Léan, membre du jury
Jacques Huot, examinateur externe
Jean-François Gauchat, représentant du doyen de la FES

Résumé

Les voies MAP kinases sont des modules hautement conservés qui font intervenir un nombre limité d'acteurs afin d'intégrer des signaux variés, et de générer une réponse spécifique appropriée. De la levure à l'humain, elles sont organisées en blocs de trois kinases à l'activation séquentielle. Ces voies sont conservées dans leur architecture et leurs modes de régulation parmi lesquels la phosphorylation, les interactions protéine-protéine et la localisation subcellulaire s'influencent mutuellement. Afin d'en apprendre davantage sur la régulation des voies MAP kinases, nous nous sommes d'abord penchés sur leur phosphorylation.

Dans un premier temps, nous avons étudié la protéine régulatrice Ste50 qui est essentielle à l'activation des voies MAP kinase Fus3, Hog1 et Kss1 de *S. cerevisiae*. Nous avons identifié la thréonine 42 comme site de phosphorylation requis pour la réponse aux phéromones relayée par Fus3, mais pas pour la réponse à l'osmolarité élevée via Hog1. De plus, la phosphorylation de ce résidu affecte la distribution subcellulaire de Ste50.

En second lieu, nous avons identifié un résidu dont la phosphorylation est requise pour l'entrée au noyau de la MAP kinase ERK1 de mammifère. La sérine 283 influence l'activité nucléaire de ERK1 mais pas son activité cytoplasmique, en régulant ses interactions avec les nucléoporines, notamment. Cette activité nucléaire est nécessaire à plusieurs processus physiologiques dont la différenciation des cellules PC12.

Ces études illustrent tant chez la levure que les mammifères que la phosphorylation d'un seul site peut grandement affecter la localisation subcellulaire de la protéine, tout comme le résultat des signaux qu'elle relaye. Nos travaux devraient contribuer à élucider les mécanismes à la base de la spécificité des signaux intégrés par les voies MAP kinases.

Mots-clés : Signalisation intracellulaire, Voies MAP kinases, Phosphorylation, Ste50, Spécificité du signal, ERK1, Localisation subcellulaire, Entrée au noyau, Insertion des MAP kinases

Abstract

MAP kinase pathways are highly conserved modules that utilize a limited number of players in order to integrate various signals, and generate a specific appropriate response. From yeast to human, they are tiered as three sequentially-activated kinases. Hence, the architecture and the components are homologous, as are the modes of regulation in which phosphorylation, protein-protein interactions, and subcellular localization are mutually influenced. Aiming to gain further knowledge on the regulation of MAP kinase pathways, we first examined phosphorylation.

First, we studied the regulatory protein Ste50 which is essential to the Fus3, Hog1 and Kss1 MAP kinase pathways in *S. cerevisiae*. We have identified threonine 42 as a phosphorylation site required for Fus3-mediated pheromone response, but not for the Hog1 high osmolarity response pathway. Moreover, phosphorylation of this residue affects Ste50 subcellular distribution.

Secondly, we identified serine 283 as a residue whose phosphorylation is required for nuclear entry of the mammalian MAP kinase ERK1. Mutation of this site perturbs some interactions including those with nucleoporins, and abolishes ERK1 nuclear but not cytoplasmic activity. This nuclear activity is necessary for many physiological processes including PC12 cell differentiation.

These studies show that phosphorylation of a single residue can greatly affect the protein's subcellular localization as well as the outcome of the signals it conveys. Our work should contribute to decipher the mechanisms underlying the specificity of MAP kinase signal transduction.

Keywords : Signal transduction, MAP kinase pathways, Phosphorylation, Ste50, Signal specificity, ERK1, Subcellular localization, Nuclear entry, MAP kinase insertion.

Table des matières

1	Introduction	1
1.1	Signalisation intracellulaire	1
1.1.1	Localisation subcellulaire	3
1.1.1.1	Noyau	3
1.1.1.1.1	Transport passif.....	4
1.1.1.1.2	Transport actif.....	5
1.1.1.1.2.1	Import nucléaire	6
1.1.1.1.2.2	Export nucléaire	8
1.1.1.1.3	Transport et sélectivité dans le NPC.....	9
1.1.1.1.3.1	Porte d'affinité Brownienne.....	11
1.1.1.1.3.2	Phase sélective	11
1.1.1.1.3.3	« Spaghetti huileux ».....	12
1.1.1.2	Membranes et organelles.....	13
1.1.1.2.1	Séquences signal	13
1.1.1.2.2	Domaines de ciblage	15
1.1.1.2.3	Modifications post-traductionnelles.....	16
1.1.2	Protéines kinases	18
1.1.2.1	Phosphorylation	18
1.1.2.2	Sites de phosphorylation	19
1.1.2.3	Structure des protéine kinases	21
1.1.2.4	Classification des kinases.....	23
1.2	MAP kinases	26
1.2.1	Découverte des MAP kinases.....	27
1.2.2	Modules de trois kinases.....	28
1.2.2.1	Une cascade de phosphorylation	28
1.2.2.2	De multiples voies	29
1.3	MAP kinases de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	31

1.3.1	Voie Fus3 de conjugaison.....	32
1.3.2	Voie Kss1 de la croissance filamenteuse.....	34
1.3.3	Voie Hog1 de réponse à l'osmolarité élevée.....	35
1.3.4	Autres voies MAP kinase.....	38
1.3.4.1	Voie Mpk1 de l'intégrité de la paroi cellulaire.....	38
1.3.4.2	Voie Smk1 de la sporulation.....	39
1.4	MAP kinases de mammifères.....	39
1.4.1	Voie ERK1/2.....	41
1.4.1.1	Raf.....	41
1.4.1.1.1	RKIP.....	43
1.4.1.2	MEK1 et MEK2.....	44
1.4.1.3	ERK1 et ERK2.....	45
1.4.1.3.1	Expression.....	47
1.4.1.3.2	Inactivation génique.....	48
1.4.1.3.2.1	ERK1.....	48
1.4.1.3.2.2	ERK2.....	49
1.4.1.3.2.3	ERK1 et ERK2.....	50
1.4.1.3.3	Initiation du cycle cellulaire.....	50
1.4.1.3.4	MK.....	51
1.4.1.3.5	ERK1b, ERK1c, Golgi et mitose.....	51
1.4.1.3.6	Rôle physiopathologique de ERK1/2.....	52
1.4.1.3.6.1	Cancer.....	53
1.4.1.3.6.2	Système nerveux.....	54
1.4.2	Voie JNK.....	54
1.4.2.1	MAPKKK de la voie JNK.....	55
1.4.2.2	MKK4 et MKK7.....	57
1.4.2.3	JNK1, JNK2 et JNK3.....	59
1.4.2.4	JIP.....	60

1.4.3	Voie p38.....	61
1.4.3.1	Composantes de la voie p38.....	61
1.4.3.2	p38 α , p38 β , p38 γ et p38 δ	62
1.4.3.2.1	Activation non conventionnelle.....	65
1.4.3.2.1.1	Autophosphorylation via TAB1.....	65
1.4.3.2.1.2	Phosphorylation sur la tyrosine 323.....	65
1.4.3.2.2	Cible thérapeutique.....	66
1.4.4	Voie ERK5.....	67
1.4.5	MAP kinases atypiques.....	69
1.4.5.1	ERK3.....	69
1.4.5.2	ERK4.....	71
1.4.5.3	ERK7.....	71
1.4.5.4	NLK.....	72
1.5	Propriétés conservées des MAP kinases.....	73
1.5.1	Architecture.....	73
1.5.1.1	Propagation du signal dans la cassette de trois kinases.....	74
1.5.1.2	Redondance et compétition.....	76
1.5.2	Composantes.....	80
1.5.2.1	MAPKKK.....	80
1.5.2.2	MAPKK.....	81
1.5.2.2.1	Sélectivité des MAPKK.....	82
1.5.2.2.2	Localisation subcellulaire des MAPKK.....	83
1.5.2.3	MAP kinases.....	83
1.5.2.3.1	Substrats des MAP kinases.....	85
1.5.2.3.2	Localisation subcellulaire des MAP kinases.....	87
1.5.2.3.2.1	Entrée au noyau.....	89
1.5.2.3.2.2	Sortie du noyau.....	91
1.5.2.3.2.3	Cycle nucléo-cytoplasmique.....	91

1.5.3 Mécanismes de régulation des voies MAP kinase	93
1.5.3.1 Phosphorylation	94
1.5.3.1.1 Sites activateurs	94
1.5.3.1.2 Autres sites régulateurs	95
1.5.3.1.3 Phosphatases	97
1.5.3.1.3.1 MAP kinase phosphatases	97
1.5.3.1.3.1.1 MAP kinase phosphatases à double spécificité.....	98
1.5.3.2 Interactions stables.....	100
1.5.3.2.1 Protéines d'échafaudage.....	101
1.5.3.2.2 Interactions d'amarrage.....	105
1.5.3.2.2.1 Domaine pour un amarrage versatile.....	106
1.5.3.2.2.2 Amarrage commun.....	106
1.5.3.2.2.3 Amarrage FXFP.....	112
1.5.3.2.2.4 Src-Homology 3.....	114
1.5.3.2.2.5 Interactions d'amarrage et spécificités des MAP kinases.....	115
1.5.3.3 Localisation subcellulaire.....	118
1.5.3.3.1 Ciblage.....	119
1.5.3.3.2 Complexes transcriptionnels.....	124
1.5.3.3.3 Sensibilité et spécificité.....	124
1.5.3.4 Paramètres cinétiques.....	125
1.5.3.4.1 Activation transitoire et activation soutenue	126
1.5.3.4.1.1 Cellules PC12.....	126
1.5.3.4.2 Boucles de rétroaction	128
1.5.3.4.2.1 Régulation croisée.....	131
1.6 Hypothèse de travail.....	132
2 Résultats	133
2.1 Phosphorylation of the MAPKKK regulator Ste50p in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> : a casein kinase I phosphorylation site is required for proper mating function	133

2.1.1	Contexte	133
2.1.2	Article publié dans <i>Eucaryotic Cell</i> (2003)	133
2.1.2.1	Abstract	135
2.1.2.2	Introduction	135
2.1.2.3	Materials and methods	137
2.1.2.3.1	Materials	137
2.1.2.3.2	Yeast strains and manipulations.....	138
2.1.2.3.3	Plasmid constructions.....	139
2.1.2.3.4	Preparation of GST fusion proteins from <i>Escherichia coli</i> and yeast 140	
2.1.2.3.5	Protein kinase assays, ³² P metabolic labeling, and phosphopeptide mapping 141	
2.1.2.3.6	Subcellular fractionation of Ste50p-containing protein complexes..	142
2.1.2.3.7	Yeast mating and other assays	142
2.1.2.3.8	Photomicroscopy.....	143
2.1.2.4	Results	143
2.1.2.4.1	Ste50p is a phosphoprotein in vivo and is phosphorylated on multiple serine/threonine residues.....	143
2.1.2.4.2	Threonine 42 is important for Ste50p function in the pheromone response pathway	145
2.1.2.4.3	Phosphorylation of threonine 42 is required to suppress the mating defect of Ste11SAMp	147
2.1.2.4.4	Threonine 42 preferentially regulates the function of Ste50p in the pheromone response pathway	149
2.1.2.4.5	Threonine 42 is phosphorylated by CKI in vitro	151
2.1.2.4.6	Ste50p is phosphorylated on threonine 42 in vivo.....	155
2.1.2.4.7	T42D does not bypass the requirement for CKI activity for efficient mating 156	

2.1.2.4.8	The T42A mutation alters the subcellular fractionation profile of Ste50p	158
2.1.2.5	Discussion	160
2.1.2.6	Acknowledgments	164
2.1.2.7	References	165
2.1.3	Épilogue	169
2.1.4	Données supplémentaires	169
2.2	Phosphorylation of serine 283 is required for ERK1 nuclear function	172
2.2.1	Contexte	172
2.2.2	Manuscrit pour soumission à <i>EMBO Journal</i>	172
2.2.2.1	Abstract	174
2.2.2.2	Introduction	174
2.2.2.3	Materials and methods	178
2.2.2.3.1	Reagents and antibodies	178
2.2.2.3.2	Plasmid constructs and mutagenesis	178
2.2.2.3.3	Cell culture and transfections	179
2.2.2.3.4	Phosphorylation analysis	179
2.2.2.3.5	Luciferase reporter and kinase assays	180
2.2.2.3.6	Immunoblot and co-precipitation analysis	180
2.2.2.3.7	Immunofluorescence microscopy	181
2.2.2.3.8	PC-12 differentiation assays	181
2.2.2.4	Results	182
2.2.2.4.1	ERK1 is phosphorylated on serine 283 in vivo	182
2.2.2.4.2	Phosphorylation of serine 283 is not required for ERK1 activation and cytoplasmic activity	185
2.2.2.4.3	ERK1-dependent gene transcription requires phosphorylation of serine 283	188

2.2.2.4.4	Phosphorylation of serine 283 is required for MEK1-dependent nuclear entry.....	190
2.2.2.4.5	Nuclear targeting overcomes requirement of serine 283 for ERK1 nuclear function.....	194
2.2.2.4.6	ERK1 S283A impairs nuclear activity.....	197
2.2.2.4.7	Serine 283 affects MEK-specific binding but not CD interactions ..	199
2.2.2.4.8	Phosphorylation of serine 283 is required for proper nucleoporin binding 202	
2.2.2.4.9	Phosphorylation of serine 283 is required for PC12 differentiation .	203
2.2.2.5	Discussion	205
2.2.2.6	Acknowledgments	213
2.2.3	Données supplémentaires.....	214
3	Discussion.....	217
3.1	Sites de phosphorylation.....	217
3.1.1	Identification chez Ste50.....	218
3.1.2	Identification chez ERK1.....	219
3.1.2.1	Autres sites de phosphorylation.....	220
3.2	Protéine kinases impliquées.....	223
3.2.1	Caséine kinases.....	225
3.2.1.1	Thréonine 42 et Caséine kinase 1	225
3.2.1.2	Sérine 283 et Caséine kinase 2	226
3.2.2	Motifs consensus pour la sérine 283.....	228
3.3	Modèle de transport nucléo-cytoplasmique de ERK1/2.....	230
3.3.1	ERK1 et MEK1 influencent mutuellement leur localisation	231
3.3.1.1	Amarrage commun et export.....	233
3.3.1.1.1	Séquences d'amarrage et de localisation.....	234
3.3.2	Cycle nucléo-cytoplasmique	235
3.3.3	Dimérisation de ERK1/2.....	237

3.4	Rétention cytoplasmique de ERK1 activée	240
3.4.1	Candidats improbables.....	241
3.4.1.1	STEP, PTP-SL, HePTP et DS-MKP.....	241
3.4.2	Candidats probables.....	242
3.4.2.1	Calcineurine.....	242
3.4.2.2	DAPK.....	243
3.4.2.3	Dynéine	243
3.4.2.4	ERF	243
3.4.2.5	FHL2.....	244
3.4.2.6	MNK1/2a.....	244
3.4.2.7	Naf1.....	244
3.4.2.8	PEA-15.....	245
3.4.2.9	Validation des candidatures.....	245
3.5	Perspectives	247
	Bibliographie.....	249
	Annexe I.....	I

Liste des tableaux

Tableau 1-I Signaux d'import et d'export nucléaire	7
Tableau 1-II Domaines de ciblage à la membrane	16
Tableau 1-III Sous-domaines catalytiques.....	23
Tableau 1-IV Classification des kinases	26
Tableau 1-V Inactivation génique des composantes de la voie ERK1/2.....	43
Tableau 1-VI Substrats des MAP kinases ERK1 et ERK2.....	47
Tableau 1-VII Inactivation génique des composantes de la voie JNK.....	57
Tableau 1-VIII Propriétés d'activation des isoformes de p38.....	63
Tableau 1-IX Inactivation génique des composantes de la voie p38.....	64
Tableau 1-X Inactivation génique des composantes de la voie ERK5	68
Tableau 1-XI Motif d'activation des principales MAP kinases.....	82
Tableau 1-XII MAP kinase phosphatases à double spécificité	99
Tableau 1-XIII Types d'interaction des MAP kinases	101
Tableau 1-XIV Amarrage commun.....	107
Tableau 1-XV Amarrage commun versus amarrage FXFP.....	113
Tableau 1-XVI Amarrage commun des MAPKK.....	116
Tableau 1-XVII Régulateurs de la localisation subcellulaire de ERK1/2.....	120
Tableau 2-I Yeast strains used in this study.....	138
Tableau 2-II Influence of Thr42 of Ste50p on the mating response of yeast with $\Delta ste20$ or $STE11^{\Delta SAM}$	147
Tableau 2-III Conservation of serine 283 in ERK1/2 orthologs.....	184
Tableau 2-IV Summary of ERK1 S283A protein interactions in comparison to ERK1 wt	202
Tableau 3-I Alignement des MAP kinases humaines incluant les sérines 283 et 286 ..	221
Tableau 3-II La sérine 283 comme substrat potentiel de CK2	226
Tableau 3-III Kinases potentielles de la sérine 283 de ERK1	229

Liste des figures

Figure 1-1 Voies de signalisation de l'EGF.....	2
Figure 1-2 Structure du complexe du pore nucléaire (NPC).....	4
Figure 1-3 Transport nucléo-cytoplasmique actif	5
Figure 1-4 Passage à travers le NPC.....	10
Figure 1-5 Modèles de sélectivité du NPC.....	11
Figure 1-6 Translocation à travers une membrane	14
Figure 1-7 Phosphorylation des protéines.....	19
Figure 1-8 Acides aminés accepteurs de phosphate.....	20
Figure 1-9 Structure des protéine kinases	22
Figure 1-10 Parenté des groupes de kinases	24
Figure 1-11 Voies MAP kinase de mammifères.....	30
Figure 1-12 Voies MAP kinase de <i>S. cerevisiae</i>	32
Figure 1-13 Activation de la voie Fus3.....	33
Figure 1-14 Complexes d'activation de la voie Hog1.....	36
Figure 1-15 Principales voies MAP kinases de mammifères.....	40
Figure 1-16 MAPKKK, MAPKK et MAP kinases de la voie ERK1/2.....	42
Figure 1-17 Structure comparative des MAP kinases	46
Figure 1-18 Activation des MK par les voies ERK1/2 et p38	51
Figure 1-19 MAPKKK, MAPKK et MAP kinases de la voie JNK	56
Figure 1-20 MAPKKK, MAPKK et MAP kinases de la voie p38.....	62
Figure 1-21 MAPKKK, MAPKK et MAP kinase de la voie ERK5	67
Figure 1-22 Architecture des voies MAP kinases	74
Figure 1-23 Ultrasensibilité des MAP kinases	75
Figure 1-24 Compétition entre deux isoformes de MAP kinases	79
Figure 1-25 Structure et activation de ERK2	84
Figure 1-26 Substrats des MAP kinases ERK1 et ERK2	86
Figure 1-27 Localisation subcellulaire de ERK1/2	87

Figure 1-28 Vitesses d'import et d'export nucléaire	92
Figure 1-29 Intégration de multiples signaux par une seule MAP kinase	94
Figure 1-30 Protéines d'échafaudage	103
Figure 1-31 Sites d'amarrage des MAP kinases	110
Figure 1-32 Bidirectionnalité de la liaison d'amarrage commun.....	111
Figure 1-33 Motif FXFP dans la détection de la durée du signal de ERK1/2.....	114
Figure 1-34 Cinétiques d'activation de ERK1	125
Figure 1-35 Activation transitoire et soutenue de ERK1/2	127
Figure 1-36 Boucles de rétroaction impliquant ERK1 et ERK2.....	129
Figure 2-1 Ste50p is phosphorylated in vivo.....	144
Figure 2-2 Replacement of threonine 42 of Ste50p with alanine abolishes its ability to suppress the <i>Δste20</i> defect in mating.....	146
Figure 2-3 Replacement of threonine 42 of Ste50p with alanine abolishes its ability to suppress the <i>STE11Δ</i> SAM defect in mating.....	149
Figure 2-4 Phosphorylation of threonine 42 of Ste50p is required for the proper pheromone response.....	151
Figure 2-5 Protein kinases Yck1p, Gin4p, and Rim11p phosphorylate GST-Ste50p in vitro, and threonine 42 of Ste50p is phosphorylated in vitro by Yck1p.....	154
Figure 2-6 Ste50p is phosphorylated on threonine 42 in vivo	156
Figure 2-7 Replacement of T42 of Ste50p with aspartic acid does not bypass the requirement for Yck1p and/or Yck2p to suppress the mating defect of <i>STE11Δ</i> SAM	157
Figure 2-8 The T42A mutation retained the ability to interact with Ste11p but altered the subcellular fractionation profile of Ste50p.....	159
Figure 2-9 Phosphorylation de Ste50 <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i>	170
Figure 2-10 Comportement biochimique du mutant T42A.....	171
Figure 2-11 ERK1 phosphorylation on serine 283.....	182
Figure 2-12 Phosphorylation of serine 283 and ERK1 activation by MEK1/2.....	186

Figure 2-13 Serine 283 and ERK1 cytoplasmic activity	187
Figure 2-14 Serine 283 and ERK1 nuclear activity	189
Figure 2-15 ERK1 and MEK1 subcellular localization	192
Figure 2-16 ERK1 subcellular localization in infected MEFs	193
Figure 2-17 ERK1 targeting to the nucleus or the cytoplasm	195
Figure 2-18 Dominant negative effect of ERK1 S283A	199
Figure 2-19 Requirement of serine 283 for protein-protein interactions.....	200
Figure 2-20 ERK1 S283A in PC12 differentiation.....	204
Figure 2-21 Cytoplasmic targeting of ERK by Common Docking interactions	208
Figure 2-22 Dynamic model for ERK1/2 and MEK1/2 nucleocytoplasmic shuttling..	211
Figure 2-23 Phosphorylation de plusieurs sites sur HA-ERK1.....	214
Figure 2-24 Dimérisation de ERK1.....	215
Figure 2-25 La surexpression de PEA-15 inhibe l'activation de ERK1/2.....	216
Figure 3-1 Activité nucléaire relative des mutants de ERK1	235
Figure 3-2 Dimérisation de ERK2.....	238

Liste des abréviations

Abréviation	Signification	Traduction libre
AA	Acide arachidonique	
ADN	Acide désoxyribonucléique	
ADNc	ADN complémentaire	
ADP	Adénosine diphosphate	
AGC	Contenant les familles PKA, PKC et PKG	
AHQr	Riche en résidus alanine, histidine et glutamine	
AMPc	Adénosine monophosphate cyclique	
ARN	Acide ribonucléique	
ASK	<i>Apoptosis signal-regulating kinase</i>	Kinase régulant les signaux apoptotiques
ATF	<i>Activating transcription factor</i>	Facteur activant la transcription
ATP	Adénosine triphosphate	
BMK	<i>Big MAP kinase</i>	Grosse MAP kinase
Cak	<i>Cdk-activating kinase</i>	Kinase activant les CDK
CaMK	Protéine kinase dépendante du calcium et/ou de la calmoduline	
CD	<i>Common docking</i>	Amarrage commun
Cdc	<i>Cell division cycle</i>	Cycle de division cellulaire
CDK	<i>Cyclin-dependant kinase</i>	Kinase dépendante d'une cycline
CK	Caséine kinase	
CLK	<i>Cdc2-like kinase</i>	Kinase analogue à Cdc2
CMGC	Contenant les familles CDK, MAP kinase, GSK3 et CLK	
cPLA ₂	<i>Cytosolic phospholipase A₂</i>	Phospholipase A ₂ cytosolique
CRM	<i>Chromosome region maintenance</i>	Maintien de région chromosomique
Da	Dalton	
DAPK	<i>Death-associated protein kinase</i>	Protéine kinase associée à la mort
DED	<i>Death effector domain</i>	Domaine effecteur de mort
DEF	<i>Docking for ERK, FXP</i>	Amarrage de ERK, FXP
DEJL	<i>Docking of ERK and JNK, LXL</i>	Amarrage de ERK et JNK, LXL
dERK	<i>Drosophila ERK</i>	ERK de <i>Drosophila melanogaster</i>
Dig	<i>Down-regulator of invasive growth</i>	Réprimant la croissance filamenteuse
DIM	<i>Drosophila importin</i>	Importine de drosophile
DLK	<i>Dual leucine zipper-bearing kinase</i>	Kinase arborant un double zipper de leucine

DS-MKP	MKP à double spécificité	
DVD	<i>Domain for versatile docking</i>	Domaine pour un amarrage versatile
EC	<i>Embryonic carcinoma</i>	Carcinome embryonnaire
EGF	<i>Epidermal growth factor</i>	Facteur de croissance épidermique
EGFR	<i>EGF receptor</i>	Récepteur de l'EGF
EGR	<i>Early growth response</i>	Réponse de croissance précoce
ERF	<i>ETS2 repressor factor</i>	Facteur réprimant ETS2
ERK	Extracellular-signal regulated kinase	Kinase régulée par des signaux extracellulaires
ES	<i>Embryonic stem</i>	Souche embryonnaire
et/ou	L'un, l'autre, ou les deux à la fois	
FAK	<i>Focal adhesion kinase</i>	Kinase des points d'adhésion focaux
FG	Phénylalanine-glycine	
FGF	<i>Fibroblast growth factor</i>	Facteur de croissance des fibroblastes
FHL	<i>Four and a half LIM domain</i>	Quatre domaines LIM et demie
FRET	Fluorescence resonance energy transfer	Transfert d'énergie de résonance de fluorescence
Fus	<i>Fusion</i>	Impliqué dans la fusion de levures haploïdes
GAP	<i>GTPase-activating protein</i>	Protéine activant une GTPase
GDP	Guanosine diphosphate	
GEF	<i>Guanine nucleotide exchange factor</i>	Facteur d'échange des guanine nucléotides
GFP	<i>Green fluorescent protein</i>	Protéine fluorescente verte
GlcNAc	N-acétyl glucosamine	
GMPc	Guanosine monophosphate cyclique	
Gpr	<i>G protein-coupled receptor</i>	Récepteur couplé aux protéines G
GSK	Glycogène synthase kinase	
GST	Glutathione S-transférase	
GTP	Guanosine triphosphate	
IQGAP	<i>IQ domain-containing GAP</i>	GAP contenant un domaine IQ
<i>H. sapiens</i>	<i>Homo sapiens</i>	Homme
HePTP	<i>Hematopoietic PTP</i>	PTP hématopoïétique
Hog	<i>High osmolarity glycerol</i>	Glycérol contre l'osmolarité élevée
HPLC	<i>High pressure liquid chromatography</i>	Chromatographie liquide à haute pression
IKAP	<i>IκB kinase complex-associated protein</i>	Protéine associée au complexe de la kinase d'IκB
IRS	<i>Insulin receptor substrate</i>	Substrat du récepteur à l'insuline

JIP	<i>JNK-interacting protein</i>	Protéine interagissant avec les JNK
JLP	<i>JNK-associated leucine zipper protein</i>	Protéine à zipper de leucine associée à JNK
JNK	<i>Jun N-terminal kinase</i>	Kinase de la partie N-terminale de c-Jun
JNKK	JNK kinase	Kinase de JNK
KIM	<i>Kinase interaction motif</i>	Motif d'interaction avec les kinases
Ksr	<i>Kinase suppressor of Ras</i>	Kinase supprimant l'effet de Ras
Kss	<i>Kinase supressor of SST2</i>	Kinase supprimant l'effet de SST2
LMB	Leptomycine B	
MAP	<i>Microtubule-associated protein</i>	Protéine associée aux microtubules
MAP kinase	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>	Protéine kinase activée par des mitogènes
MAPKAP	<i>MAP kinase-activated protein</i>	Protéine kinase activée par les MAP kinases
MAPKK	MAP kinase kinase	
MAPKKK	MAP kinase kinase kinase	
MAPKKKK	MAP kinase kinase kinase kinase	
MBP	<i>Myelin basic protein</i>	Protéine basique de la myéline
MEF	<i>Mouse embryonic fibroblasts</i>	Fibroblastes embryonnaires de souris
MEF2	<i>Myocyte enhancer factor 2</i>	Facteur de renforcement des myocytes 2
MEK	<i>MAPK or ERK Kinase</i>	Kinase de MAPK ou de ERK
MEKK	MEK kinase	
MK	MAPKAP kinase	
MKK	MAP kinase kinase	
MKI	<i>MAP kinase insert</i>	Insertion des MAP kinases
MKP	MAP kinase phosphatase	
MLK	<i>Mixed-lineage kinase</i>	Kinase de lignée mélangée
MNK	<i>MAP kinase-interacting kinase</i>	Kinase interagissant avec les MAP kinases
MP	<i>MEK partner</i>	Partenaire de MEK
Mpk	MAP kinase	
Msg	<i>Multicopy suppressor of GPA1 deletion</i>	Dont la surexpression inhibe les effets de GPA1
MSK	<i>Mitogen- and stress-activated protein kinase</i>	Protéine kinase activée par les mitogènes et les stress
Naf	<i>Nef-associated factor</i>	Facteur associé à Nef
NES	<i>Nuclear export signal</i>	Signal d'export nucléaire
NFκB	<i>Nuclear factor κB</i>	Facteur nucléaire κB
NGF	<i>Nerve growth factor</i>	Facteur de croissance des nerfs

NFAT	<i>Nuclear factor of activated T-cells</i>	Facteur nucléaire des lymphocytes T activés
NLK	<i>Nemo-like kinase</i>	Kinase analogue à Nemo
NLS	<i>Nuclear localization signal</i>	Signal de localisation nucléaire
NPC	<i>Nuclear pore complex</i>	Complexe du pore nucléaire
NPR	<i>Natriuretic peptide receptor</i>	Récepteur des peptides natriurétiques
NT	N-terminal	
NTF	<i>Nuclear transport factor</i>	Facteur de transport nucléaire
Nup	Nucléoporine	
OSM	<i>Osmosensing scaffold for MEKK3</i>	Échafaudage de MEKK3 sensible à l'osmolarité
PAK	<i>p21-activated kinase</i>	Kinase activée par p21-Rac
PARP	PolyADP-ribose polymérase	
PC	Phéochromocytome	
PDGF	<i>Platelet-derived growth factor</i>	Facteur de croissance dérivé des plaquettes
PEA-15	<i>15 kDa phosphoprotein enriched in astrocytes</i>	Phosphoprotéine de 15 kDa abondante dans les astrocytes
PEST	Riche en résidus proline, glutamate, sérine et thréonine	
PKA	Protéine kinase dépendante de l'AMPc	
PKC	Protéine kinase C	
PKG	Protéine kinase dépendante du GMPc	
Pol II	ARN polymérase II	
PP	Protéine phosphatase	
PTP	Protéine tyrosine phosphatase	
RA	<i>Ras association</i>	Domaine d'association à Ras
Raf	<i>Rapidly growing fibrosarcoma</i>	Fibrosarcome à croissance rapide
RanBP	Ran binding protein	Protéine liant Ran
RanGAP	Ran GAP	GAP de Ran
Ras	<i>Rat sarcoma</i>	Sarcome de rat
Rcc	<i>Regulator of chromosome condensation</i>	Régulateur de la condensation chromosomique
RCPG	Récepteur couplé aux protéines G	
RE	Réticulum endoplasmique	
Réfs	Références	
RGC	<i>Receptor guanylyl cyclase</i>	Récepteur à activité guanylyl cyclase
RKIP	<i>Raf kinase inhibitor protein</i>	Protéine inhibant la kinase Raf
RSK	<i>Ribosomal S6 kinase</i>	Kinase de la sous-unité ribosomale S6

<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Levure à pain; levure à bourgeonnement
<i>S. pombe</i>	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	Levure à fission
SAM	<i>Sterile alpha motif</i>	Motif de stérilité alpha
Sap	<i>SRF accessory protein</i>	Protéine accessoire au SRF
SAPK	<i>Stress-activated protein kinase</i>	Protéine kinase activée par les stress
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i>	Dodécylsulfate de sodium
Sef	<i>Similar expression to FGF genes</i>	Expression similaire à celle des gènes de FGF
SEK	<i>SAPK or ERK kinase</i>	Kinase de SAPK ou de ERK
siRNA	<i>Short interfering RNA</i>	Court ARN simple brin d'inactivation
Smk	<i>Sporulation-specific MAP kinase</i>	MAP kinase spécifique à la sporulation
SRF	<i>Serum-response factor</i>	Facteur de réponse au sérum
SRP	<i>Signal recognition particule</i>	Particule de reconnaissance du signal
SST	<i>Supersensitive</i>	Hypersensibilité aux phéromones
Ste	Sterile	
STEP	<i>Striatum-enriched PTP</i>	PTP enrichie dans le corpus striatum
SV	<i>Simian virus</i>	Virus simien
SYK	<i>Spleen tyrosine kinase</i>	Tyrosine kinase de la rate
TAB	<i>TAK1-binding protein</i>	Protéine liant TAK1
TAD	<i>Transactivation domain</i>	Domaine de transactivation
TAK	<i>TGF-β-activated kinase</i>	Kinase activée par le TGF- β
TAO	<i>Thousand and one</i>	Kinase comportant mille et un acides aminés
TAP-Tag	<i>Tandem-affinity purification tag</i>	Purification par affinité à deux épitopes
TGF- β	<i>Transforming growth factor-β</i>	Facteur de croissance transformant- β
TIF	<i>Transcription initiation factor</i>	Facteur d'initiation de la transcription
TK	Tyrosine kinase	
TKL	<i>Tyrosine kinase-like</i>	Analogue aux tyrosines kinases
TNF	<i>Tumor necrosis factor</i>	Facteur de nécrose des tumeurs
UV	Ultraviolets	
wt	<i>Wild type</i>	Type sauvage

*Nos idées ne sont que des instruments
intellectuels qui nous servent à pénétrer
dans les phénomènes; il faut les changer
quand elles ont rempli leur rôle, comme
on change un bistouri émoussé quand il a
servi trop longtemps.*

Claude Bernard, *Introduction à l'étude de la
médecine expérimentale*, 1865

Remerciements

Le processus est long, très long. Il a débuté bien avant l'inscription et semble vouloir s'éterniser. Comme le disait Woody Allen : « L'éternité c'est long, surtout vers la fin ». Je voudrais rendre ici un modeste hommage à ceux et celles qui m'ont accompagné au cours de ce périple, et dont fort heureusement plusieurs m'accompagnent encore aujourd'hui.

À tous mes mentors, à tous ceux qui ont cru en moi, et qui m'ont contaminé avec leur foi. Merci Sylvain, Emmanuel, Gaétan, Marcel, Roger, Richard, Guy, Marc, Carl, Sylvain, Paul, Michel, Cunle, Malcolm, France, Mona, Stéphane, Frédéric, Philippe, Geneviève et Pierre-Luc de m'avoir donné une chance, un projet, une philosophie, un conseil, une étincelle. J'espère avoir été à la hauteur, et je souhaite pouvoir un jour vous rendre ce que vous m'avez apporté.

Merci encore à Sylvain qui a su fournir un projet stimulant d'une grande envergure pour lequel mon enthousiasme, s'il a parfois été entamé, ne s'est jamais démenti. Il m'a fourni une opportunité exceptionnelle d'explorer tant de techniques et d'aspects de la science. Il m'a aussi donné la liberté de me tromper, mais également celle de contribuer au bien commun de multiples manières. Il a en outre fourni un cadre scientifique et humain d'une valeur inestimable. Ton équilibre continuera longtemps de me fasciner.

Merci aussi à aux gens qui ont partagé le quotidien de ces découvertes avec moi Philippe, Stéphane, Geneviève, Pierre-Luc, Catherine, Édith, Josée, Justine, Benjamin, Paul et Sylvia, pour ne nommer que ceux-la. Bien souvent, j'ai eu envie de devenir fumeur moi aussi. Merci d'avoir su rire et écouter, merci de m'avoir épaulé et encouragé, merci de m'avoir procuré des solutions (et des constructions) et de m'avoir demandé conseil. Merci de m'avoir offert de si bonnes raisons de me rendre au labo chaque matin.

Bien d'autres personnes ont gracieusement contribué de manière indirecte à la complétion du projet. Cela s'est parfois fait à leur insu, mais jamais au mien. La vie est courte et le temps précieux. Merci d'avoir donné le vôtre.

Je ne saurais passer sous silences mes collègues, mais surtout amis musiciens. (n=1) a été bien plus qu'une soupape, la formation aura été une façon de grandir et de faire ressortir une part de nous-même que nous ne croyions pas posséder. Philippe, Alexandre et Alexis, nous avons vécu une aventure extraordinaire et j'ai été privilégié de le faire avec vous. La musique a quelque chose d'aussi intemporel que notre amitié.

Si je suis en mesure aujourd'hui d'écrire ces lignes, c'est indubitablement grâce à Karine. Lumineuse, elle a toujours été un phare dans mon brouillard. Elle m'a invariablement permis de livrer ce que j'ai de meilleur, même quand je croyais être dans le pire. Ma gratitude va notamment à son épaule qui a su m'accueillir tant de fois, et à son pied avec lequel elle a su botter mon derrière aux moments appropriés. Au cœur de tempêtes imprévisibles, j'ai toujours pu m'accrocher à elle et j'espère qu'elle a pu et pourra toujours s'accrocher à moi. Il y a eu aussi les filles. Je crois avec elles et elles me ramènent à l'essentiel. De plus, elles me confirment chaque jour que la plus belle découverte de ma vie ne s'est pas faite dans le laboratoire, mais quelques étages plus haut.

Avec un dévouement et une versatilité rarissimes, tu t'es impliquée dans le projet, allant jusqu'à t'oublier. Je n'oublierai pas. La gorge nouée, je te remercie de m'avoir donné le temps, de m'avoir si généreusement donné ton temps, d'avoir pris la relève plus souvent qu'à ton tour. Merci d'avoir traversé cette éternité avec moi. Je ne le referais avec personne d'autre.

1 Introduction

Qu'elles fassent partie d'un organisme complexe ou qu'elles fonctionnent de manière isolée, les cellules sont constamment soumises à de grandes quantités et variétés de signaux. Provenant de l'extérieur ou de l'intérieur des cellules, ces multiples informations doivent être captées, intégrées et relayées efficacement afin de générer la réponse cellulaire adéquate. Les mécanismes de signalisation cellulaire, par leurs fonctions de relais et d'intégrateurs, permettent aux cellules d'évoluer dans un environnement en mouvement, afin qu'elles croissent, se différencient, se protègent contre des stress, répondent à des stimuli, migrent, se divisent, ...

Parmi les mécanismes de signalisation impliqués dans ces processus, les voies MAP kinases jouent un rôle de premier plan et constituent souvent des points de convergence pour plusieurs signaux critiques. Le décryptage de leurs modes de régulation permet de mieux comprendre les processus biologiques dans lesquels elles sont intégrées, ainsi que leur implication lorsque le dérèglement de ces processus mène à la maladie.

1.1 Signalisation intracellulaire

Afin de relayer l'information et de l'intégrer dans une panoplie de réponses aussi spécifiques que coordonnées, les cellules utilisent des messagers intracellulaires. Allant de la molécule simple, par exemple l'oxyde nitrique (NO), aux échafaudages complexes de multiples protéines, ces messagers agissent de manière séquentielle pour transmettre cette information. Que la réponse à un stimulus soit locale ou qu'elle s'applique à l'ensemble de la cellule, ces relais doivent être strictement coordonnés de manière spatio-temporelle. Par exemple, la réponse à un stimulus extracellulaire peut se faire ailleurs dans la cellule et requérir un remodelage du cytosquelette, l'induction de gènes dans le noyau, l'activation de la synthèse protéique sur les ribosomes et le ciblage des protéines néo-synthétisées vers leur site de prédilection.

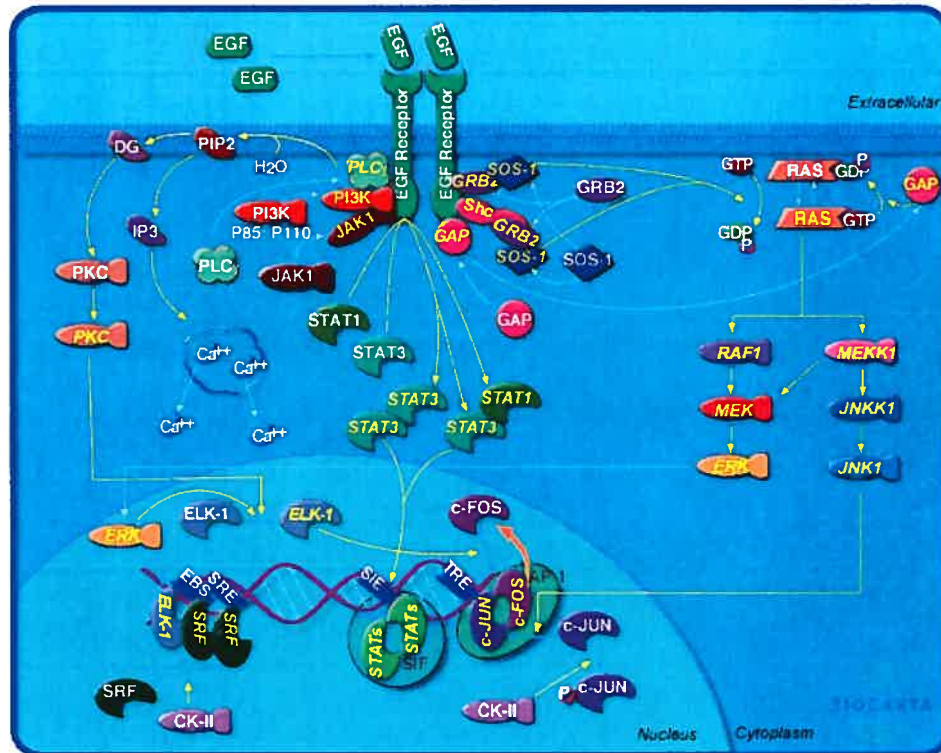


Figure 1-1 Voies de signalisation de l'EGF

Le facteur de croissance de l'épiderme (EGF) et son récepteur (EGFR) activent une multitude de voies de signalisation depuis la membrane plasmique jusqu'au noyau. La couleur jaune indique une activation ou une forme activée.

Tiré de http://biocarta.com/pathfiles/h_egfPathway.asp

De manière générale, on décrit les voies de signalisation comme étant des cascades enzymatiques activées séquentiellement depuis la membrane, suite à la liaison d'un récepteur avec son ligand. Par des interactions protéiques ou par des modifications post-traductionnelles, le signal est amplifié et retransmis d'une protéine à une autre jusque dans le noyau où s'effectue l'induction de gènes spécifiques à la réponse. Cette représentation linéaire s'avère fort réductrice et un peu simpliste; néanmoins, elle sert convenablement les

descriptions qui seront faites dans les prochaines pages, bien que la réalité demeure nettement plus complexe.

1.1.1 Localisation subcellulaire

Pour relayer adéquatement l'information, les messagers, de nature protéique ou autre, doivent se trouver au bon endroit dans la cellule, au bon moment. Le ciblage vers la localisation subcellulaire appropriée revêt donc une grande importance. En outre, puisqu'il s'agit d'un processus dynamique, il est possible, qu'à un moment ou un autre, ces messagers doivent changer leur lieu d'action dans la cellule. Les prochains paragraphes traiteront de mécanismes de ciblage subcellulaire des protéines en mettant une emphase particulière sur le transport nucléo-cytoplasmique.

1.1.1.1 Noyau

Le noyau constitue le gardien du génome. Pour y avoir accès et moduler l'expression génique, les molécules de signalisation doivent franchir la double membrane nucléaire par le complexe du pore nucléaire (NPC) qui représente la seule porte d'accès. Au nombre de 1000 à 10000 par cellule (Burke, 2006), le NPC possède une structure analogue à celle d'un panier contenant huit axes de symétrie (Figure 1-2A) et peut être traversé jusqu'à mille fois en une seconde (Fried & Kutay, 2003) sans même que les grosses molécules qui le traversent ne soient dépliées (Weis, 2003). Le NPC est un assemblage macromoléculaire de trente protéines possédant une masse moléculaire d'environ 60 MegaDaltons (MDa); (Cronshaw et al, 2002; Fahrenkrog et al, 2004). Ses unités d'assemblage, les nucléoporines (Nup), sont des protéines conservées de la levure jusqu'aux mammifères (Feldherr et al, 2002; Xu & Massague, 2004). Plusieurs d'entre elles contiennent de nombreux tandems phenylalanine-glycine (FG; retrouvés dans les motifs GLFG et FXFG), formant une poche hydrophobe sur toute la longueur du NPC, et plus particulièrement dense à ses extrémités nucléaires et cytoplasmiques (Figure 1-2B).

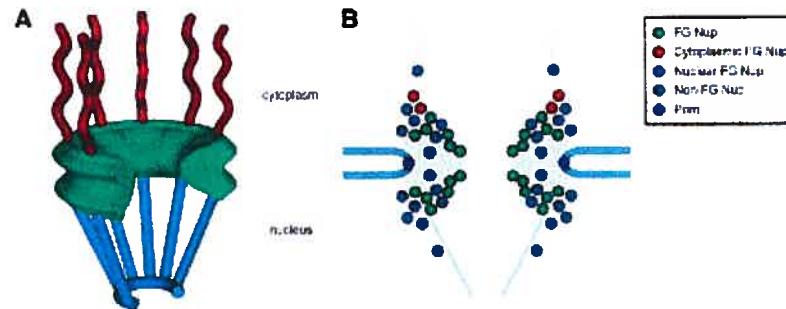


Figure 1-2 **Structure du complexe du pore nucléaire (NPC)**

A) Structure générale du pore nucléaire. B) Emplacement et densité des motifs FG à l'intérieur du pore.

Tiré de (Weis, 2003)

1.1.1.1.1 *Transport passif*

Le NPC permet l'entrée de molécules au noyau, mais aussi leur sortie (Fahrenkrog et al, 2004), et peut être franchi de trois manières. Premièrement, par diffusion passive à travers le pore selon un mouvement brownien déterminé par les concentrations de part et d'autre du pore. C'est ainsi que les ions et des petites molécules faisant moins de 60 kDa, ou 9 nm de diamètre peuvent traverser le pore de manière libre et non-sélective (Fahrenkrog et al, 2004; Weis, 2003). Deuxièmement, par diffusion facilitée à travers le pore. Ce mécanisme se fait toujours suivant le gradient, mais de manière plus sélective puisque la molécule doit interagir avec le NPC de manière directe, ou comme le cargo d'une autre protéine qui la remorque à travers le pore. Nous savons que les motifs FG des nucléoporines contribuent à des interactions essentielles à ce processus qui demeure mal défini (Fahrenkrog et al, 2004; Xu & Massague, 2004).

1.1.1.1.2 Transport actif

La troisième manière dont peut être franchi le NPC est par transport actif. Très sélectif, ce processus demande un apport en énergie qui est fourni par l'hydrolyse de guanosine triphosphate (GTP), car il se fait à l'encontre du gradient de concentration de la molécule transportée.

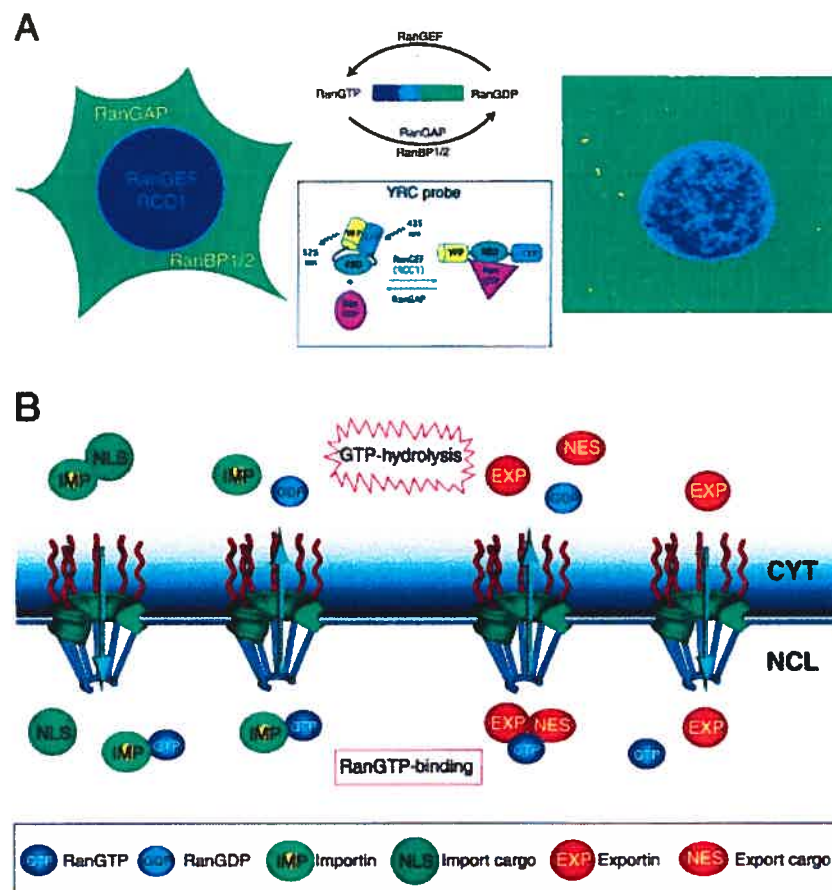


Figure 1-3 Transport nucléo-cytoplasmique actif

A) Représentation (gauche) et observation par *fluorescence resonance energy transfer* (FRET; droite) du gradient cellulaire de Ran-GTP (centre) de part et d'autre du noyau. B)

Mécanismes d'import (gauche) et d'export (droite) nucléaires tel que respectivement décrit dans les sections 1.1.1.1.2.1 et 1.1.1.1.2.2.

Tiré de (Weis, 2003)

Les karyophérines constituent la plus importante classe de transporteurs nucléaires (Fried & Kutay, 2003). Comptant plus d'une vingtaine de membres chez les métazoaires, on y retrouve des intermédiaires de l'import et de l'export nucléaire comme les importines β et les exportines, respectivement. Elles ont comme cargo des protéines, de l'acide ribonucléique (ARN) et des ribonucléoprotéines (Fahrenkrog et al, 2004; Fried & Kutay, 2003; Weis, 2003; Xu & Massague, 2004). Le temps de reconnaissance entre les karyophérines et leurs cargos respectifs (10 secondes), plutôt que le passage dans le NPC (0,002 secondes), constitue l'étape limitante du transport nucléo cytoplasmique (Riddick & Macara, 2005; Smith et al, 2002; Timney et al, 2006).

1.1.1.1.2.1 Import nucléaire

Plusieurs protéines possèdent dans leur séquence primaire un signal de localisation subcellulaire (Wickner & Schekman, 2005). Le signal de localisation nucléaire (NLS) le mieux caractérisé se retrouve dans la séquence de l'antigène T du virus simien 40 (SV40) (Kalderon et al, 1984a; Kalderon et al, 1984b; Richardson et al, 1986). Cette séquence, à l'instar des autres NLS « classiques », contient un noyau riche en résidus lysine et arginine (Tableau 1-I); (Christophe et al, 2000; Lange et al, 2007). Différentes importines α reconnaissent et lient différents NLS. Via un domaine autre, l'importine α s'associe avec l'importine β . Cette dernière est responsable du processus de translocation en interagissant avec les motifs FG des nucléoporines (Bayliss et al, 2000; Bednenko et al, 2003). De plus, parmi la vingtaine d'importines β connues, certaines reconnaissent directement des NLS, indépendamment des importines α (Christophe et al, 2000; Fried & Kutay, 2003). En outre, les importines possèdent des fonctions spécifiques de chaperonnes cytoplasmiques pour les

domaines basiques que constituent les NLS (Jakel et al, 2002), ce qui pourrait expliquer en partie leur apparente redondance (Fried & Kutay, 2003).

Tableau 1-I Signaux d'import et d'export nucléaire

Signal	Consensus	Exemple	Séquence	Transporteur
NLS monopartie	(K/R) ₄₋₅	SV40 Antigène T	PKKKRKVE	Importines α et β
NLS bipartie	(K/R) ₂ X ₁₀₋₁₂ (K/R) ₃	Nucléoplasmine	KRPAATKKAGQAKKKK	Importines α et β
NES	LX ₂₋₃ (L/I/V/M/F)X ₂₋₃ LX(L/I/V)	MEK1	LQKKLELEL	Exportine CRM1

Après son passage dans le NPC, l'importine β interagit avec le complexe Ran-GTP (Figure 1-3B, page 5). Très concentrée dans le noyau (Figure 1-3A), la GTPase Ran lorsqu'en complexe avec le GTP, induit des changements conformationnels qui permettent la dissociation entre l'importine β et son cargo (Fried & Kutay, 2003; Weis, 2002). La dissociation du complexe cargo(NLS)-importine α -importine β est aussi facilitée par certaines Nup de la face nucléaire du NPC (Booth et al, 1999; Gilchrist et al, 2002; Solsbacher et al, 2000). L'importine β possède une très haute affinité pour Ran-GTP, et le complexe importine β -Ran-GTP retourne vers le cytoplasme, poussé par le gradient de GTP. Alors que le passage de l'importine β de part et d'autre du NPC s'est fait sans énergie, c'est le retour à l'état initial, qui en demande afin de maintenir le gradient de GTP. En effet, arrivé dans le cytoplasme, le complexe importine β -Ran-GTP entre en contact avec plusieurs protéines comme RanGAP, RanBP1 et RanBP2 qui augmentent l'activité GTPase (GAP) de Ran, jusqu'alors très faible. Le GTP de Ran est hydrolysé en guanosine diphosphate (GDP), ce qui induit la dissociation de l'importine β dont l'affinité pour Ran-GDP est basse. Ran-GDP retourne au noyau via le transporteur *Nuclear transport factor 2* (NTF2) qui franchit le NPC (Figure 1-4, page 10) à la manière d'une importine (Stewart, 2000). Le cycle se complète au noyau lorsque le facteur d'échange de guanine nucléotides (GEF), *Regulator of the onset of chromosome condensation 1* (Rcc1) recharge Ran en GTP tout en le libérant de son GDP (Fahrenkrog et al, 2004; Fried & Kutay, 2003;

Lange et al, 2007; Weis, 2003; Xu & Massague, 2004). Rcc1 joue un rôle clé en permettant le maintien d'une concentration nucléaire en Ran-GTP 200 fois supérieure à celle du cytoplasme, et c'est cette différence de part et d'autre de la membrane nucléaire qui agit comme moteur du transport nucléo-cytoplasmique (Weis, 2003). En somme, de manière grossière, l'importine β troque dans le noyau son cargo possédant un NLS pour RanGTP, ce qui lui fera regagner le cytoplasme. Un apport constant en énergie sous forme de GTP permet de retourner à l'état initial après que l'activité GTPase de Ran ait augmenté dans le cytoplasme, et conséquemment, de recommencer un autre cycle.

1.1.1.1.2.2 Export nucléaire

L'export d'une molécule du noyau vers le cytoplasme se fait de manière analogue (Figure 1-3, page 5). De tous les facteurs d'export nucléaire, *Chromosome region maintenance 1* (CRM1) demeure parmi les plus versatiles et les plus utilisés (Fried & Kutay, 2003). Cette protéine lie les séquences riches en leucine (Tableau 1-I, page 7) des signaux d'export nucléaire (NES) (Fukuda et al, 1997a). Toutefois, cette liaison ne peut avoir lieu qu'en présence de Ran-GTP, elle est donc restreinte au noyau (Weis, 2003). Le gradient de Ran-GTP favorise la progression du complexe cargo(NES)-CRM1-Ran-GTP. La dissociation de ce complexe résulte à nouveau de l'action des GAP sur Ran. Le cargo est alors libéré dans le cytoplasme, et Ran-GDP ainsi que CRM1 retournent au noyau afin de compléter ce cycle de transport nucléo-cytoplasmique et de préparer le prochain (Fried & Kutay, 2003; Weis, 2002). La faible affinité entre le NES et CRM1 favorise également leur dissociation cytoplasmique puisque des mutants possédant un NLS de trop haute affinité pour CRM1 s'accumulent dans le NPC (Kutay & Guttinger, 2005). La leptomycine B (LMB) est un agent pharmacologique et un outil puissant pour l'étude des protéines exportées par CRM1. Elle lie de manière covalente la cystéine 528 de CRM1, inhibant toute interaction entre cette dernière et des protéines contenant un NES (Kau & Silver, 2003). La LMB affecte le transport de plusieurs molécules de signalisation cellulaire dont

IκB, c-Abl ainsi que MEK1 et MEK2 (Adachi et al, 2000; Taagepera et al, 1998; Tam et al, 2000).

1.1.1.1.3 Transport et sélectivité dans le NPC

En plus d'être structurellement très souples (Lim et al, 2006; Paulillo et al, 2005), plusieurs Nup sont également mobiles (Fahrenkrog et al, 2004). On les retrouve parfois même à l'extérieur du NPC (Griffis et al, 2003). La mobilité et la souplesse des Nup contenant des motifs FG en combinaison avec le système Ran-GTP convient parfaitement à l'association et à la dissociation rapides d'un cargo et de son transporteur, et par conséquent, à un transport bidirectionnel efficace à travers le NPC (Fahrenkrog et al, 2004). De plus, un cargo lié en complexe d'import ou d'export perd une partie de ses propriétés fonctionnelles et ne contribue plus au gradient de cargo libre à l'encontre duquel il voyage, ce qui en facilite le transport (Fried & Kutay, 2003). Dans ce système, le GTP constitue la seule source d'énergie (Weis et al, 1996), et l'écart significatif entre les concentrations de Ran-GTP de chaque côté de l'enveloppe nucléaire représente la principale source de la direction du transport nucléo-cytoplasmique (Kose et al, 1997). En effet, cette direction du transport se voit inversée lorsque la concentration de Ran-GTP est très élevée dans le cytoplasme (Nachury & Weis, 1999). Ainsi, le déplacement des transporteurs à l'intérieur du NPC peut être décrit comme un processus de diffusion facilitée pendant lequel le transporteur, généralement sous forme dimérique, saute symétriquement d'une Nup à l'autre (Figure 1-4) par une série d'interactions de faible affinité avec les motifs FG distribués le long du NPC (Fried & Kutay, 2003; Peters, 2005; Strawn et al, 2004; Weis, 2003; Zeitler & Weis, 2004).

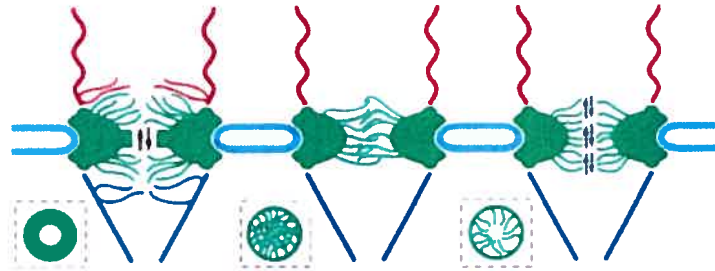


Figure 1-5 **Modèles de sélectivité du NPC**

Schémas comparatifs des modèles mécanistiques de sélectivité du NPC, avec vue à vol d'oiseau (encadré). De gauche à droite : modèle de la porte d'affinité, modèle de la phase sélective, et modèle des « spaghetti huileux »..

Tiré de (Weis, 2003)

1.1.1.1.3.1 Porte d'affinité Brownienne

Dans ce modèle, les transporteurs interagissent préférentiellement avec les motifs FG des Nup situées aux abords du NPC, sur la face cytoplasmique ou nucléaire. Ces nucléoporines permettent alors aux transporteurs ainsi « attirés » de diffuser par mouvement brownien dans le NPC et de franchir un point d'étranglement fixe dont l'ouverture est de 9 nm (Rout et al, 2000). Ainsi, les Nup aux faces externes du NPC attireraient les protéines interagissant avec les motifs FG tout en laissant diffuser librement les petites molécules et en repoussant les grosses. Toutefois, on reproche à ce modèle de ne pas permettre d'expliquer la translocation de gros cargos à travers une embouchure étroite (Fried & Kutay, 2003).

1.1.1.1.3.2 Phase sélective

Par ailleurs, il a été proposé que les Nup entrelacées par des interactions faibles entre leurs motifs FG établiraient un réseau de mailles à l'intérieur du NPC. Ces mailles hydrophobes formant une phase hydrophobe agiraient comme passoire laissant diffuser les

petites molécules et rejetant les grosses molécules hydrophiles. En interagissant plus fortement mais de manière transitoire avec les motifs FG, les transporteurs pourraient défaire les mailles et ainsi traverser le NPC, les mailles se refermant derrière eux (Ribbeck & Gorlich, 2001). Ce modèle qui explique plus facilement le transit de cargos pouvant faire plus de 35 nm que la diffusion de petites molécules, n'a jamais été directement observé (Fried & Kutay, 2003). Or, des travaux récents démontrent que les motifs FG des Nup peuvent former des interactions stables *in vivo*, constituant un réseau hydrophobe à la fois stable et flexible, comparable à un gel constitué d'agarose à 0,4% (Frey et al, 2006). De plus, en accord avec le modèle proposé, les molécules en transit résident plus longtemps dans le NPC que si elles diffusaient librement, suggérant ainsi que le transport de cargos peut effectivement défaire certaines interactions, c'est-à-dire dissoudre partiellement le gel.

1.1.1.1.3.3 « Spaghetti huileux »

Un modèle hybride suggère que les Nup n'interagiraient pas entre elles, mais formeraient néanmoins un ensemble souple et désordonné avec une ouverture centrale de 10 nm (Macara, 2001). Le NPC serait franchi par des associations transitoires avec plusieurs motifs FG, les Nup étant suffisamment flexibles pour être déplacées et permettre le passage d'un gros cargo.

Ces modèles assument tous trois qu'aucune molécule est exclue du NPC de manière active, que sa sélectivité repose exclusivement sur les interactions avec les motifs FG, et que la translocation en elle-même se fait par mouvement aléatoire et/ou diffusion facilitée (Fried & Kutay, 2003; Weis, 2003). Ils cautionnent également les observations selon lesquelles la direction du transport nucléo-cytoplasmique provient uniquement du gradient de Ran-GTP qui fournit une force motrice et permet une association/dissociation rapide entre les transporteurs et leur cargo.

1.1.1.2 Membranes et organelles

Outre le noyau et le cytoplasme, plusieurs autres structures subcellulaires ont des compositions protéiques uniques. Il s'agit majoritairement d'organelles délimitées par une ou plusieurs membranes. Alors que la synthèse protéique n'a lieu que dans le cytoplasme et les mitochondries, les protéines nouvellement synthétisées doivent être correctement ciblées, et franchir en totalité ou en partie les membranes qui les séparent de leurs lieux d'activité (Wickner & Schekman, 2005).

1.1.1.2.1 Séquences signal

Des séquences signal analogues aux NLS et NES permettent l'aiguillage des protéines qui les contiennent. En favorisant des interactions avec des protéines et/ou des lipides, ces séquences permettent le ciblage vers et dans certaines membranes particulières. Parmi les cibles, on compte la membrane plasmique, le réticulum endoplasmique (RE), l'appareil de Golgi, les endosomes, les peroxysomes et les mitochondries (van Vliet et al, 2003; Wickner & Schekman, 2005). Chaque organelle possède ses signaux dont la séquence primaire n'est pas conservée, bien que la polarité et les motifs tridimensionnels permettant le ciblage, eux le soient (Wickner & Schekman, 2005).

À l'exception des mitochondries (dont 99% des protéines sont importées) et des peroxysomes qui incorporent leurs protéines de manière post-traductionnelle, la translocation dans les membranes afin de les franchir ou d'y être incorporées, est un processus co-traductionnel (Wickner & Schekman, 2005). Toutefois, des récepteurs servant à la reconnaissance des séquences signal ainsi que des chaperonnes contribuant au bon dépliement des protéines ciblées, sont au cœur de ces deux processus (Figure 1-6). De plus, la translocation requiert un apport en énergie qui est généralement d'origine nucléotidique (ATP, GTP), mais qui, dans le cas des mitochondries, est assuré par leur gradient intermembranaire de protons (Wickner & Schekman, 2005).

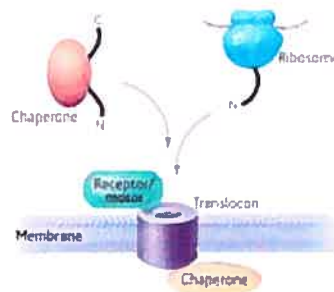


Figure 1-6 Translocation à travers une membrane

Modèle général d'incorporation co-translationnelle d'une protéine dans une membrane. Une protéine en néosynthèse est reconnue à la fois par une chaperonne et son récepteur qui agit comme moteur pour faire passer la protéine dépliée dans le Translocon. Après quoi, celle-ci est repliée par une autre chaperonne et peut se voir déchargée dans la membrane ou dans la lumière de l'organelle.

Tiré de (Wickner & Schekman, 2005)

Le passage à travers le RE constitue sans doute le modèle le mieux caractérisé de translocation à travers une membrane. De plus, le RE constitue le point de départ des protéines ciblées aux membranes plasmiques, à l'appareil de Golgi, aux endosomes et aux granules sécrétoires (van Vliet et al, 2003). En bref, la séquence signal d'une protéine en cours de traduction est reconnue par le *Signal recognition particule* (SRP). Cet important complexe riboprotéique lié à la membrane du RE agit comme coordonnateur de la translocation de concert avec les chaperonnes et le ribosome afin de déplier la protéine naissante et d'en ralentir la traduction (Cheng & Gilmore, 2006). Lorsque le SRP et son récepteur à la membrane du RE lient tous deux le GTP, la protéine complexée au ribosome est transférée dans le Translocon pour franchir la membrane (Schnell & Hebert, 2003) alors que sa traduction reprend. Si environ une vingtaine d'acides aminés hydrophobes entrent consécutivement dans le Translocon, la protéine est relâchée latéralement dans la

membrane et s'y trouve enchâssée, sinon, elle continue dans la lumière du RE et pourra être sécrétée ou ciblée en tant que protéine soluble. Les chaperonnes de la lumière contribuent au repliement des protéines franchissant le pore de translocation ainsi qu'à leur maturation et à leur ciblage (Meyer & Dobberstein, 1980; Rothman & Lodish, 1977; Walter & Blobel, 1980).

1.1.1.2.2 Domaines de ciblage

Les protéines néo-synthétisées peuvent également se retrouver à la face cytoplasmique des membranes. On parle alors de protéines périphériques. Différents domaines d'interaction avec les phospholipides qui composent les membranes permettent aux protéines qui les renferment d'atteindre le pourtour d'organelles ou la membrane plasmique. Ces domaines se retrouvent (parfois en plusieurs exemplaires) sur de nombreuses protéines impliquées dans les mécanismes de signalisation cellulaire, ainsi que dans le transit des vésicules et organelles (Balla, 2005; Cho & Stahelin, 2005). Une seule copie est généralement suffisante pour le ciblage de la molécule hôte, mais ces domaines de ciblage sont plus efficaces en combinaison avec d'autres domaines et coopèrent dans plusieurs interactions avec des protéines pour former des complexes (de signalisation) à une membrane déterminée.

La composition des membranes varie selon les régions subcellulaires. Conséquemment, c'est la sélectivité des différents domaines envers certains phospholipides qui est à la base de la spécificité de ciblage. Les principaux domaines de liaison aux phospholipides sont donnés dans le tableau ci-dessous. En outre, certains de ces domaines ne lient pas les phospholipides de manière préférentielle, mais possèdent néanmoins des motifs structurels similaires (Balla, 2005; Cho & Stahelin, 2005). Pour la plupart, ces domaines sont davantage conservés dans leurs structures que dans leurs séquences, de sorte que les quelques séquences consensus bien définies sont généralement très courtes (Balla, 2005).

Tableau 1-II Domaines de ciblage à la membrane

Principaux domaines liant des phospholipides (et domaines structurellement apparentés) qui permettent une localisation membranaire des protéines.

Domaine	Signification	Spécificités de liaison	Exemples
C1	<i>PKC conserved 1</i>	Diacyl glycerol	Isoformes de PKC
C2	<i>PKC conserved 2</i>	Calcium	PKC, cPLA ₂
PH	<i>Pleckstrin homology</i>	Phosphoinositides	Akt, Btk, PLCδ
FYVE	Fab1, YOTB, Vac1 et EEA1	Phosphoinositides	PKCδ, EEA1
PX	Phox	Phosphoinositides	p47 ^{PHOX} , PI 3-kinases
ENTH	<i>Epsin N-terminal homology</i>	Phosphoinositides	Epsine, HIP-1
ANTH	<i>AP180 N-terminal homology</i>	Phosphoinositides	Adaptateur de clathrines AP-2
FERM	<i>From band 4.1, ezrin, radixin, moesin</i>	Phosphoinositides et protéines	JAK3, Ezrine
PTB	<i>Phosphotyrosine binding</i>	Phosphotyrosine	IRS-1, Shc
PDZ	<i>Postsynaptic density protein, disk large, zonula occludens</i>	Petits peptides en C-terminal de protéines transmembranaires	PSD95 récepteurs du glutamate

1.1.1.2.3 Modifications post-traductionnelles

Certaines protéines périphériques ne possèdent pas de domaine de liaison aux phospholipides et sont ciblées à la membrane plasmique ou vers des organelles comme les endosomes et l'appareil de Golgi par la liaison covalente avec des molécules lipidiques (Greaves & Chamberlain, 2007). La thio-acylation est un phénomène réversible au cours duquel une cystéine est modifiée par l'ajout d'un acide gras (palmitate), d'un groupement myristyl, farnesyl ou geranylgeranyl (Magee & Seabra, 2005). D'autres modifications lipidiques peuvent moduler l'activité et/ou la localisation subcellulaire. Parmi celles-ci on retrouve l'acylation sur une glycine N-terminale, ou sur des résidus lysine, et la carboxyméthylation d'une cystéine préalablement acylée (Magee & Seabra, 2005; Smotrys & Linder, 2004). Par ailleurs, plusieurs protéines impliquées dans le transport vésiculaire ou dans les mécanismes de signalisation sont thio-acétylées. La mieux caractérisée d'entre elles est sans doute la GTPase monomérique Ras (*Rat sarcoma*); (Goodwin et al, 2005; Philips, 2005; Rocks et al, 2005). Habituellement précédée par d'autres résidus semblables, la cystéine modifiée fait souvent partie d'un motif CAAX en plus d'avoir plusieurs acides

aminés basiques dans son environnement afin de former une surface chargée positivement et ainsi favoriser les interactions avec les phospholipides membranaires. Le lieu de ciblage d'une protéine thio-acylée dépend de la nature et du nombre de modifications, influençant ainsi l'affinité pour les compositions lipidiques des différents compartiments subcellulaires (Greaves & Chamberlain, 2007; Magee & Seabra, 2005; Smotrys & Linder, 2004). Par exemple, la greffe en C-terminal d'une séquence CAAX, mais pas SAAX, sur les protéines *Extracellular signal-regulated kinase 1* (ERK1) et ERK2, entraîne leur relocalisation à la membrane plasmique (Hochholdinger et al, 1999).

Des modifications post-traductionnelles de nature non lipidique peuvent également affecter la localisation subcellulaire des protéines. Notamment, l'ajout d'un groupement N-acétyl glucosamine (GlcNAc) sur des résidus sérine et thréonine joue un rôle dans le ciblage nucléaire de certaines protéines (Guinez et al, 2005; Monsigny et al, 2004). En outre, l'ajout de GlcNAc sur plusieurs Nup est essentiel au transport nucléaire (Duverger et al, 1993; Duverger et al, 1995; Duverger et al, 1996). Toutefois, les mécanismes liant le GlcNAc au ciblage et transport nucléaire demeurent méconnus (Guinez et al, 2005; Monsigny et al, 2004).

Un signal de ciblage subcellulaire peut de surcroît être généré lors de la modification d'une protéine par phosphorylation (Section 1.1.2.1, page 18). En effet, la phosphorylation de plusieurs facteurs de transcription sur des résidus précis va de pair avec leur localisation cytoplasmique (Brunet et al, 1999a; Kaffman & O'Shea, 1999). Dans certains cas, la phosphorylation agit en perturbant ou masquant le NLS qui n'est alors plus reconnu par le transporteur (Kaffman & O'Shea, 1999). Ou encore, elle agit directement comme signal d'export nucléaire (Benzeno et al, 2006; Diehl et al, 1997). À l'opposé, la phosphorylation peut induire la localisation nucléaire de nombreuses protéines (Kaffman & O'Shea, 1999), dont plusieurs sont des acteurs clés dans des processus de signalisation cellulaire (Section 1.5.2.3.2, page 87). Un mécanisme fréquemment utilisé est la liaison par les protéines de la famille 14-3-3 de protéines phosphorylées sur des sites spécifiques, ce qui entraîne la rétention cytoplasmique (Yaffe & Elia, 2001). Enfin, les molécules du transport

nucléo-cytoplasmique sont aussi sujettes à une régulation négative par phosphorylation (Kehlenbach & Gerace, 2000).

1.1.2 Protéines kinases

Une fois sa localisation subcellulaire atteinte, une protéine impliquée dans les mécanismes de signalisation cellulaire doit alors effectuer correctement sa fonction. Un des mécanismes les mieux décrits permettant une réponse intracellulaire à des stimuli extracellulaires est la modification d'une protéine par phosphorylation (Cohen, 1982). Les protéines kinases sont les enzymes dont la fonction est le transfert d'une molécule de phosphate sur un substrat donné. En tant que régulateurs de la phosphorylation, une pléiade de kinases sont elles-mêmes sujettes à cette modification post-traductionnelle, qui se fait généralement de manière plus abondante dans leur extrémité C-terminale (Villen et al, 2007).

1.1.2.1 Phosphorylation

L'activation de la phosphorylase par le transfert enzymatique du phosphate γ de l'ATP (Fischer & Krebs, 1955) est la première description d'un changement de conformation induit par phosphorylation. En effet, un phosphate porte une double charge négative à pH physiologique, et sa liaison covalente perturbe l'équilibre électrostatique de la molécule à laquelle il est greffé. Les protéines, habituellement porteuses de plusieurs charges positives et négatives simultanément, sont particulièrement sensibles à cette modification. Aujourd'hui, nous savons que la phosphorylation des protéines est un phénomène réversible, et qu'en plus de jouer des rôles d'activation ou d'inactivation, la phosphorylation de certains résidus peut créer des domaines de reconnaissance et/ou de liaison pour d'autres protéines, et affecter la localisation subcellulaire de la protéine, sa demi-vie ainsi que son potentiel oncogénique (Pawson, 2004; Pawson & Scott, 2005; Yaffe & Elia, 2001). D'importantes initiatives ont été entreprises pour identifier le grand nombre possible de sites de phosphorylation dans le dessein de mieux comprendre cette composante

dynamique de la régulation cellulaire (Kim et al, 2005a; Olsen et al, 2006; Villen et al, 2007; Wu et al, 2006b)

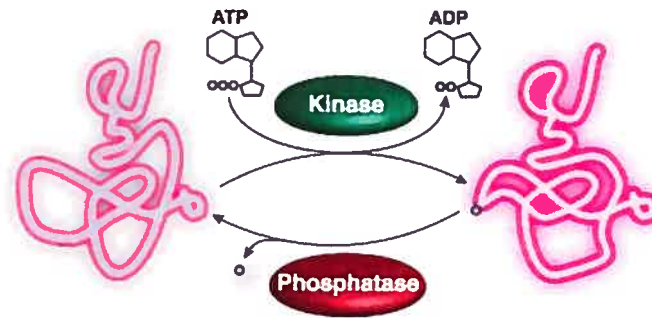


Figure 1-7 **Phosphorylation des protéines**

Le transfert réversible du γ -phosphate de l'ATP induit des changements de conformation et peuvent modifier l'état d'activation d'une protéine.

Adapté de (Berg et al, 2007; Voet & Voet, 2004)

1.1.2.2 Sites de phosphorylation

Une protéine peut être phosphorylée sur un ou plusieurs des acides aminés qui la composent. Bien avant que l'origine enzymatique du phénomène ne soit connue, une protéine contenant de la phosphosérine avait été décrite (Lipmann & Levene, 1932). La sérine et la thréonine sont demeurées pendant près de quarante ans les seuls acides aminés connus comme pouvant être phosphorylés chez les protéines de mammifères, jusqu'à la découverte de phosphotyrosine (Eckhart et al, 1979; Hunter & Sefton, 1980).

Chez les levures et les plantes, on retrouve également de la phosphorylation sur des résidus sérine et thréonine, mais pas en tyrosine, à quelques exceptions près. De plus, des composantes dites de « phospho-relais à deux composantes » impliquant des résidus phosphohistidine et de la phosphoaspartate y ont été bien caractérisées (Besant et al, 2003; Matthews, 1995; Mizuno, 1998). En outre, de la phospholysine ainsi que de la

phosphohistidine ont été décrites chez les mammifères, mais leurs rôles demeurent mal connus (Matthews, 1995; Matthews & Huebner, 1984).

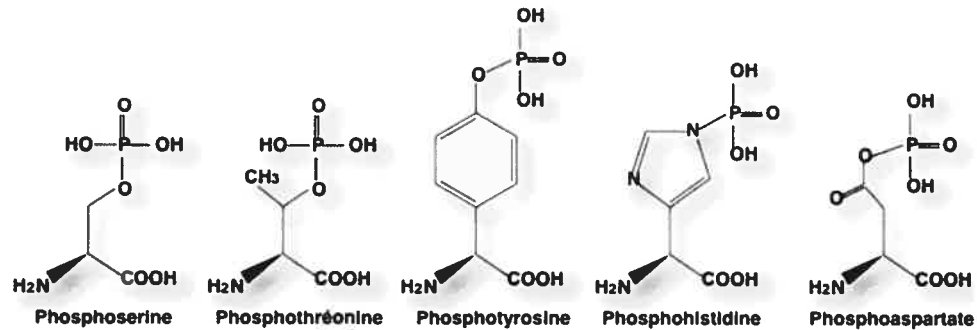


Figure 1-8 Acides aminés accepteurs de phosphate

Adapté de (Berg et al, 2007; Klumpp & Krieglstein, 2005; Mizuno, 1998; Voet & Voet, 2004)

La nature des phosphoamino acides n'est pas forcément la même au sein d'une seule protéine. Par exemple, une protéine peut contenir de la phosphothrèonine et de la phosphotyrosine, comme c'est le cas de nombreuses MAP kinases. Le nombre et la nature des résidus phosphorylés ainsi que leur environnement au sein de la protéine influencent à différents degrés la conformation et l'activité de la protéine qui les arbore.

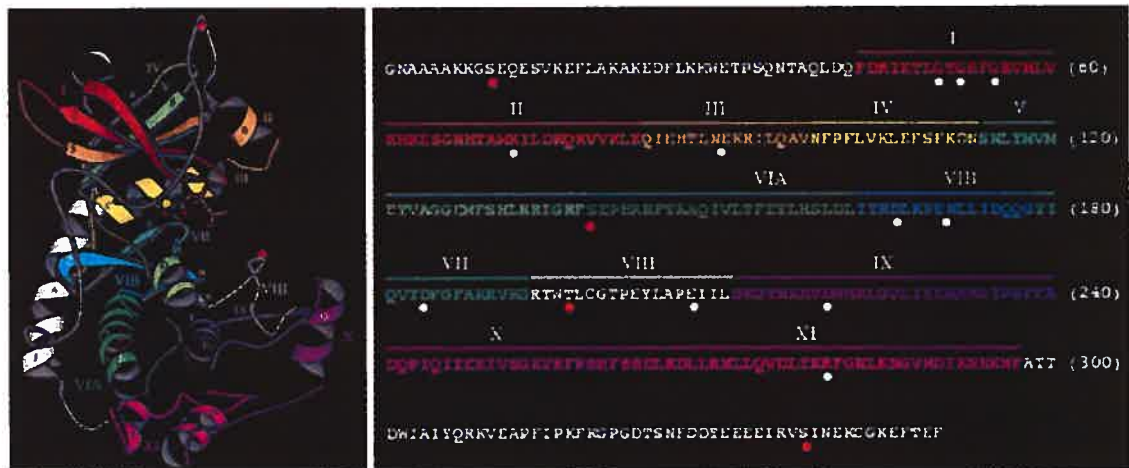
Généralement, la phosphorylation en tyrosine est associée aux événements de signalisation dits « précoces ». Ceux-ci ont lieu sur les premiers acteurs impliqués lorsqu'un signal extracellulaire (particulièrement un signal de croissance) franchit la membrane et engendre une cascade de signalisation. Conséquemment, la phosphorylation en tyrosine des protéines a généralement cours près de la membrane plasmique et dans le cytoplasme, alors que la phosphorylation en sérine et thrèonine survient généralement plus tardivement dans le cytoplasme et dans le noyau. Dans cet ouvrage, il sera principalement question de phosphorylation sérine et thrèonine, tout comme des kinases qui catalysent ce type de phosphorylation.

1.1.2.3 Structure des protéine kinases

On estime que les protéine kinases forment 1,7% du génome humain (Manning et al, 2002) et phosphoryleraient 30 à 50% des protéines qui y sont encodées (Kobe et al, 2005). En incluant les différents états de phosphorylation pour chaque protéine, les 518 kinases humaines généreraient donc jusqu'à 20 000 phosphoprotéines aux propriétés différentes (Johnson & Hunter, 2005). Les kinases jouent donc un rôle important dans une myriade de processus physiologiques qui régissent l'organisme tout au long de la vie.

Toutefois, malgré la grande variété de leurs fonctions biologiques, les sérine/thréonine kinases forment avec les tyrosine kinases une superfamille d'une surprenante homologie (Hanks & Hunter, 1995; Johnson et al, 2001). Cette parenté est attribuable à leur domaine kinase qui catalyse le transfert du γ -phosphate d'un nucléotide triphosphate (généralement de l'ATP, mais parfois aussi du guanosine triphosphate, GTP) vers un substrat. Composé de 250 à 300 acides aminés, le domaine kinase se subdivise à son tour en 12 sous-domaines conservés (Hanks et al, 1988). Le tout se replie en deux lobes formant le noyau catalytique dont la structure tridimensionnelle est elle aussi hautement conservée (Hanks & Hunter, 1995; Johnson et al, 2001); (Figure 1-9). Première kinase cristallisée (Knighton et al, 1991), la protéine kinase dépendante de l'AMP cyclique (PKA) sert fréquemment de prototype à cette superfamille (Francis & Corbin, 1994; Taylor et al, 1990; Taylor et al, 1992).

Le lobe N-terminal, également appelé petit lobe, est composé d'environ 80 acides aminés. Il englobe les sous-domaines I à IV, et se replie en cinq feuillets β antiparallèles enjambés par une hélice α . Considéré comme plus malléable que le lobe C-terminal, il contribue à la catalyse en permettant l'amarrage et le bon positionnement du nucléotide ainsi que des phosphates de l'ATP (Hanks & Hunter, 1995). Par des interactions ioniques et des ponts hydrogène, cette dernière molécule sert de pont entre les deux lobes dont l'interface constitue une fissure hydrophobe dans laquelle se glisse son noyau nucléotidique (Johnson et al, 2001).



mouvement de charnière, mais serait plutôt la combinaison de glissements et de pivots (Johnson et al, 2001).

Tableau 1-III Sous-domaines catalytiques

Principales fonctions des différents sous-domaines catalytiques des kinases avec leurs résidus et motifs les plus hautement conservés.

D'après (Hanks & Hunter, 1995; Johnson et al, 2001)

Sous-domaine	Fonction principale	Résidu(s) conservé(s)	Résidu(s) PKA	Résidu(s) ERK1
I	Positionnement et coordination des phosphates α et β	GXGXXGXV	51-58	49-56
II	Liaison et positionnement des phosphates α et β	K	73	71
III	Stabilisation des interactions de Lys 73	E	92	88
IV	Ancrage hydrophobe avec le lobe C-terminal			
V	Lien entre les deux lobes			
VIA	Structure de soutien			
VIB	Boucle contenant la base catalytique	HRDLKXXN	165-172	164-171
VII	Orientation du phosphate γ	DFG	185-187	184-186
VIII	Boucle d'activation; reconnaissance et ancrage du substrat	APE	207-209	206-208
IX	Stabilisation de la boucle catalytique	D	221	220
X	Peu conservé, présence parfois d'une insertion		<i>aucune</i>	271-298
XI	Ancrage de la boucle d'activation au lobe C-terminal	R	280	318

Bien qu'ils agissent tous de manière coordonnée au sein de la kinase, les douze sous-domaines possèdent chacun au moins une fonction particulière, et surtout des résidus clés et conservés qui sont associés à cette fonction. Les principales propriétés en sont résumées dans le tableau de la page précédente.

1.1.2.4 Classification des kinases

Bien que très conservés, les domaines kinase ne sont pas entièrement homogènes. Ce sont ces disparités de séquence qui servent de base de classement (Hanks & Hunter, 1995; Manning et al, 2002). Les particularités fonctionnelles de chacun de ces neuf groupes transparaissent néanmoins car la structure et la fonction d'une protéine sont intimement

liées. De plus, ces mêmes neuf groupes se retrouvent chez tous les métazoaires (Manning et al, 2002).

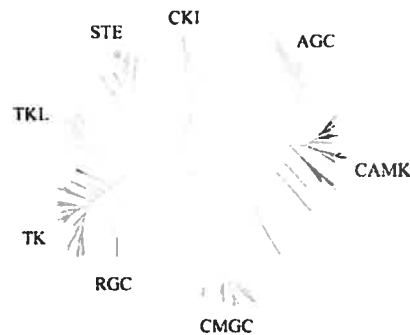


Figure 1-10 Parenté des groupes de kinases

Arborescence des groupes de protéine kinases humaines à l'exception des kinases atypiques.

Tiré de (Manning et al, 2002)

Ainsi, les enzymes du groupe Tyrosine kinase (TK) sont les seules à phosphoryler des résidus tyrosine, alors que toutes les autres sont des sérine/thréonine kinases. On retrouve dans ce groupe les récepteurs de plusieurs facteurs de croissance, le proto-oncogène Src ainsi que la *Focal adhesion kinase* (FAK). Le groupe hybride *Tyrosine kinase-like* (TKL) est composé de sérine/thréonine kinases qui possèdent des attributs des TK. Il est très diversifié et inclut des membres des familles MLK (*Mixed-lineage kinase*), Raf (*Rapidly growing fibrosarcoma*) et Ksr (*Kinase supressor of Ras*). Les membres du petit groupe *Receptor guanylate cyclase* (RGC) possèdent également une structure similaire à celle des TK, malgré leur activité guanylyl cyclase. Le groupe STE (*Sterile*), quant à lui, renferme des membres qui se retrouvent à différents endroits dans des cascades de phosphorylation en amont des MAP kinases. Ces dernières appartiennent au groupe CMGC (CDK, MAP kinase, GSK3, CLK), dont la différence majeure vis-à-vis des autres kinases est la présence d'une insertion entre les sous-domaines X et XI, et une préférence pour les

substrats riches en proline. Les kinases des groupes AGC (contenant les familles PKA, PKC et PKG) et CaMK (kinases dépendantes du calcium et/ou de la calmoduline), partagent toutes deux d'être activables par les seconds messagers comme l'AMPc et le calcium, respectivement, ainsi qu'une préférence pour les résidus sérine/thréonine avec des acides aminés basiques dans leur environnement. À l'inverse, une préférence pour les substrats dans un environnement acide, semble avoir cours chez les membres de la famille Caséine kinase 1 (CK1); (Meggio & Pinna, 2003). Les protéine kinases qui ne figurent pas parmi ces huit groupes sont très hétérogènes, mais possèdent néanmoins une structure/fonction qui les apparente aux autres kinases (Hanks & Hunter, 1995). Les propriétés et particularités de neuf groupes de protéine kinases sont résumées dans le tableau à la page suivante.

Tableau 1-IV Classification des kinases

Classification des protéines kinases eucaryotes avec leurs familles et sous-familles.

Adapté de (Hanks & Hunter, 1995; Manning et al, 2002)

Groupe	Familles	Sous-familles	Kinases <i>S. cerevisiae</i>	Kinases <i>H. sapiens</i>	Exemples (famille>sous-famille>kinases)
AGC	14	21	17	63	AKT>>Akt1, Akt2, Akt3
CAMK	17	33	21	74	MAPKAPK>MNK>MNK1, MNK2
CK1	3	5	4	12	CK1>>CK1 α , CK1 α 2
CMGC	8	24	21	61	MAPK>ERK>ERK1, ERK2, ERK3, ERK4
STE	3	13	14	47	STE7>>MEK1, MEK2, MEK5, MEK6
TK	30	30	0	90	EGFR>>EGFR, Her2
TKL	7	13	0	43	RAF>>A-Raf, B-Raf, Raf-1
RGC	1	1	0	5	RGC>>NPR-A, NPR-B
Autres	51	61	53	123	Autre>IKK>IKK α , IKK β , IKK ϵ , TBK1
<i>Total</i>	134	201	130	518	

Groupe	Particularités	Préférences substrat
AGC	Régulation par les nucléotides	Riches en acides aminés basiques
CAMK	Régulation par le calcium et/ou la calmoduline	Riches en acides aminés basiques
CK1		Riches en acides aminés acides
CMGC	Insertion entre les sous-domaines X et XI	Riches en proline
STE	Contient MAPK α , MAPK β et MAPK γ	
TK	Seules tyrosines kinases	Varie selon domaines d'interaction modulaires
TKL	Serine/thréonine kinases avec une structure TK	
RGC	Similarités aux TK	Guanylyl cyclases
Autres	Grande variabilité	Serine/thréonine

1.2 MAP kinases

L'établissement du lien entre l'activité tyrosine kinase de la protéine Src et son potentiel oncogénique (Eckhart et al, 1979; Hunter & Sefton, 1980) a eu d'importantes répercussions au tournant des années 1980. De plus, de nombreuses similitudes entre cette oncogénèse virale et les effets de plusieurs facteurs de croissance ont été observées (Cooper et al, 1982; Cooper & Hunter, 1981b). De nouveaux outils, comme des anticorps anti-phosphotyrosine, ont alors permis de mettre en lumière l'importance des récepteurs aux

facteurs de croissance comme le *platelet-derived growth factor* (PDGF) (Daniel et al, 1985), l'*epidermal growth factor* (EGF) (Hunter & Cooper, 1981), et l'insuline (Kasuga et al, 1982) dans les événements de phosphorylation en tyrosine. La phosphotyrosine devint subséquemment l'objet de plusieurs recherches visant d'abord l'identification de nouveaux substrats et, par la suite, de kinases (Cooper & Hunter, 1983).

1.2.1 Découverte des MAP kinases

De cette quête de protéines phosphorylées en tyrosine, un candidat se démarqua. Dans plusieurs lignées cellulaires traitées au PDGF ou à l'EGF (Cooper et al, 1982; Cooper & Hunter, 1983; Kohno, 1985; Rossomando et al, 1989), à la thrombine (Kohno & Pouyssegur, 1986), aux esters de phorbol (Kazlauskas & Cooper, 1988; Rossomando et al, 1989), dans des cellules transformées de manière virale (Cooper & Hunter, 1981a) ainsi que dans des oocytes de *Xenopus laevis* arrêtés en mitose (Cooper, 1989), une protéine d'une masse moléculaire de 42 kDa contenant de la phosphotyrosine fut observée, parfois en compagnie d'une protéine similaire faisant 2 kDa de plus.

Contrastant avec bien des tyrosine kinases jusqu'alors identifiées, cette protéine s'est révélée être une sérine/thréonine kinase pour laquelle une stimulation à l'insuline augmente son activité phosphotransférase, en plus d'induire sa phosphorylation en tyrosine mais également en thréonine (Ray & Sturgill, 1988). Le nom MAP kinase lui fut initialement conféré par sa capacité à phosphoryler *Microtubule-associated protein-2* (MAP-2) (Ray & Sturgill, 1988; Sturgill & Ray, 1986). La signification de l'acronyme fut ultérieurement changée pour *mitogen-activated protein* kinase, conséquence de son activation par plusieurs agents mitogéniques incluant des facteurs de croissance et des esters de phorbol (Rossomando et al, 1989).

Le nom *Extracellular signal-regulated kinase* (ERK) fut ensuite adopté lorsque l'ADN complémentaire (ADNc) codant pour cette protéine fut cloné (Boulton et al, 1990). Peu de temps après, les séquences de ERK1, ERK2 et ERK3 étaient révélées (Boulton et al, 1991). Une analyse de ces séquences démontra une forte homologie avec les kinases

Fusion 3 (Fus3) et *Kinase supressor of SST* (Kss1) alors récemment identifiées chez *Saccharomyces cerevisiae* (Courchesne et al, 1989; Elion et al, 1990).

1.2.2 Modules de trois kinases

Puisqu'au moment de son activation par de nombreux stimuli, ERK2 est phosphorylée en thréonine et tyrosine, et que la déphosphorylation de l'un ou l'autre de ces résidus abolit son activité catalytique (Anderson et al, 1990), il a été proposé que cette protéine représentait le point de convergence de deux voies de signalisation : une voie de tyrosine phosphorylation, et une autre de sérine/thréonine phosphorylation, toutes deux avec leurs kinases respectives.

1.2.2.1 Une cascade de phosphorylation

Cependant, la recherche de candidats ayant des MAP kinases comme substrat n'a généré aucune tyrosine kinase ni sérine/thréonine kinase. Néanmoins, une protéine particulière ayant une activité thréonine/tyrosine kinase a pu être identifiée (Ahn et al, 1992a; Alessandrini et al, 1992; Crews et al, 1992; Nakielny et al, 1992b). Cette dernière, une MAP kinase kinase (MAPKK) (Haystead et al, 1992; Nakielny et al, 1992a; Seger et al, 1992a; Wu et al, 1993b), fut nommée MEK1 pour *MAPK or ERK Kinase 1*. Le clonage de MEK1 fut rapidement suivi par celui de MEK2, identique à 79% (Brott et al, 1993; Otsu et al, 1993; Wu et al, 1993a; Zheng & Guan, 1993a).

Par ailleurs, il a été observé que le proto-oncogène, et protéine G monomérique, Ras (p21-ras), était liée indirectement à l'activation de ERK2 (de Vries-Smits et al, 1992; Leever & Marshall, 1992; Robbins et al, 1992; Wood et al, 1992). C'est un autre proto-oncogène, Raf-1 (*Rapidly growing fibrosarcoma*; aussi connu sous le nom de C-Raf), qui était la pièce manquante du puzzle (Schaap et al, 1993). Effectivement, Raf-1 s'associe à la forme activée de Ras (Finney et al, 1993; Hallberg et al, 1994; Koide et al, 1993; Moodie et al, 1993; Vojtek et al, 1993; Zhang et al, 1993) en plus de pouvoir lier MEK1 (Huang et al, 1993; Van Aelst et al, 1993). De surcroît, Raf-1 peut phosphoryler et activer MEK1 (Alessi

et al, 1994; Dent et al, 1992; Howe et al, 1992; Kyriakis et al, 1992), ce qui en fait une MAP kinase kinase kinase (MAPKKK). Il en est de même pour l'isoforme B-Raf qui possède des propriétés similaires (Catling et al, 1994; Catling et al, 1995; Papin et al, 1995; Reuter et al, 1995). Une cascade de kinases se phosphorylant séquentiellement est tout à fait envisageable puisque la majorité des kinases sont elles-mêmes des phosphoprotéines dont l'assemblage de la forme active peut requérir la présence de phosphate sur des résidus clés (Johnson et al, 2001).

Ainsi, l'identification de kinases en amont (et aussi en aval) de ERK1 et ERK2, a permis la reconstitution d'une cascade enzymatique dans laquelle chaque kinase activée, phosphoryle et active à son tour la kinase suivante (Khokhlatchev et al, 1997; Macdonald et al, 1993; Neiman & Herskowitz, 1994; Tobe et al, 1992).

1.2.2.2 De multiples voies

Toutefois, parmi toutes ces kinases alors clonées, une certaine disparité a commencé à émerger. Par exemple, MKK3 et MEK5, contrairement à leurs homologues MEK1 et MEK2, sont incapables de phosphoryler ou d'activer ERK1 et ERK2 (English et al, 1995; Zheng & Guan, 1993b). Ou encore, MEK kinase 1 (MEKK1), une MAPKKK en partie homologue à Raf qui interagit et est activée par Ras en réponse aux facteurs de croissance (Lange-Carter & Johnson, 1994; Russell et al, 1995). MEKK1 peut également phosphoryler MEK1, mais sans pour autant l'activer (Xu et al, 1995).

La notion de voies MAP kinases parallèles s'est imposée davantage avec la découverte de nouvelles MAP kinases homologues à ERK1 et ERK2, mais possédant des propriétés d'activation distinctes (Derijard et al, 1995). La sous-famille des *Jun N-terminal kinases* (JNK) répond nettement mieux aux stress cellulaires et aux cytokines qu'aux facteurs de croissance, en plus d'avoir une sélectivité différente de celle de ERK1/2 à l'endroit de différents substrats, dont c-Jun (Derijard et al, 1994; Kallunki et al, 1994; Kyriakis et al, 1994; Lee et al, 1994). En outre, contrairement à ERK1 et ERK2, les JNK sont activées par MEKK1 mais pas Raf (Minden et al, 1994). De son côté, la sous-famille

p38 est activée suite à un choc osmotique ou thermique, en plus d'être très similaire à *High osmolarity glycerol 1* (Hog1) de *S. cerevisiae*, et est aussi impliquée dans la réponse osmotique (Han et al, 1994; Rouse et al, 1994).

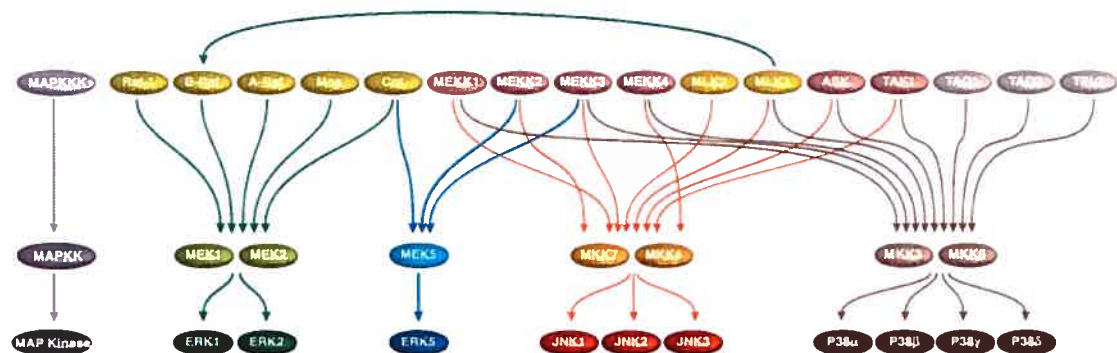


Figure 1-11 Voies MAP kinase de mammifères

Composition des principales voies MAP kinases caractérisées chez les mammifères. Pour un portrait complet des voies MAP kinase de *S. cerevisiae*, voir Figure 1-15, page 40.

Adapté de (Imajo et al, 2006; Qi & Elion, 2005; Uhlik et al, 2004)

La recherche d'analogues des MAP kinases chez la levure *S. cerevisiae*. a permis d'identifier *MAP Kinase 1* (Mpk1) (Lee et al, 1993), tandis que la similarité de Fus3 et Kss1 aux autres MAP kinases a été révélée après leur identification. Un crible pour trouver des protéines impliquées dans la réponse à une osmolarité élevée a, quant à lui, permis l'identification de Hog1 et son activateur Pbs2 (Brewster et al, 1993). En plus de leurs homologues respectives de séquences aux MAP kinases et MAPKK, Hog1 et Pbs2 forment un tandem enzyme-substrat dans lequel Pbs2 phosphoryle et active Hog1. Ceci indiquait déjà que plusieurs MAP kinases existent tant chez les levures que les mammifères et celles-ci partagent non seulement des similitudes de séquences, mais également une organisation ainsi que des modes de régulation similaires.

1.3 MAP kinases de *Saccharomyces cerevisiae*

Il existe plusieurs voies MAP kinase chez tous les eucaryotes, des unicellulaires comme les levures et les amibes, jusqu'aux organismes complexes comme les mammifères, en passant par les plantes, les poissons et les insectes. L'architecture voulant qu'une MAPKKK phosphoryle et active la MAPKK en amont d'une MAP kinase est elle aussi conservée. Pourtant chaque cascade est déclenchée de manière différente et conduit à des réponses biologiques différentes. Au cours des prochaines pages, les particularités de chaque voie MAP kinase et de ses composantes seront décrites dans une perspective axée sur la biologie cellulaire et la physiologie. Les MAP kinases de la levure *Saccharomyces cerevisiae* feront l'objet de la présente sous-section, tandis que celles de mammifères seront abordées dans la suivante (Section 1.4, page 39).

Il est à noter que des caractères *italiques* sont utilisés dans la littérature pour faire référence à des gènes (ex. : *fus3*). Si ces derniers sont exprimés de manière ectopique, des lettres majuscules sont utilisées (ex. : *FUS3*). Pour faire référence à la protéine exprimée, la lettre « p » est ajoutée comme suffixe (ex. : Fus3p). Cependant, comme cet ouvrage fait principalement référence aux protéines, et que cette nomenclature se retrouve de plus en plus fréquemment dans les publications de haut niveau, une nomenclature simple dépourvue d'italique et de suffixes (ex. : Fus3) est utilisée dans cet ouvrage.

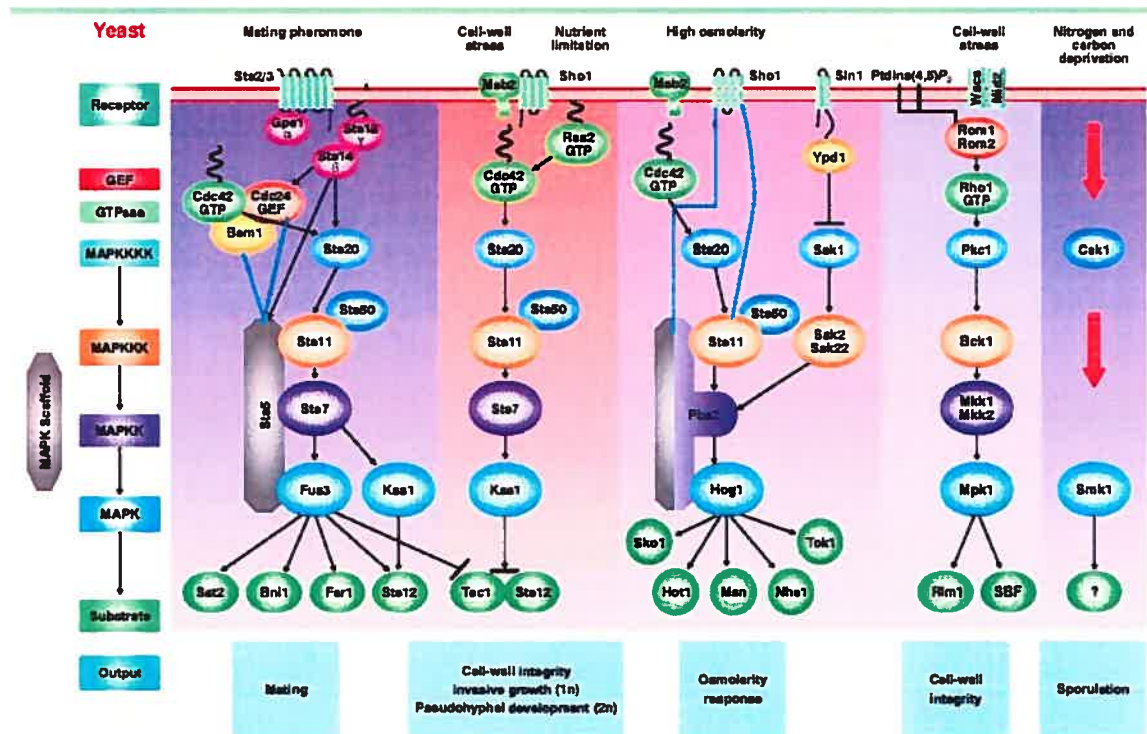


Figure 1-12 Voies MAP kinase de *S. cerevisiae*

Tiré de (Qi & Elion, 2005)

1.3.1 Voie Fus3 de conjugaison

La levure *Saccharomyces cerevisiae* existe sous forme haploïde et diploïde. En fonction de leur sexe (a ou α), les levures haploïdes sécrètent des phéromones (facteurs de conjugaison) qui sont reconnues par un récepteur spécifique exprimé par les partenaires du sexe opposé (Alberts, 2002; Darnell et al, 1990). La stimulation de ce récepteur déclenche l'arrêt du cycle cellulaire et la formation d'une projection cellulaire appelée *shmoo*, en direction du gradient de phéromone. Lorsque les partenaires entrent en contact, les membranes, puis les noyaux se fusionnent, formant un zygote qui se développe ensuite en une cellule a/α diploïde capable de croître à son tour.

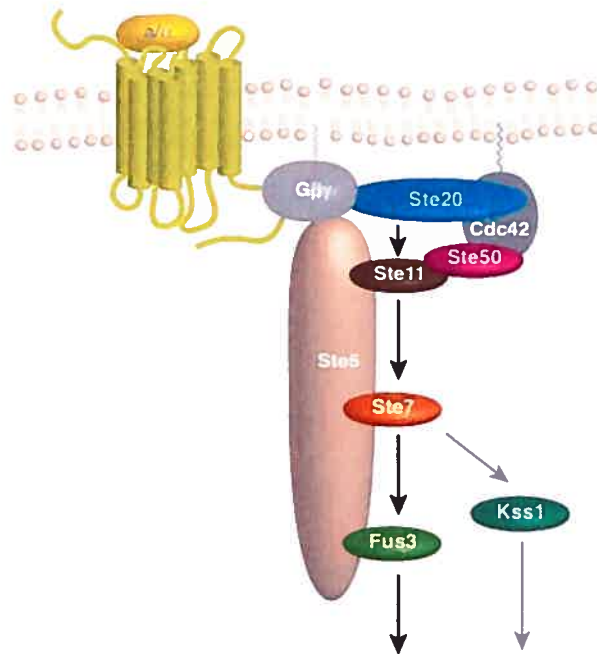


Figure 1-13 **Activation de la voie Fus3**

Représentation schématique du complexe permettant aux protéines $G\beta\gamma$ de recruter Ste5 et Ste20 afin d'activer la MAPKCKK Ste11 puis la voie Fus3 de réponse aux phéromones.

La voie MAP kinase Fus3 est essentielle à ce processus (Bardwell, 2005; Elion, 2000; Posas et al, 1998a; Ramezani-Rad, 2003a; Schwartz & Madhani, 2004) qui implique l'activation de plus de 200 gènes (Roberts et al, 2000). La liaison de la phéromone à son récepteur couplé aux protéines G (RCPG) permet le recrutement de la protéine d'échafaudage Ste5 et des composantes de la cascade (Section 1.5.3.2.1, page 101) via les sous-unités $G\beta\gamma$ de la protéine G hétérotrimérique (Pryciak & Huntress, 1998; Whiteway et al, 1995); (Figure 1-13). Aussi recrutée par $G\beta\gamma$, la MAP kinase kinase kinase kinase (MAPKCKK) *Sterile 20* (Ste20) est simultanément activée par la GTPase monomérique Cdc42 avant d'activer à son tour la MAPKCKK Ste11 par phosphorylation (Bardwell, 2005; Elion, 2000). S'en suit l'activation de la MAPKK Ste7, puis des MAP kinases Kss1 et

Fus3. Toutes deux des orthologues de ERK1/2, ces dernières possèdent notamment comme cible commune le facteur de transcription Ste12 qu'elles activent à la fois en levant son inhibition par les protéines *Down-regulator of invasive growth 1* (Dig1) et Dig2, et par phosphorylation directe (Breitkreutz et al, 2001; Cook et al, 1996; Hung et al, 1997; Tedford et al, 1997). Toutefois, en plus d'être un déterminant de la spécificité du signal (Conte & Curcio, 2000; Errede & Ge, 1996; Madhani et al, 1997), Fus3 contribue majoritairement à la réponse aux phéromones (Sabbagh et al, 2001), possiblement parce qu'elle est la seule des deux MAP kinases à lier Ste5. Il n'en demeure pas moins que ces deux MAP kinases ne sont pas redondantes et possèdent des substrats qui leurs sont propres ainsi que des modes de régulation distincts assurant une réponse adéquate aux bons stimuli (Paliwal et al, 2007).

La protéine Ste50 est elle aussi essentielle à la voie de la conjugaison (Rad et al, 1992). Celle-ci ne possède des orthologues que chez la levure, mais son *Sterile alpha motif* (SAM) en N-terminal (Ponting, 1995) et son domaine d'association à Ras (RA) en C-terminal (Ponting & Benjamin, 1996) sont retrouvés chez plusieurs protéines d'organismes plus complexes (Ramezani-Rad, 2003a). Ceci lui confère des propriétés de protéine adaptatrice. En effet, son domaine RA lui permet de recruter Cdc42 (Ramezani-Rad, 2003b; Truckses et al, 2006) et permet l'activation de Ste11 par ciblage à la membrane (Truckses et al, 2006; Wu et al, 2006a). Quant à lui, le domaine SAM de Ste50 lie son homologue situé dans la portion N-terminale de Ste11 (Bhattacharjya et al, 2004; Grimshaw et al, 2004; Kwan et al, 2006; Kwan et al, 2004; Posas et al, 1998b; Xu et al, 1996). Cette interaction constitutive (Wu et al, 1999) est requise pour tous les processus relayés par Ste11 (Jansen et al, 2001; Wu et al, 2003). Dans la voie Fus3, Ste50 permet entre autres une durée plus soutenue du signal des phéromones (Xu et al, 1996).

1.3.2 Voie Kss1 de la croissance filamenteuse

Chez les levures diploïdes a/α , une carence en éléments nutritifs dont l'azote, induit une forme de différenciation, appelée croissance filamenteuse (Gancedo, 2001; Palecek et

al, 2002; Pan et al, 2000). Celle-ci est caractérisée notamment par la formation de pseudohyphes permettant aux levures de chercher des éléments nutritifs en dépit de leur mobilité limitée.

En absence d'azote, mais en présence d'une source de carbone, *G protein-coupled receptor 1* (Gpr1) induit la production d'AMPc via la sous-unité G α s à laquelle il est couplé (Madhani & Fink, 1998). Ce second messenger active les trois isoformes de PKA de *S. cerevisiae* qui induisent à leur tour l'expression du gène FLO11 (Pan & Heitman, 1999; Robertson & Fink, 1998). Par un mécanisme encore mal défini, la voie Kss1 active également ce gène (Rupp et al, 1999). Cette voie activée à la membrane (Truckses et al, 2006) requiert à nouveau Cdc42, Ste20, Ste11, Ste50 et Ste7 en plus de Kss1 (Cook et al, 1997; Madhani & Fink, 1997; Madhani et al, 1997; Mosch et al, 1996; Ramezani Rad et al, 1998), mais n'implique pas Fus3 ni Ste5 ou une autre protéine d'échafaudage (Figure 1-12, page 32). Kss1 est la seule MAP kinase de cette voie qu'elle inhibe à l'état inactif, mais dont la phosphorylation par Ste7 la convertit en activateur (Cook et al, 1997).

Les processus de conjugaison et de croissance filamenteuse sont somme toute similaires, et c'est pourquoi ils font appel à bien des partenaires communs. Dans les deux cas, les processus sont associés à un arrêt de la prolifération accompagné de changements morphologiques significatifs dont la formation de projections cytoplasmiques (shmoos ou pseudohyphes, selon). La spécificité de signal provient donc du fait que certaines composantes sont utilisées par une voie, mais pas l'autre, en plus d'avoir cours dans des cellules soit haploïdes ou diploïdes (Schwartz & Madhani, 2004). Par ailleurs, la formation de pseudohyphes se fait également chez des levures haploïdes en absence de glucose, mais l'implication de la voie Kss1 demeure incertaine.

1.3.3 Voie Hog1 de réponse à l'osmolarité élevée

À cause des environnements variables au sein desquels elles croissent, fermentent et prolifèrent, les levures ont développé plusieurs mécanismes d'adaptation à des changements d'osmolarité. L'un de ceux-ci implique la MAP kinase Hog1 dont l'activation

conduit à l'induction de gènes permettant la synthèse intracellulaire de glycérol afin de compenser l'augmentation de la pression osmotique externe.

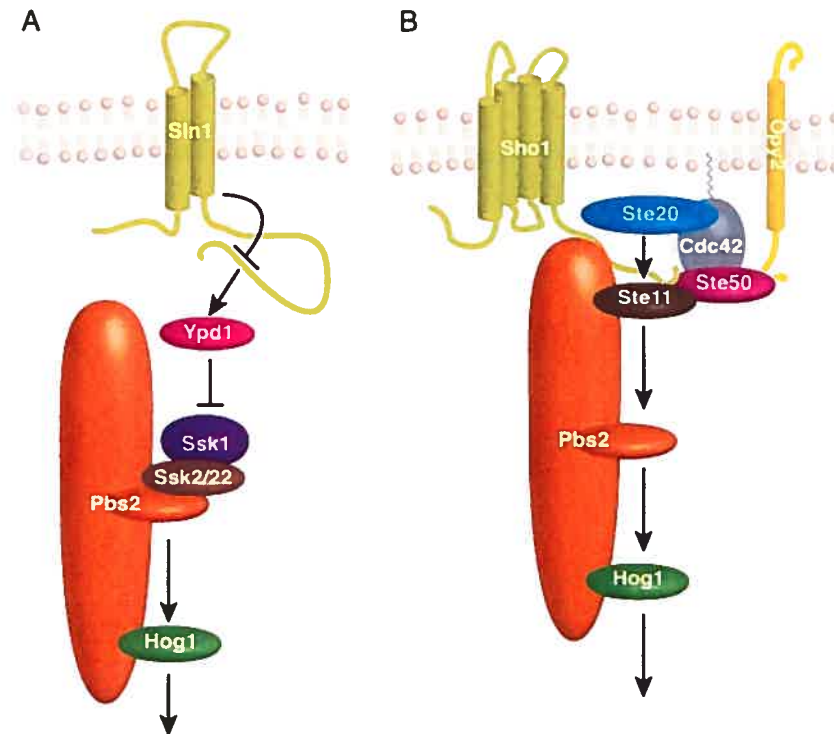


Figure 1-14 Complexes d'activation de la voie Hog1

A) Représentation schématique de la branche Ssk2/22 de la voie Hog1. B) Partenaires d'interaction permettant d'activer spécifiquement la voie Hog1 par la branche Sho1.

Deux branches d'activation indépendantes convergent sur MAPKK Pbs2 (Hohmann, 2002; O'Rourke et al, 2002; Seet & Pawson, 2004; Sheikh-Hamad & Gustin, 2004). Dans la première appelée Ssk2/22 (Figure 1-14A), l'histidine kinase transmembranaire Sln1 s'autophosphoryle et le phosphate de la phosphohistidine générée est transféré sur un résidu aspartate, puis sur une histidine de la protéine Ypd1 pour terminer son « phospho-relais » sur une aspartate de la protéine Ssk1 (Besant et al, 2003).

Cette dernière, à l'état non-phosphorylé, interagit avec les MAPKKK Ssk2 et Ssk22, conduisant à leur autophosphorylation. Ainsi, l'osmolarité élevée réprime l'activité catalytique de Sln1, ce qui a pour conséquence de lever l'action inhibitrice de Ypd1, et permettre l'activation de Ssk2 et Ssk22 par l'entremise de Ssk1. Ssk2/22 forment des interactions d'amarrage spécifiques avec la MAPKK Pbs2 (Tatebayashi et al, 2003) pour ensuite l'activer par phosphorylation, afin que cette dernière phosphoryle et active à son tour la MAP kinase Hog1.

Dans la seconde branche d'activation (Sho1; Figure 1-14B, page 36), Pbs2 agit comme protéine d'échafaudage qui, en plus de lier la MAPKKK Ste11 et la MAP kinase Hog1, interagit directement avec le domaine SH3 de l'osmorécepteur Sho1. De plus, la protéine G Cdc42, la MAPKKKK Ste20, ainsi que la protéine adaptatrice Ste50 sont toutes trois essentielles à la réponse osmotique relayée par la branche Sho1.

Bref, trois voies MAP kinases aux propriétés bien distinctes requièrent l'activation de Ste11 en présence de Ste50 mais aussi de Cdc42 et Ste20. Les protéines d'échafaudage Ste5 et Pbs2 permettent l'isolement et l'activation directe des autres protéines des cascades MAP kinases respectives (Ramezani-Rad, 2003a; Schwartz & Madhani, 2004). De plus, en interagissant avec les récepteurs membranaires, elles permettent une activation rapide et spécifique de Ste11 tout en évitant ses débordements possibles vers les autres voies. En outre, les interactions entre Ste11 et Ste50 via leurs domaines SAM respectifs sont elles aussi très importantes pour la spécificité du signal. Effectivement, le domaine SAM de Ste50 est essentiel aux voies Fus3, Kss1 et Hog1 (Jansen et al, 2001) en plus d'être interchangeable avec celui de Ste11 (Wu et al, 2006a). En outre, Ste50 lie la protéine transmembranaire Opy2 ce qui lui permet de recruter Ste11 à la membrane afin d'activer spécifiquement la voie Hog1 (Wu et al, 2006a). De surcroît, la protéine G monomérique Cdc42 lie et active Ste20 à la membrane en plus de lier le complexe Ste11-Ste50 (Tatebayashi et al, 2006) de sorte que Ste11 est présentée à Ste20 pour activation à la

membrane. Enfin, le tandem Ste11-Ste50 s'associe, lui aussi directement à Sho1 (Tatebayashi et al, 2006). En somme, un important assemblage de protéines solidement liées de part et d'autre permet le recrutement et l'activation spécifiques du complexe de signalisation de la voie Hog1.

1.3.4 Autres voies MAP kinase

Deux autres processus biologiques chez *S. cerevisiae* impliquent différentes MAP kinases (Gustin et al, 1998; Posas et al, 1998a; Widmann et al, 1999). Bien que l'architecture de ces voies soit moins conventionnelle (Figure 1-12, page 32), les MAP kinases qui les composent y jouent néanmoins un rôle essentiel (Krisak et al, 1994; Lee et al, 1993).

1.3.4.1 Voie Mpk1 de l'intégrité de la paroi cellulaire

L'adaptation à un nouvel environnement nécessite souvent des changements morphologiques. Que ce soit pour la croissance cellulaire, la formation de pseudohyphes et l'adaptation à des changements d'osmolarité, ces processus impliquent un remodelage du cytosquelette et de la paroi cellulaire (Levin, 2005).

Dans cette voie, plusieurs signaux de stress émanant de senseurs transmembranaires convergent vers la protéine G monomérique Rho1 et son effecteur Pkc1, l'orthologue des Protéine kinase C (PCK) de mammifère (Hohmann, 2002; Levin, 2005; Serrano et al, 2006). Ce tandem est également impliqué dans plusieurs voies de signalisation dont la voie MAP kinase Mpk1 dans laquelle Pkc1 joue le rôle de MAPKKK, qui phosphoryle et active les MAPKK Mkk1 et Mkk2. Ces dernières ont pour cible la MAP kinase Mpk1 aussi connue par le nom du gène *Slf2* qui l'encode. Les protéines Mkk1/2 et Mpk1 sont recrutés aux sites de croissance membranaire par la protéine d'échafaudage Spa2 (van Drogen & Peter, 2002). Parmi les substrats de Mpk1, on retrouve des canaux ioniques, des agents de remodelage de la chromatine et du cytosquelette, mais aussi des facteurs de transcription,

ainsi que des MAP kinase phosphatases (MKP) alors mobilisées pour inactiver Fus3 et Hog1.

1.3.4.2 Voie Smk1 de la sporulation

À l'inverse de la conjugaison, la sporulation est le processus complexe à partir duquel une levure diploïde produit des gamètes haploïdes sous forme de spores (Engebrecht, 2003). Initiée en absence d'azote, mais en présence d'une source de carbone non-fermentable, la sporulation requiert deux cycles de méioses et de ségrégation de chromatides.

La MAP kinase Smk1 est requise pour l'assemblage des parois de la spore (Krisak et al, 1994), mais nécessite un seuil d'activité pour l'initiation du processus (Wagner et al, 1999). Celle-ci est régulée positivement par *Cdk-activating kinase 1* (Cak1), une enzyme mieux connue pour phosphoryler certaines *cyclin-dependent kinases* (CDK) dans leur boucle activatrice (Schaber et al, 2002; Wagner et al, 1997). Une homologue de la MAPKKKK Ste20, Sps1, est également impliquée à diverses étapes de la sporulation, mais il n'a pas été clairement établi que celle-ci se retrouve directement en amont de Smk1 (Friesen et al, 1994; Iwamoto et al, 2005).

1.4 MAP kinases de mammifères

Les voies MAP kinases de mammifères sont elles aussi organisées en modules de trois kinases. Toutefois, ces protéines et leurs régulateurs sont plus nombreux et arborent parfois des patrons d'expression variables en fonction des contextes cellulaires et tissulaires. Les principes d'organisation et de régulation restent similaires, mais le niveau de complexité augmente de quelques degrés. Il n'en demeure pas moins que ces voies tout comme leurs composantes sont essentielles à une pléthore de processus physiologiques.

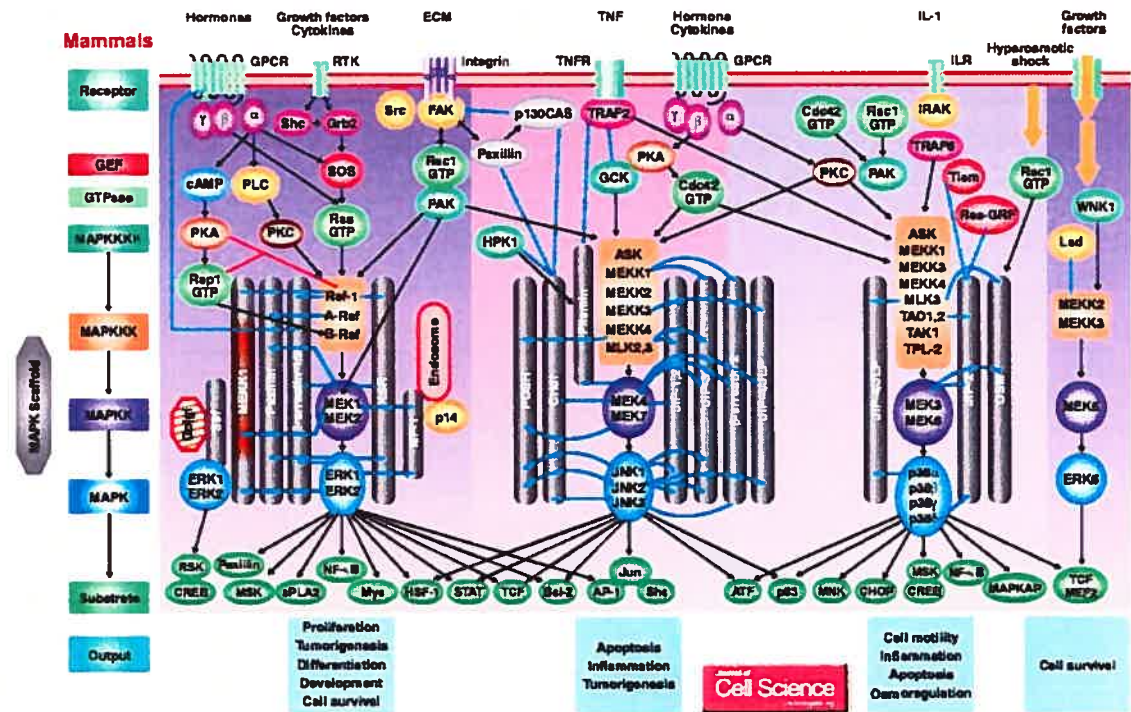


Figure 1-15 Principales voies MAP kinases de mammifères

Tiré de (Qi & Elion, 2005)

Activées par une grande variété de stimuli dont les facteurs de croissance, les cytokines, les radiations ainsi que les stress mécaniques et oxydatifs, les voies MAP kinases sont partie prenante de nombre de processus cellulaires fondamentaux (Chang & Karin, 2001; Chen et al, 2001; Imajo et al, 2006; Johnson & Lapadat, 2002; Pearson et al, 2001b; Qi & Elion, 2005; Raman & Cobb, 2003). Ceux-ci incluent la croissance et la prolifération (Zhang & Liu, 2002), la migration (Huang et al, 2004a) et l'apoptose (Wada & Penninger, 2004). Les MAP kinases sont impliquées dans le développement de l'embryon (Krens et al, 2006a; Kuida & Boucher, 2004; Meloche et al, 2004), du système nerveux (Kyosseva, 2004a), et du système vasculaire et sanguin (Depeille et al, 2007).

Parce qu'elles jouent des rôles capitaux dans la croissance, la prolifération et la migration cellulaires, les voies MAP kinases sont reliées de manière non équivoque au développement et à l'évolution de différentes formes de cancer (Bradham & McClay, 2006; Katsanakis et al, 2002; Kohno & Pouyssegur, 2006; Olson & Hallahan, 2004; Rennefahrt et al, 2005; Sebolt-Leopold, 2000; Thompson & Lyons, 2005). Similairement, elles sont impliquées dans certaines maladies cardiovasculaires (Armstrong, 2004; Blanc et al, 2003; Strniskova et al, 2002), hématologiques (Platanias, 2003), métaboliques (Manning & Davis, 2003) ou encore des maladies inflammatoires (Kaminska, 2005; Kyriakis & Avruch, 2001) dont l'asthme (Pelaia et al, 2005) ou la maladie Crohn (Van Den Blink et al, 2002). Enfin, elles jouent un rôle dans la plasticité synaptique et pourraient être impliquées dans la schizophrénie et la maladie d'Alzheimer (Kyosseva, 2004b; Zhu et al, 2002).

1.4.1 Voie ERK1/2

Les MAP kinases ERK1/2 figurent parmi les premières et les mieux décrites, tant dans leur composition que leur régulation. Cette voie MAP kinase est également associée à une multitude de processus physiologiques et a été proposée comme cible dans plusieurs pathologies. L'activation de la voie ERK1/2 passe généralement par la protéine G monomérique Ras. Celle-ci est reliée à plusieurs voies de signalisation et possède une multitude d'effecteurs dont les MAPKKK de la sous-famille Raf.

1.4.1.1 Raf

Différents stimuli impliquent divers types de récepteurs activent plusieurs chemins qui convergent vers les MAPKKK membres de la sous-famille Raf (Katz et al, ; Werry et al, 2005). Associée à celle de Ras, l'activation de A-Raf, B-Raf et Raf-1, représente la première étape de l'activation de la voie ERK1/2 (Avruch et al, 2001; Chong et al, 2003; Kyriakis, ; Kyriakis et al, 1992). B-Raf est principalement activée par phosphorylation alors que des évènements plus complexes de recrutement à la membrane sont impliqués dans les cas de A-Raf et Raf-1 (O'Neill & Kolch, 2004). Les modes de régulation de ces protéines

sont parfois complexes, et seront en partie abordés au cours des prochaines sections. Les MAPKK MEK1 et MEK2 sont les seuls substrats confirmés de ces proto-oncogènes (Baccarini, 2005). Par contre, MEK1 et MEK2 sont aussi phosphorylées par Mos (Posada et al, 1993) et Cot (Hagemann et al, 1999), deux autres MAPKKK proto-oncogéniques. Par ailleurs, les études génétiques et biochimiques (Huser et al, 2001; Lenormand et al, 1996; Mikula et al, 2001; Pearson et al, 2000) suggèrent que les membres de la sous-famille Raf (ci-après appelés Raf) auraient des propriétés indépendantes de leur activité catalytique (Hindley & Kolch, 2002). Parmi celles-ci on retrouve un rôle présumé de protéine d'échafaudage (Section 1.5.3.2.1, page 101) ainsi qu'une implication dans d'autres voies de signalisation, certaines étant reliées à l'apoptose.

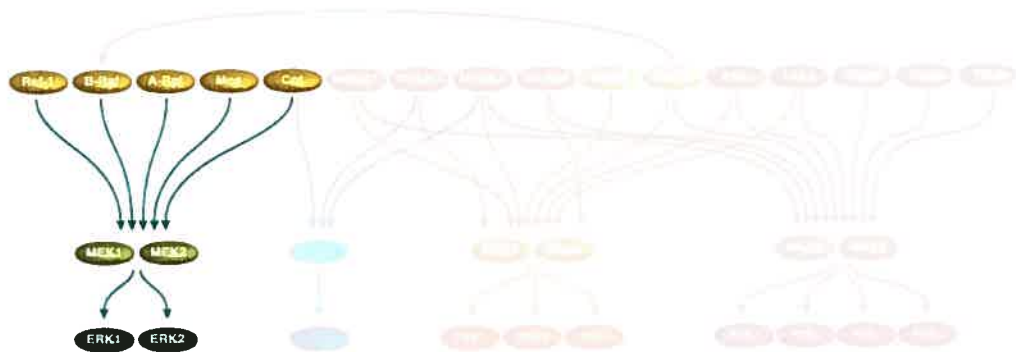


Figure 1-16 MAPKKK, MAPKK et MAP kinases de la voie ERK1/2

Il n'en demeure pas moins que Raf joue un rôle crucial dans la croissance et la prolifération. L'inactivation génique (*knockout*) de B-Raf (Wojnowski et al, 1997) ou de Raf-1 (Huser et al, 2001) conduit à une mort embryonnaire attribuable à des problèmes de vascularisation (Tableau 1-V, page 43). Les membres de la famille Raf sont impliqués dans l'oncogenèse (Baccarini, 2005; Rapp et al, 2006; Schreck & Rapp, 2006; Sridhar et al, 2005; Thomas, 2006). Par exemple, le gène de B-Raf est muté dans 7% des cancers (Wellbrock et al, 2004) et dans 60% des mélanomes malins (Wallace et al, 2005). Raf devient conséquemment une cible thérapeutique de choix (Smith et al, 2006) et le

Sorafenib, un inhibiteur de son activité kinase (Wilhelm et al, 2004) est actuellement approuvé pour usage clinique en Amérique du nord dans le traitement de carcinomes rénaux (Samlowski & Vogelzang, 2007).

Tableau 1-V Inactivation génique des composantes de la voie ERK1/2

Rôle	Nom	Alias	Viable	Phénotype d'inactivation génique	Réfs
MAPKKK	A-Raf		Oui	Défauts neurologiques et intestinaux	[1]
	B-Raf		Non	Défauts de formation des vaisseaux sanguins	[2]
	Raf-1	C-Raf	Non	Réduction du nombre de vaisseaux sanguins	[3]
MAPKK	MEK1	MKK1	Non	Défauts placentaires	[4]
	MEK2	MKK2	Oui	Viable et fertile	[5]
MAP kinase	ERK1	p44 ^{MAPK}	Oui	Viable et fertile; résistance à l'induction de tumeurs de la peau	[6, 7]
	ERK2	p42 ^{MAPK}	Non	Mort embryonnaire précoce et sévères défauts placentaires	[8-10]
Régulateur	RKIP		Oui	Olfaction et reproduction déficientes	[11, 12]

Références (Réfs) : [1] (Pritchard et al, 1996); [2] (Wojnowski et al, 1997); [3] (Huser et al, 2001); [4] (Giroux et al, 1999); [5] (Belanger et al, 2003); [6] (Pages et al, 1999); [7] (Bourcier et al, 2006); [8] (Saba-El-Leil et al, 2003); [9] (Yao et al, 2003); [10] (Hatano et al, 2003); [11] (Theroux et al, 2007); [12] (Moffit et al, 2007).

1.4.1.1.1 RKIP

Raf kinase inhibitor protein (RKIP), un régulateur négatif de Raf pourrait également constituer une cible thérapeutique alternative (Keller et al, 2004; Trakul & Rosner, 2005). Localisée à la membrane et dans le cytoplasme (Simister et al, 2002), RKIP dissocie Raf de MEK1/2 en liant l'une ou l'autre des kinases (Yeung et al, 2000; Yeung et al, 1999). Cependant, cette inhibition peut être levée par la PKC dans une boucle de rétroaction (Section 1.5.3.4.2, page 128). De plus, RKIP régule négativement la signalisation en aval des RCPG (Lorenz et al, 2003) ainsi que la voie *Nuclear Factor κB* (NFκB); (Yeung et al, 2001). L'expression de RKIP diminue dans les métastases prostatiques (Fu et al, 2003). En outre, RKIP inhibe l'angiogenèse et l'activité invasive des cellules en plus de favoriser leur

apoptose (Chatterjee et al, 2004; Fu et al, 2003). L'inactivation génique de RKIP engendre des défauts d'olfaction (Theroux et al, 2007) et de reproduction (Moffit et al, 2007); (Tableau 1-V).

1.4.1.2 MEK1 et MEK2

Les MAPKK MEK1 et MEK2 (MEK1/2) possèdent une masse moléculaire d'environ 45 kDa et sont identiques à 79%, les différences résidant dans la partie N-terminale et dans une région située entre les sous-domaines IX et X (Brott et al, 1993; Ohren et al, 2004; Zheng & Guan, 1993a). Conséquemment, les deux protéines ont des propriétés biochimiques, dont l'activité kinase à l'endroit des substrats ERK1 et ERK2, très similaires (Brott et al, 1993; Catling et al, 1995; Moriguchi et al, 1995; Zheng & Guan, 1993b). Ainsi, elles sont souvent considérées comme équivalentes.

De plus, MEK1/2 et Raf ont plusieurs points en commun. En effet, à l'instar de Raf, l'activation constitutive de MEK1/2 leur confère des propriétés oncogéniques (Brunet et al, 1994; Cowley et al, 1994; Mansour et al, 1994). De même, l'expression d'un allèle constitutivement actif de MEK1 dans le cœur (Bueno et al, 2000), l'œil (Gong et al, 2001), les chondrocytes (Murakami et al, 2004) ou encore la peau (Haase et al, 2001; Hobbs et al, 2004; Scholl et al, 2004) engendre une hyperplasie ou une hypertrophie. Les cellules de ces tissus sont plus nombreuses, parfois plus volumineuses avec des retards de différenciation et des défauts d'apoptose. Bref, l'expression d'une forme active de MEK1 génère des phénotypes équivalents, bien que moins sévères, à ceux engendrés par l'expression d'une forme active de Ras ou de Raf, suggérant que MEK1 est leur principal effecteur (Scholl et al, 2005). De plus, l'inactivation génique de MEK1 (Giroux et al, 1999) engendre des effets similaires à ceux provoqués par l'inactivation de B-Raf et Raf-1 (Tableau 1-V, page 43).

Par contre, les souris dépourvues de MEK2 sont viables et fertiles (Belanger et al, 2003), suggérant qu'il existe des différences entre MEK1 et MEK2. Ces différences se retrouvent notamment au niveau de leur profil d'expression dans certains tissus (Alessandrini et al, 1997; Brott et al, 1993; Moriguchi et al, 1995; Xu et al, 1997) et de leur

activation par des facteurs en amont (Wu et al, 1996; Xu et al, 1997). Dans un exemple plus récent, une stimulation à l'EGF augmente la liaison de MEK1 à la protéine d'échafaudage *IQ domain-containing GTPase-activating protein 1* (IQGAP1), tandis qu'elle réduit celle de MEK2 (Roy et al, 2005). En outre, dans des modèles d'expression épidermique seule MEK1 a eu pour effet d'augmenter la prolifération cellulaire (Scholl et al, 2004). De manière complémentaire, l'inactivation de MEK1 par ARN simple brin (siRNA) réduit la prolifération cellulaire alors que celle de MEK2 l'augmente (Ussar & Voss, 2004). Ces résultats suggèrent donc que MEK1 et MEK2 ont des propriétés distinctes.

Près du tiers de tous les cancers présentent une ou plusieurs mutations activatrices de Ras et/ou Raf (Hoshino et al, 1999; Scholl et al, 2005; Wallace et al, 2005). Ainsi, plusieurs inhibiteurs pharmacologiques de MEK1/2 ont été développés dont trois sont actuellement en phase d'essais cliniques et semblent particulièrement efficaces auprès des tumeurs solides ou en combinaison avec d'autres agents anticancéreux (Kohno & Pouyssegur, 2006; Messersmith et al, 2006; Sebolt-Leopold, 2004; Wallace et al, 2005; Wang et al).

1.4.1.3 ERK1 et ERK2

Aussi connues sous le nom de p42^{MAPK} et p44^{MAPK} à cause de leurs masses moléculaires respectives, les MAP kinases ERK1 et ERK2 (ERK1/2) sont les effecteurs de la cascade. Bien qu'elles soient capables de s'autophosphoryler *in vitro* (Her et al, 1993; Robbins & Cobb, 1992; Rossomando et al, 1992; Wu et al, 1991), ERK1 et ERK2 ont pour seuls activateurs *in vivo*, MEK1 et MEK2 qui phosphorylent leur boucle d'activation sur les résidus thréonine et tyrosine de leur motif TEY (Ahn et al, 1992b; Crews et al, 1992; Haystead et al, 1992; Seger et al, 1992b; Tobe et al, 1992).

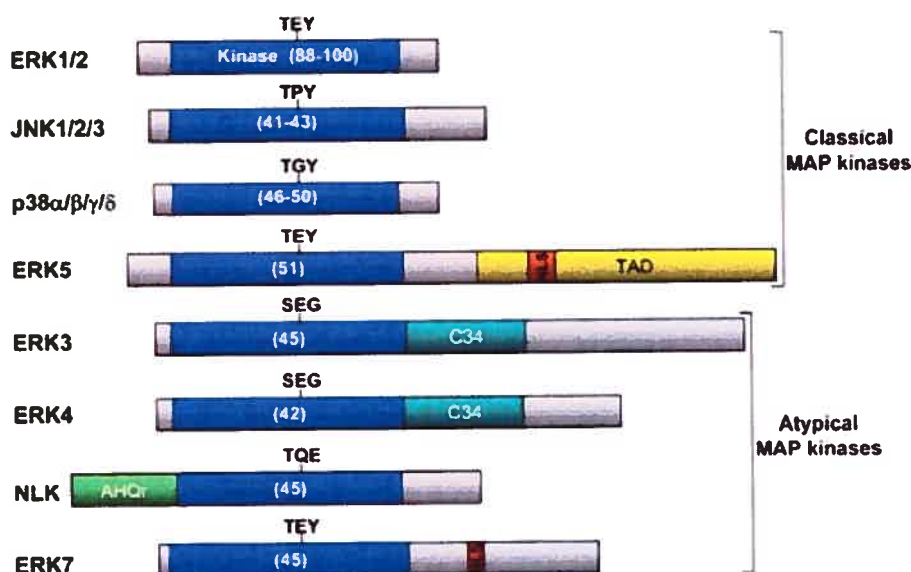


Figure 1-17 Structure comparative des MAP kinases

Schéma des MAP kinases humaines classiques et atypiques avec leur motif TXY. Les domaines kinase sont en bleu et les parenthèses indiquent les pourcentages d'identité de ceux-ci avec le domaine kinase de ERK1. TAD, domaine de transactivation; C34 région conservée entre ERK3 et ERK4; AHQr, domaine riche en résidus alanine, histidine et glutamine.

Tiré de (Coulombe & Meloche, 2006)

Essentielles à la croissance (Pages et al, 1993), ERK1/2 phosphorylent de nombreux substrats. Ces derniers incluent des régulateurs des voies de signalisation (Imajo et al, 2006; Kondoh & Nishida, ; Kyriakis, ; Yoon & Seger, 2006), du cytosquelette (Huang et al, 2004a; Wong & Cheng, 2005), du cycle cellulaire (Chambard et al, ; Shapiro, 2002; Torii et al, 2006; Zhang & Liu, 2002), de la transcription (Whitmarsh, ; Yang et al, 2003a), de la traduction (Mahalingam & Cooper, 2001; Roux & Blenis, 2004; Wullschleger et al, 2006), ainsi que des modificateurs de l'ADN (Edmunds & Mahadevan, 2004; Yang & Sharrocks, 2006); (Tableau 1-VI), le tout étant contrôlé de manière spatio-temporelle très stricte

(Ebisuya et al, 2005; Murphy & Blenis, 2006; O'Neill & Kolch, 2004; Pouyssegur & Lenormand, 2003).

Tableau 1-VI Substrats des MAP kinases ERK1 et ERK2

Regroupement sommaire des 161 substrats de ERK1 et ERK2 répertoriés avec les effets découlant de leur phosphorylation. Voir aussi Figure 1-26, page 86.

Substrats répertoriés	Effets généraux
57 Facteurs de transcription	Modification de l'activité transcriptionnelle
8 Kinases en amont	Boucles de rétroaction négatives et positives
19 Kinases en aval/autres voies	Modification de l'activité catalytique
5 Phosphatases	Affecte la demi-vie
24 Protéines de signalisation	Inhibition des voies de signalisation
22 Protéines du cytosquelette	Modification des interactions protéine-protéine
9 Protéines et protéases apoptotiques	Effets anti-apoptotiques
5 Protéines de modification de l'ADN	Favorise la transcription et la synthèse d'ADN
3 Protéines de la traduction	Favorise la traduction
2 Protéines virales	Augmente l'infectivité
7 Autres	Modification des interactions protéine-protéine

Adapté de (Yoon & Seger, 2006).

1.4.1.3.1 Expression

Les différences se situant principalement à l'extérieur du domaine kinase, ERK1 et ERK2 n'en demeurent pas moins identiques à 83% (Boulton & Cobb, 1991; Boulton et al, 1991; Boulton et al, 1990). Elles sont également très similaires dans leurs propriétés biochimiques (Brondello et al, 1999; Dang et al, 1998; Lenormand et al, 1998; Lenormand et al, 1993; Robbins et al, 1993; Seger et al, 1991). De plus, une proportion importante de la littérature fait référence à ERK1 et ERK2 sans distinction, en utilisant l'une, l'autre ou parfois les deux dans les expériences qui y sont décrites. Bien qu'il existe des orthologues jusque chez la levure, les deux isoformes ERK1 et ERK2 sont présentes uniquement chez les vertébrés, à l'exception du poulet (*Gallus gallus*) et de la grenouille (*Xenopus leavis*) où seule ERK2 est retrouvée (Krens et al, 2006a). Chez les mammifères, ERK1 et ERK2 sont exprimées de manière ubiquitaire (Boulton & Cobb, 1991), avec des abondances relatives

qui varient selon les tissus (Pelech, 2006), ERK2 étant plus abondante que ERK1, sauf dans le nerf sciatique (Pages & Pouyssegur, 2004).

1.4.1.3.2 *Inactivation génique*

Des expériences d'inactivation génique (, page 43) ont été entreprises afin de déterminer les rôles spécifiques de ERK1 et ERK2, qui semblent pourtant redondants dans bien des fonctions.

1.4.1.3.2.1 ERK1

Les souris chez lesquelles ERK1 a été inactivé sont viables et fertiles (Nekrasova et al, 2005; Pages et al, 1999). Sans pour autant que les niveaux d'expression de la protéine soient affectés, l'activité de ERK2 semble suffisante pour compenser l'absence de ERK1 (Ferguson et al, 2006; Mazzucchelli et al, 2002; Pages et al, 1999; Selcher et al, 2001; Vantaggiato et al, 2006). L'activité de ERK2 en absence de ERK1 est également plus soutenue, possiblement à cause de meilleures interactions avec MEK1/2 (Mazzucchelli et al, 2002; Pages et al, 1999).

Ces souris dépourvues de ERK1 (ERK1^{-/-}) présentent des défauts de maturation et de prolifération des thymocytes (Fischer et al, 2005; Pages et al, 1999). Les kératinocytes isolés de ces souris ont une expression inférieure de gènes associés à la croissance et la migration, ce qui se traduit par une prolifération réduite (Bourcier et al, 2006). Par contre, des souris générées par une autre stratégie et dans un autre fond génétique, ne montrent pas de tels défauts chez les thymocytes (Nekrasova et al, 2005). Il n'en demeure pas moins que ERK1 et ERK2 sont impliquées à différentes étapes de ce processus complexe de différenciation (Daniels et al, 2006; Fischer et al, 2005).

Dans le même ordre d'idées, les souris ERK1^{-/-} sont plus susceptibles de développer des inflammations au niveau du système nerveux central (Nekrasova et al, 2005) et de la peau (Bourcier et al, 2006). Elles sont davantage résistantes au développement de tumeurs cutanées; ces dernières se manifestant plus tardivement, moins

fréquemment et de manière moins importante que chez les souris normales (Bourcier et al, 2006).

Par ailleurs, les souris ERK1^{-/-} ont un métabolisme postprandial accéléré, ce qui les rend plus résistantes à l'obésité et moins susceptibles de développer du diabète (Bost et al, 2005). En outre, l'inactivation génique de ERK1 chez la souris fait décroître leur adiposité et le nombre de leurs adipocytes.

L'activité ERK1/2 joue un rôle crucial dans la mémoire à long terme (Kelly et al, 2003; Sananbenesi et al, 2003) et dans l'apprentissage contextuel (Shalin et al, 2004). ERK1/2 régulent positivement l'initiation de la traduction afin d'augmenter la synthèse protéique requise pour moduler la plasticité synaptique qui permet la consolidation de la mémoire à long terme (Adams & Sweatt, 2002; Kelleher et al, 2004; Sweatt, 2004; Thiels & Klann, 2001). Chez les souris ERK1^{-/-}, la mémoire à long terme est grandement améliorée (Mazzucchelli et al, 2002) sans pour autant que le processus d'acquisition de connaissances ne soit modifié (Selcher et al, 2001). De plus, ces souris démontrent un meilleur apprentissage behavioral que les souris normales (Ferguson et al, 2006; Selcher et al, 2001). Ces effets pourraient être attribuables à une augmentation de l'activité de ERK2 (Mazzucchelli et al, 2002; Vantaggiato et al, 2006).

1.4.1.3.2.2 ERK2

ERK2 est requise très tôt dans le développement embryonnaire et son inactivation génique cause des défauts placentaires létaux (Hatano et al, 2003; Saba-EI-Leil et al, 2003; Yao et al, 2003) évoquant ceux provoqués par l'inactivation génique de MEK1 (Tableau 1-V, page 43). De plus, la perte d'un seul allèle de ERK2 se traduit par une mort embryonnaire (Fischer et al, 2005). Ces données suggèrent que d'importantes différences existent entre ERK2 et ERK1 dont le phénotype d'inactivation génique est moins sévère. Toutefois, ERK1 peut compenser *in vitro* l'absence de ERK2 (Yao et al, 2003), même si sa présence dans les embryons ERK2^{-/-} ne fait pas consensus (Saba-EI-Leil et al, 2003; Yao et al, 2003). Somme toute, des études d'insertion génique de ERK1 au locus de ERK2

permettront de déterminer si ces protéines possèdent des propriétés bien distinctes, ainsi que leur niveau de redondance.

1.4.1.3.2.3 ERK1 et ERK2

L'inactivation par siRNA de ERK2 (Vantaggiato et al, 2006) ou de ERK1 et ERK2 simultanément (Marzec et al, 2006) inhibe considérablement la prolifération cellulaire. En revanche, l'inactivation de ERK1 augmente l'apoptose (Marzec et al, 2006). De plus, l'inactivation de ERK2, mais pas de ERK1, par siRNA est suffisante pour bloquer la transformation cellulaire induite par Ras (Vantaggiato et al, 2006).

Pourtant, l'inactivation ciblée de ERK2 dans le thymus de souris normales ou ERK1^{-/-} révèle que ces deux isoformes de MAP kinase sont requises pour la maturation des thymocytes (Fischer et al, 2005). De plus, ERK1 et ERK2 sont toutes deux capables d'induire le facteur de transcription *Early growth response 1* (Egr1), et ce de manière dépendante de la quantité totale de ERK1/2 présente dans la cellule.

1.4.1.3.3 Initiation du cycle cellulaire

L'action de ERK1/2 sur la croissance et la prolifération s'exerce de bien des manières, notamment au niveau de l'entrée dans le cycle cellulaire (Meloche & Pouyssegur, 2007). Dans un premier temps, leur activation soutenue induit l'expression de la cycline D1 (Daksis et al, 1994; Lavoie et al, 1996a; Weber et al, 1997) ainsi que d'autres gènes précoces dont c-Fos (Chen et al, 1992; Gille et al, 1992; Nori et al, 1992) qui sont eux aussi associés aux premiers événements de l'entrée dans le cycle cellulaire. Nonobstant leur action favorisant l'expression de gènes reliés à la croissance et la prolifération, ERK1/2 exercent une régulation négative sur un ensemble de gènes antiprolifératifs (Yamamoto et al, 2006), ce qui favorise encore davantage l'entrée en phase S. En parallèle, l'activité ERK1/2 augmente la synthèse de ribosomes (Stefanovsky et al, 2006a; Stefanovsky et al, 2006b) et de pyrimidines (Graves et al, 2000), permettant d'obtenir les protéines et les nucléotides requis au moment de la réplication de l'ADN et de la division cellulaire.

1.4.1.3.4 MK

Les *MAP kinase-activated protein* (MAPKAP) *kinases* (MK) constituent un chaînon entre ERK1/2 et la voie d'initiation de la traduction, et donc de la synthèse protéique (Ueda et al, 2004; Waskiewicz et al, 1999). ERK1/2 phosphorylent et activent plusieurs membres de cette famille de kinases, qui comprend les branches *Ribosomal S6 kinase* (RSK) et *Mitogen- and stress-activated protein kinase* (MSK), la seconde étant également activée par les MAP kinases de la sous-famille p38 (Gaestel, 2006; Hauge & Frodin, 2006; Roux & Blenis, 2004). Absente des levures et des plantes, l'expression des MK est néanmoins ubiquiste chez les mammifères. Les MK phosphorylent également des facteurs de transcription ainsi que l'histone H3 (Soloaga et al, 2003). Leur position comme substrats des MAP kinases ERK1/2 et p38 leur confère un rôle dans le croissance et l'inflammation, ce qui est corroboré par des expériences d'inactivation génique (Dufresne et al, 2001; Kotlyarov et al, 1999; Lehner et al, 2002; Leighton et al, 1995; Shi et al, 2003).

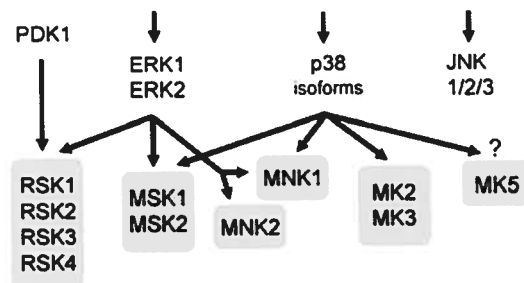


Figure 1-18 Activation des MK par les voies ERK1/2 et p38

Tiré de (Roux & Blenis, 2004)

1.4.1.3.5 ERK1b, ERK1c, Golgi et mitose

L'épissage alternatif de ERK1 permet de générer ERK1b (Yung et al, 2000) et ERK1c (Aebersold et al, 2004) des protéines de 46 et 42 kDa, respectivement. Celles-ci

sont déficientes dans leurs interactions avec MEK1 et des phosphatases de sorte qu'elles sont activées plus lentement, mais également désactivées plus lentement (Aebersold et al, 2004; Yung et al, 2001; Yung et al, 2000). Contrairement à ERK1 et ERK2 qui transitent du cytoplasme vers le noyau lors de leur activation, ERK1b est constitutivement nucléaire (Yung et al, 2000), et ERK1c se voit ciblée au protéasome suivant sa mono-ubiquitination (Aebersold et al, 2004). En outre, bien que les cellules ERK1^{-/-} prolifèrent normalement, ERK1c semble à la fois nécessaire et suffisante pour la fragmentation de l'appareil de Golgi (Aebersold et al, 2004; Shaul & Seger, 2006). Ce processus a normalement cours lors de la mitose (Colanzi et al, 2003a) et requiert l'activité de MEK1 mais pas celle de ERK1 ni ERK2 (Acharya et al, 1998; Colanzi et al, 2000; Colanzi et al, 2003b). Curieusement, une forme de ERK2 dont la thréonine activatrice est déphosphorylée (mais la tyrosine activatrice demeure phosphorylée) est ciblée au Golgi lors l'initiation de la mitose (Cha & Shapiro, 2001; Hancock et al, 2005a)

Pourtant, ERK1 et ERK2 sont actives au moment de la phase G₂/M de la mitose (Tamemoto et al, 1992; Wang et al, 2007b). Concomitamment, l'inhibition de leur activité (Shinohara et al, 2006) ou de celle de MEK1/2 (Dangi et al, 2006; Roberts et al, 2002; Wright et al, 1999) retarde cette transition. Ces données suggèrent un rôle pour ERK1/2 dans la mitose, bien que celui-ci demeure encore mal défini.

1.4.1.3.6 Rôle physiopathologique de ERK1/2

Dans bien des pathologies, la croissance et la division cellulaire se dérèglent de façon parfois aberrante. Essentielle à ces processus, la voie ERK1/2 pourrait constituer une cible de choix pour pallier à ces dérèglements. Par exemple, ERK1/2 favorisent la croissance et inhibent l'apoptose dans les cardiomyocytes. Cette combinaison d'effets peut engendrer une hypertrophie cardiaque combinée à une fibrose lorsque la voie ERK1/2 est activée de manière forte et soutenue (Bishopric et al, 2001; Mehta & Griendling, 2007).

1.4.1.3.6.1 Cancer

Les MAP kinases ERK1/2 ont de nombreux substrats impliqués dans la croissance, le cycle cellulaire, ainsi que la motilité, et sont impliquées directement dans la prolifération et l'angiogenèse, deux processus qui se dérèglent dans l'établissement et la progression du cancer (Berra et al, 2000; McCubrey et al, ; Pages et al, 2000; Reddy et al, 2003). ERK1/2 ont aussi pour substrat, la protéine p53 dont le gène est le plus fréquemment muté dans les cancers (Wu, 2004). Réciproquement, p53 affecte la transcription de plusieurs régulateurs de la voie ERK1/2. Cette voie est suractivée dans 30% des cancers, ce chiffre grimant à 90 % pour le cancer du pancréas (Smalley, 2003). La voie ERK1/2 est en outre associée à de nombreux types de cancers dont ceux de la peau (Smalley, 2003), du sein (Santen et al, 2002), de la thyroïde (Williams & Smalridge, 2004), et du colon (Avizienyte et al, 2005). Cette activation constitutive pourrait être la cause de la résistance de certains cancers aux agents chimiothérapeutiques (Smalley, 2003; Wang et al).

La voie ERK1/2 a été ciblée au niveau de MEK1/2 et Raf pour le développement d'agents anti-cancéreux, ERK1/2 constituant de moins bons candidats puisque leur site de liaison de l'ATP qui est la cible des inhibiteurs de kinases, est similaire à celui de bien d'autres protéines, en particulier les CDK (Chambard et al, ; Sebolt-Leopold, 2004; Wang et al). De plus, une seule mutation activatrice de ERK2 a été détectée *in vivo* (Arvind et al, 2005), alors que plusieurs ont été identifiées chez B-Raf (Rapp et al, 2006; Schreck & Rapp, 2006; Thomas, 2006). Néanmoins, ERK1/2 sont régulés à de multiples niveaux (section 1.5.3, page 93), ce qui permet de présager le développement de nouveaux types d'inhibiteurs affectant leur activité en totalité ou en partie. Il n'en demeure pas moins que les inhibiteurs de Raf et ceux non compétitifs de MEK1/2 obtiennent actuellement des résultats probants pour le traitement de carcinomes rénaux, de mélanomes et de leucémies infantiles (Flotho et al, 2007; Samlowski & Vogelzang, 2007; Wang et al, 2007a).

1.4.1.3.6.2 Système nerveux

La plasticité synaptique, dont ERK1/2 sont d'importants médiateurs, est impliquée dans l'hypersensibilité à la douleur (Obata & Noguchi, 2004). Dans certains modèles animaux de douleur inflammatoire, des inhibiteurs de MEK1/2 ont été testés avec succès (Ji, 2004a; Ji, 2004b; Ma & Quirion, 2005). En outre, ERK1 est impliquée dans la mémoire à long terme et l'apprentissage contextuel (Davis & Laroche, 2006), comme c'est le cas avec la dépendance à la cocaïne (Ferguson et al, 2006; Lu et al, 2006) et à l'alcool (Aroor & Shukla, 2004). Parallèlement, l'expression et l'activation de ERK1/2 est réduite dans le cerveau de sujets dépressifs qui ont eux-mêmes attenté à leurs jours (Dwivedi et al, 2006; Dwivedi et al, 2001; Qi et al, 2006).

En outre, cette fonction de ERK1/2 dans la croissance, la survie et la plasticité des neurones permet de les relier à des désordres comme la schizophrénie (Kyosseva, 2004b). De plus, cette voie est activée par l'insuline et le cholestérol, et une activation chronique peut engendrer des maladies neurodégénératives telles que la maladie d'Alzheimer (Colucci-D'Amato et al, 2003; Nelson & Alkon, 2005).

Inversement, l'activation de la voie ERK1/2 pourrait contribuer non pas au développement, mais au traitement de désordres bipolaires. Par exemple, le lithium et le valproate utilisés pour traiter certains comportements maniaques activent significativement cette voie (Einat et al, 2003).

1.4.2 Voie JNK

La voie MAP kinase JNK est principalement activée par les cytokines et les stress cellulaires comme un choc osmotique, un stress oxydatif ou des radiations, de sorte que les MAP kinases JNK furent initialement nommées *Stress-activated protein kinases* (SAPK) (Davis, 2000; Weston & Davis, 2002). Les facteurs de transcription de la famille AP-1 figurent parmi les cibles les plus importantes des JNK (Karin & Gallagher, 2005). Ceux-ci sont des hétérodimères formés de Fos, Maf, ATF et/ou de membres de la famille Jun

(c-Jun, JunB, JunD); (Ozanne et al, 2007; Shaulian & Karin, 2001). Les facteurs AP-1 relient l'activation de la voie JNK à l'induction de plusieurs gènes cibles impliqués dans la prolifération, l'apoptose, l'inflammation et la réparation de l'ADN (Karin & Gallagher, 2005).

Ainsi, la voie JNK est impliquée dans la croissance, le développement du système nerveux, ainsi que dans la réponse aux cytokines et à l'insuline (Karin & Gallagher, 2005; Weston & Davis, 2007). Elle représente conséquemment une cible de choix en vue du traitement de la maladie de Parkinson (Kuan & Burke, 2005), de l'inflammation (Jaeschke et al, 2005), du diabète (Bennett et al, 2003), du cancer (Heasley & Han, 2006; Kennedy & Davis, 2003) et de nombreuses autres pathologies (Karin & Gallagher, 2005; Manning & Davis, 2003).

1.4.2.1 MAPKKK de la voie JNK

Plusieurs MAPKKK activent la voie JNK à divers degrés d'intensité. Bien que cette spécificité semble liée à la nature du stimulus activateur, elle reste pourtant très cryptique (Weston & Davis, 2007). Il n'en demeure pas moins que MEKK1 est le premier activateur identifié de la voie JNK (Minden et al, 1994) et le plus puissant (Karin & Gallagher, 2005). Par la suite, plusieurs autres MAPKKK de cette voie ont été découvertes : MEKK2 et MEKK3 (Blank et al, 1996), MEKK4 (Gerwins et al, 1997), *Mixed-lineage kinase 2* (MLK2) et MLK3 (Hirai et al, 1996; Tibbles et al, 1996), *Apoptosis signal-regulating kinase 1* (ASK1) et ASK2 (Ichijo et al, 1997; Wang et al, 1998a) et *TGF- β -activated kinase 1* (TAK1) (Yamaguchi et al, 1995). De plus, d'autres protéines comme *Dual leucine zipper-bearing kinase* (DLK) (Fan et al, 1996) ainsi que *Thousand and one amino acid kinase 1* (TAO1) et TAO2 (Chen et al, 1999; Hutchison et al, 1998) peuvent aussi activer cette voie, mais à un degré moindre.

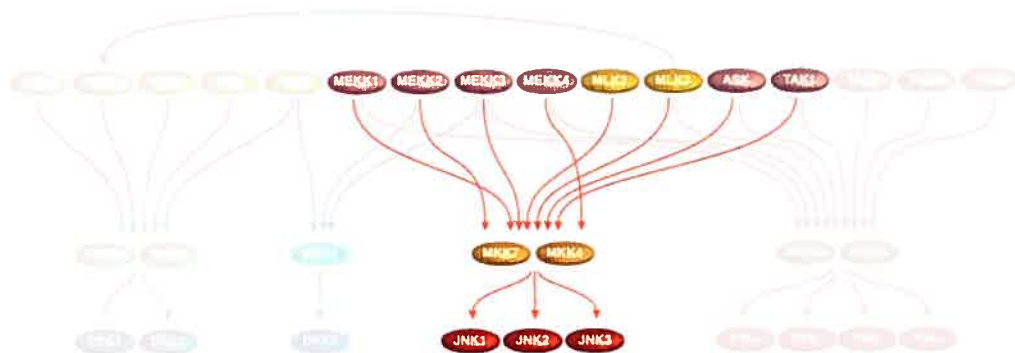


Figure 1-19 MAPKKK, MAPKK et MAP kinases de la voie JNK

Comme elles sont nombreuses, l'inactivation génique de ces différentes MAPKKK n'a pas permis l'identification de l'une d'entre elles comme étant essentielle à la voie JNK. En effet, l'absence de MEKK1 ou d'autres MAPKKK (Tableau 1-VII) n'empêche pas l'activation de la voie JNK par des stress comme les rayons ultraviolets (UV). Ces données suggèrent que plusieurs MAPKKK sont activées par un même stress, ou encore que la MAPKKK critique à la voie JNK n'a pas encore été inactivée (Karin & Gallagher, 2005; Wang et al).

En outre, certaines MAPKKK ont des fonction de protéine d'échafaudage (Section 1.5.3.2.1, page 101) qui permettent une activation spécifique et rapide de certaines composantes de la voie JNK. En effet, dans leurs assemblages respectifs de la cascade enzymatique, MEKK1 lie préférentiellement la MAPKK MKK4 (Xia et al, 1998), alors que son homologue MEKK2 s'associe préférentiellement à la MAPKK MKK7 (Cheng et al, 2000), assurant alors un relais et un aiguillage spécifique de certains signaux.

Tableau 1-VII Inactivation génique des composantes de la voie JNK

Rôle	Nom	Alias	Viable	Phénotype d'inactivation génique	Réfs
<i>MAPKKK</i>	MEKK1		Non	Défauts d'érythropoïèse	[12]
	MEKK3		Non	Réduction du nombre de vaisseaux sanguins	[13]
	MEKK4	MTK1	Non	Défauts de formation du tube neural	[14]
	ASK1	MAPKKK5	Oui	Défauts d'apoptose et de remodelage cardiaque	[15,16]
<i>MAPKK</i>	MKK4	SEK1, JNKK1	Non	Défauts d'hépatogenèse	[17,18]
	MKK7	SEK2, JNKK2	Non	Défauts d'hépatogenèse	[19]
	MKK4, MKK7		Non	Défauts d'apoptose	[20]
<i>MAP kinase</i>	JNK1	SAPK γ , SAPK1c	Oui	Diminution de la résistance à l'insuline	[21-24]
	JNK2	SAPK α , SAPK1a	Oui	Baisse de la résistance à l'insuline; défauts de maturation des thymocytes	[25-29]
	JNK1, JNK2		Non	Défauts d'apoptose, défauts neurologiques	[30-32]
	JNK3	SAPK β , SAPK1b	Oui	Protection contre l'hypoxie et l'ischémie cérébrale	[33]
<i>Échafaudage</i>	JIP1		Oui	Baisse de signalisation JNK et diminution de la résistance à l'insuline	[34-37]

Références : [12] (Bonnesen et al, 2005); [13] (Yang et al, 2000); [14] (Chi et al, 2005); [15] (Yamaguchi et al, 2003); [16] (Tobiume et al, 2001); [17] (Ganiatsas et al, 1998); [18] (Nishina et al, 1999); [19] (Wada et al, 2004); [20] (Tournier et al, 2001); [21] (Tuncman et al, 2006); [22] (Hirosumi et al, 2002); [23] (Dong et al, 1998); [24] (Sabapathy et al, 2001); [25] (Jaeschke et al, 2005); [26] (Jaeschke et al, 2006); [27] (Tuncman et al, 2006); [28] (Sabapathy et al, 1999a); [29] (Yang et al, 1998b); [30] (Tournier et al, 2000); [31] (Kuan et al, 1999); [32] (Sabapathy et al, 1999b); [33] (Kuan et al, 2003); [34] (Whitmarsh et al, 2001); [35] (Im et al, 2003); [36] (Kim et al, 2005b); [37] (Jaeschke et al, 2004).

1.4.2.2 MKK4 et MKK7

Elles aussi impliquées dans les réponses aux stress cellulaires, les MAPKK MKK4 et MKK7 furent respectivement connues d'abord sous l'appellation *SAPK or ERK kinase 1* (SEK1) et SEK2 ou encore *JNK kinase 1* (JNKK1) et JNKK2, pour leur capacité à phosphoryler le motif TPY des JNK (Davis, 2000; Karin & Gallagher, 2005; Wang et al, ; Wang et al, 2007c); (Figure 1-17, page 46). Par ailleurs, MKK4 phosphoryle préférentiellement la tyrosine de ce motif alors que MKK7 préfère la thréonine (Lawler et al, 1998; Lisnock et al, 2000). Contrairement à MKK7, MKK4 peut également

phosphoryler le motif TGY des MAP kinases de la sous-famille p38 en conditions de surexpression (Derijard et al, 1995; Sanchez et al, 1994 ; Tournier et al, 1997 ; Wu et al, 1997 ; Yao et al, 1997).

L'expression de MKK4 et MKK7 est ubiquitaire chez la souris adulte (Wang et al, 2007c) et l'inactivation génique de l'une ou de l'autre engendre de sévères problèmes d'anémie et d'hépatogénèse aux conséquences létales (Ganiatsas et al, 1998 ; Nishina et al, 1999 ; Wada et al, 2004). De plus, ces expériences d'inactivation génique (Tableau 1-VII, page 57) ont permis de confirmer que MKK4 et MKK7 ne sont pas entièrement redondantes, *in vivo* (Dong et al, 2000 ; Ganiatsas et al, 1998 ; Nishina et al, 1997 ; Wada et al, 2004; Yang et al, 1997a).

Les défauts d'hépatogénèse observés chez les embryons dépourvus de MKK4 sont attribuables à une augmentation significative des niveaux d'apoptose (Ganiatsas et al, 1998; Nishina et al, 1997 ; Watanabe et al, 2002). Parallèlement, on observe des mutations de MKK4 dans environ 5% des tumeurs (Wang et al, ; Wang et al, 2007c; Weston & Davis, 2007). Certaines de ces mutations ont pour effet de rendre les cellules réfractaires à l'apoptose induite par des stress extracellulaires, facilitant du coup la colonisation métastatique (Wang et al, 2007c). Inversement, d'autres mutations accentuent les effets prolifératifs de la voie JNK (Weston & Davis, 2007), comme en témoigne la forte activité JNK de plusieurs lignées cancéreuses (Kennedy 2003). Bref, selon le contexte, la voie JNK est impliquée dans l'oncogénèse par inhibition de ses propriétés pro-apoptotiques ou par suractivation de ses effets prolifératifs. La voie JNK constitue également une cible anticancéreuse car des inhibiteurs pharmacologiques bloquent l'induction de gènes de réparation suite à un traitement avec des agents qui endommagent l'ADN (Gjerset et al, 2001; Potapova et al, 2001; Yang et al, 2003b). Ces inhibiteurs pourraient ainsi compléter certaines chimiothérapies.

1.4.2.3 JNK1, JNK2 et JNK3

Les JNK doivent leur nom à la capacité qu'elles ont de phosphoryler le facteur de transcription c-Jun dans sa partie N-terminale afin de l'activer (Davis, 2000). En revanche, ERK1/2 phosphorylent c-Jun dans sa partie C-terminale ce qui a un effet inhibiteur sur son activité transcriptionnelle. JNK1, JNK2 et JNK3 sont sujettes à des épissages alternatifs qui peuvent générer en tout 10 isoformes (Gupta et al, 1996). Ces variantes possèdent des affinités propres pour les différents substrats et régulateurs (Davis, 2000).

Alors que l'expression de JNK1 et JNK2 est ubiquitaire, celle de JNK3 est restreinte au cerveau, au cœur, et aux testicules (Karin & Gallagher, 2005). Cette dernière est toutefois dispensable pour le développement du système nerveux central (Yang et al, 1997b); (Tableau 1-VII, page 57). Par contre, les souris chez lesquelles le gène de JNK3 a été inactivé sont davantage résistantes à l'ischémie cérébrales en comparaison avec des souris JNK1^{-/-} ou JNK2^{-/-} (Haydar et al, 1999). Néanmoins, bien que les souris dépourvues de JNK1 (Dong et al, 1998; Hirosumi et al, 2002 ; Sabapathy et al, 2001; Tuncman et al, 2006), JNK2 (Jaeschke et al, 2006; Sabapathy et al, 1999a; Tuncman et al, 2006 ; Yang et al, 1998b) ou JNK3 (Kuan et al, 2003) soient viables, l'inactivation génique combinée de JNK1 et JNK2 engendre des défauts de formation du tube neural aux conséquences létales (Kuan et al, 1999).

Par ailleurs, JNK1 semble l'isoforme activée de manière prédominante, du moins lors de l'activation des lymphocytes T (Conze et al, 2002), ou de l'ingestion d'une diète riche en lipides (Yang et al, 1997b). De manière concomitante, des souris JNK1^{-/-} accumulent moins de graisses que les souris JNK2^{-/-} et les souris de type sauvage (Hirosumi et al, 2002). La complémentarité et la redondance entre JNK1 et JNK2 est abordée plus en profondeur dans la section 1.5.1.2, page 76.

1.4.2.4 JIP

Plusieurs protéines d'échafaudage (Section 1.5.3.2.1, page 101) permettant d'assembler une cascade JNK et favorisant son activation ont été recensées. Parmi celles-ci, on retrouve β -arrestine-2 (McDonald et al, 2000), CRK2 (Girardin & Yaniv, 2001), Filamine (Marti et al, 1997), *I κ B kinase complex-associated protein* (IKAP); (Holmberg et al, 2002a ; Whitmarsh et al, 1998), *JNK-interacting protein 1* (JIP1); (Whitmarsh et al, 1998), JIP2 (Negri et al, 2000), JIP3 (Ito et al, 1999; Kelkar et al, 2000), ainsi que JIP4 (Kelkar et al, 2005; Lee et al, 2002) aussi appelée *JNK-associated leucine zipper protein* (JLP). Le rôle des membres de la famille JIP au sein de la voie JNK devient de plus en plus clair avec des implications dans le développement du cerveau, l'apoptose et la réponse à l'insuline (Whitmarsh, 2006b).

En outre, plusieurs observations relient JIP1 au développement du diabète. En effet, on rapporte chez plusieurs patients atteints d'une forme génétique de diabète de type II des mutations dans le gène encodant JIP1 (Waeber et al, 2000). De plus, les souris JIP1^{-/-}, tout comme les JNK1^{-/-}, sont réfractaires au développement de la résistance à l'insuline induite par une diète riche en lipides (Jaeschke et al, 2004). Effectivement, une telle diète nuit à l'action de l'insuline en rendant l'organisme résistant aux signaux qu'elle déclenche. La voie JNK est impliquée dans cette condition de résistance (Dong et al, 2000) qui, si elle est maintenue, peut dégénérer en diabète de type II (Hotamisligil, 2003). De plus, les JNK sont activées chez des souris obèses (Hirosumi et al, 2002). Ceci cause de la résistance à l'insuline (White, 2003) puisque les JNK phosphorylent *Insulin receptor substrate-1* (IRS-1) sur une sérine inhibitrice (Aguirre et al, 2000; Lee et al, 2003), découplant alors cette protéine du récepteur de l'insuline en amont. Toutefois, il demeure possible que IRS-1 ne soit pas la seule cible des JNK dans la résistance à l'insuline et le développement du diabète (Weston & Davis, 2007).

1.4.3 Voie p38

La voie MAP kinase p38 constitue un relais de prédilection pour les signaux de stress et d'inflammation (Ashwell, 2006; Zarubin & Han, 2005). En effet, celle-ci est activée par les rayons UV, des chocs thermiques ou osmotiques, ainsi que par des facteurs de croissances et plusieurs cytokines inflammatoires (Foltz et al, 1997; Freshney et al, 1994; Han et al, 1994; Lee et al, 1994; Pietersma et al, 1997; Raingeaud et al, 1995; Rouse et al, 1994; Shalom-Barak et al, 1998; Shapiro et al, 1998a). De plus, l'activation de la voie p38 est elle-même essentielle à la production de cytokines pro-inflammatoires (Guan et al, 1998), d'enzymes antioxydants (Craxton et al, 1998; Da Silva et al, 1997), de protéines du remodelage tissulaire (Badger et al, 1998; Pietersma et al, 1997) et de nombreuses autres molécules de l'inflammation (Pietersma et al, 1997). Enfin, la voie p38 est impliquée dans la prolifération et la différenciation des cellules du système immunitaire (Kummer et al, 1997; Lee et al, 1994).

1.4.3.1 Composantes de la voie p38

Souvent activée par les mêmes stimuli, la voie p38 partage plusieurs MAPKKK importantes avec la voie JNK (Zarubin & Han, 2005). Celles-ci incluent TAK1, ASK1, DLK, MEKK1, MEKK3, MEKK4, MLK1, MLK2 et MLK3 (Cuenda & Dorow, 1998; Hirai et al, 1997; Ichijo et al, 1997; Moriguchi et al, 1996; Takekawa et al, 1997; Tibbles et al, 1996; Ubeda et al, 1996), dont la surexpression active la voie p38 et la voie JNK avec des efficacités variables.

Les MAPKK MKK3 et MKK6 sont identiques à 80%. L'inactivation génique de l'une ou de l'autre engendre des défauts immunologiques qui n'affectent pas la viabilité ni la fertilité des souris (Lu et al, 1999; Tanaka et al, 2002; Wysk et al, 1999); (Tableau 1-IX, page 64). En revanche, la double inactivation de MKK3 et MKK6 engendre une létalité découlant de sévères défauts de vascularisation (Brancho et al, 2003; Kang et al, 2006). Tandis que MKK6 active efficacement les quatre isoformes de p38,

MKK3 est incapable d'activer p38 β (Parker et al, 1998). Par ailleurs, la MAPKK MKK4, activée dans la voie JNK peut conduire à l'activation de p38 α et p38 δ dans certaines conditions cellulaires (Jiang et al, 1997). MKK4 contribue à l'activation des MAP kinases p38 par les rayons UV, mais MKK3 et MKK6 seuls relayent l'activation de p38 par le *Tumor necrosis factor α* (TNF α); (Brancho et al, 2003). En somme, MKK3 et MKK6 exercent chacun une spécificité malgré leur action largement redondante, et elles sont considérées comme les principales MAPKK de la voie p38.

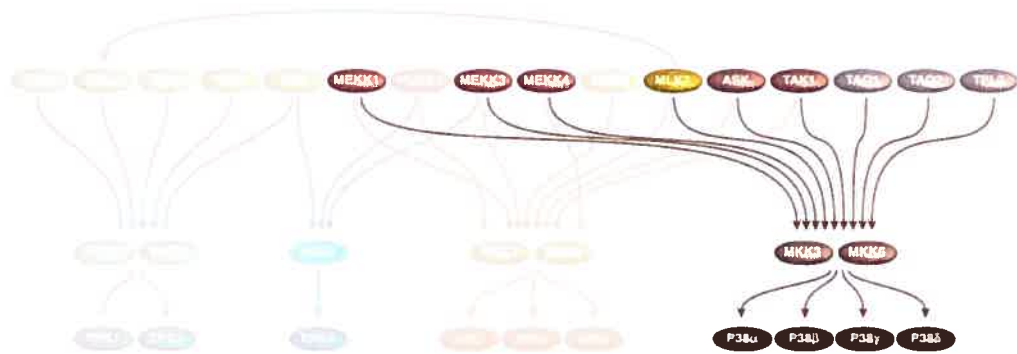


Figure 1-20 MAPKKK, MAPKK et MAP kinases de la voie p38

Un choc osmotique favorise l'assemblage d'une cascade d'activation de la voie p38 alors que MEKK3, MKK3 en plus de la GTPase monomérique Rac1 sont recrutées par *Osmosensing scaffold for MEKK3* (OSM); (Uhlik et al, 2003). En outre, un rôle de protéine d'échafaudage de la voie p38 a récemment été proposé pour JIP4 (Kelkar et al, 2005). Contrairement à ses homologues JIP1, JIP2 et JIP3, celle-ci n'active pas les JNK, mais favorise l'activation des p38 par MKK3 et MKK6.

1.4.3.2 p38 α , p38 β , p38 γ et p38 δ

Les MAP kinases p38 comptent des orthologues jusque chez la levure (Brewster et al, 1993 ; Han et al, 1994; Rouse et al, 1994 ; Shiozaki & Russell, 1995). Chez les

mammifères, la sous-famille comprend quatre isoformes. Identiques à 60%, p38 α , p38 β (Jiang et al, 1996), p38 γ (Lechner et al, 1996; Li et al, 1996), et p38 δ (Jiang et al, 1997; Kumar et al, 1997) sont toutes encodées par des gènes différents (Ashwell, 2006). De plus, elles démontrent toutes des profils d'activation similaires malgré certaines différences dans les cinétiques et les niveaux d'activation de chaque isoforme (Enslin et al, 1998; Hu et al, 1999; Jiang et al, 1996; Jiang et al, 1997). L'expression de p38 α et p38 β est ubiquitaire, bien que celle de p38 β soit généralement plus faible à l'exception des lymphocytes T, tandis que celle de p38 γ et p38 δ varie selon les types cellulaires (Ashwell, 2006; Hale et al, 1999; Zarubin & Han, 2005).

Tableau 1-VIII Propriétés d'activation des isoformes de p38

Isoforme	Activateur				
	MKK3	MKK4	MKK6	TAB1	Tyr 323
p38 α	+	+	+	+	+
p38 β	-	-	+	-	+
p38 γ	+	-	+	-	-
p38 δ	+	+	+	-	-

Par ailleurs, l'épissage alternatif de p38 α génère Mxi2 dont la portion C-terminale possède des propriétés bien distinctes (Faccio et al, 2000; Sanz et al, 2000; Zervos et al, 1995). De plus, Mxi2 lie ERK1 et ERK2 tout en favorisant leur entrée au noyau, indépendamment de leur état d'activation (Casar et al, 2007a; Casar et al, 2007b; Sanz-Moreno et al, 2003). Toutefois, les implications physiologiques de cette découverte demeurent encore méconnues.

p38 α est la seule isoforme essentielle possiblement dû à sa plus vaste distribution tissulaire. Effectivement, son inactivation génique engendre des défauts d'angiogenèse placentaire et d'érythropoïèse (Adams et al, 2000; Mudgett et al, 2000; Tamura et al, 2000). En revanche, les souris dépourvues de p38 β , p38 γ ou p38 δ , sont viables, fertile et sans

problèmes de santé apparents (Kuida & Boucher, 2004 ; Sabio et al, 2005). Même la double inactivation de p38 γ et p38 δ n'engendre pas de phénotype marqué (Sabio et al, 2005).

Tableau 1-IX Inactivation génique des composantes de la voie p38

Rôle	Nom	Alias	Viable	Phénotype d'inactivation génique	Réfs
MAPKKK	MEKK1		Non	Défauts d'érythropoïèse	[12]
	MEKK3		Non	Réduction du nombre de vaisseaux sanguins	[13]
	MEKK4	MTK1	Non	Défauts de formation du tube neural	[14]
	ASK1	MAPKKK5	Oui	Défauts d'apoptose et de remodelage cardiaque	[15,16]
MAPKK	MKK3		Oui	Baisse de signalisation p38; défauts de maturation des lymphocytes T	[38-40]
	MKK6		Oui	Baisse de signalisation p38; défauts d'apoptose et des lymphocytes T	[40]
	MKK3, MKK6		Non	Défauts de placenta et de vasculature	[41,42]
MAP kinase	p38 α		Non	Défauts de placenta et de vasculature; anémie	[43-45]
	p38 β		Oui	Viable et fertile	[46]
	p38 γ	SAPK3, ERK6	Oui	Viable et fertile	[47,48]
	p38 δ	SAPK4	Oui	Viable et fertile	[48]
	p38 γ , p38 δ		Oui	Viable et fertile	[48]

Références : [12] (Bonnesen et al, 2005); [13] (Yang et al, 2000); [14] (Chi et al, 2005); [15] (Yamaguchi et al, 2003); [16] (Tobiome et al, 2001); [38] (Lu et al, 1999); [39] (Wysk et al, 1999); [40] (Tanaka et al, 2002); [41] (Brancho et al, 2003); [42] (Kang et al, 2006); [43] (Adams et al, 2000); [44] (Mudgett et al, 2000); [45] (Tamura et al, 2000); [46] (Beardmore et al, 2005); [47] (Kuida & Boucher, 2004); [48] (Sabio et al, 2005).

Les MAP kinases p38 phosphorylent elles aussi une multitude de substrats dont la majorité sont des facteurs de transcription (Ashwell, 2006; Zarubin & Han, 2005). Ces derniers incluent *Activating transcription factor 1* (ATF1), ATF2, ATF 6, *SRF accessory protein 1* (Sap1), CHOP, p53, *Myocyte enhancer factor 2A* (MEF2A), MEF2C, Elk-1 et *Nuclear factor of activated T-cells* (NFAT); (Gomez del Arco et al, 2000; Han et al, 1997; Hazzalin et al, 1996; Huang et al, 1999; Janknecht & Hunter, 1997; Pereira et al, 2004; Raingeaud et al, 1995; Tan et al, 1996; Wang & Ron, 1996; Zhao et al, 1999b). Parmi les autres substrats des p38, on compte également plusieurs MK (Section 1.4.1.3.4, page 51);

(Roux & Blenis, 2004) qui relie cette voie à la traduction. En plus d'agir au niveau de la régulation traductionnelle (Kumar et al, 2003b), les MAP kinases p38 stabilisent des ARN codant pour des cytokines inflammatoires (Clark et al, 2003; Kracht & Saklatvala, 2002) et contribuent à l'expression de ces gènes via des modifications post-traductionnelles (Kontoyiannis et al, 2001; Kotlyarov et al, 1999; Prichett et al, 1995).

1.4.3.2.1 Activation non conventionnelle

Outre, la phosphorylation par MKK3 et MKK6 sur les sites activateurs du motif TGY, quelques isoformes de p38 peuvent être activées de manière indépendante des MAPKK (Mittelstadt et al, 2005); (Tableau 1-VIII, page 63).

1.4.3.2.1.1 Autophosphorylation via TAB1

La protéine *TAK1-binding protein 1* (TAB1) est d'abord connue comme une protéine régulatrice de la MAPKKK TAK1. Cependant, lorsqu'elle lie p38 α , cette dernière s'autophosphoryle sur ses résidus activateurs (Ge et al, 2002). Bien que ce mécanisme d'activation se produise dans des conditions physiologiques (Matsuyama et al, 2003; Ohkusu-Tsukada et al, 2004; Tanno et al, 2003), l'activation de p38 α par les stimuli activant classiquement la voie p38 se fait principalement par les MAPKK MKK3 et MKK6, et de manière plus restreinte via TAB1 (Brancho et al, 2003 ; Kang et al, 2006).

1.4.3.2.1.2 Phosphorylation sur la tyrosine 323

Un autre mécanisme favorise l'autophosphorylation de p38 α , mais aussi de p38 β (Mittelstadt et al, 2005). Dans celui-ci, la tyrosine kinase ZAP70 phosphoryle p38 α et p38 β sur la tyrosine 323, ce qui augmente leur activité phosphotransférase non seulement sur elles-mêmes, mais également à l'endroit de leur substrats (Salvador et al, 2005a). En outre, les tyrosine kinases LCK, FYN et *Spleen tyrosine kinase* (SYK) peuvent activer p38 α et p38 β de la même manière (Ashwell, 2006; Salvador et al, 2005b). La phosphorylation de la tyrosine 323 est suffisante pour induire l'activité kinase qui ne requiert pas la phosphorylation de la boucle activatrice (Salvador et al, 2005a). Les deux types de

phosphorylation agissent de manière additive, et la contribution relative de chaque mode d'activation pourrait varier selon le stimulus (Ashwell, 2006).

1.4.3.2.2 Cible thérapeutique

Avec un rôle dans la réponse inflammatoire et la croissance de plusieurs types cellulaires, les MAP kinases de la sous-famille p38 représentent une cible attrayante pour le traitement de diverses pathologies. En outre, la voie p38 pourrait être impliquée dans le développement de l'arthrite, de la maladie d'Alzheimer et la maladie de Crohn (Hollenbach et al, 2004; Johnson & Bailey, 2003; Perregaux et al, 1995). L'inhibition de la voie p38 réduirait non seulement l'inflammation associée à ces maladies, (Adams et al, 2001; Peifer et al, 2006), mais permettrait également de traiter la douleur qui en découle (Ji, 2004b).

Activées par des stress chimiques et mécaniques, les MAP kinases p38 ont fait l'objet d'études sur l'hypertrophie cardiaque (Behr et al, 2003; Kerkela & Force, 2006; Liang & Molkenin, 2003; Mehta & Griendling, 2007). Celles-ci ont démontré que l'expression cardiaque d'une forme active de MKK3 ou MKK6 est suffisante pour engendrer de l'hypertrophie (Choukroun et al, 1998; Liao et al, 2001; Zechner et al, 1997). De plus, la progression de l'hypertrophie cardiaque est accompagnée d'une augmentation de l'expression de p38 α et p38 β (Wang et al, 1998b). L'inhibition de p38 pourrait alors freiner l'hypertrophie cardiaque et les désordres parfois inflammatoires qui y sont associés (Clerk & Sugden, 2006; Kerkela & Force, 2006)

D'autre part, plusieurs composés déjà disponibles inhibent directement des MAP kinases p38 (Dominguez et al, 2005; Goldstein & Gabriel, 2005; Lee et al, 2000; Lee & Dominguez, 2005). Parmi ceux-ci le SB203580 est un des mieux caractérisés. Ce pyridinyl imidazole inhibe spécifiquement p38 α et p38 β , empêchant du coup la production de cytokines pro-inflammatoires et la prolifération de cellules du système immunitaire (Ashwell, 2006). En conclusion, plus d'une vingtaine d'inhibiteurs de diverses origines font l'objet d'essais précliniques et cliniques en vue du traitement de l'inflammation, de

l'arthrite, du psoriasis, de la maladie de Crohn ainsi que de l'athérosclérose (Saklatvala, 2004).

1.4.4 Voie ERK5

La voie ERK5 se distingue d'abord par son unique MAP kinase et sa seule MAPKK, MEK5 (Nishimoto & Nishida, 2006; Wang et al, 2005; Wang & Tournier, 2006). Cette dernière est activée par plusieurs MAPKKK comme Cot (Chiariello et al, 2000) ainsi que MEKK2 et MEKK3 (Chao et al, 1999; English et al, 1995; Sun et al, 2001) qui activent également d'autres voies MAP kinases.

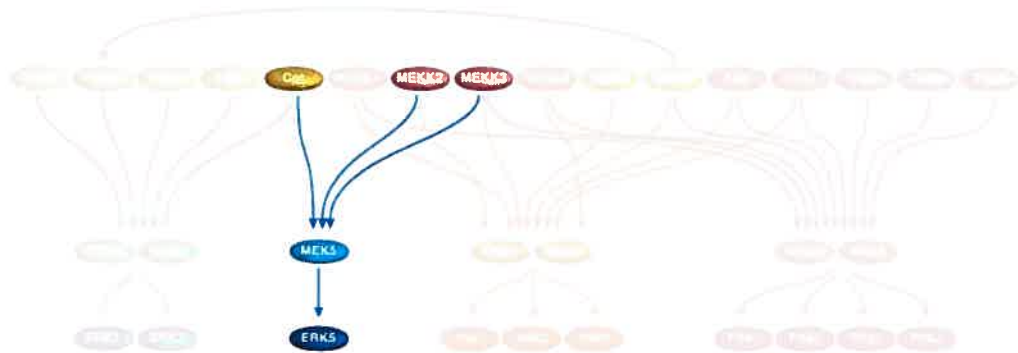


Figure 1-21 MAPKKK, MAPKK et MAP kinase de la voie ERK5

Outre leur similarités de séquence primaire (Zhou et al, 1995), plusieurs éléments apparentent MEK5 avec MEK1/2. D'abord, elles sont activées par le sérum et nombre de facteurs de croissance (Kamakura et al, 1999; Kato et al, 2000a; Kato et al, 1997; Kato et al, 1998; Zhou et al, 1995). Ensuite, à l'instar de MEK1/2, MEK5 phosphoryle un motif d'activation TEY (Buschbeck & Ullrich, 2005 ; English et al, 1998 ; Mody et al, 2003). De manière comparable à MEK1 (Giroux et al, 1999), l'inactivation génique de MEK5 confirme ses propriétés prolifératrices et anti-apoptotiques, en plus de son rôle dans le développement du système cardio-vasculaire (Wang et al, 2005). Enfin, certains inhibiteurs

pharmacologiques de MEK1/2 inhibent également MEK5 (Kamakura et al, 1999; Mody et al, 2001), ajoutant davantage à la similitude.

Tableau 1-X Inactivation génique des composantes de la voie ERK5

Rôle	Nom	Alias	Viable	Phénotype d'inactivation génique	Réfs
MAPKKK	MEKK3		Non	Réduction du nombre de vaisseaux sanguins	[13]
MAPKK	MEK5		Non	Défauts cardiovasculaires; baisse de prolifération; hausse d'apoptose	[49]
MAP kinase	ERK5	BMK1	Non	Défauts d'angiogenèse et de développement cardiovasculaire	[50-53]

Références : [13] (Yang et al, 2000); [49] (Wang et al, 2005) ; [50] (Regan et al, 2002) ; [51] (Sohn et al, 2002); [52] (Yan et al, 2003) ; [53] (Hayashi & Lee, 2004).

Quant à ERK5, sa taille deux fois supérieure à celle des autres MAP kinases (98 kDa) lui valut initialement le nom de *Big MAP kinase 1* (BMK1) (Lee et al, 1995 ; Zhou et al, 1995). Le domaine catalytique de ERK5, situé dans la portion N-terminale, est pourtant identique à 50% à celui de ERK1/2 (Figure 1-17, page 46). La partie C-terminale de ERK5 contient un NLS et un NES, ainsi que deux régions riches en résidus proline soupçonnées de permettre la liaison à des protéines contenant un domaine *Src-Homology 3* (SH3) (Buschbeck & Ullrich, 2005; Kondoh et al, 2006; Raviv et al, 2004; Yan et al, 2001; Zhou et al, 1995). De concert avec la phosphorylation de ses sites activateurs par MEK5, ERK5 s'autophosphoryle dans sa partie C-terminale, ce qui contribue à la maintenir dans une conformation active en plus de modifier sa localisation subcellulaire (Buschbeck & Ullrich, 2005 ; English et al, 1998 ; Mody et al, 2003). De surcroît, la partie C-terminale de ERK5 renferme une séquence unique possédant une activité transcriptionnelle (Akaike et al, 2004; Kasler et al, 2000 ; Terasawa et al, 2003).

Certains substrats de ERK5, incluant Sap1a, c-Myc et certaines MK sont aussi phosphorylés par ERK1/2 (English et al, 1998; Kamakura et al, 1999; Pearson et al, 2001a). Par contre, les facteurs de transcription MEF2A, MEF2C et MEF2D, figurant parmi les

substrats les mieux caractérisés de ERK5, ne sont pas des cibles de ERK1/2 (Kato et al, 1997 ; Kato et al, 2000b; Yang et al, 1998a). Contrairement à ERK1/2, ERK5 est activée par plusieurs signaux oxydatifs et des stress cellulaires (Torres, 2003; Wang & Tournier, 2006). Finalement, l'inactivation de ERK5 engendre un phénotype distinct de celui de ERK1 ou ERK2. Bien que ce phénotype soit létal, comme celui de l'inactivation de ERK2, cette létalité embryonnaire n'est pas attribuable à des défauts de développement placentaires, mais plutôt à des malformations cardiaque sévères (Hayashi & Lee, 2004; Regan et al, 2002; Sohn et al, 2002; Yan et al, 2003). En somme, la voie ERK5 possède bien des similarités avec les la voie ERK1/2, mais également des propriétés uniques qui font d'elle une voie à part entière.

1.4.5 MAP kinases atypiques

Les voies MAP kinase de mammifères que nous venons de couvrir possèdent une architecture selon laquelle une MAPKKK phosphoryle et active une MAPKK qui phosphoryle et active à son tour une MAP kinase. Les MAP kinases dites « atypiques » se distinguent des autres MAP kinases « classiques » car elles ne constituent pas des substrats pour les MAPKK (Coulombe & Meloche, 2006). Elles ne font donc pas parties de voies bien définies jusqu'ici. De plus, les MAP kinases atypiques possèdent des structures passablement différentes de celles des MAP kinases des voies ERK1/2, JNK et p38 (Bogoyevitch & Court, 2004); (Figure 1-17, page 46). Néanmoins, toutes les MAP kinases montrent au moins 40% d'identité (60% similarité) à ERK1 dans leur domaine kinase (Coulombe & Meloche, 2006).

1.4.5.1 ERK3

D'une masse moléculaire apparente de 100 kDa, ERK3 partage 45% d'identité avec ERK1 au niveau du domaine kinase (Figure 1-17, page 46). Par contre, les deux enzymes montrent plusieurs distinctions structurales. D'abord, ERK3 possède une importante extension en C-terminal dont les fonctions demeurent encore mal connues. De plus, deux

motifs conservés dans toutes les MAP kinases sont absents de ERK3 (et ERK4). D'abord, un motif SEG figure en lieu du TEY dans la boucle d'activation ; puis, la séquence SPR se substitue au motif très conservé APE dans le sous-domaine VIII. Ceci suggère que ERK3 pourrait avoir une spécificité de substrat différente ou même exercer des effets physiologiques indépendants de la phosphorylation de substrats (Boudeau et al, 2006). Néanmoins, ERK3 phosphoryle MK5 *in vitro* et *in vivo* (Seternes et al, 2004). De plus, ERK3 est capable de s'autophosphoryler sur la sérine de sa boucle d'activation (Cheng et al, 1996), démontrant qu'elle possède bel et bien une activité catalytique intrinsèque. La phosphorylation de la sérine du motif SEG est constitutive *in vivo* n'est pas modifiée par des stimulations aux facteurs de croissance ou aux stress chimiques (Coulombe, P. & Meloche, S., manuscrit en préparation).

À l'opposé des autres MAP kinases, il n'existe pas d'orthologues chez les plantes et les invertébrés (Coulombe & Meloche, 2006; Krens et al, 2006b). L'ARN messager de ERK3 est exprimé de manière ubiquitaire dans les tissus de mammifères adultes, bien que celle-ci soit prédominante dans le cerveau, les muscles squelettiques et le tractus gastrointestinal (Coulombe & Meloche, 2006). En outre, l'expression du messager et de la protéine de ERK3 augmente lors de la différenciation de plusieurs lignées de cellules (Boulton et al, 1991; Coulombe et al, 2003). De surcroît, la surexpression de ERK3 inhibe la progression du cycle cellulaire de plusieurs types cellulaires (Coulombe et al, 2003; Crowe, 2004; Julien et al, 2003).

ERK3 est une protéine instable avec une demi-vie de 30 à 45 minutes alors que celle de ERK1 dépasse plusieurs heures (Coulombe et al, 2003; Mikalsen et al, 2005). Cette instabilité est attribuable à la polyubiquitination de l'extrémité N-terminale de ERK3 qui induit sa dégradation par le protéasome (Coulombe et al, 2004; Coulombe et al, 2003). Parallèlement, on observe une stabilisation de ERK3 lors de la différenciation des cellules C2C12 (Coulombe et al, 2003). D'autres MAP kinases sont aussi régulées de manière aiguë par le système ubiquitine-protéasome. De manière analogue à ERK3, l'activité de ERK7 est contrôlée par une ubiquitination continue (Kuo et al, 2004). Seuls les 20 premiers acides

aminés de ERK7 sont nécessaires et suffisants pour cette dégradation alors que la partie N-terminale de ERK3 compte deux dégrons (Coulombe et al, 2003; Kuo et al, 2004). Par ailleurs, dans des conditions de fort stress cellulaire prolongé, MEKK1 peut aussi induire la dégradation de ERK1/2 par ubiquitination (Lu et al, 2002).

1.4.5.2 ERK4

Présentant une forte homologie avec ERK3 (73% d'identité dans le domaine kinase), ERK4 a initialement été nommée p63^{mapk} en raison de son poids moléculaire (Gonzalez et al, 1992). À l'instar de ERK3, ERK4 contient également une importante partie C-terminale, renferme les motifs SEG et SPR (Figure 1-17, page 46) et ne possède aucun orthologue chez les plantes et les invertébrés (Coulombe & Meloche, 2006; Krens et al, 2006b). En revanche, quelques disparités entre ERK3 et ERK4 ont déjà été relevées. D'abord, l'expression de l'ARN messager de ERK4 n'est pas ubiquitaire, mais limitée au cœur, au rein, au poumon, au pancréas, au placenta à la prostate, à la peau et surtout au cerveau où elle y est plus forte (Garcia et al, 1996 ; Gonzalez et al, 1992). De plus, contrairement à ERK3, ERK4 est une protéine très stable (Kant et al, 2006). Enfin, les phénotypes d'inactivation génique n'ont pas été publiés pour ERK3 ni ERK4, mais ceux-ci devraient révéler davantage les rôles physiologiques différents de chacune de ces enzymes (Turgeon, B., Rousseau, J. & Meloche, S., communication personnelle).

1.4.5.3 ERK7

Le domaine kinase de ERK7 est identique à 45% à celui de ERK1, mais il comprend une extension de 204 acides aminés en C-terminal (Figure 1-17, page 46). Cette région ne montre que peu d'homologie avec d'autres protéines si ce n'est qu'elle renferme un NLS potentiel et des régions riches en résidus proline (Coulombe & Meloche, 2006). En outre, la partie C-terminale est requise pour l'activation complète de ERK7 (Abe et al, 1999), de manière complémentaire à son autophosphorylation sur son motif TEY (Abe et al, 2001; Klevernic et al, 2006). Des stress oxydatifs, des agents mitogéniques et des tyrosine kinases peuvent mener à l'activation de ERK7 (Abe et al, 2002; Iavarone et al,

2006 ; Klevernic et al, 2006), ce qui suggère un rôle dans la régulation de la prolifération. Des fonctions dans le transport du chlore et la signalisation par les récepteurs nucléaires ont aussi été proposés pour cette kinase (Coulombe & Meloche, 2006). ERK7 phosphoryle plusieurs substrats génériques des MAP kinases (Abe et al, 2001; Abe et al, 1999)

ERK7 est exprimée dans les tissus adultes de mammifères, l'expression étant plus forte dans le poumon et le rein (Abe et al, 2002). Fait intéressant, les orthologues humain et murin de ERK7 présentent une homologie limitée. En effet, la protéine n'est identique qu'à 69% entre les deux espèces. Cette différence est telle que trois ans après avoir cloné ERK7 chez la souris (Abe et al, 1999), le même groupe rapportait le clonage de l'orthologue humain en nommant ce dernier ERK8 et en le considérant de manière erronée comme une kinase distincte de ERK7 (Abe et al, 2002).

1.4.5.4 NLK

Nemo-like kinase (NLK) doit son nom à sa ressemblance à la protéine Nemo de drosophile (Choi & Benzer, 1994). À l'instar de Rolled l'orthologue de ERK1/2, Nemo est importante pour le développement de l'œil de la drosophile (Brott et al, 1998; Meneghini et al, 1999; Rocheleau et al, 1999). NLK possède des extensions d'une centaine d'acide aminés de part et d'autre de son domaine kinase. De plus, le motif TEY de NLK est remplacé par un motif TQE, avec un seul résidu phosphorylable, comme c'est le cas pour ERK3 et ERK4 (Figure 1-17, page 46). Bien que la phosphorylation de la thréonine n'ait pas encore été documentée, il n'en demeure pas moins que ce résidu est lié à l'activité biochimique de NLK qui inclut la phosphorylation de plusieurs facteurs de transcription (Brott et al, 1998; Ishitani et al, 2003 ; Ishitani et al, 1999; Kanei-Ishii et al, 2004; Kurahashi et al, 2005 ; Rocheleau et al, 1999).

NLK est activée par plusieurs ligands extracellulaires dont Wnt-1, des cytokines et des membres de la famille *Transforming growth factor- β* (TGF- β); (Kanei-Ishii et al, 2004; Kojima et al, 2005; Ohkawara et al, 2004; Smit et al, 2004). De plus, des évidences biochimiques et génétiques placent la MAPKKK TAK1 et sa protéine régulatrice TAB1

quelque part en amont de NLK (Ishitani et al, 1999; Meneghini et al, 1999 ; Ohkawara et al, 2004; Shin et al, 1999; Smit et al, 2004). Cependant, le recours à une autre kinase comme intermédiaire n'a pas été infirmé ni confirmé (Coulombe & Meloche, 2006).

Conservée chez les invertébrés (Kortenjann et al, 2001b), l'expression de NLK chez les mammifères se fait dans la plupart des tissus adultes, mais de manière plus importante au cerveau et dans les organes lymphatiques (Brott et al, 1998). L'inactivation génique de NLK cause des retards de croissance et d'importants défauts neurologiques qui entraînent la mort *in utero* ou 4 à 6 semaines après la naissance, selon le fond génétique des lignées de souris (Kortenjann et al, 2001a).

1.5 Propriétés conservées des MAP kinases

Bien que les précédentes sous-sections aient mis en lumière certaines disparités entre les voies MAP kinases et parfois certaines de leurs composantes, ces voies n'en demeurent pas moins hautement conservées à la fois dans leur architecture et dans leurs mécanismes de régulation. Les prochaines sections tenteront d'établir des concepts généraux s'appliquant à toutes les voies MAP kinases de toutes les espèces. La majorité des travaux effectués et décrits portent sur la voie ERK1/2 de mammifère, il en émerge néanmoins des propriétés à la fois communes et conservées.

1.5.1 Architecture

Outre leur expression ubiquitaire (Karandikar & Cobb, 1999; Pearson et al, 2001b), une des caractéristiques les mieux conservées des voies MAP kinases est sans doute cette organisation en modules de trois kinases soumises à une activation séquentielle, et régulées par phosphorylation (Pearson et al, 2001b; Widmann et al, 1999). En résumé, une MAPKKK phosphoryle et active une MAPKK qui, à son tour, phosphoryle et active une MAP kinase (Figure 1-22A, page 74) dont les substrats sont variés mais spécifiques. C'est cette dernière qui donne son nom à la voie MAP kinase.

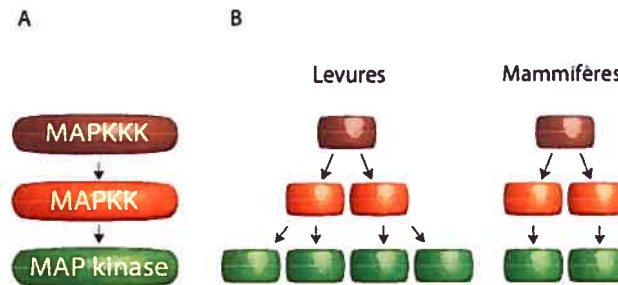


Figure 1-22 Architecture des voies MAP kinases

A) Un module de base composé de trois kinases. B) Amplification du signal chez les levures et les mammifères.

Cette architecture constitue la cassette de base à laquelle peuvent se greffer d'autres éléments en amont comme en aval (par exemple, des MAPKKKK et des MK, respectivement). L'utilisation de trois kinases permet une régulation à plusieurs niveaux, mais également la communication avec d'autres voies de signalisation parallèles (Pearson et al, 2001b; Widmann et al, 1999). Des exemples sont donnés par MEKK1 qui peut induire l'activation de la voie NFκB (Lee et al, 1997), et par la capacité de MEKK3 d'activer les voies JNK, p38 et ERK5 (Uhlik et al, 2004). De tels débordements entre les voies de signalisation surviennent généralement au niveau de la MAPKKK.

1.5.1.1 Propagation du signal dans la cassette de trois kinases

Une propriété que confère l'organisation en trois kinases activées séquentiellement est l'amplification du signal (Figure 1-22B). Celle-ci ne peut avoir cours que si chaque kinase est plus abondante en aval que celle en amont. C'est le cas notamment dans la voie de réponse aux phéromones chez *S. cerevisiae*, où la MAP kinase est plus abondante que la MAPKK qui est elle-même plus abondante que la MAPKKK (Stevenson et al, 1992). Par contre, chez les mammifères, cette amplification n'a lieu qu'à l'étape entre la MAPKKK et la MAPKK. En effet, dans la voie ERK1/2, les MAPKK sont nettement plus abondantes

que les MAPKKK, mais leur concentration intracellulaire est équivalente ou supérieure à celles des MAP kinases (Bhalla, 2004; Huang & Ferrell, 1996; Sasagawa et al, 2005; Schoeberl et al, 2002).

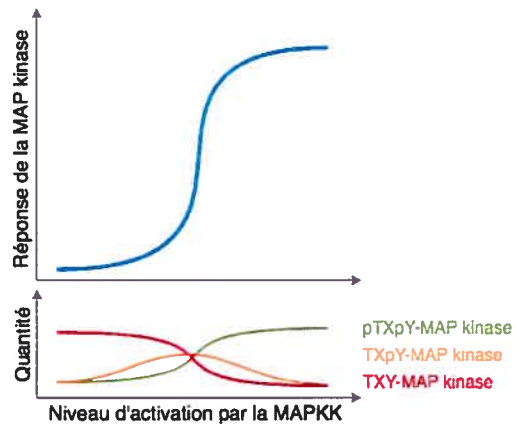


Figure 1-23 **Ultrasensibilité des MAP kinases**

Représentation schématique du niveau de réponse de la MAP kinase en fonction de l'intensité de stimulation (haut). La phosphorylation non-processive des MAP kinases fait en sorte qu'elles répondent de façon ultrasensible à la manière d'un interrupteur. Les niveaux de chaque état de phosphorylation de la boucle activatrice de la MAP kinase sont également schématisés (bas).

Par ailleurs, la phosphorylation des MAPKK par les MAPKKK est processive alors que celle des MAP kinases est distributive (non-processive). Effectivement, la MAPKKK Raf-1 phosphoryle les deux sites activateurs de la MAPKK MEK1 en une seule réaction (Alessi et al, 1994). Par contre, l'activation des MAP kinases ERK1 ou ERK2 requiert deux interactions. Lors de la première, la tyrosine activatrice est phosphorylée; la phosphorylation de la thréonine activatrice ayant lieu au moment de la seconde interaction (Burack & Sturgill, 1997; Haystead et al, 1992). Ainsi, la forme inactive mono-phosphorylée en tyrosine s'accumule lorsque peu de MAPKK sont actives. Néanmoins,

lorsque cette accumulation atteint un certain seuil, la majorité des évènements de phosphorylation par la MAPKK ont lieu sur le deuxième site, la thréonine activatrice (Figure 1-23, page 75). Conséquemment, la plupart des évènements de phosphorylation des MAP kinases deviennent alors activateurs, ce qui confère aux MAPK kinases une ultrasensibilité allant de pair avec des propriétés de réponse rapide similaires à celles d'un interrupteur (Mackeigan et al, 2005). Cet interrupteur est déclenché au moment de la phosphorylation rapide de la thréonine dont la conséquence est une activation forte et rapide de la MAP kinase qui peut être qualifiée de « tout ou rien » (Kolch et al, 2005; Li & Qian, 2003), et a été observée dans plusieurs voies MAP kinase (Angeli et al, 2004; Bagowski & Ferrell, 2001; Bhalla et al, 2002; Ferrell & Machleder, 1998; Huang & Ferrell, 1996; Mackeigan et al, 2005).

De surcroît, les MAPKK contribuent à ces propriétés de réponse, car, à l'état inactif, elles inhibent par séquestration, l'activité basale des MAP kinases (Sugiura et al, 1999). La phosphorylation de leurs résidus activateurs fait passer les MAPKK d'inhibiteurs à activateurs des MAP kinases. Enfin, leur translocation nucléaire pourrait également expliquer les propriétés d'interrupteur des MAP kinases en permettant un cloisonnement du signal et l'établissement d'un seuil de réponse (Harding et al, 2005; Mackeigan et al, 2005; Whitehurst et al, 2004a), et ce de manière liée à la concentration du stimulus (Ando et al, 2004). En somme, les propriétés d'amplification et d'ultrasensibilité rendent les MAP kinases aptes à relayer différents processus de croissance et de survie cellulaire (Burack & Sturgill, 1997; Chen et al, 2001; Ferrell, 2002; Huang & Ferrell, 1996).

1.5.1.2 Redondance et compétition

Généralement, plusieurs membres ou isoformes existent au sein d'une même sous-famille de kinases. Par exemple, en excluant les épissages alternatifs, la voie JNK compte trois MAP kinases et la voie p38 en compte quatre. En outre, les membres d'une même sous-famille de MAP kinases sont généralement homologues à plus de 80% (Chen et al, 2001), et sont activés de manière équivalente par un nombre restreint de MAPKK

(habituellement une ou deux). Dans plusieurs modèles d'inactivation génique chez la souris et la levure, l'absence d'une MAP kinase est fonctionnellement compensée par une autre de la même sous-famille (Breitkreutz et al, 2001; Elion et al, 1991; Jaeschke et al, 2006; Pages et al, 1999; Sabio et al, 2005). De manière analogue, dans des fibroblastes embryonnaires de souris (MEF), l'absence de la MAPKKK A-Raf ou de Raf-1 peut être compensée par les autres membres de la sous-famille dont B-Raf (Huser et al, 2001; Mercer et al, 2002; Mikula et al, 2001). La conservation évolutive de multiples isoformes à différents niveaux au sein des cascades de MAP kinases suggère que leurs fonctions ne se chevauchent pas entièrement, et conséquemment, que chaque isoforme possède ses spécificités. En somme, la pertinence physiologique de la redondance à l'intérieur des voies MAP kinases demeure une question ouverte.

Cependant, une étude utilisant la complémentarité des approches génétiques et pharmacologiques pourrait nous fournir des bases pour expliquer cette redondance des MAP kinases (Jaeschke et al, 2006). JNK1 et JNK2 sont toutes deux capables de phosphoryler et d'activer le facteur de transcription c-Jun *in vitro* et *in vivo* (Davis, 2000). Conséquemment, l'inactivation génique de JNK1, ainsi que la double inactivation de JNK1 et JNK2, causent une baisse de la phosphorylation et de l'activation de c-Jun (Kuan et al, 1999; Sabapathy et al, 2004). Par contre, l'inactivation de JNK2 cause les effets inverses, suggérant des rôles opposés de JNK1 et JNK2 (Sabapathy et al, 2004). Or, l'inhibition pharmacologique de JNK2 résulte en une baisse de la phosphorylation de c-Jun (Jaeschke et al, 2006), ce qui est en accord avec les évidences biochimiques (Davis, 2000).

L'ensemble de ces observations peut s'expliquer simplement par des mécanismes de compétition (Figure 1-24, page 79). JNK1 et JNK2 entrent en compétition afin d'être activées par les MAPKK MKK4 et MKK7. JNK1 et JNK2 sont aussi en compétition pour la phosphorylation de c-Jun puisqu'elles utilisent une région homologue pour lier des sites qui sont semblables tant chez leurs activateurs que leurs substrats (Ho et al, 2003). Toutefois, JNK1 active c-Jun plus efficacement, de sorte que lorsqu'il y a inactivation génique de JNK1, JNK2 compense en prenant sa place auprès de MKK4/7, mais demeure

incapable d'activer c-Jun aussi efficacement. En absence de JNK2, JNK1 intègre tout le signal en amont et devient la seule à le dispenser en aval. Conséquemment, c-Jun est plus abondamment phosphorylé car l'absence d'une kinase de moindre efficacité (JNK2) est compensée par la suractivation d'une kinase de plus haute efficacité (JNK1). En d'autres termes, JNK2 agit comme un agoniste partiel et son ablation génique cause un gain de fonction de JNK1 (Jaeschke et al, 2006; Ventura et al, 2006). Lorsque JNK2 est sujette à l'inhibition pharmacologique, JNK1 demeure dans la course pour MKK4/7 et se voit activée normalement. La baisse d'activité de c-Jun est attribuable à une inhibition de JNK2 sans qu'il y ait compensation de la part de JNK1. Dans le cas où des MAP kinases contribueraient de manière quasi-équivalente à la réponse, l'absence de l'une serait presque entièrement compensée par l'autre, et vice versa. Ainsi, les différences observées seraient moins importantes que dans le cas de JNK1 et JNK2.

Un raisonnement similaire peut s'appliquer aux membres de la sous-famille Raf. Effectivement, les isoformes de Raf n'activent pas les MAPKK MEK1 et MEK2 de manière équivalente (Wu et al, 1996), ou avec la même cinétique (Hoyle et al, 2000), mais demeurent en partie redondantes et interchangeable (Huser et al, 2001; Mikula et al, 2001). Ces données suggèrent que la compétition existe également au niveau de l'activation des MAPKK par les MAPKKK.

En somme, la compétition d'isoformes de MAP kinases pour les mêmes activateurs et substrats permet de conserver le niveau d'activité dans une fenêtre déterminée, en plus de permettre par un processus dynamique que cette activité soit facilement et rapidement modulée. L'activité MAP kinase est donc ni trop élevée, ni trop basse, et ce, pour l'ensemble des substrats. Ce principe de compétition s'applique fort bien à l'ensemble des MAP kinases puisqu'elles partagent toutes des mécanismes d'interaction similaires avec leurs substrats et avec leurs régulateurs (Chang et al, 2002; Lee et al, 2004; Remenyi et al, 2005; Sharrocks et al, 2000).

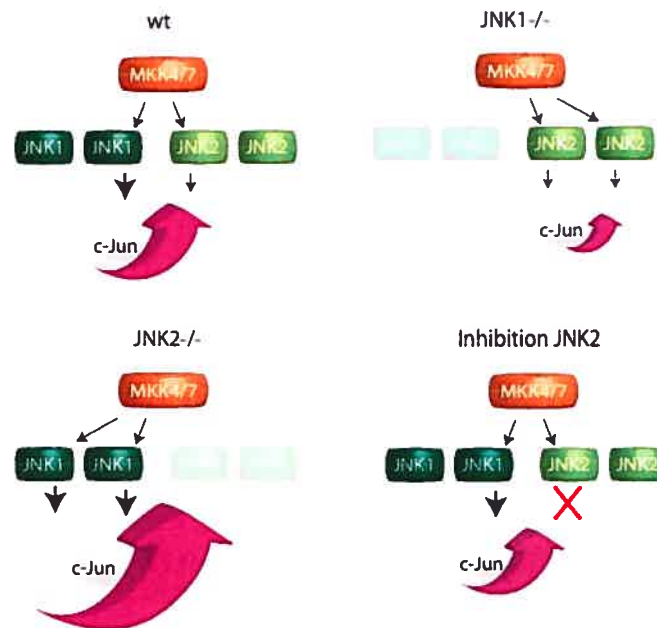


Figure 1-24 **Compétition entre deux isoformes de MAP kinases**

Deux MAP kinases possèdent les mêmes MAPKK activatrices et phosphorylent un même substrat sur les mêmes sites. Si les deux MAP kinases ne phosphorylent pas le substrat de manière égale, l'absence de la MAP kinase contribuant majoritairement (JNK1) à la phosphorylation du substrat ne sera pas entièrement compensée par l'autre (JNK2). Lors de l'inhibition pharmacologique, les deux MAP kinases sont toujours en compétition pour leurs activateurs, alors qu'une seule des deux peut alors phosphoryler le substrat.

Adapté de (Jaeschke et al, 2006)

Par ailleurs, la compétition peut se faire non seulement pour des activateurs, des phosphatases et des substrats (Bardwell et al, 2003), mais peut avoir cours dans des contextes de localisation subcellulaire particulière (compétition pour des transporteurs ou des protéines d'ancrage), ou d'attachement et de participation à des complexes fonctionnels (signalosomes, protéines d'échafaudage, ...). Dans le même ordre d'idées, il a été observé

que la protéine d'échafaudage Ste5 et la MAPKK Ste7 se concurrencent pour la même région de liaison sur la MAP kinase Fus3 (Kusari et al, 2004), comme le font les MAP kinases Fus3 et Kss1 pour Ste7 (Bardwell et al, 2001). Il reste néanmoins bien du travail à faire pour faire toute la lumière sur la question de la redondance et de la compétition.

1.5.2 Composantes

En plus de l'architecture, il y a également une forte conservation des éléments de cette architecture. Nous savons que les MAP kinases sont identiques à plus de 40% dans leur domaine catalytique (Coulombe & Meloche, 2006). Une homologie comparable existe entre les différentes MAPKK et MAPKKK, respectivement. L'expression d'une MAP kinase humaine (Atienza et al, 2000; Galcheva-Gargova et al, 1994; Truman et al, 2006) ou de grenouille (Lee et al, 1993) permet de compenser efficacement l'absence de son orthologue chez *S. cerevisiae*. En outre, certains domaines des orthologues MEK1/2 et Ste7 sont fonctionnellement interchangeable (Grewal et al, 2006), tout comme la mutation d'un résidu conservé dans MEK1, Pbs2 et Ste7 provoque exactement les mêmes effets (Gopalbhai et al, 2003). Ces expériences ont permis de mettre en évidence la conservation de la voie, de ses composantes et de ses mécanismes de régulation puisque, ces MAP kinases métazoaires peuvent être phosphorylées et activées par les MAPKK d'un eucaryote inférieur, et générer la réponse appropriée, pouvant aller jusqu'à modifier ou corriger un phénotype.

1.5.2.1 MAPKKK

Les MAPKKK sont des sérine/thréonine kinases formant une vaste famille de 21 membres, dont quinze (incluant les Raf et les MLK) appartiennent au groupe *Tyrosine kinase-like* (TKL). Les autres se retrouvent dans le groupe STE, ce qui les apparente aux kinases Sterile 7, 11 et 20 de levure (Manning et al, 2002). Leur activation se fait généralement par la liaison à la membrane avec une petite GTPase activée de la famille Ras ou Rho, ou par phosphorylation de résidus clés par une MAPKKKK (Widmann et al,

1999). L'activation des MAPKKK peut aussi se faire par oligomérisation, par relocalisation à la membrane ou par diverses combinaisons de ces événements (Rapp et al, 2006). Les MAPKKK possèdent souvent d'importants domaines régulateurs leur permettant de former des oligomères ou d'interagir avec des protéines en amont. D'autres domaines peuvent également jouer des rôles d'auto-inhibition ou d'ubiquitylation (Qi & Elion, 2005).

L'hétérogénéité ainsi que les divers modes de régulation des MAPKKK leur permettent d'intégrer des signaux de différente nature et d'aiguiller ceux-ci vers une ou plusieurs voies MAP kinases, comme ceux de la voie Wnt/ β -caténine redirigés la voie JNK (Boutros et al, 1998; Kim et al, 2003; Zhang et al, 1999). Ou encore, les MAPKKK peuvent rediriger ces signaux vers d'autres voies de signalisation, comme par exemple la voie NF κ B (Section 1.5.1, page 73).

1.5.2.2 MAPKK

En soi, les MAPKK forment une classe de kinases très particulière à cause de leur double spécificité (Pearson et al, 2001b; Widmann et al, 1999). C'est cette capacité à phosphoryler leurs substrats à la fois en tyrosine et en sérine/thréonine qui les rend si uniques, puisqu'habituellement, les kinases phosphorylent exclusivement en tyrosine ou en sérine/thréonine. Ne comptant que 7 membres (4 chez *S. cerevisiae*), ces protéines du groupe STE sont respectivement plus homologues que les MAPKKK (Caffrey et al, 1999). De plus, le nombre de substrats d'une MAPKK est beaucoup plus restreint : alors que les MAPKKK peuvent phosphoryler des MAPKK relevant de différentes voies, ces dernières se limitent aux MAP kinases d'une même voie qui sont généralement identiques à près de 80% (Chen et al, 2001).

La phosphorylation spécifique par les MAPKKK de deux résidus sérine/thréonine, situés dans la boucle d'activation des MAPKK augmente dramatiquement l'activité catalytique de ces dernières (Alessi et al, 1994; Zheng & Guan, 1994). Toutefois, contrairement aux MAP kinases dont la phosphorylation des deux résidus activateurs est essentielle à leur activité phosphotransférase (Rossomando et al, 1989), la phosphorylation

d'un seul de ces résidus confère aux MAPKK une activité kinase, et cette activité augmente dramatiquement lorsque le second résidu est lui aussi phosphorylé (Alessi et al, 1994; Mansour et al, 1996; Zheng & Guan, 1994).

1.5.2.2.1 Sélectivité des MAPKK

Sur les MAP kinases, la thréonine et la tyrosine phosphorylées par les MAPKK sont séparées par un seul acide aminé, et constituent le motif TXY qui les caractérise. C'est la nature de l'acide aminé variable (X) au milieu du motif qui sert de base pour définir les familles de MAP kinases, du moins chez les mammifères (Tableau 1-XI). Par exemple, la sous-famille ERK1/2 possède un motif TEY (Payne et al, 1991), alors que le TGY caractérise la sous-famille p38 (Han et al, 1994; Lee et al, 1994).

Tableau 1-XI Motif d'activation des principales MAP kinases

MAP kinases de *S. cerevisiae* et de mammifères avec le motif TXY phosphorylé par leurs MAPKK respectives.

<i>S. Cerevisiae</i>			Mammifères		
MAP kinase	TXY	MAPKK	MAP kinases	TXY	MAPKK
Fus3	TEY	Ste7	ERK1/2	TEY	MEK1/2
Hog1	TGY	Pbs2	p38 $\alpha/\beta/\gamma/\delta$	TGY	MKK3/6
Kss1	TEY	Ste7	JNK1/2/3	TPY	MKK4/7
Mpk1	TEY	Mkk1/2	ERK5	TEY	MEK5
Smk1	TNY	?	ERK3/4	SEG	?
			ERK7	TEY	?
			NLK	TQE	?

Ainsi, bien qu'elle soit nécessaire, la composition du motif TXY n'est pas le seul déterminant de la reconnaissance par les MAPKK (Brunet & Pouyssegur, 1996). Effectivement, MKK3 et MKK6 ne phosphorylent que les membres de la sous-famille p38 dont le motif dans la boucle d'activation est TGY, tout comme MKK4 et MKK 7 se limitent (sauf exceptions) à ceux de la famille JNK arborant le motif TPY (Pearson et al,

2001b; Qi & Elion, 2005; Raman & Cobb, 2003). Pourtant, ERK1, ERK2, ERK5 et ERK7 possèdent toutes le motif TEY dans leur boucle d'activation (Tableau 1-XI), mais seule ERK5 est phosphorylée par MEK5 (Abe et al, 1999; English et al, 1995; Zhou et al, 1995). Il y a donc plus d'un mode de reconnaissance des MAPKK pour leurs substrats. Outre le motif dans la structure primaire et l'environnement tridimensionnel, la spécificité de phosphorylation des MAP kinases par leurs MAPKK respectives est régulée par des interactions protéine-protéine spécifiques (voir section 1.5.3.2, page 100) qui peuvent en plus inclure la présence de protéines d'échafaudage (Qi & Elion, 2005; Tanoue & Nishida, 2003).

1.5.2.2.2 Localisation subcellulaire des MAPKK

MEK1 et MEK2 possèdent un NES riche en leucine qui assure leur localisation cytoplasmique (Fukuda et al, 1996; Lenormand et al, 1993; Moriguchi et al, 1995; Zheng & Guan, 1994). Les résidus leucine qui le composent sont conservés chez les autres MAPKK de mammifères et de *S. cerevisiae*, mais dans une région plus éloignée de leur extrémité N-terminale. C'est notamment le cas de MKK6 (Hashimoto et al, 2000). MKK3 et MKK6 (Ben-Levy et al, 1998; English et al, 1995), tout comme les MAPKK de levure Pbs2 (Ferrigno et al, 1998) et Pek1 (Madrid et al, 2006) ont été observées dans le cytoplasme. En revanche, MEK5 réside au noyau, indépendamment de son état d'activation (Raviv et al, 2004). Néanmoins, la plupart des MAPKK transitent par le noyau, d'autant plus lorsqu'elles sont activées (Furuno et al, 2001; Jaaro et al, 1997; Kim & Kahn, 1997; Tolwinski et al, 1999; Yao et al, 2001).

1.5.2.3 MAP kinases

L'obtention des structures cristallines des MAP kinases p38 α (Chang et al, 2002; Wang et al, 1997; Wilson et al, 1996), JNK1 (Heo et al, 2004), JNK3 (Xie et al, 1998), Fus3 (Remenyi et al, 2005) et ERK2 (Zhang et al, 1994), dont plusieurs à l'état actif (Bellon et al, 1999; Bhattacharyya et al, 2006; Canagarajah et al, 1997), est venue

compléter les informations données par les structures primaires (Boulton et al, 1991) et de nombreuses études biochimiques. Ainsi, les MAP kinases ressemblent structurellement aux autres phosphotransférases (Figure 1-25). Toutefois, leur activité catalytique n'est pas dépendante d'une sous-unité régulatrice, mais plutôt de la phosphorylation des deux résidus du motif TXY situé dans la boucle d'activation. Cette dernière obstrue l'accès des substrats au site actif lorsqu'elle n'est pas phosphorylée, mais la diphosphorylation des résidus activateurs engendre un changement de conformation qui expose le site actif, et qui est accompagné par une rotation des lobes N- et C-terminaux afin de former le site catalytique (Canagarajah et al, 1997; Hoofnagle et al, 2001; Hoofnagle et al, 2004; Remenyi et al, 2005; Zhang et al, 1994).

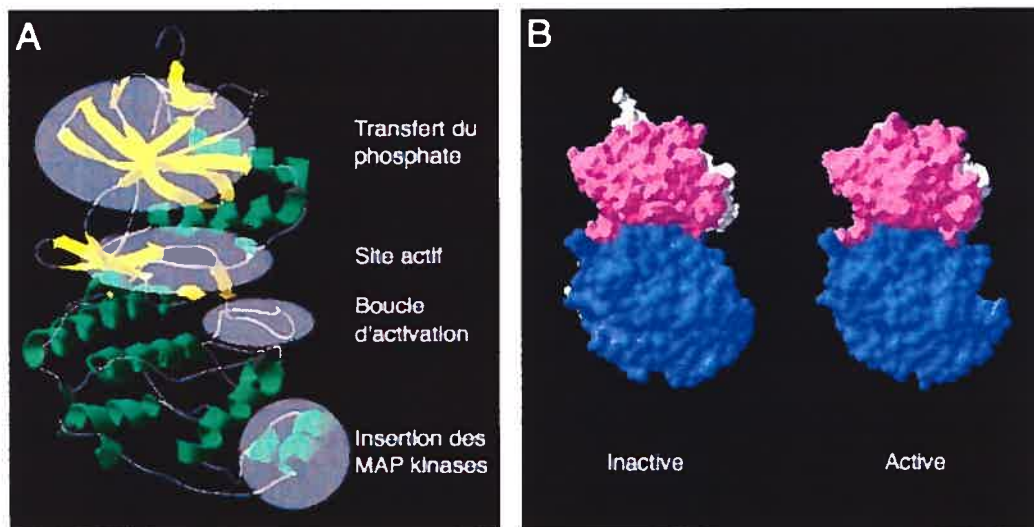


Figure 1-25 **Structure et activation de ERK2**

A) Structure cristalline de la forme active de la MAP kinase ERK2 (Canagarajah et al, 1997) avec les principales régions catalytiques et distinctives mises en lumière. B) Rapprochement des lobes N-terminal (rose) et C-terminal de ERK2 (bleu) lors de l'activation afin d'optimiser le positionnement des résidus de la catalyse.

Une autre région affectée par cette phosphorylation activatrice est l'insertion des MAP kinase (*MAP kinase insert*; MKI). Ce dernier est formé par deux hélices α entre les sous-domaines catalytiques X et XI. Bien que plusieurs évidences démontrent son importance pour des interactions protéine-protéine particulières (Chou et al, 2003; Lee et al, 2004; Robinson et al, 2002; Whitehurst et al, 2004b), le rôle du MKI demeure mal défini. Cette insertion est aussi présente chez les CDK (Hanks & Hunter, 1995; Widmann et al, 1999), avec qui les MAP kinases partagent également des propriétés de transit nucléocytoplasmique ainsi qu'une préférence pour phosphoryler les résidus sérine ou thréonine suivis d'une proline (Yang & Kornbluth, 1999).

1.5.2.3.1 *Substrats des MAP kinases*

Parmi les trois composantes des voies MAP kinases, ce sont les MAP kinases elles-mêmes qui ont le plus grand nombre de substrats. Tandis que les MAPKKK phosphorylent les MAPKK d'une ou de quelques voies et que les MAPKK, très sélectives, phosphorylent exclusivement les MAP kinases, ces dernières ont de multiples substrats dont la nature, la fonction ainsi que la localisation subcellulaire varient grandement. Pour ERK1/2, plus de 160 cibles de phosphorylation sont répertoriées (Yoon & Seger, 2006). Celles-ci incluent des kinases en amont comme Raf (Anderson et al, 1991; Brummer et al, 2003; Dougherty et al, 2005), MEK1/2 (Matsuda et al, 1993) et EGFR (Northwood et al, 1991), des kinases en aval comme les MK (Gaestel, 2006; Mukhopadhyay et al, 1992; Roux & Blenis, 2004), la phospholipase A₂ cytosolique (cPLA₂); (Nemenoff et al, 1993), des protéines du cytosquelette (Huang et al, 2004a; Wong & Cheng, 2005), ainsi que plusieurs régulateurs du cycle cellulaire (Meloche & Pouyssegur, 2007; Wilkinson & Millar, 2000). Cependant, comme pour la plupart des MAP kinases, les substrats de ERK1/2 sont majoritairement des facteurs de transcription (Holmberg et al, 2002b; Whitmarsh, ; Yoon & Seger, 2006; Zarubin & Han, 2005). Cette phosphorylation induit des changements conformationnels, et module l'activité des facteurs de transcription en affectant leur liaison à l'ADN, leurs

interactions avec d'autres protéines régulatrices, leur synthèse et dégradation, ainsi que leur localisation subcellulaire (Yang et al, 2003a).

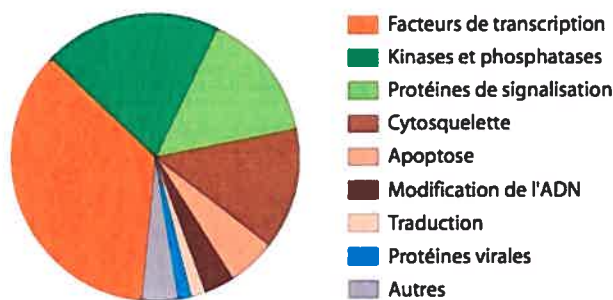


Figure 1-26 **Substrats des MAP kinases ERK1 et ERK2**

Répartition des substrats de ERK1 et ERK2 répertoriés. Pour plus de détails, voir aussi Tableau 1-VI, page 47.

Adapté de (Yoon & Seger, 2006)

Le consensus optimal de phosphorylation par une MAP kinase est donné par la séquence PXS/TP, où le site de phosphorylation est donné par une sérine ou une thréonine (S/T) précédée d'une proline en position P-2, puis de n'importe quel acide aminé (X), et suivi d'une autre proline en position P+1 (Songyang et al, 1996). Les résidus proline permettent au substrat d'aller se loger au site actif entre les deux lobes catalytiques (Lee et al, 2004). Bien que cette séquence soit préférentiellement ciblée par les MAP kinases, la proline en position P-2 n'est pas conservée chez tous les substrats, alors que celle qui est en position P+1 est essentielle, sans toutefois être suffisante (Clark-Lewis et al, 1991; Mahalingam & Cooper, 2001). Ceci explique que plusieurs MAP kinases se chevauchent dans leurs substrats respectifs (Fukunaga & Hunter, 1997; Roux & Blenis, 2004; Waskiewicz et al, 1997). Néanmoins, les MAP kinases de la sous-famille ERK1/2 exercent une phosphorylation préférentielle sur les résidus baignant dans un environnement basique

alors que ceux de la famille JNK favorisent un contexte d'acides aminés acides (Mukhopadhyay et al, 1992). Somme toute, une sélectivité pour des cibles particulières peut être atteinte de différentes manières, notamment par des interactions stables et spécifiques (Somsen et al, 2002).

1.5.2.3.2 Localisation subcellulaire des MAP kinases

Afin de pouvoir générer une réponse efficace et coordonnée, les MAP kinases doivent avoir accès à leurs cibles aux moments opportuns et pour une durée appropriée. Toutefois, chaque MAP kinase possède une grande variété de substrats dont la localisation dans la cellule est toute aussi diversifiée. Ceux-ci se retrouvent inclusivement dans le cytoplasme, le noyau, associés au cytosquelette, à des organelles ou à la membrane plasmique; ce qui sous-entend que les MAP kinases doivent naviguer d'un lieu à un autre de la cellule. Or, à l'exception de ERK5 (et possiblement ERK7) qui possède un NLS, aucune MAP kinase n'a dans sa séquence primaire un signal de ciblage sub-cellulaire de type NLS, NES ou autre. En outre, la taille relativement petite des MAP kinases leur permet de diffuser passivement de part et d'autre du pore nucléaire.

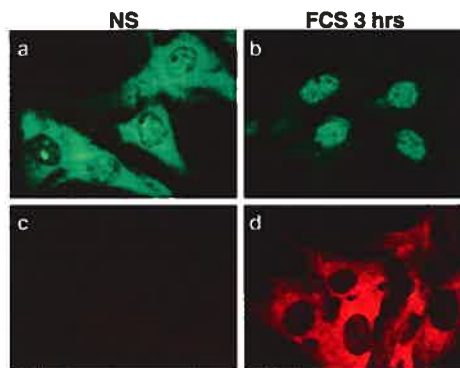


Figure 1-27 Localisation subcellulaire de ERK1/2

Localisation de ERK1/2 (a, b) et de leur forme active (c, d) en absence (NS; a, c) ou en présence (FCS 3 hrs; b, d) de sérum.

Tiré de (Volmat et al, 2001)

Pourtant, on rapporte un changement de localisation cellulaire chez la plupart des MAP kinases en réponse à divers stimuli ou agents pharmacologiques. Par exemple, ERK1/2 passent rapidement du cytoplasme au noyau en réponse à des agents mitogéniques (Chen et al, 1992; Costa et al, 2006; Gonzalez et al, 1993; Horgan & Stork, 2003; Lenormand et al, 1993; Murphy et al, 2002; Volmat et al, 2001). C'est cette localisation nucléaire qui leur permet d'induire l'expression d'une multitude de gènes, l'entrée dans le cycle cellulaire ainsi que la synthèse d'ADN (Adachi et al, 2002; Brunet et al, 1999b; Formstecher et al, 2001; Gervais et al, 2006; Hulleman et al, 1999; Marena et al, 2006; Whitehurst et al, 2004a). L'activation de plusieurs autres MAP kinases conduit également à leur relocalisation au noyau. C'est notamment le cas de Fus3 (Choi et al, 1999; van Drogen et al, 2001), Kss1 (Ma et al, 1995) et Mpk1 (van Drogen & Peter, 2002) de levure, tout comme de JNK1 de mammifère (Aplin et al, 2002; Cavigelli et al, 1995; Cheng & Feldman, 1998; Gonzalez et al, 1993). p38 (Aplin et al, 2002; Cheng & Feldman, 1998) ainsi que ses orthologues Hog1 de *S. cerevisiae* (Ferrigno et al, 1998; Mattison & Ota, 2000; Reiser et al, 1999) et Spc1 de *S. pombe* (Gaits et al, 1998; Nguyen et al, 2002) s'accumulent également au noyau suite à leur activation, et ce, en dépit du fait que leur export nucléaire s'en voit aussi accru (Ben-Levy et al, 1998; Reiser et al, 1999). En outre, d'autres MAP kinases comme ERK3 (Cheng et al, 1996; Julien et al, 2003), ERK5 (Buschbeck & Ullrich, 2005; Esparis-Ogando et al, 2002; Kondoh et al, 2006; Raviv et al, 2004; Yan et al, 2001), ERK7 (Abe et al, 1999) et NLK (Kanei-Ishii et al, 2004) sont actives dans le noyau. De surcroît, même en l'absence de stimulus, ERK1/2 (Ando et al, 2004; Costa et al, 2006; Furuno et al, 2001; Horgan & Stork, 2003; Volmat & Pouyssegur, 2001) ainsi que plusieurs autres MAP kinases (Aberg et al, 2006; Gaits & Russell, 1999; Julien et al, 2003; Kondoh et al, 2006; van Drogen et al, 2001) font partie d'un processus dynamique de transit nucléo-cytoplasmique.

1.5.2.3.2.1 Entrée au noyau

Bien que davantage décrites chez ERK1/2, une localisation cytoplasmique et une accumulation nucléaire suite à leur activation semblent, somme toute, applicables à une majorité de MAP kinases. Cette translocation se produit de manière indépendante du cytosquelette d'actine (Liu et al, 2004). De plus, l'entrée au noyau des MAP kinases ne requiert pas d'activité catalytique, mais nécessite la phosphorylation sur leur deux résidus activateurs (Costa et al, 2006; Gaits et al, 1998; Horgan & Stork, 2003; Khokhlatchev et al, 1998; Lenormand et al, 1998; Ma et al, 1995). L'entrée au noyau de ERK1/2 se fait d'abord de manière forte et rapide, puis de manière moins importante dans son intensité, mais d'une durée plus soutenue (Burack & Shaw, 2005; Horgan & Stork, 2003), à l'image de leur cinétique d'activation (Figure 1-34, page 125). De plus, l'accumulation nucléaire ne nécessite qu'une activation transitoire (Horgan & Stork, 2003), et se fait elle aussi à la manière d'un interrupteur, requérant un seuil d'activation (Faustino et al, 2006; Whitehurst et al, 2004a). Par contre, l'activité de la MAPKK se doit d'être soutenue pour permettre l'accumulation nucléaire de la MAP kinase (Costa et al, 2006). En outre, l'entrée au noyau s'accompagne d'une dissociation entre la MAP kinase et la MAPKK (Adachi et al, 1999; Adachi et al, 2000; Burack & Shaw, 2005; Fukuda et al, 1997c; Horgan & Stork, 2003; Wolf et al, 2001). Cette dissociation est suffisante pour l'accumulation nucléaire de ERK1/2, mais le lieu où celle-ci se produit demeure méconnu.

La taille de la majorité des MAP kinases dont ERK1/2, est suffisamment petite pour leur permettre de franchir le NPC par diffusion facilitée sans transporteurs ni apport énergétique (Burack & Shaw, 2005; Shibayama et al, 2002; Whitehurst et al, 2002). En effet, l'activation de ces dernières augmente leur affinité pour les motifs FG des Nup de la surface cytoplasmique ou nucléaire du NPC (Lee et al, 2004; Matsubayashi et al, 2001; Whitehurst et al, 2002). ERK2 doit interagir avec le NPC afin de pouvoir le franchir (Shibayama et al, 2002). De manière concomitante, la vitesse d'import et d'export nucléaire de ERK1 (Ando et al, 2004) et ERK2 (Costa et al, 2006) augmente avec leur activation.

Par ailleurs, de multiples évidences suggèrent l'existence d'un second mécanisme d'entrée au noyau. La MAP kinase ERK de drosophile (dERK), dans sa forme activée, lie *Drosophila importin 7* (DIM-7), et Ketel (Baker et al, 2002; Lorenzen et al, 2001; Vrailas et al, 2006), des orthologues respectives des importines α et β , possédant chacune un domaine de liaison à Ran, ce qui suggère une implication dans le transport actif. De plus, l'accumulation nucléaire de dERK requiert DIM-7 et/ou Ketel (Lorenzen et al, 2001). De même, un excès d'importine β bloque l'import de ERK1/2 (Matsubayashi et al, 2001). En outre, l'entrée au noyau de chimères de ERK2 avec une masse moléculaire trop importante pour diffuser librement dans le NPC, est possible, mais requiert un apport énergétique (Adachi et al, 1999; Matsubayashi et al, 2001).

Il a été proposé que ce soit la forme monomérique de ERK1/2 qui traverse le NPC sans apport énergétique, alors que le transport actif permet la translocation d'un complexe de ERK1/2 sous forme de dimère ou associées à d'autres protéines (Adachi et al, 1999). De plus, une proportion plus considérable de dimère franchit le NPC lors des premiers événements d'entrée au noyau, l'entrée de la forme monomérique devenant par la suite plus importante (Horgan & Stork, 2003). Sous forme active, ERK1 (Philipova & Whitaker, 2005) et ERK2 (Khokhlatchev et al, 1998) peuvent former des homo- et des hétérodimères. Le dimère formé est alors trop volumineux pour diffuser dans le NPC et nécessite un apport énergétique afin de le franchir. Or, la dimérisation de ERK1/2 n'est pas impliquée dans le passage du NPC (Burack & Shaw, 2005; Wolf et al, 2001). En outre, ce mécanisme n'est pas universel puisque JNK2 peut former des dimères indépendamment de son état d'activation (Wilsbacher et al, 2006), alors que p38 γ , même dans sa forme active, n'en forme pas du tout (Bellon et al, 1999). Par contre, la *Green fluorescent protein* (GFP) s'assemble en dimères (Yang et al, 1996). Cette protéine est souvent greffée à des MAP kinases lors d'études de localisation subcellulaire (Horgan & Stork, 2003; Matsubayashi et al, 2001; Rubinfeld et al, 1999; Shibayama et al, 2002; van Drogen et al, 2001; Whitehurst et al, 2002; Wolf et al, 2001) et pourrait induire artificiellement leur dimérisation.

1.5.2.3.2.2 Sortie du noyau

La sortie du noyau et le retour vers le cytoplasme sont généralement attribués à l'association de la MAP kinase à une MAPKK possédant un NES (Ajenjo et al, 2004; Burack & Shaw, 2005; Fukuda et al, 1997b; Fukuda et al, 1997c; Rubinfeld et al, 1999). Ainsi, les MAP kinases peuvent servir de cargo dans un mécanisme de transport actif (Adachi et al, 2000) tout comme elles peuvent ressortir du noyau par un autre mécanisme n'impliquant pas d'apport énergétique (Burack & Shaw, 2005; Ranganathan et al, 2006). De plus, la déphosphorylation des résidus activateurs des MAP kinases n'est pas requise pour leur export nucléaire (Horgan & Stork, 2003; Mattison & Ota, 2000). Enfin, les mécanismes d'entrée et de sortie du noyau semblent de plus en plus s'inscrire dans un processus dynamique et cyclique, et dont les mécanismes de régulation demeurent en grande partie méconnus.

1.5.2.3.2.3 Cycle nucléo-cytoplasmique

À l'état inactif, ERK1/2 entrent au noyau par diffusion facilitée et peuvent en ressortir de la même manière, mais c'est l'export actif qui assure principalement leur accumulation cytoplasmique. Alors que le transit nucléo-cytoplasmique de l'importine β demeure constant même après une stimulation, l'activation de ERK1/2 se traduit par une hausse de leur vitesse d'entrée et de sortie du noyau (Ando et al, 2004); (Figure 1-28). En outre, l'affinité de ERK1/2 pour les Nup (Lee et al, 2004) comme pour les importines (Lorenzen et al, 2001) va de pair avec leur activation. Conséquemment, une meilleure liaison à des transporteurs ainsi qu'aux motifs FG des Nup permet d'expliquer l'augmentation de la vitesse de transit de ERK1/2. Des variations dans les cinétiques d'import et d'export nucléaire peuvent quant à elles, expliquer en partie l'accumulation nucléaire de ERK1 (Ando et al, 2004) et ERK2 (Costa et al, 2006) puisque le passage à travers le NPC ne représente pas l'étape limitante de ce processus (Burack & Shaw, 2005).

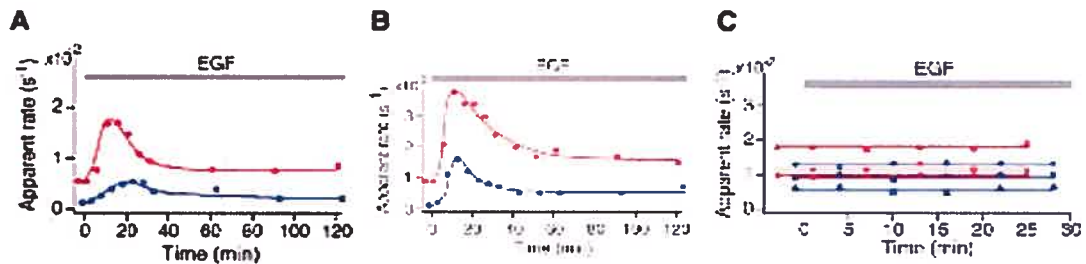


Figure 1-28 Vitesses d'import et d'export nucléaire

Cinétique de la vitesse d'entrée (rouge) et de sortie (bleu) du noyau de ERK1 (A, B) et l'importine β (C) en réponse à 10 ng/ml (A) ou 100 ng/ml (B, C) d'EGF.

Tiré de (Ando et al, 2004)

En revanche, l'accumulation nucléaire de ERK1/2 est tributaire de l'équilibre de liaison entre ces MAP kinases et leurs ancres cytoplasmiques et nucléaires (Burack & Shaw, 2005; Callaway et al, 2005). De plus, l'accumulation nucléaire requiert la néosynthèse de protéines (Lenormand et al, 1998) et est associée à l'inactivation de ERK1/2 (Volmat et al, 2001);(Figure 1-27, page 87). Des MAP kinases phosphatases nucléaires (Tableau 1-XII, page 99) induites par ERK1/2 semblent toutes désignées pour jouer ce double rôle d'inactivation et d'ancrage (Costa et al, 2006; Lenormand et al, 1998; Mattison & Ota, 2000; Pouyssegur & Lenormand, 2003; Pouyssegur et al, 2002; Tresini et al, 2007; Volmat et al, 2001). Puisque le transport dans le NPC est bidirectionnel et semble dépendre de leur affinité pour les Nup, la désactivation nucléaire de ERK1/2 est suffisante pour favoriser leur accumulation au noyau.

En bref, l'activation de ERK1/2 favorise leur liaison aux Nup et à des transporteurs, ce qui leur permet de franchir le NPC jusqu'au noyau où elles sont désactivées de sorte qu'elles ne peuvent plus franchir le NPC aussi facilement vers le cytoplasme. En effet, suite à leur inactivation, l'affinité de ERK pour les karyophérines DIM-7 et Ketel s'en voit

décru tout comme celle de ERK1/2 pour les Nup, ce qui favorise leur exclusion du NPC. De surcroît, ERK2, JNK2 et p38 α peuvent toutes trois affecter positivement comme négativement l'activité de Ran GAP et son effet sur l'import nucléaire de protéines (Faustino et al, 2006). Ceci pourrait en outre influencer la vitesse de leur propre transit nucléo-cytoplasmique. Enfin, la présence des MAP kinases au sein de complexes avec des protéines nucléaires (Section 1.5.3.3, page 118) pourrait également contribuer à leur rétention nucléaire.

1.5.3 Mécanismes de régulation des voies MAP kinase

De manière complémentaire à la structure et aux composantes des voies MAP kinases, plusieurs modes de régulation sont conservés entre les voies, et d'une espèce à l'autre. Une multitude de modes de régulation permet d'intégrer des signaux diversifiés et de générer une réponse spécifique malgré le recours à des kinases pourtant si analogues. En effet, l'activation d'une seule parmi la quinzaine de MAP kinases que comptent les mammifères peut engendrer plusieurs réponses différentes, certaines étant parfois même opposées (Breitkreutz & Tyers, 2002; Ebisuya et al, 2005; Schaeffer & Weber, 1999; Tan & Kim, 1999).

Les mécanismes de signalisation sont semblables à une partie d'échecs dans laquelle un nombre limité de pièces se déplaçant de manière déterminée peut néanmoins générer une quantité quasi-infinie de possibilités de positions et de stratégies (Kolch, 2005). Ainsi, les voies MAP kinases sont coordonnées de manière spatio-temporelle par des combinaisons de phosphorylation/déphosphorylation ainsi que par des interactions avec différents partenaires, et ce, dans différents contextes subcellulaires. Donc, la régulation à divers niveaux permet simultanément à plusieurs MAP kinases de générer une grande variété de réponses biologiques qui n'en demeurent pas moins spécifiques et adaptées.

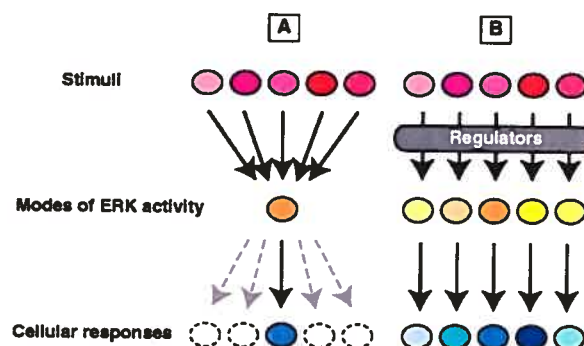


Figure 1-29 **Intégration de multiples signaux par une seule MAP kinase**

Modèles de signalisation par les MAP kinases activées par de multiples stimuli. A) Tous les signaux convergent vers une MAP kinase avec un seul mode de régulation spatio-temporelle, ce qui génère un seul type de réponse. B) Le recours à plusieurs régulateurs permet à la MAP kinase d’agir de multiples manières à partir de multiples endroits. Conséquemment, elle génère des réponses adaptées et spécifiques.

Tiré de (Ebisuya et al, 2005)

1.5.3.1 Phosphorylation

Puisqu’elles sont constituées en modules de trois kinases, la phosphorylation est le mode de régulation de prédilection des voies MAP kinases. En effet, l’ensemble des MAPKKK, des MAPKK et des MAP kinases sont activées par phosphorylation (bien que cela ne semble pas la seule condition de l’activation des MAPKKK) . Le contrôle de l’état de phosphorylation des MAP kinases contribue à la spécificité du signal en affectant sa durée, son intensité ainsi que sa localisation (Ebisuya et al, 2005; Marshall, 1995; Murphy & Blenis, 2006).

1.5.3.1.1 Sites activateurs

Cette phosphorylation au cœur de l’activation séquentielle des kinases de la voie a lieu dans leur boucle d’activation. Conséquemment, la mutation de ces résidus activateurs

en acides aminés chargés négativement (aspartate et glutamate) et phosphomimétiques a pour effet d'activer constitutivement les MAPKKK (Baccarini, 2005; Chong et al, 2003) et MAPKK (Huang & Erikson, 1994) en les maintenant dans une conformation active. La délétion de leur domaine régulateur et auto-inhibiteur rend également les MAPKKK constitutivement actives (Cairns et al, 1992; Stanton & Cooper, 1987; Xu et al, 1996).

Toutefois, la substitution des résidus thréonine et tyrosine activateurs par des résidus aspartate et/ou glutamate chez les MAP kinases n'engendre pas d'effet phosphomimétique (Zhang et al, 1995). Au contraire, elle abolit leur activité phosphotransférase comme le fait toute substitution pour des résidus non phosphorylables (Lenormand et al, 1993). Effectivement, les changements de conformation induits par la phosphorylation de la tyrosine puis de la thréonine sont trop importants pour être reproduits par une permutation de ces résidus avec des acides aminés chargés négativement (Canagarajah et al, 1997). Ceci explique également que, contrairement à MEK1/2 et Raf, les MAP kinases ERK1/2 ne possèdent aucune mutation dans leur boucle d'activation leur conférant des propriétés oncogéniques découlant d'une activation constitutive (Widmann et al, 1999).

1.5.3.1.2 Autres sites régulateurs

Plusieurs autres sites de phosphorylation ont été répertoriés chez différentes composantes des voies MAP kinases. Par exemple, chez les protéines de la sous-famille Raf ainsi que chez leurs orthologues de nématode et de drosophile plusieurs résidus autres que leurs sites activateurs sont phosphorylés, et ce de manière dépendante de ERK1/2 dans une boucle de rétroaction négative (Anderson et al, 1991; Brummer et al, 2003; Dougherty et al, 2005); (voir aussi Section 1.5.3.4.2, page 128). Par ailleurs, la protéine Akt phosphoryle d'autres résidus conservés, ce qui se traduit par une baisse de l'activité catalytique de Raf (Chong et al, 2001). Inversement, la mutation de ces sites en résidus non phosphorylables augmente l'activité catalytique de Raf. On retrouve aussi des effets similaires chez la MAPKK MKK4 suivant sa phosphorylation par Akt (Park et al, 2002).

La MAPKK MEK1 possède quant à elle trois sites régulant négativement son activité. Le premier correspond à la thréonine 292, qui est phosphorylée rétroactivement par ERK1/2 (Matsuda et al, 1993). Lorsque phosphorylé, ce résidu inhibe alors la phosphorylation de la sérine 298 de MEK1 par *p21-activated kinase 1* (PAK1), événement qui favorise la liaison entre Raf-1 et MEK1, et l'activation subséquente de cette dernière (Eblen et al, 2002; Eblen et al, 2004) ; (Figure 1-36, page 129). Le second site de régulation négative est la thréonine 286 qui est phosphorylée par le complexe CDK5/p35 ce qui en limite les effets aux cellules post mitotiques où CDK5 et son activateur p35 sont exprimées (Sharma et al, 2002). Le troisième, la sérine 212, se retrouve près de la boucle d'activation, et est conservée jusqu'aux MAPKK Ste7 et Pbs2 de *S. cerevisiae* (Gopalbhai et al, 2003).

Chez les MAP kinases, un premier site de régulation négative a récemment été identifié (Peregrin et al, 2006). La phosphorylation de la thréonine 123, un résidu non conservé situé dans le sillon d'amarrage (voir Section 1.5.3.2.2.2, page 106), inhibe l'activation de p38 α par MKK6 en plus de perturber plusieurs interactions protéine-protéine et la phosphorylation de plusieurs substrats. Par contre, la tyrosine 323 de p38 α et p38 β est un site de régulation positive qui augmente l'activité catalytique de ces isoformes indépendamment de l'état de phosphorylation de leur boucle d'activation (Salvador et al, 2005a; Salvador et al, 2005b); (Section 1.4.3.2.1.2, page 65). De la phosphosérine a en outre été détectée chez p38 γ et p38 δ lorsque ces MAP kinases sont phosphorylées *in vitro* par MKK3 ou MKK6 (Fleming et al, 2000). Il en va de même pour la sérine 207 en plus de la thréonine 204 de JNK2 α 2 qui sont phosphorylées *in vitro* par CK2 ou MKK7 (mais pas MKK4) et dont la phosphorylation *in vivo* a en outre été détectée (Fleming et al, 2000). Toutefois, les fonctions biologiques de ces sites identifiés restent méconnues.

Enfin, de la phosphosérine a été détectée chez ERK1 et ERK2 (Gopalbhai & Meloche, 1998; Kohno & Pouyssegur, 1986; Robbins & Cobb, 1992; Vouret-Craviari et al, 1993), ce qui implique que la phosphorylation de ces protéines ne se limite pas aux résidus

thréonine et tyrosine activateurs. Conséquemment, il subsiste au moins un site de phosphorylation chez ERK1 et ERK2 qui demeure inconnu.

1.5.3.1.3 Phosphatases

Puisque la régulation des voies MAP kinases se fait en grande partie par phosphorylation, un phénomène réversible, la déphosphorylation y joue également un rôle prépondérant.

À l'instar de la phosphorylation, la déphosphorylation peut contribuer à l'activation des voies MAP kinases. En effet, la déphosphorylation des membres de la sous-famille Raf par la protéine phosphatase 1 (PP1) et/ou PP2A contribue à préparer ceux-ci à une activation subséquente (Abraham et al, 2000; Adams et al, 2005; Dhillon et al, 2002; Dougherty et al, 2005; Hatakeyama et al, 2003; Jaumot & Hancock, 2001; Ory et al, 2003). Par contre, la déphosphorylation contribue généralement à l'inactivation des voies MAP kinases. Ainsi, PP5 déphosphoryle un résidu activateur de Raf-1 (von Kriegsheim et al, 2006) qui est aussi présent chez B-Raf (Mason et al, 1999), inhibant du coup la signalisation vers les MAPKK et MAP kinases en aval (Shah & Catt, 2006). En outre, PP1, PP2A et PP2C α peuvent déphosphoryler et inactiver plusieurs MAPKK (Casillas et al, 1993; Keyse, 2000; Takekawa et al, 1998; Westermarck et al, 2001; Westermarck et al, 1994). Toutefois, la terminaison des signaux des voies MAP kinases semble plus étroitement contrôlée au niveau de la déphosphorylation des MAP kinases elles-mêmes.

1.5.3.1.3.1 MAP kinase phosphatases

Les phosphatases spécifiques aux MAP kinases, les MAP kinase phosphatases (MKP), se définissent par rapport aux résidus activateurs qu'elles utilisent comme substrat. En effet, puisque la déphosphorylation de la thréonine et/ou de la tyrosine activateurs sont suffisantes pour inactiver les MAP kinases (Anderson et al, 1990), on peut classer les MKP en trois catégories (Farooq & Zhou, 2004): 1) les MKP à simple spécificité sérine/thréonine, comme PP2A et PP2C (Alessi et al, 1995; Keyse, 2000; Takekawa et al,

1998; Warmka et al, 2001; Zhou et al, 2002); 2) les MKP à simple spécificité tyrosine, comme *Striatal-enriched PTP* (STEP), PTP-SL (Buschbeck et al, 2002; Mattison & Ota, 2000; Pulido et al, 1998), PTPBR7 (Ogata et al, 1999) et HePTP (Oh-hora et al, 1999; Pettiford & Herbst, 2000; Saxena et al, 1999; Zhou et al, 2002); 3) les MKP à double spécificité (DS-MKP) pour les résidus activateurs des MAP kinases (Farooq & Zhou, 2004; Keyse, 2000; Theodosiou & Ashworth, 2002).

1.5.3.1.3.1.1 MAP kinase phosphatases à double spécificité

Les treize DS-MKP recensées chez les mammifères contiennent dans leur domaine catalytique deux sites distincts de liaison aux phosphoamino acides (Farooq & Zhou, 2004; Kondoh & Nishida) en plus de la séquence catalytique HCXXXXXR, caractéristique de toutes les phosphatases à l'exception des sérine/thréonine phosphatases (Denu & Dixon, 1998). Les DS-MKP peuvent être subdivisées en quatre catégories (Tableau 1-XII) en fonction des composantes structurales rattachées à leur domaine phosphatase, mais également selon leur localisation subcellulaire et leur sélectivité variable pour les différentes MAP kinases.

La première catégorie (Type I) inclut des DS-MPK d'environ 200 acides aminés qui n'englobent que le domaine catalytique, alors que les autres types de DS-MKP possèdent un domaine de liaison aux MAP kinases (CD; voir aussi section 1.5.3.2.2.2, page 106) en N-terminal de celui-ci. Chez les DS-MKP de Type III, on retrouve en plus un domaine N-terminal (NT) aux fonctions encore méconnues, alors que les DS-MKP de type IV contiennent un domaine PEST (riche en résidus proline, glutamate, sérine et thréonine) à leur extrémité C-terminale.

Tableau 1-XII MAP kinase phosphatases à double spécificité

Nom	Alias	Sélectivité	Localisation subcellulaire
Type I (DS-MKP)			
VHR	DUSP3, TDSP11	ERK>>JNK~p38	Nucléaire
MKP6	DUSP14, MKPL	ERK~JNK>>p38	Cytoplasmique
DUSP18		JNK	
DSP2	DUSP22, JSP1, VHX	p38~JNK>>ERK	Cytoplasmique et nucléaire
MKP8	DUSP26	p38	Nucléaire
Type II (CD) - (DS-MKP)			
MKP1	DUSP1, VH1, CL100	p38>JNK>>ERK	Nucléaire
PAC1	DUSP2	ERK>>JNK~p38	Nucléaire
MKP2	DUSP4, VH2, TYP2	ERK~JNK~p38	Nucléaire
VH3	DUSP5, B23	ERK>>JNK~p38	Nucléaire
MKP3	DUSP6, PYST1, VH6	ERK~ERK5>>JNK~p38	Cytoplasmique
PYST2	DUSP7, MKPX, B59	ERK>JNK	Cytoplasmique
MKP4	DUSP9, PYST3	ERK~p38~JNK	Cytoplasmique et nucléaire
Type III (NT) - (CD) - (DS-MKP)			
MKP5	DUSP10	JNK>p38>>ERK	Cytoplasmique et nucléaire
Type IV (CD) - (DS-MKP) - (PEST)			
VH5	DUSP8, NTPP1	JNK~p38>>ERK	Cytoplasmique et nucléaire
MKP7	DUSP16	JNK~p38>>ERK	Cytoplasmique et nucléaire

Adapté de (Aoyama et al, 2001; Farooq & Zhou, 2004; Kondoh & Nishida, ; Theodosiou & Ashworth, 2002; Todd et al, 1999)

Plusieurs évidences tendent à mettre de l'avant les DS-MKP comme principaux régulateurs négatifs de l'activité MAP kinase. En effet, différentes expériences biochimiques et génétiques suggèrent que PP2A agit au niveau de Raf, davantage comme régulateur positif que négatif de la voie ERK1/2 (Abraham et al, 2000; Adams et al, 2005; Hatakeyama et al, 2003; Ory et al, 2003). En outre, les MKP à simple spécificité tyrosine sont essentiellement cytoplasmiques alors que les MAP kinases peuvent être inactivées au noyau (Volmat & Pouyssegur, 2001). En revanche, la localisation subcellulaire des DS-MKP, bien que spécifique pour chacune, couvre l'ensemble de la cellule. De plus,

l'expression de certaines DS-MKP est induite par des MAP kinases (Brondello et al, 1997; Marti et al, 2001; Zhan et al, 1997), et leur phosphorylation par ces mêmes MAP kinases les stabilise en inhibant leur dégradation (Brondello et al, 1999). De surcroît, plusieurs DS-MKP sont activées par l'association d'une MAP kinase (Camps et al, 1998; Slack et al, 2001) qui vient perturber la liaison intramoléculaire entre le domaine de liaison aux MAP kinases et le site catalytique, permettant alors à ce dernier d'avoir accès à ses substrats (Farooq et al, 2001; Farooq et al, 2003). Enfin, les DS-MKP démontrent une sélectivité à l'endroit de certaines MAP kinases, permettant à une voie MAP kinase d'en inactiver une autre, par l'induction d'une DS-MKP spécifique (Pouyssegur et al, 2002; Zhan et al, 1997). En somme, ces propriétés de régulation croisées entre les MAP kinases et les DS-MKP suggèrent fortement l'existence d'une boucle de rétroaction négative (Section 1.5.3.4.2, page 128) dans laquelle les MAP kinases induisent leur propre déphosphorylation par contact direct ou via l'expression de DS-MKP capables de les inactiver et/ou d'inactiver des MAP kinases d'une autre voie (Farooq & Zhou, 2004; Mandl et al, 2005; Pouyssegur et al, 2002).

1.5.3.2 Interactions stables

Maints stimuli différents génèrent des réponses biologiques bien distinctes en faisant pourtant appel à un nombre limité de MAP kinases et un nombre encore plus restreint de MAPKK (Ebisuya et al, 2005; Murphy & Blenis, 2006). Le cloisonnement spatio-temporel des MAP kinases permet à une seule de ces protéines de générer de multiples signaux à partir de diverses localisations subcellulaires. Il existe dans ce cas une proximité des MAP kinases avec certains effecteurs, cibles et régulateurs précis. La spécificité alors grandement resserrée, le signal peut être en plus modifié dans son intensité et sa durée.

Tableau 1-XIII Types d'interaction des MAP kinases

Interaction	Nature	Sites et motifs impliqués	Région(s) impliquée(s)	Utilisateurs du site d'interaction
Kinase-substrat	Transitoire	Conservés	Catalytique	Multiples
Échafaudage	Stable	Non-conservés	Variables	Unique
Amarrage	Stable	Conservés	Non-catalytique	Multiples

Dans ce dessin, diverses interactions stables régissent les voies MAP kinases (Imajo et al, 2006; Kolch, 2005; Morrison & Davis, 2003; Pouyssegur et al, 2002; Tanoue & Nishida, 2003). La stabilité de ces interactions permet dans certains cas le ciblage des MAP kinases vers des localisations subcellulaires particulières (Tableau 1-XVII, page 120). Les interactions stables sont de deux natures : échafaudage (*scaffold*) et amarrage (*docking*). Dans le premier cas, une protéine d'échafaudage maintient et isole deux ou plusieurs kinases de la cascade. Ces interactions sont exclusives (chaque site de liaison sur la protéine d'échafaudage est occupé par un partenaire) et les protéines d'échafaudage sont peu conservées. À l'opposé, des régions et des motifs conservés servent d'intermédiaires dans les interactions d'amarrage (Tanoue & Nishida, 2003). De plus, les sites d'interaction d'amarrage sont partagés de manière mutuellement exclusive par plusieurs partenaires qui rivalisent entre eux pour lier la MAP kinase (Bardwell et al, 2003). Ainsi, de nombreux substrats et régulateurs lient de la même manière un site d'amarrage sur une MAP kinase. Chaque voie MAP kinase possède ses propres acteurs et interacteurs. Cependant, les principes sont les mêmes et les mécanismes impliqués sont généralement conservés par plus d'une voie.

1.5.3.2.1 Protéines d'échafaudage

La découverte d'une protéine d'échafaudage s'est d'abord faite chez *S. cerevisiae*. Essentielle à la voie de la conjugaison induite par les phéromones, la protéine Ste5 lie simultanément la MAPKKK Ste11, la MAPKK Ste7 et la MAP kinase Fus3 (Flatauer et al,

2005; Hagen et al, 1991; Marcus et al, 1994; Printen & Sprague, 1994; Yablonski et al, 1996). Ensuite, de nombreuses autres protéines aux fonctions homologues ont été identifiées chez les métazoaires. Parmi celles-ci, les β -Arrestines lient Raf-MEK1/2-ERK1/2 et participent au couplage entre cette voie MAP kinase et les RCPG (Hall & Lefkowitz, 2002). Dans le même ordre d'idées, les JIP assemblent une cassette de trois kinases de la voie JNK (Section 1.4.2.4, page 60). Aujourd'hui, des protéines d'échafaudage sont reconnues comme des composantes structurales dans presque toutes les voies MAP kinases (Morrison & Davis, 2003), certaines voies MAP kinase ayant même recours à plusieurs protéines d'échafaudage simultanément (Figure 1-15, page 40).

Contrairement à celles énoncées précédemment, certaines protéines d'échafaudage ont une activité catalytique. C'est notamment le cas de Pbs2, une MAPKK pourvue de domaines supplémentaires lui permettant de lier la MAPKKK Ste11 et la MAP kinase Hog1 (Posas & Saito, 1997). De même, des MAPKKK comme MEKK1 et MEKK2 ont des fonctions d'échafaudage (Cheng et al, 2000; Hall & Lefkowitz, 2002). Homologue à Raf-1, Ksr est une protéine d'échafaudage qui ne possède pas d'activité catalytique, mais qui s'associe néanmoins à une cassette de trois kinases de la voie ERK1/2 (Boudeau et al, 2006; Morrison & Davis, 2003).

Les protéines d'échafaudage ont d'abord un rôle organisationnel. Elles contribuent à l'assemblage et l'isolation de complexes de signalisation fonctionnels (Imajo et al, 2006; Morrison & Davis, 2003; Pouyssegur et al, 2002; Schwartz & Madhani, 2004; Yoshioka, 2004). Celles-ci accueillent généralement deux à trois kinases de la cascade auxquelles s'ajoutent parfois d'autres régulateurs et substrats (Figure 1-30). Ce rapprochement physique entre les kinases, leurs substrats et leurs régulateurs a pour effet d'augmenter la spécificité et l'efficacité du signal (Schwartz & Madhani, 2004), tel qu'observé avec des protéines d'échafaudage synthétiques (Harris et al, 2001) ou chimériques (Inouye et al, 1997; Park et al, 2003). En outre, cette proximité induite a pour effet de rendre la cascade d'activation entièrement processive, de sorte qu'elle sera activée de manière plus linéaire par un signal croissant (Kolch, 2005; Kolch et al, 2005). De surcroît, la propagation du

signal dans la cascade d'activation est accélérée lorsqu'il y a échafaudage, et cet effet est davantage amplifié dans une séquence de trois kinases, plutôt que dans un assemblage n'en comptant que deux (Kolch, 2005). Cependant, l'échafaudage entre une kinase et son substrat annihile toute amplification puisque les protagonistes sont liés au complexe de manière équimolaire.

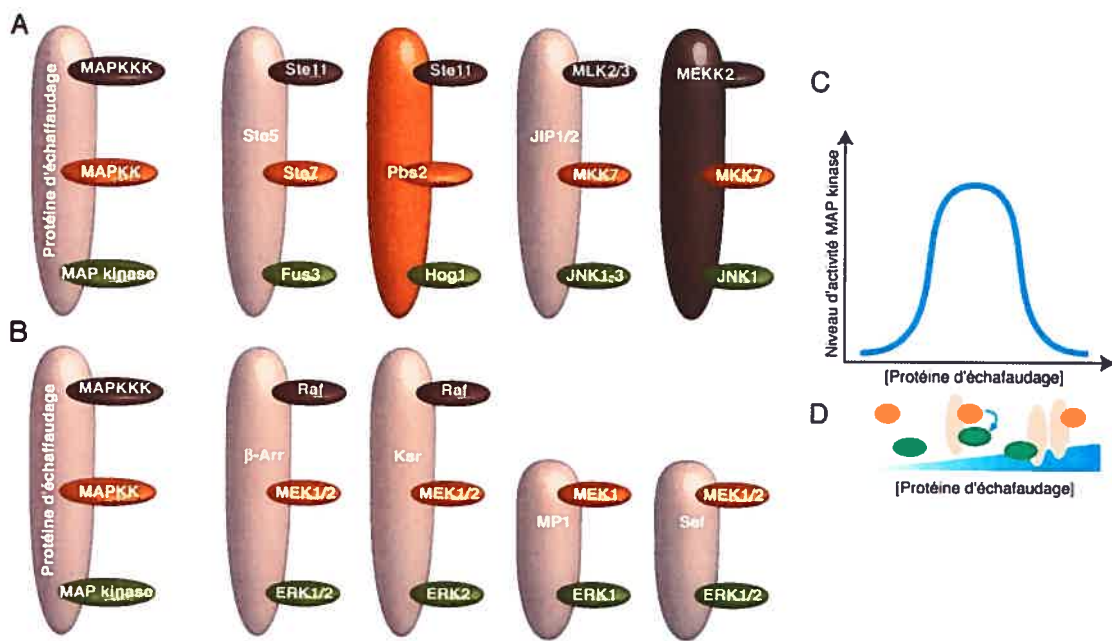


Figure 1-30 Protéines d'échafaudage

A) Représentation de l'assemblage de quelques protéines d'échafaudage de levure et de mammifère abordées dans cet ouvrage. B) Quelques complexes d'échafaudage de la voie ERK1/2. C) Signal transmis par une voie MAP kinase en fonction de la concentration de la protéine d'échafaudage. D) Représentation schématique du couplage et du découplage entre une MAPKK et une MAP kinase selon la concentration de leur protéine d'échafaudage.

Adapté de (Qi & Elion, 2005; Tanoue & Nishida, 2003; Yoshioka, 2004)

Afin de prévenir les débordements et les interférences dans le signal, les protéines d'échafaudage ont aussi pour fonction l'isolation de kinases souvent utilisées par plus d'une voie (Schwartz & Madhani, 2006). Par exemple, la MAPKKK Ste11 est assemblée par Ste5 dans la voie Fus3, alors qu'elle est isolée par Pbs2 dans la voie Hog1. De plus, l'échafaudage de voies MAP kinases peut se faire en des localisations subcellulaires distinctes, ce qui constitue une autre façon de réguler le signal relayé (Harris et al, 2001; Park et al, 2003). De par sa faculté de coupler un effecteur avec son substrat, l'expression croissante d'une protéine d'échafaudage favorise la transmission du signal, jusqu'au point où sa concentration surpasse celle des protéines qu'elle rassemble (Kolch, 2005). La protéine d'échafaudage titre alors les composantes, ce qui se traduit par un découplage de la cascade d'activation (Figure 1-30C et D).

Souvent perçues à tort comme du mortier cimentant des assemblage statiques, les protéines d'échafaudage jouent un rôle dynamique qui dépasse le simple rapprochement physique de kinases avec leurs substrats (Dard & Peter, 2006). Par exemple Ste5 et Ksr ont des cycles dynamiques de localisation subcellulaire et sont temporairement recrutées à la membrane lors de l'activation de leurs voies MAP kinase respectives (Muller et al, 2001; Wang & Elion, 2003). De plus, Ksr est sujette à plusieurs événements de phosphorylation réversibles qui affectent sa stabilité (Muller et al, 2001; Ory et al, 2003; Razidlo et al, 2004). Parallèlement, Ste5 possède une structure mobile (Sette et al, 2000), et favorise l'auto-activation de la MAP kinase Fus3 qui la phosphoryle dans une boucle de rétro-inhibition (Bhattacharyya et al, 2006). De plus, Ste5 transite continuellement entre le noyau et le cytoplasme (Mahanty et al, 1999; van Drogen & Peter, 2001), accentuant davantage son rôle dynamique.

Contrairement aux kinases, il n'y a que très peu de conservation et d'homologie de séquence entre les différentes protéines d'échafaudage (Tableau 1-XIII, page 101). De plus, des motifs et des consensus communs n'ont pas été identifiés, de sorte qu'il est permis de croire que plusieurs protéines d'échafaudage et d'autres régulateurs spatio-temporels restent encore à découvrir. Effectivement, de nouveaux candidats pourraient bientôt

émerger puisque plusieurs initiatives visant le décryptage de réseaux d'interactions engendrent des résultats prometteurs (Jones et al, 2006; Parrish et al, 2006; Rousseau & Schymkowitz, 2005 ; Vidal, 2005).

1.5.3.2.2 Interactions d'amarrage

Contrairement aux interactions kinase-substrat où la liaison est généralement de courte durée et implique le site de transfert du phosphate de l'enzyme, les interactions d'amarrage sont plus stables et impliquent des régions distinctes du site catalytique de la kinase et du site phospho-accepteur du substrat (Pouyssegur & Lenormand, 2003; Tanoue & Nishida, 2002; Tanoue & Nishida, 2003). Ces interactions peuvent avoir cours entre une MAPKKK et une MAPKK, entre une MAPKK et une MAP kinase, mais aussi entre une MAP kinase et d'autres effecteurs. Les interactions d'amarrage et les interactions catalytiques sont généralement complémentaires (Zhou et al, 2006b).

Un même motif d'amarrage peut être lié avec une affinité variable par différentes MAP kinases. C'est-à-dire qu'en se liant à un substrat, une MAP kinase peut empêcher une autre MAP kinase (pouvant appartenir à une différente sous-famille) d'y avoir accès. De manière concomitante, différents régulateurs sont en compétition directe pour le même site de liaison sur une MAP kinase (Bardwell et al, 2003; Qiao et al, 2006). Ce site peut alors être occupé à différents moments par différents régulateurs et effecteurs, contribuant à la spécificité du signal transmis. En outre, la régulation de la spécificité est davantage accrue lorsque plusieurs types d'interactions sont utilisées par un même effecteur. De surcroît, les régulateurs et effecteurs peuvent occuper différentes localisations subcellulaires, ajoutant une dimension spatio-temporelle à la régulation des voies MAP kinases par les interactions d'amarrage (Pouyssegur & Lenormand, 2003; Pouyssegur et al, 2002; Tanoue & Nishida, 2002; Tanoue & Nishida, 2003).

1.5.3.2.2.1 Domaine pour un amarrage versatile

De nombreuses interactions entre une MAPKK et une MAPKKK ont été décrites dans plusieurs voies et organismes. Parmi celles-ci, on retrouve, Raf-1 et MEK1 (Catling et al, 1995; Huang et al, 1993; Van Aelst et al, 1993), MKK4 et MEKK1 (Xia et al, 1998), MKK6 et MEKK4 (Mita et al, 2002) ainsi que Pbs2 et Ssk2/Ssk22 (Tatebayashi et al, 2003). Or, peu de similarités dans les modes de liaison avaient jusqu'alors été relevées. Toutefois, une région d'une vingtaine d'acides aminés permettant de lier des MAPKKK a récemment été identifiée (Takekawa et al, 2005). Conservée chez les sept MAPKK de mammifères, cette région adjacente à la partie C-terminale du domaine catalytique des MAPKK a été nommée *Domain for versatile docking* (domaine pour un amarrage versatile; DVD) car elle permet des liaisons spécifiques entre les MAPKK et certaines MAPKKK. À l'instar des autres interactions d'amarrage, le DVD ne module pas l'activité phosphotransférase des MAPKK, mais demeure essentiel à leur activation spécifique par leurs MAPKKK respectives (Takekawa et al, 2005). Il est présumé que la dissociation du domaine d'auto-inhibition des MAPKKK au moment de leur activation favoriserait la liaison du DVD à leur lobe catalytique N-terminal.

1.5.3.2.2.2 Amarrage commun

Un crible génétique chez la drosophile a permis l'identification d'une mutation de type gain de fonction (*gain of function*) de l'orthologue de ERK1/2 (Brunner et al, 1994). Cette mutation n'active pas constitutivement ERK1/2 et ne favorise pas davantage leur activation par MEK1/2, mais réduit plutôt l'action des phosphatases à leur endroit (Bott et al, 1994). Quelques années plus tard, il fut découvert que le résidu de la mutation est un intermédiaire clé dans une foule d'interactions entre les MAP kinases et de multiples régulateurs en amont comme en aval, incluant notamment des MAPKK, des MKP, des facteurs de transcription (Bardwell et al, 2001; Tanoue et al, 2000) et des MK (Gavin & Nebreda, 1999; Roux & Blenis, 2004; Smith et al, 1999), mais également des protéines

d'échafaudage (Bardwell et al, 2001; Bhattacharyya et al, 2006; Ho et al, 2003; Kurzbauer et al, 2004). De plus, ce type d'interaction est partagé par de nombreuses MAP kinases qui montrent souvent des sélectivités différentes pour un même site (Bardwell et al, 2003; Barsyte-Lovejoy et al, 2004; Ho et al, 2006; Slack et al, 2001; Tanoue et al, 2001b; Yang et al, 1999). Ces interactions sont mutuellement exclusives, et le fait que des MAPKK et des MKP utilisent un même site d'amarrage suggère une séquence d'activation puis d'inactivation, ajoutant une composante temporelle à ce mode de régulation (Pouyssegur et al, 2002).

Tableau 1-XIV Amarrage commun

Quelques partenaires d'interaction des MAP kinases possédant un motif d'amarrage commun. Les résidus basiques **lysine** et **arginine** sont dénotés en bleu, et les acides aminés hydrophobes **leucine**, **isoleucine**, **valine** et **alanine**, en orange. Des essais de liaison, sinon des essais fonctionnels, servent de bases pour déterminer la spécificité. Abréviations non listées utilisées : *FT*, Facteurs de transcription; *Pd*, Phosphodiesterases; *Échaf*, Protéines d'échafaudage.

Adapté de (Ho et al, 2006; Liu et al, 2006; MacKenzie et al, 2000; Roux & Blenis, 2004; Tanoue & Nishida, 2003; Vinciguerra et al, 2004)

Protéine amarrée	Motif d'amarrage commun	Consensus simple	Sélectivité	
<i>MAPKK</i>	MEK1	MPKKKPTPIQLNPAP	+++ (x) ₃ LxL	ERK
	MEK1	NLEALQKKLEELDE	++ (x) ₃ LxL	ERK
	MEK1	ELDEQQRKRLEAFL	+++ (x) ₀ LxLxL	ERK
	MEK2	MLARRKPVLPALINPTIA	+++ (x) _{2,4} LxL	ERK
	MEK2	NLVDLQKKLEELDE	++ (x) ₃ LxL	ERK
	MEK2	ELDEQQRKRLEAFL	+++ (x) ₀ LxLxL	ERK
	MEK5	MLWLAL	(x) ₁ LxLxL	ERK5
	MEK5	LPSNSLKSSAELKKILA	++ (x) _{0,2} LxL	ERK5
	MKK3	ASMPQSKRKKDLRISC	++++ (x) ₁ LxL	p38
	MKK6	MSQSGKRRNPGDKI	+++ (x) ₃ LxL	p38
	MKK4	VSSMQGKRKALKLNF	+++ (x) ₁ LxL	JNK
	MKK7	QENREARRRIDLNLDI	+++ (x) _{0,2} LxLxL	JNK
	MKK7	LDISPQRPRPTLQLPL	+x+ (x) ₂ LxLxL	JNK
	MKK7	PTPPARPRHMLGLPS	+x+ (x) ₂ LxL	JNK
<i>MK</i>	RSK1	SSILAQRVRKLPSTTL	++ (x) _{0,3} L	ERK
	RSK2	RSTLAQRRGIKKITSTAL	++ (x) _{0,4} LxxxL	ERK
	RSK3	SSNLAQRRGMKRLTSTRL	++ (x) _{0,2} L	ERK
	RSK4	ASSLAQRRSMKKRTSTGL	+++ (x) ₄ L	ERK
	MNK2A	QSKLAQRRQASLSSAPV	++ (x) _{2,7} LxL	ERK
	MNK1	KSRLARRRALAQGREGE	+++ (x) ₀ LxLxL	ERK~p38
	MSK1	KAPLAKRRRKMKKTSTST	+++++ (x) _{0,2}	ERK~p38
	MSK2	NAPLAKRRKQKLRSATAS	+++++ (x) ₅ LxL	ERK~p38
	MK2B	NPLLLKRRKKARALEAAAL	+++++ (x) ₃ LxLxL	P38
MK3	NNRLLNKRKKQAGSSAS	+++++ (x) _{1,6} L	P38	
MK5	NNPILRKRKLLGTPKDSV	+++++ (x) _{0,1} L	P38, ERK3/4(?)	
<i>PTP</i>	EC-PTP	GLQERRGSNVSLTLDM	++ (x) ₃ LxLxL	ERK, p38
	HePTP	RLQERRGSNVALMLDV	++ (x) _{3,5} LxLxL	ERK, p38
	STEP	GLQERRGSNVSLTLDM	++ (x) ₃ LxLxL	ERK, p38
<i>DS-MKP</i>	MKP1	FSTIVRRRAKGAAG	+++ (x) _{0,3,6} L	p38~JNK>ERK
	MKP2	CNTIVRRRAKGSVLE	+++ (x) ₄ LxL	p38~JNK>ERK
	PAC1	WNALLRRRARARGPP	+++ (x) ₀ LxL	p38~JNK>ERK
	MKP3	PGIMLRRLQKGNLPVR	++ (x) ₅ LxL	ERK
	MKP4	PALLLRRLRRGSLSVR	++ (x) _{2,5} LxL	ERK
	PYST2	PGLMLRRLRKGNLPIR	++ (x) _{2,5} LxL	ERK
	VH3	NSVVLRRARGGAVSA	++ (x) ₅ LxL	ERK
	MKP5	ADKISRRLQQGITV	+++ (x) ₅ LxL	p38~JNK
	MKP7	SKLMKRRLQQDKVLI	+++ (x) ₅ LxL	p38~JNK
VH5	SKLVKRRLQQGKVTI	+++ (x) ₅ LxL	p38~JNK	
<i>FT</i>	MEF2A	RKPDLRVVIPPS	++ (x) ₂ LxLxL	p38
	SAP-1	RSKKPKGLGLAPTIVIT	++ (x) _{3,6} LxL	ERK~p38
	Elk-1	KGRKPRDELPSPSLL	++ (x) ₃ LxLxL	ERK~p38
	c-Jun	KILKQSMTLNLADPVGSLKP	+xx+ (x) ₄ LxL	JNK>ERK
JunD	MLKKDALTLSLAEQGAAGL	++ (x) ₂ LxLxL	ERK~JNK	
<i>Pd</i>	PDE4	VETKKVTSSGVLLL	++ (x) _{5,6} LxL	ERK
<i>Échaf</i>	JIP1	RPKRPTTLNLF	++ (x) ₃ LxL	JNK
	Ste5	LILAAPKERN	LxLxLx+x+	ERK (Fus3)

De nombreuses études biochimiques (résumées dans (Pouyssegur & Lenormand, 2003; Pouyssegur et al, 2002; Sharrocks et al, 2000; Tanoue & Nishida, 2002; Tanoue & Nishida, 2003)) et structurales (Bhattacharyya et al, 2006; Chang et al, 2002; Heo et al, 2004; Lee et al, 2004; Liu et al, 2006; Remenyi et al, 2005; Zhou et al, 2006a; Zhou et al, 2006b) ont permis de délimiter un motif consensus pour ces interactions d'amarrage. Les appellations ont varié : domaine D (*D domain*), domaine δ , *Kinase interaction motif* (KIM), *Docking for ERK and JNK LXL* (DEJL) (Jacobs et al, 1999; Kallunki et al, 1996; Lee et al, 2004; Pulido et al, 1998; Sharrocks et al, 2000), référant souvent au motif de manière incomplète. Par ailleurs, le terme « motif d'amarrage commun » sera utilisé dans cet ouvrage pour désigner la séquence $(K/R)_{2-4}X_{0-6}LXL$.

Ainsi, le motif consensus débute par un noyau d'au moins deux résidus lysine et/ou arginine. Ce noyau peut contenir jusqu'à six acides aminés basiques parfois entrecoupés d'autres résidus, mais formant néanmoins une région chargée positivement. Au milieu du motif, se trouve une région variable tant dans la nature des acides aminés qui la composent, que dans sa longueur. La fin du motif est habituellement composée de résidus leucine séparés par un acide aminé variable. D'autres résidus hydrophobes comme une valine ou une isoleucine se substituent fréquemment à l'une ou l'autre des leucines du motif. En outre, dans de nombreux cas, des résidus hydrophobes additionnels sont présents à l'extrémité du motif, modifiant la fin du consensus LXL en LXLXL (Bhattacharyya et al, 2006). De surcroît, chez plusieurs MK, un à deux de ces résidus hydrophobes sont présents en N-terminal du noyau basique du motif (Roux & Blenis, 2004).

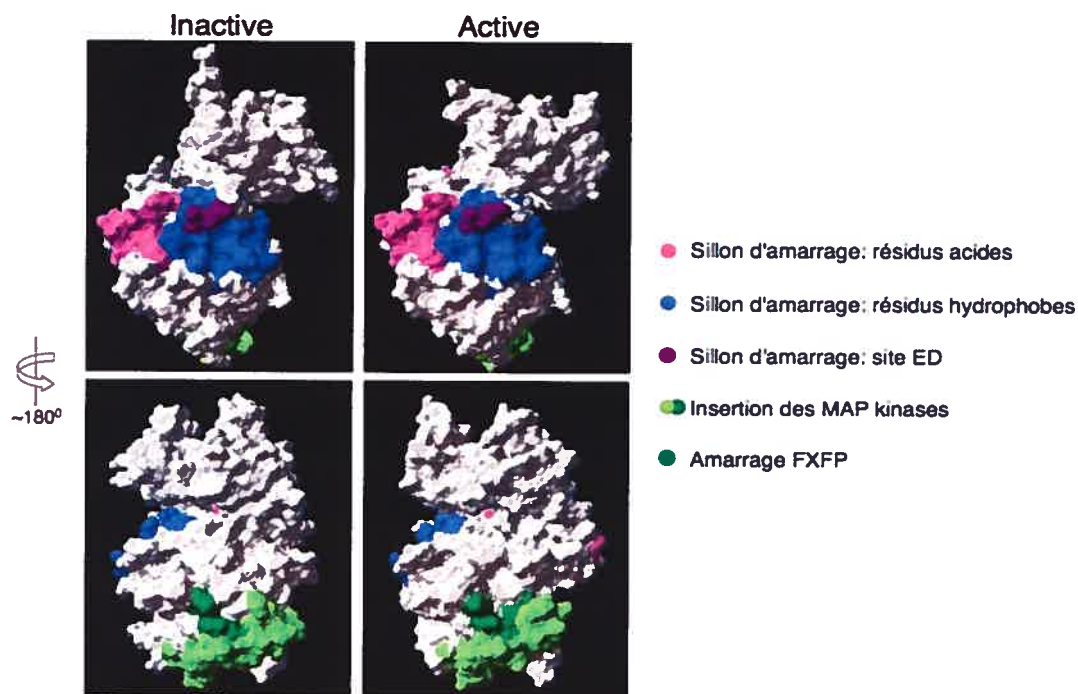


Figure 1-31 Sites d'amarrage des MAP kinases

Modélisation des formes inactive et active de ERK2 montrant les résidus impliqués dans les interactions d'amarrage selon des études effectuées avec les MAP kinases p38 α (Chang et al, 2002), JNK1 (Heo et al, 2004), Fus3 (Bhattacharyya et al, 2006; Remenyi et al, 2005) et ERK2 (Lee et al, 2004; Liu et al, 2006; Zhou et al, 2006b). Les acides aminés impliqués dans la liaison aux résidus basiques du motif d'amarrage sont en rose, ceux liant les résidus hydrophobes sont en bleu, et ceux faisant partie du site ED sont en pourpre. Les résidus du MKI sont en vert, et les plus foncés sont impliqués dans la liaison au motif FXFP. Le changement de conformation induit lors de l'activation expose davantage ces derniers. Figure réalisée en partie avec Swiss-Pdb viewer (Guex & Peitsch, 1997)

Les motifs d'amarrage communs lient le sillon d'amarrage (*docking groove*, aussi connu sous le nom du site CD ou domaine CD) des MAP kinases (Tanoue et al, 2001a; Tanoue et al, 2002; Tarrega et al, 2002). Situé à l'opposé du site actif (Tanoue et al, 2001a) dans le lobe C-terminal (Nichols et al, 2000), le sillon d'amarrage contient des résidus acides complémentaires aux résidus basiques du motif d'amarrage commun. Le sillon d'amarrage contient également les résidus permettant des interactions hydrophobes avec le consensus LXL du motif (Figure 1-31). Au centre des résidus hydrophobes, se retrouve le site ED qui représente un des premiers déterminants de la spécificité. Composé de deux résidus thréonine chez ERK2, le site ED de p38 est formé par un glutamate suivi d'un aspartate, créant alors une charge négative sur la surface de la protéine (Tanoue et al, 2001a). Cette dernière est reconnue spécifiquement par certains substrats de p38 comme MK3.

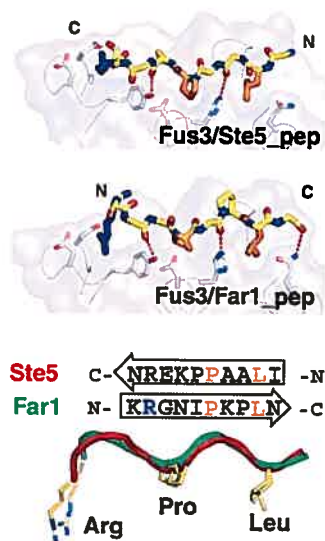


Figure 1-32 **Bidirectionnalité de la liaison d'amarrage commun**

Nonobstant leur orientation respective, les peptides de Ste5 et Far1 sont reconnus de la même manière par le sillon d'amarrage de la MAP kinase Fus3.

Tiré de (Bhattacharyya et al, 2006)

Les liaisons d'amarrage induisent des changements conformationnels significatifs à la fois chez les MAP kinases et chez les régulateurs avec lesquels elles interagissent (Mustelin et al, 2005; Remenyi et al, 2005). En effet, la liaison d'amarrage perturbe l'ordre dans la boucle d'activation des MAP kinases (Bhattacharyya et al, 2006; Zhou et al, 2006b) de sorte que la tyrosine activatrice habituellement enfouie au sein de la protéine se retrouve exposée au solvant, et devient sujette à des événements de phosphorylation et déphosphorylation. Inversement, l'activation de la MAP kinase induit un réarrangement du sillon d'amarrage qui augmente l'affinité des interactions (Hoofnagle et al, 2001). Effectivement, l'association entre ERK1 et la MK *MAP kinase-interacting kinase 1* (MNK1) est plus importante lorsque ERK1 est activée plutôt qu'inactive (Figure 2-19C, page 200). De même, les séquences d'amarrage sont très souples, particulièrement dans leur région variable (Bhattacharyya et al, 2006). Cette souplesse leur permet de lier plusieurs MAP kinases, ou encore de lier une MAP kinase avec différentes orientations, comme c'est le cas avec Ste5 (Figure 1-32), PEA-15 (Callaway et al, 2005) et *ETS2 repressor factor* (ERF); (Polychronopoulos et al, 2006). La bidirectionnalité de ces liaisons pourrait expliquer la présence de motifs d'amarrage commun de part et d'autre du site de phosphorylation de plusieurs substrats (Sharrocks et al, 2000). Dans un même ordre d'idées, plusieurs motifs d'amarrage commun d'apparence plus complexe avec des alternances de noyaux de résidus basiques et hydrophobes ont été répertoriés (Tanoue et al, 2002). Ceux-ci sont candidats à être reconnus dans les deux orientations.

1.5.3.2.2.3 Amarrage FXFP

Un motif distinct d'amarrage aux MAP kinases a été identifié en parallèle. En effet, la séquence conservée FXFP est essentielle à la liaison de nombreuses protéines incluant plusieurs facteurs de transcription, des phosphatases ainsi que A-Raf et Ksr (Jacobs et al, 1999). Les résidus phénylalanine jouent un rôle essentiel dans ces interactions (Fantz et al, 2001), bien qu'ils soient occasionnellement substitués par des résidus tyrosine, contenant

eux aussi un anneau aromatique (Dimitri et al, 2005). Ces interactions sont plus restrictives que les interactions d'amarrage commun puisque seules ERK1/2 (et dans une moindre mesure p38 α), mais pas JNK1 ni p38 β , peuvent reconnaître et lier le motif FXFP (Galanis et al, 2001; Jacobs et al, 1999), d'où le nom *Docking for ERK, FXFP* (DEF) qui lui est parfois attribué.

Tableau 1-XV Amarrage commun versus amarrage FXFP

Comparaison de la reconnaissance des motifs impliquées dans les interactions d'amarrage entre les MAP kinases et leurs substrats.

Motif d'amarrage	Position par rapport au site phosphorylé	Orientation de la reconnaissance	MAP kinases le reconnaissant	Région de reconnaissance sur les MAP kinases
Amarrage commun	N-terminal et C-terminal	Bidirectionnelle	ERK, JNK p38, ERK5	Sillon d'amarrage (face non-catalytique)
Amarrage FXFP	C-terminal	Unidirectionnelle	ERK > p38 α	Insertion des MAP kinases (face catalytique)

Contrairement aux motifs d'amarrage commun, les motifs FXFP ne se retrouvent qu'en C-terminal (Tableau 1-XV), et à une courte distance du site phosphorylé par la MAP kinase (Sharrocks et al, 2000). De manière concomitante, la région des MAP kinases liant les motifs FXFP se retrouve sur la même face de la protéine que le site actif (Lee et al, 2004). En outre, plusieurs résidus impliqués dans la liaison font partie du MKI et sont dévoilés lors de l'activation de la MAP kinase (Figure 1-31, page 110). Ainsi, les interactions d'amarrage FXFP sont plus importantes lorsque cette dernière est activée (Lee et al, 2004). Par exemple, la liaison aux Nup via leurs motifs FG et surtout FXFG est impliquée dans la translocation nucléaire de ERK1 et ERK2 (Matsubayashi et al, 2001; Whitehurst et al, 2002). De même, l'activation de ERK1/2 accroît leur affinité pour les motifs FXFP (smiliares à FXFG) ainsi que leur translocation nucléaire (Ando et al, 2004; Fukuda et al, 1997c; Lenormand et al, 1998; Lenormand et al, 1993).

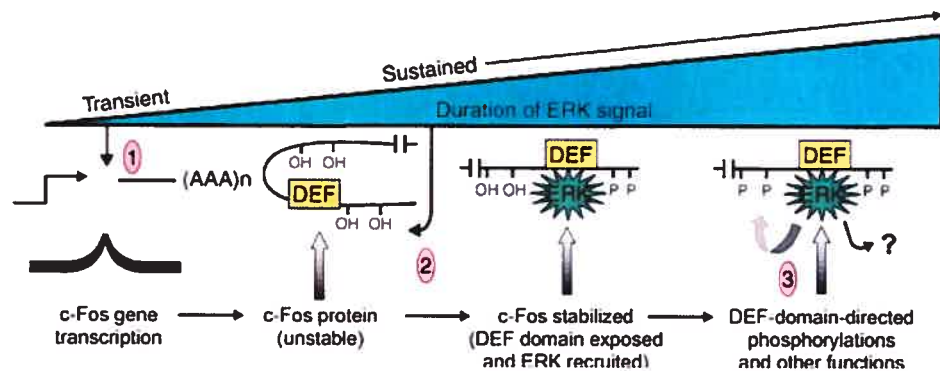


Figure 1-33 Motif FXFP dans la détection de la durée du signal de ERK1/2

Le produit du gène précoce c-Fos est instable sauf s'il est phosphorylé ERK1/2 sur des résidus ciblés par un motif FXFP (DEF).

Tiré de (Assoian, 2002)

Le motif FXFP est requis pour stabiliser l'expression de nombreux gènes précoces initialement induits par l'activation transitoire des MAP kinases ERK1/2 (Murphy et al, 2004; Murphy et al, 2002; Vinciguerra et al, 2004). En effet, la courte demi-vie du produit de ces gènes précoces peut être prolongée par la phosphorylation d'un ou plusieurs résidus spécifiques et dont le motif FXFP avoisinant permet la reconnaissance. Ainsi, la liaison d'une MAP kinase avec une protéine de gène précoce via un motif FXFP confère à cette dernière la propriété de détecter si l'activation des MAP kinases est soutenue ou non (Murphy & Blenis, 2006).

1.5.3.2.2.4 Src-Homology 3

Les voies MAP kinase utilisent parfois des interactions d'amarrage qui ne leur sont pas propres. Le domaine SH3 lie des séquences riches en proline qui sont souvent présentes dans les tyrosines kinases et autres protéines de signalisation précoce (Pawson, 2004). Chez *S. cerevisiae*, la MAPKK et protéine d'échafaudage Pbs2 possède une telle séquence qui est reconnue par le domaine SH3 de l'osmorécepteur Sho1 (Maeda et al, 1995). Cette liaison

permet d'activer la voie MAP kinase Hog1 (Saito & Tatebayashi, 2004); (voir aussi Section 1.3.3, page 35). Du côté des mammifères, Sprouty2 possède également une séquence riche en proline dont la liaison au domaine SH3 du GEF Grb2 empêche l'activation de la voie ERK1/2 par Ras, présumément via une boucle de rétroaction négative (Hanafusa et al, 2002; Lao et al, 2006; Ozaki et al, 2005).

1.5.3.2.2.5 Interactions d'amarrage et spécificités des MAP kinases

Dans des systèmes d'amarrage qui sont partagés par plusieurs MAP kinases homologues ayant nombre d'effecteurs avec des motifs similaires, une spécificité de signal peut être atteinte par différents moyens à la fois subtils et complémentaires.

D'abord par l'expression tissulaire : les MAP kinases ne peuvent interagir avec des protéines qui ne sont pas là. Bien que l'expression des composantes des voies MAP kinases est ubiquitaire (Widmann et al, 1999), celle de leurs partenaires d'interaction ne l'est pas nécessairement. C'est notamment le cas de plusieurs produits de gènes précoces (Murphy et al, 2004).

Au moins deux types d'interactions d'amarrage (commun et FXFP) impliquent les MAP kinases. Ces interactions sont indépendantes les unes des autres. En effet, un type d'interactions d'amarrage peut être perturbé chez une MAP kinase sans que l'autre soit affecté (Dimitri et al, 2005). En outre, l'état d'activation de la MAP kinase modifie l'affinité de ses interactions (Lee et al, 2004). Dans ces deux types d'interactions d'amarrage, le nombre et l'emplacement des motifs sur un substrat déterminent le(s) site(s) de phosphorylation (Fantz et al, 2001). De plus, nombre de partenaires d'interaction possèdent les deux types de motifs (Fantz et al, 2001; Jacobs et al, 1999; MacKenzie et al, 2000). La disposition et la configuration des deux types de motifs contribuent elles aussi à la sélectivité, et donc à la spécificité du signal (Vinciguerra et al, 2004).

Bien que similaires, les sillons d'amarrage des différentes MAP kinases divergent quelque peu. Ces disparités contribuent à la sélectivité, comme le fait le site ED (Tanoue et al, 2001a). Ainsi, les différences de séquence entre les MAP kinases, mais également entre

celles de leurs partenaires permettent d'obtenir de multiples combinaisons aux affinités variables (Fantz et al, 2001; Ho et al, 2006; Tarrega et al, 2005). En outre, plusieurs facteurs à l'intérieur d'un motif d'amarrage commun influencent sa sélectivité. Effectivement, la portion hydrophobe du motif (LXL) est liée avec une plus forte affinité que la portion basique (K/R), et elle prévaut au moment de la reconnaissance par une MAP kinase (Barsyte-Lovejoy et al, 2002; Seidel & Graves, 2002; Xu et al, 2001; Yang et al, 1999). De plus, la nature des acides aminés dans les motifs d'amarrage influence également la sélectivité. C'est particulièrement le cas avec la portion variable du motif d'amarrage commun pour laquelle la composition en acides aminés, mais également la longueur influencent la reconnaissance et la liaison par les MAP kinases (Bhattacharyya et al, 2006; Tanoue et al, 2002; Tarrega et al, 2002). La discrimination des MAP kinases pour un partenaire ou un autre est également affectée par les résidus avoisinant les motifs d'amarrage. C'est notamment le cas de certaines phosphatases (Tarrega et al, 2005), de MK (Roux et al, 2003) et de facteurs de transcription (Seidel & Graves, 2002).

Tableau 1-XVI Amarrage commun des MAPKK

Nombre de motifs d'amarrage présents chez les MAPKK humaines et de *S. cerevisiae*. Le consensus de ces motifs peut souvent être appliqué selon différents cadres de lecture.

<i>S. cerevisiae</i>				<i>H. sapiens</i>			
MAPKK	Motifs d'amarrage	Reconnaisances possibles	MAP kinases	MAPKK	Motifs d'amarrage	Reconnaisances possibles	MAP kinases
Ste7	2	3	Fus3, Kss1	MEK1	3	3	ERK1/2
Pbs2	1	3	Hog1	MEK2	3	4	ERK1/2
Mkk1	1	2	Mpk1	MEK5	2	3	ERK5
Mkk2	1	2	Mpk1	MKK3	1	1	P38 $\alpha/\beta/\gamma/\delta$
				MKK6	1	1	P38 $\alpha/\beta/\gamma/\delta$
				MKK4	1	1	JNK1/2/3
				MKK7	3	4	JNK1/2/3

Les MAPKK constituent un pivot de la spécificité du signal relayé par les voies MAP kinase. Non seulement sont-elles présentes en nombre restreint par rapport aux autres

composantes des cascades MAP kinase (7 MAPKK chez les mammifères pour 20 MAPKKK et 14 MAP kinases), mais les MAPKK forment des interactions d'amarrage spécifiques avec des kinases en amont (DVD) et en aval (amarrage commun), en plus de pouvoir former d'autres interactions spécifiques avec les MAP kinases (Robinson et al, 2002). Plusieurs MAPKK possèdent plus d'un motif d'amarrage commun (Tableau 1-XVI, ci-dessus; Tableau 1-XIV, page 107) et/ou des motifs qui peuvent être interprétés selon différents cadres de lecture (Bhattacharyya et al, 2006; Ho et al, 2006; Remenyi et al, 2005). En effet, le consensus $(K/R)_{2-4}X_{0-6}LXL$ peut être reconnu plusieurs fois de différentes manières au sein de la partie N-terminale d'une MAPKK. Par exemple, le motif d'amarrage commun est recensé trois fois dans cette extrémité de MEK2. La séquence RRKPVLPALTI peut générer les consensus $(K/R)_3X_2LXL$ ainsi que $(K/R)_3X_4LXL$. Si on ajoute à cela les autres motifs répertoriés KKLEELEL et RKRLEAFL qui génèrent les consensus respectifs $(K/R)_2X_3LXL$ et $(K/R)_3LXLXL$, on obtient en tout quatre modes de reconnaissance pour trois motifs sur une seule MAPKK. Si on additionne à tout cela les deux orientations possibles pour la reconnaissance de certains motifs, le nombre de modes de liaison des MAPKK augmente encore.

Ainsi, en plus de reconnaître le motif TXY de la boucle d'activation, les MAPKK peuvent lier les MAP kinases selon différents modes. Ces différences dans le nombre de motifs d'amarrage commun et les manières dont ceux-ci peuvent être reconnus pourraient en partie fournir de nouvelles bases de sélectivité. Elles pourraient en outre contribuer à expliquer non seulement la spécificité d'une MAPKK pour une sous-famille de MAP kinases, mais également une sélectivité pour certaines isoformes à l'intérieur de cette sous-famille. Par ailleurs, les interactions sont de basse affinité entre le sillon et le motif d'amarrage commun, avec un K_M d'environ $5 \mu M$ (Seidel & Graves, 2002), impliquant que ces interactions peuvent se former et se défaire rapidement. Ceci suggère que les MAP kinases pourraient glisser le long de motifs d'amarrage communs en les liant selon différents modes. De surcroît, le motif d'amarrage est très souple et peut être reconnu de plusieurs manières dans deux orientations (Bhattacharyya et al, 2006; Remenyi et al, 2005).

L'ensemble de ces observations soulève la possibilité que les MAPKK, avec les différents motifs d'amarrage qu'elles comportent, soient elles aussi reconnues de différentes manières par les MAP kinases, contribuant encore davantage à la spécificité de leurs interactions et conséquemment, du relais du signal.

En somme, les interactions d'amarrage représentent un mode de régulation conservé requérant des principes de base qui sont partagés par les partenaires. Toutefois, de subtiles disparités créant des affinités différentes permettent d'établir une sélectivité, et de relayer le signal de manière spécifique. Ces interactions peuvent être bloquées de manière spécifique, laissant présager un potentiel thérapeutique pour l'inhibition sélective d'interactions d'amarrage entre une MAP kinase et ses activateurs ou des cibles particulières (Dimitri et al, 2005; Hancock et al, 2005b; Jacobs et al, 1999).

1.5.3.3 Localisation subcellulaire

Une autre façon de générer différents signaux faisant appel aux mêmes composantes est de modifier leur localisation subcellulaire. Un tel exemple est donné par la forme active de ERK1/2 dont l'accumulation nucléaire est suffisante pour induire la différenciation des cellules PC12 en précurseurs neuronaux (Robinson et al, 1998; Traverse et al, 1994). En outre, la littérature fait état de plusieurs cas où une activité cytoplasmique ou nucléaire de ERK1/2 génèrent des résultats différents, parfois même opposés. D'abord, dans l'aile en développement de la drosophile, la prolifération est associée à l'activité nucléaire de dERK, alors que son activité cytoplasmique va de pair avec la différenciation des cellules (Marenda et al, 2006). Ensuite, les différentes phases de la sélection des thymocytes matures requièrent l'activation de ERK1/2 (Alberola-Ila & Hernandez-Hoyos, 2003). Une activation importante, rapide et transitoire de ERK1/2 se fait à la membrane plasmique au cours de la phase de sélection négative (Daniels et al, 2006). Par contre, dans la sélection positive, cette activation de ERK1/2 est plus sensible, mais elle se fait de manière lente et soutenue, partout dans la cellule. Finalement, les fibroblastes sénescents sont incapables de proliférer en réponse à des facteurs de croissance (Kim et al, 2000; Tresini et al, 2001)

puisque ERK1/2 sont prématurément inactivées au noyau par MKP2 et ne peuvent donc pas activer les gènes requis, bien qu'elles demeurent actives dans le cytoplasme (Tresini et al, 2007).

1.5.3.3.1 Ciblage

La localisation subcellulaire d'une MAP kinase peut aussi être affectée par un recrutement vers des complexes protéiques. De tels assemblages modifient les propriétés cinétiques des voies de signalisation tant au niveau de leur activation que de leur inactivation (Pawson & Nash, 2003).

Dans la voie ERK1/2, l'assemblage le mieux documenté est celui dans lequel MEK1/2 retiennent ERK1/2 au cytoplasme (Sections 1.5.2.2.1 et 1.5.2.3.2.1, pages 82 et 89, respectivement). Par ailleurs, plusieurs complexes permettent le ciblage vers différentes organelles. Notamment, le complexe formé de p14 et *MEK partner 1* (MP1); (Kurzbauer et al, 2004; Teis et al, 2002; Wunderlich et al, 2001), à l'instar de certaines β -Arrestines (Abe et al, 2001; DeFea et al, 2000; Luttrell et al, 2001; Tohgo et al, 2002), recrute des composantes de la voie ERK1/2 aux endosomes, possiblement à des fins d'activation (Tableau 1-XVII). De son côté, *Similar expression to FGF genes* (Sef) empêche leur accumulation nucléaire en les ciblant au Golgi (Mor & Philips, 2006; Tanoue & Nishida, 2002; Torii et al, 2004b). La rétention cytoplasmique des formes actives de ERK1/2 est un mécanisme utilisé pour inhiber la prolifération des cellules embryonnaires après une première différenciation (Smith et al, 2004). C'est aussi ce mécanisme de régulation qui est conservé dans le développement de la drosophile (Kumar et al, 2003a; Kumar et al, 1998; Marena et al, 2006).

Certains candidats permettent la rétention cytoplasmique ou l'exclusion nucléaire de ERK1/2 sans affecter l'activité catalytique de ces dernières. C'est notamment le cas de RSK (Kim et al, 2006) de drosophile, ainsi que de *Four and a half LIM domain 2* (FHL2) chez les cardiomyocytes de mammifères (Purcell et al, 2004). L'importine DIM-7 a aussi été proposée comme intermédiaire de la rétention cytoplasmique de dERK (Baker et al,

2002). En outre, ce découplage entre l'activité cytoplasmique et nucléaire peut se faire par relocalisation à la membrane plasmique comme le fait *Grb2-associated binder 2* (Gab2) avec ERK2 via son domaine PH (Zhao et al, 1999a). De manière concomitante, une rétention prolongée à la membrane confère à ERK1/2 des propriétés de dominants négatifs attribuables à leur incapacité d'aller activer des gènes cibles (Brunet et al, 1999b; Hochholdinger et al, 1999). Néanmoins, des protéines d'échafaudage comme KSR, Pbs2 et Ste5 permettent le recrutement membranaire transitoire des MAP kinases de leurs voies respectives à des fins d'activation et sans en restreindre la translocation nucléaire (Cho, 2006; Dard & Peter, 2006; Elion, 2001; Mor & Philips, 2006; Seet & Pawson, 2004). Au cours des dernières années, plusieurs groupes ont rapporté des protéines comme affectant la localisation subcellulaire de ERK1/2. Quelques partenaires d'interaction de ERK1/2 chez les mammifères sont énumérés dans le tableau ci-dessous, avec un résumé de leurs effets sur la localisation subcellulaire et l'activité catalytique de ERK1/2.

Tableau 1-XVII Régulateurs de la localisation subcellulaire de ERK1/2

Partenaires d'interaction de la forme inactive (TEY-) et active (pTEpY-) de ERK1/2 affectant ou susceptibles d'affecter leur ciblage subcellulaire. On y note aussi les effets de ces partenaires sur l'activité phosphotransférase de ERK1/2 (ou leur activation par MEK1/2) ainsi que certaines protéines autres que ERK1/2 interagissant avec ces partenaires. Les DS-MKP n'y figurent pas puisque leurs effets sur la localisation subcellulaires de diverses MAP kinases sont déjà abondamment décrits dans la littérature (Farooq & Zhou, 2004; Pouyssegur et al, 2002; Tanoue & Nishida, 2003); (Tableau 1-XII, page 99). Il en va de même avec les facteurs de transcription dont les interactions avec ERK1/2 sont bien répertoriées (Edmunds & Mahadevan, 2004; Sharrocks et al, 2000).

Symboles et abréviations : - interaction non détectée; + interaction détectée; ++ interaction accrue; (?) interaction présumée; *n.d.* non déterminé; ↑ augmente l'activité; ↓ diminue l'activité; ↔ sans effet sur l'activité; FW Far-western, 2H double hybride chez

la levure; L-GST liaison *in vitro* à la Glutathione S-transférase (GST); CoIP co-immunoprécipitation *in vivo*; C&N cytoplasme et noyau (le ciblage peut varier selon le contexte cellulaire).

Réfs : [1] (Je et al, 2001; Leinweber et al, 1999; Menice et al, 1997); [2] (Tcherkezian et al, 2005; Tcherkezian et al, 2006); [3] (Zhao et al, 1999a); [4] (Fantz et al, 2001; Ory et al, 2003; Roy et al, 2002; Stewart et al, 1999; Sugimoto et al, 1998; Yu et al, 1998); [5] (Buckley et al, 2004; Caldwell et al, 2006); [6] (Ishihara et al, 2003); [7] (Huang et al, 2004b); [8] (Mitsushima et al, 2004); [9] (Spence et al, 2004); [10] (Yin et al, 2004; Yin et al, 2005); [11] (Roberts et al, 2003); [12] (Sundberg-Smith et al, 2005); [13] (Ishibe et al, 2004; Ishibe et al, 2003; Liu et al, 2002; Turner, 2000); [14] (Li et al, 1999; Roy et al, 2004; Roy et al, 2005); [15] (Harrison et al, 2004); [16] (Christerson et al, 1999; Karandikar et al, 2000); [17] (DeFea et al, 2000; Gripenrog & Miettinen, 2005; Luttrell et al, 2001; Scott et al, 2006; Tohgo et al, 2002); [18] (Vomastek et al, 2004); [19] (Brahma & Dalby, 2007; Kurzbauer et al, 2004; Schaeffer et al, 1998; Sharma et al, 2004; Teis et al, 2006; Teis et al, 2002; Wunderlich et al, 2001); [20] (Kovalenko et al, 2003; Preger et al, 2004; Torii et al, 2004a; Tsang et al, 2002; Xiong et al, 2003); [21] (Shapiro et al, 1998b; Zecevic et al, 1998); [22] (Lou et al, 2004a; Lou et al, 2004b); [23] (Eves et al, 2006; Yeung et al, 2000; Yeung et al, 1999); [24] (Sanna et al, 2005); [25] (Chen et al, 2005a); [26] (Yao et al, 2007); [27] (Perlson et al, 2005); [28] (Le Gallic et al, 1999; Polychronopoulos et al, 2006); [29] (Purcell et al, 2004); [30] (Adachi et al, 1999; Fukuda et al, 1997b; Fukuda et al, 1997c; Robinson et al, 2002); [31] (Tanoue et al, 2000); [32] (Bronisz et al, 2006; Molina et al, 2005); [33] (Parra-Palau et al, 2003; Scheper et al, 2003; Waskiewicz et al, 1997); [34] (Nakamura & Yamaguchi, 2006); [35] (Zhang et al, 2002); [36] (Yang et al, 2005); [37] (Callaway et al, 2005; Chou et al, 2003; Formstecher et al, 2001; Hill et al, 2002; Whitehurst et al, 2004b); [38] (Mustelin et al, 2005; Pulido et al, 1998; Zuniga et al, 1999); [39] (Kumar et al, 2007; Perlson et al, 2006); [40] (Pircher et al, 1999); [41] (Maekawa et al, 2002; Maekawa et al, 2004); [42] (Osawa et al, 2004; Roshan et al, 1999); [43] (Wang et al, 2004); [44] (Hu & Mivechi, 2006); [45] (Casar et al, 2007a; Sanz-Moreno et al, 2003); [46] (Cohen-Armon et al, 2007); [47] (Sur & Ramos, 2004)

Lieu du ciblage	Partenaire(s) d'interaction	Interaction avec TEY-ERK1/2	Interaction avec pTEPY-ERK1/2	Effet sur l'activité kinase	Essais d'interaction	Région de liaison dans ERK1/2	Autres protéines interagissant avec le partenaire	Notes	Réfs
Membrane plasmique	Calponine	+	+	+	CoIP, FW	<i>n.d.</i>			[1]
	CdGAP	+	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	CoIP	MKI/FXFP	RSK1	Lie mieux ERK1 que ERK2	[2]
	Gab2	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	↔	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	Grb2, SHP, PI3K	Contient domaine PH; inhibe l'activité nucléaire de ERK1/2	[3]
	KSR1/2	+	++	↑	2H, CoIP	MKI/FXFP	MEK1/2, Raf, CNK, TAK1, 14-3-3	Permet l'accumulation nucléaire de ERK1/2	[4]
	PLC-γ1	+	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	CoIP	CD		Plusieurs inositol-phosphatases/kinases pourraient s'associer de manière similaire	[5]
	RAGE	+	+	<i>n.d.</i>	L-GST, CoIP	CD			[6]
	SNT-2	+	++	↓	2H, L-GST, CoIP	<i>n.d.</i>	EGFR	Inhibe l'accumulation nucléaire de ERK2	[7]
Vinexine	-	+	↔	L-GST, CoIP	MKI/FXFP	Sos		[8]	
Adhésions focales	Dystroglycan	+	+	↔	CoIP	<i>n.d.</i>	MEK1/2		[9]
	GIT-1	+	++	+	L-GST, CoIP	<i>n.d.</i>	MEK1		[10]
	Intégrine αVβ3	-	+	<i>n.d.</i>	CoIP	<i>n.d.</i>		Les deux sous-unités lient mieux ERK1 que ERK2	[11]
Cytosquelette	PAK1	-	+	<i>n.d.</i>	L-GST, CoIP	CD	Raf, MP1, MEK1/2, Raf, FAK		[12]
	Paxilline	++	+	<i>n.d.</i>	L-GST, CoIP	<i>n.d.</i>			[13]
Endosomes	IQGAP1	+	+	↑	L-GST, CoIP	<i>n.d.</i>	MEK1/2, Cdc42	Permet l'accumulation nucléaire de ERK1/2	[14]
	LSP1	++	+	<i>n.d.</i>	L-GST, CoIP	<i>n.d.</i>	MEK1, KSR		[15]
	MEKK1	+	+	↑	CoIP	<i>n.d.</i>	MEK1/2, Raf		[16]
Golgi	β-Arrestine1/2	+	++	↑	CoIP	<i>n.d.</i>	MEK1/2, Raf, Filamine	Permet la l'accumulation nucléaire de ERK1/2	[17]
	MORG1	+	<i>n.d.</i>	↑	CoIP	<i>n.d.</i>	MEK1, Raf-1, MP1	Lie mieux ERK2 que ERK1	[18]
	MP1	++	+	↑	L-GST, CoIP	<i>n.d.</i>	MEK1, p14, MORG1	Ciblage aux endosomes tardifs via p14	[19]
Kintéchores	Sef	+	+(?)	↔	CoIP	<i>n.d.</i>	MEK1/2 (activées), Ras, FGFR1/2	Inhibe la dissociation ERK1/2-MEK1/2 et l'accumulation nucléaire de ERK1/2	[20]
	CENP-E	+	++	<i>n.d.</i>	CoIP	<i>n.d.</i>		MEK1/2 activées colocalisent aux kinétochores	[21]
	Nek2A	<i>n.d.</i>	+	<i>n.d.</i>	CoIP	CD	CENP-E	Localisé aussi aux centrosomes	[22]
	RKIP	+	+	↓	L-GST	CD	Raf, MEK1/2, AuroraB	Localisé aussi aux centrosomes; lie davantage MEK1/2 et Raf	[23]

Lieu du ciblage	Partenaire(s) d'interaction	Interaction avec TEY-ERK1/2	Interaction avec pTepY-ERK1/2	Effet sur l'activité kinase	Essais d'interaction	Région de liaison dans ERK1/2	Autres protéines interagissant avec le partenaire	Notes	Réfs
Cytoplasme	Calcineurine	+	++	↔	CoIP	<i>n.d.</i>		Complexes Calcineurine-NFAT-MEK1-ERK2	[24]
	DAPK	+	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	2H, L-GST, CoIP	CD		Inhibe l'accumulation nucléaire de ERK1/2	[25]
	DEDa	+	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	CoIP	<i>n.d.</i>		Homologie à PEA-15; ERK1/2 favorisent entrée au noyau de DEDa	[26]
	Dynéine	-	+	<i>n.d.</i>	CoIP	<i>n.d.</i>	Vimentine		[27]
	ERF	+	++	↔	L-GST, CoIP	MKI/FXFP		Transloque du noyau vers le cytoplasme de manière ERK-dépendante	[28]
	FHL1/2/3	+	++	↔	2H, L-GST, CoIP	<i>n.d.</i>		Travaux principalement faits avec FHL2	[29]
	MEK1/2	++	+	↑	2H, L-GST, CoIP	CD, MKI	Raf, MP1, β -Arrestine 1/2, MORG1, IQGAP, Paxilline	Contiennent NES; permettent l'accumulation nucléaire de ERK1/2 suite à leur activation; travaux surtout faits avec MEK1	[30, 31]
	MITF	+	+	<i>n.d.</i>	L-GST, CoIP	<i>Pas CD</i>	14-3-3	Lie autant ERK1 que ERK2	[32]
	MNK1/2a	+	++	↔	2H, L-GST, CoIP	CD	Importin α , eIF4E, eIF4G	Contiennent NLS et NES; MNK2b ne lie pas ERK1/2	[31, 33]
	MNSF β	++	+(?)	↓	L-GST, CoIP	<i>n.d.</i>		Similaire à l'ubiquitine; présumément cytoplasmique	[34]
	Naf1	+	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	2H, L-GST, CoIP	<i>n.d.</i>		Inhibe l'accumulation nucléaire de ERK2	[35]
	NFAT	+	+	↔	L-GST, CoIP	<i>n.d.</i>	RSK	Permet l'entrée au noyau de ERK1/2	[24, 36]
	PEA-15	+	+	↓	2H, L-GST, CoIP	CD, MKI	Akt, RSK2	Contient NES; empêche liaison de ERK2 aux Nup	[37]
	PTP-SL, STEP, HePTP	+	+	↓	L-GST, CoIP	CD		Contiennent NES	[38]
	Vimentine	-	+	<i>n.d.</i>	L-GST, CoIP	<i>Sous boucle activation</i>	Raf, Importines α et β	Permet l'entrée au noyau de ERK1/2; résidus 89-102 de (ERK1/) ERK2 aussi impliqués dans liaison	[27, 39]
C&N	STAT5A	+	+	<i>n.d.</i>	L-GST, CoIP	<i>n.d.</i>	Gab2		[40]
	Tob	+	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	L-GST, CoIP	CD	ErbB2	Contient NLS et NES	[41]
Noyau	Gab1	-	+	↔	CoIP	<i>n.d.</i>	Grb2, c-Met	Contient NLS et domaines PH et SH2; transloque du cytoplasme vers le noyau	[42]
	HSF1	++	+	↑	CoIP	<i>n.d.</i>	14-3-3		[43]
	HSF4b	+	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	CoIP	<i>n.d.</i>	MKP8		[44]
	Mxi2	+	+	↑	CoIP	<i>n.d.</i>	MEK1, Nup	Bloque effets PEA-15	[45]
	PARP-1	+	+	↔	CoIP	<i>n.d.</i>			[46]
	Vanishin	+	<i>n.d.</i>	↓	L-GST	<i>n.d.</i>		60% d'identité à PEA-15	[47]

1.5.3.3.2 Complexes transcriptionnels

Les MAP kinases font également partie d'importants complexes transcriptionnels (Edmunds & Mahadevan, 2004; Edmunds & Mahadevan, 2006; Whitmarsh). Associées à plusieurs *loci* cibles par l'intermédiaire de facteurs de transcription, les MAP kinases recrutent à leur tour de nombreux cofacteurs sur le site d'initiation de la transcription (Alepez et al, 2001; Edmunds & Mahadevan, 2004; Kumar & Bernstein, 2001; Pokholok et al, 2006; Proft & Struhl, 2002). À ces protéines se greffent l'ARN polymérase II (Pol II); (Alepez et al, 2003) ainsi que des enzymes favorisant le déroulement de la chromatine (De Nadal et al, 2004; Proft & Struhl, 2002). De son côté, la MAP kinase Hog1 joue un rôle actif dans l'élongation de la transcription notamment par la mobilisation de Pol II et de facteurs d'élongation (Proft et al, 2006). À l'instar de son orthologue de levure, p38 α peut recruter Pol II (Alepez et al, 2003). En outre, ERK2 dans sa forme activée, lie et active la topoisomérase II (Shapiro et al, 1999; Zhao et al, 2003), la PolyADP-ribose polymérase-1 (PARP-1) ; (Cohen-Armon et al, 2007) ainsi que le facteur d'initiation de la transcription TIF-IA (Shapiro et al, 1999; Zhao et al, 2003). L'ensemble de ces données démontrent que les MAP kinases jouent de multiples rôles (incluant celui de régulateur de la modification de la chromatine) au sein de complexes transcriptionnels élaborées.

1.5.3.3.3 Sensibilité et spécificité

D'autre part, la sensibilité de la voie ERK1/2 est plus grande pour des signaux provenant de la membrane plutôt que du cytoplasme (Harding et al, 2005) car un ciblage membranaire des composantes de la voie ERK1/2 lors de l'activation de la voie permet un recrutement adéquat des partenaires, et influence la spécificité du signal (Lamson et al, 2006; Wu et al, 2006a). En somme, la localisation subcellulaire des MAP kinases influence à la fois la manière dont le signal à relayer sera capté en amont, et celle dont il sera retransmis en aval.

1.5.3.4 Paramètres cinétiques

L'activité catalytique des MAP kinases ERK1/2 augmente rapidement en réponse à un stimulus, atteignant son maximum après cinq minutes (Kahan et al, 1992; Meloche et al, 1992a; Meloche et al, 1992b; Vouret-Craviari et al, 1993). Si le stimulus engendre une réponse transitoire, l'activité MAP kinase redescend ensuite au niveau basal (Figure 1-34). S'il induit plutôt une réponse soutenue, l'activation de ERK1/2 suit un profil similaire, mais une phase soutenue d'activation émerge après trente minutes de stimulation pour se maintenir pendant plus de deux heures. Néanmoins, les phases transitoire et soutenue de l'activation contribuent toutes deux à l'induction de l'expression génique (Ventura et al, 2006).

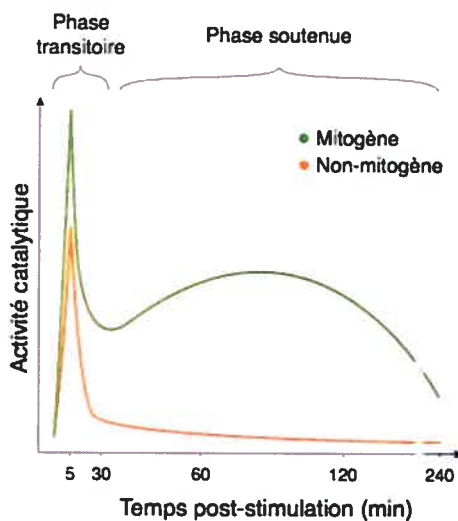


Figure 1-34 Cinétiques d'activation de ERK1

Activité phosphotransférase de ERK1 en réponse à des agents mitogéniques et non-mitogéniques, générant une réponse **soutenue** et **transitoire**, respectivement.

Adapté de (Meloche et al, 1992a; Meloche et al, 1992b; Vouret-Craviari et al, 1993)

1.5.3.4.1 Activation transitoire et activation soutenue

Toute modification dans le lieu, l'intensité et la durée de l'activité des MAP kinases affecte la spécificité de leur signal, et la réponse cellulaire. Par exemple, l'activation de la voie ERK1/2 selon qu'elle soit transitoire ou soutenue provoque des effets opposés sur l'apoptose d'ostéoclastes (Chen et al, 2005b). De manière générale, l'activation transitoire de ERK1/2 ne permet pas l'entrée en phase S (Cook & McCormick, 1996; Murphy et al, 2002; Vouret-Craviari et al, 1993), car elle n'est pas suffisamment longue pour réprimer l'expression de régulateurs négatifs de la prolifération (Yamamoto et al, 2006). En revanche, une activation soutenue de cette voie telle qu'induite par le PDGF et d'autres facteurs de croissance est requise pour la prolifération des fibroblastes (Balmanno & Cook, 1999; Dobrowolski et al, 1994; Yamamoto et al, 2006). De manière analogue, l'activation constitutive de ERK1/2 est associée à la carcinogenèse (Kohno & Pouyssegur, 2006; Solit et al, 2006; Thompson & Lyons, 2005) bien qu'elle puisse induire la sénescence (Boucher et al, 2004; Wang et al, 2002). Pour ce qui est de la voie JNK, son activation transitoire est associée à la survie cellulaire alors que son activation soutenue conduit à l'apoptose (Chang et al, 2006; Ventura et al, 2006). Par ailleurs, l'activation soutenue de la MAP kinase Kss1 de *S. cerevisiae* mène à la croissance filamenteuse (Section 1.3.2, page 34), alors que son activation transitoire est requise pour la réponse aux phéromones (Sabbagh et al, 2001). De même, Hog1 permet de réagir à un stress osmotique par une activation transitoire qui devient létale lorsqu'elle est soutenue (Warmka et al, 2001). En bref, une durée et une intensité variables du signal des MAP kinase sont utilisées dans plusieurs systèmes pour générer des réponses biologiques différentes (Corson et al, 2003; Ghiglione et al, 1999; McMullen et al, 2005).

1.5.3.4.1.1 Cellules PC12

La lignée de phéochromocytome PC12 constitue un modèle bien étudié dans lequel l'EGF induit la prolifération via une activation transitoire de ERK1/2, alors que le *Nerve growth factor* (NGF) active ERK1/2 de manière soutenue, menant à la différenciation de

ces cellules et à l'acquisition de propriétés des neurones sympathiques (Dikic et al, 1994; Ebisuya et al, 2005; Marshall, 1995; Murphy & Blenis, 2006; Traverse et al, 1994). Dans des cellules PC12 isolées, il a été démontré que le niveau d'activation de ERK1/2 est directement proportionnel à la concentration du stimulus (Fujioka et al, 2006; Mackeigan et al, 2005; Whitehurst et al, 2004a). De manière concomitante, c'est la concentration absolue de NGF qui est responsable de l'activation soutenue de ERK1/2 dans les PC12 (Sasagawa et al, 2005). En contrepartie, l'activation transitoire de ERK1/2 dépend du rythme d'augmentation de la concentration du stimulus, et ce de manière indépendante de sa concentration absolue (Sasagawa et al, 2005; Schoeberl et al, 2002).

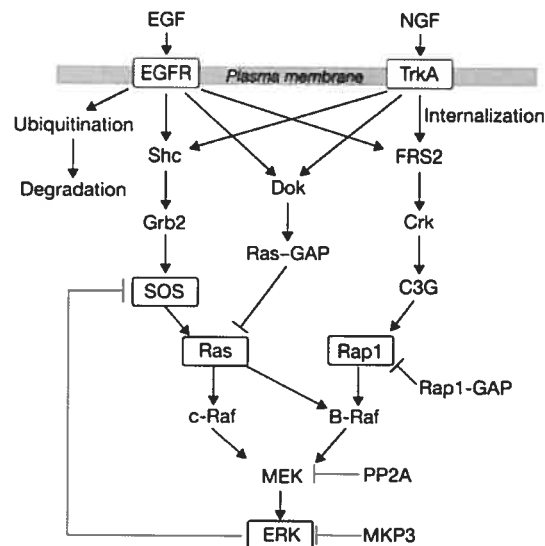


Figure 1-35 **Activation transitoire et soutenue de ERK1/2**

Modèle pour expliquer les différences entre les signaux transitoires et soutenus induits respectivement par l'EGF et le NGF dans les cellules PC 12.

Tiré de (Sasagawa et al, 2005)

Une explication pour cette différence entre l'EGF et le NGF provient du fait que l'EGFR est internalisé et dégradé beaucoup plus rapidement que TRK, le récepteur du NGF

(Di Fiore & Gill, 1999). Conséquemment, le signal en aval de l'EGFR est généré moins longtemps, donc de manière moins soutenue. Pourtant, dans un cas comme dans l'autre, la protéine G monomérique Ras est activée transitoirement (Sasagawa et al, 2005). Cependant, seul le NGF active la protéine G monomérique Rap1 (Figure 1-35) de manière lente et soutenue (York et al, 2000; York et al, 1998). Contrairement à son homologue Ras, Rap1 n'est pas située à la membrane et n'active pas Raf-1, mais peut néanmoins activer B-Raf, et le faire de manière soutenue (Ohba et al, 2003; Sasagawa et al, 2005). Finalement, des études mettent en lumière la part importante des boucles de rétroaction dans les différences entre le NGF et l'EGF quant à l'activation de la voie ERK1/2 dans les PC12 (Brightman & Fell, 2000; Santos et al, 2007). En effet, l'activation transitoire par l'EGF est attribuable à une rétroinhibition de Raf par ERK1/2. En revanche, le NGF déclenche également une boucle de rétroaction, mais les effets de cette dernière sont positifs, permettant au signal de perdurer.

1.5.3.4.2 Boucles de rétroaction

Une activation soutenue des voies MAP kinase est favorisée par des boucles de rétroaction positives (Bhalla & Iyengar, 1999; Bhalla et al, 2002 ; Brightman & Fell, 2000). De telles boucles permettent entre autres de relayer efficacement le signal sur une grande distance, comme c'est le cas dans les oocytes ou les axones (Markevich et al, 2006). Dans un exemple simple, la PKC phosphoryle et active Raf-1 (Kolch et al, 1993), conduisant à l'activation de ERK1/2 (Figure 1-36A). Ces MAP kinases phosphorylent et activent la cPLA2, générant du coup de l'acide arachidonique (AA), un activateur de la PKC. Ainsi, l'inhibition de cette dernière ne bloque pas l'activation initiale de ERK1/2 (Raf-1 étant principalement activée par Ras), mais empêche que celle-ci perdure de manière soutenue (Bhalla & Iyengar, 1999; Bhalla et al, 2002).

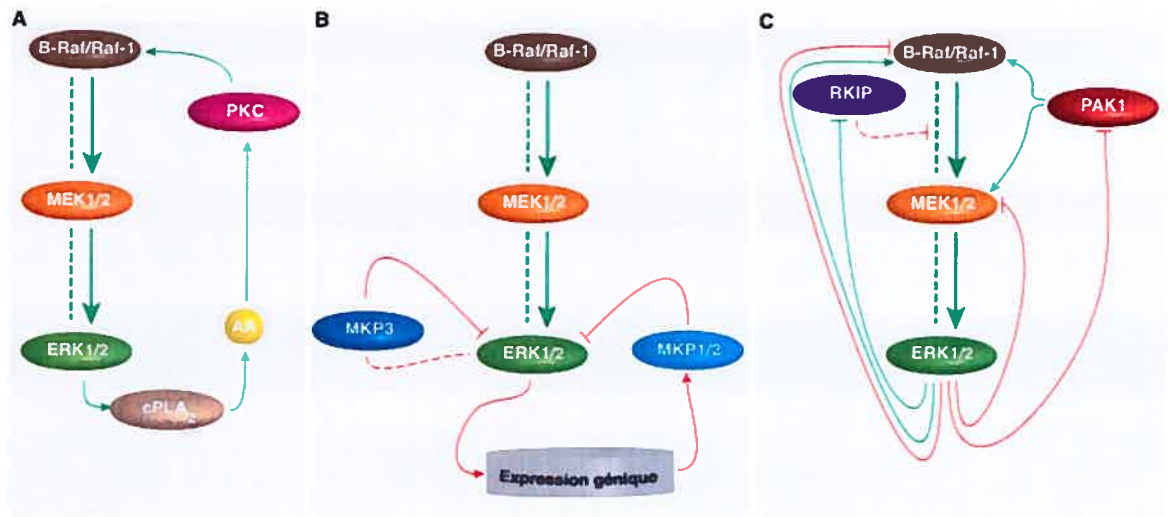


Figure 1-36 **Boucles de rétroaction impliquant ERK1 et ERK2**

Quelques exemples de boucles de régulation impliquant les MAP kinases ERK1/2. A) Rétroaction positive impliquant la PKC et la cPLA₂. B) Rétroaction négative par des DS-MKP. C) Enchevêtrement de boucles de rétroaction positive et négative. Les activations sont indiquées par des flèches alors que les traits perpendiculaires désignent une inhibition; les interactions sont dénotées par des traits hachurés; la **rétroaction positive** et la **rétroaction négative** sont indiquées respectivement en vert et rouge. Certains acteurs ou liens ont été délibérément omis pour des raisons de clarté.

Les phosphatases jouent également un rôle prépondérant dans la durée du signal, et plusieurs PTP ont pour cible des protéines de signalisation précoces comme l'EGFR. L'activation soutenue des MAP kinases pourrait dépendre de la capacité de certains stimuli à inhiber ces PTP (Adachi et al, 2002). De même, plusieurs boucles de régulation négative impliquent des MKP à simple spécificité (Adachi et al, 2002; Letourneux et al, 2006; Wurgler-Murphy et al, 1997) ainsi que des DS-MKP (Figure 1-36B); (Kang & Kim, 2006; Mandl et al, 2005; Muda et al, 1996; Volmat et al, 2001). Il a notamment été observé que ERK1/2 induisent l'expression de MKP1 et MKP2 (Brondello et al, 1997; Sun et al, 1993).

En outre, les MAP kinases peuvent stabiliser l'ARN messager (Sugiura et al, 2003) et inhiber la dégradation par le protéasome (Brondello et al, 1999) de certaines DS-MKP. Les niveaux et les patrons d'expression, ainsi que les sélectivités démontrées par les phosphatases induites à l'endroit des diverses MAP kinases permettent de générer une grande variété de réponses tant au niveau de l'intensité, de la spécificité que de la durée du signal (Bhalla et al, 2002). Ceci permet donc des réponses adaptées et modulables selon les stimuli. De manière plus directe, la liaison de ERK1/2 à MKP3 (Camps et al, 1998) ou PAC1 (Farooq et al, 2003) induit leur activation catalytique. Par contre, ERK1/2 phosphorylent également MKP3 ce qui induit sa dégradation via le protéasome et une activation plus soutenue (rétroactivation); (Marchetti et al, 2005). Donc, en agissant sur l'expression et l'activation de DS-MKP, les MAP kinases contribuent à leur propre rétroinhibition.

De surcroît, des boucles de rétroaction positives et négatives font parfois des chassés-croisés (Figure 1-36C). Tel que succinctement décrit dans la section 1.5.3.1.2, l'adhésion cellulaire mène à la phosphorylation de la sérine 298 de MEK1 par PAK1 (Coles & Shaw, 2002 ; Eblen et al, 2002; Eblen et al, 2004). Ceci se traduit par de meilleures interactions entre Raf-1 et MEK1, favorisant du coup l'activation de ERK1/2. Toutefois, ces dernières phosphorylent rétroactivement MEK1 sur la thréonine 292, ce qui empêche sa phosphorylation sur la sérine 298. En outre, RKIP lie Raf-1 tout comme MEK1, de manière à prévenir leur interaction et l'activation subséquente de la voie ERK1/2 (Yeung et al, 2000; Yeung et al, 1999). En revanche, la phosphorylation de RKIP par ERK1/2 (Kolch et al, 2005) ou PKC (Corbit et al, 2003; Lorenz et al, 2003) lève cette inhibition, permettant à la voie MAP kinase d'être activée de manière plus soutenue. De plus, Raf-1 est phosphorylée sur plusieurs sites par ERK1/2 dans une boucle de rétroaction positive (Balan et al, 2006). Paradoxalement, ERK1/2 phosphorylent également PAK1 (Sundberg-Smith et al, 2005) mais surtout B-Raf (Brummer et al, 2003) et Raf-1 (Anderson et al, 1991; Dougherty et al, 2005) sur des sites régulant négativement leur activité, ce qui ajoute à la complexité de la rétroaction. L'ordre exact des événements impliqués dans les boucles de

rétroaction demeure en partie méconnu, mais joue un rôle clé dans la durée, et donc dans la spécificité du signal. L'élucidation de ces mécanismes temporels de la régulation des voies MAP kinase nous permettra de déterminer à quel moment la boucle est activatrice et à quel moment elle devient inhibitrice, selon le contexte.

En définitive, il existe de nombreuses boucles de régulation des diverses voies MAP kinase. Plusieurs d'entre elles impliquent la rétro-phosphorylation de kinases en amont des MAP kinases (Section 1.5.2.3.1, page 85), ou celle d'autres régulateurs. Néanmoins, tous les mécanismes de régulation énumérés dans les sections précédentes (phosphorylation, interactions, localisation) sont reliés à la durée du signal, et en permettent un contrôle spatio-temporel serré. Par exemple, les MK RSK1, RSK2 et RSK3 se lient aux MAP kinases ERK1/2 afin d'être activées. Toutefois, RSK3 est activée sur une plus longue période car elle demeure associée plus longtemps à ERK1/2 que ses homologues (Roux et al, 2003). En outre, le lieu où les MAP kinases sont activées, mais également inactivées influe sur le signal engendré, et implique des mécanismes de séquestration et de déphosphorylation (Ebisuya et al, 2005; Murphy & Blenis, 2006). Bref, la régulation des MAP kinases se fait à plusieurs niveaux de manière adaptée aux boucles de rétroaction. L'équilibre entre les boucles positives et les négatives affecte le type de signal généré, et conséquemment, la réponse cellulaire.

1.5.3.4.2.1 Régulation croisée

Les différentes voies MAP kinases partagent souvent plusieurs régulateurs. Afin de maintenir une spécificité dans le signal, certaines voies ont des mécanismes leur permettant d'en inactiver une autre. Par exemple, la MAP kinase Hog1 de *S. cerevisiae* inactive ses homologues Fus3 et Kss1 par l'intermédiaire de la DS-MKP *Multicopy suppressor of GPA1 deletion 5* (Msg5); (Bardwell et al, 1996). De leur côté, les MAP kinases de la sous-famille p38 inhibent l'activation des voies ERK1/2 (Li et al, 2003; Westermarck et al, 1998) et JNK (Avdi et al, 2002) via la phosphatase PP2A (Grethe & Porn-Ares, 2006; Liu & Hofmann, 2004; Westermarck et al, 2001). En outre, les MAP kinases p38 s'associent

physiquement avec ERK1/2 afin d'empêcher leur activation (Efimova et al, 2003; Zhang et al, 2001), mais lient également PP2A (Boudreau et al, 2006), ce qui suggère que les membres de la sous-famille p38 peuvent recruter des phosphatases pour inactiver d'autres voies MAP kinase. Par ailleurs, l'inactivation d'une voie peut également survenir en aval de celle-ci par le blocage de cibles spécifiques. Par exemple, via la MAP kinase Fus3, les phéromones induisent la dégradation du facteur de transcription Tec1 qui est essentiel à la voie Kss1 (Bao et al, 2004). Tec1 n'est alors plus disponible pour s'associer à des cibles qui sont partagées par les voies Fus3 et Kss1, permettant du coup une réponse spécifique aux phéromones (Chou et al, 2006).

1.6 Hypothèse de travail

Des signaux aussi spécifiques que variés peuvent être obtenus par un contrôle spatio-temporel très serré des MAP kinases. Les divers paramètres de localisation subcellulaire et de durée de signal, en plus des partenaires d'interaction des MAP kinases s'influencent mutuellement, et génèrent une myriade de combinaisons possibles, malgré un nombre pourtant limité d'intervenants.

Les voies MAP kinases sont régulées de trois manières qui s'influencent mutuellement. Ainsi, l'état de phosphorylation, la localisation subcellulaire et les interactions avec partenaires différents partenaires se combinent pour générer une réponse cellulaire appropriée. Nous nous intéressons à la question de spécificité du signal et de sa régulation dans des voies pourtant ubiquitaires. Nous étudierons d'abord la phosphorylation des protéines puisqu'elle représente le mode par excellence de régulation des voies MAP kinase. Ensuite, nous visons la caractérisation des sites de phosphorylation identifiés. Enfin, nous tenterons de déterminer comment cette phosphorylation affecte les autres mécanismes de régulation des voies MAP kinase, et comment la spécificité du signal s'en trouve modifiée.

2 Résultats

Les voies MAP kinases relayent et intègrent une foule de signaux variés de manière spécifique en des réponses adaptées. Impliquées dans une foules de pathologies, elles ont chacune leurs spécificités mais sont pourtant régies par des principes conservés. Nous avons tenté d'en savoir davantage sur ces principes de régulation et comment ceux-ci affectent la spécificité des réponses transmises par les voies MAP kinases des eucaryotes.

2.1 Phosphorylation of the MAPKKK regulator Ste50p in *Saccharomyces cerevisiae*: a casein kinase I phosphorylation site is required for proper mating function

2.1.1 Contexte

La MAPKKK Ste11 et sa protéine régulatrice Ste50 sont essentielles à l'activation de trois voies MAP kinase (Fus3 de réponse aux phéromones; Kss1 de la croissance filamenteuse; Hog1 de réponse à l'osmolarité élevée) avec des stimuli et des effets biologiques bien distincts. La phosphorylation étant un moyen de réguler les voies MAP kinases nous nous sommes demandé si elle était impliquée dans les fonctions régulatrices de Ste50 et pouvait influencer la spécificité des signaux relayés par Ste11.

2.1.2 Article publié dans *Eucaryotic Cell* (2003)

Les pages suivantes sont tirées de (Wu et al, 2003) et en partie adaptées au format de cette thèse.

Phosphorylation of the MAPKKK Regulator Ste50p in *Saccharomyces cerevisiae*: a Casein Kinase I Phosphorylation Site Is Required for Proper Mating Function

Cunle Wu,^{1*} Mathieu Arcand,² Gregor Jansen,^{1,3} Mei Zhong,^{1‡} Tatiana Iouk,^{1,3} David Y. Thomas,^{1,3} Sylvain Meloche,² and Malcolm Whiteway^{1,4}

Genetics Group, Biotechnology Research Institute, National Research Council of Canada, Montreal, Quebec, Canada H4P 2R2,¹ Institut de Recherches Cliniques de Montréal and Department of Pharmacology, Université de Montréal, Montreal, Quebec, Canada H2W 1R7,² Department of Biochemistry, McGill University, Montreal, Quebec, Canada H3G 1Y6,³ Department of Biology, McGill University, Montreal, Quebec, Canada H3A 1B1⁴

*Corresponding author. Mailing address: Genetics Group, Biotechnology Research Institute, National Research Council of Canada, 6100 Royalmount Ave., Montreal, Quebec, Canada H4P 2R2. Phone: (514) 496-6202. Fax: (514) 496-6213.

████████████████████

‡Present address: CuraGen Corporation, 20 Commercial St., Branford, CT 06405.

Received July 23, 2003; Accepted July 26, 2003.

2.1.2.1 Abstract

The Ste50 protein of *Saccharomyces cerevisiae* is a regulator of the Ste11p protein kinase. Ste11p is a member of the MAP3K (or MEKK) family, which is conserved from yeast to mammals. Ste50p is involved in all the signaling pathways that require Ste11p function, yet little is known about the regulation of Ste50p itself. Here, we show that Ste50p is phosphorylated on multiple serine/threonine residues in vivo. Threonine 42 (T42) is phosphorylated both in vivo and in vitro, and the protein kinase responsible has been identified as casein kinase I. Replacement of T42 with alanine (T42A) compromises Ste50p function. This mutation abolishes the ability of overexpressed Ste50p to suppress either the mating defect of a *ste20 ste50* deletion mutant or the mating defect of a strain with a Ste11p deleted from its sterile-alpha motif domain. Replacement of T42 with a phosphorylation-mimetic aspartic acid residue (T42D) permits wild-type function in all assays of Ste50p function. These results suggest that phosphorylation of T42 of Ste50p is required for proper signaling in the mating response. However, this phosphorylation does not seem to have a detectable role in modulating the high-osmolarity glycerol synthesis pathway.

2.1.2.2 Introduction

All eukaryotic cells use a highly conserved mitogen-activated protein kinase (MAPK) module as the central core of a variety of complex signal transduction pathways. These pathways respond to many external stimuli and regulate numerous cellular processes. Each MAPK cascade is typically comprised of three protein kinases: a MAP3K, or MEKK; a MAP2K, or MEK; and a MAPK. These kinases are activated by sequential phosphorylation (2, 39). Eukaryotic cells typically contain multiple MAPK modules containing unique or shared protein kinases that provide the bases for signal transduction specificity and cross talk between signaling pathways. This regulation in turn may control the pattern of signaling (i.e., transient versus sustained) and/or coordinate multiple biological processes in response to a variety of environmental cues (for reviews, see references 6, 9, 14, 27, 29, 42, and 48).

The yeast *Saccharomyces cerevisiae* uses five MAPK cascades to respond to different physiological stimuli. One cascade is required for **a/α** diploid cells undergoing meiosis, and two cascades control the developmental processes of mating and filamentation, while two other cascades control the response to environmental osmostress—the high-osmolarity glycerol synthesis (HOG) pathway regulates response to high-osmolarity stress, and the MPK pathway modulates response to low osmolarity and challenges to cell wall integrity (for reviews, see references 9, 15, 20, 23, 25, 29, and 43). Components of these MAPK cascades are shared among different modules, including those controlling mating, filamentation, and the HOG pathway (7, 17, 26, 28, 34, 35, 49). Although the extent of sharing of these components varies among different pathways, the common module among the mating, filamentation, and HOG pathways comprises at least Ste11p (MAP3K) and its two regulators—Ste20p and Ste50p.

Ste20p is the founding member of the PAK/Ste20p kinase family. The activities of these kinases are modulated by small GTPases of the Rho superfamily. Ste20p is required for the activation of Ste11p and has been shown to phosphorylate Ste11p both in vitro and in vivo (8, 18, 51). Ste50p is also implicated in the regulation of Ste11p activity. Ste50p lacks any currently identified enzymatic function but is involved in all the signaling pathways that require the function of Ste11p. The involvement of Ste50p in the modulation of Ste11p function is dependent on physical interaction of the two proteins through their respective sterile-alpha motif (SAM) domains (17, 35, 49). This interaction appears to be constitutive; however, modulation of the interaction through mutations has been shown to differentially influence Ste11p activity in the different pathways (17). The C-terminal part of Ste50p is also required for its function, but this activity requires the presence of an intact SAM domain (49). In contrast to its clear involvement in Ste11p regulation, little is known about the regulation of Ste50p itself.

Here, we show that Ste50p is a phosphoprotein that is phosphorylated at multiple serine/threonine sites in intact cells. We have identified one of these sites as amino acid residue threonine 42. Casein kinase I (CKI) is capable of phosphorylating this residue in

vitro. Preventing phosphorylation of threonine 42 by its replacement at this site with alanine results in vivo in decreased signaling during the mating response but has no detectable effect on signaling in the HOG pathway. Replacement of threonine 42 with the phosphomimetic residue aspartic acid permits the wild-type function of Ste50p in both the mating and HOG pathways. It appears that phosphorylation of Ste50p by casein kinase activity in yeast modulates the function of Ste50p, and this modulation may have different effects in the different pathways that share the Ste11p-Ste50p complex.

2.1.2.3 Materials and methods

2.1.2.3.1 Materials

Restriction endonucleases and DNA-modifying enzymes were obtained from New England Biolabs and Amersham Biosciences. High-fidelity *Taq* thermostable DNA polymerase and tablet protease inhibitors were purchased from Roche Molecular Biochemicals. Acid-washed glass beads (450 to 600 μm in diameter), synthetic α mating factor, protease inhibitors, and bovine serum albumin were purchased from Sigma. α mating factor was dissolved in 90% methanol at a concentration of 1.0 mg/ml and stored at -20°C . Plasmids pGEX-4T-3 and pGEX-2TK, glutathione-Sepharose beads, glutathione, and protein A/G-Sepharose beads were obtained from Amersham Biosciences. The antibody against glutathione *S*-transferase (GST) was described previously (50). The anti-Ste50p antibodies were raised in rabbits against bacterially expressed, purified GST-Ste50p. GST-Ste50 protein fusions were detected using rabbit polyclonal anti-GST antibodies (49). Rabbit polyclonal antibodies directed against Ste5p were described previously (22). Anti-Fus3 goat polyclonal antibodies were from Santa Cruz Biotechnology. Nitrocellulose membranes were from Bio-Rad. Horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies were from Santa Cruz Biotechnology. The enhanced chemiluminescence assay system was purchased from Amersham Biosciences.

2.1.2.3.2 Yeast strains and manipulations

Yeast media, culture conditions, and manipulations of yeast strains were as described previously (40). Yeast transformations with circular or linearized plasmid DNA were carried out after treatment of yeast cells with lithium acetate (40). The yeast strains used in this study are listed in Tableau 2-I.

Tableau 2-I Yeast strains used in this study

Strains	Relevant genotype	Source
W303-1A	<i>MATa ade2 ura3 his3 leu2 trp1 can1</i>	R. Rothstein
W303-1B	<i>MATα ade2 ura3 his3 leu2 trp1 can1</i>	R. Rothstein
YCW241	W303-1A <i>FUS1::LacZ::LEU2</i>	Wu et al, 1999
YCW315	W303-1A <i>ste50Δ::TRP1</i>	Wu et al, 1999
YCW316	W303-1B <i>ste50Δ::TRP1</i>	Wu et al, 1999
YCW350	W303-1A <i>ste20Δ::TRP1ste50Δ::Kan^R</i>	This study
YCW360	<i>MATα ura3 leu2 his3 ssk2Δ::LEU2 ssk22Δ::LEU2 ste50Δ::TRP1</i>	Wu et al, 1999
YCW365	<i>MATa ura3 leu2 his3 ssk2Δ::LEU2 ssk22Δ::LEU2 ste50Δ::TRP1</i>	Wu et al, 1999
YCW393	<i>MATa his3 leu2 trp1 ura3 ste50Δ::TRP1 sst1::hisG FUS1::LacZ::LEU2</i>	This study
YCW466	<i>MATa ura3 leu2 his3 ssk2Δ::LEU2 ssk22Δ::LEU2 STE11^{ΔSAM}</i>	This study
YCW1151	<i>MATα ura3 leu2 his3 ssk1Δ:: Kan^R yck1 yck2ts STE11^{ΔSAM}</i>	This study
DC17	<i>MATα his1</i>	J. Hicks

2.1.2.3.3 Plasmid constructions

Yeast expression constructs carrying different fragments of *STE50* were generated by PCR (41) using appropriate primers and cloned into pYEX-4T2. The starting plasmid for constructing the *STE50* mutants was pVL57 (49). To make Ste50p (1-67), pVL57 was digested with *EcoRI* and *BglII*, blunt ended with T4 DNA polymerase, and religated to create pCW250. To make Ste50p(99-346), the fragment of *STE50* was PCR amplified with primers OCW78 (5'-CGGGATCCATGAGAGACAGCAAGTTG-3' [BamHI site is underlined]) and OCW18 (5'-GGGAATTCCTTAGAGTCTTCCACCGGG-3' [EcoRI site is underlined]), digested with *BamHI* and *EcoRI*, and cloned into pYEX-4T2 to give rise to pCW206. To make the serine/threonine (S/T)-to-alanine (A) mutations in Ste50p, site-directed mutagenesis by PCR was used with specific mutagenic primer pairs and flanking primers of OCW18 and OCW104: 5'-CGGAATTCATGTCCCCTATACTAGG-3', which annealed to the GST sequence within pVL57. The PCR products were digested and cloned as *BamHI-EcoRI* fragments into pYEX-4T2, and mutations were confirmed by DNA sequencing. pCW259 contains the serine 12-to-alanine mutation (S12A), pCW260 contains S16A, pCW261 contains T24A, pCW262 contains S33A, pCW263 contains S36A, pCW264 contains T42A, pCW265 contains S46A/T47A, and pCW266 contains T53A. To make centromere-containing plasmid versions of the *STE50* constructs that express *STE50* under its own promoter, the 5'-flanking sequences of *STE50* were amplified by PCR from genomic DNA with primers OCW87 (5'-TCCCCGCGGGTCCGGTGAAAAGTAT-3' [SpeI site is underlined]) and OCW88 (5'-CGGGATCCTGATTTGCTATCTCTGCTAG-3' [EcoRI site is underlined]). These PCR products were digested with *BamHI* and *SpeI* and cloned along with the *BamHI-EcoRI* fragment of *STE50* from pVL57 into the *SpeI* and *EcoRI* sites of pRS316. The resulting construct, pCW267, contained an 800-bp 5' flanking sequence of *STE50* with an added *BamHI* site upstream of the *STE50* coding sequence. The mutant alleles of *STE50* were then cloned by exchanging the *BamHI-EcoRI* fragments from pCW259, pCW260, pCW261, pCW262, pCW263, pCW264, pCW265, and pCW266 with

that of pCW267 to generate pCW276, pCW277, pCW278, pCW279, pCW280, pCW281, pCW282, and pCW283. Plasmid pCW379 expressing Ste50p with a substitution of aspartic acid for T42 was created in a similar manner. Multiple S/T-to-A mutations were created by multiple-round site-directed PCR mutagenesis. Several yeast constructs expressing Ste50p bearing multiple S/T-to-A substitutions as GST fusions were created: pCW372, with the N-terminal six-S/T substitution by A (6A); pCW373, with the N-terminal eight-S/T substitution by A, except T42 (7A/T42); and pCW401, with the N-terminal eight-S/T substitution by A (8A).

For bacterial expression constructs, pVL56 expressing the full-length Ste50p in pGEX-2TK was used as the starting construct. Plasmid pCW249 was created to express the N-terminal amino acids (aa) 1 to 67 of Ste50p by digesting pVL56 with *EcoRI* and *BglIII*, blunt ending it with T4 DNA polymerase, and religation. Plasmids similar to pCW249, expressing the N-terminal 67 aa of Ste50p, were created for all the multiple S/T-to-A mutants. Plasmid pCW360 had the substitution of alanine for threonine 42 (T42A), pCW358 had the N-terminal five S/T residues replaced with alanine (5A), pCW380 had the N-terminal six S/T residues replaced with alanine (6A), pCW359 had the N-terminal eight S/T residues replaced with alanine (8A), and pCW381 had the N-terminal eight S/T residues replaced with alanine, except T42 (7A/T42).

2.1.2.3.4 Preparation of GST fusion proteins from *Escherichia coli* and yeast

The GST fusion proteins were expressed in *E. coli* strain UT5600 (New England Biolabs), extracted, bound to glutathione-Sepharose beads, and eluted with glutathione as previously described (51). The eluted proteins were then concentrated and washed with storage buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 200 mM KCl, 1 mM dithiothreitol, and 10% glycerol) by centrifugation using the Centricon-30 system (Amicon Inc.) and stored at -80°C . For yeast GST fusion expression constructs, including the yeast ORF protein kinase library, cells were induced with galactose for 5 h with *GAL* promoter-driven GST fusion vectors (55) or with the addition of 0.5 mM CuSO_4 for 2 h with *CUP1* promoter-driven

GST fusion vectors. Total cell extracts were prepared as described previously (49). Purification of yeast GST fusion proteins were performed with yeast extracts and glutathione-Sepharose beads according to the procedure described previously for purification of *E. coli* GST fusion proteins (51). The eluted proteins were washed with storage buffer, concentrated with the Centricon 30 system, and stored at -80°C .

2.1.2.3.5 Protein kinase assays, ^{32}P metabolic labeling, and phosphopeptide mapping

In vitro kinase assays were performed essentially as described previously (51). The reactions were carried out in 30 μl of kinase buffer containing 2 μM [$\gamma\text{-}^{32}\text{P}$]ATP ($\sim 2 \times 10^4$ Ci/mol), and the reaction mixtures were incubated at 30°C for 30 min. The reaction mixture was resolved by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), and the labeled products were visualized by either autoradiography or phosphorimaging (Molecular Dynamics).

The in vivo metabolic labeling with [^{32}P]orthophosphate was performed with yeast cells (*ssk2 ssk22 ste50*) carrying different alleles of the STE50 gene as GST fusions under the control of the *CUP1* promoter. Exponentially growing cells from selective medium were inoculated into phosphate-free YPD medium (54) at an optical density at 600 nm (OD_{600}) of ~ 0.2 for 3 h, and copper sulfate was then added to the medium to a final concentration of 0.5 mM and incubated for 2 h. Approximately 10 OD_{600} units of cells were then harvested, resuspended in 5 ml of fresh phosphate-free YPD medium containing 1.5 mCi of [^{32}P]orthophosphate (Amersham Biosciences), and incubated for 1 h at 30°C . Yeast total cell extracts were prepared, and labeled Ste50p was purified with glutathione-Sepharose beads as described for the purification of GST fusion protein from yeast. Two-dimensional (2-D) tryptic phosphopeptide mapping analysis was performed essentially as described previously (3, 12).

2.1.2.3.6 *Subcellular fractionation of Ste50p-containing protein complexes*

Cells expressing GST-Ste50p or GST-Ste50-T42Ap were grown in liquid Ura-dropout medium to late exponential phase. The cultures were divided into two aliquots, and one aliquot of each was treated with α -factor at a final concentration of 3 μ M for 90 min at 30°C. Equivalents of 250 OD₆₀₀ units of cells were harvested by centrifugation; washed with ice-cold extraction buffer containing 50 mM HEPES (pH 7.5), 150 mM NaCl, 10% glycerol, 1 mM dithiothreitol, 2 mM EDTA, 50 mM NaF, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, and 1 mM Na₃VO₄ and supplemented with protease inhibitor cocktail tablets (Roche Molecular Biochemicals); and disrupted using a French press. The homogenates were centrifuged at 6,000 \times g for 5 min at 4°C to remove cell debris. The supernatant aliquots, corresponding to \sim 50 OD₂₈₀ units, were loaded on an eight-step (20 to 65% [wt/wt]) sucrose gradient over a 65% (wt/wt) 2-ml sucrose pad with each step prepared in 50 mM HEPES, pH 7.5, 150 mM NaCl, and 2 mM EDTA. The gradients were centrifuged at 38,000 rpm in an SW41 swinging-bucket rotor (Beckman) at 4°C for 12 h. Fractions (\sim 0.85 ml) were collected from the top of the gradient. Proteins from each fraction were precipitated with 10% trichloroacetic acid, and the protein pellets were washed with ice-cold acetone, resuspended in SDS sample buffer, and subjected to immunoblotting analyses.

2.1.2.3.7 *Yeast mating and other assays*

Plate mating tests were carried out as described previously (19). Quantitative mating assays were carried out by a filter assay as described previously (21). β -Galactosidase activities were measured as described previously (19), with Miller units defined as follows: $(OD_{420} \times 1,000)/(OD_{600} \times t \times V)$, where t is the time in minutes and V is the volume in milliliters. Halo assays to test cell growth inhibition in response to α mating factor were performed as described previously (21).

2.1.2.3.8 Photomicroscopy

Cells were grown to mid-log phase and fixed with formaldehyde at a final concentration of 3.7% with 150 mM NaCl. The cells were viewed with a microscope equipped with Nomarski optics, and microscopic photographs were acquired with a 100× objective using a Micro Max camera (Princeton Instruments Inc.) with Northern Eclipse imaging software (Empix Imaging Inc.) and processed using Adobe Photoshop for Macintosh.

2.1.2.4 Results

2.1.2.4.1 *Ste50p is a phosphoprotein in vivo and is phosphorylated on multiple serine/threonine residues*

The functions of many signaling components are regulated through phosphorylation. Ste50p has been shown to be one of the regulators of the MAPKKK Ste11p and is involved in all the signal transduction pathways that need the function of Ste11p (17, 28, 35, 36, 49). To examine if Ste50p is phosphorylated in vivo, yeast cells expressing Ste50p as a GST fusion were metabolically labeled with [³²P]orthophosphate. GST-Ste50p was then purified and analyzed by SDS-PAGE and autoradiography. As shown in Fig. 1, Ste50p was phosphorylated in vivo. The extent of phosphorylation of Ste50p was not significantly affected by treatment with pheromone at 5 μM. Tryptic phosphopeptide mapping revealed several labeled spots, indicating that Ste50p is phosphorylated on multiple sites in vivo, as the GST protein alone is not labeled (8, 33). Phosphoamino acid analysis indicated that the phosphorylation occurred exclusively on serine/threonine residues (data not shown). Fragmentation of Ste50p showed that both the N terminus (aa 1 to 67) and the C terminus (aa 99 to 346) were labeled in vivo (Fig. 1C). The N terminus of Ste50p contains all nine serine/threonine residues within the core SAM domain (32, 44), and they are located in a single 53-residue tryptic peptide (see Fig. 5C).

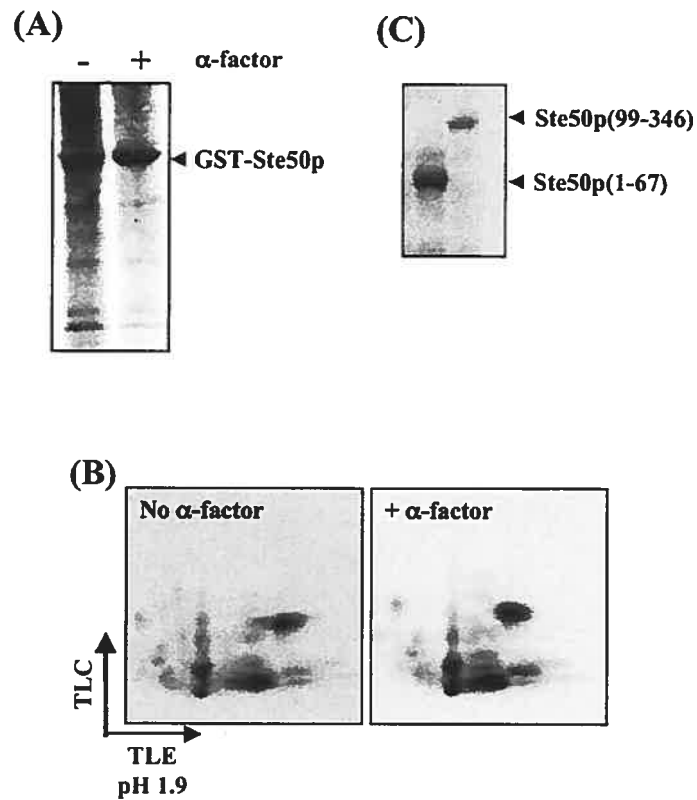


Figure 2-1 Ste50p is phosphorylated in vivo

(A) GST-Ste50p was expressed in a $\Delta ste50$ strain, metabolically labeled with [^{32}P]orthophosphate in the presence (+) or absence (-) of 5 μM α mating factor for 1 h, purified with glutathione-Sepharose, and resolved by SDS-PAGE. (B) Labeled GST-Ste50p from the gel in panel A was digested with trypsin and subjected to 2-D phosphopeptide mapping analysis. TLC, thin-layer chromatography; TLE, thin-layer electrophoresis. (C) Both the N- and C-terminal fragments are phosphorylated in vivo. Constructs expressing the N-terminal (aa 1 to 67) and C-terminal (aa 99 to 346) portions of Ste50p were expressed as GST fusions and analyzed as described for panel A.

2.1.2.4.2 Threonine 42 is important for Ste50p function in the pheromone response pathway

Given the functional importance (17, 35, 49) of the SAM domain (amino acid residues 32 to 100) and the fact that this region of Ste50p is phosphorylated in vivo, site-directed mutagenesis was performed to change all of the S/T residues in the SAM domain to A. To assess the role of the potential phosphorylation site(s), the single S/T-to-A mutants, expressed as GST fusions under the control of the *CUP1* promoter on a 2 μ m plasmid, were first tested for the ability to suppress the mating defect of a *ste20 ste50* strain.

Both Ste20p and Ste50p are regulators of Ste11p MAPKKK. Deletion of *STE50* results in reduced mating, but the cells are far from sterile, whereas *ste20 ste50* strains are completely sterile. However, overexpression of Ste50p has been shown to partially suppress the mating defect of *ste20* mutants (52), and thus, the *ste20 ste50* strain provides a sensitive assay for Ste50p function. We analyzed the S/T-to-A mutants of Ste50p for the ability to permit mating in the *ste20 ste50* (YCW350) genetic background, since the mating response in this strain depends solely on the function of Ste50p. As shown in Fig. 2A, the yeast strain YCW350 (*ste20 ste50*) transformed with only the vector plasmid showed no detectable mating, whereas overexpression of wild-type Ste50p, as expected, increases the mating to a readily detectable level. All but one of the S/T-to-A mutants showed no significant difference in the ability to confer mating competence compared to the level of mating generated by wild-type Ste50p. However, the T42A mutant was significantly impaired in its ability to permit mating in the *ste20 ste50* strain. In contrast, the T42D mutant allowed mating at a level comparable to that permitted by wild-type Ste50p. The phenotype observed was not due to different protein concentrations, because the steady-state levels of both mutant and wild-type Ste50p were very similar, as judged by Western blot analysis (Fig. 2B). Quantitative mating analysis revealed that the Ste50-T42A mutant caused a >30-fold decrease, compared to wild-type Ste50p, in suppression of the mating

defect of the *ste20 ste50* strain (Tableau 2-II), while the T42D mutant functioned essentially like wild-type Ste50p. These observations suggest that T42 may need to be phosphorylated for Ste50p to perform its function in the mating pathway.

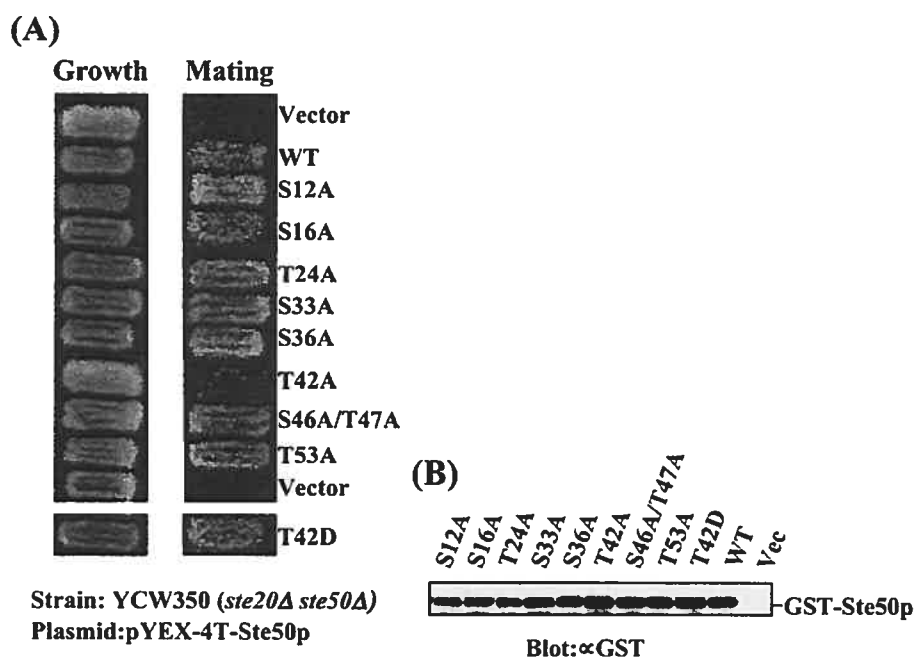


Figure 2-2 Replacement of threonine 42 of Ste50p with alanine abolishes its ability to suppress the $\Delta ste20$ defect in mating

(A) Yeast strain YCW350 (*MATa Δste20 Δste50*) was transformed with the various *STE50* alleles indicated as GST fusion constructs under the control of the *CUP1* promoter and tested for both growth (left) and ability to mate with tester strain DC17 (*MAT α his1*) by plate mating assay. The mating was performed for 8 h at 30°C, and diploids were then selected on minimal medium (right). (B) Western blot analysis of the expression of the various Ste50p constructs. Yeast cell extracts from strains used in panel A were prepared, resolved on SDS-PAGE, and probed with an anti-GST antibody (α GST).

Tableau 2-II Influence of Thr42 of Ste50p on the mating response of yeast with $\Delta ste20$ or $STE11^{\Delta SAM}$

Relevant genotype	Mating efficiency*	
	<i>Ste20Δ ste50Δ</i> #	<i>STE11^{ΔSAM} ssk2Δ ssk22Δ</i> #
Vector	$< 0.1 \times 10^{-5}$	$3.0 \pm 0.4 \times 10^{-5}$
<i>STE50^{WT}</i>	$34.0 \pm 2.0 \times 10^{-5}$	$450.0 \pm 40.0 \times 10^{-5}$
<i>STE50^{T42A}</i>	$1.0 \pm 0.5 \times 10^{-5}$	$6.6 \pm 0.5 \times 10^{-5}$
<i>STE50^{T42D}</i>	$40.0 \pm 2.0 \times 10^{-5}$	$360.0 \pm 30.0 \times 10^{-5}$

*Strains used were YCW350 (*MATa ste20Δ ste50Δ*) or YCW466 (*MATa STE11^{ΔSAM} ssk2Δ ssk22Δ*) transformed with *STE50* alleles indicated. All *STE50* alleles were expressed as GST fusions from *CUP1* promoter from 2 μ plasmid.

Mating efficiency is the number of diploids formed with the *MATa* tester strain DC17 cells divided by the number input *MATa* cells in the mating mixture at the beginning of the experiment multiplied by 100. The data are expressed as the average of three repetitions with SD indicated.

2.1.2.4.3 Phosphorylation of threonine 42 is required to suppress the mating defect of *Ste11SAMP*

The SAM domain of Ste11p is required for its proper function, as removal of this motif results in complete loss of Ste11p activity in the HOG pathway branch and greatly reduces the mating response (17, 35, 49). Intriguingly, the mating defect of *Ste11SAMP* strains was sensitive to the expression level of Ste11p: the chromosomal-level expression of an integrated allele generated an extremely low mating level that was close to sterile, while overexpression led to an almost complete suppression of the mating defect (17, 49). We constructed a strain with an integrated allele of *STE11* containing a deletion of aa 26 to 130 within the SAM domain (*STE11SAM*). This strain had a very low level of mating

response and behaved essentially as if it was sterile in plate mating assays. We found that overexpression of Ste50p from the *CUP1* promoter as a GST fusion protein could partially suppress the mating defect of the *STE11SAM* strain (Fig. 3, second panel from left), even though the Ste11SAMp protein has no detectable interaction with Ste50p (17, 49). This suppression of the mating response requires the activity of Ste11SAMp, since overexpression of Ste50p did not improve the mating of *ste11* cells (data not shown). However, overexpression of Ste50p was unable to make the osmosensitive *ssk2 ssk22 STE11SAM* strain capable of growth on high-osmolarity medium (Fig. 3, third panel from left). Although overexpression of Ste50p resulted in partial suppression of the *STE11SAM* mating defect, it did not allow a detectable pheromone-induced cell cycle arrest as measured by halo assay or permit either significant induction of a *FUS1::LacZ* reporter or typical pheromone-induced morphogenesis (data not shown).

The mechanism of suppression of the Ste11SAMp signaling defect by overexpression of Ste50p is unclear. However, due to its sensitivity, this system was also used to assay the Ste50p mutants for the ability to suppress the signaling defect of Ste11SAMp. All the S/T-to-A mutations except T42A were able to suppress the mating defect of Ste11SAMp to a level identical to that generated by the wild-type Ste50p. However, the T42A mutation almost completely blocked the ability of Ste50p overproduction to suppress the mating defect of Ste11SAMp (Fig. 3, second panel from left; Table II). In contrast to the T42A substitution, the T42D mutation was able to suppress the Ste11SAMp mating defect just like the wild-type Ste50p, suggesting that phosphorylation of Ste50p on T42 is required for the suppression function. Like the wild-type Ste50p, none of the Ste50p S/T-to-A mutants or the T42D mutant was able to suppress the Ste11SAMp signaling defect in the HOG pathway, although they all complemented Ste50p function in the *ssk2 ssk22 ste50* strain and permitted growth on high-osmolarity media (Fig. 3, right panel). This is consistent with previous observations that the interaction between Ste11p and Ste50p through their respective SAM domains is absolutely required for HOG pathway function (17, 35, 49).

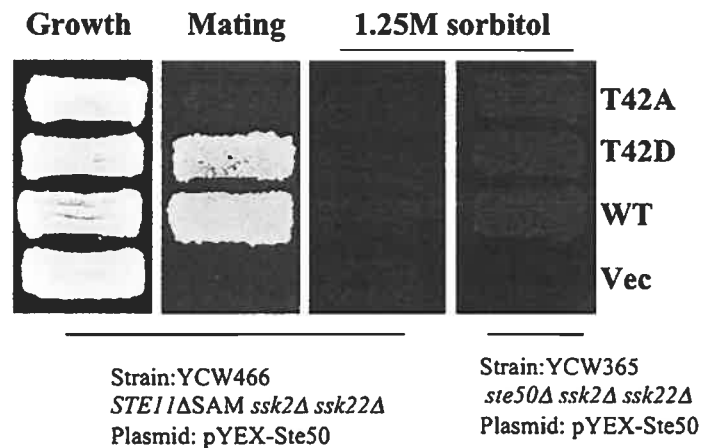


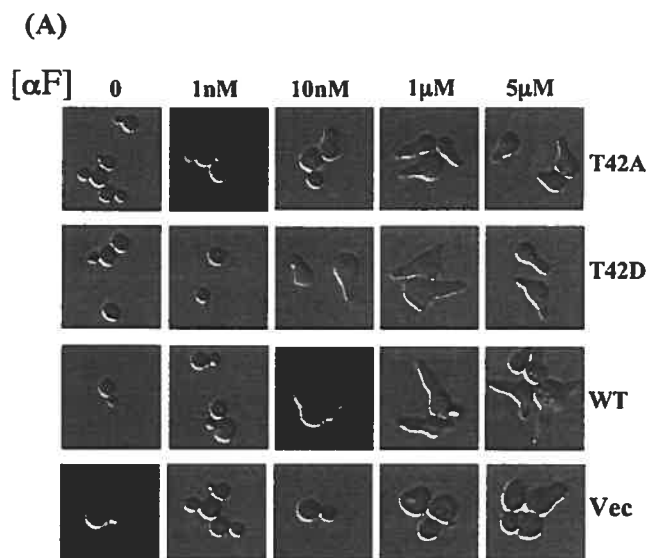
Figure 2-3 **Replacement of threonine 42 of Ste50p with alanine abolishes its ability to suppress the *STE11Δ* SAM defect in mating**

Yeast strain YCW466 (*MATa STE11ΔSAM Δssk2 Δssk22*) was transformed with the *STE50* alleles indicated and tested for growth (left), for the ability to mate with tester strain DC17 (*MATα his1*) by selecting for diploids on minimal medium (second panel from left), and for the ability to grow on high-osmolarity medium containing 1.25 M sorbitol (third panel from left). Both the T42A and T42D alleles of Ste50p complement wild-type (WT) Ste50p function to allow strain YCW365 (*Δste50 Δssk2 Δssk22*) to grow on high-osmolarity medium containing 1.25 M sorbitol (right). Vec, control vector.

2.1.2.4.4 *Threonine 42 preferentially regulates the function of Ste50p in the pheromone response pathway*

We next assessed the role of the potential regulatory phosphorylation site threonine 42 in functional-complementation assays. For these experiments, the T42A, T42D, and wild-type versions of Ste50p were expressed under the control of the *STE50* promoter on a centromere (CEN) plasmid and tested for the ability to complement *ste50* in both the

pheromone response and the HOG pathways. We found that the T42A mutant showed a defect in pheromone response as measured by *FUS1::LacZ* induction. Figure 4B shows that the Ste50-T42Ap mutant was less responsive than the wild-type protein, as indicated by the dose-response curve for *FUS1::LacZ* induction. In addition, the mating efficiency decreased ~10-fold compared to the wild type. (Mating efficiencies were as follows: *STE50*, 13.8 ± 1.05 ; *STE50-T42A*, 1.70 ± 0.20 ; *STE50-T42D*, 18.0 ± 0.34 ; vector, $<0.1 \pm 0.05$. The strain used was YCW315 [*MAT a ste50::TRP1*] transformed with the *STE50* alleles mentioned above. All *STE50* alleles were carried on the CEN plasmid and expressed under the control of its own promoter. The mating efficiency is the number of diploids formed with the *MAT α* tester strain DC17 cells divided by the number of plasmid-containing *MAT α* cells in the mating mixture at the beginning of the experiment multiplied by 100. The data given are expressed as the averages of three repetitions \pm standard deviations.) However, replacement of Thr42 with the phosphomimetic aspartic acid residue created no discernible phenotype, suggesting that phosphorylation of Thr42 is involved in the proper functioning of Ste50p. The phenotypes observed were not due to differences in protein concentrations, because the steady-state levels of both mutant and wild-type Ste50p proteins were very similar, as judged by Western blot analysis (Fig. 4C).



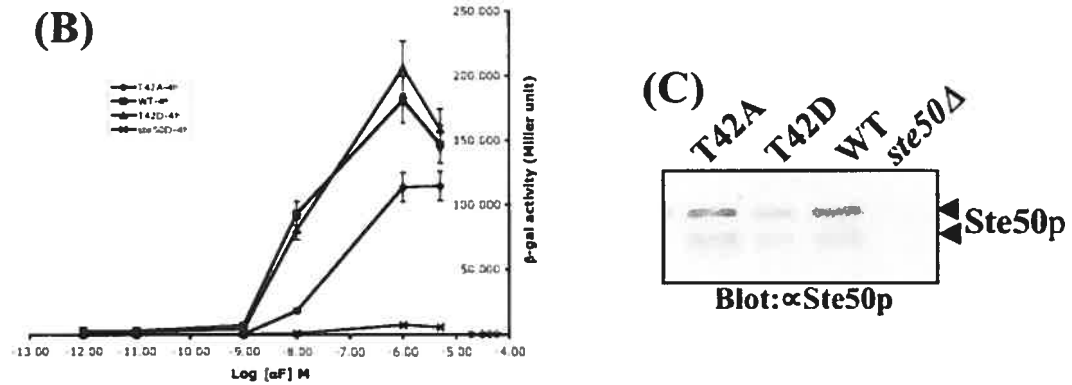


Figure 2-4 Phosphorylation of threonine 42 of Ste50p is required for the proper pheromone response

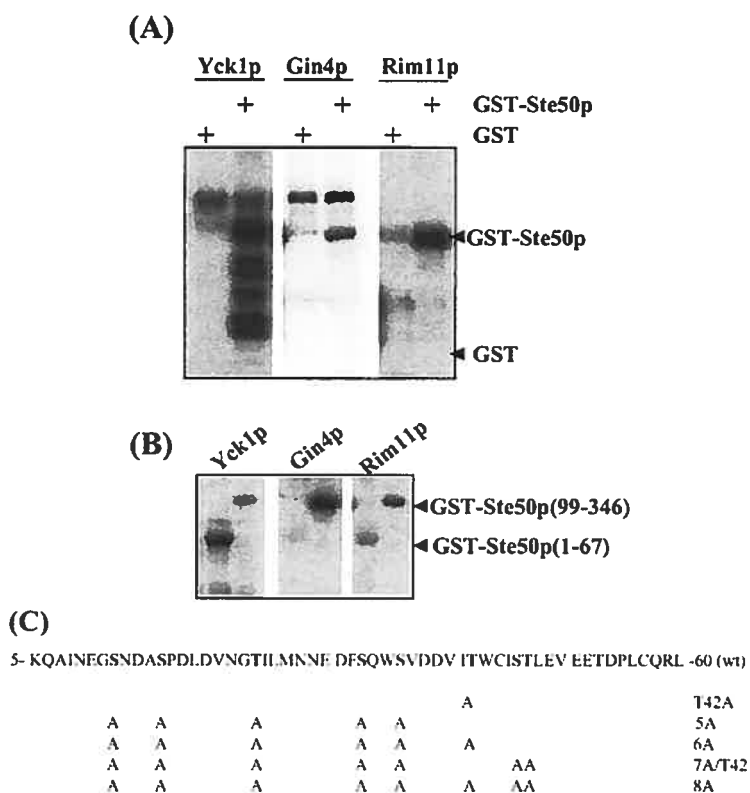
Yeast strain YCW393 (*MATa Δ ste50::TRP1 FUS1::LacZ::LEU2 sst1::hisG*) was transformed with *STE50* alleles expressed from its own promoter on a CEN plasmid or with a control vector. Exponentially growing cells were treated with the indicated concentrations of α mating factor (α F) for 4 h. (A and B) Cell morphology was monitored by microscopy (A), and mating-specific transcriptional activation was measured by β -galactosidase assays (B) as described in Materials and Methods. Each data point represents the average of triplicates \pm standard deviation. (C) The steady-state level of Ste50p protein before induction was analyzed by Western blotting with an anti-Ste50p (α Ste50p) polyclonal antibody. The arrowheads indicate Ste50p; the lower band is likely to be a degradation product.

2.1.2.4.5 Threonine 42 is phosphorylated by CKI *in vitro*

To identify the kinase that is responsible for the phosphorylation of Thr42 of Ste50p, we first identified the protein kinase(s) that could phosphorylate Ste50p *in vitro*. Ste50p was expressed and purified as a GST fusion protein from *E. coli* and used as a substrate in a kinase assay screen with a yeast kinase library (see Materials and Methods).

The protein kinases from the library were purified from yeast as pools of eight kinases. The positive pools were then deconvoluted to identify candidate kinases. This *in vitro* kinase screening identified Yck1p, Gin4p, and Rim11p as kinases capable of phosphorylating Ste50p *in vitro* (Fig. 5A). Further analysis showed that Yck1p phosphorylated both the N-terminal portion (aa 1 to 67) and the C-terminal portion (aa 99 to 346) of Ste50p, whereas Gin4p phosphorylated only the C-terminal portion. Rim11p phosphorylated both the N- and C-terminal fragments of Ste50p but gave a relatively weak signal on the N terminus of the protein (Fig. 5B). These results identified Yck1p and/or Rim11p as a candidate kinase for the phosphorylation of Thr42 of Ste50p. Sequence analysis indicated that Thr42 matches well with the canonical consensus sequence $(D/E)_n-X-X-S/T$ (where D/E is aspartic acid or glutamic acid, S/T is serine or threonine, X is any amino acid residue, and $n = 1$ to 3) for CKI phosphorylation (reference 45 and references therein). To determine if Thr42 of Ste50p is phosphorylated by Yck1p *in vitro*, the aa 1 to 67 fragment of Ste50p, which contains all the S/T residues in the SAM domain (Fig. 5C), was subcloned from the various mutants. These fragments were expressed, purified from *E. coli*, and used as substrates in the *in vitro* kinase assays with Yck1p. The results of the kinase assays are summarized in Fig. 5D. The fragment aa 1 to 67 of wild-type Ste50p was phosphorylated extensively by Yck1p, indicating that it is a good *in vitro* substrate for the kinase. In contrast, the phosphorylation was totally abolished when the first eight S/T residues in this fragment were mutated to alanine residues (8A), indicating that the Yck1p phosphorylation site(s) is among the first eight S/T residues. The 8A construct also served as a negative control for the kinase assay to show that Yck1p does not phosphorylate the GST part of the fusion protein. In contrast, the Ste50p fragment with all of the first eight S/T residues except Thr42 mutated to alanine residues (7A/T42) was a good substrate for Yck1p, indicating that the Thr42 residue of Ste50p represents a good Yck1p phosphorylation site *in vitro*. To check if Thr42 was the sole Yck1p phosphorylation site, the Ste50p fragment (aa 1 to 67) with only the T42A mutation was used in the kinase assay. The Ste50(1-67)T42Ap fragment was efficiently phosphorylated by Yck1p, indicating that Thr42 is not the sole

Yck1p phosphorylation site in this region of Ste50p. Other Yck1p *in vitro* phosphorylation sites are limited to the first five S/T residues, since the Ste50(1-67)p fragment with the first six S/T residues (including Thr42) mutated to alanine was not phosphorylated by Yck1p. Neither Gin4p nor Rim11p phosphorylated the T42 site of Ste50 in *in vitro* using Ste50(1-67)7A/T42p as a substrate (Fig. 5E), indicating that T42 is phosphorylated specifically by Yck1p *in vitro*, although there is still the possibility that Rim11p phosphorylates other S/T sites within the first 67 aa of Ste50p.



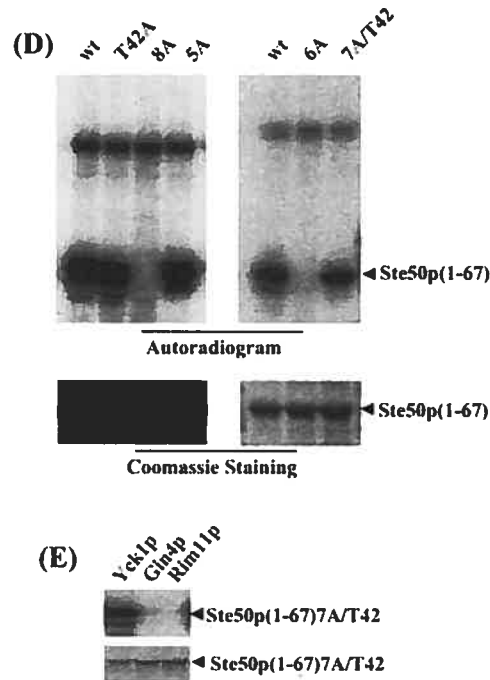


Figure 2-5 Protein kinases Yck1p, Gin4p, and Rim11p phosphorylate GST-Ste50p in vitro, and threonine 42 of Ste50p is phosphorylated in vitro by Yck1p

(A) Protein kinases Yck1p, Gin4p, and Rim11p isolated from yeast as GST fusions were tested for the ability to phosphorylate purified GST-Ste50p in vitro. The positions of phosphorylated GST-Ste50p and GST are indicated. +, present. (B) The N-terminal fragment of Ste50p is phosphorylated by Yck1p. The N-terminal and C-terminal fragments of Ste50p were expressed and purified from bacteria and used as substrates in vitro for the protein kinases indicated. The positions of the N-terminal and C-terminal fragments of Ste50p as GST fusions are indicated. (C) Amino acid sequence of the N-terminal fragment of Ste50p. The alanine substitutions are indicated, and the names of the corresponding mutants are indicated on the right. wt, wild type. (D) The N-terminal fragment (aa 1 to 67) of Ste50p with various alanine substitutions was purified from bacteria and used as a substrate in the in vitro kinase assay with Yck1p. The ^{32}P -labeled GST-Ste50p(1-67) is shown in the autoradiogram above, and the amounts of protein used in the kinase assay are

shown as Coomassie staining below. (E) Threonine 42 of Ste50p is not phosphorylated either by Gin4p or Rim11p. GST-Ste50p(1-67)7A/T42 was used as a substrate in the in vitro kinase assays with Yck1p, Gin4p, and Rim11p under the same conditions as for panel D. The autoradiogram (top) and the input protein indicated by Coomassie staining (bottom) are shown.

Although the screen identified only Yck1p as a Ste50p in vitro kinase, three other casein kinase isomers (Yck2p, Yck3p, and Hrr25p) exist in *S. cerevisiae*. We asked whether these other casein kinase isomers could also phosphorylate Ste50p in vitro. Yck2p and Hrr25 (Yck3p was found not to be expressed in the library) were individually purified from the yeast expression library and used in the kinase assay and were found to effectively phosphorylate both the full-length GST-Ste50p and the N-terminal region (aa 1 to 67) of Ste50p in vitro. These kinases also phosphorylated GST-Ste50(1-67)7A/T42p, but not GST-Ste50(1-67)8Ap, in vitro (data not shown).

2.1.2.4.6 *Ste50p is phosphorylated on threonine 42 in vivo*

To confirm that Thr42 was phosphorylated in vivo, the 8A and 7A/T42 mutants, as well as the wild-type Ste50p, were expressed as GST fusion proteins in a yeast strain with *STE50* deleted and then subjected to [³²P]orthophosphate metabolic labeling. The labeled Ste50p was purified, resolved by SDS-PAGE (Fig. 6A), and analyzed by tryptic phosphopeptide mapping. As shown in Fig. 6B, a single phosphopeptide that was observed on the maps of both the wild-type and the 7A/T42 mutant was absent from the map of the 8A mutant. Since the only difference between the 8A and 7A/T42 mutants was that Thr42 in the 7A/T42 mutant was replaced by a nonphosphorylatable alanine in the 8A mutant, Thr42 of Ste50p was the only residue responsible for the appearance of the phosphopeptide that was absent in the map obtained from the 8A mutant. This result strongly suggests that Thr42 of Ste50p was phosphorylated in vivo, most likely by a CKI isomer.

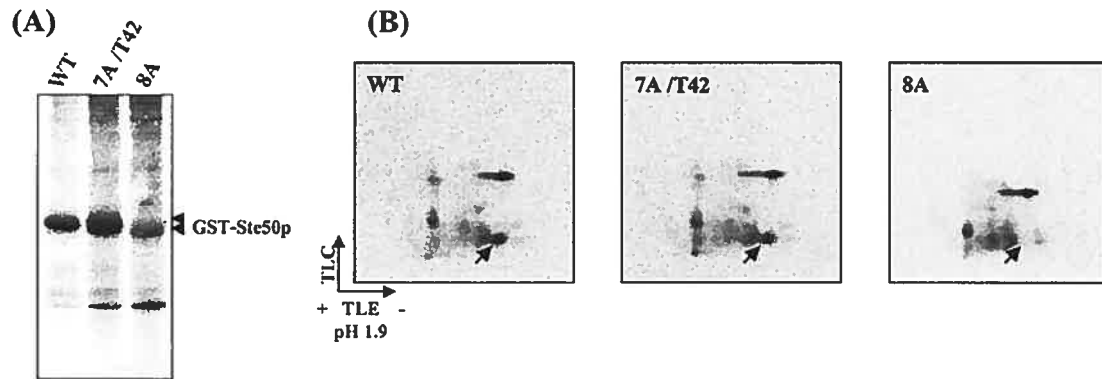


Figure 2-6 Ste50p is phosphorylated on threonine 42 in vivo

Ste50p wild type (WT) and the 7A/T42 and 8A mutants were expressed as GST fusion proteins and metabolically labeled with [32 P]orthophosphate and purified with glutathione-Sepharose beads. (A) The labeled Ste50p was resolved on SDS-PAGE; the arrowheads indicate GST-Ste50p. (B) The bands corresponding to Ste50p in panel A were excised, digested with trypsin, and subjected to 2-D phosphopeptide mapping. The arrows indicate the positions of a phosphopeptide which is present in the maps of both wild-type Ste50p and the 7A/T42 mutant but absent from the map of the 8A mutant.

2.1.2.4.7 *T42D* does not bypass the requirement for CKI activity for efficient mating

The above-mentioned data show that Thr42 is phosphorylated by CKI and that the Ste50p T42A mutant is unable to suppress the mating defect of strains with *STE11SAM*, suggesting that phosphorylation of Ste50p on Thr42 is required for the suppression effect. To determine if the phosphomimetic mutant (T42D) of Ste50p is able to bypass the requirement for yeast CKI activity in this process, we constructed a yeast strain with the genotype *STE11SAM ssk1 yck1 yck2^{ts}*. This strain (YCW1151) was temperature sensitive for growth at 37°C and had a nearly sterile phenotype at room temperature, as judged by plate mating assays; *SSK1* was also deleted to make the strain hyperosmotically sensitive, which can be useful for other assays. This strain was transformed with the overexpression

constructs *STE50*, *STE50-T42A*, and *STE50-T42D*, as well as a control vector, and the transformants were tested for their mating responses. As expected, both wild-type Ste50p and T42D suppressed the mating defect of the strain at 25°C, whereas the T42A mutant, like the control vector, failed to do so. At the nonpermissive temperature (37°C), the T42D mutant should be able to mate if phosphorylation of Ste50p Thr42 by YCK activity was the only requirement for the suppression of the mating defect of *STE11*ΔSAM. However, we found that Ste50-T42Dp was unable to give rise to a detectable level of mating, as judged by the plate mating assay (Fig. 7). This result is consistent with the observation that CKI activities are involved in multiple physiological processes, including mating (5, 16), some of which are collectively essential in *S. cerevisiae* (38, 47).

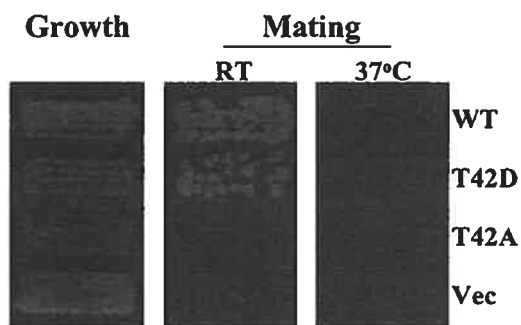


Figure 2-7 Replacement of T42 of Ste50p with aspartic acid does not bypass the requirement for Yck1p and/or Yck2p to suppress the mating defect of *STE11*ΔSAM

Yeast YCW1151 (*MATa ura3 leu2 his3 Δ ssk1::KanR yck1 yck2 [supi]ts STE11 Δ SAM*) was transformed with various *STE50* alleles (described in Figure 3) and control plasmid (Vec) as indicated. The cells were tested for the ability to mate both at 25 (room temperature [RT]) and 37°C with the tester strain DC16 (*MATa his1*). For mating at 37°C, both the tester and the strain to be tested were preincubated for 2 h before the two strains were mixed to start the mating process at the same temperature for five more hours and

then selected for diploids on a minimal medium plate. For mating at 25°C, the mating was allowed to proceed for 5 h at 25°C, and diploids were then selected at 37°C. WT, wild type.

2.1.2.4.8 The T42A mutation alters the subcellular fractionation profile of Ste50p

Since T42 is located within the N-terminal SAM domain core, we used a GST resin pull-down assay to examine whether the observed defect in the mating response was due to altered interaction of Ste50-T42Ap with Ste11p. To this end, the wild-type, T42A, and T42D versions of Ste50p expressed as GST fusion proteins, together with a control vector, were cotransformed with Myc-tagged Ste11p (49). The GST fusion proteins were purified on glutathione-Sepharose beads, and the presence of Ste11p was analyzed by Western blotting using an anti-Myc antibody (9E10). As shown in Fig. 8A, there was no significant difference in the amount of Myc-tagged Ste11p brought down by the wild type or the Thr42 mutants (either T42A or T42D) of Ste50p. This suggests that phosphorylation of Thr42 does not play a major role in modulating the interaction of Ste50p with Ste11p.

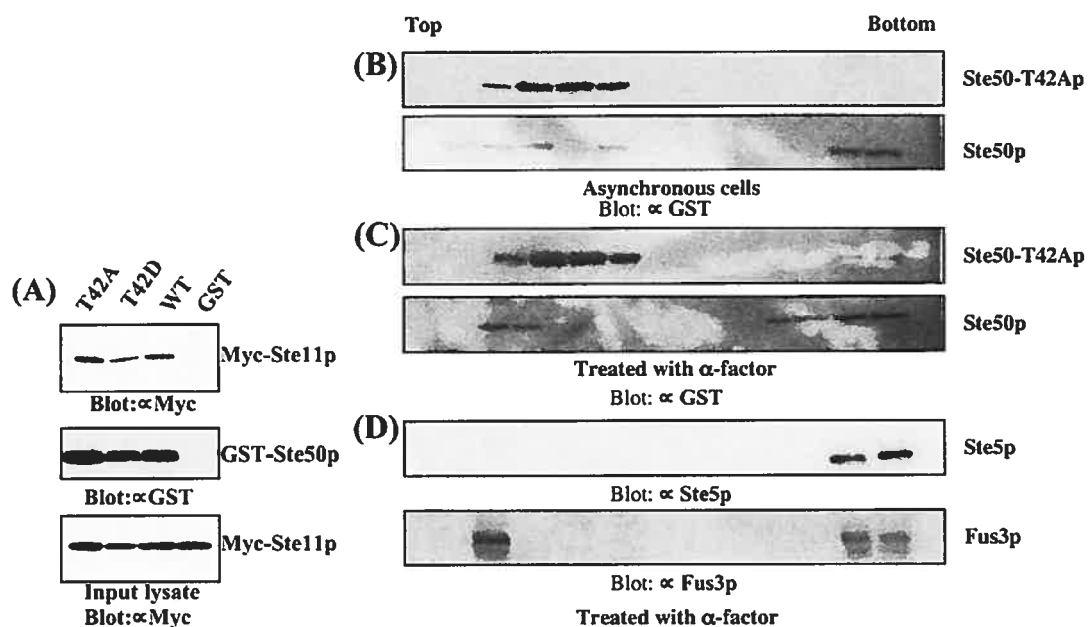


Figure 2-8 The T42A mutation retained the ability to interact with Ste11p but altered the subcellular fractionation profile of Ste50p

(A) T42A of Ste50p does not alter the association between Ste50p and Ste11p. Yeast strain YCW315 (*MATa Δ ste50::TRP1*) was cotransformed with pCW199 (Myc-tagged Ste11p) and various *STE50* alleles as GST fusions as indicated. Total cell extracts were prepared from $\sim 10^9$ exponentially growing cells and incubated with glutathione-Sepharose beads (GSB). The beads were washed, and bound proteins were analyzed by immunoblotting them with an anti-Myc (α Myc) (9E10) monoclonal antibody for the presence of Ste11p (top) and an anti-GST (α GST) antibody for GST-Ste50p (middle). The presence of Myc-Ste11p in all the samples at similar levels before GSB pull-down is shown in the bottom blot, which represents $\sim 1/10$ of the cell extract used in the pull-down experiment. (B to D) Total cell extracts from YCW315 expressing either GST-Ste50p or GST-Ste50-T42Ap were fractionated on sucrose gradients. Proteins from each fraction were subjected to immunoblot analyses with the indicated antibodies.

However, signaling protein complexes usually involve multiple interactions among their components, so we asked whether the mutation had any influence on the formation of Ste50p-containing protein complexes *in vivo*. We fractionated cell extracts using sucrose velocity gradients and analyzed the protein distributions by immunoblotting. Comparative analysis of the fractionation profiles showed that the distribution of GST-Ste50-T42Ap was significantly different from that of the GST-Ste50 protein. Fractionation of the cell extracts prepared from asynchronously growing cells revealed that both GST-Ste50p and GST-Ste50-T42Ap were found in the light pool near the top of the gradient but that only the wild-type protein was found with heavy protein complexes at the bottom of the gradient (Fig. 8B). These differences became even more apparent when we analyzed the distribution of the GST-Ste50p-containing protein complexes prepared from pheromone-treated cells. Pheromone treatment resulted in more of the wild-type Ste50p pool shifting to the bottom of the density gradient. In contrast, pheromone treatment did not efficiently recruit the mutant Ste50-T42Ap to these heavy protein complexes; the majority of the T42A substituted protein remained at the top of the gradient (Fig. 8C). We also examined the distributions of both Ste5p and Fus3p from pheromone-treated cell extracts in the density gradient. As shown in Fig. 8D, this heavy fraction includes much of the Fus3p and essentially all of the Ste5p. These changes in the cosedimentation profiles suggest that the mutant Ste50p may be ineffectively associated with pheromone signaling complexes.

2.1.2.5 Discussion

MAP3K nodes are important for the regulation of MAPK modules. One of the best-studied MAP3K proteins is Ste11p, which is shared by several signaling pathways in the yeast *S. cerevisiae* (24, 28, 34). Ste50p is an important regulator of Ste11p function (17, 35, 36, 49). Despite this regulatory role played by Ste50p in the MAPK cascades that share Ste11p, little is known about the regulation of Ste50p itself. In an attempt to gain some insight into the role that phosphorylation may play in modulating the function of Ste50p, we established by 2-D tryptic phosphopeptide mapping analysis that Ste50p is

phosphorylated on multiple serine/threonine residues *in vivo*. One of these sites of phosphorylation is a target for CKI activity, and this site plays a role in the regulation of Ste50p function.

Using a yeast protein kinase library (55), we identified several protein kinases, including Yck1p, that can phosphorylate GST-Ste50p *in vitro*. It is evident that our screen may not have identified all possible protein kinases that could phosphorylate GST-Ste50p *in vitro* for two reasons: first, not all the protein kinases are present or expressed in the library; second, expression of multiple kinase clones as a pool may lead to the loss or underrepresentation of those clones that grow slowly. For example, Yck3p was not found in the library, and while Yck2p and Hrr25p were present in the library and were active as individual proteins, they were not picked up in the first round of the *in vitro* kinase screen using the pools of eight kinases. Nevertheless, this genomewide screen provides an approach to identify candidate kinases for a specific substrate in the absence of genetic or biological information.

We focused our study on the N-terminal portion of Ste50p, since it contains the functionally important and relatively well-studied SAM domain (17, 32, 35, 36, 49). The *in vitro* kinase assay established that Thr42 of Ste50p was phosphorylated by CKI. Although initially only Yck1p was identified as a relevant kinase, further analysis using other purified CKI isomers (Yck2p and Hrr25p) indicated that all yeast CKI isomers tested were able to phosphorylate GST-Ste50p *in vitro*. It is not surprising that CKI isomers lack specificity in the *in vitro* assay. It is believed that regulation of the specificity of this family of kinases is controlled in part by their spatial localization and proximity to substrates (13). Thus, more detailed *in vivo* studies in which both spatial organization and temporal regulation of CKI activity is maintained will be necessary to address the question of which YckI isomer(s) is responsible for the phosphorylation of T42 of Ste50p *in vivo*. However, it is perhaps significant that Yck1p and/or Yck2p is localized to the plasma membrane, where the mating response signals are initiated.

The CKI family of protein kinases is a group of highly related, ubiquitously expressed serine/threonine kinases found in all eukaryotic organisms from protozoa to mammals. With a wide subcellular distribution that includes the plasma-organelle membranes, the cytoplasm, and the nucleus, CKI family members have been implicated in diverse roles that control critical physiological processes, such as Wnt signaling, circadian rhythms, DNA repair, and nuclear import (31, 45, 56). There are at least seven CKI isomers that have been characterized in mammals (13, 45). Recently, it has been elegantly shown that CKI α , in concert with the glycogen synthase kinase-3 protein kinase, is responsible for the hyperphosphorylation of β -catenin, which is required to target β -catenin for degradation in the Wnt signaling pathway. CKI is required for the “priming” phosphorylation event (1, 53). CKI has also been shown to phosphorylate the NF-AT4 transcription factor to mask its nuclear import signal and thus regulate its subcellular localization (56).

The yeast *S. cerevisiae* has four CKI gene homologues: *HRR25* and *YCK3* are an essential pair that are involved in processes such as DNA repair and protein vesicle transport (47), whereas the *YCK1* and *YCK2* genes, which provide all the plasma membrane CKI activity, comprise another pair encoding an essential function (38). Yck1p and Yck2p have been shown to associate with the plasma membrane, to localize to sites of polarized growth, and to act in morphogenesis and septin organization (37, 38). It has been shown that yeast Yck1p and Yck2p are responsible for the phosphorylation of plasma membrane-localized proteins, including the H⁺-ATPase (10) and the α -factor receptor, Ste2p (16). The phosphorylation of Ste2p provides the signal for ubiquitination and internalization of the receptor (16). Yeast cells containing Ste2p variants that have C-terminal phosphorylation sites mutated show mating response defects, such as increased sensitivity to α -factor and moderately decreased mating efficiency (5). Similarly, the signal for ubiquitination and subsequent internalization of Ste3p, the α -factor receptor, is also mediated by Yck1p/Yck2p phosphorylation within the PEST-like sequence of the receptor. In this case, however, the phosphorylation is constitutive and independent of ligand binding (11, 30). Overexpression

of Yck1p has also been reported to interfere with pheromone-induced cell cycle arrest in wild-type yeast cells (4).

It appears that residue Thr42 of Ste50p needs to be phosphorylated for a proper mating response, since the T42A mutation causes a defect in mating. The defect is not likely due merely to a structural change, since T42D-containing proteins behave indistinguishably from wild-type proteins. Furthermore, in yeast strain YCW365 (*ssk2 ssk22 ste50*), both the T42A and T42D alleles complement Ste50p function in the HOG pathway in a manner indistinguishable from that of the wild type, suggesting that the interaction between Ste11p and Ste50p is not affected. This notion is supported by the fact that both the T42A and T42D versions of Ste50p can pull down Ste11p as well as the wild-type protein does. The residue Thr42 of Ste50p is located in the first helix of the SAM domain in the alignment with the structure of the Eph receptor SAM domain (43). Although the residue at this position is not highly conserved at the primary sequence level, many SAM domains from a variety of organisms have an acidic glutamic or aspartic acid residue at the Thr42-equivalent position (44). Interestingly, T42A, but not T42D, is severely defective in its ability to suppress the mating defect of Ste11SAMP, which has no detectable interaction with Ste50p (17, 35, 49), suggesting that phosphorylation of Ste50p at T42 may be required to maintain or amplify a weak mating signal generated from the crippled Ste11p kinase. There is no suppression observed with a *ste11* null mutation through overexpression of Ste50p, suggesting that the suppression is not taking place at a step downstream of Ste11p.

Our subcellular-fractionation results suggest that Ste50-T42Ap has an altered ability to form heavy protein complexes compared to the wild-type protein (Fig. 8). Such alteration may result in less Ste50-T42Ap localizing to the pheromone signaling protein core complex and thus lead to inefficient signaling. Overall, it appears that phosphorylation of residue Thr42 is important for the function of Ste50p in the mating response pathway, but intriguingly, the role of Ste50p in the HOG pathway does not appear to be influenced by the phosphorylation state of T42. This suggests that although the role of Ste50p is to

serve as a coactivator of Ste11p in both pathways, posttranslational modifications of the protein can alter its relative effectiveness in one pathway or the other. Although our metabolic-labeling result indicated that the general phosphorylation of Ste50p did not seem to be affected by pheromone treatment and appeared to be constitutive, we cannot rule out the possibility that some phosphorylation site(s) may be dynamically regulated. Because the Yck1 and Yck2 proteins exhibit localization to sites of polarized growth that overlap with the observed localization of proteins like Ste20p, it is possible that the modulation of Ste50p function through casein kinase phosphorylation of Thr42 acts to fine tune the activation of Ste11p in the mating pathway. Yck1p and Yck2p also phosphorylate pheromone receptors and signal their internalization, which is necessary for proper mating functions, such as orientation or reorientation of mating projections (16, 46). Although the low level of expression of endogenous Ste50p and Ste11p has precluded their direct cellular localization, they function as parts of complexes that are localized to mating projections.

Sharing components among different MAPK cascades is a common phenomenon in eukaryotes. Although our understanding of why this architecture has evolved and how these shared components are differentially regulated is far from clear, it is generally accepted that cells use the sharing of MAPK cascade components to coordinate physiological processes among different pathways. It is conceivable that fine tuning of the signal distribution of the shared components is required for the differential regulation of specific pathways. In this case, the Ste50p function in the mating pathway may be fine tuned by yeast CKI-directed phosphorylation.

2.1.2.6 Acknowledgments

We thank H. Zhu and M. Snyder for the yeast kinase library and L. Robinson for strains.

G.J. was the recipient of a Deutsche Forschungsgemeinschaft postdoctoral fellowship and an NRC/NSERC postdoctoral fellowship. M.Z. was the recipient of an

NRC/NSERC postdoctoral fellowship. This work was supported by the NRC/GHI and by grants from the Cancer Research Society to S.M. and MOP 85769 to D.Y.T. and M.W.

2.1.2.7 References

1. **Amit, S., A. Hatzubai, Y. Birman, J. S. Andersen, E. Ben-Shushan, M. Mann, Y. Ben-Neriah, and I. Alkalay.** 2002. Axin-mediated CKI phosphorylation of beta-catenin at Ser 45: a molecular switch for the Wnt pathway. *Genes Dev* **16**:1066-76.
2. **Banuett, F.** 1998. Signalling in the yeasts: an informational cascade with links to the filamentous fungi. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**:249-274.
3. **Boyle, W. J., P. V. d. Geer, and T. Hunter.** 1991. Phosphopeptide mapping and phosphoamino acid analysis by 2-dimensional separation on thin layer cellulose plates. *Meth. Enzym.* **201**:110-149.
4. **Burchett, S., A. Scott, B. Errede, and H. G. Dohlman.** 2001. Identification of novel pheromone-response regulators through systematic overexpression of 120 protein kinases in yeast. *J Biol Chem* **276**:26472-26478.
5. **Chen, Q., and J. B. Konopka.** 1996. Regulation of the G-protein-coupled alpha-factor pheromone receptor by phosphorylation. *Mol Cell Biol* **16**:247-57.
6. **Cobb, M. H.** 1999. MAP kinase pathways. *Prog Biophys Mol Biol* **71**:479-500.
7. **Cook, J. G., L. Bardwell, and J. Thorner.** 1997. Inhibitory and activating functions for MAPK Kss1 in the *S. cerevisiae* filamentous-growth signalling pathway. *Nature* **390**:85-8.
8. **Drogen, F., S. M. O'Rourke, V. M. Stucke, M. Jaquenoud, A. M. Neiman, and M. Peter.** 2000. Phosphorylation of the MEKK Ste11p by the PAK-like kinase Ste20p is required for MAP kinase signaling in vivo. *Curr Biol* **10**:630-9.
9. **Elion, E. A.** 2000. Pheromone response, mating and cell biology. *Curr Opin Microbiol* **3**:573-81.
10. **Estrada, E., P. Agostinis, J. R. Vandenheede, J. Goris, W. Merlevede, J. Francois, A. Goffeau, and M. Ghislain.** 1996. Phosphorylation of yeast plasma membrane H⁺-ATPase by casein kinase I. *J Biol Chem* **271**:32064-72.
11. **Feng, Y., and N. G. Davis.** 2000. Akr1p and the type I casein kinases act prior to the ubiquitination step of yeast endocytosis: Akr1p is required for kinase localization to the plasma membrane. *Mol Cell Biol* **20**:5350-9.
12. **Gopalbhai, K., and S. Meloche.** 1998. Repression of mitogen-activated protein kinases ERK1/ERK2 activity by a protein tyrosine phosphatase in rat fibroblasts transformed by upstream oncoproteins. *J Cell Physiol* **174**:35-47.
13. **Gross, S. D., and R. A. Anderson.** 1998. Casein kinase I: spatial organization and positioning of a multifunctional protein kinase family. *Cell Signal* **10**:699-711.

14. **Gustin, M. C., J. Albertyn, M. Alexander, and K. Davenport.** 1998. MAP kinase pathways in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev* **62**:1264-300.
15. **Herskowitz, I.** 1995. MAP kinase pathways in yeast: for mating and more. *Cell* **80**:187-197.
16. **Hicke, L., B. Zanolari, and H. Riezman.** 1998. Cytoplasmic tail phosphorylation of the alpha-factor receptor is required for its ubiquitination and internalization. *J Cell Biol* **141**:349-58.
17. **Jansen, G., F. Buhring, C. P. Hollenberg, and M. Ramezani Rad.** 2001. Mutations in the SAM domain of STE50 differentially influence the MAPK-mediated pathways for mating, filamentous growth and osmotolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Genet Genomics* **265**:102-17.
18. **Leberer, E., D. Dignard, D. Harcus, D. Y. Thomas, and M. Whiteway.** 1992. The protein kinase homologue Ste20p is required to link the yeast pheromone response G-protein $\beta\gamma$ subunits to downstream signalling components. *EMBO J.* **11**:4815-4824.
19. **Leberer, E., D. Dignard, L. Hougan, D. Y. Thomas, and M. Whiteway.** 1992. Dominant-negative mutants of a yeast G-protein β subunit identify two functional regions involved in pheromone signalling. *EMBO J.* **11**:4805-4813.
20. **Leberer, E., D. Y. Thomas, and M. Whiteway.** 1997. Pheromone signalling and polarized morphogenesis in yeast. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **7**:59-66.
21. **Leberer, E., C. Wu, T. Leeuw, A. Fourest-Lieuvin, J. E. Segall, and D. Y. Thomas.** 1997. Functional characterization of the Cdc42p binding domain of yeast Ste20p protein kinase. *EMBO J.* **16**:83-97.
22. **Leeuw, T., A. Fourest-Lieuvin, C. Wu, J. Chenevert, K. Clark, M. Whiteway, D. Y. Thomas, and E. Leberer.** 1995. Pheromone response in yeast: association of Bem1p with proteins of the MAP kinase cascade and actin. *Science* **270**:1210-1213.
23. **Levin, D. E., and B. Errede.** 1995. The proliferation of MAP kinase signaling pathways in yeast. *Curr. Opin. Cell Biol.* **7**:197-202.
24. **Liu, H., C. Styles, and G. R. Fink.** 1993. Elements of the yeast pheromone response pathway required for filamentous growth of diploids. *Science* **262**:1741-1744.
25. **Madhani, H. D., and G. R. Fink.** 1998. The riddle of MAP kinase signaling specificity. *Trends Genet* **14**:151-5.
26. **Madhani, H. D., C. A. Styles, and G. R. Fink.** 1997. MAP kinases with distinct inhibitory functions impart signaling specificity during yeast differentiation. *Cell* **91**:673-84.
27. **Marshall, C. J.** 1995. Specificity of receptor tyrosine kinase signaling: transient versus sustained extracellular signal-regulated kinase activation. *Cell* **80**:179-85.
28. **O'Rourke, S. M., and I. Herskowitz.** 1998. The Hog1 MAPK prevents cross talk between the HOG and pheromone response MAPK pathways in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev* **12**:2874-86.

29. **Pan, X., T. Harashima, and J. Heitman.** 2000. Signal transduction cascades regulating pseudohyphal differentiation of *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Opin Microbiol* **3**:567-72.
30. **Panek, H. R., J. D. Stepp, H. M. Engle, K. M. Marks, P. K. Tan, S. K. Lemmon, and L. C. Robinson.** 1997. Suppressors of YCK-encoded yeast casein kinase 1 deficiency define the four subunits of a novel clathrin AP-like complex. *EMBO J* **16**:4194-4204.
31. **Peters, J. M., R. M. McKay, J. P. McKay, and J. M. Graff.** 1999. Casein kinase I transduces Wnt signals. *Nature* **401**:345-50.
32. **Ponting, C. P.** 1995. SAM: a novel motif in yeast sterile and *Drosophila* polyhomeotic proteins. *Protein Sci* **4**:1928-30.
33. **Portela, P., S. Howell, S. Moreno, and S. Rossi.** 2002. In vivo and in vitro phosphorylation of two isoforms of yeast pyruvate kinase by protein kinase A. *J Biol Chem* **277**:30477-87.
34. **Posas, F., and H. Saito.** 1997. Osmotic activation of the HOG MAPK pathway via Ste11p MAPKKK: scaffold role of Pbs2p MAPKK. *Science* **276**:1702-5.
35. **Posas, F., E. A. Witten, and H. Saito.** 1998. Requirement of STE50 for osmotic stress-induced activation of the STE11 mitogen-activated protein kinase kinase in the high-osmolarity glycerol response pathway. *Mol Cell Biol* **18**:5788-96.
36. **Ramezani Rad, M., G. Jansen, F. Buhning, and C. P. Hollenberg.** 1998. Ste50p is involved in regulating filamentous growth in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* and associates with Ste11p. *Mol Gen Genet* **259**:29-38.
37. **Robinson, L. C., C. Bradley, J. D. Bryan, A. Jerome, Y. Kweon, and H. R. Panek.** 1999. The Yck2 yeast casein kinase 1 isoform shows cell cycle-specific localization to sites of polarized growth and is required for proper septin organization. *Mol Biol Cell* **10**:1077-92.
38. **Robinson, L. C., E. J. Hubbard, P. R. Graves, A. A. DePaoli-Roach, P. J. Roach, C. Kung, D. W. Haas, C. H. Hagedorn, M. Goebel, M. R. Culbertson, and et al.** 1992. Yeast casein kinase I homologues: an essential gene pair. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**:28-32.
39. **Robinson, M. J., and M. H. Cobb.** 1997. Mitogen-activated protein kinase pathways. *Curr Opin Cell Biol* **9**:180-6.
40. **Rose, M. D., F. Winston, and P. Hieter.** 1990. *Methods in yeast genetics. A laboratory manual.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
41. **Saiki, R. J., D. H. Gelfand, S. Stoffel, S. J. Scharf, R. Higuchi, G. T. Horn, K. B. Mullis, and H. A. Erlich.** 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**:487-491.
42. **Schaeffer, H. J., and M. J. Weber.** 1999. Mitogen-activated protein kinases: specific messages from ubiquitous messengers. *Mol Cell Biol* **19**:2435-44.

43. **Sprague, G. F., Jr.** 1998. Control of MAP kinase signaling specificity or how not to go HOG wild. *Genes Dev* **12**:2817-20.
44. **Stapleton, D., I. Balan, T. Pawson, and F. Sicheri.** 1999. The crystal structure of an Eph receptor SAM domain reveals a mechanism for modular dimerization. *Nat Struct Biol* **6**:44-9.
45. **Tobin, A. B.** 2002. Are we beta-ARKing up the wrong tree? Casein kinase I alpha provides an additional pathway for GPCR phosphorylation. *Trends Pharmacol. Sci.* **23**:337-43.
46. **Vallier, L. G., J. E. Segall, and M. Snyder.** 2002. The alpha-factor receptor C-terminus is important for mating projection formation and orientation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell Motil Cytoskeleton* **53**:251-66.
47. **Wang, X., M. F. Hoekstra, A. J. DeMaggio, N. Dhillon, A. Vancura, J. Kuret, G. C. Johnston, and R. A. Singer.** 1996. Prenylated isoforms of yeast casein kinase I, including the novel Yck3p, suppress the *gcs1* blockage of cell proliferation from stationary phase. *Mol Cell Biol* **16**:5375-85.
48. **Widmann, C., S. Gibson, M. B. Jarpe, and G. L. Johnson.** 1999. Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human. *Physiol Rev* **79**:143-80.
49. **Wu, C., E. Leberer, D. Y. Thomas, and M. Whiteway.** 1999. Functional characterization of the interaction of Ste50p with Ste11p MAPKKK in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* **10**:2425-40.
50. **Wu, C., V. Lytvyn, D. Y. Thomas, and E. Leberer.** 1997. The phosphorylation site for Ste20p-like protein kinases is essential for the function of myosin-I in yeast. *J. Biol. Chem.* **272**:30623-30626.
51. **Wu, C., M. Whiteway, D. Y. Thomas, and E. Leberer.** 1995. Molecular characterization of Ste20p, a potential mitogen-activated protein or extracellular signal-regulated kinase kinase (MEK) kinase kinase from *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **270**:15984-15992.
52. **Xu, G., G. Jansen, D. Y. Thomas, C. P. Hollenberg, and M. Ramezani Rad.** 1996. Ste50p sustains mating pheromone-induced signal transduction in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Microbiol.* **20**:773-783.
53. **Yanagawa, S., Y. Matsuda, J. S. Lee, H. Matsubayashi, S. Sese, T. Kadowaki, and A. Ishimoto.** 2002. Casein kinase I phosphorylates the Armadillo protein and induces its degradation in *Drosophila*. *Embo J* **21**:1733-42.
54. **Zhou, Z., A. Gartner, R. Cade, G. Ammerer, and B. Errede.** 1993. Pheromone-induced signal transduction in *Saccharomyces cerevisiae* requires the sequential function of three protein kinases. *Mol Cell Biol* **13**:2069-80.
55. **Zhu, H., J. F. Klemic, S. Chang, P. Bertone, A. Casamayor, K. G. Klemic, D. Smith, M. Gerstein, M. A. Reed, and M. Snyder.** 2000. Analysis of yeast protein kinases using protein chips. *Nat Genet* **26**:283-9.

56. **Zhu, J., F. Shibasaki, R. Price, J. C. Guillemot, T. Yano, V. Dotsch, G. Wagner, P. Ferrara, and F. McKeon.** 1998. Intramolecular masking of nuclear import signal on NF-AT4 by casein kinase I and MEKK1. *Cell* **93**:851-61.

2.1.3 Épilogue

Quelques années plus tard, d'autres travaux vinrent encore approfondir la question de la relation entre Ste50 et Ste11 dans la spécificité des signaux relayés par cette dernière (Lamson et al, 2006; Truckses et al, 2006; Wu et al, 2006a). On y démontre notamment l'importance du ciblage membranaire de Ste11 pour son activation. La protéine Opy2 est également identifiée comme partenaire de Ste50 permettant à Ste11 d'activer spécifiquement la voie Hog1 (Section 1.3.3, page 35).

2.1.4 Données supplémentaires

Les connaissances au moment où ces expériences ont été entreprises suggéraient que Ste11 régulait l'activité biologique de Ste50 par phosphorylation. En effet, Ste11 peut phosphoryler Ste50 *in vitro*, notamment dans sa partie N-terminale. En revanche, ce n'est pas le cas *in vivo* puisque Ste50 demeure autant phosphorylée en présence qu'en absence de Ste11. Il n'en demeure pas moins que Ste50 est phosphorylée *in vivo*, ce qui en soi mérite une étude approfondie.

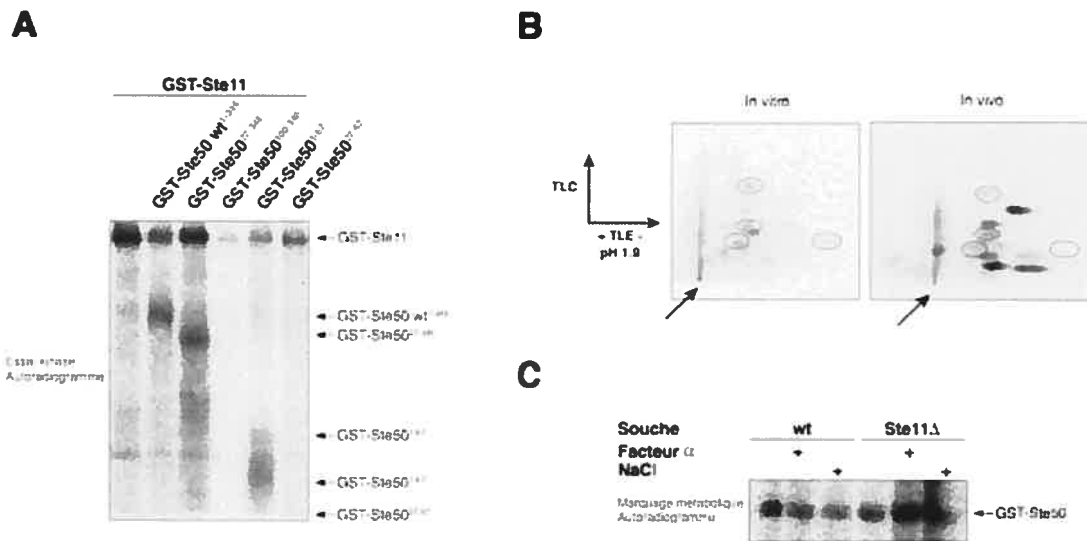


Figure 2-9 Phosphorylation de Ste50 *in vitro* et *in vivo*

A) Essai kinase de Ste11 sur des mutants de délétion de Ste50 suggérant une phosphorylation prépondérante parmi les 100 premiers résidus. B) Cartes phosphopeptidiques de Ste50 telle que phosphorylée par *in vitro* par Ste11 (panneau de gauche), ou suivant un marquage métabolique au [³²P] (*in vivo*; panneau de droite). Les flèches indiquent le lieu du dépôt sur la plaque de cellulose. Les cercles dénotent des phosphopeptides apparemment correspondants. C) Marquage métabolique de Ste50 exprimée dans une souche de type sauvage (wt) ou dépourvue de Ste (Ste11Δ) suite à un traitement aux phéromones (Facteur α) ou un choc osmotique (NaCl).

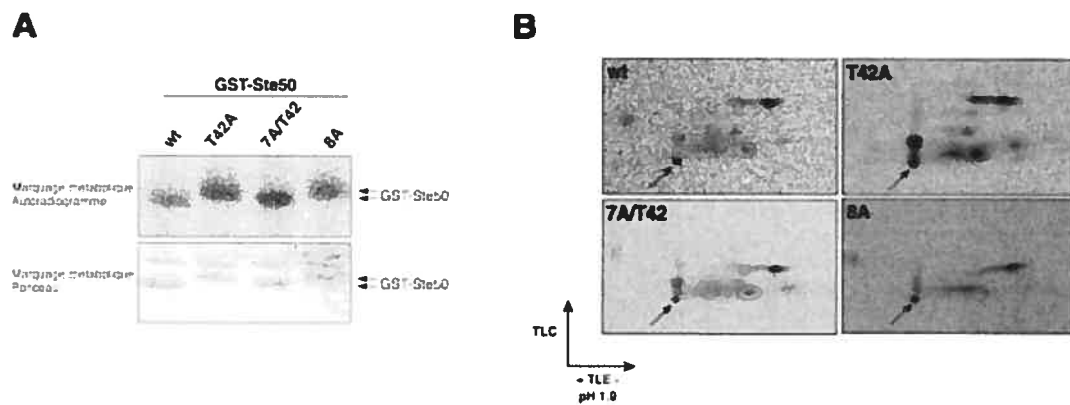


Figure 2-10 **Comportement biochimique du mutant T42A**

Marquage métabolique au $[^{32}\text{P}]$ de mutants de Ste50. A) Autoradiogramme (panneau supérieur) et membrane traitée au Rouge Ponceau (panneau inférieur) révélant des différences de migration électrophorétique en absence de la thréonine 42 de Ste50. B) Cartes phosphopeptidiques avec phosphopeptide récurrent (cercles rouges) chez Ste 50 de type sauvage (wt) et chez plusieurs mutants à l'exception du 8A.

2.2 Phosphorylation of serine 283 is required for ERK1 nuclear function

2.2.1 Contexte

L'importance de la phosphorylation des résidus thréonine et tyrosine du motif TEY de ERK1/2 pour l'activité catalytique et la localisation subcellulaire n'est plus à démontrer. Toutefois, des évidences de phosphosérine laissent sous-entendre qu'il y a au moins un autre site de phosphorylation. Cette étude a pour but l'identification et la caractérisation d'un de ces résidus ainsi que la détermination de son rôle dans les signaux relayés par ERK1.

2.2.2 Manuscrit pour soumission à *EMBO Journal*

Le manuscrit présenté ci-dessous a été adapté au gabarit de la thèse. Son format ne correspond pas en tous points à celui spécifié par les éditeurs de EMBO J., mais le texte et les figures sont identiques à ceux du manuscrit qui sera soumis sous peu.

Phosphorylation of serine 283 is required for ERK1 nuclear function*

Mathieu Arcand^{1,2}, Philippe Coulombe^{1,3}, Catherine Julien¹, France Dumas⁴ and Sylvain Meloche^{*,1,2,3}

¹Institut de Recherche en Immunologie et Cancérologie and ²Departments of Pharmacology and ³Molecular Biology, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada; ⁴Institut de Recherche en Biotechnologie, Conseil National de Recherche du Canada, Montréal, Québec, Canada


Running title: Phosphorylation of serine 283 in ERK1 function

Keywords: ERK/MAP kinase insert/MEK/phosphorylation/subcellular localization

Subject category: Signal transduction

This work was supported by a grant from the National Cancer Institute of Canada. M. Arcand and P. Coulombe are recipients of, studentships from the FRSQ and the CIHR, respectively. S. Meloche holds a Canada Research Chair in Cellular Signaling.

* Corresponding author: Dr. Sylvain Meloche
Institut de recherche en immunologie et cancer
Université de Montréal, C.P. 6128
Succ. Centre-ville
Montréal (Québec) H3C 3J7
Canada
Tel.: (514) 343-6966
Fax: (514) 343-6954



2.2.2.1 Abstract

The ERK1/2 MAP kinase pathway plays a pivotal role in many cellular processes including growth, differentiation and survival. Upon activation by the cytoplasmic anchors and upstream kinases MEK1 and MEK2, ERK1/2 are phosphorylated on their activating threonine and tyrosine residues, thereby causing a significant increase in catalytic activity accompanied by their nuclear translocation. Here, we identify serine 283 as a novel phosphorylated residue located next to the MAP kinase insert of ERK1. Phosphorylation of this highly conserved residue does not modulate ERK1 phosphotransferase activity *in vitro* and *in vivo*. Luciferase reporter assays and immunofluorescence experiments on cells co-expressing MEK1 and ERK1 variants in the presence or absence of leptomycin B demonstrate that serine 283 is required for ERK1 nuclear entry and gene induction. NLS- and NES-tagged ERK1 also displayed lower nuclear activity. Despite retaining its Common Docking capabilities, the ERK1 S283A mutant, is defective in MEK1 and nucleoporin binding. When re-introduced by infection in ERK1-null fibroblasts, ERK1 S283A was also deficient in nuclear entry. In addition, expression of this mutant blocks PC12 cells neuronal differentiation. We conclude that phosphorylation on serine 283 affects ERK1 function by acting on its nuclear entry through modified protein-protein interactions. We propose a model where the MAP kinase insert mediates interactions essential for MEK-accompanied ERK1 nuclear entry, whereas nuclear export occurs through Common Docking interactions.

2.2.2.2 Introduction

Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways are known to play a pivotal role in a wide variety of biological processes. Their organization in modules of three kinases is highly conserved from yeasts to mammals. The prototypical MAP kinase pathway, the Extracellular signal-Regulated Kinase (ERK)1/2 cascade, is essential for cell growth, proliferation and differentiation (reviewed in (Meloche & Pouyssegur, 2007; Pouyssegur et al, 2002; Raman & Cobb, 2003; Widmann et al, 1999). In fibroblasts, stimulation of this MEK-ERK pathway leads to the activation of several immediate-early genes including

Elk-1 and induces the c-Fos promoter (Murphy et al, 2004; Murphy et al, 2002). ERK1/2 activation also induces cyclin D1 expression, thereby allowing cell-cycle progression (Lavoie et al, 1996a; Lavoie et al, 1996b; Pages et al, 1993). Constitutive activation of the pathway leads to increased DNA synthesis, mammalian cell transformation and tumor induction in nude mice (Brunet et al, 1994; Cowley et al, 1994; Mansour et al, 1994; Shapiro, 2002). In PC12 pheochromocytoma cells, the MEK-ERK cascade is essential for neuronal differentiation induced by nerve growth factor (NGF). Conversely, constitutive activation of cascade components leads to neurite outgrowth and PC12 differentiation (Cowley et al, 1994; Fukuda et al, 1995; Robinson et al, 1998).

In resting cells, ERK1 and ERK2 are maintained inactive and anchored in the cytoplasm by their upstream kinases and only known activators MEK1 and MEK2 (Adachi et al, 1999; Burack & Shaw, 2005; Fukuda et al, 1996; Fukuda et al, 1997c; Furuno et al, 2001; Lenormand et al, 1993; Moriguchi et al, 1995; Rubinfeld et al, 1999; Zheng & Guan, 1994). ERK1/2 have two MEK-binding regions. The first one is a cluster of negatively charged residues located near ERK1/2 C-terminus. These amino acids interact with a region shared by MEK1/2 and by many ERK1/2 effectors and regulators, which is called the Common Docking (CD) domain (Nichols et al, 2000; Tanoue et al, 2000; Tanoue et al, 2001a). The second region comprises the ERK1/2 MAP kinase insert and neighboring residues (Robinson et al, 2002). Contrary to CD interactions, this second type is ERK-MEK selective. In addition, ERK1/2 can bind to Phe-X-Phe-Pro sequence-containing proteins through docking for ERK FXFP (DEF) interactions (Jacobs et al, 1999). DEF interactions are achieved via the ERK1/2 MAP kinase insert (Lee et al, 2004). Docking interactions allow phosphorylation of specific residues (Fantz et al, 2001) as well as specificity in the regulation of upstream and downstream effectors (Tanoue & Nishida, 2002; Tanoue & Nishida, 2003). Finally, the ERK1/2 residues important for docking do not modulate phosphotransferase activity, and docking interactions can occur independently of one another (Dimitri et al, 2005).

Upon stimulation of the ERK1/2 pathway by numerous stimuli including mitogens, Raf isoforms phosphorylate MEK1/2 on activating serine residues 218 and 222. In turn, the latter phosphorylate ERK1/2 on threonine 202 and tyrosine 204 of the signature TEY motif within the activation loop, thus causing a dramatic increase in ERK1/2 phosphotransferase activity. ERK1/2 can then phosphorylate cytoplasmic targets such as the cytosolic phospholipase A₂ (cPLA₂) and the kinase MNK1 (Fukunaga & Hunter, 1997; Nemenoff et al, 1993; Waskiewicz et al, 1997). Simultaneously, by direct interactions with nucleoporins (Lee et al, 2004; Matsubayashi et al, 2001; Whitehurst et al, 2002), ERK1 and ERK2 enter the nucleus as a monomer by passive diffusion, or a dimer through active transport (Adachi et al, 1999), thereby gaining access to nuclear targets allowing them to modulate gene expression (Brunet et al, 1999b). ERK1/2 nuclear accumulation is associated with disruption of the MEK-ERK complex, although the localization of this dissociation remains elusive (Adachi et al, 1999; Burack & Shaw, 2005; Fukuda et al, 1997c; Horgan & Stork, 2003; Wolf et al, 2001). Moreover, upon sustained mitogenic stimulus, termination of the signal occurs as the ERK1/2 TEY sequence is dephosphorylated in the nucleus, presumably by dual specificity-phosphatases (Volmat et al, 2001). ERK1/2 are exported out of the nucleus via MEK1/2 that contain a leucine-rich nuclear export signal (NES) (Adachi et al, 1999; Adachi et al, 2000; Ajenjo et al, 2004; Burack & Shaw, 2005; Fukuda et al, 1997b; Fukuda et al, 1996; Fukuda et al, 1997c). In accordance with the observations that ERK1/2 (Ando et al, 2004; Costa et al, 2006; Furuno et al, 2001; Horgan & Stork, 2003; Volmat & Pouyssegur, 2001) and several other MAP kinases (Aberg et al, 2006; Gaits & Russell, 1999; Julien et al, 2003; Kondoh et al, 2006; van Drogen & Peter, 2001) undergo continuous nucleocytoplasmic shuttling even in the absence of stimulus, it has recently been suggested that the rate ERK1/2 nucleocytoplasmic shuttling, rather than just nuclear entry, is increased upon mitogenic stimulation (Ando et al, 2004; Costa et al, 2006) .

Regulation of ERK1/2 MAP kinase occurs mainly at three levels. First and foremost, by phosphorylation. The dual phosphorylation of activating threonine and tyrosine residues is essential for both phosphotransferase activity and nuclear translocation

(Canagarajah et al, 1997; Horgan & Stork, 2003; Khokhlatchev et al, 1998; Lenormand et al, 1993; Pages et al, 1993). Second, by control of their subcellular localization. When sequestered in the cytoplasm, ERK1/2 cannot phosphorylate nuclear targets (Brunet et al, 1999b; Hochholdinger et al, 1999). Inversely, cytoplasmic targets are immune to nuclear ERK1/2. Hence, cytoplasmic and nuclear activity is required for full ERK1/2 function. Thirdly, proper regulation of ERK1/2 phosphorylation state and subcellular localization are modulated by their interactions with multiple proteins. Via modular docking domains or by other protein-protein interactions, ERK1/2 can interact in a spatio-temporal manner with upstream kinases like MEK1/2, numerous phosphatases, nucleoporins and a plethora of cytoplasmic and nuclear substrates and effectors. Differential combination of these three modes of regulation may greatly contribute to achieving specific MAP kinase signals (Ebisuya et al, 2005; Kolch, 2005)

Despite significant progress, a complete picture of ERK1/2 MAP kinase regulation is yet to emerge. Evidence of serine phosphorylation of ERK1 and ERK 2 (Gopalbhai & Meloche, 1998; Kohno & Pouyssegur, 1986; Robbins & Cobb, 1992; Vouret-Craviari et al, 1993) strongly suggest that regulation of these MAP kinases by phosphorylation is not solely restricted to the threonine and tyrosine residues of the activation loop. In this study, we report the identification and characterization of serine 283, a novel phosphorylation site on the MAP kinase ERK1. The residue is conserved from yeast to mammals. We show that this site does not affect ERK1 phosphotransferase activity or phosphorylation by MEK1, but is required for nuclear entry and function. Moreover, an S283A mutant acts as a dominant negative and inhibits PC12 cell differentiation. Although it does not affect CD interactions, this residue is important for MEK1 and nucleoporin binding, all of which play a key role in ERK nucleocytoplasmic shuttling. Our results suggest a new model for ERK1 regulation where serine phosphorylation of a specific residue modulates its nuclear entry by affecting some, but not all, protein-protein interactions.

2.2.2.3 Materials and methods

2.2.2.3.1 Reagents and antibodies

The source of reagents has been described (Coulombe et al, 2004; Gopalbhai et al, 2003; Julien et al, 2003; Meloche, 1995). LMB was a gift from M. Yoshida (University of Tokyo). Nerve growth factor 2.5S (NGF) was from Invitrogen. [³²P] Phosphoric acid and [γ -³²P] ATP from ICN. Recombinant Elk-1 from Upstate. Monoclonal antibody 12CA5 to influenza virus hemagglutinin (HA) was a gift from M. Dennis (SignalGene). Commercial antibodies were obtained from the following suppliers: monoclonal (M2) and rabbit polyclonal anti-FLAG (Sigma); polyclonal anti-Myc and polyclonal anti-HA (Y-11) from Santa Cruz Biotechnology; rabbit polyclonal antibodies to ERK1 and ERK1/2 (Upstate), monoclonal (9E10) and polyclonal anti biotinylated goat anti-rabbit and anti-mouse immunoglobulin G (IgG), and horseradish peroxidase (HRP)-conjugated streptavidin from (Vector Laboratories), Mab (E10) to ERK1/2 phosphothreonine183/202 phosphotyrosine 185/204 (pTpY ERK1/2; Cell signaling), rabbit antibody to phosphothreonine 197/202 MNK1 (pTpT MNK1; Cell signaling), HRP-conjugated goat anti-mouse and anti-rabbit IgG (Bio-Rad); fluorescein isothiocyanate-conjugated donkey anti-rabbit and anti-mouse, and rhodamine-conjugated donkey anti-rabbit and anti-mouse (Jackson Immunoresearch); Alexa fluor 647-conjugated goat anti-mouse IgG (Molecular Probes); fluorescein isothiocyanate-conjugated goat anti-HA (Bethyl Laboratories).

2.2.2.3.2 Plasmid constructs and mutagenesis

All ERK1 recombinant constructs were derived from the chinese hamster cDNA sequence (Meloche et al, 1992a). Point mutations were introduced into ERK1 and MEK1 cDNA by using the Altered Sites in vitro mutagenesis system (Promega). HA-ERK1 constructs were subcloned into the HindIII/XbaI sites of pRc CMV while FLAG MEK1 constructs were generated upon MEK1 introduction into pcDNA3-FLAG (P. Coulombe) using the EcoRI/XhoI sites. pBabe-puro (Morgenstern & Land, 1990) was kindly provided

by B. Weinberg and was ligated with ERK1 through HindIII/XhoI sites. The HA-ERK1-NLS and -NES constructs were derived from ERK3-NLS (Julien et al, 2003). The NLS and NES sequences were subcloned in the EcoRI/XbaI sites of pcDNA3, and ERK1 was introduced in the EcoRI site after PCR amplification. MNK1 bearing 6 Myc epitopes was a gift from Dr L. Voisin (Institut de Recherche en Immunologie et Cancer). GST-Nup153C cDNA was kindly provided by Dr. N. G. Ahn (University of Colorado), expressed in *E. coli* and purified on glutathion sepharose resin (Amersham Pharmacia). All other constructs have been described (Coulombe & Meloche, 2002; Coulombe et al, 2004; Gopalbhai et al, 2003).

2.2.2.3.3 *Cell culture and transfections*

The culture and serum starvation of Rat-1 fibroblasts prior to metabolic labeling has been described (Gopalbhai et al, 2003; Meloche, 1995). HeLa and HEK 293 cells were grown in minimum essential media supplemented with 10% fetal bovine serum and antibiotics. Immortalized mouse embryonic fibroblasts (MEF) derived from wt or ERK1-null mice (generous gift from J. Pouyssegur, Université de Nice) were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) and antibiotics. Cells were infected with the virus-containing culture supernatant of HEK 293 cotransfected with pBabe-puro and pCL-Ampho (Imgenex) and selected in 2 $\mu\text{g/ml}$ puromycin for 3 days. PC12 cells were grown in DMEM supplemented 5% FBS and 10% horse serum plus antibiotics on poly-L-lysine treated dishes. For transfections, HEK 293 were transfected using the calcium phosphate method, HeLa were transfected with polyethyleneimine (PEI) and PC12 were transfected according to the manufacturer's protocol with LipofectAMINE 2000 (Invitrogen).

2.2.2.3.4 *Phosphorylation analysis*

[³²P] metabolic labeling and one-dimensional phosphoamino acid analysis were performed as described (Gopalbhai & Meloche, 1998). For protein sequencing, exponential

HEK 293 cells transiently transfected with HA-ERK1-GST were metabolically labeled with [³²P]-orthophosphate for 5 h in phosphate-free media supplemented with 10% dialyzed calf serum. The protein was pulled-down with glutation-sepharose (Amersham), resolved on 10% SDS-PAGE and subjected to autoradiography. The gel was stained, trypsin-digested and processed as described (Charron et al, 2001; Gopalbhai et al, 2003) for Edman degradation.

2.2.2.3.5 *Luciferase reporter and kinase assays*

For reporter gene assays, 50 000 HeLa cells per well, seeded in 24-well plates were cotransfected with 285 ng of pFR-Luc reporter construct, 15 ng of pFA-Elk-1, 200 ng of pcDNA3- β-gal, and with 500 ng ERK1 and 100 ng MEK1 DD expression plasmids. The total DNA amount was kept constant at 1100 ng with pRc/CMV and pcDNA3 vectors. After 24 h, the cells were serum-starved until harvest on the following day, and gene induction activity was assayed using a luciferase reporter assay kit (Promega). Transfection efficiency was normalized by measuring β-galactosidase activity. For *in vitro* kinase assays and their control immunoblots, the same lysates were used. Briefly, 500 000 HeLa cells were seeded at in 6-well plates and transfected the next day with 3μg of plasmid DNA. ERK1 and MEK1 were maintained in a 4:1 ratio and the amount of total DNA was normalized with appropriate expression vectors. On the day following the transfections, cells were serum-starved for an additional 24h before harvest. *In vitro* kinase assays were performed as described (Giasson & Meloche, 1995) using the 12CA5 antibody.

2.2.2.3.6 *Immunoblot and co-precipitation analysis*

Calcium phosphite-transfected HEK 293 cells were lysed and scraped in President's choice buffer (5 mM Tris pH 7.4, 20 mM NaCl, 1mM NaF, 0,1 mM EDTA, 15% glycerol and 1% NP-40). Equal aliquots (3% of total lysate volume) were taken for control immunoblotting and the remaining cleared lysate was transferred on pre-washed glutathione-sepharose beads, or on 12CA5-precoupled protein A-sepharose (Amersham),

incubated for 3h at 4°C, washed 4 times in President's choice buffer and boiled in Laemmli buffer. Immunodetection of FLAG- and Myc-tagged co-precipitated proteins was respectively done using rabbit polyclonal and mouse monoclonal antibodies, and a biotin-streptavidin amplification system with enhanced chemiluminescence (ECL) detection. Nup binding assays were performed similarly, with the exception that GST-Nup153C was produced and purified from bacteria.

2.2.2.3.7 *Immunofluorescence microscopy*

For immunofluorescence studies, 200 000 cells were grown on microscope coverslips. HeLa were transfected with 2 µg of plasmid DNA with a 1:1 ERK1:MEK1 ratio. Cells were serum-starved 24h later, prior to washes in ice-cold phosphate-buffered saline (PBS) and fixation with 3,7% paraformaldehyde in PBS, 15 min at room temperature. Pretreatments included 10% calf serum for 2h and LMB for 12h. After quenching in 0,1M glycine and permeabilisation in 0,1% triton, the coverslips were blocked 1h at 37°C in 1% bovine serum albumin (BSA) in PBS. All primary and secondary antibodies were diluted 1:100 in blocking buffer except for anti-FLAG monoclonal and polyclonal antibodies, which were used at 1:500 and 1:200, respectively. After counterstaining in 300 nM DAPI, the cells were mounted on glass slides in 50 mM Tris-HCl, pH 8.5, 5 mg/ml *N*-propyl-gallate, 50% glycerol and viewed using a Zeiss LSM 510 confocal microscope at 63X. Over 150 cells per coverslip were scored in at least three independent experiments. Images were generated using an additional 2X digital zoom, and enhanced using Adobe Photoshop.

2.2.2.3.8 *PC-12 differentiation assays*

For PC-12 differentiation assays, CC2-treated Lab Tek II chamber slides (Nunc) were additionally coated with laminin before the seeding of 50 000 cells. Following transfection, NGF was added to the culture medium and left for 3 days. Cells were washed twice in ice-cold PBS and treated with 3,7% paraformaldehyde, washed again twice, and

incubated 1h at 37°C PBS containing 1% BSA and 0,1% Triton (PBT). F-7 anti-HA and FITC-conjugated anti-mouse antibodies were diluted 1:100 in PBT, incubated sequentially for 1h at 37°C, counterstained with DAPI and mounted. At least 150 cells were scored for neurite outgrowth in five independent experiments.

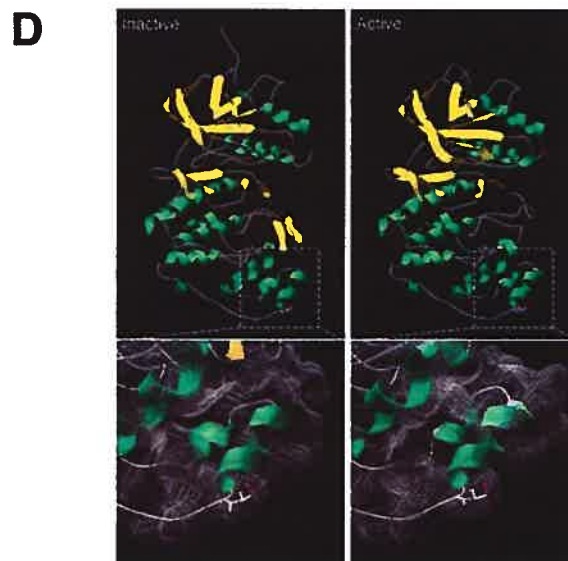
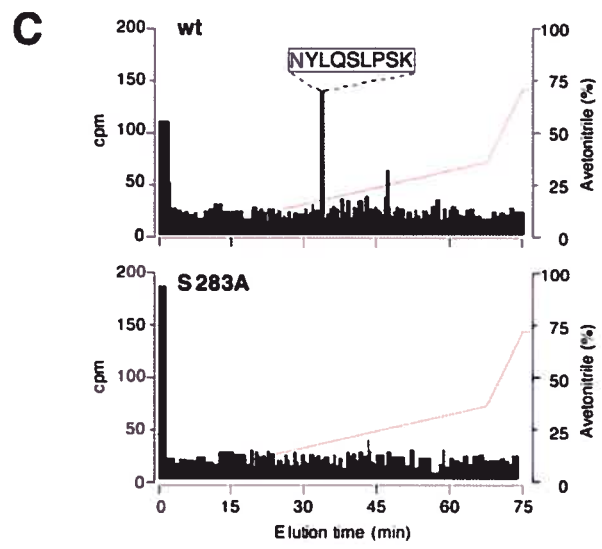
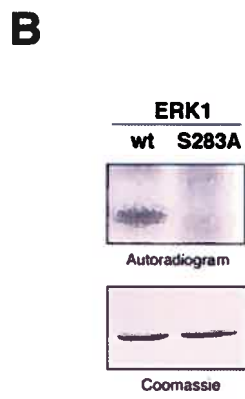
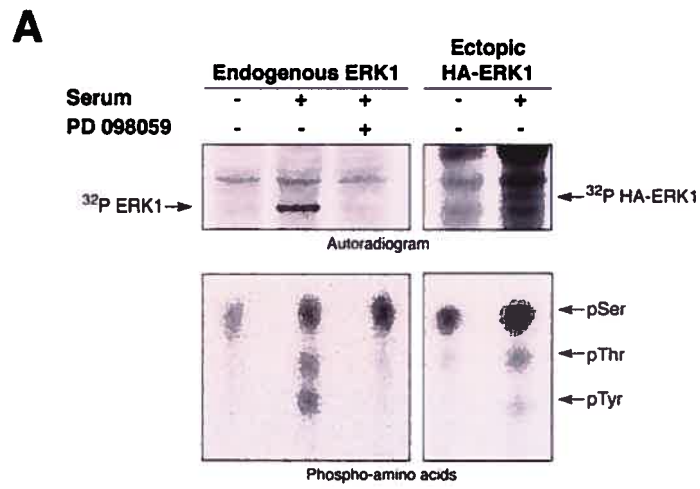
2.2.2.4 Results

2.2.2.4.1 *ERK1 is phosphorylated on serine 283 in vivo*

To gain further insight into MAP kinase regulation, the phosphoamino acid content of both endogenous and ectopically expressed ERK1 from ³²P-labelled cells was analyzed by thin layer chromatography. As expected, phosphothreonine and phosphotyrosine levels were significantly elevated upon serum treatment (Figure 2-11A). Additionally, ERK1 was also phosphorylated on serine in both serum starved- and serum treated-cells, even in the presence of the MEK1/2 inhibitor PD098059.

Figure 2-11 ERK1 phosphorylation on serine 283

(A) Phosphoamino acid analysis from ERK1 selectively immunoprecipitated from serum-starved, [³²P]-labeled Rat1 cells treated with 10% serum and/or 100 μM of the MEK1/2 inhibitor PD098059 as indicated (left panel) or from ERK1 ectopically expressed in HEK 293 cells (right panel). (B) Autoradiogram of precipitated HA-ERK1-GST wt and S283A following transfection and [³²P]-labeling of exponentially growing HEK 293 cells. (C) Chromatogram of [³²P]-ERK1 tryptic digests from (B). HPLC fractions were collected manually and counted for radioactivity. The amino acid sequence shown was obtained by automated Edman degradation of the radioactive phosphopeptide displaying the highest number of counts per minute (cpm). (D) ERK1 structure and serine 283 localization in the inactive and active forms. Model is based on ERK2 crystal structure (Canagarajah et al, 1997; Zhang et al, 1994) and generated using Swiss-PdbViewer (Guex & Peitsch, 1997).



In order to map the phosphoserine residue(s), GST-tagged forms of ERK1 were expressed HEK293 cells and pulled-down following [³²P] metabolic labeling. The corresponding SDS PAGE bands were digested *in-gel* and the tryptic peptides were then separated by high performance liquid chromatography (HPLC). The fractions were collected manually and counted for radioactivity and the identified radioactive phosphopeptides were then sequenced by automated Edman degradation (Charron et al, 2001; Gopalbhai et al, 2003). One of the main phosphopeptides yielded the sequence NYLQSLPSK, an ERK1 peptide encompassing serine residues 283 and 286 (Figure 2-11C). The same sequence was obtained under similar conditions where HA-ERK1 was immunoprecipitated and the phosphopeptides were separated by capillary electrophoresis and detected by autoradiography (data not shown). Substitution of serine 283 by a non-phosphorylatable alanine residue (S283A) severely reduced [³²P] incorporation in the protein (Figure 2-11B) and rendered the HPLC fraction containing the identified peptide undistinguishable (Figure 2-11C). Likewise, phosphorylation of serine 283 under similar conditions was confirmed by mass spectrometry analysis (data not shown). We therefore conclude that serine 283 is a novel phosphorylation site on the MAP kinase ERK1.

Tableau 2-III Conservation of serine 283 in ERK1/2 orthologs

Common name	Organism	MAP kinase	Sequence
Human	<i>Homo sapiens</i>	ERK1	NYLQSLPS
Chinese hamster	<i>Criceticus griserius</i>	ERK1	NYLQSLPS
Human	<i>Homo sapiens</i>	ERK2	NYLLSLPH
House mouse	<i>Mus musculus</i>	ERK2	NYLLSLPH
African clawed frog	<i>Xenopus laevis</i>	MAP kinase	NYIQSLPY
Zebra fish	<i>Dario rerio</i>	MAP kinase 1	NYLLSLPR
Drosophila	<i>Drosophila melaogaster</i>	Rolled	NYLES LPH
Nematode	<i>Caednorhabilis elegans</i>	Sur-1	SYLIS LPH
Social amoeba	<i>Dictyostelium discoideum</i>	ERK	TMLES LPP
Fission yeast	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	Spk1	KYIKSLPF
Baker's yeast	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Fus3	EYIKSLPM

Serine 283 is a residue highly conserved in ERK1 and ERK2 orthologs (Tableau 2-III) suggesting an important role in ERK structure/function. It is located after the second helix of the MAP kinase insert (Figure 2-11D), a unique fold between subdomains X and XI found in MAP kinases and in a few other nucleo-cytoplasmic shuttling proteins such as cyclin-dependent kinases (Cdks); (Hanks & Hunter, 1995; Pearson et al, 2001b). Significantly affected by phosphorylation on the TEY motif (Canagarajah et al, 1997), this region plays a role in DEF docking interactions as well as binding to regulators of ERK1/2 subcellular localization (Chou et al, 2003; Hill et al, 2002; Lee et al, 2004; Robinson et al, 2002; Whitehurst et al, 2004b).

2.2.2.4.2 Phosphorylation of serine 283 is not required for ERK1 activation and cytoplasmic activity

Aiming to define the role for serine 283, we looked at ERK1 phosphorylation by MEK1/2 and its phosphotransferase activity. Activation kinetics of ERK1 in response to serum treatment was measured by *in vitro* immune complex phosphorylation assay. Time points were chosen at 5 and 120 minutes following treatment because ERK1/2 activation is maximal at 5 minutes (Meloche et al, 1992a; Meloche et al, 1992b; Vouret-Craviari et al, 1993), and nuclear accumulation is manifest after 2 hours (Brunet et al, 1999b; Lenormand et al, 1993; Volmat et al, 2001). Both wild type (wt) and S283A forms of ERK1, displayed a similar activation profile with a markedly increased phosphorylation of the activating threonine and tyrosine residues (pTpY) at 5 min that was reduced after 120 min treatment, as measured with a dual phosphorylation-specific antibody (Figure 2-12, upper panel). These data indicate that ERK1 S283A is adequately phosphorylated by MEK1/2. In contrast, an ERK1 mutant where the activating threonine 202 and tyrosine 204 residues have respectively been mutated to alanine and phenylalanine (TYAF) did not harbor such phosphorylation or display phosphotransferase activity. As expected, ERK1 kinase activity

paralleled its dual phosphorylation (Figure 2-12, lower panels), additionally indicating that ERK1 S283A is catalytically functional.

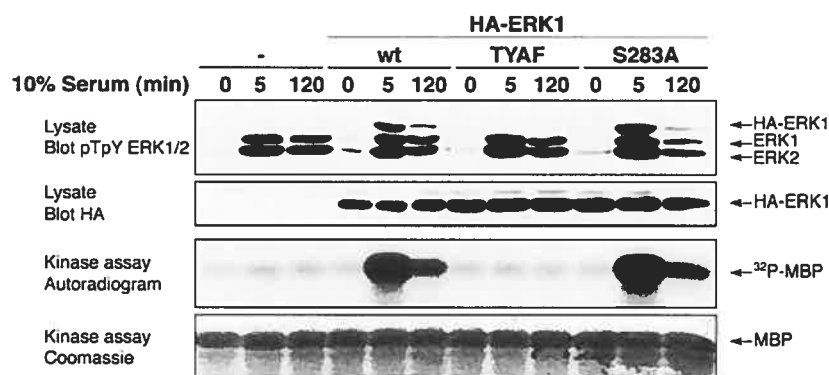


Figure 2-12 **Phosphorylation of serine 283 and ERK1 activation by MEK1/2**

HEK 293 cell expressing wild type (wt), the double mutant threonine 202 to alanine and tyrosine 204 to phenylalanine (TYAF), and serine 283 to alanine (S283A), HA-tagged ERK1, or an empty vector (-) were serum-starved and stimulated with 10% calf serum for indicated times. Cells were lysed and immunoprecipitation against the HA epitope was performed (bottom panels). The immune complexes were assayed for kinase activity in the presence of [γ -³²P]-ATP whose incorporation in 10 μ g of myelin basic protein (MBP) substrate was visualized by autoradiography and coomassie blue staining (bottom panels). Anti-ERK1/2 phosphothreonine 202 and phosphotyrosine 204 (pTpY ERK1/2) western blotting (top panel) on whole cell lysates indicates that phosphorylation by MEK1/2 is normal and parallels ERK1 phosphotransferase activity.

Serum stimulation concurrently activates multiple signaling cascades other than the ERK1/2 MAP kinase pathway. Moreover, MEK1 and MEK2 are the only known direct ERK1/2 activators. Consequently, cotransfection of HeLa cells with a constitutively active allele of MEK1 (MEK1 DD) was used to insure a single input in ERK1 activation. To

further examine ERK1 function *in vivo*, cells were also transfected with MNK1, an ERK1/2 substrate that localizes primarily in the cytoplasm. Upon phosphorylation by ERK1/2, MNK1 is activated and, in turn phosphorylates targets such as the translation regulator eIF4E (Fukunaga & Hunter, 1997; Parra-Palau et al, 2003; Waskiewicz et al, 1997). Gel retardation in electrophoretic mobility as well as immunoblotting with a specific antibody to the activating ERK phosphorylation sites monitored MNK1 phosphorylation by ERK1 (Figure 2-13A, upper panels). MNK1 was phosphorylated to a similar extent by ERK1 wt and S283A. Conversely, ERK1-induced electrophoretic mobility shifts in MEK1 DD also suggest that activated ERK1 wt and S283A can retrophosphorylate the cytoplasmic protein MEK1, and thus display cytoplasmic activity. (Figure 2-13A, lower panel; Figure 2-14B, lower panel). Cytoplasmic localization of MNK1 and MEK1 was confirmed by confocal microscopy (Figure 2-13B) indicating that ERK1 S283A can phosphorylate a cytoplasmic target as effectively as the wt protein.

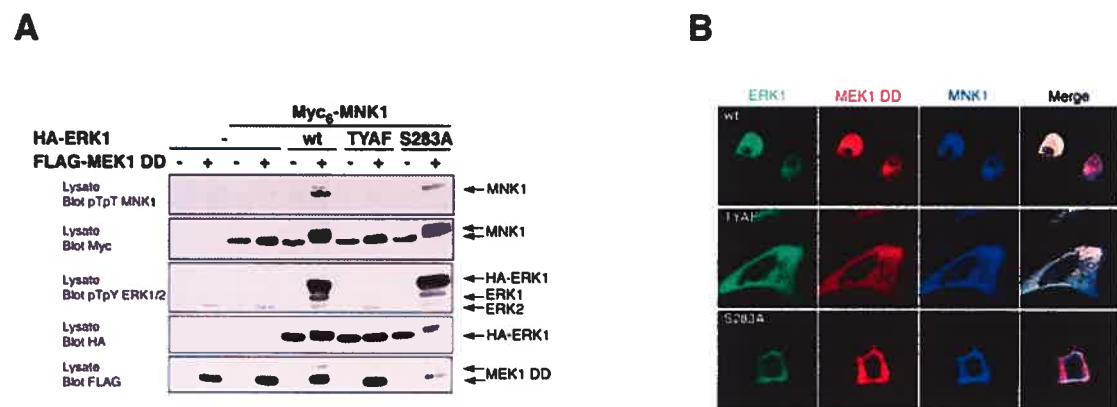


Figure 2-13 Serine 283 and ERK1 cytoplasmic activity

HA-tagged ERK1 was co-expressed in HeLa cells with a constitutively active form of MEK (MEK1 DD) and the cytoplasmic target MNK1. (A) ERK1 kinase activity towards MEK (MEK1 DD) and the cytoplasmic target MNK1. (A) ERK1 kinase activity towards MNK1 was monitored by immunoblotting with an antibody that recognizes two ERK1/2-specific phosphorylation sites on MNK1 (upper panel). ERK1 activation was measured by anti-pTpY ERK1/2 western blotting and ERK1, MEK1 DD and MNK1 expression levels

using anti-HA, -FLAG and -Myc antibodies, respectively. (B) Triple fluorescence confocal microscopy confirming cytoplasmic localization of co-expressed ERK1 (green), MEK1 DD (red) and MNK1 (blue) in HeLa cells.

2.2.2.4.3 ERK1-dependent gene transcription requires phosphorylation of serine 283

We next examined the impact of ERK1 serine 283 phosphorylation on a nuclear target. Elk-1 is a TCF family transcription factor whose phosphorylation on ERK-specific residues activates immediate-early gene transcription (Gille et al, 1995). In addition, ERK translocation and nuclear localization are necessary for Elk-1 activation and gene transcription (Brunet et al, 1999b; Robinson et al, 1998). Accordingly, ERK1 nuclear activity was measured in an Elk-1 based luciferase assay. Expression of MEK1 DD in serum-deprived HeLa cells was sufficient to induce Elk-1-dependant luciferase transcription, but luciferase reporter activity was about five times greater in the presence of ERK1 wt (Figure 2-14A). The ERK1 S283A mutant has an impaired ability to induce transcriptional inducing activity, comparable to that of the negative control ERK1 TYAF. Similar results were obtained in exponentially growing HeLa cells as well as in HEK 293 cells (data not shown). In addition, mutation of serine 283 to a negatively charged aspartate residue (S283D) generated the same results as S283A (data not shown), suggesting the residue did not effectively mimic the phosphorylated serine.

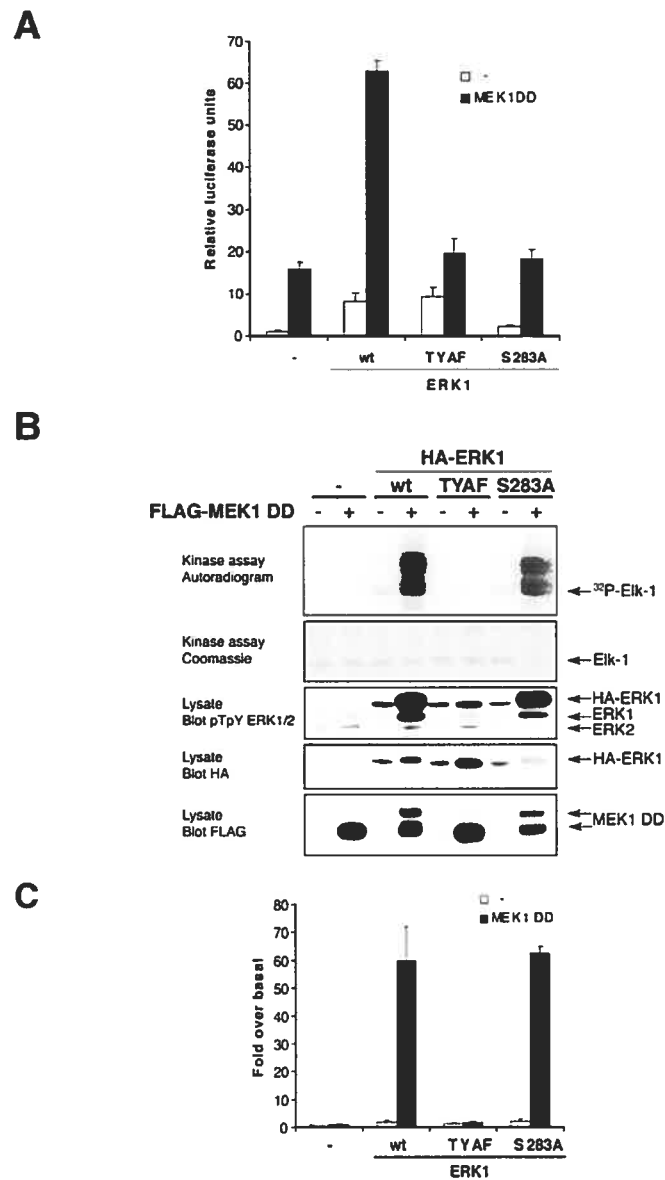


Figure 2-14 Serine 283 and ERK1 nuclear activity

(A) HeLa cells were cotransfected with an empty vector (-), ERK1 variants, MEK1 DD, Elk-1-GAL4 and the reporter plasmid GAL4-luciferase, and luciferase activity was measured in four independent experiments. (B) ERK1 *in vitro* immune complex kinase assay using recombinant Elk-1 as substrate (top panels). Lysates were probed for ERK1 and

MEK1 DD expression (lower panels) as well as for ERK1 activation (middle panel). (C) Quantification of ERK1 kinase activity from four independent experiments as shown above where labeled recombinant Elk-1 was excised from the SDS PAGE gel and radioactive [^{32}P] incorporation was counted. Error bars indicate \pm SEM.

To discard the possibility that ERK1 S283A cannot effectively phosphorylate Elk-1, similar conditions were used in an ERK1 *in vitro* kinase assay using recombinant Elk-1 as a substrate. ERK1 S283A was normally phosphorylated by MEK1 DD (Figure 2-14B; middle panel) and in turn, phosphorylated Elk-1 as effectively as ERK1 wt (Figure 2-14B,C). ERK1 wt and S283A also displayed similar kinase activity towards the MBP substrate under the same conditions (data not shown). Hence, the failure of ERK1 S283A to induce reporter gene expression is not due to a lower phosphotransferase activity towards Elk-1.

2.2.2.4.4 Phosphorylation of serine 283 is required for MEK1-dependent nuclear entry

Considering that serine 283 affects the phosphorylation of a nuclear target but not of cytoplasmic target *in vivo*, ERK1 subcellular localization was observed by immunofluorescence. Ectopic expression in HeLa cells of ERK1 caused the protein to be localized partly in the cytoplasm, but mostly to accumulate in the nucleus, as described (Lenormand et al, 1993). Co-expression of MEK1 wt (Figure 2-15A,C) or a kinase inactive allele (K97A; data not shown) caused massive cytoplasmic re-localization of ERK1 wt, TYAF and S283A, in accordance with its role as cytoplasmic anchor (Adachi et al, 2000; Ajenjo et al, 2004; Fukuda et al, 1997c; Rubinfeld et al, 1999; Sugiura et al, 1999). In contrast, MEK1 DD co-expression caused nuclear accumulation of ERK1 wt but not ERK1 TYAF, consistently with previous findings (Fukuda et al, 1997c; Horgan & Stork, 2003; Wolf et al, 2001). ERK1 S283A however, remained cytoplasmic when co-expressed with all MEK1 variants. Interestingly, an important proportion of cells co-expressing ERK1 S283A and MEK1 DD also displayed a smaller nucleus and overall cell size.

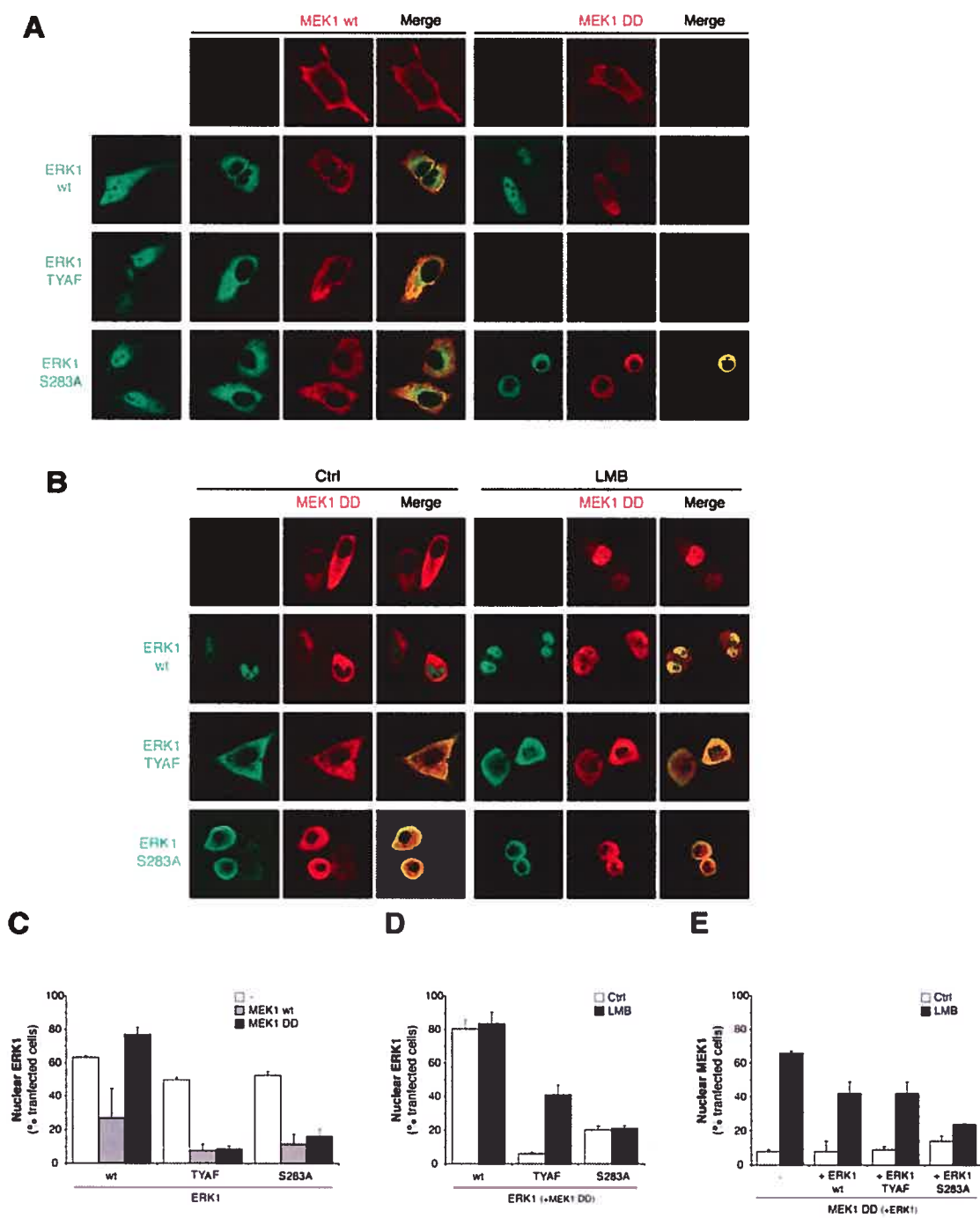


Figure 2-15 ERK1 and MEK1 subcellular localization

(A) Confocal immunofluorescence microscopy on HeLa cells expressing HA-ERK1 variants (green) alone or in combination with either FLAG-MEK1 (red) wild type (wt) or constitutively active (DD). (B) HeLa cells cotransfected with ERK1 and MEK1 DD were left untreated (Ctrl) or were treated for 12h with the CRM-1-dependant nuclear export inhibitor Leptomycin B (LMB) before being fixed for immunofluorescence. (C) Transfected cells from (A) were scored for nuclear HA staining in four different experiments. (D) Quantification of MEK1 DD-induced ERK1 nuclear accumulation in Ctrl or LMB-treated cells from four different experiments as depicted in (B). (E) FLAG-MEK1 DD nuclear accumulation was also scored under the same conditions. Error bars indicate \pm SEM.

Lack of ERK1 S283A nuclear accumulation in the presence of MEK1 DD can be due to either decreased nuclear entry or increased nuclear export. To test these hypotheses, ERK1 mutants were cotransfected with MEK1 DD and scored for their nuclear accumulation in absence or presence of the CRM1-dependant nuclear export inhibitor leptomycin B (LMB). Expectedly, LMB treatment caused strong MEK1 DD nuclear retention (Adachi et al, 2000; Fukuda et al, 1997a; Yao et al, 2001) and ERK1 wt nuclear accumulation (Chen et al, 2005b) remained high (Figure 2-15B,D,E). LMB treatment also augmented the nuclear accumulation of ERK1 TYAF, but not that of ERK1 S283A. The above data strongly suggest that ERK1 S283A does not enter the nucleus, and that dual-phosphorylation of threonine 202 and tyrosine 204 is not the unique requirement for ERK1 nuclear entry and accumulation. Interestingly, MEK1 DD LMB-induced nuclear accumulation was also lower when co-expressed with ERK1 S283A in comparison to ERK1 wt (Figure 2-15B,E).

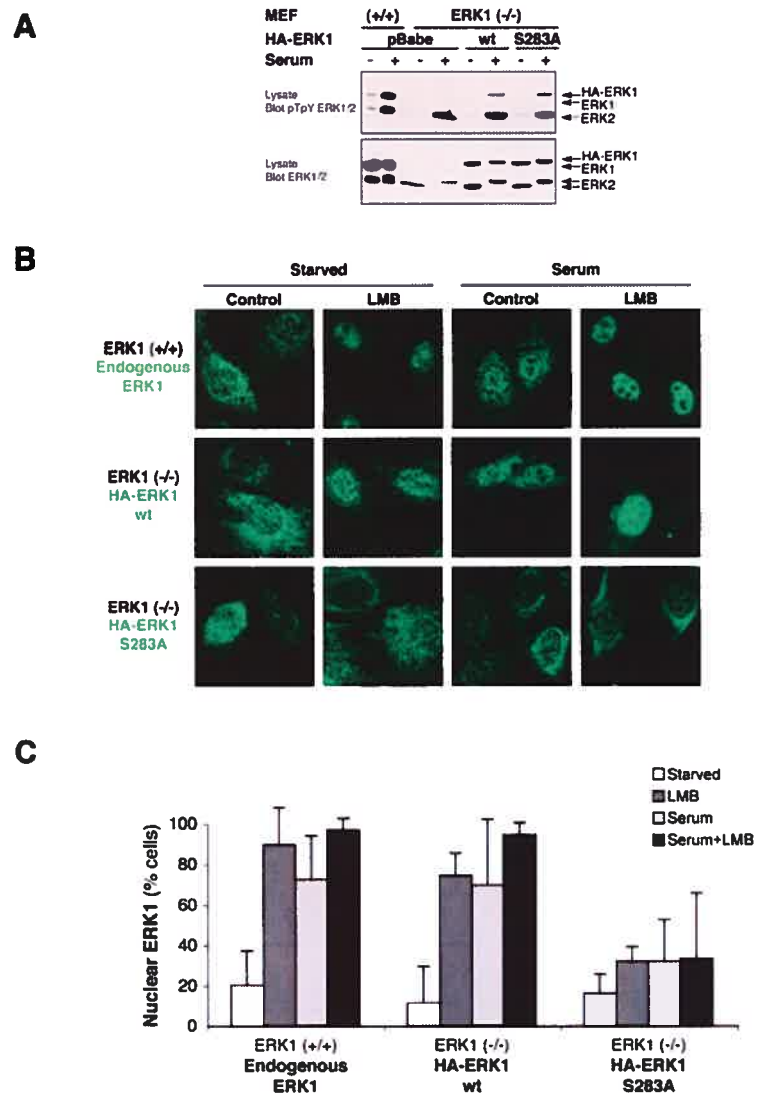


Figure 2-16 ERK1 subcellular localization in infected MEFs

(A) Immunoblot analysis of serum starved (-) or calf serum-treated (+) embryonic fibroblasts derived from wt (+/+) or ERK1 knockout (-/-) mice, and retrovirally infected with HA-ERK1 wt, HA-ERK1 S283A or expression vector (pBabe). Lysates were probed with anti-pTpY ERK1/2 (upper panel) or anti-ERK1/2 (lower panel) antibodies. (B) Confocal microscopy of the serum-starved mouse embryonic fibroblasts (MEFs) described

in (A) following serum, Leptomycin B (LMB), or combination treatment, and immunostained for ERK1. (C) Quantification from two independent experiments of ERK1 nuclear accumulation in MEFs following treatments as in (B). Error bars indicate \pm SEM.

Infection of ERK1 null fibroblasts was used to ensure that ERK1 S283A mislocation was not due to overexpression, and does occur when MEK1 and ERK1 are expressed at physiological levels. Puromycin-resistant vectors encoding either ERK1 wt or S283A were packaged in retroviruses for infection of embryonic fibroblasts (MEF) derived from ERK1 knockout mice. As control, wt- or ERK1 null-derived fibroblasts were infected with an empty vector. After puromycin selection of the cells, western blotting using an anti ERK1/2 antibody was used to determine protein expression. Infected HA-ERK1 wt and S283A were expressed in ERK1 null MEFs at slightly lower levels than endogenous ERK1 is in wt MEFs (Figure 2-16A, lower panel). Moreover, all three ERK1 variants responded identically to serum stimulation after starvation, as determined by phosphorylation of the activating threonine and tyrosine residues (Figure 2-16A, upper panel). More importantly, their subcellular localization was assessed by immunofluorescence using an anti-ERK1 antibody (Figure 2-16B). As expected, all ERK1 variants were localized to the cytoplasm in the absence of serum but accumulated in the nucleus following LMB and/or serum treatment, except for ERK1 S283A whose cytoplasmic localization was maintained, even after treatment. Consequently, the identical results obtained with physiological (or lower) expression levels validate our other experimental models used in this study.

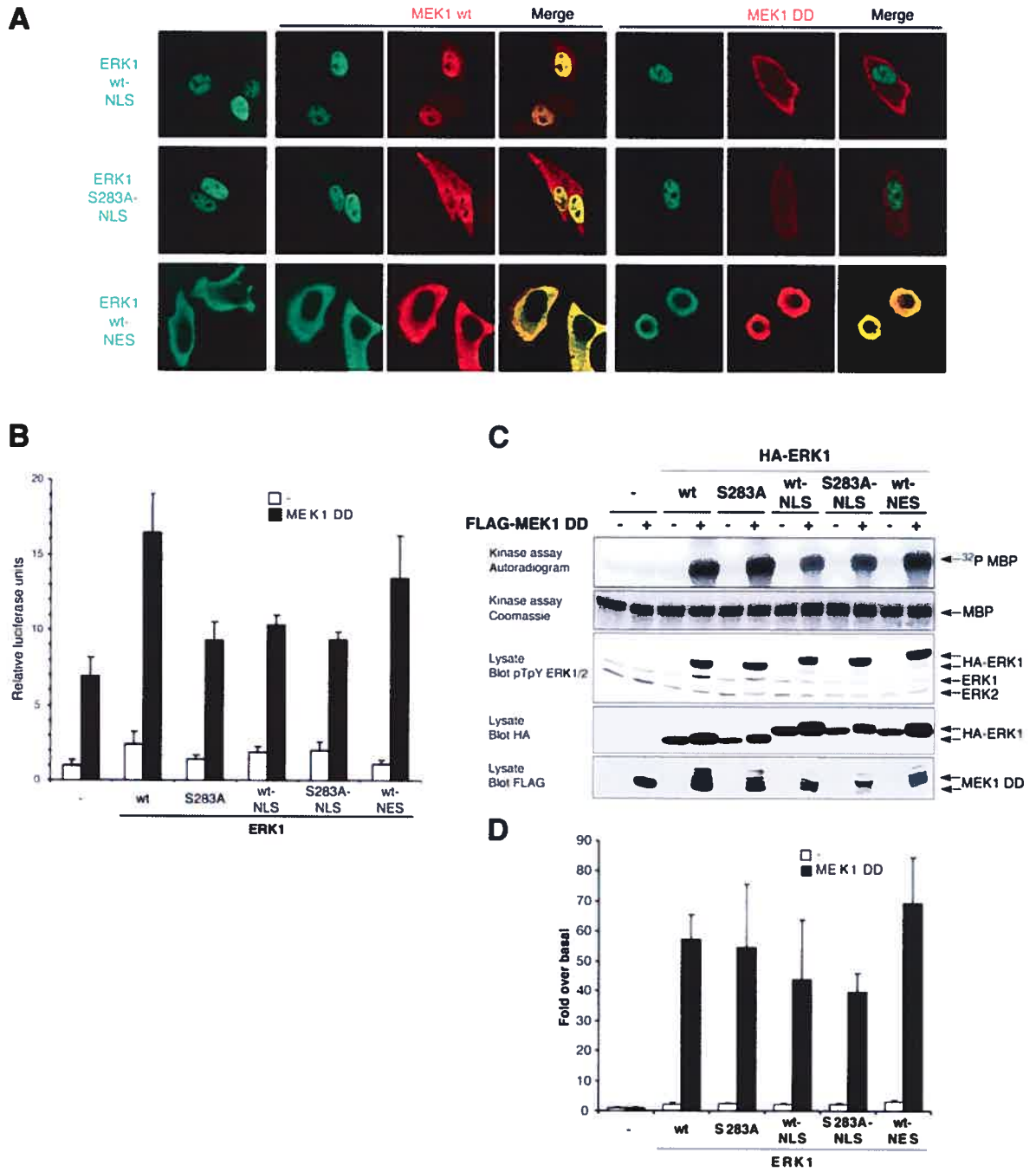
2.2.2.4.5 Nuclear targeting overcomes requirement of serine 283 for ERK1 nuclear function

ERK1 S283A fails to enter the nucleus in a MEK1-dependant manner but remains active in the cytoplasm. To determine if impaired nuclear entry exclusively accounts for ERK1 S283A reduced nuclear activity, HA-ERK1 wt and S283A were artificially tethered to the nucleus by fusion of their C-terminus to the nuclear localization signal (NLS) of

SV40 T antigen (Kalderon et al, 1984a; Kalderon et al, 1984b; Richardson et al, 1986). In addition, the nuclear export signal (NES) of MEK1 (Fukuda et al, 1996) was added to ERK1 wt to mimic the behavior of ERK1 S283A. These ERK1 variants were expressed in HeLa cells along with MEK1 wt, MEK1 DD or the appropriate empty vector, and subjected to confocal microscopy for characterization. NLS harboring ERK1 variants were always localized in the nucleus (Figure 2-17A, upper and middle panels). Interestingly, MEK1 wt did not retain in the cytoplasm ERK1 wt-NLS or ERK1 S283A-NLS. Instead, the latter dragged MEK1 wt in the nucleus. Inversely, ERK1 wt-NES did not accumulate in the nucleus (Figure 2-17A, lower panels), even in the presence of the active MEK1 DD. Moreover, cells co-expressing ERK1 wt-NES and MEK1 DD displayed a smaller nucleus and overall cell size, thus suggesting that the ERK1 S283A phenotype was effectively mimicked by ERK1 wt-NES, but not by ERK1 S283A-NLS.

Figure 2-17 ERK1 targeting to the nucleus or the cytoplasm

(A) Confocal immunofluorescence microscopy of HeLa cells co-expressing HA-ERK1 wt-NLS, HA-ERK1 S283A-NLS or HA-ERK1 wt-NES (green) and FLAG-MEK1 variants (red). (B) Luciferase reporter and (C) immune complex kinase assays of NLS- and NES-tagged ERK1 variants in the absence (-) or presence (MEK1 DD) of active MEK1. (D) Quantification of the phosphotransferase activity from four experiments as described in (C). Error bars indicate \pm SEM.



The phosphotransferase activity of ERK1-NLS and -NES was also examined for characterization purposes. In the presence of MEK1 DD, the catalytic activity of ERK1 wt-NLS and ERK1 S283-NLS was lower than that of their unfused counterparts while

ERK1wt-NES displayed higher kinase activity (Figure 2-17B,C). Conversely, the activity paralleled pTpY levels (B, middle panel). These data suggest that ERK1 is activated more efficiently by MEK1 when it stays longer in the cytoplasm.

To further depict the importance of serine 283 in ERK1 nuclear function, the NLS- and NES-harboring ERK1 variants were tested in the absence or presence of MEK1 DD for reporter gene activity. Although HA-ERK1 wt-NLS had a significantly reduced luciferase reporter activity compared to that of HA-ERK1 wt, both HA-ERK1-NLS wt and S283A displayed similar luciferase induction via Elk-1 activation (Figure 2-17D). This suggests that ERK1 S283A can function normally in the nucleus, if it does enter. Expectedly, HA-ERK1 wt-NES also displayed reduced nuclear activity compared to HA-ERK1 wt. Because the NLS and NES bring ERK1 into and out of the nucleus, respectively, its nucleocytoplasmic cycling and shuttling become impaired. Likewise, either NLS or NES fusion to ERK1 wt decreases its luciferase reporter activity, suggesting that proper nucleocytoplasmic shuttling is required for full ERK1 nuclear function.

2.2.2.4.6 *ERK1 S283A impairs nuclear activity*

Because ERK1 S283A is significantly less active in inducing Elk-1 -dependant reporter gene expression, a luciferase assay was this time used to determine if absence of phosphorylation at serine 283 can act in a dominant negative manner on nuclear function. Dual-tagged HA-ERK1 wt-GST was co-expressed with increasing amounts of single-tagged HA-ERK1 wt or S283A, again in the absence or presence of MEK1 DD. Increasing amounts of HA-ERK1 wt had an additive effect to those of HA-ERK1 wt-GST on Elk-1 -dependant reporter gene induction (Figure 2-18A). In contrast, increasing amounts of HA-ERK1 S283A reduced gene induction down to basal levels. Conversely, ERK1 S283A (but not wt) blocked the MEK1 DD-driven nuclear accumulation of Myc₆-tagged ERK1 wt (Figure 2-18B).

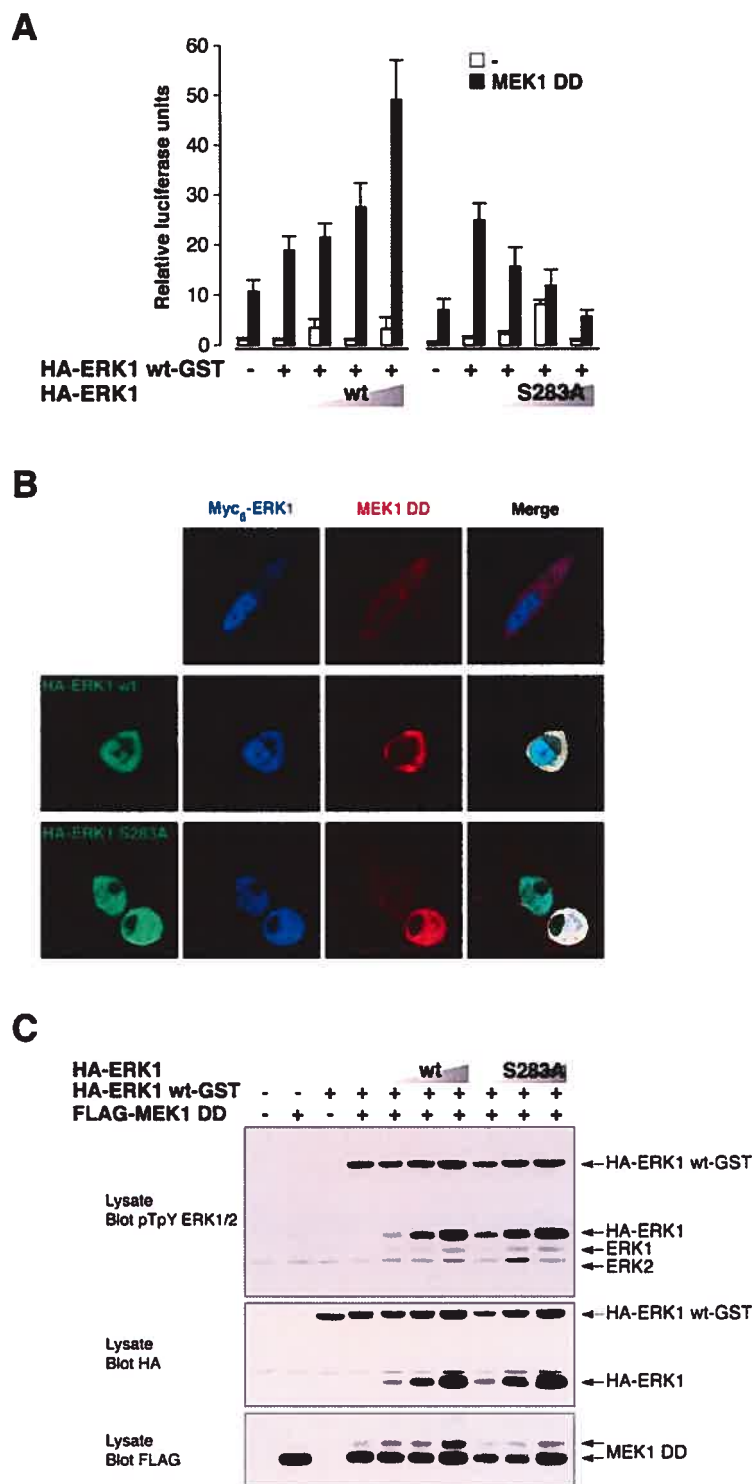


Figure 2-18 Dominant negative effect of ERK1 S283A

(A) Elk-1-based luciferase assays in HeLa cells. Cells were transfected with a fixed amount of dual tagged HA-ERK1 wt-GST and MEK1 DD or empty vector, and increasing quantities of HA-ERK1 wt or S283A before being assessed for luciferase activity. Error bars indicate \pm SEM from 3 independent experiments (B) Triple fluorescence confocal microscopy of co-expressed Myc₆-ERK1 wt (blue), FLAG-MEK1 DD (red) and HA-ERK1 wt or S283A (green). (C) ERK1 activation and expression in the conditions described in (A) as detected by western blot analysis.

Consistent with its dominant interfering activity, we investigated whether or not ERK1 S283A could block phosphorylation by MEK1/2. Increasing amounts of HA-ERK1 wt or S283A were co-expressed with HA-ERK1 wt-GST and MEK1 DD (Figure 2-18C). HA-ERK1 wt-GST phosphorylation by MEK1 DD remained unaffected in the presence of HA-ERK1 wt or S283A. The above data suggest ERK1 S283A acts in a dominant negative manner by inhibiting ERK1 wt (and possibly ERK2) nuclear accumulation via a mechanism downstream of MEK1/2.

2.2.2.4.7 Serine 283 affects MEK-specific binding but not CD interactions

MEK1/2 sturdily bind ERK1/2 and induce their re-localization to the cytoplasm (Adachi et al, 2000; Fukuda et al, 1997c; Robinson et al, 2002; Sugiura et al, 1999; Tanoue et al, 2000). To establish whether MEK1 is responsible for the cytoplasmic retention of ERK1 S283A, co-precipitation studies were performed either by pull-down experiments from cells co-expressing a kinase-inactive allele of MEK1 (K97A) for better binding (Robinson et al, 2002), and GST-tagged ERK1 (Figure 2-19A), or by co-immunoprecipitation between endogenous MEK1 and HA-ERK1 (Figure 2-19B). These experiments revealed a decrease in ERK1 S283A binding to MEK1. Similar results were also obtained with an *in vitro* translated form of MEK1 DD (data not shown).

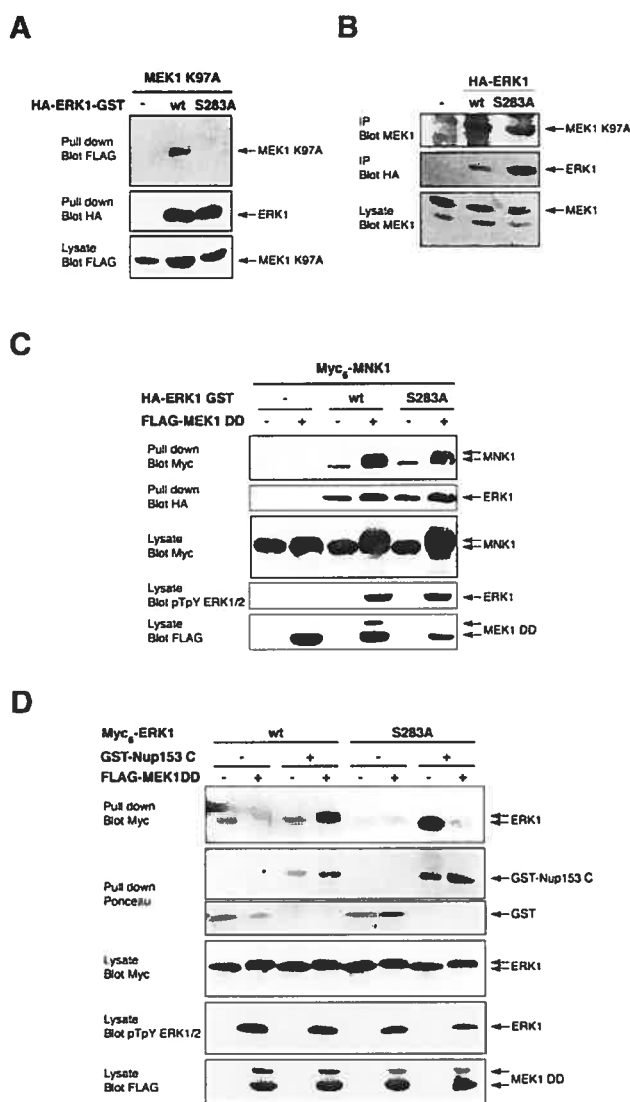


Figure 2-19 Requirement of serine 283 for protein-protein interactions

(A) Co-precipitation studies from GST pull down experiments on HEK 293 cells co-expressing kinase inactive FLAG-MEK1 (K97A) and HA- and GST-dual tagged ERK1. (B) Co-immunoprecipitation between ectopically expressed ERK1 and endogenous MEK1 in HeLa cells. (C) GST pull down experiments in HEK 293 and co-precipitation of ERK1 and MNK1 in the presence of MEK1 DD or appropriate empty vector (-). (D) Lysates from

cells expressing Myc₆-ERK1 wt or S283A in the absence (-) or presence of MEK1 DD were incubated with purified recombinant glutathione *S*-transferase or a fusion between the GST and the C-terminus of nucleoporin 153 (GST-Nup-153C). After SDS-PAGE, precipitates were stained with Ponceau S to determine GST fusion protein levels, washed and probed with an anti-Myc antibody. Protein expression and ERK1 activation were detected by western blotting analysis of cell lysates.

ERK1/2 have two distinct regions that allow them interact directly with MEK1/2 (Robinson et al, 2002; Rubinfeld et al, 1999; Tanoue et al, 2000; Tanoue et al, 2001a; Tanoue & Nishida, 2003). The first one comprises the MAP kinase insert (MKI) and serine 283, while the other is a cluster of negatively charged amino acids that give rise to common docking (CD) interactions. Many different proteins that bind to ERK1/2 including MNK1 share the latter (Tanoue et al, 2000). In addition, it has been reported that interactions mediated by those regions are independent: one type can be impaired without affecting another and vice-versa (Dimitri et al, 2005). Accordingly, decrease in MEK1 binding by ERK1 S283A should be due to loss in one of those two types of interactions, at least. Pull-down experiments indicated that binding to MNK1 is similar in both ERK1 wt and S283A co-expressing cells (Figure 2-19C), suggesting modulation in CD interactions do not account for ERK1 S283A cytoplasmic localization. Moreover, in accordance with previous data (Hoofnagle et al, 2001), ERK1 activation by MEK1 DD enhances its CD interactions with MNK1. A summary of ERK1 wt and S283A co-precipitation experiments is given in Tableau 2-IV.

Tableau 2-IV Summary of ERK1 S283A protein interactions in comparison to ERK1 wt

Interaction type	Interactor	ERK1 S283A	
		Inactive TEY	Active pTEpY
MEK-specific	MEK1	-	n/a
MEK-specific	MEK1 K97A	-	n/a
MEK-specific	MEK1 DD	n/a	-
CD (K/RK/RK/R)	MNK1	=	=
DEF (FXFP)	Nup 153 C	+	-

Increased, decreased and maintained interactions are denoted respectively by the (+), (-) and (=) symbols

2.2.2.4.8 Phosphorylation of serine 283 is required for proper nucleoporin binding

ERK subcellular localization can be affected by its differential interactions with proteins of the nuclear entry machinery. Via DEF type docking interactions, ERK2 can bind nucleoporins (Nup) on the nuclear (Matsubayashi et al, 2001) and cytoplasmic (Lee et al, 2004; Whitehurst et al, 2004b; Whitehurst et al, 2002) faces of the nuclear pore complex. Likewise, the FG repeats in the C-terminus of nucleoporins and the MAP kinase insert of ERK2 mediate these interactions (Lee et al, 2004). It is therefore possible that defects in nucleoporin binding could account for impaired ERK1 S283A nuclear entry. To answer this question, a recombinant fusion protein between the glutathione *S*-transferase and the C-terminal portion of nucleoporin 153 (GST-Nup153C) was immobilized on sepharose beads and incubated with lysates from HEK 293 cells co-expressing ERK1 variants, and MEK1 DD or the appropriate empty vector. Immunoblotting of the precipitated complexes surprisingly revealed that, whereas ERK1 wt binding to Nup is augmented upon activation, the ERK1 S283A–Nup interaction dramatically decreases when ERK1 S283A is phosphorylated by MEK1 (Figure 2-19D). Moreover, in the inactive state, ERK1 S283A displays better Nup binding than its wt counterpart. Thus, defective

interactions between ERK1 S283A and Nup153C are likely to account for its impaired nuclear entry.

2.2.2.4.9 Phosphorylation of serine 283 is required for PC12 differentiation

PC12 cell neuronal differentiation in response to nerve growth factor (NGF) requires a functional ERK MAP kinase pathway including nuclear activity (Cowley et al, 1994; Fukuda et al, 1995; Robbins et al, 1992; Vaudry et al, 2002). To test the importance of serine 283 phosphorylation in ERK1 function *in vivo*, PC12 cells were transfected with green fluorescent protein (GFP), ERK1 wt, ERK1 S283A or MEK1 K97A which has been reported to block NGF-induced PC12 differentiation (Cowley et al, 1994). After three days of NGF treatment, cells were scored for protein expression and differentiation. Positive cells expressing the constructs were visualized by immunofluorescence microscopy and neurite outgrowth was used to assess cell differentiation (Figure 2-20B,C). While cells expressing ERK1 wt displayed slightly enhanced neural differentiation in comparison to those expressing GFP, ERK1 S283A expressing cells displayed differentiation levels comparable to those of negative control MEK1 K97A. Taken together, the above data suggest that ERK1 serine 283 is required for full ERK1/2 activity because it regulates protein-protein interactions affecting nuclear translocation and nuclear function, but not activation by MEK1/2.

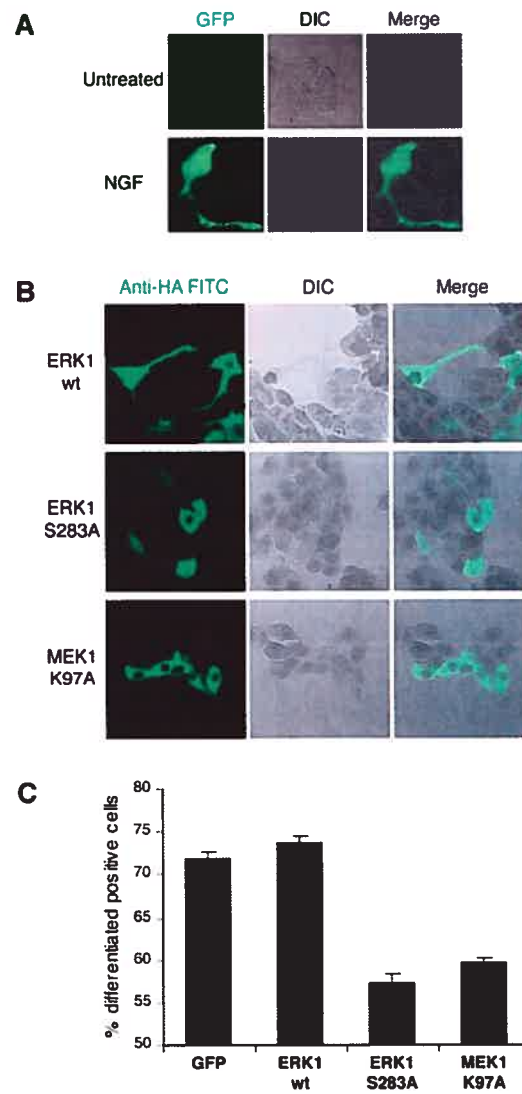


Figure 2-20 ERK1 S283A in PC12 differentiation

(A) Neurite outgrowth in PC12 cells expressing the green fluorescent protein (GFP), and treated for 72h with nerve growth factor (NGF). (B) Microscopy analysis of NGF-treated PC 12 cells expressing ERK1 wt, S283A or the dominant negative MEK1 K97A. (C) Cells displaying immunofluorescent staining as in (B) were scored for neurite outgrowth in five independent experiments. Error bars indicate \pm SEM.

2.2.2.5 Discussion

We identified serine 283 as the first novel phosphorylation residue on the MAP kinase ERK1, in 15 years. However, aside from the activation loop threonine and tyrosine residues, additional phosphorylation sites have been described for other MAP kinases. For example, JNK2 α 2 is phosphorylated on threonine 204 and serine 207, residues that can be phosphorylated *in vitro* by Casein kinase 2 and MKK7, but not MKK4 (Fleming et al, 2000). In p38 α and p38 β , tyrosine 323 acts a positive regulator of phosphotransferase activity, working with activating threonine and tyrosine residues in an additive manner (Salvador et al, 2005a; Salvador et al, 2005b). In contrast, a G-protein-coupled receptor kinase 2 (GRK2) phosphorylation site identified in the docking groove of p38 α disrupts its Common Docking interactions with regulators including MKK6, therefore impairing its subsequent activation (Peregrin et al, 2006). Serine 283 phosphorylation also affects ERK1 binding to some partners, but acts as a positive regulator of those interactions (Figure 2-19), some of which are required for nuclear entry (Matsubayashi et al, 2001; Whitehurst et al, 2002).

Homologous to ERK1 serine 283, the serine 264 of ERK2 might also be phosphorylated *in vivo* for three reasons. First, serine 283 is present in both ERK1 and ERK2 and is highly conserved throughout eukaryotes, thus suggesting an significant role for the residue in structure and function, in accordance with this study. Secondly, the kinetics of nuclear translocation and retention of ERK1 and ERK2 in response to growth factor stimulation are indistinguishable (Lenormand et al, 1998). This implies that ERK1 and ERK2 share similar if not identical regulatory mechanisms of nuclear accumulation. Conversely, an ERK2 a non-phosphorylatable ERK2 serine 264 mutant is also deficient in MEK1 binding (Robinson et al, 2002) and mutations in the ERK2 MAP kinase insert (near serine 264) slow down ERK2 nuclear import without affecting its export (Ranganathan et al, 2006). Third and more importantly, phosphoserine has also been described in ERK2

(Kohno & Pouyssegur, 1986; Robbins & Cobb, 1992). Moreover, two-dimensional phosphopeptide mapping analyses of ERK1 and ERK2 suggest the presence of phosphorylated serine residues on homologous peptides in these two proteins (Robbins & Cobb, 1992). Contrarily to phosphothreonine and phosphotyrosine, the phosphoserine content of ERK1/2 does not seem to vary whether the protein has been isolated from quiescent, exponentially growing, or agonist-treated cells (Gopalbhai & Meloche, 1998; Robbins & Cobb, 1992; Vouret-Craviari et al, 1993); (data not shown). Furthermore, ERK1 serine phosphorylation is MEK1/2-independent (Figure 2-11A). These data suggest that ERK1/2 undergo growth factor-independent, and quite possibly, constitutive serine phosphorylation. Despite many attempts, an effective ERK1 serine 283 phospho-specific antibody has yet to be generated. Hypothetically, it might cross react with ERK2 and help solve the issue of ERK2 serine 264 phosphorylation. In addition, this antibody could provide significant insight on ERK1 serine 283 spatiotemporal regulation.

Immunofluorescence studies combined with LMB treatment led us to conclude that serine 283 phosphorylation is required for MEK1-dependent ERK1 nuclear entry. By co-precipitation studies, we showed that ERK1 S283A is deficient for certain types of protein-protein interactions that can, individually or in combination, regulate its subcellular localization; the most obvious being defective interactions with Nup153. Upon MEK1 activation, ERK1 S283A binding to Nup153 strikingly decreases in accordance with its lack of nuclear accumulation. Moreover, in the inactive state, ERK1 S283A interacts more strongly with Nup153, possibly facilitating its nuclear accumulation in the absence of active MEK1. Moreover, ERK1 S283A also displayed reduced association with MEK1. ERK1/2 bind MEK1/2 through two types of interactions. The first being Common Docking interactions (Tanoue et al, 2000), but these are not modulated by serine 283 phosphorylation (Figure 2-19C). The second type of interactions is MEK-specific and occurs via the MAP kinase insert (Robinson et al, 2002), in the vicinity of serine 283 (Figure 2-11D). Hence, the latter interactions are disturbed between MEK1 and ERK1 S283A.

Nevertheless, MEK1-ERK1 S283A interactions, though reduced, must still exist for four reasons: (1) ERK1 S283A is adequately phosphorylated by MEK1, (2) CD interactions can occur in ERK1 S283A, (3) ERK1 S283A is massively relocated from the nucleus to the cytoplasm in the presence of MEK1 wt or K97A, and (4) both ERK1 wt-NLS and ERK1 S283A-NLS can drag MEK1 wt (but not MEK1 DD) into the nucleus in the absence of stimulus. In addition, activated ERK2 can bind activated MEK1, though less efficiently than the inactive form (Adachi et al, 1999). Dissociation of the MEK-ERK complex occurs upon nuclear entry (Adachi et al, 1999; Burack & Shaw, 2005; Fukuda et al, 1997c; Horgan & Stork, 2003; Wolf et al, 2001), but it remains unclear if that dissociation takes place in the cytoplasm or the nucleus. Our data suggests the latter hypothesis. Indeed, consistent with the findings that LMB-induced MEK1 nuclear accumulation is enhanced upon activation of the MAP kinase pathway (Yao et al, 2001), MEK1 DD accumulates more strongly in the nucleus when co-expressed with ERK1 wt than with ERK1 S283A in LMB-treated cells (Figure 2-15B,E). This implies that MAP kinase insert-mediated ERK1-bound MEK1 enters the nucleus more efficiently than unbound MEK1. This suggests that dissociation of the ERK-MEK complex is not required for nuclear entry, and that MEK1/2 can accompany ERK1/2 in the nucleus before their dissociation.

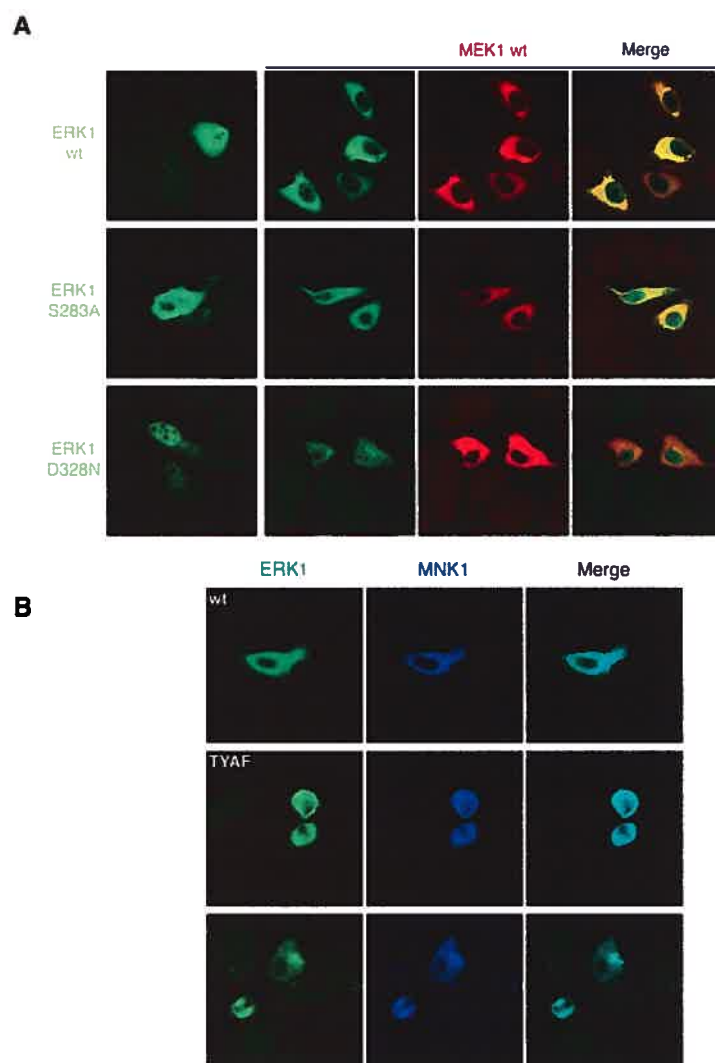


Figure 2-21 Cytoplasmic targeting of ERK by Common Docking interactions

(A) Immunofluorescence microscopy of ERK1 variants co-expressed with MEK1 (Right panels) or an empty vector (Left panel). (B) Co-expression of MNK1 with ERK1 variants under similar conditions.

Here, we propose a model in which MAP kinase insert mediated- and DEF domain-interactions are required for nuclear entry of both ERK and MEK, whereas CD interactions mediate ERK nuclear export and cytoplasmic retention. Conversely, NES-containing proteins that utilize CD interactions such as MEK1/2 (Adachi et al, 2000; Fukuda et al, 1997c; Rubinfeld et al, 1999; Sugiura et al, 1999), PTP-SL (Blanco-Aparicio et al, 1999; Zuniga et al, 1999), MKP-3 (Brunet et al, 1999b), and MNK1 (Figure 2-13B, Figure 2-21B) can cause ERK1/2 to accumulate in the cytoplasm. In addition, MEK1 D domain mutants cannot sequester ERK2 in the cytoplasm nor activate it properly (Grewal et al, 2006; Xu et al, 2001). Conversely, ERK1 D328N, a mutant deficient in CD interactions accumulates in the nucleus and MEK1 does not induce its cytoplasmic re-localization nor retention (Figure 2-21A). Homologous ERK2 mutants are also nuclear (Tresini et al, 2007) and insensitive to MEK1- (Rubinfeld et al, 1999) and PTP-SL-induced (Tarrega et al, 2002) cytoplasmic retention. These ERK1/2 mutants cannot exit the nucleus, whereas ERK1 S283A cannot enter. Figure 2-22 summarizes these findings in a model where ERK1/2 and MEK1/2 are bound in the cytoplasm in their active and inactive states. MEK1/2 phosphorylation on the ERK1/2 activating threonine and tyrosine residues enhances Nup binding by DEF interactions (Lee et al, 2004), and the ERK-MEK complex can now access the nucleus by facilitated diffusion (Burack & Shaw, 2005; Whitehurst et al, 2002) when serine 283 is phosphorylated, therefore allowing the two partners to interact in a MAP kinase insert-mediated specific manner. Dissociation of the MEK-ERK complex in the nucleus now allows ERK1/2 nuclear anchoring (Lenormand et al, 1998) and signal termination (Lenormand et al, 1998; Volmat et al, 2001). ERK1/2 can then re-associate by CD interactions with MEK1/2 (Adachi et al, 2000; Fukuda et al, 1997b; Fukuda et al, 1997c) or other D domain and NES-containing proteins such as MNK1 (Figure S1B), and shuttle back to the cytoplasm through CRM-1 -mediated nuclear export, or by other mechanisms (Ranganathan et al, 2006), henceforth completing the cycle.

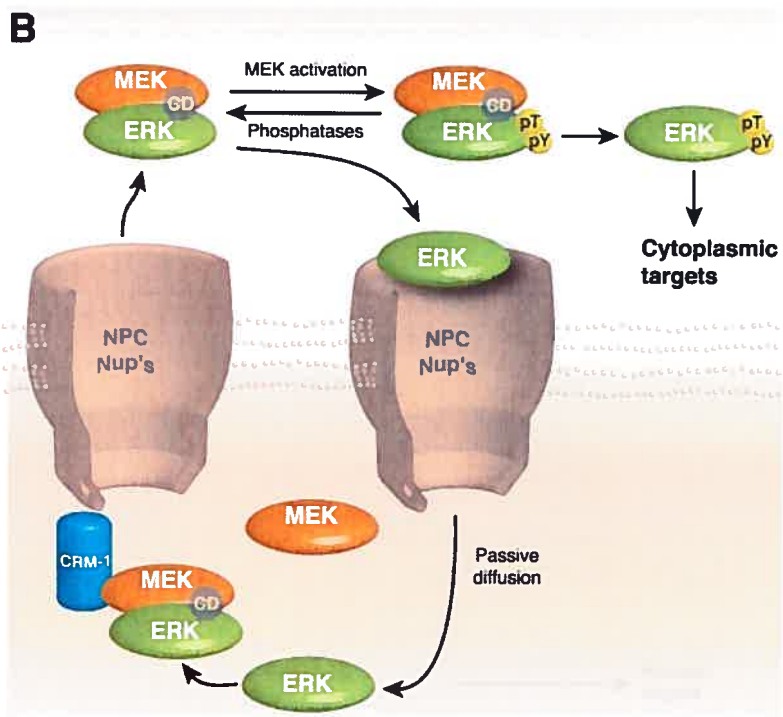
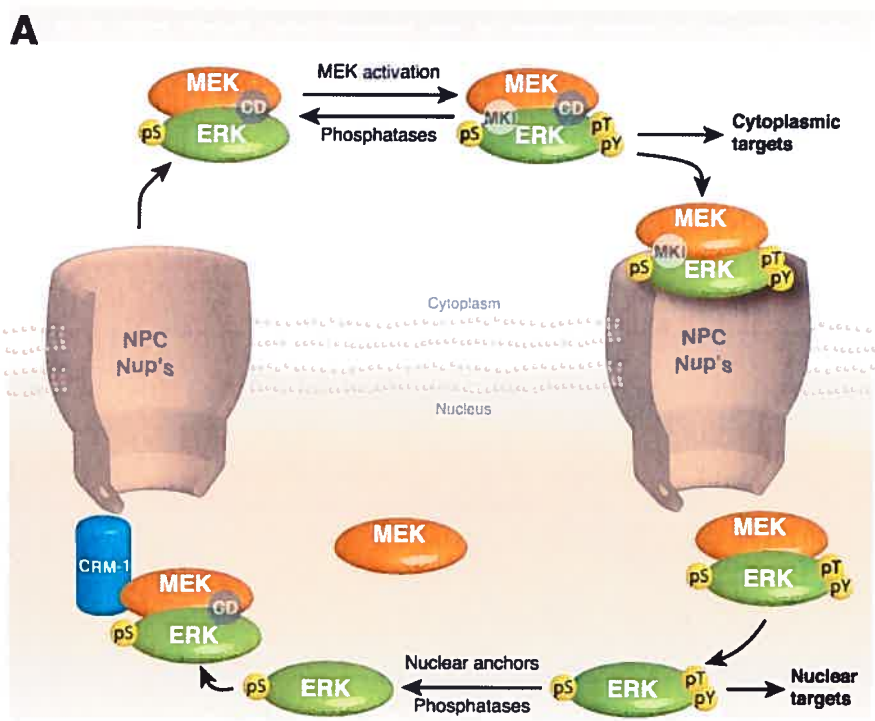


Figure 2-22 Dynamic model for ERK1/2 and MEK1/2 nucleocytoplasmic shuttling

ERK1/2 are anchored in the cytoplasm by MEK1/2. (A) Upon activation, phosphorylation of serine 283 and the MAP kinase insert (*MKI*) are required for DEF docking interactions with the nucleoporins (Nup's) of the nuclear pore complex (NPC), as well as for nuclear entry of the ERK-MEK complex by facilitated diffusion. ERK1/2 and MEK1/2 dissociate in the nucleus where ERK1/2 are inactivated. ERK1/2 require common docking (*CD*) interactions for CRM-1-mediated nuclear export by MEK1/2 or other nuclear export sequence (*NES*) containing interactors. (B) In absence of serine 283 phosphorylation, ERK1 becomes hyper-activated in the cytoplasm because it cannot efficiently translocate to the nucleus. ERK1/2 can still transit through the NPC by passive diffusion, but they are rapidly exported to the cytoplasm in a piggyback manner.

Complete nucleo-cytoplasmic shuttling comprising ERK1/2 and MEK1/2 nuclear entry (Brunet et al, 1999b; Robinson et al, 1998), as well as nuclear export (Fukuda et al, 1997b; Jaaro et al, 1997) appears to be required for proper signal generation, propagation, amplification and termination. In accordance with this hypothesis is the evidence that MEK1/2 (Furuno et al, 2001; Jaaro et al, 1997; Kim & Kahn, 1997; Tolwinski et al, 1999; Yao et al, 2001), ERK1/2 (Ando et al, 2004; Costa et al, 2006; Furuno et al, 2001; Horgan & Stork, 2003; Volmat & Pouyssegur, 2001) as well as several other MAP kinases (Aberg et al, 2006; Gaits & Russell, 1999; Julien et al, 2003; Kondoh et al, 2006; van Drogen & Peter, 2001) constitutively shuttle between the cytoplasm and the nucleus, even in the absence of stimulus. More so, the rates of nuclear import, but also, though to a lesser extent, nuclear export, increase upon growth factor stimulation (Ando et al, 2004; Costa et al, 2006). The nucleus being the site for ERK1/2 dephosphorylation (Volmat et al, 2001), fast nucleo-cytoplasmic transit is predicted to be more efficient in gene induction than simple nuclear retention (Ando et al, 2004). This again is in accordance with our reporter gene studies in which the activity of ERK1 is reduced when it tethered to the nucleus by

fusion with a NLS. Moreover, expression of a NLS-tagged MAP kinase in drosophila leads to severe developmental defects (Kumar et al, 2003a). Our model proposes a dynamic interplay between ERK1/2 and MEK1/2 through their binding and docking domains to efficiently regulate their nucleo-cytoplasmic shuttling, and consequently, their function. This model is further validated in *S. pombe*, where the cytoplasmic localization of the MAP kinase kinase Wis1 plays a crucial role in the activation and nuclear entry of the MAP kinase Spc1 (Nguyen et al, 2002), and nucleo-cytoplasmic shuttling is required for both function and regulation of the pathway (Gaits & Russell, 1999).

ERK1 phosphorylation on serine 283 is required for NGF-induced PC12 neural differentiation and may play a role in other cellular phenotypes. For example, an important proportion of HeLa cells co-expressing ERK1 S283A and MEK1 DD displayed a reduced nuclear and overall cell size (Figure 2-15A). Also observed in cells co-expressing ERK1 wt-NES and MEK1 DD (but not ERK1 S283A-NLS and MEK1 DD; Figure 2-17A), this cellular morphology is comparable to the nuclear shrinkage observed in PC12 cell under hypoxic conditions, a phenomenon that is associated with caspase-independent cell death and requires phospholipase A₂ (PLA₂) activity (Shinzawa & Tsujimoto, 2003). cPLA₂ is an ERK1/2 cytoplasmic target that is activated upon phosphorylation (Lin et al, 1993). Given that ERK1 wt and S283A are phosphorylated and activated to the same extent by MEK1 DD (Figure 2-14C), we assume that total ERK1 activity in cells expressing either ERK1 variant is the same. Furthermore, the activity of ERK1 wt is split between the cytoplasm and the nucleus, whereas ERK1 S283A activity is restricted to the cytoplasm. Therefore, cytoplasmic ERK1 activity is augmented in cells expressing ERK1 S283A, in comparison to its wt counterpart (Figure 2-22B). We consequently hypothesize that excessive and sustained ERK1 (S283A) cytoplasmic activity leads to increased PLA₂ activity and hence, nuclear shrinkage. Restriction of ERK1/2 nuclear entry by cytoplasmic retention blocks Madin-Darby Canine Kidney (MDCK) cell migration (Tanimura et al, 2002), and has been proposed as a mechanism accounting for the reduced proliferation of endoderm-differentiated embryonic stem (ES) and embryonic carcinoma (EC) cells in response to

growth factors (Smith et al, 2004). Upon serum treatment of retinoic acid-differentiated ES or EC cells, ERK1/2 are normally phosphorylated by MEK1/2, and can activate cytoplasmic but not nuclear targets because their localization is restricted to the cytoplasm. Further studies will determine if the phosphorylation of serine 283 or other sites plays a role in nuclear shrinkage, apoptosis, cell migration and other phenomena.

2.2.2.6 Acknowledgments

The authors would like to acknowledge the financial support of the FRSQ. We are also grateful to Malcolm Whiteway (NRCC-BRI, Montréal) for collaborating on protein sequencing, Anne-Claude Gingras and Ruedi Aebersold (Institute for Systems Biology, Seattle) as well as Éric Bonneil, Christelle Pommies and Pierre Thibault (IRIC, Montréal) for mass spectrometry, Christian Charbonneau for assistance in microscopy, and Josée Noël and Édith Giasson for technical assistance.

2.2.3 Données supplémentaires

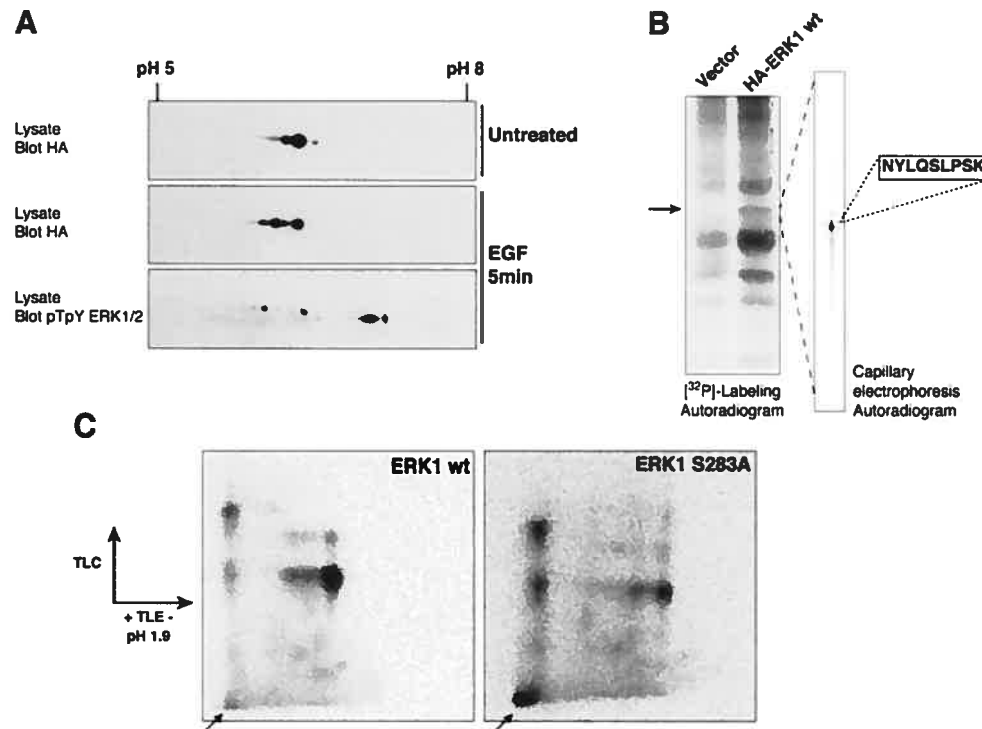


Figure 2-23 Phosphorylation de plusieurs sites sur HA-ERK1

A) Électrophorèse à deux dimensions de HA-ERK1 wt exprimée dans des cellules HeLa en absence de sérum, suivant ou non un traitement à l'EGF. Les immunobuvardages anti-HA et anti-pTpY ERK1/2 des lysats révèlent que ERK1 est sujette à plusieurs modifications post-traductionnelles, peu importe son état d'activation. B) Marquage métabolique au [32 P] de cellules HEK 293 exprimant HA-ERK1 wt. La protéine est immunoprécipitée puis digérée *in-gel*. Les fragments tryptiques libérés sont séparés par électrophorèse capillaire dont les fractions sont déposées sur membrane de PVDF. Les phosphopeptides marqués sont révélés par autoradiogramme avant d'être séquencés par dégradation d'Edman. Parmi ceux-ci nous avons détecté la séquence NYLQSLPS renfermant la sérine 283 de ERK1. C) Cartes phosphopeptidiques de HA-ERK1 wt et S283A dans des conditions similaires à (B).

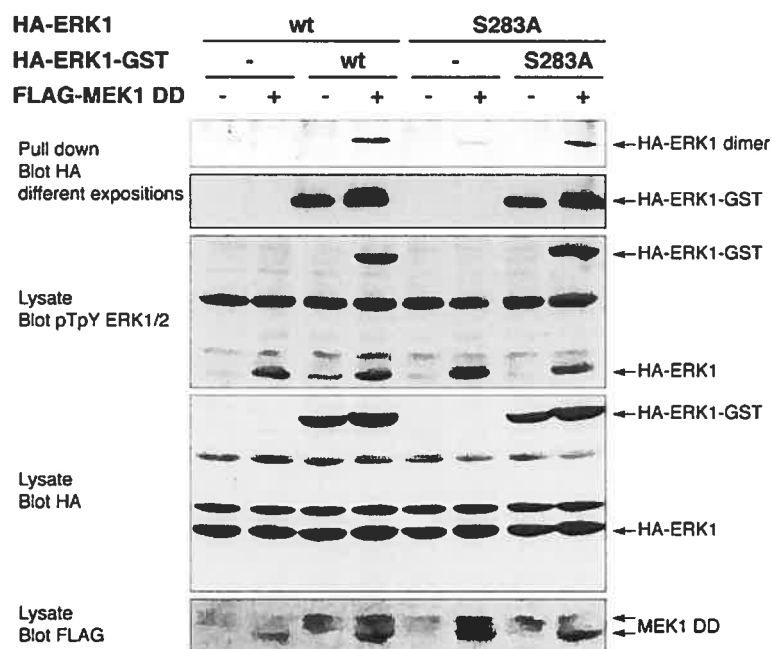


Figure 2-24 **Dimérisation de ERK1**

Co-précipitation de HA-ERK1-GST et HA-ERK1 en absence ou en présence de la forme activée de MEK1. Le mutant S283A forme aussi efficacement des dimères que sa variante de type sauvage.

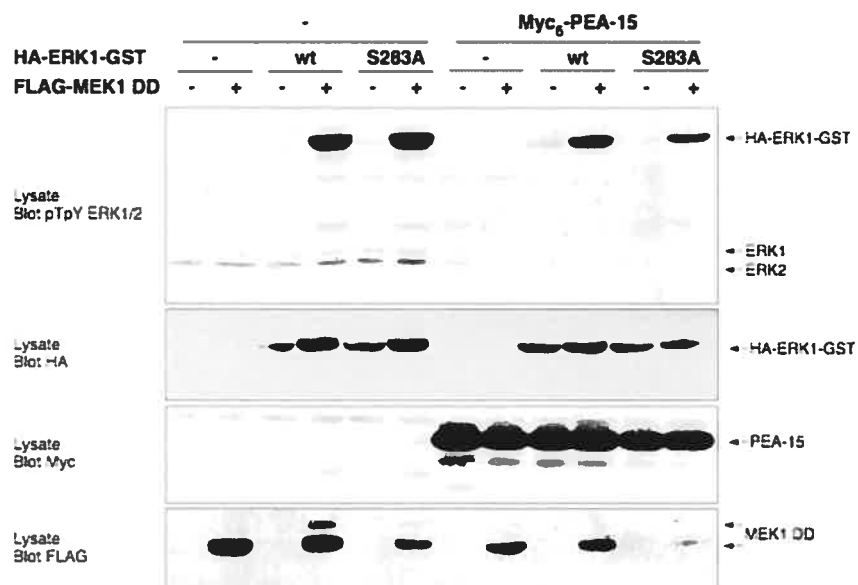


Figure 2-25 La surexpression de PEA-15 inhibe l'activation de ERK1/2

Immunobuvardage à partir de lysats de cellules HEK293 co-exprimant des variantes de HA-ERK1-GST et Myc₆-PEA-15 en absence ou présence de MEK1 DD. Le buvardage avec l'anticorps contre la forme activée de ERK1/2 (pTpY ERK1/2) révèle que PEA-15 inhibe l'activation de ERK1/2 endogène ainsi que celle de ERK1 wt et S283A par la forme active de MEK1.

3 Discussion

Les travaux décrits dans les précédentes sections illustrent qu'un site de phosphorylation peut affecter la localisation subcellulaire, et conséquemment, la manière dont les signaux sont relayés dans les voies MAP kinase eucaryotes. Dans un premier temps, nous avons identifié chez la levure *S. cerevisiae*, la thréonine 42 comme site de phosphorylation sur la protéine régulatrice Ste50 (Section 2.1). La phosphorylation de la thréonine 42 n'affecte pas l'association entre Ste11 et Ste50 validant que ces interactions se font via leurs domaines SAM respectifs (Wu et al, 2006a; Wu et al, 1999). Toutefois, la mutation de ce site affecte la transmission de signaux de réponse aux phéromones qui sont relayés par la MAPKKK Ste11 vers la voie Fus3. Malgré cela, ce site n'affecte pas la résistance à l'osmolarité élevée impliquant Ste11 et la voie Hog1. En outre, la phosphorylation de la thréonine 42 modifie le fractionnement subcellulaire de Ste50, ce qui suggère un changement de localisation subcellulaire. Des travaux subséquents ont confirmé l'importance de la relocalisation membranaire de Ste11 et Ste50 pour l'activation spécifique de la voie Hog1 (Tatebayashi et al, 2006; Wu et al, 2006a).

Dans la seconde étude, nous avons identifié la sérine 283 comme un résidu hautement conservé qui est phosphorylé sur la MAP kinase ERK1 de mammifère (Section 2.2). La phosphorylation de ce site est requise pour l'association de ERK1 aux nucléoporines et son entrée au noyau. Le mutant S283A est actif dans le cytoplasme, mais ne possède pas d'activité nucléaire. Celui-ci se comporte même comme un dominant négatif sur l'activité nucléaire de ERK1. L'activité au noyau de ERK1/2 est requise pour certaines fonctions cellulaires comme la différenciation des PC12.

3.1 Sites de phosphorylation

Nous avons utilisé des approches quelque peu distinctes, mais parfois complémentaires afin d'identifier des sites de phosphorylation chez des protéines de levure et de mammifère. Dans les deux cas, la phosphorylation du site a été confirmée par mutagenèse dirigée, et nous avons pu observer des effets sur des processus cellulaires et physiologiques.

3.1.1 Identification chez Ste50

Afin d'isoler et d'identifier la thréonine 42 de Ste50 comme site de phosphorylation, nous avons utilisé une combinaison d'approches *in vitro* et *in vivo* sur des mutants de délétion et des mutants ponctuels. Ces expériences ont d'abord permis la reconnaissance d'un important peptide tryptique dans la portion N-terminale de Ste50 contenant 8 résidus sérine et thréonine qui ont tous été mutés individuellement ou en combinaison. Des essais fonctionnels ont mis en évidence la thréonine 42 comme candidat à la phosphorylation *in vivo*. En outre, la mutation de la thréonine 42 en alanine (T42A) seule ou en combinaison avec les autres sérine/thréonine du peptide accélère la migration électrophorétique de Ste50 (Figure 2-10A, page 171). Néanmoins, le peptide disparaissant dans les cartes phosphopeptidiques de Ste50 8A est toujours présent chez Ste50 T42A tout comme chez Ste50 7A/T42 (Figure 2-10B). Ceci suggère que la thréonine 42 n'est pas le seul résidu de ce peptide pouvant être phosphorylé. Puisque le phosphopeptide détecté chez Ste50 wt, T42A et 7A/T42, mais pas chez Ste50 8A, migre toujours au même endroit, il ne doit y avoir qu'un seul résidu de phosphorylé à l'intérieur du peptide. En effet, afin de conserver un profil de migration bidimensionnel identique, le phosphopeptide doit conserver ses propriétés biochimiques de ratio charge/masse et d'hydrophobicité. L'ajout ou le retrait d'un phosphate modifie significativement ces propriétés et perturbe les profils de migration électrophorétique (TLE) et chromatographique (TLC) du phosphopeptide. Donc, il ne peut y avoir à la fois qu'un seul site de phosphorylation sur le peptide contenant les 8 résidus sérine/thréonine. Il s'agit de manière prédominante de la thréonine 42 qui affecte la migration électrophorétique de Ste50 ainsi que la réponse aux phéromones. Cependant, un autre résidu peut être phosphorylé en l'absence de la thréonine 42. Toutefois, cet autre site à l'intérieur du phosphopeptide a des effets moins marqués que la thréonine 42 (Figure 2-2, page 146), à tout le moins sur la conjugaison.

3.1.2 Identification chez ERK1

L'identification de la sérine 283 de ERK1 a été effectuée par digestion tryptique de la protéine marquée à même le gel de polyacrylamide après des étapes d'alkylation pour faciliter l'extraction des peptides libérés. Ces peptides sont ensuite séparés par chromatographie liquide à haute pression (HPLC) dont les fractions sont collectées manuellement. Lorsque l'on détecte de la radioactivité dans l'une d'elles, la fraction est soumise à une dégradation d'Edman automatisée afin d'obtenir la séquence du phosphopeptide radioactif correspondant. La séquence est lue avant d'être comparée avec des séquences connues. Notre équipe a par le passé obtenu des résultats probants avec cette technique. Notamment, l'identification de deux sites de phosphorylation *in vitro* du facteur de transcription GATA-4 par la MAP kinase p38 α (Charron et al, 2001) et celle d'un site conservé de régulation négative sur MEK1 *in vivo* (Gopalbhai et al, 2003). Pour ERK1, une digestion *in-gel* similaire sur une protéine marquée et immunoprécipitée, mais avec une séparation des peptides par électrophorèse capillaire a elle aussi permis d'identifier le phosphopeptide NYLQSLPSK contenant la sérine 283 (Figure 2-23B, page 214).

Cette digestion directe de protéines visibles au bleu de Coomassie offre des rendements dépassant 90% (Hellman et al, 1995). La méthode que nous utilisons habituellement pour générer des cartes phosphopeptidiques à partir de membranes de PVDF génère quant à elle des rendements bien inférieurs (Boyle et al, 1991). Ces différences de rendement pourraient expliquer les patrons similaires sur les cartes phosphopeptidiques de ERK1 wt et S283A générées à partir de protéines adsorbées sur membrane de PVDF. Ces patrons sont toutefois différents si l'on digère les protéines dans le gel (Figure 2-23C, page 214). Ces données suggèrent que le phosphopeptide contenant la sérine 283 phosphorylée demeure adsorbé sur la membrane de PVDF, mais peut être extrait par digestion *in-gel*. Somme toute, la phosphorylation de la sérine 283 a été confirmée par mutagenèse dirigée avec digestion dans le gel de polyacrylamide et séparation des peptides par HPLC (Figure 2-11C, page 182). Pour le mutant S283A, nous n'avons détecté aucune fraction significativement

radioactive. Nous en concluons que le peptide NYLQSLPSK renfermant la sérine 283 n'est phosphorylé que chez la protéine de type sauvage. La phosphorylation de la sérine 283 a ultérieurement été confirmée par spectrométrie de masse, également sur des produits de digestion tryptique *in-gel* (M.-C. Gingras et R. Aebersold, communication personnelle). En outre, le haut degré de conservation de ce résidu suggère lui aussi un rôle important dans la régulation de la protéine, ce que nous avons élucidé en partie par la suite.

3.1.2.1 Autres sites de phosphorylation

Plusieurs évidences soutiennent l'existence d'autres sites de phosphorylation chez ERK1 et ERK2. D'abord, l'analyse du profil de ERK1 sur gel bidimensionnel (Figure 2-23A, page 214) suggère la présence de modifications post-traductionnelles. En effet, en absence comme en présence d'EGF, ERK1 démontre différents points isoélectriques à chacun desquels peut-être rattaché un état de modification post-traductionnelle. L'ajout de chaque phosphate acidifie le point isoélectrique de la protéine. Conséquemment, la présence de plusieurs points isoélectriques suggère que de multiples états de modification post-traductionnelles (notamment la phosphorylation) co-existent simultanément sur ERK1, certains de ces états étant plus abondants que les autres. Dans la même veine, cela suggère aussi la possibilité de plusieurs niveaux de phosphorylation. Nos analyses par HPLC (Figure 2-11C) ainsi que des cartes phosphopeptidiques (Figure 2-23C, page 214), pointent également en direction de plusieurs sites de phosphorylation.

Plus récemment, d'autres analyses par spectrométrie de masse ont permis d'identifier plus d'une demi-douzaine de nouveaux sites de phosphorylation sur ERK1 (S. Lehmann, M. Arcand, E. Bonneil, P. Thibault et S. Meloche). Parmi ceux-ci on retrouve la très conservée sérine 170 ainsi que les thréonines 176 et 177 qui constituent le site ED du sillon d'amarrage (Section 1.5.3.2.2.2, page 106; Figure 1-31, page 110). La phosphorylation de ces thréonines leur confère une importante charge négative comparable à celle des acides glutamique et aspartique du site ED de p38. La substitution de ces deux résidus thréonine par des acides glutamique et aspartique, procure à ERK2 une sélectivité

de liaison d'amarrage semblable à celle de p38 (Tanoue et al, 2001a). Par ailleurs, la phosphorylation de p38 α sur la thréonine 123 située dans son sillon d'amarrage inhibe sa liaison et son activation par MKK3 (Peregrin et al, 2006). Bien que ce site ne soit pas conservé chez ERK1/2, il demeure possible que la phosphorylation de résidus du sillon d'amarrage affecte leur association avec MEK1/2. Des études subséquentes permettront de déterminer si la phosphorylation d'un ou plusieurs de ces trois résidus nouvellement identifiés modifie la sélectivité d'amarrage de ERK1 et si elle perturbe ses interactions avec MEK1/2.

Tableau 3-I **Alignement des MAP kinases humaines incluant les sérines 283 et 286**

MAP kinase	Séquence
ERK1	NYLQSLPSK
ERK2	NYLLSLPHK
JNK1	TYVENRPKY
JNK2	NYVENRPKY
JNK3	NYVENRPKY
P38 α	NYIQSLTQM
P38 β	TYIQSLPPM
P38 γ	NYMKGLPEL
P38 δ	SYIQSLPQT
NLK	HILRGPHKQ
ERK5	AYIQSLPPR
ERK7	SVLHQLGSR
ERK3	VYIRNDMTE
ERK4	SFVSTWEV

Le peptide NYLQSLPSK refermant les sérines 283 et 286 a également été observé sous forme doublement phosphorylée. La relation entre la phosphorylation des sérines 283 et 286 demeure encore mal comprise. Ces deux résidus se trouvent à la fin de l'insertion des MAP kinases de ERK1, hors de structures secondaires bien définies. Cependant, à l'opposé de la sérine 283, la sérine 286 est très peu conservée si ce n'est que chez les orthologues de ERK1 (Tableau 2-III, page 184). Il en va de même dans l'ensemble des MAP kinase humaines où la sérine 286 se retrouve chez ERK1 et chez les MAP kinases

atypiques ERK3 et ERK7, alors que la sérine 283 est retrouvée chez toutes les MAP kinases à l'exception de JNK1/2/3, NLK, ERK3 et ERK7 (Tableau 3-I). La sérine 286 pourrait alors contribuer à la spécificité de l'isoforme ERK1 par rapport à ERK2.

Par ailleurs, nos données de mutagenèse indiquent que la phosphorylation de la sérine 283 précède celle de la 286. En effet, la mutation de la sérine 283 en résidu alanine non-phosphorylable (S283A) empêche le marquage du peptide contenant les deux résidus (Figure 2-11C, page 182). Ces résultats suggèrent que la sérine 286 ne peut être phosphorylée que si la sérine 283 l'est préalablement. Cette phosphorylation doit donc se faire de manière ordonnée. De même, l'un de ces résidus peut se voir déphosphorylé sans affecter l'état de la phosphorylation de l'autre. Bref, sur la protéine néo-synthétisée, la sérine 283 est d'abord phosphorylée, s'en suit celle de la 286 ce qui génère un peptide bi-phosphorylé. La déphosphorylation individuelle de l'un ou l'autre des deux sites peut alors produire un peptide mono-phosphorylé. Ainsi, le peptide peut avoir quatre états de phosphorylation; non phosphorylé, phosphorylé sur la sérine 283, phosphorylé sur la sérine 286, et phosphorylé sur les deux résidus. Somme toute, plusieurs expériences doivent être faites à ce chapitre afin de confirmer que la mutation S283A inhibe la phosphorylation de sérine 286. Il sera ensuite possible de déterminer si cette phosphorylation est bien ordonnée. Pour ce faire, nous devons procéder à d'autres analyses par spectrométrie de masse en utilisant cette fois le mutant S283A plutôt que la protéine de type sauvage.

En outre, des anticorps phospho-spécifiques dirigés contre la sérine 283 et/ou 286 pourraient s'avérer des outils fort utiles pour répondre à cette question. Ceux-ci permettraient de suivre l'état de l'un ou l'autre des sites par une procédure moins lourde que celle encourue pour des analyses de spectrométrie de masse. De tels anticorps pourraient également permettre de visualiser la régulation spatio-temporelle des sites, et de détecter des variations des niveaux de phosphorylation dans certains processus ou dérèglements physiologiques.

Enfin, des études similaires à celles relatées dans ce document permettront ultérieurement d'établir le rôle de la sérine 286 dans l'import et la fonction nucléaire de ERK1, seule ou en combinaison avec la sérine 283. Nous serons alors en mesure de déterminer si la phosphorylation de ces deux sites a des effets nuls, redondants, complémentaires ou additifs. Nous espérons pouvoir en faire autant avec les autres sites de phosphorylation récemment identifiés.

3.2 Protéine kinases impliquées

L'identification d'un nouveau site de phosphorylation mène inévitablement à se poser la question : quelle est la kinase qui en est responsable?

Plusieurs approches expérimentales peuvent être utilisées pour répondre à cette question. Comme une kinase et son substrat se doivent d'interagir, des cribles d'interaction peuvent permettre l'identification d'une kinase. Des expériences de double hybride chez la levure ou de purification douce d'une protéine à deux épitopes (TAP-Tag) permettent d'identifier des interactions stables, ce qui n'est pas toujours le cas entre une kinase et son substrat (Tableau 1-XIII, page 101). En plus de constituer une approche complémentaire, des essais de phosphorylation *in vitro* représentent alors une alternative intéressante. Dans de telles expériences, le substrat est produit en bactérie, puis est mis en présence de kinases potentielles. Toutefois, si ce substrat est une kinase, il est important d'utiliser un mutant catalytiquement inactif afin d'éviter que celui-ci ne s'autophosphoryle et ne vienne brouiller les résultats. C'est notamment le cas de ERK1/2 dont l'autophosphorylation peut en outre conduire à leur activation (Robbins & Cobb, 1992; Rossomando et al, 1992; Seger et al, 1991; Wu et al, 1991). Ces essais peuvent facilement être transposés à plus grande échelle permettant d'employer de nombreux échantillons, comme par exemple, des fractions chromatographiques à partir de matériel de base plus complexe, dont des liquides biologiques ou des lysats cellulaires. Bien que laborieuse, cette technique a fait ses preuves à plusieurs reprises au fil du temps (Johnson & Hunter, 2005).

Nous avons utilisé une forme catalytiquement inactive de ERK2 comme substrat dans un essai kinase *in gel*. Pour ces essais, le substrat est immobilisé dans le gel de polyacrylamide dans lequel on fait migrer les échantillons candidats. Ces derniers peuvent être constitués entre autres, de lysat cellulaire, de fractions subcellulaires, de protéine co-immunoprécipitée par le substrat, ou une autre protéine plus ou moins purifiée. Postérieur aux étapes de migration, les protéines du gel sont renaturées en présence de [γ - 32 P] ATP afin que les kinases du gel phosphorylent le substrat qui s'y trouve. La phosphorylation est alors détectée par autoradiogramme du gel entier. La présence d'une bande indique qu'il y a eu phosphorylation du substrat, en plus de fournir la masse moléculaire apparente de la kinase. Lorsque nous avons procédé à ce type d'essais à partir de lysats ou de protéines co-précipitant avec une forme inactive de ERK1, nous avons effectivement détecté de multiples bandes par autoradiogramme. En contrepartie, les mêmes bandes étaient également visibles sur un gel contrôle ne contenant pas de substrat, suggérant que l'autophosphorylation de ces kinases masquait tout signal spécifique. Par la suite, nous avons focalisé nos expériences sur les effets biologiques de la sérine 283 plutôt que sur la recherche de kinases.

Par ailleurs, lorsqu'une kinase candidate est identifiée, on doit à nouveau entreprendre des essais de phosphorylation du substrat. Ces essais devraient idéalement contenir des contrôles positifs comme un autre substrat bien caractérisé de la kinase et, si possible, une forme activée de la kinase. À l'opposé, une forme catalytiquement inactive de la kinase, et un substrat dans lequel le site de phosphorylation a été muté devraient figurer parmi les contrôles négatifs. De plus, la même kinase provenant d'une autre source (ex. : recombinante plutôt qu'immunoprécipitée) permet encore de confirmer davantage son lien avec le site de phosphorylation.

Une fois encore, les anticorps phospho-spécifiques peuvent s'avérer de précieux instruments de travail, permettant de suivre l'état de phosphorylation *in cyto* et *in vitro* du site identifié. On peut alors procéder à des essais kinase *in vitro* sans radioactivité avec un monitoring par immunobuvardage et chimioluminescence, ou par fluorescence, selon le

type d'anticorps secondaire utilisé. Le recours à la fluorescence permet en outre une détection rapide et à grande échelle, facilitant les cribles automatisés pour identifier des kinases potentielles. Enfin, en utilisant ces anticorps phospho-spécifiques en immunobuvardage sur des lysats de cellules traitées avec des inhibiteurs pharmacologiques de la kinase potentielle (dans la mesure où ceux-ci sont disponibles), cette dernière se verra confirmée comme responsable de la phosphorylation du site *in vivo*. Des approches complémentaires impliquant des siRNA dirigés contre la kinase, ou des cellules dans lesquelles la kinase a été inactivée permettront de valider ces conclusions. Le nombre et la variété des approches seront garants de la solidité des conclusions.

3.2.1 Caséine kinases

Nous avons étudié la phosphorylation de Ste50 et de ERK1 qui sont des composantes essentielles des voies MAP kinases auxquelles elles appartiennent. Outre ces liens, la possibilité que les sites identifiés soient tous deux des substrats pour des isoformes des Caséines kinases (CK) semble les rapprocher un peu plus.

3.2.1.1 Thréonine 42 et Caséine kinase 1

Dans le cas de Ste50, nous avons eu recours à une librairie de kinases qui ont été exprimées puis utilisées dans des essais de phosphorylation *in vitro*. Trois kinases ont d'abord été identifiées (Yck1, Gin4 et Rim11), mais d'entre elles, seulement Yck1 est capable de phosphoryler la thréonine 42 adéquatement (Figure 2-5E, page154). Afin de confirmer le rôle de Yck1 *in vivo*, une souche dans laquelle les isoformes de Caséine kinase 1 Yck1 et Yck2 sont inactivées à 37°C a été utilisées pour des essais de conjugaison. Les deux isoformes ont été ciblées puisque, d'une part la librairie est incomplète, et d'autre part, ces protéines ont des sélectivités qui se chevauchent (Gross & Anderson, 1998). De plus, elles sont toutes deux régulées par la proximité du substrat, ce dernier étant très abondant dans les essais de phosphorylation *in vitro*. De surcroît, Yck1 et Yck2 sont toutes deux exprimées à la membrane, d'où partent les signaux de conjugaison.

Le mutant T42D qui permet de court-circuiter le recours au domaine SAM de Ste11 est incapable d'induire la conjugaison à la température non-permissive, en absence de Yck1 et Yck2 (Figure 2-7, page 157). Ceci est expliqué par le fait que l'activité CK1 est essentielle à plusieurs processus physiologiques, notamment à différentes étapes de la conjugaison (Chen & Konopka, 1996; Robinson et al, 1992; Wang et al, 1996). Conséquemment, il est difficile de confirmer avec certitude absolue que Yck1 phosphoryle effectivement la thréonine 42 de Ste50 *in vivo*, malgré que les évidences *in vitro* soient solides et convergentes.

3.2.1.2 Sérine 283 et Caséine kinase 2

Contrairement à la phosphothréonine et la phosphotyrosine, le contenu en phosphosérine de ERK1 (et ERK2) demeure similaire peu importe que la protéine ait été isolée à partir de cellules quiescentes, en croissance exponentielle ou traitées avec divers agonistes (Gopalbhai & Meloche, 1998; Robbins & Cobb, 1992; Vouret-Craviari et al, 1993). En outre, un traitement avec l'inhibiteur pharmacologique PD098059 révèle que cette phosphorylation en sérine est indépendante de MEK1/2 (Figure 2-11A, page 182). L'ensemble de ces données suggère une phosphorylation constitutive de résidu(s) sérine de ERK1.

Tableau 3-II La sérine 283 comme substrat potentiel de CK2

Protéine	Séquence	Réf
ERK1	YL QSL PS	
JNK2 α 2	TE QTLA p S	[1]
c-Jun	EP QTVPE	[2]
β Catenin	QQ QSYLD	[3]
Consensus CK2	S/TXXE/D/pS	[4]
Consensus CK1	pSXXS/T	[4]

Réf. : [1] (Fleming et al, 2000); [2] (Meggio et al, 1995); [3] (Song et al, 2000); [4] (Meggio & Pinna, 2003)

Puisqu'elle possède une activité constitutive, de nombreux substrats et une séquence consensus de phosphorylation donnée par SXX(E/D/pS); (Meggio & Pinna, 2003), la Caséine kinase 2 (CK2) pourrait constituer une enzyme de choix pour la phosphorylation de la sérine 283 de ERK1. Toutefois, le respect de ce consensus suppose que le peptide de la sérine 283 ait la séquence NYLQSLPpSK. Dans ce cas, la sérine 286 serait elle aussi phosphorylée, ce qui est compatible avec nos données (Section 3.1.2.1). De plus, des peptides aux séquences similaires ont été décrits dans la littérature comme étant des substrats de CK2 *in vitro* ou *in vivo* (Tableau 3-II). Parmi les protéines arborant de tels peptides on retrouve le facteur de transcription c-Jun (Papa & Tager, 1995), la MAP kinase JNK2 (Fleming et al, 2000) ainsi que β -caténine (Song et al, 2000). Nonobstant que la translocation au noyau n'ait été démontrée que pour son isoforme JNK1, JNK2 possède néanmoins une activité nucléaire (Aplin et al, 2002; Cavigelli et al, 1995). De même, β -caténine transloque au noyau suivant son activation (Moon, 2005). En outre, la séquence SLPS est retrouvée dans la portion N-terminale de MEK5, une MAPKK résidant au noyau en permanence (Raviv et al, 2004).

Par ailleurs, CK2 affecte le transport nucléo-cytoplasmique de la ribosome S6 kinase II (Panasyuk et al, 2006), une protéine qui est activée par des signaux trophiques, à l'instar de ERK1/2. De plus, suivant une stimulation à l'insuline, l'activité CK2 va de pair avec l'activité nucléaire de ERK1/2 (Kim & Kahn, 1997). De surcroît, CK2 s'associe à Ksr et agit comme régulateur positif de la voie ERK1/2 (Ritt et al, 2007). Ksr est également une protéine qui transite par le noyau et dont la phosphorylation et les interactions avec MEK1/2 affectent sa localisation subcellulaire (Brennan et al, 2002; Muller et al, 2001).

Dans ce qui pourrait ressembler à une relation de réciprocité, la sérine 286 constitue un excellent site CK1 si la sérine 283 est phosphorylée. Au sein du peptide NYLQpSLPSK, la sérine 286 remplit le consensus pSXXS favorisé par la CK1 (Meggio & Pinna, 2003). Bref, la sérine 283 pourrait être phosphorylée par la CK2 dans la mesure où la sérine 286 l'est déjà. De son côté, la sérine 286 deviendrait une cible CK1 si la sérine 283 est

phosphorylée au préalable. Il faudrait alors déterminer lequel de ces deux sites est phosphorylé en premier. Autrement, nous assisterions à ce qui ressemblerait à un jeu de l'œuf ou la poule entre CK2 et CK1 pour la phosphorylation des sérines 283 et 286, respectivement.

3.2.2 Motifs consensus pour la sérine 283

La sérine 283 peut correspondre à un consensus CK2, particulièrement si la sérine 286 est phosphorylée. Cependant, ce résidu peut également faire partie d'autres séquences consensus sans pour autant que la sérine 286 ne soit phosphorylée. Pour en savoir davantage sur des kinases potentielles, la séquence de ERK1 utilisée dans nos expériences a été soumise aux bases de données et algorithmes de prédiction de sites de phosphorylation que constituent Phospho ELM (<http://phospho.elm.eu.org>); (Diella et al, 2004), Phosphosite (<http://www.phosphosite.org>); (Hornbeck et al, 2004), PPSP (<http://bioinformatics.lcd-ustc.org/PPSP>); (Xue et al, 2006) et Phospho 3D (<http://cbm.bio.uniroma2.it/phospho3d>); (Zanzoni et al, 2007). Ceux-ci ont d'abord validé la phosphorylation des résidus thréonine et tyrosine activateurs par les MAPKK MEK1 et MEK2. Quant à la sérine 283, elle pourrait se voir phosphorylée par plusieurs kinases dont le consensus demeure souvent mal défini ou très variable (Tableau 3-III, page 229). Somme toute, la valeur prédictive des algorithmes demeure faible, mais la probabilité que la sérine 283 soit phosphorylée par une de ces kinases est plus grande que pour CK2.

Ces kinases potentielles sont essentiellement impliquées dans divers stades du cycle cellulaire ou dans les voies MAP kinases. Les kinases de la sous-famille Chk sont importantes pour la détection du dommage à l'ADN et permettent la transition en mitose depuis la phase G2. Le peptide RNYLQSLPSK de ERK1 ne constitue pas un substrat parfait selon le consensus RXXS puisqu'il correspond davantage à la séquence RXXXS. Or, Chk1 favorise les substrats avec un acide aminé hydrophobe en position +1 (O'Neill et al, 2002) tel que la leucine 284 de ERK1, voisine de la sérine 283. Également impliquée dans la détection, mais aussi la réparation du dommage à l'ADN, DNA-PK est une kinase

atypique. Ses substrats ont une glutamine précédant le site de phosphorylation, comme c'est le cas de la sérine 283 de ERK1. Avec une arginine en position -5, la sérine 283 constitue un faible consensus pour les kinases de la sous-famille Aurora. Ces dernières sont impliquées dans la ségrégation des chromosomes (Meraldi et al, 2004). Quant à NIMA et ses orthologues de la sous-famille Nek, le motif consensus est donné par FXXT ou F(K/R)(K/R)(S/T). De manière peu restrictive, la tyrosine 280 de ERK1 avec son noyau aromatique pourrait se substituer à la phénylalanine du motif qui deviendrait alors YXXS. Si l'une de ces candidates s'avère la kinase de la sérine 283 *in vivo*, cela pourrait davantage resserrer les liens qui unissent ERK1/2 au cycle cellulaire (Section 1.4.1.3.3, page 50) et à la transition G2/M (Section 1.4.1.3.5, page 51).

Tableau 3-III Kinases potentielles de la sérine 283 de ERK1

Kinase(s)	Famille	Fonction	Consensus	Réf
Chk1/Chk2	CAMK	Transition G2/M	RXXS	[1]
DNA-PK	Autre	Détection du dommage à l'ADN	Q(S/T)	[2]
Ipl1/Aurora	Autre	Cycle cellulaire	(K/R) _{1,3} X(S/T)	[3]
NIMA/Nek	Autre	Condensation des chromosomes	F(K/R/X)(K/R/X)(S/T)	[4, 5]
MAPKKK	Ste	Activation MAPKK	SXXXS	[6]
PAK	Ste	Activation MAPKKK	(K/R) _{1,2} X _{1,2} S	[7]

Réf : [1] (O'Neill et al, 2002); [2] (Collis et al, 2005); [3] (Meraldi et al, 2004); [4] (Descamps & Prigent, 2001); [5] (Malumbres & Barbacid, 2007); [6] (Baccarini, 2005); [7] (Bokoch, 2003)

Par contre, toujours selon ces algorithmes, la sérine 283 de ERK1 constituerait un meilleur substrat pour les MAPKKK et les PAK de la famille Ste (Tableau 3-III). La phosphorylation de ERK1 par ces kinases laisse présager l'existence d'une boucle de rétroaction. Or, nos données montrent que la phosphorylation en sérine est indépendante de l'activité de MEK1/2, et conséquemment de l'activation de ERK1/2. Ce qui exclut donc que la phosphorylation de la sérine 283 fait partie d'une boucle de rétroaction. Ainsi, des kinases des sous-familles PAK et Raf court-circuiteraient MEK1/2 afin de « préparer » ERK1 pour l'entrée au noyau qui suit de son activation. PAK1 peut interagir avec Raf et

ERK1/2 (Tableau 1-XVII, page 120), tout comme peuvent le faire MEK1/2 et Raf (Takekawa et al, 2005). L'ensemble de ces interactions pourrait mener à l'assemblage de complexes d'activation au sein desquels Raf et/ou PAK régulent positivement ERK1/2 sans pour autant les activer directement. De plus, des MAPKKK et des membres de la sous-famille PAK reliés à d'autres voies MAP kinase pourraient eux aussi agir sur ERK1 afin de favoriser son activité nucléaire. Cependant, bien du travail doit être abattu avant de pouvoir valider ce modèle. Une des premières étapes consiste à vérifier la phosphorylation de la sérine 283 par Raf et/ou PAK, *in vitro* puis *in vivo*. Ensuite, nous déterminerons si cette phosphorylation se produit effectivement au sein de complexes d'activation. Alors, nous pourrions observer ces complexes par microscopie confocale. De plus, il sera possible d'étudier l'impact de divers mutants de liaison sur la phosphorylation de la sérine 283 et l'entrée au noyau de ERK1.

3.3 Modèle de transport nucléo-cytoplasmique de ERK1/2

Nos travaux ont permis d'établir le rôle de la sérine 283 pour la fonction nucléaire de ERK1. Des analyses de la localisation ont révélé que la sérine 283 est requise non seulement pour l'accumulation nucléaire de ERK1, mais également pour son entrée au noyau. La phosphorylation de ce résidu est importante pour la liaison de ERK1 avec MEK1 et avec les Nup. Sans perturber les interactions d'amarrage commun, la mutation de la sérine 283 en alanine inhibe les interactions médiées par l'insertion des MAP kinases (MKI) dont celles avec les Nup qui sont essentielles à son entrée au noyau. Nous avons vérifié en parallèle que l'ajout d'un NLS peut effectivement permettre au mutant ERK1 S283A de surmonter ce défaut d'accumulation nucléaire. De manière concomitante, la greffe d'un NES sur la protéine de type sauvage lui confère des propriétés similaires à celle du mutant S283A.

Ces études de localisation subcellulaire ont pour la plupart été réalisées en présence de MEK1 de type sauvage (wt) ou d'une forme constitutivement active (DD) pour deux raisons. La première étant que la présence de MEK1 DD assure une activation forte de

ERK1/2 sans pour autant activer d'autres voies de signalisation comme le feraient le traitement de cellules avec du sérum ou des facteurs de croissance. En second lieu, c'est pour des motifs de visualisation et de comptage de cellules. En effet, ERK1 exprimée en absence de MEK1 se retrouve davantage dans le noyau, même dans des cellules privées de sérum (Figure 2-15C, page 192) alors que la protéine endogène est cytoplasmique dans de telles conditions (Lenormand et al, 1993). Cependant, la co-expression de ERK1 avec MEK1 de type sauvage ou une variante catalytiquement inactive (K97A) rétablit cette localisation cytoplasmique. De même, MEK1 DD induit une importante accumulation nucléaire de ERK1/2. En outre, ces études de co-expression ont contribué à améliorer la compréhension du rôle de MEK1 dans la localisation subcellulaire de ERK1 et ont illustré l'influence de ERK1 sur la localisation de MEK1.

3.3.1 ERK1 et MEK1 influencent mutuellement leur localisation

En effet, nous avons d'abord observé que la localisation de MEK1 va souvent de pair avec celle de ERK1. Nous avons alors évalué l'accumulation nucléaire de MEK1 DD en co-expression avec différentes variantes de ERK, et ce en absence ou présence de LMB (Figure 2-15E). Lorsque co-exprimée seule (avec un vecteur vide), MEK1 DD est fortement cytoplasmique (moins de 10% nucléaire) alors que la LMB cause son accumulation au noyau (près de 70%), nous servant du coup de contrôle positif (Adachi et al, 2000). Cette accumulation nucléaire de MEK1 DD est réduite en présence de ERK1 wt ou TYAF (environ 40%), suggérant un ralentissement de son transit nucléo-cytoplasmique. Le mutant ERK1 TYAF n'est pas activé par MEK1 DD puisque sa thréonine et sa tyrosine activatrices ont été substitués pour des résidus similaires mais non phosphorylables. Conséquemment, ERK1 TYAF entre moins au noyau en présence de MEK1 DD que ERK1 wt (Figure 2-15C, page 192). Toutefois, ERK1 TYAF se voit quand même relocalisé au cytoplasme par MEK1 wt (ou MEK1 K97A), et demeure sensible à la LMB. En contrepartie, ERK1 S283A est insensible à la LMB et reste localisé au cytoplasme en présence de MEK1 wt, K97A ou DD. En outre, ce mutant maintient davantage MEK1 DD

dans le cytoplasme (environ 25% nucléaire) que les variantes wt et TYAF. Ces expériences confirment dans leur ensemble que MEK1 modifie la localisation de ERK1 en permettant notamment son ciblage cytoplasmique, mais elles établissent également que la localisation subcellulaire de MEK1 est affectée par celle de ERK1.

Nos expériences de ciblage nucléaire de ERK1 par l'ajout d'un NLS sont elles aussi en accord avec ces observations. Réciproquement à MEK1 wt qui peut titrer ERK1 vers le cytoplasme, ERK1 wt-NLS et même ERK1 S283A-NLS peuvent induire la relocalisation nucléaire de MEK1 wt (Figure 2-17A, page 195). Cependant, MEK1 DD demeure cytoplasmique, suggérant une dissociation d'avec ERK1 subséquentement à l'activation de cette dernière.

En présence de MEK1 wt ou DD, ERK1 S283A est localisée au cytoplasme. Des phénotypes similaires à ceux obtenus avec ERK1 S283A peuvent être générés par ciblage cytoplasmique de la protéine de type sauvage. En outre, ERK1 S283A réside au cytoplasme indépendamment de son état d'activation. C'est aussi le cas de MEK1 qui semblait à priori un bon candidat à la séquestration cytoplasmique de ERK1 S283A. Or, nos essais de co-précipitation *in vivo* ont révélé que ERK1 S283A lie MEK1 avec une efficacité nettement moindre que ERK1 wt (Figure 2-19A,B, page 200). Pourtant, ERK1 S283A est titrée vers le cytoplasme en présence de MEK1. De même, MEK1 wt est relocalisée au noyau par ERK1 S283A-NLS. Ces observations suggèrent que ERK1 S283A et MEK1 peuvent interagir de manière suffisante pour affecter leurs localisations subcellulaires respectives.

Deux régions de ERK1 lui permettent d'interagir avec MEK1. D'abord, son sillon d'amarrage est utilisé par MEK1 ainsi que plusieurs autres régulateurs et effecteurs de ERK1/2 lors d'interactions d'amarrage commun (CD). Le second type d'interactions avec MEK1 se fait via le MKI de ERK1 et implique la sérine 283. La mutation S283A perturbe la liaison de ERK1 à MEK1 sans affecter les interactions CD (Figure 2-19C). Les interactions CD entre ERK1/2 et MEK1/2 ont deux principales fonctions: le recrutement

cytoplasmique ainsi que l'activation de ERK1/2 par MEK1/2 (Grewal et al, 2006). Il en va de même dans notre modèle expérimental où le mutant du sillon d'amarrage ERK1 D328N n'est pas recruté au cytoplasme par MEK1 et demeure nucléaire (Figure 2-21A, page 208). En revanche, les propriétés d'activation et de rétention cytoplasmique demeurent inaltérées chez ERK1 S283A. Ce mutant est néanmoins déficient dans ses interactions avec MEK1 et celles avec les Nup. De plus, ERK1 S283A n'entre pas au noyau et réduit l'accumulation nucléaire de MEK1 induite par la LMB. À la lumière de plusieurs observations incluant les nôtres, nous proposons un modèle où les interactions CD servent au recrutement cytoplasmique, alors que celles se faisant via le MKI servent à l'entrée au noyau de ERK1 en compagnie de MEK1. MEK1 utilise ERK1 pour entrer au noyau, alors que MEK1 remorque ERK1 pour un retour au cytoplasme. Ces deux protéines se dissocient dans le noyau d'où MEK1 peut ressortir d'elle-même, et où ERK1 demeure ancrée pour se voir ultimement inactivée par des phosphatases nucléaires.

3.3.1.1 Amarrage commun et export

ERK1 peut se réassocier avec MEK1 pour ressortir du noyau, mais peut également servir de cargo à d'autres protéines contenant un NES, toujours via des interactions CD. Par exemple, les tyrosine phosphatases STEP et PTP-SL contiennent un NES en plus d'un motif d'amarrage commun. Ces protéines recrutent et maintiennent ERK2 au cytoplasme (Blanco-Aparicio et al, 1999; Zuniga et al, 1999). Afin de valider ce modèle, nous avons co-transfecté ERK1 wt ou S283A avec MNK1, qui possède un NES et un motif d'amarrage commun à l'instar de MEK1. Effectivement, MNK1 induit la relocalisation cytoplasmique de ERK1 wt, TYAF et S283A (Figure 2-21B). ERK1 wt s'accumule au noyau en présence de MEK1 DD, or l'ajout de MNK1 induit sa relocalisation au cytoplasme (Figure 2-13B, page 187). Ainsi, ERK1/2 sont relocalisées au cytoplasme indépendamment de leur état d'activation (Horgan & Stork, 2003). En contrepartie, le mutant du sillon d'amarrage ERK1 D328N demeure au noyau en présence de MNK1, confirmant que les interactions d'amarrage commun sont requises pour le recrutement cytoplasmique de ERK1/2.

3.3.1.1.1 Séquences d'amarrage et de localisation

Les motifs d'amarrage jumelés à des NES constituent une remorque parfaite pour le retour de ERK1/2 vers le cytoplasme. Singulièrement, des similitudes entre les deux séquences consensus sont notables. En effet, sous forme simplifiée, le consensus du motif d'amarrage est donné par $(K/R)_{2-4}X_{0-6}LXL$ et celui du NES par $LX_{2-3}LX_{2-3}LXL$. Le motif LXL, voire LXLXL, est présent dans les deux consensus. Ceci laisse présager que la liaison d'une protéine à une MAP kinase par interactions CD masquerait son NES et empêcherait la sortie de la MAP kinase vers le cytoplasme. Les interactions entre un NES et une exportine sont très faibles (Kutay & Guttinger, 2005), suggérant qu'une MAP kinase venant s'amarrer à une protéine portant un tel motif (servant à la fois pour l'amarrage commun et l'export nucléaire) pourrait déloger une exportine préalablement liée. Alors, la MAP kinase pourrait bloquer ou du moins ralentir l'export nucléaire. Nos expériences démontrent que l'accumulation nucléaire de MEK1 DD n'est pas affectée par la co-expression de ERK1 wt (Figure 2-15B, E, page 192). Cependant, un traitement à la LMB réduit significativement cette accumulation. Ces données suggèrent que ERK1 favorise l'import nucléaire de MEK1 sans ralentir son export. En outre, ERK2 peut accroître l'activité GTPase de RanGAP (Faustino et al, 2006), impliquant une augmentation plutôt qu'une diminution de l'import et l'export nucléaires. Enfin, nos expériences sur ERK1 avec MEK1 et MNK1 indiquent que ces dernières recrutent ERK1 au cytoplasme par des interactions CD. MEK1 et MNK1 possèdent chacune plusieurs de ces consensus (Tableau 1-XIV, page 107; Tableau 1-XVI, page 116). Certaines séquences ressemblent davantage à un NES, d'autres correspondent mieux à un motif d'amarrage commun. Nous proposons que la multitude de ces motifs permet une reconnaissance simultanée par la MAP kinase et l'exportine CRM-1. En outre, la présence de plusieurs de ceux-ci sur une protéine la rendrait propice à exporter des MAP kinases hors du noyau.

3.3.2 Cycle nucléo-cytoplasmique

Le modèle dynamique que nous proposons (Section 2.2.2.5; Figure 2-22, page 211) appuie les observations d'un transit nucléo-cytoplasmique continu de ERK1/2 (Ando et al, 2004; Costa et al, 2006; Furuno et al, 2001; Horgan & Stork, 2003; Volmat & Pouyssegur, 2001) et MEK1/2 (Jaaro et al, 1997; Tolwinski et al, 1999; Yao et al, 2001), transit qui accélère lors de l'activation de la voie. Celui-ci permet notamment une activation rapide de gènes cibles avec une grande sensibilité (Ando et al, 2004; Whitehurst et al, 2004a). De plus, ce cycle est important car il permet d'activer correctement la voie ERK1/2. Le retour au cytoplasme est garant d'une activation adéquate de la MAP kinase, mais aussi de son ciblage nucléaire subséquent (Grewal et al, 2006; Nguyen et al, 2002).

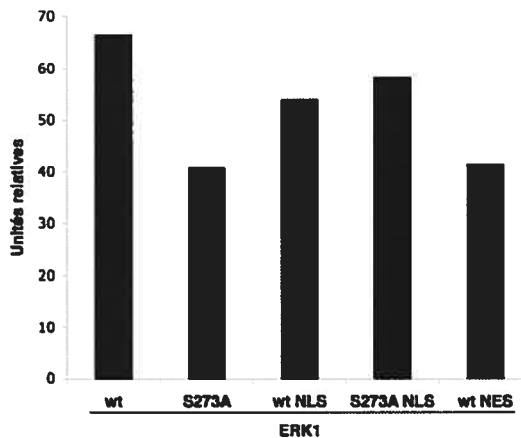


Figure 3-1 **Activité nucléaire relative des mutants de ERK1**

Activité nucléaire de variantes de ERK1 obtenue par essais luciférase gène rapporteur Elk-1 (Figure 2-17, page 195) et normalisée par leur activité phosphotransférase en présence de MEK1 DD.

De manière concomitante, l'accumulation cytoplasmique ou nucléaire de ERK1 par l'ajout d'un NES ou d'un NLS réduit son activité et sa capacité à activer le facteur de transcription Elk-1 (Figure 2-17B, page 195). Ainsi, un cycle nucléo-cytoplasmique complet est requis pour que ERK1 ait une activité nucléaire maximale. Par ailleurs, la baisse d'activité nucléaire semble moins importante pour ERK1 wt-NES que pour ERK1 wt-NLS, mais n'est attribuable qu'à une activité catalytique plus élevée (Figure 2-17D). ERK1 wt-NES peut être plus facilement activée par MEK1DD puisque les deux se retrouvent longtemps ensemble au cytoplasme. De surcroît, ERK1 wt-NES devient inaccessible aux phosphatases nucléaires. Effectivement, la normalisation de l'activité luciférase induite par MEK1 DD des mutants -NLS et -NES de ERK1 par leur activité phosphotransférase (Figure 3-1) révèle que ERK1 wt-NES possède une activité nucléaire relative comparable à celle de ERK1 S283A. De plus, celle de ERK1 wt-NLS et ERK1 S283A-NLS sont similaires. Ceci confirme que le défaut d'activité nucléaire de ERK1 S283A est attribuable à son incapacité à entrer au noyau, phénomène qui peut être reproduit par l'ajout d'un NES sur la protéine de type sauvage.

En somme, la sérine 283 fait partie du MKI, la région de ERK1/2 la plus affectée par la phosphorylation sur les résidus thréonine et tyrosine activateurs, après la boucle d'activation elle-même. La phosphorylation de ce résidu permet à ERK1 d'interagir spécifiquement avec certaines protéines. Parmi ces dernières, on retrouve des Nup qui sont essentielles pour l'entrée au noyau. Ces interactions sont plus fortes lorsque ERK1 est active, ce qui lui permet alors de lier efficacement les Nup et de franchir le NPC. La sortie du noyau quant à elle, se fait à la manière d'un train où ERK1/2 sont remorquées par MEK1/2 (ou d'autres protéines) via des interactions CD. L'exportine CRM-1 agit comme locomotive d'export en remorquant MEK1/2 via leur NES. Le retour au cytoplasme de ERK1/2 leur permet d'amorcer adéquatement un nouveau cycle nucléo-cytoplasmique dont la vitesse augmente considérablement lorsque ces kinases sont activées.

3.3.3 Dimérisation de ERK1/2

Par ailleurs, il a été proposé que l'homo-dimérisation de ERK2 est impliquée dans sa translocation nucléaire (Adachi et al, 1999; Cobb & Goldsmith, 2000; Khokhlatchev et al, 1998); (voir aussi Section 1.5.2.3.2.1, page 89). Les dimères de la forme activée de ERK2 ont d'abord été observés *in vitro* sur des cristaux de la protéine (Canagarajah et al, 1997). En outre, des profils chromatographiques différents en plus d'essais de centrifugation analytique ont confirmé que la forme de ERK2 phosphorylée sur la thréonine et la tyrosine de la boucle d'activation est prompte à la dimérisation (Khokhlatchev et al, 1998; Wilsbacher et al, 2006). Par ailleurs, ERK1 activée forme également des dimères *in vitro*, mais aussi *in vivo*. En effet, des complexes résistants au dodécylsulfate de sodium (SDS) et ayant un poids moléculaire apparent plus élevé ont été observés dans des extraits d'oursins ou de cellules HeLa à partir desquels ERK1 phosphorylée en thréonine et tyrosine a été immunoprécipitée (Philipova & Whitaker, 2005). Ces complexes sont reconnus en immunobuvardage par différents anticorps dirigés contre la forme active de ERK1, ou contre la protéine ERK1 totale. De plus, les dimères de ERK1 possèdent une activité catalytique accrue. Ils représentent toutefois un très faible pourcentage de la quantité totale de ERK1 dans une cellule (Philipova & Whitaker, 2005), ce qui pourrait en outre expliquer que la dimérisation de ERK2 n'a pas pu être observée par FRET (Burack & Shaw, 2005).

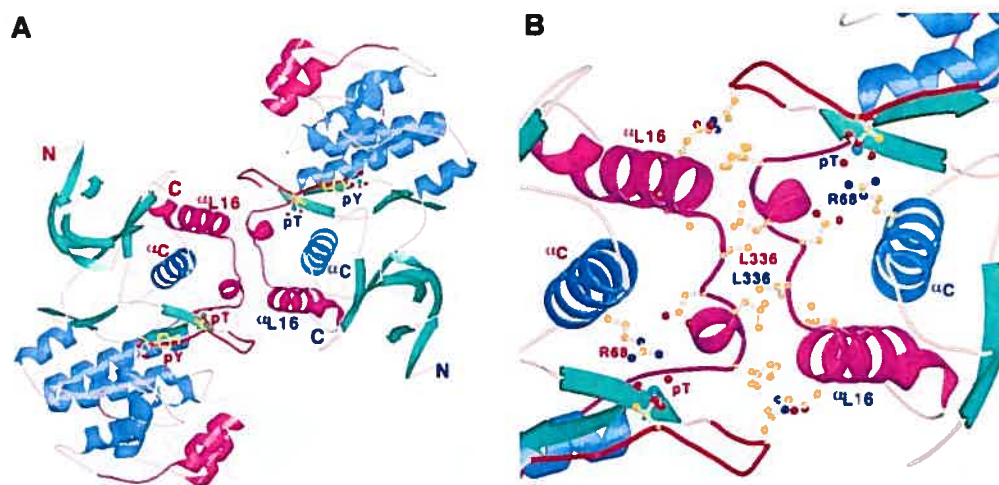


Figure 3-2 **Dimérisation de ERK2**

Structure cristalline de la forme activée de ERK2. A) Vue d'ensemble du dimère de ERK2 montrant notamment la phosphorylation des résidus thréonine (pT) et tyrosine (pY) activateurs. L'insertion des MAP kinases est représentée par un ruban rose au haut et au bas de l'image, selon la molécule à laquelle il appartient. B) Vue rapprochée de l'interface de dimérisation avec les principaux résidus impliqués.

Tiré de (Khokhlatchev et al, 1998)

Les résidus impliqués dans la dimérisation sont principalement des leucines situées près de la grande hélice α à l'extrémité C-terminale (Figure 3-2), là où cette dernière enjambe le petit lobe (Khokhlatchev et al, 1998). Ces leucines entrent en contact les unes avec les autres à la manière d'une fermeture éclair (*zipper*). Toujours dans cette région, un acide glutamique forme un pont salin avec la boucle d'activation de son partenaire via un résidu histidine. La mutation de ces sites (ERK2 H176E L₄A) n'affecte pas l'activité phosphotransférase de la protéine (Wilsbacher et al, 2006). Cependant, un mutant équivalent fusionné à la GFP s'accumule au noyau de cellules PC12 de manière déficiente, principalement dans la phase initiale de l'entrée nucléaire (Horgan & Stork, 2003). Par

ailleurs, une grosse protéine chimérique résultant de la fusion du mutant de dimérisation avec la β -Galactosidase (β -Gal-ERK2 H176E L₄A), n'entre pas au noyau lorsque MEK1 et B-Raf sont activées (Adachi et al, 1999). En revanche, une chimère similaire avec ERK2 de type sauvage (β -Gal-ERK2 wt) entre au noyau dans les mêmes conditions. Toutefois, cette translocation nécessite de l'énergie, suggérant que le dimère requiert un transport actif pour entrer au noyau. Or, l'entrée nucléaire de ERK2 ne nécessite pas d'apport en énergie ou de facteurs de transport (Burack & Shaw, 2005; Whitehurst et al, 2002). De surcroît, des expériences de microscopie et de FRET réalisées avec des cellules épithéliales (HEK 293) ou ovariennes (CHO) mènent à la conclusion que la dimérisation n'affecte pas les cinétiques d'import ou d'export nucléaires de ERK2 (Burack & Shaw, 2005; Wolf et al, 2001).

Nous savons maintenant que la sérine 283 de ERK1 est requise pour son entrée au noyau et que la mutation de ce site génère une forme cytoplasmique de ERK1, comparable au mutant β -Gal-ERK2 H176E L₄A. Puisqu'elle influence le transport nucléocytoplasmique de ERK1, nous avons donc voulu savoir si la sérine 283 est également impliquée dans sa dimérisation. Pour ce faire, nous avons procédé de manière analogue à nos études de co-précipitation : HA-ERK1-GST a été co-exprimée avec Myc₆-ERK1 en absence ou présence de MEK1DD, puis nous avons incubé le lysat en présence de billes de glutathione-agarose avant de récupérer les protéines précipitées pour les soumettre à une analyse *western* (Figure 2-24, page 215). Ces expériences (également entreprises avec HA-ERK1 plutôt que Myc₆-ERK1; données non montrées) ont révélé que le mutant ERK1 S283A peut former des dimères en présence de MEK1 DD aussi efficacement que ERK1 wt. Conséquemment, le défaut d'entrée nucléaire de ce mutant n'est pas attribuable à une dimérisation déficiente. De plus, ceci confirme les données cristallographiques démontrant que l'insertion des MAP kinases est située bien loin de l'interface de dimérisation (Figure 3-2A), et ne prend pas part au processus.

En somme, nos données ne permettent pas de trancher le débat sur le rôle de la dimérisation dans l'entrée au noyau. ERK1 S283A peut être activé et former des dimères *in*

vivo, mais n'entre pas au noyau en présence de MEK1 DD. Nous pouvons donc affirmer que la dimérisation ainsi que la phosphorylation des résidus activateurs ne sont pas suffisants pour l'entrée au noyau de ERK1.

3.4 Rétention cytoplasmique de ERK1 activée

Les signaux générés par les MAP kinases ERK1/2 varient selon leur localisation subcellulaire (Section 1.5.3.3.3, page 124). De plus, nous disposons d'un mutant de ERK1 (S283A) qui est normalement activé par MEK1/2, mais qui ne s'accumule pas au noyau en présence d'une forme constitutivement active de MEK1. En outre, ERK1 S283A s'associe moins efficacement à MEK1 que la protéine de type sauvage. Toutefois, cette association est suffisante pour permettre le recrutement cytoplasmique de ERK1 S283A par MEK1. Suivant la phosphorylation de ERK1/2 sur leur boucle d'activation, ces dernières se dissocient de MEK1/2 (Adachi et al, 1999). À la lumière de nos résultats expérimentaux et en accord avec une multitude d'études publiées, nous avons proposé un modèle de transit nucléo-cytoplasmique pour ERK1/2 (Figure 2-22, page 211). Les défauts d'accumulation nucléaire de ERK1 S283A sont principalement attribuables à son incapacité à lier adéquatement les Nup subséquentement à son activation. Néanmoins, cette hypothèse n'exclut pas la possibilité de mécanismes secondaires faisant appel à d'autres protéines agissant comme ancrs cytoplasmiques. Ces dernières retenant dans le cytoplasme ERK1 lorsqu'elle est activée et qu'elle se dissocie de MEK1. En effet, la rétention cytoplasmique des formes actives de ERK1/2 est utilisée dans certaines cellules embryonnaires (cellules souches embryonnaires, ES; cellules de carcinome embryonnaire, EC) afin de prévenir leur prolifération induite par des facteurs de croissance (Smith et al, 2004). Il est possible que l'absence de phosphorylation sur la sérine 283 de ERK1 soit en cause et ERK1 S283A pourrait mimer ce phénotype. Des études sont actuellement en cours afin de déterminer si le contenu en phosphosérine de ERK1/2 endogène est réduit chez les cellules EC.

Plusieurs groupes soutiennent que l'accumulation de ERK1/2 dans un compartiment subcellulaire est tributaire d'un équilibre de liaison avec des ancrs cytoplasmiques

(MEK1/2, *Phosphoprotein enriched in astrocytes-15* (PEA-15), ...) et nucléaires (facteurs de transcription, phosphatases, ...); (Burack & Shaw, 2005; Lenormand et al, 1998; Whitehurst et al, 2004b). Dans cette optique, plusieurs candidats potentiels pour la rétention cytoplasmique de ERK1/2 sont décrits dans le Tableau 1-XVII, page 120 et suivantes. Ces partenaires d'interaction affectent la localisation subcellulaire de ERK1/2. Certains d'entre eux pourraient servir d'ancre cytoplasmique à ERK1 wt et S283A lorsque ces kinases sont activées et ne lient plus MEK1 et/ou les Nup. Toutefois, afin de pouvoir expliquer la rétention cytoplasmique de ERK1/2 dans ces conditions, les candidats doivent répondre à certains critères. Le premier étant que la protéine candidate doit s'associer à ERK1/2 dans le cytoplasme. En second lieu, le candidat ne doit pas permettre l'entrée nucléaire de ERK1/2. Troisièmement, la protéine candidate ne doit pas réduire l'activité de ERK1/2, puisque ERK1 S283A est activée normalement tant par MEK1 DD que par la stimulation au sérum (Figure 2-12, page 186; Figure 2-13, page 187). De plus, l'activation de ERK1/2 est normale chez les cellules EC et ES. Enfin, le candidat doit pouvoir lier la forme activée de ERK1/2, alors que son association avec ERK1/2 inactives est dispensable.

3.4.1 Candidats improbables

Plusieurs études font état de candidats à la rétention cytoplasmique de ERK1/2. Ce rôle, pour ceux qui seront décrits au cours des prochains paragraphes, est bien défini. Toutefois, ces protéines ne remplissent pas les quatre critères énoncés. Ils occupent néanmoins une place significative dans la littérature et c'est pourquoi ils seront abordés.

3.4.1.1 STEP, PTP-SL, HePTP et DS-MKP

Ces tyrosine phosphatases contiennent à la fois un NES et un motif d'amarrage commun. La combinaison de ces deux séquences permet une relocalisation de ERK1/2 vers le cytoplasme (Blanco-Aparicio et al, 1999; Mustelin et al, 2005; Pulido et al, 1998; Tarrega et al, 2002; Zuniga et al, 1999). Toutefois, de par leur nature, ces PTP inactivent ERK1/2, ce qui les élimine d'emblée comme candidats à la rétention cytoplasmique de

ERK1 en absence de phosphorylation sur la sérine 283. De manière analogue, plusieurs DS-MKP, comme par exemple MKP3 et PYST2, constituent des candidats au titrage cytoplasmique de ERK1/2 (Tableau 1-XII, page 99). Cependant, ces phosphatases doivent à nouveau être exclues à cause de leur nature inhibitrice sur l'activité de ERK1/2. Néanmoins, il demeure possible que ces PTP et DS-MKP agissent comme ancrages cytoplasmiques de ERK1/2 dans d'autres conditions. De même, elles pourraient favoriser le retour de ERK1/2 du noyau vers le cytoplasme, ce qui est en accord avec notre modèle (Figure 2-22, page 211).

3.4.2 Candidats probables

Après une analyse du Tableau 1-XVII à la page 120, nous pouvons identifier neuf protéines répondant aux quatre critères pour en faire des candidats à la rétention cytoplasmique de ERK1/2 activées. Cependant, plusieurs d'entre elles sont encore peu caractérisées, surtout en ce qui a trait à leurs interactions avec ERK1/2. Néanmoins, elles s'associent toutes à ERK1/2 dans le cytoplasme sans en diminuer l'activité.

3.4.2.1 Calcineurine

Aussi connue sous le nom de PP2B, la Calcineurine lie préférentiellement la forme activée de ERK1/2 (Sanna et al, 2005). Comme il s'agit d'un membre de la famille PP2, et que PP2A ainsi que PP2C peuvent agir comme régulateurs négatifs de la voie ERK1/2 (Section 1.5.3.1.3, page 97), nous serions tentés d'exclure d'emblée la Calcineurine. Or, celle-ci n'affecte pas l'activité de ERK1/2 (Sanna et al, 2005), mais agit plutôt en aval en déphosphorylant des cibles de ERK1/2 (Sugimoto et al, 1997; Tian & Karin, 1999).

ERK1/2 et la Calcineurine font généralement partie de voies parallèles avec des points de convergence, comme par exemple NFAT sur lequel elles ont des activités opposées. La phosphorylation de NFAT induit sa rétention cytoplasmique, alors que la déphosphorylation par la Calcineurine mène à son accumulation nucléaire (Molkentin, 2004). De plus, ERK1/2, MEK1/2, la Calcineurine et NFAT forment un important

complexe régulateur de NFAT (Sanna et al, 2005; Yang et al, 2005). Cependant, NFAT permet l'entrée au noyau de ERK1/2, ce qui suggère que la Calcineurine fait de même et devrait alors contribuer à l'exclure comme ancre cytoplasmique de ERK1 en absence de phosphorylation sur la sérine 283. Toutefois, NFAT s'associe préférentiellement à la forme inactive de ERK1/2, et ne se comporte donc pas identiquement à la Calcineurine (Yang et al, 2005).

3.4.2.2 DAPK

Death-associated protein kinase (DAPK) et ERK1/2 forment une boucle de rétroaction favorable à l'apoptose. En effet, ERK1/2 phosphorylent DAPK, ce qui augmente son activité phosphotransférase et donc ses effets pro-apoptotiques (Chen et al, 2005a). En outre, DAPK séquestre ERK1/2 au cytoplasme, inhibant leur capacité à induire des gènes anti-apoptotiques.

3.4.2.3 Dynéine

La Dynéine est impliquée dans le transport axonal et elle s'associe avec la forme activée de ERK1/2 (Perlson et al, 2005). Par ailleurs, elle semble agir conjointement avec la Vimentine qui lie la boucle d'activation de ERK1/2 phosphorylée en thréonine et tyrosine, et prévient leur inactivation par les phosphatases (Kumar et al, 2007; Perlson et al, 2006). Par contre, la Vimentine permet la translocation nucléaire de ERK1/2.

3.4.2.4 ERF

ETS2 repressor factor (ERF) possède un motif d'amarrage FXFP de sorte qu'elle s'associe préférentiellement à la forme activée de ERK1/2 (Polychronopoulos et al, 2006). La phosphorylation de ERF par ERK1/2 induit sa migration du noyau vers le cytoplasme (Le Gallic et al, 1999). Cependant, ces observations suggèrent que le contact initial entre les deux protéines a lieu au noyau. Conséquemment, ERF pourrait induire la relocalisation cytoplasmique de ERK1 wt, mais pas ERK1 S283A puisque ce dernier n'entre pas au noyau.

3.4.2.5 FHL2

Bien que *Four and a half LIM domain 1* (FHL1) et FHL3 puissent également lier ERK1/2, les travaux de caractérisation ont davantage porté sur FHL2 (Purcell et al, 2004). Cette dernière lie plus fortement la forme activée de ERK1/2 et empêche leur entrée au noyau sans toutefois affecter leur activation par MEK1/2. Conséquemment, FHL1/2/3 constituent des candidats répondant à tous nos critères. Nous avons débuté des travaux préliminaires dans le but d'étudier le rôle de FHL2 dans la rétention cytoplasmique de ERK1 lorsque la sérine 283 n'est pas phosphorylée.

3.4.2.6 MNK1/2a

Ces MK contiennent à la fois un NLS et un NES, mais elle s'accumulent dans le cytoplasme à l'équilibre, (Figure 2-13, page 187; Figure 2-21, page 208) bien qu'elles transitent par le noyau (Parra-Palau et al, 2003). À l'instar d'autres candidats à la rétention de ERK1/2, elles possèdent en plus du NES un motif d'amarrage commun qui leur permet de lier ERK1/2 avec une meilleure affinité pour la forme activée (Fukunaga & Hunter, 1997; Tanoue et al, 2000; Waskiewicz et al, 1997). Toutefois, MNK2b ne lie pas ERK1/2 (Scheper et al, 2003). En revanche, nos travaux illustrent très bien que MNK1 peut servir d'ancre cytoplasmique pour ERK1 indépendamment de son état de phosphorylation sur les résidus thréonine et tyrosine activateurs, ainsi que sur la sérine 283. Par contre, nous n'avons pas déterminé si MNK1 affecte l'activité nucléaire de ERK1, ou si elle peut s'y substituer, à tout le moins partiellement. Somme toute, MNK1 n'influence pas l'activité cytoplasmique de ERK1.

3.4.2.7 Naf1

Bien que peu de choses soient connues à son sujet, *Nef-associated factor 1* (Naf1) s'associe à ERK2 (et présumément ERK1) et inhibe son activité nucléaire (Zhang et al, 2002). Cette caractérisation demeure par contre très sommaire et des études ultérieures

devraient déterminer si effectivement Naf1 représente un candidat à la rétention cytoplasmique de la forme activée de ERK1, incluant celle déphosphorylée en sérine 283.

3.4.2.8 PEA-15

Cette petite protéine inhibe l'activité nucléaire de ERK1/2 en les séquestrant au cytoplasme (Formstecher et al, 2001; Gervais et al, 2006; Whitehurst et al, 2004b). PEA-15 possède également un NES et lie le sillon d'amarrage ainsi que l'insertion des MAP kinases (MKI) de ERK1/2 (Callaway et al, 2005; Hill et al, 2002; Whitehurst et al, 2004b). MEK1/2 utilisent ces deux mêmes régions pour lier et activer ERK1/2 (Robinson et al, 2002; Whitehurst et al, 2004b). Conséquemment, en liant ERK1/2, PEA-15 empêche leur activation par MEK1/2. De même, PEA-15 bloque le MKI requis pour la liaison aux Nup et l'entrée au noyau (Whitehurst et al, 2004b). Parce que PEA-15 cause la rétention cytoplasmique de ERK1/2 et lie leur MKI, cette protéine semble un candidat désigné pour expliquer les effets du mutant ERK1 S283A. L'hypothèse étant que la phosphorylation de de la sérine 283 causerait une dissociation entre ERK1 et PEA-15. Par ailleurs, une étude a révélé que la dissociation entre ERK1/2 et PEA-15 survient suite à la phosphorylation de cette dernière sur deux résidus spécifiques (Krueger et al, 2005).

Pour ces raisons, et parce que sa surexpression inhibe l'activation de ERK1 par MEK1DD (Figure 2-25, page 216), il serait tentant de discréditer PEA-15 comme candidat. Cependant, cette dernière ne réduit pas l'activité de ERK1/2. De plus, il est possible que PEA-15 lie davantage ERK1 S283A que ERK1 wt et agisse alors comme ancre cytoplasmique du mutant. Des expériences de co-immunoprécipitation de PEA-15 avec ERK1 wt et S283A en présence de MEK1DD sont en cours afin de vérifier si la liaison du mutant est accrue.

3.4.2.9 Validation des candidatures

Les candidats doivent lier la forme active de ERK1 dans le cytoplasme sans réduire son activité. Afin de valider ces candidats comme ancres cytoplasmiques de ERK1 activée

mais dépourvue de phosphorylation sur la sérine 283, plusieurs expériences sont à prévoir. D'abord, des essais d'association *in vivo* : co-précipitation, et co-localisation cytoplasmique. Par la suite, nous devons observer les effets de l'inactivation de ces candidats par siRNA ou par inactivation génique sur la localisation subcellulaire de ERK1. Enfin, des tests de fonction nucléaire et cytoplasmique de ERK1 devront être effectués lorsque le candidat est surexprimé ou inactivé. Des cellules dérivées de souris pour lesquelles FHL2 a été inactivée sont disponibles (Gunther et al, 2005). Il en va de même pour MNK1 et MNK2 (Ueda et al, 2004). Ces cellules dérivées devraient constituer des outils de choix dans la caractérisation de la rétention cytoplasmique de ERK1/2 activées.

Néanmoins, notre recherche de candidats demeure bien imparfaite. Seules les protéines décrites dans la littérature comme interagissant directement avec ERK1/2 de mammifère sont répertoriées dans le tableau 1-XVII. Il est fort probable que ERK1/2 interagissent avec d'autres partenaires qui n'aient pas été jusqu'ici décrits. En outre, la localisation de ces protéines n'est pas forcément fixe. Dans certaines conditions, ceux-ci pourraient lier ERK1/2 en une localisation distincte (par exemple, aux kinétochores), puis les remorquer au cytoplasme. De plus, la rétention cytoplasmique de ERK1 S283A pourrait se faire de manière indirecte : un des partenaires de ERK1/2 lie une protéine contenant un NES, ce qui permet le ciblage cytoplasmique de ERK1/2 même dans des conditions où celles-ci sont dissociées de MEK1/2. Finalement, plusieurs candidats pourraient se partager ce rôle d'ancre cytoplasmique de la forme activée de ERK1, de manière simultanée ou dépendante du contexte cellulaire.

Une manière plus complète et directe de trouver des protéines impliquées dans la rétention de ERK1 S283A existe néanmoins. L'approche permettrait en outre de valider ou d'invalider la candidature des protéines précédemment abordées. Cette procédure repose sur un criblage avec des siRNA dirigés contre le génome complet. Des cellules exprimant ERK1 S283 et MEK1 DD sont infectées par des virus exprimant un siRNA. Un signal est détecté au noyau de la cellule par immunofluorescence lorsqu'il y a inactivation d'une ancre cytoplasmique. De plus, cette détection peut se faire de manière automatisée,

facilitant un criblage à grande échelle. Une localisation nucléaire de ERK1 S238A activée par MEK1 DD signifierait alors qu'un défaut de liaison aux Nup n'est pas la seule cause de l'accumulation au cytoplasme du mutant. Cette dernière impliquerait également une ou plusieurs ancrés cytoplasmiques.

3.5 Perspectives

À l'instar d'autres MAP kinases, ERK1 et ERK2 possèdent bien des similarités, mais également des différences subtiles qui sont à l'origine de leurs fonctions physiologiques se chevauchant de manière incomplète. L'équilibre entre ces deux protéines assure une régulation adéquate des nombreux processus cellulaires relayés par ERK1/2.

Par ailleurs, les signaux de ERK1/2 émanant du cytoplasme sont associés à la différenciation (Marenda et al, 2006) et surtout à l'absence de prolifération (Kim et al, 2000; Smith et al, 2004; Tresini et al, 2001; Tresini et al, 2007). De son côté, la prolifération est généralement associée à l'activité nucléaire (Marenda et al, 2006). Nous avons identifié un nouveau site de phosphorylation qui est requis pour l'entrée au noyau et conséquemment, pour l'activité nucléaire de ERK1. Cette sérine est aussi présente chez ERK2, bien que la phosphorylation du résidu n'ait pas été confirmée. Par contre, d'autres sites de phosphorylation uniques à ERK1 ont été identifiées. Ceux-ci pourraient être à la base de la spécificité de chaque isoforme.

Somme toute, ces nouveaux sites de phosphorylation (incluant la sérine 283) devraient nous permettre d'en apprendre davantage sur les signaux relayés par les MAP kinases. Leur caractérisation approfondie fournira des bases afin de disséquer les liens entre la localisation, l'activité et les signaux générés, ainsi que la sélectivité de chaque isoforme de ces MAP kinases. Nous disposerons alors de meilleurs outils pour comprendre comment un nombre si limité d'acteurs que sont les composantes des voies MAP kinases peuvent générer des réponses si spécifiques et si finement régulées.

Conclusion

De la levure à l'humain, les voies MAP kinase permettent de générer des réponses spécifiques à des signaux complexes via un nombre limité de composantes. Dans un premier temps, chez la levure *S. cerevisiae*, nos travaux ont identifié la thréonine 42 de la protéine régulatrice Ste50 comme étant un résidu essentiel à sa fonction. La phosphorylation du site permet à Ste50 d'aiguiller les signaux de la MAPKKK Ste11 vers une seule des trois voies qu'elle chapeaute. D'autre part, la MAP kinase ERK1 de mammifère est phosphorylée sur la sérine 283. Ce site est impliqué dans des interactions essentielles pour l'entrée au noyau et la fonction nucléaire de ERK1.

Il est permis d'espérer que les travaux présentés dans cette thèse ont illustré les liens de dépendance entre la phosphorylation, les interactions avec différents partenaires et la localisation subcellulaire dans les voies MAP kinase eucaryotes. De plus, ces trois éléments contribuent grandement à l'intégration et à la spécificité du signal. Une compréhension accrue des mécanismes impliqués dans la spécificité de ces signaux intracellulaires contribuera à élargir notre connaissance d'une foule de processus biologiques qui régissent le vivant depuis l'embryogenèse à la mort. En outre, nous comprendrons ultimement les relations entre les signaux intracellulaires et la maladie, et comment nous pouvons utiliser ces signaux à des fins de prévention et de guérison.

Bibliographie

Abe MK, Kahle KT, Saelzler MP, Orth K, Dixon JE, Rosner MR (2001) ERK7 is an autoactivated member of the MAPK family. *J Biol Chem* **276**: 21272-21279

Abe MK, Kuo W-L, Hershenson MB, Rosner MR (1999) Extracellular Signal-Regulated Kinase 7 (ERK7), a Novel ERK with a C-Terminal Domain That Regulates Its Activity, Its Cellular Localization, and Cell Growth. *Mol Cell Biol* **19**: 1301-1312

Abe MK, Saelzler MP, Espinosa R, 3rd, Kahle KT, Hershenson MB, Le Beau MM, Rosner MR (2002) ERK8, a new member of the mitogen-activated protein kinase family. *J Biol Chem* **277**: 16733-16743

Aberg E, Perander M, Johansen B, Julien C, Meloche S, Keyse SM, Seternes O-M (2006) Regulation of MAPK-activated Protein Kinase 5 Activity and Subcellular Localization by the Atypical MAPK ERK4/MAPK4. *J Biol Chem* **281**: 35499-35510

Abraham D, Podar K, Pacher M, Kubicek M, Welzel N, Hemmings BA, Dilworth SM, Mischak H, Kolch W, Baccarini M (2000) Raf-1-associated Protein Phosphatase 2A as a Positive Regulator of Kinase Activation. *J Biol Chem* **275**: 22300-22304

Acharya U, Mallabiabarrena A, Acharya JK, Malhotra V (1998) Signaling via mitogen-activated protein kinase kinase (MEK1) is required for Golgi fragmentation during mitosis. *Cell* **92**: 183-192

Adachi M, Fukuda M, Nishida E (1999) Two co-existing mechanisms for nuclear import of MAP kinase: passive diffusion of a monomer and active transport of a dimer. *Embo J* **18**: 5347-5358

Adachi M, Fukuda M, Nishida E (2000) Nuclear export of MAP kinase (ERK) involves a MAP kinase kinase (MEK)-dependent active transport mechanism. *J Cell Biol* **148**: 849-856

Adachi T, Kar S, Wang M, Carr BI (2002) Transient and sustained ERK phosphorylation and nuclear translocation in growth control. *J Cell Physiol* **192**: 151-159

Adams DG, Coffee RL, Jr., Zhang H, Pelech S, Strack S, Wadzinski BE (2005) Positive regulation of Raf1-MEK1/2-ERK1/2 signaling by protein serine/threonine phosphatase 2A holoenzymes. *J Biol Chem* **280**: 42644-42654

Adams JL, Badger AM, Kumar S, Lee JC (2001) p38 MAP kinase: molecular target for the inhibition of pro-inflammatory cytokines. *Prog Med Chem* **38**: 1-60

Adams JP, Sweatt JD (2002) Molecular psychology: roles for the ERK MAP kinase cascade in memory. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **42**: 135-163

Adams RH, Porras A, Alonso G, Jones M, Vintersten K, Panelli S, Valladares A, Perez L, Klein R, Nebreda AR (2000) Essential Role of p38[alpha] MAP Kinase in Placental but Not Embryonic Cardiovascular Development. *Molecular Cell* **6**: 109-116

Aebersold DM, Shaul YD, Yung Y, Yarom N, Yao Z, Hanoch T, Seger R (2004) Extracellular signal-regulated kinase 1c (ERK1c), a novel 42-kilodalton ERK, demonstrates unique modes of regulation, localization, and function. *Mol Cell Biol* **24**: 10000-10015

Aguirre V, Uchida T, Yenush L, Davis R, White MF (2000) The c-Jun NH2-terminal Kinase Promotes Insulin Resistance during Association with Insulin Receptor Substrate-1 and Phosphorylation of Ser307. *J Biol Chem* **275**: 9047-9054

Ahn NG, Robbins DJ, Haycock JW, Seger R, Cobb MH, Krebs EG (1992a) Identification of an activator of the microtubule-associated protein 2 kinases ERK1 and ERK2 in PC12 cells stimulated with nerve growth factor or bradykinin. *Journal of neurochemistry* **59**: 147-156

Ahn NG, Seger R, Krebs EG (1992b) The mitogen-activated protein kinase activator. *Curr Opin Cell Biol* **4**: 992-999

Ajenjo N, Canon E, Sanchez-Perez I, Matallanas D, Leon J, Perona R, Crespo P (2004) Subcellular localization determines the protective effects of activated ERK2 against distinct apoptogenic stimuli in myeloid leukemia cells. *J Biol Chem* **279**: 32813-32823

Akaike M, Che W, Marmarosh NL, Ohta S, Osawa M, Ding B, Berk BC, Yan C, Abe J (2004) The hinge-helix 1 region of peroxisome proliferator-activated receptor gamma1 (PPARgamma1) mediates interaction with extracellular signal-regulated kinase 5 and PPARgamma1 transcriptional activation: involvement in flow-induced PPARgamma activation in endothelial cells. *Mol Cell Biol* **24**: 8691-8704

Alberola-Ila J, Hernandez-Hoyos G (2003) The Ras/MAPK cascade and the control of positive selection. *Immunol Rev* **191**: 79-96

Alberts B (2002) *Molecular biology of the cell*, 4th edn. New York: Garland Science.

Alepuz PM, de Nadal E, Zapater M, Ammerer G, Posas F (2003) Osmostress-induced transcription by Hot1 depends on a Hog1-mediated recruitment of the RNA Pol II. *Embo J* **22**: 2433-2442

Alepuz PM, Jovanovic A, Reiser V, Ammerer G (2001) Stress-induced map kinase Hog1 is part of transcription activation complexes. *Mol Cell* **7**: 767-777

Alessandrini A, Brott BK, Erikson RL (1997) Differential expression of MEK1 and MEK2 during mouse development. *Cell Growth Differ* **8**: 505-511

Alessandrini A, Crews CM, Erikson RL (1992) Phorbol ester stimulates a protein-tyrosine/threonine kinase that phosphorylates and activates the Erk-1 gene product. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**: 8200-8204

Alessi DR, Gomez N, Moorhead G, Lewis T, Keyse SM, Cohen P (1995) Inactivation of p42 MAP kinase by protein phosphatase 2A and a protein tyrosine phosphatase, but not CL100, in various cell lines. *Current Biology* **5**: 283-295

Alessi DR, Saito Y, Campbell DG, Cohen P, Sithanandam G, Rapp U, Ashworth A, Marshall CJ, Cowley S (1994) Identification of the sites in MAP kinase kinase-1 phosphorylated by p74raf-1. *Embo J* **13**: 1610-1619

Anderson NG, Li P, Marsden LA, Williams N, Roberts TM, Sturgill TW (1991) Raf-1 is a potential substrate for mitogen-activated protein kinase in vivo. *Biochem J* **277 (Pt 2)**: 573-576

Anderson NG, Maller JL, Tonks NK, Sturgill TW (1990) Requirement for integration of signals from two distinct phosphorylation pathways for activation of MAP kinase. *Nature* **343**: 651-653

Ando R, Mizuno H, Miyawaki A (2004) Regulated fast nucleocytoplasmic shuttling observed by reversible protein highlighting. *Science* **306**: 1370-1373

Angeli D, Ferrell JE, Jr., Sontag ED (2004) Detection of multistability, bifurcations, and hysteresis in a large class of biological positive-feedback systems. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 1822-1827

Aoyama K, Nagata M, Oshima K, Matsuda T, Aoki N (2001) Molecular Cloning and Characterization of a Novel Dual Specificity Phosphatase, LMW-DSP2, That Lacks the Cdc25 Homology Domain. *J Biol Chem* **276**: 27575-27583

Aplin AE, Hogan BP, Tomeu J, Juliano RL (2002) Cell adhesion differentially regulates the nucleocytoplasmic distribution of active MAP kinases. *J Cell Sci* **115**: 2781-2790

Armstrong SC (2004) Protein kinase activation and myocardial ischemia/reperfusion injury. *Cardiovascular research* **61**: 427-436

- Aroor AR, Shukla SD (2004) MAP kinase signaling in diverse effects of ethanol. *Life Sci* **74**: 2339-2364
- Arvind R, Shimamoto H, Momose F, Amagasa T, Omura K, Tsuchida N (2005) A mutation in the common docking domain of ERK2 in a human cancer cell line, which was associated with its constitutive phosphorylation. *International journal of oncology* **27**: 1499-1504
- Ashwell JD (2006) The many paths to p38 mitogen-activated protein kinase activation in the immune system. *Nature reviews* **6**: 532-540
- Assoian RK (2002) Common sense signalling. *Nat Cell Biol* **4**: E187-188
- Atienza JM, Suh M, Xenarios I, Landgraf R, Colicelli J (2000) Human ERK1 induces filamentous growth and cell wall remodeling pathways in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **275**: 20638-20646
- Avdi NJ, Malcolm KC, Nick JA, Worthen GS (2002) A role for protein phosphatase-2A in p38 mitogen-activated protein kinase-mediated regulation of the c-Jun NH(2)-terminal kinase pathway in human neutrophils. *J Biol Chem* **277**: 40687-40696
- Avizienyte E, Brunton VG, Fincham VJ, Frame MC (2005) The SRC-induced mesenchymal state in late-stage colon cancer cells. *Cells, tissues, organs* **179**: 73-80
- Avruch J, Khokhlatchev A, Kyriakis JM, Luo Z, Tzivion G, Vavvas D, Zhang XF (2001) Ras activation of the Raf kinase: tyrosine kinase recruitment of the MAP kinase cascade. *Recent Prog Horm Res* **56**: 127-155
- Baccarini M (2005) Second nature: biological functions of the Raf-1 "kinase". *FEBS Lett* **579**: 3271-3277
- Badger AM, Cook MN, Lark MW, Newman-Tarr TM, Swift BA, Nelson AH, Barone FC, Kumar S (1998) SB 203580 inhibits p38 mitogen-activated protein kinase, nitric oxide production, and inducible nitric oxide synthase in bovine cartilage-derived chondrocytes. *J Immunol* **161**: 467-473
- Bagowski CP, Ferrell JE, Jr. (2001) Bistability in the JNK cascade. *Curr Biol* **11**: 1176-1182
- Baker SE, Lorenzen JA, Miller SW, Bunch TA, Jannuzi AL, Ginsberg MH, Perkins LA, Brower DL (2002) Genetic interaction between integrins and moleskin, a gene encoding a *Drosophila* homolog of importin-7. *Genetics* **162**: 285-296

- Balan V, Leicht DT, Zhu J, Balan K, Kaplun A, Singh-Gupta V, Qin J, Ruan H, Comb MJ, Tzivion G (2006) Identification of novel in vivo Raf-1 phosphorylation sites mediating positive feedback Raf-1 regulation by extracellular signal-regulated kinase. *Mol Biol Cell* **17**: 1141-1153
- Balla T (2005) Inositol-lipid binding motifs: signal integrators through protein-lipid and protein-protein interactions. *J Cell Sci* **118**: 2093-2104
- Balmano K, Cook SJ (1999) Sustained MAP kinase activation is required for the expression of cyclin D1, p21Cip1 and a subset of AP-1 proteins in CCL39 cells. *Oncogene* **18**: 3085-3097
- Bao MZ, Schwartz MA, Cantin GT, Yates JR, 3rd, Madhani HD (2004) Pheromone-dependent destruction of the Tec1 transcription factor is required for MAP kinase signaling specificity in yeast. *Cell* **119**: 991-1000
- Bardwell AJ, Abdollahi M, Bardwell L (2003) Docking sites on mitogen-activated protein kinase (MAPK) kinases, MAPK phosphatases and the Elk-1 transcription factor compete for MAPK binding and are crucial for enzymic activity. *Biochem J* **370**: 1077-1085
- Bardwell AJ, Flatauer LJ, Matsukuma K, Thorner J, Bardwell L (2001) A Conserved Docking Site in MEKs Mediates High-affinity Binding to MAP Kinases and Cooperates with a Scaffold Protein to Enhance Signal Transmission. *J Biol Chem* **276**: 10374-10386
- Bardwell L (2005) A walk-through of the yeast mating pheromone response pathway. *Peptides* **26**: 339-350
- Bardwell L, Cook JG, Chang EC, Cairns BR, Thorner J (1996) Signaling in the yeast pheromone response pathway: specific and high-affinity interaction of the mitogen-activated protein (MAP) kinases Kss1 and Fus3 with the upstream MAP kinase kinase Ste7. *Mol Cell Biol* **16**: 3637-3650
- Barsyte-Lovejoy D, Galanis A, Clancy A, Sharrocks AD (2004) ERK5 is targeted to myocyte enhancer factor 2A (MEF2A) through a MAPK docking motif. *Biochem J* **381**: 693-699
- Barsyte-Lovejoy D, Galanis A, Sharrocks AD (2002) Specificity determinants in MAPK signaling to transcription factors. *J Biol Chem* **277**: 9896-9903
- Bayliss R, Littlewood T, Stewart M (2000) Structural basis for the interaction between FxFG nucleoporin repeats and importin-beta in nuclear trafficking. *Cell* **102**: 99-108

Beardmore VA, Hinton HJ, Eftychi C, Apostolaki M, Armaka M, Darragh J, McIlrath J, Carr JM, Armit LJ, Clacher C, Malone L, Kollias G, Arthur JS (2005) Generation and characterization of p38beta (MAPK11) gene-targeted mice. *Mol Cell Biol* **25**: 10454-10464

Bednenko J, Cingolani G, Gerace L (2003) Importin beta contains a COOH-terminal nucleoporin binding region important for nuclear transport. *J Cell Biol* **162**: 391-401

Behr TM, Berova M, Doe CP, Ju H, Angermann CE, Boehm J, Willette RN (2003) p38 mitogen-activated protein kinase inhibitors for the treatment of chronic cardiovascular disease. *Curr Opin Investig Drugs* **4**: 1059-1064

Belanger LF, Roy S, Tremblay M, Brott B, Steff AM, Mourad W, Hugo P, Erikson R, Charron J (2003) Mek2 is dispensable for mouse growth and development. *Mol Cell Biol* **23**: 4778 - 4787

Bellon S, Fitzgibbon MJ, Fox T, Hsiao HM, Wilson KP (1999) The structure of phosphorylated p38gamma is monomeric and reveals a conserved activation-loop conformation. *Structure* **7**: 1057-1065

Ben-Levy R, Hooper S, Wilson R, Paterson HF, Marshall CJ (1998) Nuclear export of the stress-activated protein kinase p38 mediated by its substrate MAPKAP kinase-2. *Curr Biol* **8**: 1049-1057

Bennett BL, Satoh Y, Lewis AJ (2003) JNK: a new therapeutic target for diabetes. *Curr Opin Pharmacol* **3**: 420-425

Benzeno S, Lu F, Guo M, Barbash O, Zhang F, Herman JG, Klein PS, Rustgi A, Diehl JA (2006) Identification of mutations that disrupt phosphorylation-dependent nuclear export of cyclin D1. *Oncogene* **25**: 6291-6303

Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L (2007) *Biochemistry*, 6th edn. New York: W. H. Freeman.

Berra E, Milanini J, Richard DE, Le Gall M, Vinals F, Gothie E, Roux D, Pages G, Pouyssegur J (2000) Signaling angiogenesis via p42/p44 MAP kinase and hypoxia. *Biochem Pharmacol* **60**: 1171-1178

Besant PG, Tan E, Attwood PV (2003) Mammalian protein histidine kinases. *Int J Biochem Cell Biol* **35**: 297-309

Bhalla US (2004) Signaling in Small Subcellular Volumes. II. Stochastic and Diffusion Effects on Synaptic Network Properties. *Biophys J* **87**: 745-753

Bhalla US, Iyengar R (1999) Emergent properties of networks of biological signaling pathways. *Science* **283**: 381-387

Bhalla US, Ram PT, Iyengar R (2002) MAP Kinase Phosphatase As a Locus of Flexibility in a Mitogen-Activated Protein Kinase Signaling Network. *Science* **297**: 1018-1023

Bhattacharjya S, Xu P, Gingras R, Shaykhutdinov R, Wu C, Whiteway M, Ni F (2004) Solution structure of the dimeric SAM domain of MAPKKK Ste11 and its interactions with the adaptor protein Ste50 from the budding yeast: implications for Ste11 activation and signal transmission through the Ste50-Ste11 complex. *J Mol Biol* **344**: 1071-1087

Bhattacharyya RP, Remenyi A, Good MC, Bashor CJ, Falick AM, Lim WA (2006) The Ste5 scaffold allosterically modulates signaling output of the yeast mating pathway. *Science* **311**: 822-826

Bishopric NH, Andreka P, Slepak T, Webster KA (2001) Molecular mechanisms of apoptosis in the cardiac myocyte. *Curr Opin Pharmacol* **1**: 141-150

Blanc A, Pandey NR, Srivastava AK (2003) Synchronous activation of ERK 1/2, p38mapk and PKB/Akt signaling by H₂O₂ in vascular smooth muscle cells: potential involvement in vascular disease (review). *Int J Mol Med* **11**: 229-234

Blanco-Aparicio C, Torres J, Pulido R (1999) A novel regulatory mechanism of MAP kinases activation and nuclear translocation mediated by PKA and the PTP-SL tyrosine phosphatase. *J Cell Biol* **147**: 1129-1136

Blank JL, Gerwins P, Elliott EM, Sather S, Johnson GL (1996) Molecular cloning of mitogen-activated protein/ERK kinase kinases (MEKK) 2 and 3. Regulation of sequential phosphorylation pathways involving mitogen-activated protein kinase and c-Jun kinase. *J Biol Chem* **271**: 5361-5368

Bogoyevitch MA, Court NW (2004) Counting on mitogen-activated protein kinases--ERKs 3, 4, 5, 6, 7 and 8. *Cell Signal* **16**: 1345-1354

Bokoch GM (2003) Biology of the p21-activated kinases. *Annu Rev Biochem* **72**: 743-781

Bonnesen B, Orskov C, Rasmussen S, Holst PJ, Christensen JP, Eriksen KW (2005) MEK kinase 1 activity is required for definitive erythropoiesis in the mouse fetal liver. *Blood* **106**: 3396-3404

- Booth JW, Belanger KD, Sannella MI, Davis LI (1999) The yeast nucleoporin Nup2p is involved in nuclear export of importin alpha/Srp1p. *J Biol Chem* **274**: 32360-32367
- Bost F, Aouadi M, Caron L, Even P, Belmonte N, Prot M, Dani C, Hofman P, Pages G, Pouyssegur J, Le Marchand-Brustel Y, Binetruy B (2005) The Extracellular Signal-Regulated Kinase Isoform ERK1 Is Specifically Required for In Vitro and In Vivo Adipogenesis. *Diabetes* **54**: 402-411
- Bott CM, Thorneycroft SG, Marshall CJ (1994) The sevenmaker gain-of-function mutation in p42 MAP kinase leads to enhanced signalling and reduced sensitivity to dual specificity phosphatase action. *FEBS Lett* **352**: 201-205
- Boucher MJ, Jean D, Vezina A, Rivard N (2004) Dual role of MEK/ERK signaling in senescence and transformation of intestinal epithelial cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **286**: G736-746
- Boudeau J, Miranda-Saavedra D, Barton GJ, Alessi DR (2006) Emerging roles of pseudokinases. *Trends Cell Biol* **16**: 443-452
- Boudreau RT, Conrad DM, Hoskin DW (2006) Apoptosis induced by protein phosphatase 2A (PP2A) inhibition in T leukemia cells is negatively regulated by PP2A-associated p38 mitogen-activated protein kinase. *Cell Signal*
- Boulton TG, Cobb MH (1991) Identification of multiple extracellular signal-regulated kinases (ERKs) with antipeptide antibodies. *Cell Regul* **2**: 357-371
- Boulton TG, Nye SH, Robbins DJ, Ip NY, Radziejewska E, Morgenbesser SD, DePinho RA, Panayotatos N, Cobb MH, Yancopoulos GD (1991) ERKs: a family of protein-serine/threonine kinases that are activated and tyrosine phosphorylated in response to insulin and NGF. *Cell* **65**: 663-675
- Boulton TG, Yancopoulos GD, Gregory JS, Slaughter C, Moomaw C, Hsu J, Cobb MH (1990) An insulin-stimulated protein kinase similar to yeast kinases involved in cell cycle control. *Science* **249**: 64-67
- Bourcier C, Jacquelin A, Hess J, Peyrottes I, Angel P, Hofman P, Auberger P, Pouyssegur J, Pages G (2006) p44 mitogen-activated protein kinase (extracellular signal-regulated kinase 1)-dependent signaling contributes to epithelial skin carcinogenesis. *Cancer Res* **66**: 2700-2707

- Boutros M, Paricio N, Strutt DI, Mlodzik M (1998) Dishevelled Activates JNK and Discriminates between JNK Pathways in Planar Polarity and wingless Signaling. *Cell* **94**: 109-118
- Boyle WJ, van der Geer P, Hunter T (1991) Phosphopeptide mapping and phosphoamino acid analysis by two-dimensional separation on thin-layer cellulose plates. *Methods Enzymol* **201**: 110-149
- Bradham C, McClay DR (2006) p38 MAPK in development and cancer. *Cell Cycle* **5**: 824-828
- Brahma A, Dalby KN (2007) Regulation of protein phosphorylation within the MKK1-ERK2 complex by MP1 and the MP1*P14 heterodimer. *Archives of biochemistry and biophysics* **460**: 85-91
- Brancho D, Tanaka N, Jaeschke A, Ventura JJ, Kelkar N, Tanaka Y, Kyuuma M, Takeshita T, Flavell RA, Davis RJ (2003) Mechanism of p38 MAP kinase activation in vivo. *Genes Dev* **17**: 1969-1978
- Breitkreutz A, Boucher L, Tyers M (2001) MAPK specificity in the yeast pheromone response independent of transcriptional activation. *Curr Biol* **11**: 1266-1271
- Breitkreutz A, Tyers M (2002) MAPK signaling specificity: it takes two to tango. *Trends Cell Biol* **12**: 254-257
- Brennan JA, Volle DJ, Chaika OV, Lewis RE (2002) Phosphorylation regulates the nucleocytoplasmic distribution of kinase suppressor of Ras. *J Biol Chem* **277**: 5369-5377
- Brewster JL, de Valoir T, Dwyer ND, Winter E, Gustin MC (1993) An osmosensing signal transduction pathway in yeast. *Science* **259**: 1760-1763
- Brightman FA, Fell DA (2000) Differential feedback regulation of the MAPK cascade underlies the quantitative differences in EGF and NGF signalling in PC12 cells. *FEBS Lett* **482**: 169-174
- Brondello JM, Brunet A, Pouyssegur J, McKenzie FR (1997) The dual specificity mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 and -2 are induced by the p42/p44MAPK cascade. *J Biol Chem* **272**: 1368-1376
- Brondello JM, Pouyssegur J, McKenzie FR (1999) Reduced MAP kinase phosphatase-1 degradation after p42/p44MAPK-dependent phosphorylation. *Science* **286**: 2514-2517

- Bronisz A, Sharma SM, Hu R, Godlewski J, Tzivion G, Mansky KC, Ostrowski MC (2006) Microphthalmia-associated transcription factor interactions with 14-3-3 modulate differentiation of committed myeloid precursors. *Mol Biol Cell* **17**: 3897-3906
- Brott BK, Alessandrini A, Largaespada DA, Copeland NG, Jenkins NA, Crews CM, Erikson RL (1993) MEK2 is a kinase related to MEK1 and is differentially expressed in murine tissues. *Cell Growth Differ* **4**: 921-929
- Brott BK, Pinsky BA, Erikson RL (1998) Nlk is a murine protein kinase related to Erk/MAP kinases and localized in the nucleus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 963-968
- Brummer T, Naegele H, Reth M, Misawa Y (2003) Identification of novel ERK-mediated feedback phosphorylation sites at the C-terminus of B-Raf. *Oncogene* **22**: 8823-8834
- Brunet A, Bonni A, Zigmond MJ, Lin MZ, Juo P, Hu LS, Anderson MJ, Arden KC, Blenis J, Greenberg ME (1999a) Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell* **96**: 857-868
- Brunet A, Pages G, Pouyssegur J (1994) Constitutively active mutants of MAP kinase kinase (MEK1) induce growth factor-relaxation and oncogenicity when expressed in fibroblasts. *Oncogene* **9**: 3379-3387
- Brunet A, Pouyssegur J (1996) Identification of MAP kinase domains by redirecting stress signals into growth factor responses. *Science* **272**: 1652-1655
- Brunet A, Roux D, Lenormand P, Dowd S, Keyse S, Pouyssegur J (1999b) Nuclear translocation of p42/p44 mitogen-activated protein kinase is required for growth factor-induced gene expression and cell cycle entry. *Embo J* **18**: 664-674
- Brunner D, Oellers N, Szabad J, Biggs WH, 3rd, Zipursky SL, Hafen E (1994) A gain-of-function mutation in *Drosophila* MAP kinase activates multiple receptor tyrosine kinase signaling pathways. *Cell* **76**: 875-888
- Buckley CT, Sekiya F, Kim YJ, Rhee SG, Caldwell KK (2004) Identification of phospholipase C-gamma1 as a mitogen-activated protein kinase substrate. *J Biol Chem* **279**: 41807-41814
- Bueno OF, De Windt LJ, Tymitz KM, Witt SA, Kimball TR, Klevitsky R, Hewett TE, Jones SP, Lefer DJ, Peng CF, Kitsis RN, Molkenin JD (2000) The MEK1-ERK1/2 signaling pathway promotes compensated cardiac hypertrophy in transgenic mice. *Embo J* **19**: 6341-6350

Burack WR, Shaw AS (2005) Live Cell Imaging of ERK and MEK: simple binding equilibrium explains the regulated nucleocytoplasmic distribution of ERK. *J Biol Chem* **280**: 3832-3837

Burack WR, Sturgill TW (1997) The activating dual phosphorylation of MAPK by MEK is nonprocessive. *Biochemistry* **36**: 5929-5933

Burke B (2006) CELL BIOLOGY: Nuclear Pore Complex Models Gel. *Science* **314**: 766a-767

Buschbeck M, Eickhoff J, Sommer MN, Ullrich A (2002) Phosphotyrosine-specific Phosphatase PTP-SL Regulates the ERK5 Signaling Pathway. *J Biol Chem* **277**: 29503-29509

Buschbeck M, Ullrich A (2005) The Unique C-terminal Tail of the Mitogen-activated Protein Kinase ERK5 Regulates Its Activation and Nuclear Shuttling. *J Biol Chem* **280**: 2659-2667

Caffrey DR, O'Neill LA, Shields DC (1999) The evolution of the MAP kinase pathways: coduplication of interacting proteins leads to new signaling cascades. *J Mol Evol* **49**: 567-582

Cairns BR, Ramer SW, Kornberg RD (1992) Order of action of components in the yeast pheromone response pathway revealed with a dominant allele of the STE11 kinase and the multiple phosphorylation of the STE7 kinase. *Genes Dev* **6**: 1305

Caldwell KK, Sosa M, Buckley CT (2006) Identification of mitogen-activated protein kinase docking sites in enzymes that metabolize phosphatidylinositols and inositol phosphates. *Cell Commun Signal* **4**: 2

Callaway K, Rainey MA, Dalby KN (2005) Quantifying ERK2-protein interactions by fluorescence anisotropy: PEA-15 inhibits ERK2 by blocking the binding of DEJL domains. *Biochim Biophys Acta* **1754**: 316-323

Camps M, Nichols A, Gillieron C, Antonsson B, Muda M, Chabert C, Boschert U, Arkinstall S (1998) Catalytic Activation of the Phosphatase MKP-3 by ERK2 Mitogen-Activated Protein Kinase. *Science* **280**: 1262-1265

Canagarajah BJ, Khokhlatchev A, Cobb MH, Goldsmith EJ (1997) Activation mechanism of the MAP kinase ERK2 by dual phosphorylation. *Cell* **90**: 859-869

Casar B, Sanz-Moreno V, Yazicioglu MN, Rodriguez J, Berciano MT, Lafarga M, Cobb MH, Crespo P (2007a) Mxi2 promotes stimulus-independent ERK nuclear translocation. *Embo J*

Casar B, Sanz-Moreno V, Yazicioglu MN, Rodriguez J, Berciano MT, Lafarga M, Cobb MH, Crespo P (2007b) Mxi2 promotes stimulus-independent ERK nuclear translocation. *Embo J* **26**: 635-646

Casillas AM, Amaral K, Chegini-Farahani S, Nel AE (1993) Okadaic acid activates p42 mitogen-activated protein kinase (MAP kinase; ERK-2) in B-lymphocytes but inhibits rather than augments cellular proliferation: contrast with phorbol 12-myristate 13-acetate. *Biochem J* **290** (Pt 2): 545-550

Catling AD, Reuter CW, Cox ME, Parsons SJ, Weber MJ (1994) Partial purification of a mitogen-activated protein kinase kinase activator from bovine brain. Identification as B-Raf or a B-Raf-associated activity. *J Biol Chem* **269**: 30014-30021

Catling AD, Schaeffer HJ, Reuter CW, Reddy GR, Weber MJ (1995) A proline-rich sequence unique to MEK1 and MEK2 is required for raf binding and regulates MEK function. *Mol Cell Biol* **15**: 5214-5225

Cavigelli M, Dolfi F, Claret FX, Karin M (1995) Induction of c-fos expression through JNK-mediated TCF/Elk-1 phosphorylation. *Embo J* **14**: 5957-5964

Cha H, Shapiro P (2001) Tyrosine-phosphorylated extracellular signal--regulated kinase associates with the Golgi complex during G2/M phase of the cell cycle: evidence for regulation of Golgi structure. *J Cell Biol* **153**: 1355-1367

Chambard J-C, Lefloch R, Pouyssegur J, Lenormand P (2006) ERK implication in cell cycle regulation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* **Sous presse**

Chang CI, Xu BE, Akella R, Cobb MH, Goldsmith EJ (2002) Crystal structures of MAP kinase p38 complexed to the docking sites on its nuclear substrate MEF2A and activator MKK3b. *Mol Cell* **9**: 1241-1249

Chang L, Kamata H, Solinas G, Luo J-L, Maeda S, Venuprasad K, Liu Y-C, Karin M (2006) The E3 Ubiquitin Ligase Itch Couples JNK Activation to TNF[alpha]-induced Cell Death by Inducing c-FLIPL Turnover. *Cell* **124**: 601-613

Chang L, Karin M (2001) Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature* **410**: 37-40

Chao T-H, Hayashi M, Tapping RI, Kato Y, Lee J-D (1999) MEKK3 Directly Regulates MEK5 Activity as Part of the Big Mitogen-activated Protein Kinase 1 (BMK1) Signaling Pathway. *Journal of Biological Chemistry* **274**: 36035-36038

Charron F, Tsimiklis G, Arcand M, Robitaille L, Liang Q, Molkenin JD, Meloche S, Nemer M (2001) Tissue-specific GATA factors are transcriptional effectors of the small GTPase RhoA. *Genes Dev* **15**: 2702-2719

Chatterjee D, Bai Y, Wang Z, Beach S, Mott S, Roy R, Braastad C, Sun Y, Mukhopadhyay A, Aggarwal BB, Darnowski J, Pantazis P, Wyche J, Fu Z, Kitagwa Y, Keller ET, Sedivy JM, Yeung KC (2004) RKIP sensitizes prostate and breast cancer cells to drug-induced apoptosis. *J Biol Chem* **279**: 17515-17523

Chen CH, Wang WJ, Kuo JC, Tsai HC, Lin JR, Chang ZF, Chen RH (2005a) Bidirectional signals transduced by DAPK-ERK interaction promote the apoptotic effect of DAPK. *Embo J* **24**: 294-304

Chen J-R, Plotkin LI, Aguirre JI, Han L, Jilka RL, Kousteni S, Bellido T, Manolagas SC (2005b) Transient Versus Sustained Phosphorylation and Nuclear Accumulation of ERKs Underlie Anti-Versus Pro-apoptotic Effects of Estrogens. *J Biol Chem* **280**: 4632-4638

Chen Q, Konopka JB (1996) Regulation of the G-protein-coupled alpha-factor pheromone receptor by phosphorylation. *Mol Cell Biol* **16**: 247-257

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

Chen Z, Gibson TB, Robinson F, Silvestro L, Pearson G, Xu B, Wright A, Vanderbilt C, Cobb MH (2001) MAP kinases. *Chem Rev* **101**: 2449-2476

Chen Z, Hutchison M, Cobb MH (1999) Isolation of the protein kinase TAO2 and identification of its mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase binding domain. *J Biol Chem* **274**: 28803-28807

Cheng HL, Feldman EL (1998) Bidirectional regulation of p38 kinase and c-Jun N-terminal protein kinase by insulin-like growth factor-I. *J Biol Chem* **273**: 14560-14565

Cheng J, Yang J, Xia Y, Karin M, Su B (2000) Synergistic interaction of MEK kinase 2, c-Jun N-terminal kinase (JNK) kinase 2, and JNK1 results in efficient and specific JNK1 activation. *Mol Cell Biol* **20**: 2334-2342

Cheng M, Boulton TG, Cobb MH (1996) ERK3 is a constitutively nuclear protein kinase. *J Biol Chem* **271**: 8951-8958

Cheng Z, Gilmore R (2006) Slow translocon gating causes cytosolic exposure of transmembrane and luminal domains during membrane protein integration. *Nat Struct Mol Biol* **13**: 930-936

Chi H, Sarkisian MR, Rakic P, Flavell RA (2005) Loss of mitogen-activated protein kinase kinase kinase 4 (MEKK4) results in enhanced apoptosis and defective neural tube development. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 3846-3851

Chiariello M, Marinissen MJ, Gutkind JS (2000) Multiple mitogen-activated protein kinase signaling pathways connect the cot oncoprotein to the c-jun promoter and to cellular transformation. *Mol Cell Biol* **20**: 1747-1758

Cho W (2006) Building signaling complexes at the membrane. *Sci STKE* **2006**: pe7

Cho W, Stahelin RV (2005) Membrane-protein interactions in cell signaling and membrane trafficking. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **34**: 119-151

Choi K-Y, Kranz JE, Mahanty SK, Park K-S, Elion EA (1999) Characterization of Fus3 Localization: Active Fus3 Localizes in Complexes of Varying Size and Specific Activity. *Mol Biol Cell* **10**: 1553-1568

Choi KW, Benzer S (1994) Rotation of photoreceptor clusters in the developing *Drosophila* eye requires the nemo gene. *Cell* **78**: 125-136

Chong H, Lee J, Guan KL (2001) Positive and negative regulation of Raf kinase activity and function by phosphorylation. *Embo J* **20**: 3716-3727

Chong H, Vikis HG, Guan K-L (2003) Mechanisms of regulating the Raf kinase family. *Cell Signal* **15**: 463-469

Chou FL, Hill JM, Hsieh JC, Pouyssegur J, Brunet A, Glading A, Uberall F, Ramos JW, Werner MH, Ginsberg MH (2003) PEA-15 binding to ERK1/2 MAPKs is required for its modulation of integrin activation. *J Biol Chem* **278**: 52587-52597

Chou S, Lane S, Liu H (2006) Regulation of mating and filamentation genes by two distinct Ste12 complexes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **26**: 4794-4805

Choukroun G, Hajjar R, Kyriakis JM, Bonventre JV, Rosenzweig A, Force T (1998) Role of the stress-activated protein kinases in endothelin-induced cardiomyocyte hypertrophy. *J Clin Invest* **102**: 1311-1320

Christerson LB, Vanderbilt CA, Cobb MH (1999) MEKK1 interacts with alpha-actinin and localizes to stress fibers and focal adhesions. *Cell motility and the cytoskeleton* **43**: 186-198

Christophe D, Christophe-Hobertus C, Pichon B (2000) Nuclear targeting of proteins: how many different signals? *Cell Signal* **12**: 337-341

Clark AR, Dean JL, Saklatvala J (2003) Post-transcriptional regulation of gene expression by mitogen-activated protein kinase p38. *FEBS Lett* **546**: 37-44

Clark-Lewis I, Sanghera JS, Pelech SL (1991) Definition of a consensus sequence for peptide substrate recognition by p44mpk, the meiosis-activated myelin basic protein kinase. *J Biol Chem* **266**: 15180-15184

Clerk A, Sugden PH (2006) Inflammation my heart (by p38-MAPK). *Circ Res* **99**: 455-458

Cobb MH, Goldsmith EJ (2000) Dimerization in MAP-kinase signaling. *Trends Biochem Sci* **25**: 7-9

Cohen P (1982) The role of protein phosphorylation in neural and hormonal control of cellular activity. *Nature* **296**: 613-620

Cohen-Armon M, Visochek L, Rozensal D, Kalal A, Geistrikh I, Klein R, Bendetz-Nezer S, Yao Z, Seger R (2007) DNA-Independent PARP-1 Activation by Phosphorylated ERK2 Increases Elk1 Activity: A Link to Histone Acetylation. *Mol Cell* **25**: 297-308

Colanzi A, Deerinck TJ, Ellisman MH, Malhotra V (2000) A specific activation of the mitogen-activated protein kinase kinase 1 (MEK1) is required for Golgi fragmentation during mitosis. *J Cell Biol* **149**: 331-339

Colanzi A, Suetterlin C, Malhotra V (2003a) Cell-cycle-specific Golgi fragmentation: how and why? *Curr Opin Cell Biol* **15**: 462-467

Colanzi A, Sutterlin C, Malhotra V (2003b) RAF1-activated MEK1 is found on the Golgi apparatus in late prophase and is required for Golgi complex fragmentation in mitosis. *J Cell Biol* **161**: 27-32

Coles LC, Shaw PE (2002) PAK1 primes MEK1 for phosphorylation by Raf-1 kinase during cross-cascade activation of the ERK pathway. *Oncogene* **21**: 2236-2244

Collis SJ, DeWeese TL, Jeggo PA, Parker AR (2005) The life and death of DNA-PK. *Oncogene* **24**: 949-961

Colucci-D'Amato L, Perrone-Capano C, di Porzio U (2003) Chronic activation of ERK and neurodegenerative diseases. *Bioessays* **25**: 1085-1095

Conte D, Curcio MJ (2000) Fus3 controls Ty1 transpositional dormancy through the invasive growth MAPK pathway. *Mol Microbiol* **35**: 415

Conze D, Krahl T, Kennedy N, Weiss L, Lumsden J, Hess P, Flavell RA, Le Gros G, Davis RJ, Rincon M (2002) c-Jun NH(2)-terminal kinase (JNK)1 and JNK2 have distinct roles in CD8(+) T cell activation. *J Exp Med* **195**: 811-823

Cook JG, Bardwell L, Kron SJ, Thorner J (1996) Two novel targets of the MAP kinase Kss1 are negative regulators of invasive growth in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev* **10**: 2831

Cook JG, Bardwell L, Thorner J (1997) Inhibitory and activating functions for MAPK Kss1 in the *S. cerevisiae* filamentous-growth signalling pathway. *Nature* **390**: 85

Cook SJ, McCormick F (1996) Kinetic and biochemical correlation between sustained p44ERK1 (44 kDa extracellular signal-regulated kinase 1) activation and lysophosphatidic acid-stimulated DNA synthesis in Rat-1 cells. *Biochem J* **320** (Pt 1): 237-245

Cooper JA (1989) Related proteins are phosphorylated at tyrosine in response to mitogenic stimuli and at meiosis. *Mol Cell Biol* **9**: 3143-3147

Cooper JA, Bowen-Pope DF, Raines E, Ross R, Hunter T (1982) Similar effects of platelet-derived growth factor and epidermal growth factor on the phosphorylation of tyrosine in cellular proteins. *Cell* **31**: 263-273

Cooper JA, Hunter T (1981a) Changes in protein phosphorylation in Rous sarcoma virus-transformed chicken embryo cells. *Mol Cell Biol* **1**: 165-178

Cooper JA, Hunter T (1981b) Similarities and differences between the effects of epidermal growth factor and Rous sarcoma virus. *J Cell Biol* **91**: 878-883

Cooper JA, Hunter T (1983) Identification and characterization of cellular targets for tyrosine protein kinases. *J Biol Chem* **258**: 1108-1115

Corbit KC, Trakul N, Eves EM, Diaz B, Marshall M, Rosner MR (2003) Activation of Raf-1 signaling by protein kinase C through a mechanism involving Raf kinase inhibitory protein. *J Biol Chem* **278**: 13061-13068

Corson LB, Yamanaka Y, Lai KM, Rossant J (2003) Spatial and temporal patterns of ERK signaling during mouse embryogenesis. *Development* **130**: 4527-4537

Costa M, Marchi M, Cardarelli F, Roy A, Beltram F, Maffei L, Ratto GM (2006) Dynamic regulation of ERK2 nuclear translocation and mobility in living cells. *J Cell Sci* **119**: 4952-4963

Coulombe P, Meloche S (2002) Dual-tag prokaryotic vectors for enhanced expression of full-length recombinant proteins. *Anal Biochem* **310**: 219-222

Coulombe P, Meloche S (2006) Atypical mitogen-activated protein kinases: Structure, regulation and functions. *Biochim Biophys Acta* **Sous presse**

Coulombe P, Rodier G, Bonneil E, Thibault P, Meloche S (2004) N-Terminal ubiquitination of extracellular signal-regulated kinase 3 and p21 directs their degradation by the proteasome. *Mol Cell Biol* **24**: 6140-6150

Coulombe P, Rodier G, Pelletier S, Pellerin J, Meloche S (2003) Rapid turnover of extracellular signal-regulated kinase 3 by the ubiquitin-proteasome pathway defines a novel paradigm of mitogen-activated protein kinase regulation during cellular differentiation. *Mol Cell Biol* **23**: 4542-4558

Courchesne WE, Kunisawa R, Thorner J (1989) A putative protein kinase overcomes pheromone-induced arrest of cell cycling in *S. cerevisiae*. *Cell* **58**: 1107-1119

Cowley S, Paterson H, Kemp P, Marshall CJ (1994) Activation of MAP kinase kinase is necessary and sufficient for PC12 differentiation and for transformation of NIH 3T3 cells. *Cell* **77**: 841-852

Craxton A, Shu G, Graves JD, Saklatvala J, Krebs EG, Clark EA (1998) p38 MAPK is required for CD40-induced gene expression and proliferation in B lymphocytes. *J Immunol* **161**: 3225-3236

Crews CM, Alessandrini A, Erikson RL (1992) The primary structure of MEK, a protein kinase that phosphorylates the ERK gene product. *Science* **258**: 478-480

Cronshaw JM, Krutchinsky AN, Zhang W, Chait BT, Matunis MJ (2002) Proteomic analysis of the mammalian nuclear pore complex. *J Cell Biol* **158**: 915-927

Crowe DL (2004) Induction of p97MAPK expression regulates collagen mediated inhibition of proliferation and migration in human squamous cell carcinoma lines. *International journal of oncology* **24**: 1159-1163

Cuenda A, Dorow DS (1998) Differential activation of stress-activated protein kinase kinases SKK4/MKK7 and SKK1/MKK4 by the mixed-lineage kinase-2 and mitogen-activated protein kinase kinase (MKK) kinase-1. *Biochem J* **333** (Pt 1): 11-15

Da Silva J, Pierrat B, Mary JL, Lesslauer W (1997) Blockade of p38 mitogen-activated protein kinase pathway inhibits inducible nitric-oxide synthase expression in mouse astrocytes. *J Biol Chem* **272**: 28373-28380

Daksis JI, Lu RY, Facchini LM, Marhin WW, Penn LJ (1994) Myc induces cyclin D1 expression in the absence of de novo protein synthesis and links mitogen-stimulated signal transduction to the cell cycle. *Oncogene* **9**: 3635-3645

Dang A, Frost JA, Cobb MH (1998) The MEK1 proline-rich insert is required for efficient activation of the mitogen-activated protein kinases ERK1 and ERK2 in mammalian cells. *J Biol Chem* **273**: 19909-19913

Dangi S, Chen FM, Shapiro P (2006) Activation of extracellular signal-regulated kinase (ERK) in G2 phase delays mitotic entry through p21CIP1. *Cell proliferation* **39**: 261-279

Daniel TO, Tremble PM, Frackelton AR, Jr., Williams LT (1985) Purification of the platelet-derived growth factor receptor by using an anti-phosphotyrosine antibody. *Proc Natl Acad Sci U S A* **82**: 2684-2687

Daniels MA, Teixeira E, Gill J, Hausmann B, Roubaty D, Holmberg K, Werlen G, Hollander GA, Gascoigne NR, Palmer E (2006) Thymic selection threshold defined by compartmentalization of Ras/MAPK signalling. *Nature* **444**: 724-729

Dard N, Peter M (2006) Scaffold proteins in MAP kinase signaling: more than simple passive activating platforms. *Bioessays* **28**: 146-156

Darnell JE, Lodish HF, Baltimore D (1990) *Molecular cell biology*, 2nd edn. New York, N.Y.: Scientific American Books : Distributed by W.H. Freeman.

Davis RJ (2000) Signal transduction by the JNK group of MAP kinases. *Cell* **103**: 239-252

- Davis S, Laroche S (2006) Mitogen-activated protein kinase/extracellular regulated kinase signalling and memory stabilization: a review. *Genes, brain, and behavior* **5 Suppl 2**: 61-72
- De Nadal E, Zapater M, Alepuz PM, Sumoy L, Mas G, Posas F (2004) The MAPK Hog1 recruits Rpd3 histone deacetylase to activate osmoresponsive genes. *Nature* **427**: 370
- de Vries-Smits AM, Burgering BM, Leever SJ, Marshall CJ, Bos JL (1992) Involvement of p21ras in activation of extracellular signal-regulated kinase 2. *Nature* **357**: 602-604
- DeFea KA, Zalevsky J, Thoma MS, Dery O, Mullins RD, Bunnett NW (2000) beta-arrestin-dependent endocytosis of proteinase-activated receptor 2 is required for intracellular targeting of activated ERK1/2. *J Cell Biol* **148**: 1267-1281
- Dent P, Haser W, Haystead TA, Vincent LA, Roberts TM, Sturgill TW (1992) Activation of mitogen-activated protein kinase kinase by v-Raf in NIH 3T3 cells and in vitro. *Science* **257**: 1404-1407
- Denu JM, Dixon JE (1998) Protein tyrosine phosphatases: mechanisms of catalysis and regulation. *Current Opinion in Chemical Biology* **2**: 633-641
- Depeille PE, Ding Y, Bromberg-White JL, Duesbery NS (2007) MKK signaling and vascularization. *Oncogene* **26**: 1290-1296
- Derijard B, Hibi M, Wu IH, Barrett T, Su B, Deng T, Karin M, Davis RJ (1994) JNK1: a protein kinase stimulated by UV light and Ha-Ras that binds and phosphorylates the c-Jun activation domain. *Cell* **76**: 1025-1037
- Derijard B, Raingeaud J, Barrett T, Wu IH, Han J, Ulevitch RJ, Davis RJ (1995) Independent human MAP-kinase signal transduction pathways defined by MEK and MKK isoforms. *Science* **267**: 682-685
- Descamps S, Prigent C (2001) Two mammalian mitotic aurora kinases: who's who? *Sci STKE* **2001**: PE1
- Dhillon AS, Meikle S, Yazici Z, Eulitz M, Kolch W (2002) Regulation of Raf-1 activation and signalling by dephosphorylation. *Embo J* **21**: 64-71
- Di Fiore PP, Gill GN (1999) Endocytosis and mitogenic signaling. *Curr Opin Cell Biol* **11**: 483-488

- Diehl JA, Zindy F, Sherr CJ (1997) Inhibition of cyclin D1 phosphorylation on threonine-286 prevents its rapid degradation via the ubiquitin-proteasome pathway. *Genes Dev* **11**: 957-972
- Diella F, Cameron S, Gemund C, Linding R, Via A, Kuster B, Sicheritz-Ponten T, Blom N, Gibson TJ (2004) Phospho.ELM: a database of experimentally verified phosphorylation sites in eukaryotic proteins. *BMC bioinformatics* **5**: 79
- Dikic I, Schlessinger J, Lax I (1994) PC12 cells overexpressing the insulin receptor undergo insulin-dependent neuronal differentiation. *Curr Biol* **4**: 702-708
- Dimitri CA, Dowdle W, MacKeigan JP, Blenis J, Murphy LO (2005) Spatially separate docking sites on ERK2 regulate distinct signaling events in vivo. *Curr Biol* **15**: 1319-1324
- Dobrowolski S, Harter M, Stacey DW (1994) Cellular ras activity is required for passage through multiple points of the G0/G1 phase in BALB/c 3T3 cells. *Mol Cell Biol* **14**: 5441-5449
- Dominguez C, Powers DA, Tamayo N (2005) p38 MAP kinase inhibitors: many are made, but few are chosen. *Curr Opin Drug Discov Devel* **8**: 421-430
- Dong C, Yang DD, Tournier C, Whitmarsh AJ, Xu J, Davis RJ, Flavell RA (2000) JNK is required for effector T-cell function but not for T-cell activation. *Nature* **405**: 91-94
- Dong C, Yang DD, Wysk M, Whitmarsh AJ, Davis RJ, Flavell RA (1998) Defective T Cell Differentiation in the Absence of Jnk1. *Science* **282**: 2092-2095
- Dougherty MK, Muller J, Ritt DA, Zhou M, Zhou XZ, Copeland TD, Conrads TP, Veenstra TD, Lu KP, Morrison DK (2005) Regulation of raf-1 by direct feedback phosphorylation. *Mol Cell* **17**: 215-224
- Dufresne SD, Bjorbaek C, El-Haschimi K, Zhao Y, Aschenbach WG, Moller DE, Goodyear LJ (2001) Altered extracellular signal-regulated kinase signaling and glycogen metabolism in skeletal muscle from p90 ribosomal S6 kinase 2 knockout mice. *Mol Cell Biol* **21**: 81-87
- Duverger E, Carpentier V, Roche AC, Monsigny M (1993) Sugar-dependent nuclear import of glycoconjugates from the cytosol. *Exp Cell Res* **207**: 197-201
- Duverger E, Pellerin-Mendes C, Mayer R, Roche AC, Monsigny M (1995) Nuclear import of glycoconjugates is distinct from the classical NLS pathway. *J Cell Sci* **108 (Pt 4)**: 1325-1332

Duverger E, Roche AC, Monsigny M (1996) N-acetylglucosamine-dependent nuclear import of neoglycoproteins. *Glycobiology* **6**: 381-386

Dwivedi Y, Rizavi HS, Conley RR, Pandey GN (2006) ERK MAP kinase signaling in post-mortem brain of suicide subjects: differential regulation of upstream Raf kinases Raf-1 and B-Raf. *Molecular psychiatry* **11**: 86-98

Dwivedi Y, Rizavi HS, Roberts RC, Conley RC, Tamminga CA, Pandey GN (2001) Reduced activation and expression of ERK1/2 MAP kinase in the post-mortem brain of depressed suicide subjects. *Journal of neurochemistry* **77**: 916-928

Ebisuya M, Kondoh K, Nishida E (2005) The duration, magnitude and compartmentalization of ERK MAP kinase activity: mechanisms for providing signaling specificity. *J Cell Sci* **118**: 2997-3002

Eblen ST, Slack JK, Weber MJ, Catling AD (2002) Rac-PAK signaling stimulates extracellular signal-regulated kinase (ERK) activation by regulating formation of MEK1-ERK complexes. *Mol Cell Biol* **22**: 6023-6033

Eblen ST, Slack-Davis JK, Tarcsafalvi A, Parsons JT, Weber MJ, Catling AD (2004) Mitogen-activated protein kinase feedback phosphorylation regulates MEK1 complex formation and activation during cellular adhesion. *Mol Cell Biol* **24**: 2308-2317

Eckhart W, Hutchinson MA, Hunter T (1979) An activity phosphorylating tyrosine in polyoma T antigen immunoprecipitates. *Cell* **18**: 925-933

Edmunds JW, Mahadevan LC (2004) MAP kinases as structural adaptors and enzymatic activators in transcription complexes. *J Cell Sci* **117**: 3715-3723

Edmunds JW, Mahadevan LC (2006) Cell signaling. Protein kinases seek close encounters with active genes. *Science* **313**: 449-451

Efimova T, Broome AM, Eckert RL (2003) A regulatory role for p38 delta MAPK in keratinocyte differentiation. Evidence for p38 delta-ERK1/2 complex formation. *J Biol Chem* **278**: 34277-34285

Einat H, Manji HK, Gould TD, Du J, Chen G (2003) Possible involvement of the ERK signaling cascade in bipolar disorder: behavioral leads from the study of mutant mice. *Drug News Perspect* **16**: 453-463

- Elion EA (2000) Pheromone response, mating and cell biology. *Curr Opin Microbiol* **3**: 573-581
- Elion EA (2001) The Ste5p scaffold. *J Cell Sci* **114**: 3967-3978
- Elion EA, Brill JA, Fink GR (1991) Functional redundancy in the yeast cell cycle: FUS3 and KSS1 have both overlapping and unique functions. *Cold Spring Harbor Symp Quant Biol* **56**: 41
- Elion EA, Grisafi PL, Fink GR (1990) FUS3 encodes a cdc2+/CDC28-related kinase required for the transition from mitosis into conjugation. *Cell* **60**: 649-664
- Engbrecht J (2003) Cell signaling in yeast sporulation. *Biochem Biophys Res Commun* **306**: 325-328
- English JM, Pearson G, Baer R, Cobb MH (1998) Identification of substrates and regulators of the mitogen-activated protein kinase ERK5 using chimeric protein kinases. *J Biol Chem* **273**: 3854-3860
- English JM, Vanderbilt CA, Xu S, Marcus S, Cobb MH (1995) Isolation of MEK5 and differential expression of alternatively spliced forms. *J Biol Chem* **270**: 28897-28902
- Enslin H, Raingeaud J, Davis RJ (1998) Selective activation of p38 mitogen-activated protein (MAP) kinase isoforms by the MAP kinase kinases MKK3 and MKK6. *J Biol Chem* **273**: 1741-1748
- Errede B, Ge QY (1996) Feedback regulation of map kinase signal pathways. *Philos Trans R Soc London Ser B*
- Esparis-Ogando A, Diaz-Rodriguez E, Montero JC, Yuste L, Crespo P, Pandiella A (2002) Erk5 participates in neuregulin signal transduction and is constitutively active in breast cancer cells overexpressing ErbB2. *Mol Cell Biol* **22**: 270-285
- Eves EM, Shapiro P, Naik K, Klein UR, Trakul N, Rosner MR (2006) Raf kinase inhibitory protein regulates aurora B kinase and the spindle checkpoint. *Mol Cell* **23**: 561-574
- Faccio L, Chen A, Fusco C, Martinotti S, Bonventre JV, Zervos AS (2000) Mxi2, a splice variant of p38 stress-activated kinase, is a distal nephron protein regulated with kidney ischemia. *American journal of physiology* **278**: C781-790
- Fahrenkrog B, Koser J, Aebi U (2004) The nuclear pore complex: a jack of all trades? *Trends in Biochemical Sciences* **29**: 175-182

- Fan G, Merritt SE, Kortenjann M, Shaw PE, Holzman LB (1996) Dual leucine zipper-bearing kinase (DLK) activates p46SAPK and p38mapk but not ERK2. *J Biol Chem* **271**: 24788-24793
- Fantz DA, Jacobs D, Glossip D, Kornfeld K (2001) Docking sites on substrate proteins direct extracellular signal-regulated kinase to phosphorylate specific residues. *J Biol Chem* **276**: 27256-27265
- Farooq A, Chaturvedi G, Mujtaba S, Plotnikova O, Zeng L, Dhalluin C, Ashton R, Zhou M-M (2001) Solution Structure of ERK2 Binding Domain of MAPK Phosphatase MKP-3: Structural Insights into MKP-3 Activation by ERK2. *Molecular Cell* **7**: 387-399
- Farooq A, Plotnikova O, Chaturvedi G, Yan S, Zeng L, Zhang Q, Zhou M-M (2003) Solution Structure of the MAPK Phosphatase PAC-1 Catalytic Domain: Insights into Substrate-Induced Enzymatic Activation of MKP. *Structure* **11**: 155-164
- Farooq A, Zhou MM (2004) Structure and regulation of MAPK phosphatases. *Cell Signal* **16**: 769-779
- Faustino RS, Rousseau DC, Landry MN, Kostenuk AL, Pierce GN (2006) Effects of mitogen-activated protein kinases on nuclear protein import. *Can J Physiol Pharmacol* **84**: 469-475
- Feldherr C, Akin D, Littlewood T, Stewart M (2002) The molecular mechanism of translocation through the nuclear pore complex is highly conserved. *J Cell Sci* **115**: 2997-3005
- Ferguson SM, Fasano S, Yang P, Brambilla R, Robinson TE (2006) Knockout of ERK1 enhances cocaine-evoked immediate early gene expression and behavioral plasticity. *Neuropsychopharmacology* **31**: 2660-2668
- Ferrell JE, Jr. (2002) Self-perpetuating states in signal transduction: positive feedback, double-negative feedback and bistability. *Curr Opin Cell Biol* **14**: 140-148
- Ferrell JE, Jr., Machleder EM (1998) The Biochemical Basis of an All-or-None Cell Fate Switch in Xenopus Oocytes. *Science* **280**: 895-898
- Ferrigno P, Posas F, Koepp D, Saito H, Silver PA (1998) Regulated nucleo/cytoplasmic exchange of HOG1 MAPK requires the importin beta homologs NMD5 and XPO1. *Embo J* **17**: 5606-5614

- Finney RE, Robbins SM, Bishop JM (1993) Association of pRas and pRaf-1 in a complex correlates with activation of a signal transduction pathway. *Curr Biol* **3**: 805-812
- Fischer AM, Katayama CD, Pages G, Pouyssegur J, Hedrick SM (2005) The role of Erk1 and Erk2 in multiple stages of T cell development. *Immunity* **23**: 431 - 443
- Fischer EH, Krebs EG (1955) Conversion of phosphorylase b to phosphorylase a in muscle extracts. *J Biol Chem* **216**: 121-132
- Flatauer LJ, Zadeh SF, Bardwell L (2005) Mitogen-activated protein kinases with distinct requirements for Ste5 scaffolding influence signaling specificity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **25**: 1793-1803
- Fleming Y, Armstrong CG, Morrice N, Paterson A, Goedert M, Cohen P (2000) Synergistic activation of stress-activated protein kinase 1/c-Jun N-terminal kinase (SAPK1/JNK) isoforms by mitogen-activated protein kinase kinase 4 (MKK4) and MKK7. *Biochem J* **352 Pt 1**: 145-154
- Flotho C, Kratz C, Niemeyer CM (2007) Targeting RAS signaling pathways in juvenile myelomonocytic leukemia. *Curr Drug Targets* **8**: 715-725
- Foltz IN, Lee JC, Young PR, Schrader JW (1997) Hemopoietic growth factors with the exception of interleukin-4 activate the p38 mitogen-activated protein kinase pathway. *J Biol Chem* **272**: 3296-3301
- Formstecher E, Ramos JW, Fauquet M, Calderwood DA, Hsieh JC, Canton B, Nguyen XT, Barnier JV, Camonis J, Ginsberg MH, Chneiweiss H (2001) PEA-15 mediates cytoplasmic sequestration of ERK MAP kinase. *Developmental cell* **1**: 239-250
- Francis SH, Corbin JD (1994) Structure and function of cyclic nucleotide-dependent protein kinases. *Annu Rev Physiol* **56**: 237-272
- Freshney NW, Rawlinson L, Guesdon F, Jones E, Cowley S, Hsuan J, Saklatvala J (1994) Interleukin-1 activates a novel protein kinase cascade that results in the phosphorylation of Hsp27. *Cell* **78**: 1039-1049
- Frey S, Richter RP, Gorlich D (2006) FG-Rich Repeats of Nuclear Pore Proteins Form a Three-Dimensional Meshwork with Hydrogel-Like Properties. *Science* **314**: 815-817
- Fried H, Kutay U (2003) Nucleocytoplasmic transport: taking an inventory. *Cell Mol Life Sci* **60**: 1659-1688

Friesen H, Lunz R, Doyle S, Segall J (1994) Mutation of the SPS1-encoded protein kinase of *Saccharomyces cerevisiae* leads to defects in transcription and morphology during spore formation. *Genes Dev* **8**: 2162-2175

Fu Z, Smith PC, Zhang L, Rubin MA, Dunn RL, Yao Z, Keller ET (2003) Effects of raf kinase inhibitor protein expression on suppression of prostate cancer metastasis. *J Natl Cancer Inst* **95**: 878-889

Fujioka A, Terai K, Itoh RE, Aoki K, Nakamura T, Kuroda S, Nishida E, Matsuda M (2006) Dynamics of the Ras/ERK MAPK Cascade as Monitored by Fluorescent Probes. *J Biol Chem* **281**: 8917-8926

Fukuda M, Asano S, Nakamura T, Adachi M, Yoshida M, Yanagida M, Nishida E (1997a) CRM1 is responsible for intracellular transport mediated by the nuclear export signal. *Nature* **390**: 308-311

Fukuda M, Gotoh I, Adachi M, Gotoh Y, Nishida E (1997b) A novel regulatory mechanism in the mitogen-activated protein (MAP) kinase cascade. Role of nuclear export signal of MAP kinase kinase. *J Biol Chem* **272**: 32642-32648

Fukuda M, Gotoh I, Gotoh Y, Nishida E (1996) Cytoplasmic localization of mitogen-activated protein kinase kinase directed by its NH₂-terminal, leucine-rich short amino acid sequence, which acts as a nuclear export signal. *J Biol Chem* **271**: 20024-20028

Fukuda M, Gotoh Y, Nishida E (1997c) Interaction of MAP kinase with MAP kinase kinase: its possible role in the control of nucleocytoplasmic transport of MAP kinase. *Embo J* **16**: 1901-1908

Fukuda M, Gotoh Y, Tachibana T, Dell K, Hattori S, Yoneda Y, Nishida E (1995) Induction of neurite outgrowth by MAP kinase in PC12 cells. *Oncogene* **11**: 239-244

Fukunaga R, Hunter T (1997) MNK1, a new MAP kinase-activated protein kinase, isolated by a novel expression screening method for identifying protein kinase substrates. *Embo J* **16**: 1921-1933

Furuno T, Hirashima N, Onizawa S, Sagiya N, Nakanishi M (2001) Nuclear Shuttling of Mitogen-Activated Protein (MAP) Kinase (Extracellular Signal-Regulated Kinase (ERK) 2) Was Dynamically Controlled by MAP/ERK Kinase After Antigen Stimulation in RBL-2H3 Cells. *J Immunol* **166**: 4416-4421

Gaestel M (2006) MAPKAP kinases - MKs - two's company, three's a crowd. *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**: 120-130

Gaits F, Degols G, Shiozaki K, Russell P (1998) Phosphorylation and association with the transcription factor Atf1 regulate localization of Spc1/Sty1 stress-activated kinase in fission yeast. *Genes Dev* **12**: 1464-1473

Gaits F, Russell P (1999) Active Nucleocytoplasmic Shuttling Required for Function and Regulation of Stress-Activated Kinase Spc1/Sty1 in Fission Yeast. *Mol Biol Cell* **10**: 1395-1407

Galanis A, Yang SH, Sharrocks AD (2001) Selective targeting of MAPKs to the ETS domain transcription factor SAP-1. *J Biol Chem* **276**: 965-973

Galcheva-Gargova Z, Derijard B, Wu IH, Davis RJ (1994) An osmosensing signal transduction pathway in mammalian cells. *Science* **265**: 806-808

Gancedo JM (2001) Control of pseudohyphae formation in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Rev* **25**: 107-123

Ganiatsas S, Kwee L, Fujiwara Y, Perkins A, Ikeda T, Labow MA, Zon LI (1998) SEK1 deficiency reveals mitogen-activated protein kinase cascade crossregulation and leads to abnormal hepatogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 6881-6886

Garcia JJ, Zalba G, Detera-Wadleigh SD, de Miguel C (1996) Isolation of a cDNA encoding the rat MAP-kinase homolog of human p63mapk. *Mamm Genome* **7**: 810-814

Gavin AC, Nebreda AR (1999) A MAP kinase docking site is required for phosphorylation and activation of p90(rsk)/MAPKAP kinase-1. *Curr Biol* **9**: 281-284

Ge B, Gram H, Di Padova F, Huang B, New L, Ulevitch RJ, Luo Y, Han J (2002) MAPKK-independent activation of p38alpha mediated by TAB1-dependent autophosphorylation of p38alpha. *Science* **295**: 1291-1294

Gervais M, Dugourd C, Muller L, Ardidie C, Canton B, Loviconi L, Corvol P, Chneiweiss H, Monnot C (2006) Akt Down-Regulates ERK1/2 Nuclear Localization and Angiotensin II-induced Cell Proliferation through PEA-15. *Mol Biol Cell* **17**: 3940-3951

Gerwins P, Blank JL, Johnson GL (1997) Cloning of a novel mitogen-activated protein kinase kinase kinase, MEKK4, that selectively regulates the c-Jun amino terminal kinase pathway. *J Biol Chem* **272**: 8288-8295

Ghiglione C, Perrimon N, Perkins LA (1999) Quantitative variations in the level of MAPK activity control patterning of the embryonic termini in *Drosophila*. *Dev Biol* **205**: 181-193

Giasson E, Meloche S (1995) Role of p70 S6 protein kinase in angiotensin II-induced protein synthesis in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* **270**: 5225-5231

Gilchrist D, Mykytka B, Rexach M (2002) Accelerating the rate of disassembly of karyopherin cargo complexes. *J Biol Chem* **277**: 18161-18172

Gille H, Kortenjann M, Thomae O, Moomaw C, Slaughter C, Cobb MH, Shaw PE (1995) ERK phosphorylation potentiates Elk-1-mediated ternary complex formation and transactivation. *Embo J* **14**: 951-962

Gille H, Sharrocks AD, Shaw PE (1992) Phosphorylation of transcription factor p62TCF by MAP kinase stimulates ternary complex formation at c-fos promoter. *Nature* **358**: 414-417

Girardin SE, Yaniv M (2001) A direct interaction between JNK1 and CrkII is critical for Rac1-induced JNK activation. *Embo J* **20**: 3437-3446

Giroux S, Tremblay M, Bernard D, Cardin-Girard JF, Aubry S, Larouche L, Rousseau S, Huot J, Landry J, Jeannotte L, Charron J (1999) Embryonic death of Mek1-deficient mice reveals a role for this kinase in angiogenesis in the labyrinthine region of the placenta. *Curr Biol* **9**: 369 - 372

Gjerset R, Haghghi A, Lebedeva S, Mercola D (2001) Gene therapy approaches to sensitization of human prostate carcinoma to cisplatin by adenoviral expression of p53 and by antisense jun kinase oligonucleotide methods. *Methods in molecular biology (Clifton, NJ)* **175**: 495-520

Goldstein DM, Gabriel T (2005) Pathway to the clinic: inhibition of P38 MAP kinase. A review of ten chemotypes selected for development. *Curr Top Med Chem* **5**: 1017-1029

Gomez del Arco P, Martinez-Martinez S, Maldonado JL, Ortega-Perez I, Redondo JM (2000) A role for the p38 MAP kinase pathway in the nuclear shuttling of NFATp. *J Biol Chem* **275**: 13872-13878

Gong X, Wang X, Han J, Niesman I, Huang Q, Horwitz J (2001) Development of cataractous macrophthalmia in mice expressing an active MEK1 in the lens. *Investigative ophthalmology & visual science* **42**: 539-548

Gonzalez FA, Raden DL, Rigby MR, Davis RJ (1992) Heterogeneous expression of four MAP kinase isoforms in human tissues. *FEBS Lett* **304**: 170-178

Gonzalez FA, Seth A, Raden DL, Bowman DS, Fay FS, Davis RJ (1993) Serum-induced translocation of mitogen-activated protein kinase to the cell surface ruffling membrane and the nucleus. *J Cell Biol* **122**: 1089-1101

Goodwin JS, Drake KR, Rogers C, Wright L, Lippincott-Schwartz J, Philips MR, Kenworthy AK (2005) Depalmitoylated Ras traffics to and from the Golgi complex via a nonvesicular pathway. *J Cell Biol* **170**: 261-272

Gopalbhai K, Jansen G, Beauregard G, Whiteway M, Dumas F, Wu C, Meloche S (2003) Negative regulation of MAPKK by phosphorylation of a conserved serine residue equivalent to Ser212 of MEK1. *J Biol Chem* **278**: 8118-8125

Gopalbhai K, Meloche S (1998) Repression of mitogen-activated protein kinases ERK1/ERK2 activity by a protein tyrosine phosphatase in rat fibroblasts transformed by upstream oncoproteins. *J Cell Physiol* **174**: 35-47

Graves LM, Guy HI, Kozlowski P, Huang M, Lazarowski E, Pope RM, Collins MA, Dahlstrand EN, Earp HS, Evans DR (2000) Regulation of carbamoyl phosphate synthetase by MAP kinase. *Nature* **403**: 328-332

Greaves J, Chamberlain LH (2007) Palmitoylation-dependent protein sorting. *J Cell Biol* **176**: 249-254

Grethe S, Porn-Ares MI (2006) p38 MAPK regulates phosphorylation of Bad via PP2A-dependent suppression of the MEK1/2-ERK1/2 survival pathway in TNF-alpha induced endothelial apoptosis. *Cell Signal* **18**: 531-540

Grewal S, Molina DM, Bardwell L (2006) Mitogen-activated protein kinase (MAPK)-docking sites in MAPK kinases function as tethers that are crucial for MAPK regulation in vivo. *Cell Signal* **18**: 123-134

Griffis ER, Xu S, Powers MA (2003) Nup98 localizes to both nuclear and cytoplasmic sides of the nuclear pore and binds to two distinct nucleoporin subcomplexes. *Mol Biol Cell* **14**: 600-610

Grimshaw SJ, Mott HR, Stott KM, Nielsen PR, Evetts KA, Hopkins LJ, Nietlispach D, Owen D (2004) Structure of the sterile alpha motif (SAM) domain of the *Saccharomyces cerevisiae* mitogen-activated protein kinase pathway-modulating protein STE50 and analysis of its interaction with the STE11 SAM. *J Biol Chem* **279**: 2192-2201

Gripentrog JM, Miettinen HM (2005) Activation and nuclear translocation of ERK1/2 by the formyl peptide receptor is regulated by G protein and is not dependent on beta-arrestin translocation or receptor endocytosis. *Cell Signal* **17**: 1300-1311

Gross SD, Anderson RA (1998) Casein kinase I: spatial organization and positioning of a multifunctional protein kinase family. *Cell Signal* **10**: 699-711

Guan Z, Buckman SY, Pentland AP, Templeton DJ, Morrison AR (1998) Induction of cyclooxygenase-2 by the activated MEKK1 --> SEK1/MKK4 --> p38 mitogen-activated protein kinase pathway. *J Biol Chem* **273**: 12901-12908

Guex N, Peitsch MC (1997) SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis* **18**: 2714-2723

Guinez C, Morelle W, Michalski J-C, Lefebvre T (2005) O-GlcNAc glycosylation: a signal for the nuclear transport of cytosolic proteins? *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **37**: 765-774

Gunther T, Poli C, Muller JM, Catala-Lehnen P, Schinke T, Yin N, Vomstein S, Amling M, Schule R (2005) Fhl2 deficiency results in osteopenia due to decreased activity of osteoblasts. *Embo J* **24**: 3049-3056

Gupta S, Barrett T, Whitmarsh AJ, Cavanagh J, Sluss HK, Derijard B, Davis RJ (1996) Selective interaction of JNK protein kinase isoforms with transcription factors. *Embo J* **15**: 2760-2770

Gustin MC, Albertyn J, Alexander M, Davenport K (1998) MAP kinase pathways in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev* **62**: 1264-1300

Haase I, Hobbs RM, Romero MR, Broad S, Watt FM (2001) A role for mitogen-activated protein kinase activation by integrins in the pathogenesis of psoriasis. *J Clin Invest* **108**: 527-536

Hagemann D, Troppmair J, Rapp UR (1999) Cot protooncprotein activates the dual specificity kinases MEK-1 and SEK-1 and induces differentiation of PC12 cells. *Oncogene* **18**: 1391-1400

Hagen DC, McCaffrey G, Sprague GF, Jr. (1991) Pheromone response elements are necessary and sufficient for basal and pheromone-induced transcription of the FUS1 gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **11**: 2952-2961

Hale KK, Trollinger D, Rihanek M, Manthey CL (1999) Differential expression and activation of p38 mitogen-activated protein kinase alpha, beta, gamma, and delta in inflammatory cell lineages. *J Immunol* **162**: 4246-4252

Hall RA, Lefkowitz RJ (2002) Regulation of G protein-coupled receptor signaling by scaffold proteins. *Circ Res* **91**: 672-680

Hallberg B, Rayter SI, Downward J (1994) Interaction of Ras and Raf in intact mammalian cells upon extracellular stimulation. *J Biol Chem* **269**: 3913-3916

Han J, Jiang Y, Li Z, Kravchenko VV, Ulevitch RJ (1997) Activation of the transcription factor MEF2C by the MAP kinase p38 in inflammation. *Nature* **386**: 296-299

Han J, Lee JD, Bibbs L, Ulevitch RJ (1994) A MAP kinase targeted by endotoxin and hyperosmolarity in mammalian cells. *Science* **265**: 808-811

Hanafusa H, Torii S, Yasunaga T, Nishida E (2002) Sprouty1 and Sprouty2 provide a control mechanism for the Ras/MAPK signalling pathway. *Nat Cell Biol* **4**: 850-858

Hancock CN, Dangi S, Shapiro P (2005a) Protein phosphatase 2A activity associated with Golgi membranes during the G2/M phase may regulate phosphorylation of ERK2. *J Biol Chem* **280**: 11590-11598

Hancock CN, Macias A, Lee EK, Yu SY, Mackerell AD, Jr., Shapiro P (2005b) Identification of novel extracellular signal-regulated kinase docking domain inhibitors. *J Med Chem* **48**: 4586-4595

Hanks SK, Hunter T (1995) The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification. *FASEB J* **9**: 576-596

Hanks SK, Quinn AM, Hunter T (1988) The protein kinase family: conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains. *Science* **241**: 42-52

Harding A, Tian T, Westbury E, Frische E, Hancock JF (2005) Subcellular localization determines MAP kinase signal output. *Curr Biol* **15**: 869-873

Harris K, Lamson RE, Nelson B, Hughes TR, Marton MJ, Roberts CJ, Boone C, Pryciak PM (2001) Role of scaffolds in MAP kinase pathway specificity revealed by custom design of pathway-dedicated signaling proteins. *Curr Biol* **11**: 1815-1824

Harrison RE, Sikorski BA, Jongstra J (2004) Leukocyte-specific protein 1 targets the ERK/MAP kinase scaffold protein KSR and MEK1 and ERK2 to the actin cytoskeleton. *J Cell Sci* **117**: 2151-2157

Hashimoto H, Fukuda M, Matsuo Y, Yokoyama Y, Nishida E, Toyohara H, Sakaguchi M (2000) Identification of a nuclear export signal in MKK6, an activator of the carp p38 mitogen-activated protein kinases. *Eur J Biochem* **267**: 4362-4371

Hatakeyama M, Kimura S, Naka T, Kawasaki T, Yumoto N, Ichikawa M, Kim JH, Saito K, Saeki M, Shirouzu M, Yokoyama S, Konagaya A (2003) A computational model on the modulation of mitogen-activated protein kinase (MAPK) and Akt pathways in heregulin-induced ErbB signalling. *Biochem J* **373**: 451-463

Hatano N, Mori Y, Oh-hora M, Kosugi A, Fujikawa T, Nakai N, Niwa H, Miyazaki J, Hamaoka T, Ogata M (2003) Essential role for ERK2 mitogen-activated protein kinase in placental development. *Genes Cells* **8**: 847-856

Hauge C, Frodin M (2006) RSK and MSK in MAP kinase signalling. *J Cell Sci* **119**: 3021-3023

Hayashi M, Lee JD (2004) Role of the BMK1/ERK5 signaling pathway: lessons from knockout mice. *J Mol Med* **82**: 800-808

Haydar TF, Kuan CY, Flavell RA, Rakic P (1999) The role of cell death in regulating the size and shape of the mammalian forebrain. *Cereb Cortex* **9**: 621-626

Haystead TA, Dent P, Wu J, Haystead CM, Sturgill TW (1992) Ordered phosphorylation of p42mapk by MAP kinase kinase. *FEBS Lett* **306**: 17-22

Hazzalin CA, Cano E, Cuenda A, Barratt MJ, Cohen P, Mahadevan LC (1996) p38/RK is essential for stress-induced nuclear responses: JNK/SAPKs and c-Jun/ATF-2 phosphorylation are insufficient. *Curr Biol* **6**: 1028-1031

Heasley LE, Han SY (2006) JNK regulation of oncogenesis. *Mol Cells* **21**: 167-173

Hellman U, Wernstedt C, Gonez J, Heldin CH (1995) Improvement of an "In-Gel" digestion procedure for the micropreparation of internal protein fragments for amino acid sequencing. *Anal Biochem* **224**: 451-455

Heo YS, Kim SK, Seo CI, Kim YK, Sung BJ, Lee HS, Lee JI, Park SY, Kim JH, Hwang KY, Hyun YL, Jeon YH, Ro S, Cho JM, Lee TG, Yang CH (2004) Structural basis for the

selective inhibition of JNK1 by the scaffolding protein JIP1 and SP600125. *Embo J* **23**: 2185-2195

Her JH, Lakhani S, Zu K, Vila J, Dent P, Sturgill TW, Weber MJ (1993) Dual phosphorylation and autophosphorylation in mitogen-activated protein (MAP) kinase activation. *Biochem J* **296** (Pt 1): 25-31

Hill JM, Vaidyanathan H, Ramos JW, Ginsberg MH, Werner MH (2002) Recognition of ERK MAP kinase by PEA-15 reveals a common docking site within the death domain and death effector domain. *Embo J* **21**: 6494-6504

Hindley A, Kolch W (2002) Extracellular signal regulated kinase (ERK)/mitogen activated protein kinase (MAPK)-independent functions of Raf kinases. *J Cell Sci* **115**: 1575-1581

Hirai S, Izawa M, Osada S, Spyrou G, Ohno S (1996) Activation of the JNK pathway by distantly related protein kinases, MEKK and MUK. *Oncogene* **12**: 641-650

Hirai S, Katoh M, Terada M, Kyriakis JM, Zon LI, Rana A, Avruch J, Ohno S (1997) MST/MLK2, a member of the mixed lineage kinase family, directly phosphorylates and activates SEK1, an activator of c-Jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinase. *J Biol Chem* **272**: 15167-15173

Hirosumi J, Tuncman G, Chang L, Gorgun CZ, Uysal KT, Maeda K, Karin M, Hotamisligil GS (2002) A central role for JNK in obesity and insulin resistance. *Nature* **420**: 333-336

Ho DT, Bardwell AJ, Abdollahi M, Bardwell L (2003) A docking site in MKK4 mediates high affinity binding to JNK MAPKs and competes with similar docking sites in JNK substrates. *J Biol Chem* **278**: 32662-32672

Ho DT, Bardwell AJ, Grewal S, Iverson C, Bardwell L (2006) Interacting JNK-docking sites in MKK7 promote binding and activation of JNK mitogen-activated protein kinases. *J Biol Chem* **281**: 13169-13179

Hobbs RM, Silva-Vargas V, Groves R, Watt FM (2004) Expression of activated MEK1 in differentiating epidermal cells is sufficient to generate hyperproliferative and inflammatory skin lesions. *The Journal of investigative dermatology* **123**: 503-515

Hochholdinger F, Baier G, Nogalo A, Bauer B, Grunicke HH, Uberall F (1999) Novel membrane-targeted ERK1 and ERK2 chimeras which act as dominant negative, isotype-specific mitogen-activated protein kinase inhibitors of Ras-Raf-mediated transcriptional activation of c-fos in NIH 3T3 cells. *Mol Cell Biol* **19**: 8052-8065

- Hohmann S (2002) Osmotic stress signaling and osmoadaptation in yeasts. *Microbiol Mol Biol Rev* **66**: 300-372
- Hollenbach E, Neumann M, Vieth M, Roessner A, Malfertheiner P, Naumann M (2004) Inhibition of p38 MAP kinase- and RICK/NF-kappaB-signaling suppresses inflammatory bowel disease. *Faseb J* **18**: 1550-1552
- Holmberg C, Katz S, Lerdrup M, Herdegen T, Jaattela M, Aronheim A, Kallunki T (2002a) A novel specific role for I kappa B kinase complex-associated protein in cytosolic stress signaling. *J Biol Chem* **277**: 31918-31928
- Holmberg CI, Tran SEF, Eriksson JE, Sistonen L (2002b) Multisite phosphorylation provides sophisticated regulation of transcription factors. *Trends in Biochemical Sciences* **27**: 619-627
- Hoofnagle AN, Resing KA, Goldsmith EJ, Ahn NG (2001) Changes in protein conformational mobility upon activation of extracellular regulated protein kinase-2 as detected by hydrogen exchange. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 956-961
- Hoofnagle AN, Stoner JW, Lee T, Eaton SS, Ahn NG (2004) Phosphorylation-dependent changes in structure and dynamics in ERK2 detected by SDSL and EPR. *Biophys J* **86**: 395-403
- Horgan AM, Stork PJS (2003) Examining the mechanism of Erk nuclear translocation using green fluorescent protein. *Experimental Cell Research* **285**: 208-220
- Hornbeck PV, Chabra I, Kornhauser JM, Skrzypek E, Zhang B (2004) PhosphoSite: A bioinformatics resource dedicated to physiological protein phosphorylation. *Proteomics* **4**: 1551-1561
- Hoshino R, Chatani Y, Yamori T, Tsuruo T, Oka H, Yoshida O, Shimada Y, Ari-i S, Wada H, Fujimoto J, Kohno M (1999) Constitutive activation of the 41-/43-kDa mitogen-activated protein kinase signaling pathway in human tumors. *Oncogene* **18**: 813 - 822
- Hotamisligil GS (2003) Inflammatory pathways and insulin action. *Int J Obes Relat Metab Disord* **27 Suppl 3**: S53-55
- Howe LR, Leever SJ, Gomez N, Nakielnny S, Cohen P, Marshall CJ (1992) Activation of the MAP kinase pathway by the protein kinase raf. *Cell* **71**: 335-342
- Hoyle PE, Moye PW, Steelman LS, Blalock WL, Franklin RA, Pearce M, Cherwinski H, Bosch E, McMahon M, McCubrey JA (2000) Differential abilities of the Raf family of

protein kinases to abrogate cytokine dependency and prevent apoptosis in murine hematopoietic cells by a MEK1-dependent mechanism. *Leukemia* **14**: 642-656

Hu MC, Wang YP, Mikhail A, Qiu WR, Tan TH (1999) Murine p38-delta mitogen-activated protein kinase, a developmentally regulated protein kinase that is activated by stress and proinflammatory cytokines. *J Biol Chem* **274**: 7095-7102

Hu Y, Mivechi NF (2006) Association and regulation of heat shock transcription factor 4b with both extracellular signal-regulated kinase mitogen-activated protein kinase and dual-specificity tyrosine phosphatase DUSP26. *Mol Cell Biol* **26**: 3282-3294

Huang C, Jacobson K, Schaller MD (2004a) MAP kinases and cell migration. *J Cell Sci* **117**: 4619-4628

Huang C, Ma WY, Maxiner A, Sun Y, Dong Z (1999) p38 kinase mediates UV-induced phosphorylation of p53 protein at serine 389. *J Biol Chem* **274**: 12229-12235

Huang CY, Ferrell JE, Jr. (1996) Ultrasensitivity in the mitogen-activated protein kinase cascade. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 10078-10083

Huang L, Gotoh N, Zhang S, Shibuya M, Yamamoto T, Tsuchida N (2004b) SNT-2 interacts with ERK2 and negatively regulates ERK2 signaling in response to EGF stimulation. *Biochem Biophys Res Commun* **324**: 1011-1017

Huang W, Alessandrini A, Crews CM, Erikson RL (1993) Raf-1 forms a stable complex with Mek1 and activates Mek1 by serine phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**: 10947-10951

Huang W, Erikson RL (1994) Constitutive activation of Mek1 by mutation of serine phosphorylation sites. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**: 8960-8963

Hulleman E, Bijvelt JJ, Verkleij AJ, Verrrips CT, Boonstra J (1999) Nuclear translocation of mitogen-activated protein kinase p42MAPK during the ongoing cell cycle. *J Cell Physiol* **180**: 325-333

Hung W, Olson KA, Breitkreutz A, Sadowski I (1997) Characterization of the basal and pheromone-stimulated phosphorylation states of Ste12p. *European Journal Of Biochemistry / FEBS* **245**: 241-251

Hunter T, Cooper JA (1981) Epidermal growth factor induces rapid tyrosine phosphorylation of proteins in A431 human tumor cells. *Cell* **24**: 741-752

- Hunter T, Sefton BM (1980) Transforming gene product of Rous sarcoma virus phosphorylates tyrosine. *Proc Natl Acad Sci U S A* **77**: 1311-1315
- Huser M, Luckett J, Chiloeches A, Mercer K, Iwobi M, Giblett S, Sun XM, Brown J, Marais R, Pritchard C (2001) MEK kinase activity is not necessary for Raf-1 function. *Embo J* **20**: 1940-1951
- Hutchison M, Berman KS, Cobb MH (1998) Isolation of TAO1, a protein kinase that activates MEKs in stress-activated protein kinase cascades. *J Biol Chem* **273**: 28625-28632
- Iavarone C, Acunzo M, Carlomagno F, Catania A, Melillo RM, Carlomagno SM, Santoro M, Chiariello M (2006) Activation of the Erk8 Mitogen-activated Protein (MAP) Kinase by RET/PTC3, a Constitutively Active Form of the RET Proto-oncogene. *Journal of Biological Chemistry* **281**: 10567-10576
- Ichijo H, Nishida E, Irie K, ten Dijke P, Saitoh M, Moriguchi T, Takagi M, Matsumoto K, Miyazono K, Gotoh Y (1997) Induction of apoptosis by ASK1, a mammalian MAPKKK that activates SAPK/JNK and p38 signaling pathways. *Science* **275**: 90-94
- Im JY, Lee KW, Kim MH, Lee SH, Ha HY, Cho IH, Kim D, Yu MS, Kim JB, Lee JK, Kim YJ, Youn BW, Yang SD, Shin HS, Han PL (2003) Repression of phospho-JNK and infarct volume in ischemic brain of JIP1-deficient mice. *J Neurosci Res* **74**: 326-332
- Imajo M, Tsuchiya Y, Nishida E (2006) Regulatory mechanisms and functions of MAP kinase signaling pathways. *IUBMB Life* **58**: 312-317
- Inouye C, Dhillon N, Durfee T, Zambryski PC, Thorner J (1997) Mutational analysis of STE5 in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: application of a differential interaction trap assay for examining protein-protein interactions. *Genetics* **147**: 479
- Ishibe S, Joly D, Liu ZX, Cantley LG (2004) Paxillin serves as an ERK-regulated scaffold for coordinating FAK and Rac activation in epithelial morphogenesis. *Mol Cell* **16**: 257-267
- Ishibe S, Joly D, Zhu X, Cantley LG (2003) Phosphorylation-dependent paxillin-ERK association mediates hepatocyte growth factor-stimulated epithelial morphogenesis. *Mol Cell* **12**: 1275-1285
- Ishihara K, Tsutsumi K, Kawane S, Nakajima M, Kasaoka T (2003) The receptor for advanced glycation end-products (RAGE) directly binds to ERK by a D-domain-like docking site. *FEBS Lett* **550**: 107-113

Ishitani T, Ninomiya-Tsuji J, Matsumoto K (2003) Regulation of Lymphoid Enhancer Factor 1/T-Cell Factor by Mitogen-Activated Protein Kinase-Related Nemo-Like Kinase-Dependent Phosphorylation in Wnt/ β -Catenin Signaling. *Mol Cell Biol* **23**: 1379-1389

Ishitani T, Ninomiya-Tsuji J, Nagai S-i, Nishita M, Meneghini M, Barker N, Waterman M, Bowerman B, Clevers H, Shibuya H, Matsumoto K (1999) The TAK1-NLK-MAPK-related pathway antagonizes signalling between β -catenin and transcription factor TCF. *Nature* **399**: 798-802

Ito M, Yoshioka K, Akechi M, Yamashita S, Takamatsu N, Sugiyama K, Hibi M, Nakabeppu Y, Shiba T, Yamamoto KI (1999) JSAP1, a novel jun N-terminal protein kinase (JNK)-binding protein that functions as a Scaffold factor in the JNK signaling pathway. *Mol Cell Biol* **19**: 7539-7548

Iwamoto MA, Fairclough SR, Rudge SA, Engebrecht J (2005) *Saccharomyces cerevisiae* Sps1p regulates trafficking of enzymes required for spore wall synthesis. *Eukaryot Cell* **4**: 536-544

Jaaro H, Rubinfeld H, Hanoch T, Seger R (1997) Nuclear translocation of mitogen-activated protein kinase kinase (MEK1) in response to mitogenic stimulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**: 3742-3747

Jacobs D, Glossip D, Xing H, Muslin AJ, Kornfeld K (1999) Multiple docking sites on substrate proteins form a modular system that mediates recognition by ERK MAP kinase. *Genes Dev* **13**: 163-175

Jaeschke A, Czech MP, Davis RJ (2004) An essential role of the JIP1 scaffold protein for JNK activation in adipose tissue. *Genes Dev* **18**: 1976-1980

Jaeschke A, Karasarides M, Ventura JJ, Ehrhardt A, Zhang C, Flavell RA, Shokat KM, Davis RJ (2006) JNK2 is a positive regulator of the cJun transcription factor. *Mol Cell* **23**: 899-911

Jaeschke A, Rincon M, Doran B, Reilly J, Neuberg D, Greiner DL, Shultz LD, Rossini AA, Flavell RA, Davis RJ (2005) Disruption of the *Jnk2* (*Mapk9*) gene reduces destructive insulinitis and diabetes in a mouse model of type I diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 6931-6935

Jakel S, Mingot JM, Schwarzmaier P, Hartmann E, Gorlich D (2002) Importins fulfil a dual function as nuclear import receptors and cytoplasmic chaperones for exposed basic domains. *Embo J* **21**: 377-386

- Janknecht R, Hunter T (1997) Convergence of MAP kinase pathways on the ternary complex factor Sap-1a. *Embo J* **16**: 1620-1627
- Jansen G, Buhring F, Hollenberg CP, Ramezani Rad M (2001) Mutations in the SAM domain of STE50 differentially influence the MAPK-mediated pathways for mating, filamentous growth and osmotolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Genet Genomics* **265**: 102-117
- Jaumot M, Hancock JF (2001) Protein phosphatases 1 and 2A promote Raf-1 activation by regulating 14-3-3 interactions. *Oncogene* **20**: 3949-3958
- Je HD, Gangopadhyay SS, Ashworth TD, Morgan KG (2001) Calponin is required for agonist-induced signal transduction--evidence from an antisense approach in ferret smooth muscle. *The Journal of physiology* **537**: 567-577
- Ji RR (2004a) Mitogen-activated protein kinases as potential targets for pain killers. *Curr Opin Investig Drugs* **5**: 71-75
- Ji RR (2004b) Peripheral and central mechanisms of inflammatory pain, with emphasis on MAP kinases. *Current drug targets* **3**: 299-303
- Jiang Y, Chen C, Li Z, Guo W, Gegner JA, Lin S, Han J (1996) Characterization of the structure and function of a new mitogen-activated protein kinase (p38beta). *J Biol Chem* **271**: 17920-17926
- Jiang Y, Gram H, Zhao M, New L, Gu J, Feng L, Di Padova F, Ulevitch RJ, Han J (1997) Characterization of the structure and function of the fourth member of p38 group mitogen-activated protein kinases, p38delta. *J Biol Chem* **272**: 30122-30128
- Johnson DA, Akamine P, Radzio-Andzelm E, Madhusudan M, Taylor SS (2001) Dynamics of cAMP-dependent protein kinase. *Chem Rev* **101**: 2243-2270
- Johnson GL, Lapadat R (2002) Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. *Science* **298**: 1911-1912
- Johnson GV, Bailey CD (2003) The p38 MAP kinase signaling pathway in Alzheimer's disease. *Exp Neurol* **183**: 263-268
- Johnson SA, Hunter T (2005) Kinomics: methods for deciphering the kinome. *Nature methods* **2**: 17-25

- Jones RB, Gordus A, Krall JA, MacBeath G (2006) A quantitative protein interaction network for the ErbB receptors using protein microarrays. *Nature* **439**: 168-174
- Julien C, Coulombe P, Meloche S (2003) Nuclear export of ERK3 by a CRM1-dependent mechanism regulates its inhibitory action on cell cycle progression. *J Biol Chem* **278**: 42615-42624
- Kaffman A, O'Shea EK (1999) Regulation of nuclear localization: a key to a door. *Annu Rev Cell Dev Biol* **15**: 291-339
- Kahan C, Seuwen K, Meloche S, Pouyssegur J (1992) Coordinate, biphasic activation of p44 mitogen-activated protein kinase and S6 kinase by growth factors in hamster fibroblasts. Evidence for thrombin-induced signals different from phosphoinositide turnover and adenylcyclase inhibition. *J Biol Chem* **267**: 13369-13375
- Kalderon D, Richardson WD, Markham AF, Smith AE (1984a) Sequence requirements for nuclear location of simian virus 40 large-T antigen. *Nature* **311**: 33-38
- Kalderon D, Roberts BL, Richardson WD, Smith AE (1984b) A short amino acid sequence able to specify nuclear location. *Cell* **39**: 499-509
- Kallunki T, Deng T, Hibi M, Karin M (1996) c-Jun can recruit JNK to phosphorylate dimerization partners via specific docking interactions. *Cell* **87**: 929-939
- Kallunki T, Su B, Tsigelny I, Sluss HK, Derijard B, Moore G, Davis R, Karin M (1994) JNK2 contains a specificity-determining region responsible for efficient c-Jun binding and phosphorylation. *Genes Dev* **8**: 2996-3007
- Kamakura S, Moriguchi T, Nishida E (1999) Activation of the Protein Kinase ERK5/BMK1 by Receptor Tyrosine Kinases. Identification and characterization of a signaling pathway to the nucleus. *J Biol Chem* **274**: 26563-26571
- Kaminska B (2005) MAPK signalling pathways as molecular targets for anti-inflammatory therapy--from molecular mechanisms to therapeutic benefits. *Biochim Biophys Acta* **1754**: 253-262
- Kanei-Ishii C, Ninomiya-Tsuji J, Tanikawa J, Nomura T, Ishitani T, Kishida S, Kokura K, Kurahashi T, Ichikawa-Iwata E, Kim Y, Matsumoto K, Ishii S (2004) Wnt-1 signal induces phosphorylation and degradation of c-Myb protein via TAK1, HIPK2, and NLK. *Genes Dev* **18**: 816-829

Kang T-H, Kim K-T (2006) Negative regulation of ERK activity by VRK3-mediated activation of VHR phosphatase. *Nat Cell Biol* **8**: 863-869

Kang YJ, Seit-Nebi A, Davis RJ, Han J (2006) Multiple Activation Mechanisms of p38{alpha} Mitogen-activated Protein Kinase. *J Biol Chem* **281**: 26225-26234

Kant S, Schumacher S, Singh MK, Kispert A, Kotlyarov A, Gaestel M (2006) Characterization of the Atypical MAPK ERK4 and Its Activation of the MAPK-activated Protein Kinase MK5. *J Biol Chem* **281**: 35511-35519

Karandikar M, Cobb MH (1999) Scaffolding and protein interactions in MAP kinase modules. *Cell Calcium* **26**: 219-226

Karandikar M, Xu S, Cobb MH (2000) MEKK1 binds raf-1 and the ERK2 cascade components. *J Biol Chem* **275**: 40120-40127

Karin M, Gallagher E (2005) From JNK to pay dirt: jun kinases, their biochemistry, physiology and clinical importance. *IUBMB Life* **57**: 283-295

Kasler HG, Victoria J, Duramad O, Winoto A (2000) ERK5 is a novel type of mitogen-activated protein kinase containing a transcriptional activation domain. *Mol Cell Biol* **20**: 8382-8389

Kasuga M, Zick Y, Blithe DL, Crettaz M, Kahn CR (1982) Insulin stimulates tyrosine phosphorylation of the insulin receptor in a cell-free system. *Nature* **298**: 667-669

Kato Y, Chao TH, Hayashi M, Tapping RI, Lee JD (2000a) Role of BMK1 in regulation of growth factor-induced cellular responses. *Immunol Res* **21**: 233-237

Kato Y, Kravchenko VV, Tapping RI, Han J, Ulevitch RJ, Lee JD (1997) BMK1/ERK5 regulates serum-induced early gene expression through transcription factor MEF2C. *Embo J* **16**: 7054-7066

Kato Y, Tapping RI, Huang S, Watson MH, Ulevitch RJ, Lee JD (1998) Bmk1/Erk5 is required for cell proliferation induced by epidermal growth factor. *Nature* **395**: 713-716

Kato Y, Zhao M, Morikawa A, Sugiyama T, Chakravorty D, Koide N, Yoshida T, Tapping RI, Yang Y, Yokochi T, Lee JD (2000b) Big mitogen-activated kinase regulates multiple members of the MEF2 protein family. *J Biol Chem* **275**: 18534-18540

Katsanakis KD, Owen C, Zoumpourlis V (2002) JNK and ERK signaling pathways in multistage mouse carcinogenesis: studies in the inhibition of signaling cascades as a means to understand their in vivo biological role. *Anticancer Res* **22**: 755-759

Katz M, Amit I, Yarden Y (2007) Regulation of MAPKs by growth factors and receptor tyrosine kinases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* **Sous presse**

Kau TR, Silver PA (2003) Nuclear transport as a target for cell growth. *Drug Discovery Today* **8**: 78-85

Kazlauskas A, Cooper JA (1988) Protein kinase C mediates platelet-derived growth factor-induced tyrosine phosphorylation of p42. *J Cell Biol* **106**: 1395-1402

Kehlenbach RH, Gerace L (2000) Phosphorylation of the nuclear transport machinery down-regulates nuclear protein import in vitro. *J Biol Chem* **275**: 17848-17856

Kelkar N, Gupta S, Dickens M, Davis RJ (2000) Interaction of a mitogen-activated protein kinase signaling module with the neuronal protein JIP3. *Mol Cell Biol* **20**: 1030-1043

Kelkar N, Standen CL, Davis RJ (2005) Role of the JIP4 scaffold protein in the regulation of mitogen-activated protein kinase signaling pathways. *Mol Cell Biol* **25**: 2733-2743

Kelleher RJ, 3rd, Govindarajan A, Jung HY, Kang H, Tonegawa S (2004) Translational control by MAPK signaling in long-term synaptic plasticity and memory. *Cell* **116**: 467-479

Keller ET, Fu Z, Brennan M (2004) The role of Raf kinase inhibitor protein (RKIP) in health and disease. *Biochem Pharmacol* **68**: 1049-1053

Kelly A, Laroche S, Davis S (2003) Activation of mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase in hippocampal circuitry is required for consolidation and reconsolidation of recognition memory. *J Neurosci* **23**: 5354-5360

Kennedy NJ, Davis RJ (2003) Role of JNK in tumor development. *Cell Cycle* **2**: 199-201

Kerkela R, Force T (2006) p38 mitogen-activated protein kinase: a future target for heart failure therapy? *Journal of the American College of Cardiology* **48**: 556-558

Keyse SM (2000) Protein phosphatases and the regulation of mitogen-activated protein kinase signalling. *Curr Opin Cell Biol* **12**: 186-192

Khokhlatchev A, Xu S, English J, Wu P, Schaefer E, Cobb MH (1997) Reconstitution of mitogen-activated protein kinase phosphorylation cascades in bacteria. Efficient synthesis of active protein kinases. *J Biol Chem* **272**: 11057-11062

Khokhlatchev AV, Canagarajah B, Wilsbacher J, Robinson M, Atkinson M, Goldsmith E, Cobb MH (1998) Phosphorylation of the MAP kinase ERK2 promotes its homodimerization and nuclear translocation. *Cell* **93**: 605-615

Kim JE, Tannenbaum SR, White FM (2005a) Global phosphoproteome of HT-29 human colon adenocarcinoma cells. *J Proteome Res* **4**: 1339-1346

Kim JW, Kim MJ, Kim KJ, Yun HJ, Chae JS, Hwang SG, Chang T-S, Park H-S, Lee K-W, Han P-L, Cho S-G, Kim T-W, Choi E-J (2005b) Notch interferes with the scaffold function of JNK-interacting protein 1 to inhibit the JNK signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 14308-14313

Kim JW, Lee JE, Kim MJ, Cho E-G, Cho S-G, Choi E-J (2003) Glycogen Synthase Kinase 3beta Is a Natural Activator of Mitogen-activated Protein Kinase/Extracellular Signal-regulated Kinase Kinase Kinase 1 (MEKK1). *J Biol Chem* **278**: 13995-14001

Kim K, Nose K, Shibamura M (2000) Significance of nuclear relocalization of ERK1/2 in reactivation of c-fos transcription and DNA synthesis in senescent fibroblasts. *J Biol Chem* **275**: 20685-20692

Kim M, Lee JH, Koh H, Lee SY, Jang C, Chung CJ, Sung JH, Blenis J, Chung J (2006) Inhibition of ERK-MAP kinase signaling by RSK during Drosophila development. *Embo J* **25**: 3056-3067

Kim SJ, Kahn CR (1997) Insulin regulation of mitogen-activated protein kinase kinase (MEK), mitogen-activated protein kinase and casein kinase in the cell nucleus: a possible role in the regulation of gene expression. *Biochem J* **323 (Pt 3)**: 621-627

Klevernic IV, Stafford MJ, Morrice N, Peggie M, Morton S, Cohen P (2006) Characterization of the reversible phosphorylation and activation of ERK8. *Biochem J* **394**: 365-373

Klumpp S, Krieglstein J (2005) Reversible phosphorylation of histidine residues in vertebrate proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins & Proteomics* **1754**: 291-295

Knighon DR, Zheng JH, Ten Eyck LF, Ashford VA, Xuong NH, Taylor SS, Sowadski JM (1991) Crystal structure of the catalytic subunit of cyclic adenosine monophosphate-dependent protein kinase. *Science* **253**: 407-414

Kobe B, Kampmann T, Forwood JK, Listwan P, Brinkworth RI (2005) Substrate specificity of protein kinases and computational prediction of substrates. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins & Proteomics* **1754**: 200-209

Kohno M (1985) Diverse mitogenic agents induce rapid phosphorylation of a common set of cellular proteins at tyrosine in quiescent mammalian cells. *J Biol Chem* **260**: 1771-1779

Kohno M, Pouyssegur J (1986) Alpha-thrombin-induced tyrosine phosphorylation of 43,000- and 41,000-Mr proteins is independent of cytoplasmic alkalization in quiescent fibroblasts. *Biochem J* **238**: 451-457

Kohno M, Pouyssegur J (2006) Targeting the ERK signaling pathway in cancer therapy. *Ann Med* **38**: 200-211

Koide H, Satoh T, Nakafuku M, Kaziro Y (1993) GTP-dependent association of Raf-1 with Ha-Ras: identification of Raf as a target downstream of Ras in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**: 8683-8686

Kojima H, Sasaki T, Ishitani T, Iemura S-i, Zhao H, Kaneko S, Kunimoto H, Natsume T, Matsumoto K, Nakajima K (2005) STAT3 regulates Nemo-like kinase by mediating its interaction with IL-6-stimulated TGF{beta}-activated kinase 1 for STAT3 Ser-727 phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 4524-4529

Kolch W (2005) Coordinating ERK/MAPK signalling through scaffolds and inhibitors. *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**: 827-837

Kolch W, Calder M, Gilbert D (2005) When kinases meet mathematics: the systems biology of MAPK signalling. *FEBS Lett* **579**: 1891-1895

Kolch W, Heidecker G, Kochs G, Hummel R, Vahidi H, Mischak H, Finkenzeller G, Marme D, Rapp UR (1993) Protein kinase C alpha activates RAF-1 by direct phosphorylation. *Nature* **364**: 249-252

Kondoh K, Nishida E (2006) Regulation of MAP kinases by MAP kinase phosphatases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* **Sous presse**

- Kondoh K, Terasawa K, Morimoto H, Nishida E (2006) Regulation of Nuclear Translocation of Extracellular Signal-Regulated Kinase 5 by Active Nuclear Import and Export Mechanisms. *Mol Cell Biol* **26**: 1679-1690
- Kontoyiannis D, Kotlyarov A, Carballo E, Alexopoulou L, Blakeshear PJ, Gaestel M, Davis R, Flavell R, Kollias G (2001) Interleukin-10 targets p38 MAPK to modulate ARE-dependent TNF mRNA translation and limit intestinal pathology. *Embo J* **20**: 3760-3770
- Kortenjann M, Nehls M, Smith AJ, Carsetti R, Schuler J, Kohler G, Boehm T (2001a) Abnormal bone marrow stroma in mice deficient for nemo-like kinase, Nlk. *Eur J Immunol* **31**: 3580-3587
- Kortenjann M, Wehrle C, Nehls MC, Boehm T (2001b) Only one nemo-like kinase gene homologue in invertebrate and mammalian genomes. *Gene* **278**: 161-165
- Kose S, Imamoto N, Tachibana T, Shimamoto T, Yoneda Y (1997) Ran-unassisted nuclear migration of a 97-kD component of nuclear pore-targeting complex. *J Cell Biol* **139**: 841-849
- Kotlyarov A, Neininger A, Schubert C, Eckert R, Birchmeier C, Volk HD, Gaestel M (1999) MAPKAP kinase 2 is essential for LPS-induced TNF-alpha biosynthesis. *Nat Cell Biol* **1**: 94-97
- Kovalenko D, Yang X, Nadeau RJ, Harkins LK, Friesel R (2003) Sef inhibits fibroblast growth factor signaling by inhibiting FGFR1 tyrosine phosphorylation and subsequent ERK activation. *J Biol Chem* **278**: 14087-14091
- Kracht M, Saklatvala J (2002) Transcriptional and post-transcriptional control of gene expression in inflammation. *Cytokine* **20**: 91-106
- Krens SF, Spaink HP, Snaar-Jagalska BE (2006a) Functions of the MAPK family in vertebrate-development. *FEBS Lett* **580**: 4984-4990
- Krens SFG, He S, Spaink HP, Snaar-Jagalska BE (2006b) Characterization and expression patterns of the MAPK family in zebrafish. *Gene Expression Patterns* **6**: 1019-1026
- Krisak L, Strich R, Winters RS, Hall JP, Mallory MJ, Kreitzer D, Tuan RS, Winter E (1994) SMK1, a developmentally regulated MAP kinase, is required for spore wall assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev* **8**: 2151-2161

Krueger J, Chou FL, Glading A, Schaefer E, Ginsberg MH (2005) Phosphorylation of phosphoprotein enriched in astrocytes (PEA-15) regulates extracellular signal-regulated kinase-dependent transcription and cell proliferation. *Mol Biol Cell* **16**: 3552-3561

Kuan C-Y, Whitmarsh AJ, Yang DD, Liao G, Schloemer AJ, Dong C, Bao J, Banasiak KJ, Haddad GG, Flavell RA, Davis RJ, Rakic P (2003) A critical role of neural-specific JNK3 for ischemic apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 15184-15189

Kuan CY, Burke RE (2005) Targeting the JNK signaling pathway for stroke and Parkinson's diseases therapy. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord* **4**: 63-67

Kuan CY, Yang DD, Samanta Roy DR, Davis RJ, Rakic P, Flavell RA (1999) The Jnk1 and Jnk2 protein kinases are required for regional specific apoptosis during early brain development. *Neuron* **22**: 667-676

Kuida K, Boucher DM (2004) Functions of MAP kinases: insights from gene-targeting studies. *J Biochem (Tokyo)* **135**: 653-656

Kumar JP, Hsiung F, Powers MA, Moses K (2003a) Nuclear translocation of activated MAP kinase is developmentally regulated in the developing *Drosophila* eye. *Development* **130**: 3703-3714

Kumar JP, Tio M, Hsiung F, Akopyan S, Gabay L, Seger R, Shilo BZ, Moses K (1998) Dissecting the roles of the *Drosophila* EGF receptor in eye development and MAP kinase activation. *Development* **125**: 3875-3885

Kumar N, Robidoux J, Daniel KW, Guzman G, Floering LM, Collins S (2007) Requirement of vimentin filament assembly for beta3-adrenergic receptor activation of ERK MAP kinase and lipolysis. *J Biol Chem* **282**: 9244-9250

Kumar NV, Bernstein LR (2001) Ten ERK-related proteins in three distinct classes associate with AP-1 proteins and/or AP-1 DNA. *J Biol Chem* **276**: 32362-32372

Kumar S, Boehm J, Lee JC (2003b) p38 MAP kinases: key signalling molecules as therapeutic targets for inflammatory diseases. *Nat Rev Drug Discov* **2**: 717-726

Kumar S, McDonnell PC, Gum RJ, Hand AT, Lee JC, Young PR (1997) Novel homologues of CSBP/p38 MAP kinase: activation, substrate specificity and sensitivity to inhibition by pyridinyl imidazoles. *Biochem Biophys Res Commun* **235**: 533-538

Kummer JL, Rao PK, Heidenreich KA (1997) Apoptosis induced by withdrawal of trophic factors is mediated by p38 mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem* **272**: 20490-20494

Kuo W-L, Duke CJ, Abe MK, Kaplan EL, Gomes S, Rosner MR (2004) ERK7 Expression and Kinase Activity Is Regulated by the Ubiquitin-Proteasome Pathway. *Journal of Biological Chemistry* **279**: 23073-23081

Kurahashi T, Nomura T, Kanei-Ishii C, Shinkai Y, Ishii S (2005) The Wnt-NLK Signaling Pathway Inhibits A-Myb Activity by Inhibiting the Association with Coactivator CBP and Methylating Histone H3. *Mol Biol Cell* **16**: 4705-4713

Kurzbauer R, Teis D, de Araujo ME, Maurer-Stroh S, Eisenhaber F, Bourenkov GP, Bartunik HD, Hekman M, Rapp UR, Huber LA, Clausen T (2004) Crystal structure of the p14/MP1 scaffolding complex: how a twin couple attaches mitogen-activated protein kinase signaling to late endosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 10984-10989

Kusari AB, Molina DM, Sabbagh W, Jr., Lau CS, Bardwell L (2004) A conserved protein interaction network involving the yeast MAP kinases Fus3 and Kss1. *J Cell Biol* **164**: 267-277

Kutay U, Guttinger S (2005) Leucine-rich nuclear-export signals: born to be weak. *Trends in Cell Biology* **15**: 121-124

Kwan JJ, Warner N, Maini J, Chan Tung KW, Zakaria H, Pawson T, Donaldson LW (2006) *Saccharomyces cerevisiae* Ste50 binds the MAPKKK Ste11 through a head-to-tail SAM domain interaction. *J Mol Biol* **356**: 142-154

Kwan JJ, Warner N, Pawson T, Donaldson LW (2004) The solution structure of the *S.cerevisiae* Ste11 MAPKKK SAM domain and its partnership with Ste50. *J Mol Biol* **342**: 681-693

Kyosseva SV (2004a) Mitogen-activated protein kinase signaling. *Int Rev Neurobiol* **59**: 201-220

Kyosseva SV (2004b) The role of the extracellular signal-regulated kinase pathway in cerebellar abnormalities in schizophrenia. *Cerebellum* **3**: 94-99

Kyriakis JM (2006) The integration of signaling by multiprotein complexes containing Raf kinases. *Biochim Biophys Acta (BBA) - Mol Cell Res* **Sous presse**

Kyriakis JM, App H, Zhang XF, Banerjee P, Brautigan DL, Rapp UR, Avruch J (1992) Raf-1 activates MAP kinase-kinase. *Nature* **358**: 417-421

Kyriakis JM, Avruch J (2001) Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. *Physiol Rev* **81**: 807-869

Kyriakis JM, Banerjee P, Nikolakaki E, Dai T, Rubie EA, Ahmad MF, Avruch J, Woodgett JR (1994) The stress-activated protein kinase subfamily of c-Jun kinases. *Nature* **369**: 156-160

Lamson RE, Takahashi S, Winters MJ, Pryciak PM (2006) Dual role for membrane localization in yeast MAP kinase cascade activation and its contribution to signaling fidelity. *Curr Biol* **16**: 618-623

Lange A, Mills RE, Lange CJ, Stewart M, Devine SE, Corbett AH (2007) Classical Nuclear Localization Signals: Definition, Function, and Interaction with Importin {alpha}. *J Biol Chem* **282**: 5101-5105

Lange-Carter CA, Johnson GL (1994) Ras-dependent growth factor regulation of MEK kinase in PC12 cells. *Science* **265**: 1458-1461

Lao D-H, Chandramouli S, Yusoff P, Fong CW, Saw TY, Tai LP, Yu CY, Leong HF, Guy GR (2006) A Src Homology 3-binding Sequence on the C Terminus of Sprouty2 Is Necessary for Inhibition of the Ras/ERK Pathway Downstream of Fibroblast Growth Factor Receptor Stimulation. *J Biol Chem* **281**: 29993-30000

Lavoie JN, L'Allemain G, Brunet A, Muller R, Pouyssegur J (1996a) Cyclin D1 expression is regulated positively by the p42/p44MAPK and negatively by the p38/HOGMAPK pathway. *J Biol Chem* **271**: 20608-20616

Lavoie JN, Rivard N, L'Allemain G, Pouyssegur J (1996b) A temporal and biochemical link between growth factor-activated MAP kinases, cyclin D1 induction and cell cycle entry. *Prog Cell Cycle Res* **2**: 49-58

Lawler S, Fleming Y, Goedert M, Cohen P (1998) Synergistic activation of SAPK1/JNK1 by two MAP kinase kinases in vitro. *Curr Biol* **8**: 1387-1390

Le Gallic L, Sgouras D, Beal G, Jr., Mavrothalassitis G (1999) Transcriptional repressor ERF is a Ras/mitogen-activated protein kinase target that regulates cellular proliferation. *Mol Cell Biol* **19**: 4121-4133

Lechner C, Zahalka MA, Giot JF, Moller NP, Ullrich A (1996) ERK6, a mitogen-activated protein kinase involved in C2C12 myoblast differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 4355-4359

Lee CM, Onesime D, Reddy CD, Dhanasekaran N, Reddy EP (2002) JLP: A scaffolding protein that tethers JNK/p38MAPK signaling modules and transcription factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 14189-14194

Lee FS, Hagler J, Chen ZJ, Maniatis T (1997) Activation of the IkappaB alpha kinase complex by MEKK1, a kinase of the JNK pathway. *Cell* **88**: 213-222

Lee JC, Kumar S, Griswold DE, Underwood DC, Votta BJ, Adams JL (2000) Inhibition of p38 MAP kinase as a therapeutic strategy. *Immunopharmacology* **47**: 185-201

Lee JC, Laydon JT, McDonnell PC, Gallagher TF, Kumar S, Green D, McNulty D, Blumenthal MJ, Heys JR, Landvatter SW, et al. (1994) A protein kinase involved in the regulation of inflammatory cytokine biosynthesis. *Nature* **372**: 739-746

Lee JD, Ulevitch RJ, Han JH (1995) Primary Structure of BMK1: A New Mammalian MAP Kinase. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **213**: 715-724

Lee KS, Irie K, Gotoh Y, Watanabe Y, Araki H, Nishida E, Matsumoto K, Levin DE (1993) A yeast mitogen-activated protein kinase homolog (Mpk1p) mediates signalling by protein kinase C. *Mol Cell Biol* **13**: 3067-3075

Lee MR, Dominguez C (2005) MAP kinase p38 inhibitors: clinical results and an intimate look at their interactions with p38alpha protein. *Curr Med Chem* **12**: 2979-2994

Lee T, Hoofnagle AN, Kabuyama Y, Stroud J, Min X, Goldsmith EJ, Chen L, Resing KA, Ahn NG (2004) Docking motif interactions in MAP kinases revealed by hydrogen exchange mass spectrometry. *Mol Cell* **14**: 43-55

Lee YH, Giraud J, Davis RJ, White MF (2003) c-Jun N-terminal Kinase (JNK) Mediates Feedback Inhibition of the Insulin Signaling Cascade. *J Biol Chem* **278**: 2896-2902

Leevers SJ, Marshall CJ (1992) Activation of extracellular signal-regulated kinase, ERK2, by p21ras oncoprotein. *Embo J* **11**: 569-574

Lehner MD, Schwoebel F, Kotlyarov A, Leist M, Gaestel M, Hartung T (2002) Mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 2-deficient mice show increased susceptibility to *Listeria monocytogenes* infection. *J Immunol* **168**: 4667-4673

Leighton IA, Dalby KN, Caudwell FB, Cohen PT, Cohen P (1995) Comparison of the specificities of p70 S6 kinase and MAPKAP kinase-1 identifies a relatively specific substrate for p70 S6 kinase: the N-terminal kinase domain of MAPKAP kinase-1 is essential for peptide phosphorylation. *FEBS Lett* **375**: 289-293

Leinweber BD, Leavis PC, Grabarek Z, Wang CL, Morgan KG (1999) Extracellular regulated kinase (ERK) interaction with actin and the calponin homology (CH) domain of actin-binding proteins. *Biochem J* **344 Pt 1**: 117-123

Lenormand P, Brondello JM, Brunet A, Pouyssegur J (1998) Growth factor-induced p42/p44 MAPK nuclear translocation and retention requires both MAPK activation and neosynthesis of nuclear anchoring proteins. *J Cell Biol* **142**: 625-633

Lenormand P, McMahon M, Pouyssegur J (1996) Oncogenic Raf-1 activates p70 S6 kinase via a mitogen-activated protein kinase-independent pathway. *J Biol Chem* **271**: 15762-15768

Lenormand P, Sardet C, Pages G, L'Allemain G, Brunet A, Pouyssegur J (1993) Growth factors induce nuclear translocation of MAP kinases (p42mapk and p44mapk) but not of their activator MAP kinase kinase (p45mapkk) in fibroblasts. *J Cell Biol* **122**: 1079-1088

Letourneux C, Rocher G, Porteu F (2006) B56-containing PP2A dephosphorylate ERK and their activity is controlled by the early gene IEX-1 and ERK. *Embo J* **25**: 727-738

Levin DE (2005) Cell wall integrity signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev* **69**: 262-291

Li G, Qian H (2003) Sensitivity and specificity amplification in signal transduction. *Cell Biochem Biophys* **39**: 45-59

Li SP, Junttila MR, Han J, Kahari VM, Westermarck J (2003) p38 Mitogen-activated protein kinase pathway suppresses cell survival by inducing dephosphorylation of mitogen-activated protein/extracellular signal-regulated kinase 1,2. *Cancer Res* **63**: 3473-3477

Li Z, Jiang Y, Ulevitch RJ, Han J (1996) The primary structure of p38 gamma: a new member of p38 group of MAP kinases. *Biochem Biophys Res Commun* **228**: 334-340

Li Z, Kim SH, Higgins JM, Brenner MB, Sacks DB (1999) IQGAP1 and calmodulin modulate E-cadherin function. *J Biol Chem* **274**: 37885-37892

- Liang Q, Molkenin JD (2003) Redefining the roles of p38 and JNK signaling in cardiac hypertrophy: dichotomy between cultured myocytes and animal models. *Journal of molecular and cellular cardiology* **35**: 1385-1394
- Liao P, Georgakopoulos D, Kovacs A, Zheng M, Lerner D, Pu H, Saffitz J, Chien K, Xiao RP, Kass DA, Wang Y (2001) The in vivo role of p38 MAP kinases in cardiac remodeling and restrictive cardiomyopathy. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 12283-12288
- Lim RY, Huang NP, Koser J, Deng J, Lau KH, Schwarz-Herion K, Fahrenkrog B, Aebi U (2006) Flexible phenylalanine-glycine nucleoporins as entropic barriers to nucleocytoplasmic transport. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 9512-9517
- Lin LL, Wartmann M, Lin AY, Knopf JL, Seth A, Davis RJ (1993) cPLA2 is phosphorylated and activated by MAP kinase. *Cell* **72**: 269-278
- Lipmann FA, Levene PA (1932) Serinephosphoric acid obtained on hydrolysis of vitellinic acid. *J Biol Chem* **98**: 109-114
- Lisnock J, Griffin P, Calaycay J, Frantz B, Parsons J, O'Keefe SJ, LoGrasso P (2000) Activation of JNK3 alpha 1 requires both MKK4 and MKK7: kinetic characterization of in vitro phosphorylated JNK3 alpha 1. *Biochemistry* **39**: 3141-3148
- Liu Q, Hofmann PA (2004) Protein phosphatase 2A-mediated cross-talk between p38 MAPK and ERK in apoptosis of cardiac myocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **286**: H2204-2212
- Liu S, Sun JP, Zhou B, Zhang ZY (2006) Structural basis of docking interactions between ERK2 and MAP kinase phosphatase 3. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 5326-5331
- Liu Y, Suzuki YJ, Day RM, Fanburg BL (2004) Rho kinase-induced nuclear translocation of ERK1/ERK2 in smooth muscle cell mitogenesis caused by serotonin. *Circulation research* **95**: 579-586
- Liu ZX, Yu CF, Nickel C, Thomas S, Cantley LG (2002) Hepatocyte growth factor induces ERK-dependent paxillin phosphorylation and regulates paxillin-focal adhesion kinase association. *J Biol Chem* **277**: 10452-10458
- Lorenz K, Lohse MJ, Quitterer U (2003) Protein kinase C switches the Raf kinase inhibitor from Raf-1 to GRK-2. *Nature* **426**: 574-579

Lorenzen JA, Baker SE, Denhez F, Melnick MB, Brower DL, Perkins LA (2001) Nuclear import of activated D-ERK by DIM-7, an importin family member encoded by the gene moleskin. *Development* **128**: 1403-1414

Lou Y, Xie W, Zhang DF, Yao JH, Luo ZF, Wang YZ, Shi YY, Yao XB (2004a) Nek2A specifies the centrosomal localization of Erk2. *Biochem Biophys Res Commun* **321**: 495-501

Lou Y, Yao J, Zereshki A, Dou Z, Ahmed K, Wang H, Hu J, Wang Y, Yao X (2004b) NEK2A interacts with MAD1 and possibly functions as a novel integrator of the spindle checkpoint signaling. *J Biol Chem* **279**: 20049-20057

Lu HT, Yang DD, Wysk M, Gatti E, Mellman I, Davis RJ (1999) Defective IL-12 production in mitogen-activated protein (MAP) kinase kinase 3 (Mkk3)-deficient mice. *EMBO J* **18**: 1845-1857

Lu L, Koya E, Zhai H, Hope BT, Shaham Y (2006) Role of ERK in cocaine addiction. *Trends in neurosciences* **29**: 695-703

Lu Z, Xu S, Joazeiro C, Cobb MH, Hunter T (2002) The PHD domain of MEKK1 acts as an E3 ubiquitin ligase and mediates ubiquitination and degradation of ERK1/2. *Mol Cell* **9**: 945-956

Luttrell LM, Roudabush FL, Choy EW, Miller WE, Field ME, Pierce KL, Lefkowitz RJ (2001) Activation and targeting of extracellular signal-regulated kinases by beta-arrestin scaffolds. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 2449-2454

Ma D, Cook JG, Thorner J (1995) Phosphorylation and localization of Kss1, a MAP kinase of the *Saccharomyces cerevisiae* pheromone response pathway. *Mol Biol Cell* **6**: 889-909

Ma W, Quirion R (2005) The ERK/MAPK pathway, as a target for the treatment of neuropathic pain. *Expert Opin Ther Targets* **9**: 699-713

Macara IG (2001) Transport into and out of the nucleus. *Microbiol Mol Biol Rev* **65**: 570-594, table of contents

Macdonald SG, Crews CM, Wu L, Driller J, Clark R, Erikson RL, McCormick F (1993) Reconstitution of the Raf-1-MEK-ERK signal transduction pathway in vitro. *Mol Cell Biol* **13**: 6615-6620

- Mackeigan JP, Murphy LO, Dimitri CA, Blenis J (2005) Graded mitogen-activated protein kinase activity precedes switch-like c-Fos induction in mammalian cells. *Mol Cell Biol* **25**: 4676-4682
- MacKenzie SJ, Baillie GS, McPhee I, Bolger GB, Houslay MD (2000) ERK2 mitogen-activated protein kinase binding, phosphorylation, and regulation of the PDE4D cAMP-specific phosphodiesterases. The involvement of COOH-terminal docking sites and NH2-terminal UCR regions. *J Biol Chem* **275**: 16609-16617
- Madhani HD, Fink GR (1997) Combinatorial control required for the specificity of yeast MAPK signaling. *Science* **275**: 1314
- Madhani HD, Fink GR (1998) The control of filamentous differentiation and virulence in fungi. *Trends Cell Biol* **8**: 348
- Madhani HD, Styles CA, Fink GR (1997) MAP kinases with distinct inhibitory functions impart signaling specificity during yeast differentiation. *Cell* **91**: 673
- Madrid M, Soto T, Khong HK, Franco A, Vicente J, Perez P, Gacto M, Cansado J (2006) Stress-induced Response, Localization, and Regulation of the Pmk1 Cell Integrity Pathway in *Schizosaccharomyces pombe*. *J Biol Chem* **281**: 2033-2043
- Maeda T, Takekawa M, Saito H (1995) Activation of yeast PBS2 MAPKK by MAPKKs or by binding of an SH3-containing osmosensor. *Science* **269**: 554-558
- Maekawa M, Nishida E, Tanoue T (2002) Identification of the Anti-proliferative protein Tob as a MAPK substrate. *J Biol Chem* **277**: 37783-37787
- Maekawa M, Yamamoto T, Nishida E (2004) Regulation of subcellular localization of the antiproliferative protein Tob by its nuclear export signal and bipartite nuclear localization signal sequences. *Exp Cell Res* **295**: 59-65
- Magee T, Seabra MC (2005) Fatty acylation and prenylation of proteins: what's hot in fat. *Current Opinion in Cell Biology* **17**: 190-196
- Mahalingam M, Cooper JA (2001) Phosphorylation of mammalian eIF4E by Mnk1 and Mnk2: tantalizing prospects for a role in translation. *Prog Mol Subcell Biol* **27**: 132-142
- Mahanty SK, Wang Y, Farley FW, Elion EA (1999) Nuclear shuttling of yeast scaffold Ste5 is required for its recruitment to the plasma membrane and activation of the mating MAPK cascade. *Cell* **98**: 501

- Malumbres M, Barbacid M (2007) Cell cycle kinases in cancer. *Curr Opin Genet Dev* **17**: 60-65
- Mandl M, Slack DN, Keyse SM (2005) Specific inactivation and nuclear anchoring of extracellular signal-regulated kinase 2 by the inducible dual-specificity protein phosphatase DUSP5. *Mol Cell Biol* **25**: 1830-1845
- Manning AM, Davis RJ (2003) Targeting JNK for therapeutic benefit: from junk to gold? *Nat Rev Drug Discov* **2**: 554-565
- Manning G, Whyte DB, Martinez R, Hunter T, Sudarsanam S (2002) The protein kinase complement of the human genome. *Science* **298**: 1912-1934
- Mansour SJ, Candia JM, Matsuura JE, Manning MC, Ahn NG (1996) Interdependent domains controlling the enzymatic activity of mitogen-activated protein kinase kinase 1. *Biochemistry* **35**: 15529-15536
- Mansour SJ, Matten WT, Hermann AS, Candia JM, Rong S, Fukasawa K, Vande Woude GF, Ahn NG (1994) Transformation of mammalian cells by constitutively active MAP kinase kinase. *Science* **265**: 966-970
- Marchetti S, Gimond C, Chambard J-C, Touboul T, Roux D, Pouyssegur J, Pages G (2005) Extracellular Signal-Regulated Kinases Phosphorylate Mitogen-Activated Protein Kinase Phosphatase 3/DUSP6 at Serines 159 and 197, Two Sites Critical for Its Proteasomal Degradation. *Mol Cell Biol* **25**: 854-864
- Marcus S, Polverino A, Barr M, Wigler M (1994) Complexes between STE5 and components of the pheromone-responsive mitogen-activated protein kinase module. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**: 7762-7766
- Marenda DR, Vrailas AD, Rodrigues AB, Cook S, Powers MA, Lorenzen JA, Perkins LA, Moses K (2006) MAP kinase subcellular localization controls both pattern and proliferation in the developing *Drosophila* wing. *Development* **133**: 43-51
- Markevich NI, Tsyganov MA, Hoek JB, Kholodenko BN (2006) Long-range signaling by phosphoprotein waves arising from bistability in protein kinase cascades. *Mol Syst Biol* **2**: 61
- Marshall CJ (1995) Specificity of receptor tyrosine kinase signaling: transient versus sustained extracellular signal-regulated kinase activation. *Cell* **80**: 179-185

Marti A, Luo Z, Cunningham C, Ohta Y, Hartwig J, Stossel TP, Kyriakis JM, Avruch J (1997) Actin-binding protein-280 binds the stress-activated protein kinase (SAPK) activator SEK-1 and is required for tumor necrosis factor-alpha activation of SAPK in melanoma cells. *The Journal of biological chemistry* **272**: 2620-2628

Marti F, Krause A, Post NH, Lyddane C, Dupont B, Sadelain M, King PD (2001) Negative-Feedback Regulation of CD28 Costimulation by a Novel Mitogen-Activated Protein Kinase Phosphatase, MKP6. *J Immunol* **166**: 197-206

Marzec M, Kasprzycka M, Liu X, Raghunath PN, Wlodarski P, Wasik MA (2006) Oncogenic tyrosine kinase NPM//ALK induces activation of the MEK//ERK signaling pathway independently of c-Raf. *Oncogene* **26**: 813-821

Mason CS, Springer CJ, Cooper RG, Superti-Furga G, Marshall CJ, Marais R (1999) Serine and tyrosine phosphorylations cooperate in Raf-1, but not B-Raf activation. *Embo J* **18**: 2137-2148

Matsubayashi Y, Fukuda M, Nishida E (2001) Evidence for existence of a nuclear pore complex-mediated, cytosol-independent pathway of nuclear translocation of ERK MAP kinase in permeabilized cells. *J Biol Chem* **276**: 41755-41760

Matsuda S, Gotoh Y, Nishida E (1993) Phosphorylation of Xenopus mitogen-activated protein (MAP) kinase by MAP kinase kinase kinase and MAP kinase. *J Biol Chem* **268**: 3277-3281

Matsuyama W, Faure M, Yoshimura T (2003) Activation of discoidin domain receptor 1 facilitates the maturation of human monocyte-derived dendritic cells through the TNF receptor associated factor 6/TGF-beta-activated protein kinase 1 binding protein 1 beta/p38 alpha mitogen-activated protein kinase signaling cascade. *J Immunol* **171**: 3520-3532

Matthews HR (1995) Protein kinases and phosphatases that act on histidine, lysine, or arginine residues in eukaryotic proteins: a possible regulator of the mitogen-activated protein kinase cascade. *Pharmacol Ther* **67**: 323-350

Matthews HR, Huebner VD (1984) Nuclear protein kinases. *Mol Cell Biochem* **59**: 81-99

Mattison CP, Ota IM (2000) Two protein tyrosine phosphatases, Ptp2 and Ptp3, modulate the subcellular localization of the Hog1 MAP kinase in yeast. *Genes Dev* **14**: 1229-1235

Mazzucchelli C, Vantaggiato C, Ciamei A, Fasano S, Pakhotin P, Krezel W, Welzl H, Wolfer DP, Pages G, Valverde O, Marowsky A, Porrazzo A, Orban PC, Maldonado R, Ehrenguber MU, Cestari V, Lipp HP, Chapman PF, Pouyssegur J, Brambilla R (2002)

Knockout of ERK1 MAP kinase enhances synaptic plasticity in the striatum and facilitates striatal-mediated learning and memory. *Neuron* **34**: 807-820

McCubrey JA, Steelman LS, Chappell WH, Abrams SL, Wong EWT, Chang F, Lehmann B, Terrian DM, Milella M, Tafuri A, Stivala F, Libra M, Basecke J, Evangelisti C, Martelli AM, Franklin RA (2006) Roles of the Raf/MEK/ERK pathway in cell growth, malignant transformation and drug resistance. *Biochim Biophys Acta (BBA) - Mol Cell Res* **Sous presse**

McDonald PH, Chow CW, Miller WE, Laporte SA, Field ME, Lin FT, Davis RJ, Lefkowitz RJ (2000) Beta-arrestin 2: a receptor-regulated MAPK scaffold for the activation of JNK3. *Science* **290**: 1574-1577

McMullen ME, Bryant PW, Glembotski CC, Vincent PA, Pumiglia KM (2005) Activation of p38 has opposing effects on the proliferation and migration of endothelial cells. *J Biol Chem* **280**: 20995-21003

Meggio F, Pinna LA (2003) One-thousand-and-one substrates of protein kinase CK2? *Faseb J* **17**: 349-368

Meggio F, Pinna LA, Sarno S (1995) Casein kinase-2 and cell signaling. In *Biochemistry of cell membranes : a compendium of selected topics*, Papa S, Tager JM (eds). Boston: Birkhäuser Verlag, Basel

Mehta PK, Griendling KK (2007) Angiotensin II cell signaling: physiological and pathological effects in the cardiovascular system. *American journal of physiology* **292**: C82-97

Meloche S (1995) Cell cycle reentry of mammalian fibroblasts is accompanied by the sustained activation of p44mapk and p42mapk isoforms in the G1 phase and their inactivation at the G1/S transition. *J Cell Physiol* **163**: 577-588

Meloche S, Pages G, Pouyssegur J (1992a) Functional expression and growth factor activation of an epitope-tagged p44 mitogen-activated protein kinase, p44mapk. *Mol Biol Cell* **3**: 63-71

Meloche S, Pouyssegur J (2007) The ERK1/2 mitogen-activated protein kinase pathway as a master regulator of the G1- to S-phase transition. *Oncogene* **26**: 3227-3239

Meloche S, Seuwen K, Pages G, Pouyssegur J (1992b) Biphasic and synergistic activation of p44mapk (ERK1) by growth factors: correlation between late phase activation and mitogenicity. *Mol Endocrinol* **6**: 845-854

- Meloche S, Vella FD, Voisin L, Ang SL, Saba-El-Leil M (2004) Erk2 signaling and early embryo stem cell self-renewal. *Cell Cycle* **3**: 241-243
- Meneghini MD, Ishitani T, Carter JC, Hisamoto N, Ninomiya-Tsuji J, Thorpe CJ, Hamill DR, Matsumoto K, Bowerman B (1999) MAP kinase and Wnt pathways converge to downregulate an HMG-domain repressor in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **399**: 793-797
- Menice CB, Hulvershorn J, Adam LP, Wang CA, Morgan KG (1997) Calponin and mitogen-activated protein kinase signaling in differentiated vascular smooth muscle. *J Biol Chem* **272**: 25157-25161
- Meraldi P, Honda R, Nigg EA (2004) Aurora kinases link chromosome segregation and cell division to cancer susceptibility. *Curr Opin Genet Dev* **14**: 29-36
- Mercer K, Chiloeches A, Huser M, Kiernan M, Marais R, Pritchard C (2002) ERK signalling and oncogene transformation are not impaired in cells lacking A-Raf. *Oncogene* **21**: 347-355
- Messersmith WA, Hidalgo M, Carducci M, Eckhardt SG (2006) Novel targets in solid tumors: MEK inhibitors. *Clin Adv Hematol Oncol* **4**: 831-836
- Meyer DI, Dobberstein B (1980) Identification and characterization of a membrane component essential for the translocation of nascent proteins across the membrane of the endoplasmic reticulum. *J Cell Biol* **87**: 503-508
- Mikalsen T, Johannessen M, Moens U (2005) Sequence- and position-dependent tagging protects extracellular-regulated kinase 3 protein from 26S proteasome-mediated degradation. *Int J Biochem Cell Biol* **37**: 2513-2520
- Mikula M, Schreiber M, Husak Z, Kucerova L, Ruth J, Wieser R, Zatloukal K, Beug H, Wagner EF, Baccarini M (2001) Embryonic lethality and fetal liver apoptosis in mice lacking the c-raf-1 gene. *Embo J* **20**: 1952-1962
- Minden A, Lin A, McMahon M, Lange-Carter C, Derijard B, Davis RJ, Johnson GL, Karin M (1994) Differential activation of ERK and JNK mitogen-activated protein kinases by Raf-1 and MEKK. *Science* **266**: 1719-1723
- Mita H, Tsutsui J, Takekawa M, Witten EA, Saito H (2002) Regulation of MTK1/MEKK4 kinase activity by its N-terminal autoinhibitory domain and GADD45 binding. *Mol Cell Biol* **22**: 4544-4555

Mitsushima M, Suwa A, Amachi T, Ueda K, Kioka N (2004) Extracellular signal-regulated kinase activated by epidermal growth factor and cell adhesion interacts with and phosphorylates vinexin. *J Biol Chem* **279**: 34570-34577

Mittelstadt PR, Salvador JM, Fornace AJ, Jr., Ashwell JD (2005) Activating p38 MAPK: new tricks for an old kinase. *Cell Cycle* **4**: 1189-1192

Mizuno T (1998) His-Asp phosphotransfer signal transduction. *J Biochem (Tokyo)* **123**: 555-563

Mody N, Campbell DG, Morrice N, Peggie M, Cohen P (2003) An analysis of the phosphorylation and activation of extracellular-signal-regulated protein kinase 5 (ERK5) by mitogen-activated protein kinase kinase 5 (MKK5) in vitro. *Biochem J* **372**: 567-575

Mody N, Leitch J, Armstrong C, Dixon J, Cohen P (2001) Effects of MAP kinase cascade inhibitors on the MKK5/ERK5 pathway. *FEBS Letters* **502**: 21-24

Moffit JS, Boekelheide K, Sedivy JM, Klysik J (2007) Mice lacking Raf Kinase Inhibitor Protein-1 (RKIP-1) have altered sperm capacitation and reduced reproduction rates with a normal response to testicular injury. *J Androl*

Molina DM, Grewal S, Bardwell L (2005) Characterization of an ERK-binding domain in microphthalmia-associated transcription factor and differential inhibition of ERK2-mediated substrate phosphorylation. *J Biol Chem* **280**: 42051-42060

Molkentin JD (2004) Calcineurin-NFAT signaling regulates the cardiac hypertrophic response in coordination with the MAPKs. *Cardiovascular research* **63**: 467-475

Monsigny M, Rondanino C, Duverger E, Fajac I, Roche AC (2004) Glyco-dependent nuclear import of glycoproteins, glycoplexes and glycosylated plasmids. *Biochim Biophys Acta* **1673**: 94-103

Moodie SA, Willumsen BM, Weber MJ, Wolfman A (1993) Complexes of Ras.GTP with Raf-1 and mitogen-activated protein kinase kinase. *Science* **260**: 1658-1661

Moon RT (2005) Wnt/beta-catenin pathway. *Sci STKE* **2005**: cm1

Mor A, Philips MR (2006) Compartmentalized Ras/MAPK signaling. *Annu Rev Immunol* **24**: 771-800

Morgenstern JP, Land H (1990) Advanced mammalian gene transfer: high titre retroviral vectors with multiple drug selection markers and a complementary helper-free packaging cell line. *Nucleic Acids Res* **18**: 3587-3596

Moriguchi T, Gotoh Y, Nishida E (1995) Activation of two isoforms of mitogen-activated protein kinase kinase in response to epidermal growth factor and nerve growth factor. *Eur J Biochem* **234**: 32-38

Moriguchi T, Kuroyanagi N, Yamaguchi K, Gotoh Y, Irie K, Kano T, Shirakabe K, Muro Y, Shibuya H, Matsumoto K, Nishida E, Hagiwara M (1996) A novel kinase cascade mediated by mitogen-activated protein kinase kinase 6 and MKK3. *J Biol Chem* **271**: 13675-13679

Morrison DK, Davis RJ (2003) Regulation of MAP kinase signaling modules by scaffold proteins in mammals. *Annu Rev Cell Dev Biol* **19**: 91-118

Mosch HU, Roberts RL, Fink GR (1996) Ras2 signals via the Cdc42/Ste20/mitogen-activated protein kinase module to induce filamentous growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 5352-5356

Muda M, Boschert U, Dickinson R, Martinou JC, Martinou I, Camps M, Schlegel W, Arkinstall S (1996) MKP-3, a novel cytosolic protein-tyrosine phosphatase that exemplifies a new class of mitogen-activated protein kinase phosphatase. *J Biol Chem* **271**: 4319-4326

Mudgett JS, Ding J, Guh-Siesel L, Chartrain NA, Yang L, Gopal S, Shen MM (2000) Essential role for p38alpha mitogen-activated protein kinase in placental angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 10454-10459

Mukhopadhyay NK, Price DJ, Kyriakis JM, Pelech S, Sanghera J, Avruch J (1992) An array of insulin-activated, proline-directed serine/threonine protein kinases phosphorylate the p70 S6 kinase. *J Biol Chem* **267**: 3325-3335

Muller J, Ory S, Copeland T, Piwnica-Worms H, Morrison DK (2001) C-TAK1 regulates Ras signaling by phosphorylating the MAPK scaffold, KSR1. *Mol Cell* **8**: 983-993

Murakami S, Balmes G, McKinney S, Zhang Z, Givol D, de Crombrughe B (2004) Constitutive activation of MEK1 in chondrocytes causes Stat1-independent achondroplasia-like dwarfism and rescues the Fgfr3-deficient mouse phenotype. *Genes Dev* **18**: 290-305

Murphy LO, Blenis J (2006) MAPK signal specificity: the right place at the right time. *Trends Biochem Sci* **31**: 268-275

Murphy LO, MacKeigan JP, Blenis J (2004) A network of immediate early gene products propagates subtle differences in mitogen-activated protein kinase signal amplitude and duration. *Mol Cell Biol* **24**: 144-153

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

Mustelin T, Tautz L, Page R (2005) Structure of the hematopoietic tyrosine phosphatase (HePTP) catalytic domain: structure of a KIM phosphatase with phosphate bound at the active site. *J Mol Biol* **354**: 150-163

Nachury MV, Weis K (1999) The direction of transport through the nuclear pore can be inverted. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 9622-9627

Nakamura M, Yamaguchi S (2006) The Ubiquitin-like Protein MNSFbeta Regulates ERK-MAPK Cascade. *J Biol Chem* **281**: 16861-16869

Nakielny S, Campbell DG, Cohen P (1992a) MAP kinase kinase from rabbit skeletal muscle. A novel dual specificity enzyme showing homology to yeast protein kinases involved in pheromone-dependent signal transduction. *FEBS Lett* **308**: 183-189

Nakielny S, Cohen P, Wu J, Sturgill T (1992b) MAP kinase activator from insulin-stimulated skeletal muscle is a protein threonine/tyrosine kinase. *Embo J* **11**: 2123-2129

Negri S, Oberson A, Steinmann M, Sauser C, Nicod P, Waeber G, Schorderet DF, Bonny C (2000) cDNA cloning and mapping of a novel islet-brain/JNK-interacting protein. *Genomics* **64**: 324-330

Neiman AM, Herskowitz I (1994) Reconstitution of a yeast protein kinase cascade in vitro: activation of the yeast MEK homologue STE7 by STE11. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**: 3398-3402

Nekrasova T, Shive C, Gao Y, Kawamura K, Guardia R, Landreth G, Forsthuber TG (2005) ERK1-deficient mice show normal T cell effector function and are highly susceptible to experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* **175**: 2374-2380

Nelson TJ, Alkon DL (2005) Insulin and cholesterol pathways in neuronal function, memory and neurodegeneration. *Biochem Soc Trans* **33**: 1033-1036

Nemenoff RA, Winitz S, Qian NX, Van Putten V, Johnson GL, Heasley LE (1993) Phosphorylation and activation of a high molecular weight form of phospholipase A2 by

p42 microtubule-associated protein 2 kinase and protein kinase C. *J Biol Chem* **268**: 1960-1964

Nguyen AN, Ikner AD, Shiozaki M, Warren SM, Shiozaki K (2002) Cytoplasmic Localization of Wis1 MAPKK by Nuclear Export Signal Is Important for Nuclear Targeting of Spc1/Sty1 MAPK in Fission Yeast. *Mol Biol Cell* **13**: 2651-2663

Nichols A, Camps M, Gillieron C, Chabert C, Brunet A, Wilsbacher J, Cobb M, Pouyssegur J, Shaw JP, Arkinstall S (2000) Substrate recognition domains within extracellular signal-regulated kinase mediate binding and catalytic activation of mitogen-activated protein kinase phosphatase-3. *J Biol Chem* **275**: 24613-24621

Nishimoto S, Nishida E (2006) MAPK signalling: ERK5 versus ERK1/2. *EMBO Rep* **7**: 782-786

Nishina H, Fischer KD, Radvanyi L, Shahinian A, Hakem R, Rubie EA, Bernstein A, Mak TW, Woodgett JR, Penninger JM (1997) Stress-signalling kinase Sek1 protects thymocytes from apoptosis mediated by CD95 and CD3. *Nature* **385**: 350-353

Nishina H, Vaz C, Billia P, Nghiem M, Sasaki T, De la Pompa JL (1999) Defective liver formation and liver cell apoptosis in mice lacking the stress signaling kinase SEK1//MKK4. *Development* **126**: 505-516

Nori M, L'Allemain G, Weber MJ (1992) Regulation of tetradecanoyl phorbol acetate-induced responses in NIH 3T3 cells by GAP, the GTPase-activating protein associated with p21c-ras. *Mol Cell Biol* **12**: 936-945

Northwood IC, Gonzalez FA, Wartmann M, Raden DL, Davis RJ (1991) Isolation and characterization of two growth factor-stimulated protein kinases that phosphorylate the epidermal growth factor receptor at threonine 669. *J Biol Chem* **266**: 15266-15276

O'Neill E, Kolch W (2004) Conferring specificity on the ubiquitous Raf/MEK signalling pathway. *Br J Cancer* **90**: 283-288

O'Neill T, Giarratani L, Chen P, Iyer L, Lee CH, Bobiak M, Kanai F, Zhou BB, Chung JH, Rathbun GA (2002) Determination of substrate motifs for human Chk1 and hCds1/Chk2 by the oriented peptide library approach. *J Biol Chem* **277**: 16102-16115

O'Rourke SM, Herskowitz I, O'Shea EK (2002) Yeast go the whole HOG for the hyperosmotic response. *Trends Genet* **18**: 405-412

- Obata K, Noguchi K (2004) MAPK activation in nociceptive neurons and pain hypersensitivity. *Life Sci* **74**: 2643-2653
- Ogata M, Oh-hora M, Kosugi A, Hamaoka T (1999) Inactivation of mitogen-activated protein kinases by a mammalian tyrosine-specific phosphatase, PTPBR7. *Biochem Biophys Res Commun* **256**: 52-56
- Oh-hora M, Ogata M, Mori Y, Adachi M, Imai K, Kosugi A, Hamaoka T (1999) Direct suppression of TCR-mediated activation of extracellular signal-regulated kinase by leukocyte protein tyrosine phosphatase, a tyrosine-specific phosphatase. *J Immunol* **163**: 1282-1288
- Ohba Y, Kurokawa K, Matsuda M (2003) Mechanism of the spatio-temporal regulation of Ras and Rap1. *Embo J* **22**: 859-869
- Ohkawara B, Shirakabe K, Hyodo-Miura J, Matsuo R, Ueno N, Matsumoto K, Shibuya H (2004) Role of the TAK1-NLK-STAT3 pathway in TGF- β -mediated mesoderm induction. *Genes Dev* **18**: 381-386
- Ohkusu-Tsukada K, Tominaga N, Udono H, Yui K (2004) Regulation of the maintenance of peripheral T-cell anergy by TAB1-mediated p38 alpha activation. *Mol Cell Biol* **24**: 6957-6966
- Ohren JF, Chen H, Pavlovsky A, Whitehead C, Zhang E, Kuffa P, Yan C, McConnell P, Spessard C, Banotai C, Mueller WT, Delaney A, Omer C, Sebolt-Leopold J, Dudley DT, Leung IK, Flamme C, Warmus J, Kaufman M, Barrett S, Teclé H, Hasemann CA (2004) Structures of human MAP kinase kinase 1 (MEK1) and MEK2 describe novel noncompetitive kinase inhibition. *Nat Struct Mol Biol* **11**: 1192-1197
- Olsen JV, Blagoev B, Gnäd F, Macek B, Kumar C, Mortensen P, Mann M (2006) Global, In Vivo, and Site-Specific Phosphorylation Dynamics in Signaling Networks. *Cell* **127**: 635-648
- Olson JM, Hallahan AR (2004) p38 MAP kinase: a convergence point in cancer therapy. *Trends in molecular medicine* **10**: 125-129
- Ory S, Zhou M, Conrads TP, Veenstra TD, Morrison DK (2003) Protein phosphatase 2A positively regulates Ras signaling by dephosphorylating KSR1 and Raf-1 on critical 14-3-3 binding sites. *Curr Biol* **13**: 1356-1364
- Osawa M, Itoh S, Ohta S, Huang Q, Berk BC, Marmarosh NL, Che W, Ding B, Yan C, Abe J (2004) ERK1/2 associates with the c-Met-binding domain of growth factor receptor-

bound protein 2 (Grb2)-associated binder-1 (Gab1): role in ERK1/2 and early growth response factor-1 (Egr-1) nuclear accumulation. *J Biol Chem* **279**: 29691-29699

Otsu M, Terada Y, Okayama H (1993) Isolation of two members of the rat MAP kinase kinase gene family. *FEBS Lett* **320**: 246-250

Ozaki K, Miyazaki S, Tanimura S, Kohno M (2005) Efficient suppression of FGF-2-induced ERK activation by the cooperative interaction among mammalian Sprouty isoforms. *J Cell Sci* **118**: 5861-5871

Ozanne BW, Spence HJ, McGarry LC, Hennigan RF (2007) Transcription factors control invasion: AP-1 the first among equals. *Oncogene* **26**: 1-10

Pages G, Guerin S, Grall D, Bonino F, Smith A, Anjuere F, Auberger P, Pouyssegur J (1999) Defective thymocyte maturation in p44 MAP kinase (Erk 1) knockout mice. *Science* **286**: 1374-1377

Pages G, Lenormand P, L'Allemain G, Chambard JC, Meloche S, Pouyssegur J (1993) Mitogen-activated protein kinases p42mapk and p44mapk are required for fibroblast proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**: 8319-8323

Pages G, Milanini J, Richard DE, Berra E, Gothie E, Vinals F, Pouyssegur J (2000) Signaling angiogenesis via p42/p44 MAP kinase cascade. *Ann N Y Acad Sci* **902**: 187-200

Pages G, Pouyssegur J (2004) Study of MAPK signaling using knockout mice. *Methods in molecular biology (Clifton, NJ)* **250**: 155-166

Palecek SP, Parikh AS, Kron SJ (2002) Sensing, signalling and integrating physical processes during *Saccharomyces cerevisiae* invasive and filamentous growth. *Microbiology* **148**: 893-907

Paliwal S, Iglesias PA, Campbell K, Hilioti Z, Groisman A, Levchenko A (2007) MAPK-mediated bimodal gene expression and adaptive gradient sensing in yeast. *Nature* **446**: 46-51

Pan X, Harashima T, Heitman J (2000) Signal transduction cascades regulating pseudohyphal differentiation of *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Opin Microbiol* **3**: 567-572

Pan X, Heitman J (1999) Cyclic AMP-dependent protein kinase regulates pseudohyphal differentiation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **19**: 4874-4887

Panasyuk G, Nemazany I, Zhyvoloup A, Bretner M, Litchfield DW, Filonenko V, Gout IT (2006) Nuclear Export of S6K1 II Is Regulated by Protein Kinase CK2 Phosphorylation at Ser-17. *J Biol Chem* **281**: 31188-31201

Papa S, Tager JM (1995) *Biochemistry of cell membranes : a compendium of selected topics*, Basel ; Boston: Birkhäuser Verlag.

Papin C, Eychene A, Brunet A, Pages G, Pouyssegur J, Calothy G, Barnier JV (1995) B-Raf protein isoforms interact with and phosphorylate Mek-1 on serine residues 218 and 222. *Oncogene* **10**: 1647-1651

Park H-S, Kim M-S, Huh S-H, Park J, Chung J, Kang SS, Choi E-J (2002) Akt (Protein Kinase B) Negatively Regulates SEK1 by Means of Protein Phosphorylation. *J Biol Chem* **277**: 2573-2578

Park SH, Zarrinpar A, Lim WA (2003) Rewiring MAP kinase pathways using alternative scaffold assembly mechanisms. *Science* **299**: 1061-1064

Parker CG, Hunt J, Diener K, McGinley M, Soriano B, Keesler GA, Bray J, Yao Z, Wang XS, Kohno T, Lichenstein HS (1998) Identification of stathmin as a novel substrate for p38 delta. *Biochem Biophys Res Commun* **249**: 791-796

Parra-Palau JL, Scheper GC, Wilson ML, Proud CG (2003) Features in the N and C termini of the MAPK-interacting kinase Mnk1 mediate its nucleocytoplasmic shuttling. *J Biol Chem* **278**: 44197-44204

Parrish JR, Gulyas KD, Finley RL, Jr. (2006) Yeast two-hybrid contributions to interactome mapping. *Curr Opin Biotechnol* **17**: 387-393

Paulillo SM, Phillips EM, Koser J, Sauder U, Ullman KS, Powers MA, Fahrenkrog B (2005) Nucleoporin Domain Topology is Linked to the Transport Status of the Nuclear Pore Complex. *Journal of Molecular Biology* **351**: 784-798

Pawson T (2004) Specificity in signal transduction: from phosphotyrosine-SH2 domain interactions to complex cellular systems. *Cell* **116**: 191-203

Pawson T, Nash P (2003) Assembly of cell regulatory systems through protein interaction domains. *Science* **300**: 445-452

Pawson T, Scott JD (2005) Protein phosphorylation in signaling - 50 years and counting. *Trends in Biochemical Sciences* **30**: 286-290

Payne DM, Rossomando AJ, Martino P, Erickson AK, Her JH, Shabanowitz J, Hunt DF, Weber MJ, Sturgill TW (1991) Identification of the regulatory phosphorylation sites in pp42/mitogen-activated protein kinase (MAP kinase). *Embo J* **10**: 885-892

Pearson G, Bumeister R, Henry DO, Cobb MH, White MA (2000) Uncoupling Raf1 from MEK1/2 impairs only a subset of cellular responses to Raf activation. *J Biol Chem* **275**: 37303-37306

Pearson G, English JM, White MA, Cobb MH (2001a) ERK5 and ERK2 cooperate to regulate NF-kappaB and cell transformation. *J Biol Chem* **276**: 7927-7931

Pearson G, Robinson F, Beers Gibson T, Xu BE, Karandikar M, Berman K, Cobb MH (2001b) Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocr Rev* **22**: 153-183

Peifer C, Wagner G, Laufer S (2006) New approaches to the treatment of inflammatory disorders small molecule inhibitors of p38 MAP kinase. *Curr Top Med Chem* **6**: 113-149

Pelaia G, Cuda G, Vatrella A, Gallelli L, Caraglia M, Marra M, Abbruzzese A, Caputi M, Maselli R, Costanzo FS, Marsico SA (2005) Mitogen-activated protein kinases and asthma. *J Cell Physiol* **202**: 642-653

Pelech S (2006) Dimerization in protein kinase signaling. *J Biol* **5**: 12

Peregrin S, Jurado-Pueyo M, Campos PM, Sanz-Moreno V, Ruiz-Gomez A, Crespo P, Mayor F, Jr., Murga C (2006) Phosphorylation of p38 by GRK2 at the Docking Groove Unveils a Novel Mechanism for Inactivating p38MAPK. *Curr Biol* **16**: 2042-2047

Pereira RC, Delany AM, Canalis E (2004) CCAAT/enhancer binding protein homologous protein (DDIT3) induces osteoblastic cell differentiation. *Endocrinology* **145**: 1952-1960

Perlson E, Hanz S, Ben-Yaakov K, Segal-Ruder Y, Seger R, Fainzilber M (2005) Vimentin-dependent spatial translocation of an activated MAP kinase in injured nerve. *Neuron* **45**: 715-726

Perlson E, Michaelevski I, Kowalsman N, Ben-Yaakov K, Shaked M, Seger R, Eisenstein M, Fainzilber M (2006) Vimentin binding to phosphorylated Erk sterically hinders enzymatic dephosphorylation of the kinase. *J Mol Biol* **364**: 938-944

Perregaux DG, Dean D, Cronan M, Connelly P, Gabel CA (1995) Inhibition of interleukin-1 beta production by SKF86002: evidence of two sites of in vitro activity and of a time and system dependence. *Molecular pharmacology* **48**: 433-442

- Peters R (2005) Translocation through the nuclear pore complex: selectivity and speed by reduction-of-dimensionality. *Traffic* **6**: 421-427
- Pettiford SM, Herbst R (2000) The MAP-kinase ERK2 is a specific substrate of the protein tyrosine phosphatase HePTP. *Oncogene* **19**: 858-869
- Philipova R, Whitaker M (2005) Active ERK1 is dimerized in vivo: bisphosphodimers generate peak kinase activity and monophosphodimers maintain basal ERK1 activity. *J Cell Sci* **118**: 5767-5776
- Philips MR (2005) Compartmentalized signalling of Ras. *Biochem Soc Trans* **33**: 657-661
- Pietersma A, Tilly BC, Gaestel M, de Jong N, Lee JC, Koster JF, Sluiter W (1997) p38 mitogen activated protein kinase regulates endothelial VCAM-1 expression at the post-transcriptional level. *Biochem Biophys Res Commun* **230**: 44-48
- Pircher TJ, Petersen H, Gustafsson JA, Haldosen LA (1999) Extracellular signal-regulated kinase (ERK) interacts with signal transducer and activator of transcription (STAT) 5a. *Mol Endocrinol* **13**: 555-565
- Platanias LC (2003) Map kinase signaling pathways and hematologic malignancies. *Blood* **101**: 4667-4679
- Pokholok DK, Zeitlinger J, Hannett NM, Reynolds DB, Young RA (2006) Activated signal transduction kinases frequently occupy target genes. *Science* **313**: 533-536
- Polychronopoulos S, Verykokakis M, Yazicioglu MN, Sakarellos-Daitsiotis M, Cobb MH, Mavrothalassitis G (2006) The Transcriptional ETS2 Repressor Factor Associates with Active and Inactive Erks through Distinct FXF Motifs. *J Biol Chem* **281**: 25601-25611
- Ponting CP (1995) SAM: a novel motif in yeast sterile and Drosophila polyhomeotic proteins. *Protein Sci* **4**: 1928-1930
- Ponting CP, Benjamin DR (1996) A novel family of Ras-binding domains. *Trends Biochem Sci* **21**: 422-425
- Posada J, Yew N, Ahn NG, Vande Woude GF, Cooper JA (1993) Mos stimulates MAP kinase in *Xenopus* oocytes and activates a MAP kinase kinase in vitro. *Mol Cell Biol* **13**: 2546-2553

Posas F, Saito H (1997) Osmotic activation of the HOG MAPK pathway via Ste11p MAPKKK: scaffold role of Pbs2p MAPKK. *Science* **276**: 1702

Posas F, Takekawa M, Saito H (1998a) Signal transduction by MAP kinase cascades in budding yeast. *Curr Opin Microbiol* **1**: 175-182

Posas F, Witten EA, Saito H (1998b) Requirement of STE50 for osmostress-induced activation of the STE11 mitogen-activated protein kinase kinase in the high-osmolarity glycerol response pathway. *Mol Cell Biol* **18**: 5788-5796

Potapova O, Basu S, Mercola D, Holbrook NJ (2001) Protective role for c-Jun in the cellular response to DNA damage. *J Biol Chem* **276**: 28546-28553

Pouyssegur J, Lenormand P (2003) Fidelity and spatio-temporal control in MAP kinase (ERKs) signalling. *Eur J Biochem* **270**: 3291-3299

Pouyssegur J, Volmat V, Lenormand P (2002) Fidelity and spatio-temporal control in MAP kinase (ERKs) signalling. *Biochem Pharmacol* **64**: 755-763

Preger E, Ziv I, Shabtay A, Sher I, Tsang M, Dawid IB, Altuvia Y, Ron D (2004) Alternative splicing generates an isoform of the human Sef gene with altered subcellular localization and specificity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 1229-1234

Prichett W, Hand A, Sheilds J, Dunnington D (1995) Mechanism of action of bicyclic imidazoles defines a translational regulatory pathway for tumor necrosis factor alpha. *Journal of inflammation* **45**: 97-105

Printen JA, Sprague GF, Jr. (1994) Protein-protein interactions in the yeast pheromone response pathway: Ste5p interacts with all members of the MAP kinase cascade. *Genetics* **138**: 609-619

Pritchard CA, Bolin L, Slattery R, Murray R, McMahon M (1996) Post-natal lethality and neurological and gastrointestinal defects in mice with targeted disruption of the A-Raf protein kinase gene. *Current Biology* **6**: 614-617

Proft M, Mas G, de Nadal E, Vendrell A, Noriega N, Struhl K, Posas F (2006) The stress-activated Hog1 kinase is a selective transcriptional elongation factor for genes responding to osmotic stress. *Mol Cell* **23**: 241-250

Proft M, Struhl K (2002) Hog1 kinase converts the Sko1-Cyc8-Tup1 repressor complex into an activator that recruits SAGA and SWI/SNF in response to osmotic stress. *Mol Cell* **9**: 1307

Pryciak PM, Huntress FA (1998) Membrane recruitment of the kinase cascade scaffold protein Ste5 by the Gbetagamma complex underlies activation of the yeast pheromone response pathway. *Genes Dev* **12**: 2684

Pulido R, Zuniga A, Ullrich A (1998) PTP-SL and STEP protein tyrosine phosphatases regulate the activation of the extracellular signal-regulated kinases ERK1 and ERK2 by association through a kinase interaction motif. *Embo J* **17**: 7337-7350

Purcell NH, Darwis D, Bueno OF, Muller JM, Schule R, Molkentin JD (2004) Extracellular signal-regulated kinase 2 interacts with and is negatively regulated by the LIM-only protein FHL2 in cardiomyocytes. *Mol Cell Biol* **24**: 1081-1095

Qi M, Elion EA (2005) MAP kinase pathways. *J Cell Sci* **118**: 3569-3572

Qi X, Lin W, Li J, Pan Y, Wang W (2006) The depressive-like behaviors are correlated with decreased phosphorylation of mitogen-activated protein kinases in rat brain following chronic forced swim stress. *Behavioural brain research* **175**: 233-240

Qiao F, Harada B, Song H, Whitelegge J, Courey AJ, Bowie JU (2006) Mae inhibits Pointed-P2 transcriptional activity by blocking its MAPK docking site. *Embo J* **25**: 70-79

Rad MR, Xu G, Hollenberg CP (1992) STE50, a novel gene required for activation of conjugation at an early step in mating in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Gen Genet* **236**: 145-154

Raingeaud J, Gupta S, Rogers JS, Dickens M, Han J, Ulevitch RJ, Davis RJ (1995) Pro-inflammatory cytokines and environmental stress cause p38 mitogen-activated protein kinase activation by dual phosphorylation on tyrosine and threonine. *J Biol Chem* **270**: 7420-7426

Raman M, Cobb MH (2003) MAP kinase modules: many roads home. *Curr Biol* **13**: R886-888

Ramezani Rad M, Jansen G, Buhning F, Hollenberg CP (1998) Ste50p is involved in regulating filamentous growth in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* and associates with Ste11p. *Mol Gen Genet* **259**: 29-38

Ramezani-Rad M (2003a) The role of adaptor protein Ste50-dependent regulation of the MAPKKK Ste11 in multiple signalling pathways of yeast. *Curr Genet* **43**: 161-170

- Ramezani-Rad M (2003b) The role of adaptor protein Ste50-dependent regulation of the MAPKKK Ste11 in multiple signalling pathways of yeast. *Curr Genet* **43**: 161
- Ranganathan A, Yazicioglu MN, Cobb MH (2006) The Nuclear Localization of ERK2 Occurs by Mechanisms Both Independent of and Dependent on Energy. *J Biol Chem* **281**: 15645-15652
- Rapp UR, Gotz R, Albert S (2006) BuCy RAFs drive cells into MEK addiction. *Cancer Cell* **9**: 9-12
- Raviv Z, Kalie E, Seger R (2004) MEK5 and ERK5 are localized in the nuclei of resting as well as stimulated cells, while MEKK2 translocates from the cytosol to the nucleus upon stimulation. *J Cell Sci* **117**: 1773-1784
- Ray LB, Sturgill TW (1988) Insulin-stimulated microtubule-associated protein kinase is phosphorylated on tyrosine and threonine in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**: 3753-3757
- Razidlo GL, Kortum RL, Haferbier JL, Lewis RE (2004) Phosphorylation regulates KSR1 stability, ERK activation, and cell proliferation. *J Biol Chem* **279**: 47808-47814
- Reddy KB, Nabha SM, Atanaskova N (2003) Role of MAP kinase in tumor progression and invasion. *Cancer Metastasis Rev* **22**: 395-403
- Regan CP, Li W, Boucher DM, Spatz S, Su MS, Kuida K (2002) Erk5 null mice display multiple extraembryonic vascular and embryonic cardiovascular defects. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 9248-9253
- Reiser V, Ruis H, Ammerer G (1999) Kinase activity-dependent nuclear export opposes stress-induced nuclear accumulation and retention of Hog1 mitogen-activated protein kinase in the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* **10**: 1147-1161
- Remenyi A, Good MC, Bhattacharyya RP, Lim WA (2005) The role of docking interactions in mediating signaling input, output, and discrimination in the yeast MAPK network. *Mol Cell* **20**: 951-962
- Rennefahrt U, Janakiraman M, Ollinger R, Troppmair J (2005) Stress kinase signaling in cancer: fact or fiction? *Cancer letters* **217**: 1-9
- Reuter CW, Catling AD, Jelinek T, Weber MJ (1995) Biochemical analysis of MEK activation in NIH3T3 fibroblasts. Identification of B-Raf and other activators. *J Biol Chem* **270**: 7644-7655

Ribbeck K, Gorlich D (2001) Kinetic analysis of translocation through nuclear pore complexes. *Embo J* **20**: 1320-1330

Richardson WD, Roberts BL, Smith AE (1986) Nuclear location signals in polyoma virus large-T. *Cell* **44**: 77-85

Riddick G, Macara IG (2005) A systems analysis of importin- α - β mediated nuclear protein import. *J Cell Biol* **168**: 1027-1038

Ritt DA, Zhou M, Conrads TP, Veenstra TD, Copeland TD, Morrison DK (2007) CK2 Is a component of the KSR1 scaffold complex that contributes to Raf kinase activation. *Curr Biol* **17**: 179-184

Robbins DJ, Cheng M, Zhen E, Vanderbilt CA, Feig LA, Cobb MH (1992) Evidence for a Ras-dependent extracellular signal-regulated protein kinase (ERK) cascade. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**: 6924-6928

Robbins DJ, Cobb MH (1992) Extracellular signal-regulated kinases 2 autophosphorylates on a subset of peptides phosphorylated in intact cells in response to insulin and nerve growth factor: analysis by peptide mapping. *Mol Biol Cell* **3**: 299-308

Robbins DJ, Zhen E, Owaki H, Vanderbilt CA, Ebert D, Geppert TD, Cobb MH (1993) Regulation and properties of extracellular signal-regulated protein kinases 1 and 2 in vitro. *J Biol Chem* **268**: 5097-5106

Roberts CJ, Nelson B, Marton MJ, Stoughton R, Meyer MR, Bennett HA, He YD, Dai H, Walker WL, Hughes TR, Tyers M, Boone C, Friend SH (2000) Signaling and circuitry of multiple MAPK pathways revealed by a matrix of global gene expression profiles. *Science* **287**: 873-880

Roberts EC, Shapiro PS, Nahreini TS, Pages G, Pouyssegur J, Ahn NG (2002) Distinct cell cycle timing requirements for extracellular signal-regulated kinase and phosphoinositide 3-kinase signaling pathways in somatic cell mitosis. *Mol Cell Biol* **22**: 7226-7241

Roberts MS, Woods AJ, Shaw PE, Norman JC (2003) ERK1 associates with $\alpha(v)\beta 3$ integrin and regulates cell spreading on vitronectin. *J Biol Chem* **278**: 1975-1985

Robertson LS, Fink GR (1998) The three yeast A kinases have specific signaling functions in pseudohyphal growth. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 13783-13787

Robinson FL, Whitehurst AW, Raman M, Cobb MH (2002) Identification of novel point mutations in ERK2 that selectively disrupt binding to MEK1. *J Biol Chem* **277**: 14844-14852

Robinson LC, Hubbard EJ, Graves PR, DePaoli-Roach AA, Roach PJ, Kung C, Haas DW, Hagedorn CH, Goebel M, Culbertson MR, et al. (1992) Yeast casein kinase I homologues: an essential gene pair. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**: 28-32

Robinson MJ, Stippec SA, Goldsmith E, White MA, Cobb MH (1998) A constitutively active and nuclear form of the MAP kinase ERK2 is sufficient for neurite outgrowth and cell transformation. *Curr Biol* **8**: 1141-1150

Rocheleau CE, Yasuda J, Shin TH, Lin R, Sawa H, Okano H, Priess JR, Davis RJ, Mello CC (1999) WRM-1 Activates the LIT-1 Protein Kinase to Transduce Anterior/Posterior Polarity Signals in *C. elegans*. *Cell* **97**: 717-726

Rocks O, Peyker A, Kahms M, Verveer PJ, Koerner C, Lumbierres M, Kuhlmann J, Waldmann H, Wittinghofer A, Bastiaens PIH (2005) An Acylation Cycle Regulates Localization and Activity of Palmitoylated Ras Isoforms. *Science* **307**: 1746-1752

Roshan B, Kjelsberg C, Spokes K, Eldred A, Crovello CS, Cantley LG (1999) Activated ERK2 interacts with and phosphorylates the docking protein GAB1. *J Biol Chem* **274**: 36362-36368

Rossomando AJ, Payne DM, Weber MJ, Sturgill TW (1989) Evidence that pp42, a major tyrosine kinase target protein, is a mitogen-activated serine/threonine protein kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**: 6940-6943

Rossomando AJ, Wu J, Michel H, Shabanowitz J, Hunt DF, Weber MJ, Sturgill TW (1992) Identification of Tyr-185 as the site of tyrosine autophosphorylation of recombinant mitogen-activated protein kinase p42mapk. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**: 5779-5783

Rothman JE, Lodish HF (1977) Synchronised transmembrane insertion and glycosylation of a nascent membrane protein. *Nature* **269**: 775-780

Rouse J, Cohen P, Trigon S, Morange M, Alonso-Llamazares A, Zamanillo D, Hunt T, Nebreda AR (1994) A novel kinase cascade triggered by stress and heat shock that stimulates MAPKAP kinase-2 and phosphorylation of the small heat shock proteins. *Cell* **78**: 1027-1037

Rousseau F, Schymkowitz J (2005) A systems biology perspective on protein structural dynamics and signal transduction. *Curr Opin Struct Biol* **15**: 23-30

Rout MP, Aitchison JD, Suprpto A, Hjertaas K, Zhao Y, Chait BT (2000) The yeast nuclear pore complex: composition, architecture, and transport mechanism. *J Cell Biol* **148**: 635-651

Roux PP, Blenis J (2004) ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions. *Microbiol Mol Biol Rev* **68**: 320-344

Roux PP, Richards SA, Blenis J (2003) Phosphorylation of p90 ribosomal S6 kinase (RSK) regulates extracellular signal-regulated kinase docking and RSK activity. *Mol Cell Biol* **23**: 4796-4804

Roy F, Laberge G, Douziech M, Ferland-McCollough D, Therrien M (2002) KSR is a scaffold required for activation of the ERK/MAPK module. *Genes Dev* **16**: 427-438

Roy M, Li Z, Sacks DB (2004) IQGAP1 binds ERK2 and modulates its activity. *J Biol Chem* **279**: 17329-17337

Roy M, Li Z, Sacks DB (2005) IQGAP1 is a scaffold for mitogen-activated protein kinase signaling. *Mol Cell Biol* **25**: 7940-7952

Rubinfeld H, Hanoch T, Seger R (1999) Identification of a cytoplasmic-retention sequence in ERK2. *J Biol Chem* **274**: 30349-30352

Rupp S, Summers E, Lo HJ, Madhani H, Fink G (1999) MAP kinase and cAMP filamentation signaling pathways converge on the unusually large promoter of the yeast FLO11 gene. *EMBO J* **18**: 1257

Russell M, Lange-Carter CA, Johnson GL (1995) Direct interaction between Ras and the kinase domain of mitogen-activated protein kinase kinase kinase (MEKK1). *J Biol Chem* **270**: 11757-11760

Saba-El-Leil MK, Vella FD, Vernay B, Voisin L, Chen L, Labrecque N, Ang SL, Meloche S (2003) An essential function of the mitogen-activated protein kinase Erk2 in mouse trophoblast development. *EMBO Rep* **4**: 964-968

Sabapathy K, Hochedlinger K, Nam SY, Bauer A, Karin M, Wagner EF (2004) Distinct roles for JNK1 and JNK2 in regulating JNK activity and c-Jun-dependent cell proliferation. *Mol Cell* **15**: 713-725

Sabapathy K, Hu Y, Kallunki T, Schreiber M, David J-P, Jochum W, Wagner EF, Karin M (1999a) JNK2 is required for efficient T-cell activation and apoptosis but not for normal lymphocyte development. *Current Biology* **9**: 116-125

Sabapathy K, Jochum W, Hochedlinger K, Chang L, Karin M, Wagner EF (1999b) Defective neural tube morphogenesis and altered apoptosis in the absence of both JNK1 and JNK2. *Mechanisms of development* **89**: 115-124

Sabapathy K, Kallunki T, David J-P, Graef I, Karin M, Wagner EF (2001) c-Jun NH2-Terminal Kinase (JNK)1 and JNK2 Have Similar and Stage-dependent Roles in Regulating T Cell Apoptosis and Proliferation. *J Exp Med* **193**: 317-328

Sabbagh W, Flatauer LJ, Bardwell AJ, Bardwell L (2001) Specificity of MAP kinase signaling in yeast differentiation involves transient versus sustained MAPK activation. *Mol Cell* **8**: 683

Sabio G, Arthur JS, Kuma Y, Pegg M, Carr J, Murray-Tait V, Centeno F, Goedert M, Morrice NA, Cuenda A (2005) p38gamma regulates the localisation of SAP97 in the cytoskeleton by modulating its interaction with GKAP. *Embo J* **24**: 1134-1145

Saito H, Tatebayashi K (2004) Regulation of the osmoregulatory HOG MAPK cascade in yeast. *J Biochem (Tokyo)* **136**: 267-272

Saklatvala J (2004) The p38 MAP kinase pathway as a therapeutic target in inflammatory disease. *Curr Opin Pharmacol* **4**: 372-377

Salvador JM, Mittelstadt PR, Belova GI, Fornace AJ, Jr., Ashwell JD (2005a) The autoimmune suppressor Gadd45alpha inhibits the T cell alternative p38 activation pathway. *Nature immunology* **6**: 396-402

Salvador JM, Mittelstadt PR, Guszczynski T, Copeland TD, Yamaguchi H, Appella E, Fornace AJ, Jr., Ashwell JD (2005b) Alternative p38 activation pathway mediated by T cell receptor-proximal tyrosine kinases. *Nature immunology* **6**: 390-395

Samlowski WE, Vogelzang NJ (2007) Emerging drugs for the treatment of metastatic renal cancer. *Expert opinion on emerging drugs* **12**: 605-618

Sananbenesi F, Fischer A, Schrick C, Spiess J, Radulovic J (2003) Mitogen-activated protein kinase signaling in the hippocampus and its modulation by corticotropin-releasing factor receptor 2: a possible link between stress and fear memory. *J Neurosci* **23**: 11436-11443

Sanchez I, Hughes RT, Mayer BJ, Yee K, Woodgett JR, Avruch J, Kyriakis JM, Zon LI (1994) Role of SAPK/ERK kinase-1 in the stress-activated pathway regulating transcription factor c-Jun. *Nature* **372**: 794-798

Sanna B, Bueno OF, Dai YS, Wilkins BJ, Molkentin JD (2005) Direct and indirect interactions between calcineurin-NFAT and MEK1-extracellular signal-regulated kinase 1/2 signaling pathways regulate cardiac gene expression and cellular growth. *Mol Cell Biol* **25**: 865-878

Santen RJ, Song RX, McPherson R, Kumar R, Adam L, Jeng MH, Yue W (2002) The role of mitogen-activated protein (MAP) kinase in breast cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol* **80**: 239-256

Santos SD, Verveer PJ, Bastiaens PI (2007) Growth factor-induced MAPK network topology shapes Erk response determining PC-12 cell fate. *Nat Cell Biol*

Sanz V, Arozarena I, Crespo P (2000) Distinct carboxy-termini confer divergent characteristics to the mitogen-activated protein kinase p38alpha and its splice isoform Mxi2. *FEBS Lett* **474**: 169-174

Sanz-Moreno V, Casar B, Crespo P (2003) p38alpha isoform Mxi2 binds to extracellular signal-regulated kinase 1 and 2 mitogen-activated protein kinase and regulates its nuclear activity by sustaining its phosphorylation levels. *Mol Cell Biol* **23**: 3079-3090

Sasagawa S, Ozaki Y, Fujita K, Kuroda S (2005) Prediction and validation of the distinct dynamics of transient and sustained ERK activation. *Nat Cell Biol* **7**: 365-373

Saxena M, Williams S, Brockdorff J, Gilman J, Mustelin T (1999) Inhibition of T cell signaling by mitogen-activated protein kinase-targeted hematopoietic tyrosine phosphatase (HePTP). *J Biol Chem* **274**: 11693-11700

Schaap D, van der Wal J, Howe LR, Marshall CJ, van Blitterswijk WJ (1993) A dominant-negative mutant of raf blocks mitogen-activated protein kinase activation by growth factors and oncogenic p21ras. *J Biol Chem* **268**: 20232-20236

Schaber M, Lindgren A, Schindler K, Bungard D, Kaldis P, Winter E (2002) CAK1 promotes meiosis and spore formation in *Saccharomyces cerevisiae* in a CDC28-independent fashion. *Mol Cell Biol* **22**: 57-68

Schaeffer HJ, Catling AD, Eblen ST, Collier LS, Krauss A, Weber MJ (1998) MP1: a MEK binding partner that enhances enzymatic activation of the MAP kinase cascade. *Science* **281**: 1668-1671

Schaeffer HJ, Weber MJ (1999) Mitogen-activated protein kinases: specific messages from ubiquitous messengers. *Mol Cell Biol* **19**: 2435-2444

Scheper GC, Parra JL, Wilson M, Van Kollenburg B, Vertegaal AC, Han ZG, Proud CG (2003) The N and C termini of the splice variants of the human mitogen-activated protein kinase-interacting kinase Mnk2 determine activity and localization. *Mol Cell Biol* **23**: 5692-5705

Schnell DJ, Hebert DN (2003) Protein Translocons: Multifunctional Mediators of Protein Translocation across Membranes. *Cell* **112**: 491-505

Schoeberl B, Eichler-Jonsson C, Gilles ED, Muller G (2002) Computational modeling of the dynamics of the MAP kinase cascade activated by surface and internalized EGF receptors. *Nat Biotechnol* **20**: 370-375

Scholl FA, Dumesic PA, Khavari PA (2004) Mek1 alters epidermal growth and differentiation. *Cancer Res* **64**: 6035-6040

Scholl FA, Dumesic PA, Khavari PA (2005) Effects of active MEK1 expression in vivo. *Cancer letters* **230**: 1-5

Schreck R, Rapp UR (2006) Raf kinases: Oncogenesis and drug discovery. *Int J Cancer*

Schwartz MA, Madhani HD (2004) Principles of MAP kinase signaling specificity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Annu Rev Genet* **38**: 725-748

Schwartz MA, Madhani HD (2006) Control of MAPK signaling specificity by a conserved residue in the MEK-binding domain of the yeast scaffold protein Ste5. *Curr Genet* **49**: 351-363

Scott MG, Pierotti V, Storez H, Lindberg E, Thuret A, Muntaner O, Labbe-Jullie C, Pitcher JA, Marullo S (2006) Cooperative regulation of extracellular signal-regulated kinase activation and cell shape change by filamin A and beta-arrestins. *Mol Cell Biol* **26**: 3432-3445

Sebolt-Leopold JS (2000) Development of anticancer drugs targeting the MAP kinase pathway. *Oncogene* **19**: 6594-6599

Sebolt-Leopold JS (2004) MEK inhibitors: a therapeutic approach to targeting the Ras-MAP kinase pathway in tumors. *Curr Pharm Des* **10**: 1907-1914

Seet BT, Pawson T (2004) MAPK signaling: Sho business. *Curr Biol* **14**: R708-710

Seger R, Ahn NG, Boulton TG, Yancopoulos GD, Panayotatos N, Radziejewska E, Ericsson L, Bratlien RL, Cobb MH, Krebs EG (1991) Microtubule-associated protein 2 kinases, ERK1 and ERK2, undergo autophosphorylation on both tyrosine and threonine residues: implications for their mechanism of activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**: 6142-6146

Seger R, Ahn NG, Posada J, Munar ES, Jensen AM, Cooper JA, Cobb MH, Krebs EG (1992a) Purification and characterization of mitogen-activated protein kinase activator(s) from epidermal growth factor-stimulated A431 cells. *J Biol Chem* **267**: 14373-14381

Seger R, Seger D, Lozeman FJ, Ahn NG, Graves LM, Campbell JS, Ericsson L, Harrylock M, Jensen AM, Krebs EG (1992b) Human T-cell mitogen-activated protein kinase kinases are related to yeast signal transduction kinases. *J Biol Chem* **267**: 25628-25631

Seidel JJ, Graves BJ (2002) An ERK2 docking site in the Pointed domain distinguishes a subset of ETS transcription factors. *Genes Dev* **16**: 127-137

Selcher JC, Nekrasova T, Paylor R, Landreth GE, Sweatt JD (2001) Mice Lacking the ERK1 Isoform of MAP Kinase Are Unimpaired in Emotional Learning. *Learning & Memory* **8**: 11-19

Serrano R, Martin H, Casamayor A, Arino J (2006) Signaling Alkaline pH Stress in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae* through the Wsc1 Cell Surface Sensor and the Slt2 MAPK Pathway. *J Biol Chem* **281**: 39785-39795

Seternes OM, Mikalsen T, Johansen B, Michaelsen E, Armstrong CG, Morrice NA, Turgeon B, Meloche S, Moens U, Keyse SM (2004) Activation of MK5/PRAK by the atypical MAP kinase ERK3 defines a novel signal transduction pathway. *Embo J* **23**: 4780-4791

Sette C, Inouye CJ, Stroschein SL, Iaquinta PJ, Thorner J (2000) Mutational analysis suggests that activation of the yeast pheromone response mitogen-activated protein kinase pathway involves conformational changes in the Ste5 scaffold protein. *Mol Biol Cell* **11**: 4033-4049

Shah BH, Catt KJ (2006) Protein phosphatase 5 as a negative key regulator of Raf-1 activation. *Trends Endocrinol Metab* **17**: 382-384

Shalin SC, Zirrgiebel U, Honsa KJ, Julien JP, Miller FD, Kaplan DR, Sweatt JD (2004) Neuronal MEK is important for normal fear conditioning in mice. *J Neurosci Res* **75**: 760-770

Shalom-Barak T, Quach J, Lotz M (1998) Interleukin-17-induced gene expression in articular chondrocytes is associated with activation of mitogen-activated protein kinases and NF-kappaB. *J Biol Chem* **273**: 27467-27473

Shapiro L, Puren AJ, Barton HA, Novick D, Peskind RL, Shenkar R, Gu Y, Su MS, Dinarello CA (1998a) Interleukin 18 stimulates HIV type 1 in monocytic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 12550-12555

Shapiro P (2002) Ras-MAP kinase signaling pathways and control of cell proliferation: relevance to cancer therapy. *Crit Rev Clin Lab Sci* **39**: 285-330

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

Shapiro PS, Whalen AM, Tolwinski NS, Wilsbacher J, Froelich-Ammon SJ, Garcia M, Osheroff N, Ahn NG (1999) Extracellular signal-regulated kinase activates topoisomerase IIalpha through a mechanism independent of phosphorylation. *Mol Cell Biol* **19**: 3551-3560

Sharma C, Vomastek T, Tarcsafalvi A, Catling AD, Schaeffer HJ, Eblen ST, Weber MJ (2004) MEK partner 1 (MP1): Regulation of oligomerization in MAP kinase signaling. *J Cell Biochem*

Sharma P, Veeranna, Sharma M, Amin ND, Sihag RK, Grant P, Ahn N, Kulkarni AB, Pant HC (2002) Phosphorylation of MEK1 by cdk5/p35 Down-regulates the Mitogen-activated Protein Kinase Pathway. *J Biol Chem* **277**: 528-534

Sharrocks AD, Yang S-H, Galanis A (2000) Docking domains and substrate-specificity determination for MAP kinases. *Trends in Biochemical Sciences* **25**: 448-453

Shaul YD, Seger R (2006) ERK1c regulates Golgi fragmentation during mitosis. *J Cell Biol* **172**: 885-897

Shaulian E, Karin M (2001) AP-1 in cell proliferation and survival. *Oncogene* **20**: 2390-2400

Sheikh-Hamad D, Gustin MC (2004) MAP kinases and the adaptive response to hypertonicity: functional preservation from yeast to mammals. *Am J Physiol Renal Physiol* **287**: F1102-1110

Shi Y, Kotlyarov A, Laabeta K, Gruber AD, Butt E, Marcus K, Meyer HE, Friedrich A, Volk HD, Gaestel M (2003) Elimination of protein kinase MK5/PRAK activity by targeted homologous recombination. *Mol Cell Biol* **23**: 7732-7741

Shibayama S, Shibata-Seita R, Miura K, Kirino Y, Takishima K (2002) Identification of a C-terminal region that is required for the nuclear translocation of ERK2 by passive diffusion. *J Biol Chem* **277**: 37777-37782

Shin TH, Yasuda J, Rocheleau CE, Lin R, Soto M, Bei Y, Davis RJ, Mello CC (1999) MOM-4, a MAP Kinase Kinase Kinase-Related Protein, Activates WRM-1/LIT-1 Kinase to Transduce Anterior/Posterior Polarity Signals in *C. elegans*. *Molecular Cell* **4**: 275-280

Shinohara M, Mikhailov AV, Aguirre-Ghiso JA, Rieder CL (2006) Extracellular Signal-regulated Kinase 1/2 Activity Is Not Required in Mammalian Cells during Late G2 for Timely Entry into or Exit from Mitosis. *Mol Biol Cell* **17**: 5227-5240

Shinzawa K, Tsujimoto Y (2003) PLA2 activity is required for nuclear shrinkage in caspase-independent cell death. *J Cell Biol* **163**: 1219-1230

Shiozaki K, Russell P (1995) Cell-cycle control linked to extracellular environment by MAP kinase pathway in fission yeast. *Nature* **378**: 739-743

Simister PC, Banfield MJ, Brady RL (2002) The crystal structure of PEBP-2, a homologue of the PEBP/RKIP family. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **58**: 1077-1080

Slack DN, Seternes OM, Gabrielsen M, Keyse SM (2001) Distinct binding determinants for ERK2/p38alpha and JNK map kinases mediate catalytic activation and substrate selectivity of map kinase phosphatase-1. *J Biol Chem* **276**: 16491-16500

Smalley KS (2003) A pivotal role for ERK in the oncogenic behaviour of malignant melanoma? *Int J Cancer* **104**: 527-532

Smit L, Baas A, Kuipers J, Korswagen H, van de Wetering M, Clevers H (2004) Wnt Activates the Tak1/Nemo-like Kinase Pathway. *Journal of Biological Chemistry* **279**: 17232-17240

Smith AE, Slepchenko BM, Schaff JC, Loew LM, Macara IG (2002) Systems Analysis of Ran Transport. *Science* **295**: 488-491

Smith ER, Smedberg JL, Rula ME, Xu X-X (2004) Regulation of Ras-MAPK pathway mitogenic activity by restricting nuclear entry of activated MAPK in endoderm differentiation of embryonic carcinoma and stem cells. *J Cell Biol* **164**: 689-699

Smith JA, Poteet-Smith CE, Malarkey K, Sturgill TW (1999) Identification of an extracellular signal-regulated kinase (ERK) docking site in ribosomal S6 kinase, a sequence critical for activation by ERK in vivo. *J Biol Chem* **274**: 2893-2898

Smith RA, Dumas J, Adnane L, Wilhelm SM (2006) Recent advances in the research and development of RAF kinase inhibitors. *Curr Top Med Chem* **6**: 1071-1089

Smotrys JE, Linder ME (2004) Palmitoylation of intracellular signaling proteins: regulation and function. *Annu Rev Biochem* **73**: 559-587

Sohn SJ, Sarvis BK, Cado D, Winoto A (2002) ERK5 MAPK regulates embryonic angiogenesis and acts as a hypoxia-sensitive repressor of vascular endothelial growth factor expression. *J Biol Chem* **277**: 43344-43351

Solit DB, Garraway LA, Pratilas CA, Sawai A, Getz G, Basso A, Ye Q, Lobo JM, She Y, Osman I, Golub TR, Sebolt-Leopold J, Sellers WR, Rosen N (2006) BRAF mutation predicts sensitivity to MEK inhibition. *Nature* **439**: 358-362

Soloaga A, Thomson S, Wiggin GR, Rampersaud N, Dyson MH, Hazzalin CA, Mahadevan LC, Arthur JS (2003) MSK2 and MSK1 mediate the mitogen- and stress-induced phosphorylation of histone H3 and HMG-14. *Embo J* **22**: 2788-2797

Solsbacher J, Maurer P, Vogel F, Schlenstedt G (2000) Nup2p, a yeast nucleoporin, functions in bidirectional transport of importin alpha. *Mol Cell Biol* **20**: 8468-8479

Somsen OJG, Siderius M, Bauer FF, Snoep JL, Westerhoff HV (2002) Selectivity in Overlapping MAP Kinase Cascades. *Journal of Theoretical Biology* **218**: 343-354

Song DH, Sussman DJ, Seldin DC (2000) Endogenous protein kinase CK2 participates in Wnt signaling in mammary epithelial cells. *J Biol Chem* **275**: 23790-23797

Songyang Z, Lu KP, Kwon YT, Tsai LH, Filhol O, Cochet C, Brickey DA, Soderling TR, Bartleson C, Graves DJ, DeMaggio AJ, Hoekstra MF, Blenis J, Hunter T, Cantley LC (1996) A structural basis for substrate specificities of protein Ser/Thr kinases: primary sequence preference of casein kinases I and II, NIMA, phosphorylase kinase, calmodulin-dependent kinase II, CDK5, and Erk1. *Mol Cell Biol* **16**: 6486-6493

- Spence HJ, Dhillon AS, James M, Winder SJ (2004) Dystroglycan, a scaffold for the ERK-MAP kinase cascade. *EMBO Rep* **5**: 484-489
- Sridhar SS, Hedley D, Siu LL (2005) Raf kinase as a target for anticancer therapeutics. *Mol Cancer Ther* **4**: 677-685
- Stanton VP, Jr., Cooper GM (1987) Activation of human raf transforming genes by deletion of normal amino-terminal coding sequences. *Molecular And Cellular Biology* **7**: 1171-1179
- Stefanovsky V, Langlois F, Gagnon-Kugler T, Rothblum LI, Moss T (2006a) Growth Factor Signaling Regulates Elongation of RNA Polymerase I Transcription in Mammals via UBF Phosphorylation and r-Chromatin Remodeling. *Molecular Cell* **21**: 629-639
- Stefanovsky VY, Langlois F, Bazett-Jones D, Pelletier G, Moss T (2006b) ERK Modulates DNA Bending and Enhancesome Structure by Phosphorylating HMG1-Boxes 1 and 2 of the RNA Polymerase I Transcription Factor UBF. *Biochemistry* **45**: 3626-3634
- Stevenson BJ, Rhodes N, Errede B, Sprague GF, Jr. (1992) Constitutive mutants of the protein kinase STE11 activate the yeast pheromone response pathway in the absence of the G protein. *Genes Dev* **6**: 1293-1304
- Stewart M (2000) Insights into the molecular mechanism of nuclear trafficking using nuclear transport factor 2 (NTF2). *Cell Struct Funct* **25**: 217-225
- Stewart S, Sundaram M, Zhang Y, Lee J, Han M, Guan KL (1999) Kinase suppressor of Ras forms a multiprotein signaling complex and modulates MEK localization. *Mol Cell Biol* **19**: 5523-5534
- Strawn LA, Shen T, Shulga N, Goldfarb DS, Wentz SR (2004) Minimal nuclear pore complexes define FG repeat domains essential for transport. *Nat Cell Biol* **6**: 197-206
- Strniskova M, Barancik M, Ravingerova T (2002) Mitogen-activated protein kinases and their role in regulation of cellular processes. *Gen Physiol Biophys* **21**: 231-255
- Sturgill TW, Ray LB (1986) Muscle proteins related to microtubule associated protein-2 are substrates for an insulin-stimulatable kinase. *Biochem Biophys Res Commun* **134**: 565-571
- Sugimoto T, Stewart S, Guan KL (1997) The calcium/calmodulin-dependent protein phosphatase calcineurin is the major Elk-1 phosphatase. *J Biol Chem* **272**: 29415-29418

Sugimoto T, Stewart S, Han M, Guan KL (1998) The kinase suppressor of Ras (KSR) modulates growth factor and Ras signaling by uncoupling Elk-1 phosphorylation from MAP kinase activation. *Embo J* **17**: 1717-1727

Sugiura R, Kita A, Shimizu Y, Shuntoh H, Sio SO, Kuno T (2003) Feedback regulation of MAPK signalling by an RNA-binding protein. *Nature* **424**: 961-965

Sugiura R, Toda T, Dhut S, Shuntoh H, Kuno T (1999) The MAPK kinase Pek1 acts as a phosphorylation-dependent molecular switch. *Nature* **399**: 479-483

Sun H, Charles CH, Lau LF, Tonks NK (1993) MKP-1 (3CH134), an immediate early gene product, is a dual specificity phosphatase that dephosphorylates MAP kinase in vivo. *Cell* **75**: 487-493

Sun W, Kesavan K, Schaefer BC, Garrington TP, Ware M, Johnson NL, Gelfand EW, Johnson GL (2001) MEKK2 Associates with the Adapter Protein Lad/RIBP and Regulates the MEK5-BMK1/ERK5 Pathway. *J Biol Chem* **276**: 5093-5100

Sundberg-Smith LJ, Doherty JT, Mack CP, Taylor JM (2005) Adhesion stimulates direct PAK1/ERK2 association and leads to ERK-dependent PAK1 Thr212 phosphorylation. *J Biol Chem* **280**: 2055-2064

Sur R, Ramos JW (2004) Vanishin is a novel ubiquitinated death effector domain protein that blocks ERK activation. *Biochem J*

Sweatt JD (2004) Mitogen-activated protein kinases in synaptic plasticity and memory. *Curr Opin Neurobiol* **14**: 311-317

Taagepera S, McDonald D, Loeb JE, Whitaker LL, McElroy AK, Wang JY, Hope TJ (1998) Nuclear-cytoplasmic shuttling of C-ABL tyrosine kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 7457-7462

Takekawa M, Maeda T, Saito H (1998) Protein phosphatase 2C α inhibits the human stress-responsive p38 and JNK MAPK pathways. *Embo J* **17**: 4744-4752

Takekawa M, Posas F, Saito H (1997) A human homolog of the yeast Ssk2/Ssk22 MAP kinase kinase kinases, MTK1, mediates stress-induced activation of the p38 and JNK pathways. *Embo J* **16**: 4973-4982

Takekawa M, Tatebayashi K, Saito H (2005) Conserved docking site is essential for activation of mammalian MAP kinase kinases by specific MAP kinase kinase kinases. *Mol Cell* **18**: 295-306

- Tam WF, Lee LH, Davis L, Sen R (2000) Cytoplasmic sequestration of rel proteins by I κ B α requires CRM1-dependent nuclear export. *Mol Cell Biol* **20**: 2269-2284
- Tamemoto H, Kadowaki T, Tobe K, Ueki K, Izumi T, Chatani Y, Kohno M, Kasuga M, Yazaki Y, Akanuma Y (1992) Biphasic activation of two mitogen-activated protein kinases during the cell cycle in mammalian cells. *J Biol Chem* **267**: 20293-20297
- Tamura K, Sudo T, Senftleben U, Dadgar AM, Johnson R, Karin M (2000) Requirement for p38 α in erythropoietin expression: a role for stress kinases in erythropoiesis. *Cell* **102**: 221-231
- Tan PB, Kim SK (1999) Signaling specificity: the RTK/RAS/MAP kinase pathway in metazoans. *Trends Genet* **15**: 145-149
- Tan Y, Rouse J, Zhang A, Cariati S, Cohen P, Comb MJ (1996) FGF and stress regulate CREB and ATF-1 via a pathway involving p38 MAP kinase and MAPKAP kinase-2. *Embo J* **15**: 4629-4642
- Tanaka N, Kamanaka M, Enslen H, Dong C, Wysk M, Davis RJ (2002) Differential involvement of p38 mitogen-activated protein kinase kinases MKK3 and MKK6 in T-cell apoptosis. *EMBO Rep* **3**: 785-791
- Tanimura S, Nomura K, Ozaki K, Tsujimoto M, Kondo T, Kohno M (2002) Prolonged nuclear retention of activated extracellular signal-regulated kinase 1/2 is required for hepatocyte growth factor-induced cell motility. *J Biol Chem* **277**: 28256-28264
- Tanno M, Bassi R, Gorog DA, Saurin AT, Jiang J, Heads RJ, Martin JL, Davis RJ, Flavell RA, Marber MS (2003) Diverse mechanisms of myocardial p38 mitogen-activated protein kinase activation: evidence for MKK-independent activation by a TAB1-associated mechanism contributing to injury during myocardial ischemia. *Circulation research* **93**: 254-261
- Tanoue T, Adachi M, Moriguchi T, Nishida E (2000) A conserved docking motif in MAP kinases common to substrates, activators and regulators. *Nat Cell Biol* **2**: 110-116
- Tanoue T, Maeda R, Adachi M, Nishida E (2001a) Identification of a docking groove on ERK and p38 MAP kinases that regulates the specificity of docking interactions. *Embo J* **20**: 466-479
- Tanoue T, Nishida E (2002) Docking interactions in the mitogen-activated protein kinase cascades. *Pharmacol Ther* **93**: 193-202

Tanoue T, Nishida E (2003) Molecular recognitions in the MAP kinase cascades. *Cell Signal* **15**: 455-462

Tanoue T, Yamamoto T, Maeda R, Nishida E (2001b) A Novel MAPK phosphatase MKP-7 acts preferentially on JNK/SAPK and p38 alpha and beta MAPKs. *J Biol Chem* **276**: 26629-26639

Tanoue T, Yamamoto T, Nishida E (2002) Modular structure of a docking surface on MAPK phosphatases. *J Biol Chem* **277**: 22942-22949

Tarrega C, Blanco-Aparicio C, Munoz JJ, Pulido R (2002) Two clusters of residues at the docking groove of mitogen-activated protein kinases differentially mediate their functional interaction with the tyrosine phosphatases PTP-SL and STEP. *J Biol Chem* **277**: 2629-2636

Tarrega C, Rios P, Cejudo-Marin R, Blanco-Aparicio C, van den Berk L, Schepens J, Hendriks W, Tabernero L, Pulido R (2005) ERK2 Shows a Restrictive and Locally Selective Mechanism of Recognition by Its Tyrosine Phosphatase Inactivators Not Shared by Its Activator MEK1. *J Biol Chem* **280**: 37885-37894

Tatebayashi K, Takekawa M, Saito H (2003) A docking site determining specificity of Pbs2 MAPKK for Ssk2/Ssk22 MAPKKKs in the yeast HOG pathway. *Embo J* **22**: 3624-3634

Tatebayashi K, Yamamoto K, Tanaka K, Tomida T, Maruoka T, Kasukawa E, Saito H (2006) Adaptor functions of Cdc42, Ste50, and Sho1 in the yeast osmoregulatory HOG MAPK pathway. *Embo J* **25**: 3033-3044

Taylor SS, Buechler JA, Yonemoto W (1990) cAMP-dependent protein kinase: framework for a diverse family of regulatory enzymes. *Annu Rev Biochem* **59**: 971-1005

Taylor SS, Knighton DR, Zheng J, Ten Eyck LF, Sowadski JM (1992) Structural framework for the protein kinase family. *Annu Rev Cell Biol* **8**: 429-462

Tcherkezian J, Danek EI, Jenna S, Triki I, Lamarche-Vane N (2005) Extracellular signal-regulated kinase 1 interacts with and phosphorylates CdGAP at an important regulatory site. *Mol Cell Biol* **25**: 6314-6329

Tcherkezian J, Triki I, Stenne R, Danek EI, Lamarche-Vane N (2006) The human orthologue of CdGAP is a phosphoprotein and a GTPase-activating protein for Cdc42 and Rac1 but not RhoA. *Biology of the cell / under the auspices of the European Cell Biology Organization* **98**: 445-456

Tedford K, Kim S, Sa D, Stevens K, Tyers M (1997) Regulation of the mating pheromone and invasive growth responses in yeast by two MAP kinase substrates. *Curr Biol* **7**: 228

Teis D, Taub N, Kurzbauer R, Hilber D, de Araujo ME, Erlacher M, Offterdinger M, Villunger A, Geley S, Bohn G, Klein C, Hess MW, Huber LA (2006) p14-MP1-MEK1 signaling regulates endosomal traffic and cellular proliferation during tissue homeostasis. *J Cell Biol* **175**: 861-868

Teis D, Wunderlich W, Huber LA (2002) Localization of the MP1-MAPK scaffold complex to endosomes is mediated by p14 and required for signal transduction. *Developmental cell* **3**: 803-814

Terasawa K, Okazaki K, Nishida E (2003) Regulation of c-Fos and Fra-1 by the MEK5-ERK5 pathway. *Genes Cells* **8**: 263-273

Theodosiou A, Ashworth A (2002) MAP kinase phosphatases. *Genome Biol* **3**: REVIEWS3009

Theroux S, Pereira M, Casten KS, Burwell RD, Yeung KC, Sedivy JM, Klysik J (2007) Raf kinase inhibitory protein knockout mice: Expression in the brain and olfaction deficit. *Brain research bulletin* **71**: 559-567

Thiels E, Klann E (2001) Extracellular signal-regulated kinase, synaptic plasticity, and memory. *Rev Neurosci* **12**: 327-345

Thomas NE (2006) BRAF somatic mutations in malignant melanoma and melanocytic naevi. *Melanoma Res* **16**: 97-103

Thompson N, Lyons J (2005) Recent progress in targeting the Raf/MEK/ERK pathway with inhibitors in cancer drug discovery. *Curr Opin Pharmacol* **5**: 350-356

Tian J, Karin M (1999) Stimulation of Elk1 transcriptional activity by mitogen-activated protein kinases is negatively regulated by protein phosphatase 2B (calcineurin). *J Biol Chem* **274**: 15173-15180

Tibbles LA, Ing YL, Kiefer F, Chan J, Iscove N, Woodgett JR, Lassam NJ (1996) MLK-3 activates the SAPK/JNK and p38/RK pathways via SEK1 and MKK3/6. *Embo J* **15**: 7026-7035

Timney BL, Tetenbaum-Novatt J, Agate DS, Williams R, Zhang W, Chait BT, Rout MP (2006) Simple kinetic relationships and nonspecific competition govern nuclear import rates in vivo. *J Cell Biol* **175**: 579-593

Tobe K, Kadowaki T, Hara K, Gotoh Y, Kosako H, Matsuda S, Tamemoto H, Ueki K, Akanuma Y, Nishida E, et al. (1992) Sequential activation of MAP kinase activator, MAP kinases, and S6 peptide kinase in intact rat liver following insulin injection. *J Biol Chem* **267**: 21089-21097

Tobiume K, Matsuzawa A, Takahashi T, Nishitoh H, Morita K, Takeda K, Minowa O, Miyazono K, Noda T, Ichijo H (2001) ASK1 is required for sustained activations of JNK/p38 MAP kinases and apoptosis. *EMBO Rep* **2**: 222-228

Todd JL, Tanner KG, Denu JM (1999) Extracellular Regulated Kinases (ERK) 1 and ERK2 Are Authentic Substrates for the Dual-specificity Protein-tyrosine Phosphatase VHR. A NOVEL ROLE IN DOWN-REGULATING THE ERK PATHWAY. *J Biol Chem* **274**: 13271-13280

Tohgo A, Pierce KL, Choy EW, Lefkowitz RJ, Luttrell LM (2002) beta-Arrestin scaffolding of the ERK cascade enhances cytosolic ERK activity but inhibits ERK-mediated transcription following angiotensin AT1a receptor stimulation. *J Biol Chem* **277**: 9429-9436

Tolwinski NS, Shapiro PS, Goueli S, Ahn NG (1999) Nuclear localization of mitogen-activated protein kinase kinase 1 (MKK1) is promoted by serum stimulation and G2-M progression. Requirement for phosphorylation at the activation lip and signaling downstream of MKK. *J Biol Chem* **274**: 6168-6174

Torii S, Kusakabe M, Yamamoto T, Maekawa M, Nishida E (2004a) Sef is a spatial regulator for Ras/MAP kinase signaling. *Developmental cell* **7**: 33-44

Torii S, Nakayama K, Yamamoto T, Nishida E (2004b) Regulatory mechanisms and function of ERK MAP kinases. *J Biochem (Tokyo)* **136**: 557-561

Torii S, Yamamoto T, Tsuchiya Y, Nishida E (2006) ERK MAP kinase in G1 cell cycle progression and cancer. *Cancer Science* **97**: 697-702

Torres M (2003) Mitogen-activated protein kinase pathways in redox signaling. *Front Biosci* **8**: d369-391

Tournier C, Dong C, Turner TK, Jones SN, Flavell RA, Davis RJ (2001) MKK7 is an essential component of the JNK signal transduction pathway activated by proinflammatory cytokines. *Genes Dev* **15**: 1419-1426

Tournier C, Hess P, Yang DD, Xu J, Turner TK, Nimnual A, Bar-Sagi D, Jones SN, Flavell RA, Davis RJ (2000) Requirement of JNK for Stress- Induced Activation of the Cytochrome c-Mediated Death Pathway. *Science* **288**: 870-874

Tournier C, Whitmarsh AJ, Cavanagh J, Barrett T, Davis RJ (1997) Mitogen-activated protein kinase kinase 7 is an activator of the c-Jun NH2-terminal kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**: 7337-7342

Trakul N, Rosner MR (2005) Modulation of the MAP kinase signaling cascade by Raf kinase inhibitory protein. *Cell Res* **15**: 19-23

Traverse S, Seedorf K, Paterson H, Marshall CJ, Cohen P, Ullrich A (1994) EGF triggers neuronal differentiation of PC12 cells that overexpress the EGF receptor. *Curr Biol* **4**: 694-701

Tresini M, Lorenzini A, Frisoni L, Allen RG, Cristofalo VJ (2001) Lack of Elk-1 phosphorylation and dysregulation of the extracellular regulated kinase signaling pathway in senescent human fibroblast. *Exp Cell Res* **269**: 287-300

Tresini M, Lorenzini A, Torres C, Cristofalo VJ (2007) Modulation of Replicative Senescence of Diploid Human Cells by Nuclear ERK Signaling. *J Biol Chem* **282**: 4136-4151

Truckses DM, Bloomekatz JE, Thorner J (2006) The RA domain of Ste50 adaptor protein is required for delivery of Ste11 to the plasma membrane in the filamentous growth signaling pathway of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **26**: 912-928

Truman AW, Millson SH, Nuttall JM, King V, Mollapour M, Prodromou C, Pearl LH, Piper PW (2006) Expressed in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*, Human ERK5 Is a Client of the Hsp90 Chaperone That Complements Loss of the Slt2p (Mpk1p) Cell Integrity Stress-Activated Protein Kinase. *Eukaryot Cell* **5**: 1914-1924

Tsang M, Friesel R, Kudoh T, Dawid IB (2002) Identification of Sef, a novel modulator of FGF signalling. *Nat Cell Biol* **4**: 165-169

Tuncman G, Hirosumi J, Solinas G, Chang L, Karin M, Hotamisligil GS (2006) Functional in vivo interactions between JNK1 and JNK2 isoforms in obesity and insulin resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 10741-10746

- Turner CE (2000) Paxillin interactions. *J Cell Sci* **113 Pt 23**: 4139-4140
- Ubeda M, Wang XZ, Zinszner H, Wu I, Habener JF, Ron D (1996) Stress-induced binding of the transcriptional factor CHOP to a novel DNA control element. *Mol Cell Biol* **16**: 1479-1489
- Ueda T, Watanabe-Fukunaga R, Fukuyama H, Nagata S, Fukunaga R (2004) Mnk2 and Mnk1 Are Essential for Constitutive and Inducible Phosphorylation of Eukaryotic Initiation Factor 4E but Not for Cell Growth or Development. *Mol Cell Biol* **24**: 6539-6549
- Uhlik MT, Abell AN, Cuevas BD, Nakamura K, Johnson GL (2004) Wiring diagrams of MAPK regulation by MEKK1, 2, and 3. *Biochem Cell Biol* **82**: 658-663
- Uhlik MT, Abell AN, Johnson NL, Sun W, Cuevas BD, Lobel-Rice KE, Horne EA, Dell'Acqua ML, Johnson GL (2003) Rac-MEKK3-MKK3 scaffolding for p38 MAPK activation during hyperosmotic shock. *Nat Cell Biol* **5**: 1104-1110
- Ussar S, Voss T (2004) MEK1 and MEK2, different regulators of the G1/S transition. *J Biol Chem* **279**: 43861-43869
- Van Aelst L, Barr M, Marcus S, Polverino A, Wigler M (1993) Complex formation between RAS and RAF and other protein kinases. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**: 6213-6217
- Van Den Blink B, Ten Hove T, Van Den Brink GR, Peppelenbosch MP, Van Deventer SJ (2002) From extracellular to intracellular targets, inhibiting MAP kinases in treatment of Crohn's disease. *Ann N Y Acad Sci* **973**: 349-358
- van Drogen F, Peter M (2001) MAP kinase dynamics in yeast. *Biol Cell* **93**: 63-70
- van Drogen F, Peter M (2002) Spa2p functions as a scaffold-like protein to recruit the Mpk1p MAP kinase module to sites of polarized growth. *Curr Biol* **12**: 1698-1703
- van Drogen F, Stucke VM, Jorritsma G, Peter M (2001) MAP kinase dynamics in response to pheromones in budding yeast. *Nat Cell Biol* **3**: 1051-1059
- van Vliet C, Thomas EC, Merino-Trigo A, Teasdale RD, Gleeson PA (2003) Intracellular sorting and transport of proteins. *Progress in Biophysics and Molecular Biology* **83**: 1-45
- Vantaggiato C, Formentini I, Bondanza A, Bonini C, Naldini L, Brambilla R (2006) ERK1 and ERK2 mitogen-activated protein kinases affect Ras-dependent cell signaling differentially. *Journal of Biology* **5**: 14

Vaudry D, Stork PJ, Lazarovici P, Eiden LE (2002) Signaling pathways for PC12 cell differentiation: making the right connections. *Science* **296**: 1648-1649

Ventura J-J, Hubner A, Zhang C, Flavell RA, Shokat KM, Davis RJ (2006) Chemical Genetic Analysis of the Time Course of Signal Transduction by JNK. *Molecular Cell* **21**: 701-710

Vidal M (2005) Interactome modeling. *FEBS Lett* **579**: 1834-1838

Villen J, Beausoleil SA, Gerber SA, Gygi SP (2007) Large-scale phosphorylation analysis of mouse liver. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 1488-1493

Vinciguerra M, Vivacqua A, Fasanella G, Gallo A, Cuzzo C, Morano A, Maggiolini M, Musti AM (2004) Differential phosphorylation of c-Jun and JunD in response to the epidermal growth factor is determined by the structure of MAPK targeting sequences. *J Biol Chem* **279**: 9634-9641

Voet D, Voet JG (2004) *Biochemistry*, 3rd edn. [New-York]: John Wiley & Sons.

Vojtek AB, Hollenberg SM, Cooper JA (1993) Mammalian Ras interacts directly with the serine/threonine kinase Raf. *Cell* **74**: 205-214

Volmat V, Camps M, Arkinstall S, Pouyssegur J, Lenormand P (2001) The nucleus, a site for signal termination by sequestration and inactivation of p42/p44 MAP kinases. *J Cell Sci* **114**: 3433-3443

Volmat V, Pouyssegur J (2001) Spatiotemporal regulation of the p42/p44 MAPK pathway. *Biology of the cell / under the auspices of the European Cell Biology Organization* **93**: 71-79

Vomastek T, Schaeffer HJ, Tarcsafalvi A, Smolkin ME, Bissonette EA, Weber MJ (2004) Modular construction of a signaling scaffold: MORG1 interacts with components of the ERK cascade and links ERK signaling to specific agonists. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 6981-6986

von Kriegsheim A, Pitt A, Grindlay GJ, Kolch W, Dhillon AS (2006) Regulation of the Raf-MEK-ERK pathway by protein phosphatase 5. *Nat Cell Biol* **8**: 1011-1016

Vouret-Craviari V, Van Obberghen-Schilling E, Scimeca JC, Van Obberghen E, Pouyssegur J (1993) Differential activation of p44mapk (ERK1) by alpha-thrombin and thrombin-receptor peptide agonist. *Biochem J* **289** (Pt 1): 209-214

Vrailas AD, Marendra DR, Cook SE, Powers MA, Lorenzen JA, Perkins LA, Moses K (2006) Smoothed and thickveins regulate Moleskin/Importin 7-mediated MAP kinase signaling in the developing Drosophila eye. *Development* **133**: 1485-1494

Wada T, Joza N, Cheng HY, Sasaki T, Kozieradzki I, Bachmaier K, Katada T, Schreiber M, Wagner EF, Nishina H, Penninger JM (2004) MKK7 couples stress signalling to G2/M cell-cycle progression and cellular senescence. *Nat Cell Biol* **6**: 215-226

Wada T, Penninger JM (2004) Mitogen-activated protein kinases in apoptosis regulation. *Oncogene* **23**: 2838-2849

Waeber G, Delplanque J, Bonny C, Mooser V, Steinmann M, Widmann C, Maillard A, Miklossy J, Dina C, Hani EH, Vionnet N, Nicod P, Boutin P, Froguel P (2000) The gene MAPK8IP1, encoding islet-brain-1, is a candidate for type 2 diabetes. *Nat Genet* **24**: 291-295

Wagner M, Briza P, Pierce M, Winter E (1999) Distinct steps in yeast spore morphogenesis require distinct SMK1 MAP kinase thresholds. *Genetics* **151**: 1327-1340

Wagner M, Pierce M, Winter E (1997) The CDK-activating kinase CAK1 can dosage suppress sporulation defects of smk1 MAP kinase mutants and is required for spore wall morphogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Embo J* **16**: 1305-1317

Wallace EM, Lyssikatos JP, Yeh T, Winkler JD, Koch K (2005) Progress towards therapeutic small molecule MEK inhibitors for use in cancer therapy. *Curr Top Med Chem* **5**: 215-229

Walter P, Blobel G (1980) Purification of a membrane-associated protein complex required for protein translocation across the endoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci U S A* **77**: 7112-7116

Wang D, Boerner SA, Winkler JD, LoRusso PM (2006a) Clinical experience of MEK inhibitors in cancer therapy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* **Sous presse**

Wang D, Boerner SA, Winkler JD, LoRusso PM (2007a) Clinical experience of MEK inhibitors in cancer therapy. *Biochim Biophys Acta* **1773**: 1248-1255

Wang R, He G, Nelman-Gonzalez M, Ashorn CL, Gallick GE, Stukenberg PT, Kirschner MW, Kuang J (2007b) Regulation of Cdc25C by ERK-MAP kinases during the G2/M transition. *Cell* **128**: 1119-1132

Wang W, Chen JX, Liao R, Deng Q, Zhou JJ, Huang S, Sun P (2002) Sequential activation of the MEK-extracellular signal-regulated kinase and MKK3/6-p38 mitogen-activated protein kinase pathways mediates oncogenic ras-induced premature senescence. *Mol Cell Biol* **22**: 3389-3403

Wang X, Destrumant A, Tournier C (2006b) Physiological roles of MKK4 and MKK7: Insights from animal models. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* **Sous presse**

Wang X, Destrumant A, Tournier C (2007c) Physiological roles of MKK4 and MKK7: insights from animal models. *Biochim Biophys Acta* **1773**: 1349-1357

Wang X, Grammatikakis N, Siganou A, Stevenson MA, Calderwood SK (2004) Interactions between extracellular signal-regulated protein kinase 1, 14-3-3epsilon, and heat shock factor 1 during stress. *J Biol Chem* **279**: 49460-49469

Wang X, Hoekstra MF, DeMaggio AJ, Dhillon N, Vancura A, Kuret J, Johnston GC, Singer RA (1996) Prenylated isoforms of yeast casein kinase I, including the novel Yck3p, suppress the *gcs1* blockage of cell proliferation from stationary phase. *Mol Cell Biol* **16**: 5375-5385

Wang X, Merritt AJ, Seyfried J, Guo C, Papadakis ES, Finegan KG, Kayahara M, Dixon J, Boot-Handford RP, Cartwright EJ, Mayer U, Tournier C (2005) Targeted deletion of *mek5* causes early embryonic death and defects in the extracellular signal-regulated kinase 5/myocyte enhancer factor 2 cell survival pathway. *Mol Cell Biol* **25**: 336-345

Wang X, Tournier C (2006) Regulation of cellular functions by the ERK5 signalling pathway. *Cell Signal* **18**: 753-760

Wang XS, Diener K, Tan TH, Yao Z (1998a) MAPKKK6, a novel mitogen-activated protein kinase kinase kinase, that associates with MAPKKK5. *Biochem Biophys Res Commun* **253**: 33-37

Wang XZ, Ron D (1996) Stress-induced phosphorylation and activation of the transcription factor CHOP (GADD153) by p38 MAP Kinase. *Science* **272**: 1347-1349

Wang Y, Elion EA (2003) Nuclear export and plasma membrane recruitment of the Ste5 scaffold are coordinated with oligomerization and association with signal transduction components. *Mol Biol Cell* **14**: 2543

Wang Y, Huang S, Sah VP, Ross J, Jr., Brown JH, Han J, Chien KR (1998b) Cardiac muscle cell hypertrophy and apoptosis induced by distinct members of the p38 mitogen-activated protein kinase family. *J Biol Chem* **273**: 2161-2168

Wang Z, Harkins PC, Ulevitch RJ, Han J, Cobb MH, Goldsmith EJ (1997) The structure of mitogen-activated protein kinase p38 at 2.1-Å resolution. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**: 2327-2332

Warmka J, Hanneman J, Lee J, Amin D, Ota I (2001) Ptc1, a type 2C Ser/Thr phosphatase, inactivates the HOG pathway by dephosphorylating the mitogen-activated protein kinase Hog1. *Mol Cell Biol* **21**: 51-60

Waskiewicz AJ, Flynn A, Proud CG, Cooper JA (1997) Mitogen-activated protein kinases activate the serine/threonine kinases Mnk1 and Mnk2. *Embo J* **16**: 1909-1920

Waskiewicz AJ, Johnson JC, Penn B, Mahalingam M, Kimball SR, Cooper JA (1999) Phosphorylation of the cap-binding protein eukaryotic translation initiation factor 4E by protein kinase Mnk1 in vivo. *Mol Cell Biol* **19**: 1871-1880

Watanabe T, Nakagawa K, Ohata S, Kitagawa D, Nishitai G, Seo J, Tanemura S, Shimizu N, Kishimoto H, Wada T, Aoki J, Arai H, Iwatsubo T, Mochita M, Watanabe T, Satake M, Ito Y, Matsuyama T, Mak TW, Penninger JM, Nishina H, Katada T (2002) SEK1/MKK4-Mediated SAPK/JNK Signaling Participates in Embryonic Hepatoblast Proliferation via a Pathway Different from NF- κ B-Induced Anti-Apoptosis. *Dev Biol* **250**: 332-347

Weber JD, Raben DM, Phillips PJ, Baldassare JJ (1997) Sustained activation of extracellular-signal-regulated kinase 1 (ERK1) is required for the continued expression of cyclin D1 in G1 phase. *Biochem J* **326** (Pt 1): 61-68

Weis K (2002) Nucleocytoplasmic transport: cargo trafficking across the border. *Curr Opin Cell Biol* **14**: 328-335

Weis K (2003) Regulating access to the genome: nucleocytoplasmic transport throughout the cell cycle. *Cell* **112**: 441-451

Weis K, Dingwall C, Lamond AI (1996) Characterization of the nuclear protein import mechanism using Ran mutants with altered nucleotide binding specificities. *Embo J* **15**: 7120-7128

Wellbrock C, Karasarides M, Marais R (2004) The RAF proteins take centre stage. *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**: 875-885

Werry TD, Sexton PM, Christopoulos A (2005) "Ins and outs" of seven-transmembrane receptor signalling to ERK. *Trends Endocrinol Metab* **16**: 26-33

Westermarck J, Holmstrom T, Ahonen M, Eriksson JE, Kahari VM (1998) Enhancement of fibroblast collagenase-1 (MMP-1) gene expression by tumor promoter okadaic acid is mediated by stress-activated protein kinases Jun N-terminal kinase and p38. *Matrix Biol* **17**: 547-557

Westermarck J, Li SP, Kallunki T, Han J, Kahari VM (2001) p38 mitogen-activated protein kinase-dependent activation of protein phosphatases 1 and 2A inhibits MEK1 and MEK2 activity and collagenase 1 (MMP-1) gene expression. *Mol Cell Biol* **21**: 2373-2383

Westermarck J, Lohi J, Keski-Oja J, Kahari VM (1994) Okadaic acid-elicited transcriptional activation of collagenase gene expression in HT-1080 fibrosarcoma cells is mediated by JunB. *Cell Growth Differ* **5**: 1205-1213

Weston CR, Davis RJ (2002) The JNK signal transduction pathway. *Curr Opin Genet Dev* **12**: 14-21

Weston CR, Davis RJ (2007) The JNK signal transduction pathway. *Current Opinion in Cell Biology* **19**: 142-149

White MF (2003) Insulin Signaling in Health and Disease. *Science* **302**: 1710-1711

Whitehurst A, Cobb MH, White MA (2004a) Stimulus-coupled spatial restriction of extracellular signal-regulated kinase 1/2 activity contributes to the specificity of signal-response pathways. *Mol Cell Biol* **24**: 10145-10150

Whitehurst AW, Robinson FL, Moore MS, Cobb MH (2004b) The death effector domain protein PEA-15 prevents nuclear entry of ERK2 by inhibiting required interactions. *J Biol Chem* **279**: 12840-12847

Whitehurst AW, Wilsbacher JL, You Y, Luby-Phelps K, Moore MS, Cobb MH (2002) ERK2 enters the nucleus by a carrier-independent mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 7496-7501

Whiteway MS, Wu C, Leeuw T, Clark K, Fourest-Lieuvin A, Thomas DY, Leberer E (1995) Association of the yeast pheromone response G protein beta gamma subunits with the MAP kinase scaffold Ste5p. *Science* **269**: 1572-1575

Whitmarsh AJ (2006a) Regulation of gene transcription by mitogen-activated protein kinase signaling pathways. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* **Sous presse**

Whitmarsh AJ (2006b) The JIP family of MAPK scaffold proteins. *Biochem Soc Trans* **34**: 828-832

Whitmarsh AJ, Cavanagh J, Tournier C, Yasuda J, Davis RJ (1998) A mammalian scaffold complex that selectively mediates MAP kinase activation. *Science* **281**: 1671-1674

Whitmarsh AJ, Kuan C-Y, Kennedy NJ, Kelkar N, Haydar TF, Mordes JP, Appel M, Rossini AA, Jones SN, Flavell RA, Rakic P, Davis RJ (2001) Requirement of the JIP1 scaffold protein for stress-induced JNK activation. *Genes Dev* **15**: 2421-2432

Wickner W, Schekman R (2005) Protein Translocation Across Biological Membranes. *Science* **310**: 1452-1456

Widmann C, Gibson S, Jarpe MB, Johnson GL (1999) Mitogen-Activated Protein Kinase: Conservation of a Three-Kinase Module From Yeast to Human. *Physiol Rev* **79**: 143-180

Wilhelm SM, Carter C, Tang L, Wilkie D, McNabola A, Rong H, Chen C, Zhang X, Vincent P, McHugh M, Cao Y, Shujath J, Gawlak S, Eveleigh D, Rowley B, Liu L, Adnane L, Lynch M, Auclair D, Taylor I, Gedrich R, Voznesensky A, Riedl B, Post LE, Bollag G, Trail PA (2004) BAY 43-9006 Exhibits Broad Spectrum Oral Antitumor Activity and Targets the RAF/MEK/ERK Pathway and Receptor Tyrosine Kinases Involved in Tumor Progression and Angiogenesis. *Cancer Research* **64**: 7099-7109

Wilkinson MG, Millar JB (2000) Control of the eukaryotic cell cycle by MAP kinase signaling pathways. *Faseb J* **14**: 2147-2157

Williams SF, Smallridge RC (2004) Targeting the ERK pathway: novel therapeutics for thyroid cancer. *Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord* **4**: 199-220

Wilsbacher JL, Juang YC, Khokhlatchev AV, Gallagher E, Binns D, Goldsmith EJ, Cobb MH (2006) Characterization of mitogen-activated protein kinase (MAPK) dimers. *Biochemistry* **45**: 13175-13182

Wilson KP, Fitzgibbon MJ, Caron PR, Griffith JP, Chen W, McCaffrey PG, Chambers SP, Su MS (1996) Crystal structure of p38 mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem* **271**: 27696-27700

Wojnowski L, Zimmer AM, Beck TW, Hahn H, Bernal R, Rapp UR (1997) Endothelial apoptosis in Braf-deficient mice. *Nat Genet* **16**: 293-297

Wolf I, Rubinfeld H, Yoon S, Marmor G, Hanoch T, Seger R (2001) Involvement of the activation loop of ERK in the detachment from cytosolic anchoring. *J Biol Chem* **276**: 24490-24497

Wong CH, Cheng CY (2005) Mitogen-activated protein kinases, adherens junction dynamics, and spermatogenesis: a review of recent data. *Dev Biol* **286**: 1-15

Wood KW, Sarnecki C, Roberts TM, Blenis J (1992) ras mediates nerve growth factor receptor modulation of three signal-transducing protein kinases: MAP kinase, Raf-1, and RSK. *Cell* **68**: 1041-1050

Wright JH, Munar E, Jameson DR, Andreassen PR, Margolis RL, Seger R, Krebs EG (1999) Mitogen-activated protein kinase kinase activity is required for the G(2)/M transition of the cell cycle in mammalian fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 11335-11340

Wu C, Arcand M, Jansen G, Zhong M, Iouk T, Thomas DY, Meloche S, Whiteway M (2003) Phosphorylation of the MAPKKK regulator Ste50p in *Saccharomyces cerevisiae*: a casein kinase I phosphorylation site is required for proper mating function. *Eukaryot Cell* **2**: 949-961

Wu C, Jansen G, Zhang J, Thomas DY, Whiteway M (2006a) Adaptor protein Ste50p links the Ste11p MEKK to the HOG pathway through plasma membrane association. *Genes Dev* **20**: 734-746

Wu C, Leberer E, Thomas DY, Whiteway M (1999) Functional characterization of the interaction of Ste50p with Ste11p MAPKKK in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* **10**: 2425-2440

Wu GS (2004) The functional interactions between the p53 and MAPK signaling pathways. *Cancer biology & therapy* **3**: 156-161

Wu J, Harrison JK, Dent P, Lynch KR, Weber MJ, Sturgill TW (1993a) Identification and characterization of a new mammalian mitogen-activated protein kinase kinase, MKK2. *Mol Cell Biol* **13**: 4539-4548

Wu J, Harrison JK, Vincent LA, Haystead C, Haystead TA, Michel H, Hunt DF, Lynch KR, Sturgill TW (1993b) Molecular structure of a protein-tyrosine/threonine kinase

activating p42 mitogen-activated protein (MAP) kinase: MAP kinase kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**: 173-177

Wu J, Rossomando AJ, Her JH, Del Vecchio R, Weber MJ, Sturgill TW (1991) Autophosphorylation in vitro of recombinant 42-kilodalton mitogen-activated protein kinase on tyrosine. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**: 9508-9512

Wu SL, Kim J, Bandle RW, Liotta L, Petricoin E, Karger BL (2006b) Dynamic profiling of the post-translational modifications and interaction partners of epidermal growth factor receptor signaling after stimulation by epidermal growth factor using Extended Range Proteomic Analysis (ERPA). *Mol Cell Proteomics* **5**: 1610-1627

Wu X, Noh SJ, Zhou G, Dixon JE, Guan KL (1996) Selective activation of MEK1 but not MEK2 by A-Raf from epidermal growth factor-stimulated Hela cells. *J Biol Chem* **271**: 3265-3271

Wu Z, Wu J, Jacinto E, Karin M (1997) Molecular cloning and characterization of human JNKK2, a novel Jun NH2-terminal kinase-specific kinase. *Mol Cell Biol* **17**: 7407-7416

Wullschleger S, Loewith R, Hall MN (2006) TOR Signaling in Growth and Metabolism. *Cell* **124**: 471-484

Wunderlich W, Fialka I, Teis D, Alpi A, Pfeifer A, Parton RG, Lottspeich F, Huber LA (2001) A novel 14-kilodalton protein interacts with the mitogen-activated protein kinase scaffold mp1 on a late endosomal/lysosomal compartment. *J Cell Biol* **152**: 765-776

Wurgler-Murphy SM, Maeda T, Witten EA, Saito H (1997) Regulation of the *Saccharomyces cerevisiae* HOG1 mitogen-activated protein kinase by the PTP2 and PTP3 protein tyrosine phosphatases. *Mol Cell Biol* **17**: 1289-1297

Wysk M, Yang DD, Lu HT, Flavell RA, Davis RJ (1999) Requirement of mitogen-activated protein kinase kinase 3 (MKK3) for tumor necrosis factor-induced cytokine expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 3763-3768

Xia Y, Wu Z, Su B, Murray B, Karin M (1998) JNKK1 organizes a MAP kinase module through specific and sequential interactions with upstream and downstream components mediated by its amino-terminal extension. *Genes Dev* **12**: 3369-3381

Xie X, Gu Y, Fox T, Coll JT, Fleming MA, Markland W, Caron PR, Wilson KP, Su MS (1998) Crystal structure of JNK3: a kinase implicated in neuronal apoptosis. *Structure* **6**: 983-991

Xiong S, Zhao Q, Rong Z, Huang G, Huang Y, Chen P, Zhang S, Liu L, Chang Z (2003) hSef inhibits PC-12 cell differentiation by interfering with Ras-mitogen-activated protein kinase MAPK signaling. *J Biol Chem* **278**: 50273-50282

Xu B, Stippec S, Robinson FL, Cobb MH (2001) Hydrophobic as well as charged residues in both MEK1 and ERK2 are important for their proper docking. *J Biol Chem* **276**: 26509-26515

Xu G, Jansen G, Thomas DY, Hollenberg CP, Ramezani Rad M (1996) Ste50p sustains mating pheromone-induced signal transduction in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol* **20**: 773-783

Xu L, Massague J (2004) Nucleocytoplasmic shuttling of signal transducers. *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**: 209-219

Xu S, Khoo S, Dang A, Witt S, Do V, Zhen E, Schaefer EM, Cobb MH (1997) Differential regulation of mitogen-activated protein/ERK kinase (MEK)1 and MEK2 and activation by a Ras-independent mechanism. *Mol Endocrinol* **11**: 1618-1625

Xu S, Robbins D, Frost J, Dang A, Lange-Carter C, Cobb MH (1995) MEKK1 phosphorylates MEK1 and MEK2 but does not cause activation of mitogen-activated protein kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**: 6808-6812

Xue Y, Li A, Wang L, Feng H, Yao X (2006) PPSP: prediction of PK-specific phosphorylation site with Bayesian decision theory. *BMC bioinformatics* **7**: 163

Yablonski D, Marbach I, Levitzki A (1996) Dimerization of Ste5, a mitogen-activated protein kinase cascade scaffold protein, is required for signal transduction. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 13864-13869

Yaffe MB, Elia AE (2001) Phosphoserine/threonine-binding domains. *Curr Opin Cell Biol* **13**: 131-138

Yamaguchi K, Shirakabe K, Shibuya H, Irie K, Oishi I, Ueno N, Taniguchi T, Nishida E, Matsumoto K (1995) Identification of a member of the MAPKKK family as a potential mediator of TGF-beta signal transduction. *Science* **270**: 2008-2011

Yamaguchi O, Higuchi Y, Hirotani S, Kashiwase K, Nakayama H, Hikoso S, Takeda T, Watanabe T, Asahi M, Taniike M, Matsumura Y, Tsujimoto I, Hongo K, Kusakari Y, Kurihara S, Nishida K, Ichijo H, Hori M, Otsu K (2003) Targeted deletion of apoptosis signal-regulating kinase 1 attenuates left ventricular remodeling. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 15883-15888

- Yamamoto T, Ebisuya M, Ashida F, Okamoto K, Yonehara S, Nishida E (2006) Continuous ERK Activation Downregulates Antiproliferative Genes throughout G1 Phase to Allow Cell-Cycle Progression. *Current Biology* **16**: 1171-1182
- Yan C, Luo H, Lee JD, Abe J, Berk BC (2001) Molecular cloning of mouse ERK5/BMK1 splice variants and characterization of ERK5 functional domains. *J Biol Chem* **276**: 10870-10878
- Yan L, Carr J, Ashby PR, Murry-Tait V, Thompson C, Arthur JS (2003) Knockout of ERK5 causes multiple defects in placental and embryonic development. *BMC Dev Biol* **3**: 11
- Yang CC, Ornatsky OI, McDermott JC, Cruz TF, Prody CA (1998a) Interaction of myocyte enhancer factor 2 (MEF2) with a mitogen- activated protein kinase, ERK5/BMK1. *Nucleic Acids Research* **26**: 4771-4777
- Yang D, Tournier C, Wysk M, Lu H-T, Xu J, Davis RJ, Flavell RA (1997a) Targeted disruption of the MKK4 gene causes embryonic death, inhibition of c-Jun NH2-terminal kinase activation, and defects in AP-1 transcriptional activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**: 3004-3009
- Yang DD, Conze D, Whitmarsh AJ, Barrett T, Davis RJ, Rincon M, Flavell RA (1998b) Differentiation of CD4+ T Cells to Th1 Cells Requires MAP Kinase JNK2. *Immunity* **9**: 575-585
- Yang DD, Kuan CY, Whitmarsh AJ, Rincon M, Zheng TS, Davis RJ, Rakic P, Flavell RA (1997b) Absence of excitotoxicity-induced apoptosis in the hippocampus of mice lacking the Jnk3 gene. *Nature* **389**: 865-870
- Yang F, Moss LG, Phillips GN, Jr. (1996) The molecular structure of green fluorescent protein. *Nat Biotechnol* **14**: 1246-1251
- Yang J, Boerm M, McCarty M, Bucana C, Fidler IJ, Zhuang Y (2000) Mek3 is essential for early embryonic cardiovascular development. *Nat Genet* **24**: 309-313
- Yang J, Kornbluth S (1999) All aboard the cyclin train: subcellular trafficking of cyclins and their CDK partners. *Trends in Cell Biology* **9**: 207-210
- Yang SH, Galanis A, Sharrocks AD (1999) Targeting of p38 mitogen-activated protein kinases to MEF2 transcription factors. *Mol Cell Biol* **19**: 4028-4038

Yang SH, Sharrocks AD (2006) Interplay of the SUMO and MAP kinase pathways. *Ernst Schering Res Found Workshop*: 193-209

Yang SH, Sharrocks AD, Whitmarsh AJ (2003a) Transcriptional regulation by the MAP kinase signaling cascades. *Gene* **320**: 3-21

Yang TT, Xiong Q, Graef IA, Crabtree GR, Chow CW (2005) Recruitment of the extracellular signal-regulated kinase/ribosomal S6 kinase signaling pathway to the NFATc4 transcription activation complex. *Mol Cell Biol* **25**: 907-920

Yang YM, Bost F, Charbono W, Dean N, McKay R, Rhim JS, Depatie C, Mercola D (2003b) C-Jun NH(2)-terminal kinase mediates proliferation and tumor growth of human prostate carcinoma. *Clin Cancer Res* **9**: 391-401

Yao Y, Li W, Wu J, Germann UA, Su MS, Kuida K, Boucher DM (2003) Extracellular signal-regulated kinase 2 is necessary for mesoderm differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 12759-12764

Yao Z, Diener K, Wang XS, Zukowski M, Matsumoto G, Zhou G, Mo R, Sasaki T, Nishina H, Hui CC, Tan T-H, Woodgett JP, Penninger JM (1997) Activation of Stress-activated Protein Kinases/c-Jun N-terminal Protein Kinases (SAPKs/JNKs) by a Novel Mitogen-activated Protein Kinase Kinase (MKK7). *J Biol Chem* **272**: 32378-32383

Yao Z, Duan S, Hou D, Heese K, Wu M (2007) Death effector domain DEDa, a self-cleaved product of caspase-8/Mch5, translocates to the nucleus by binding to ERK1/2 and upregulates procaspase-8 expression via a p53-dependent mechanism. *Embo J* **26**: 1068-1080

Yao Z, Flash I, Raviv Z, Yung Y, Asscher Y, Pleban S, Seger R (2001) Non-regulated and stimulated mechanisms cooperate in the nuclear accumulation of MEK1. *Oncogene* **20**: 7588-7596

Yeung K, Janosch P, McFerran B, Rose DW, Mischak H, Sedivy JM, Kolch W (2000) Mechanism of suppression of the Raf/MEK/extracellular signal-regulated kinase pathway by the raf kinase inhibitor protein. *Mol Cell Biol* **20**: 3079-3085

Yeung K, Seitz T, Li S, Janosch P, McFerran B, Kaiser C, Fee F, Katsanakis KD, Rose DW, Mischak H, Sedivy JM, Kolch W (1999) Suppression of Raf-1 kinase activity and MAP kinase signalling by RKIP. *Nature* **401**: 173-177

Yeung KC, Rose DW, Dhillon AS, Yaros D, Gustafsson M, Chatterjee D, McFerran B, Wyche J, Kolch W, Sedivy JM (2001) Raf kinase inhibitor protein interacts with NF-

kappaB-inducing kinase and TAK1 and inhibits NF-kappaB activation. *Mol Cell Biol* **21**: 7207-7217

Yin G, Haendeler J, Yan C, Berk BC (2004) GIT1 functions as a scaffold for MEK1-extracellular signal-regulated kinase 1 and 2 activation by angiotensin II and epidermal growth factor. *Mol Cell Biol* **24**: 875-885

Yin G, Zheng Q, Yan C, Berk BC (2005) GIT1 is a scaffold for ERK1/2 activation in focal adhesions. *J Biol Chem* **280**: 27705-27712

Yoon S, Seger R (2006) The extracellular signal-regulated kinase: multiple substrates regulate diverse cellular functions. *Growth Factors* **24**: 21-44

York RD, Molliver DC, Grewal SS, Stenberg PE, McCleskey EW, Stork PJ (2000) Role of phosphoinositide 3-kinase and endocytosis in nerve growth factor-induced extracellular signal-regulated kinase activation via Ras and Rap1. *Mol Cell Biol* **20**: 8069-8083

York RD, Yao H, Dillon T, Ellig CL, Eckert SP, McCleskey EW, Stork PJ (1998) Rap1 mediates sustained MAP kinase activation induced by nerve growth factor. *Nature* **392**: 622-626

Yoshioka K (2004) Scaffold proteins in mammalian MAP kinase cascades. *J Biochem (Tokyo)* **135**: 657-661

Yu W, Fantl WJ, Harrowe G, Williams LT (1998) Regulation of the MAP kinase pathway by mammalian Ksr through direct interaction with MEK and ERK. *Curr Biol* **8**: 56-64

Yung Y, Yao Z, Aebersold DM, Hanoch T, Seger R (2001) Altered regulation of ERK1b by MEK1 and PTP-SL and modified Elk1 phosphorylation by ERK1b are caused by abrogation of the regulatory C-terminal sequence of ERKs. *J Biol Chem* **276**: 35280-35289

Yung Y, Yao Z, Hanoch T, Seger R (2000) ERK1b, a 46-kDa ERK isoform that is differentially regulated by MEK. *J Biol Chem* **275**: 15799-15808

Zanzoni A, Ausiello G, Via A, Gherardini PF, Helmer-Citterich M (2007) Phospho3D: a database of three-dimensional structures of protein phosphorylation sites. *Nucleic Acids Res* **35**: D229-231

Zarubin T, Han J (2005) Activation and signaling of the p38 MAP kinase pathway. *Cell Res* **15**: 11-18

Zecevic M, Catling AD, Eblen ST, Renzi L, Hittle JC, Yen TJ, Gorbsky GJ, Weber MJ (1998) Active MAP kinase in mitosis: localization at kinetochores and association with the motor protein CENP-E. *J Cell Biol* **142**: 1547-1558

Zechner D, Thuerauf DJ, Hanford DS, McDonough PM, Glembotski CC (1997) A role for the p38 mitogen-activated protein kinase pathway in myocardial cell growth, sarcomeric organization, and cardiac-specific gene expression. *J Cell Biol* **139**: 115-127

Zeitler B, Weis K (2004) The FG-repeat asymmetry of the nuclear pore complex is dispensable for bulk nucleocytoplasmic transport in vivo. *J Cell Biol* **167**: 583-590

Zervos AS, Faccio L, Gatto JP, Kyriakis JM, Brent R (1995) Mxi2, a mitogen-activated protein kinase that recognizes and phosphorylates Max protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**: 10531-10534

Zhan XL, Deschenes RJ, Guan KL (1997) Differential regulation of FUS3 MAP kinase by tyrosine-specific phosphatases PTP2/PTP3 and dual-specificity phosphatase MSG5 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev* **11**: 1690-1702

Zhang F, Strand A, Robbins D, Cobb MH, Goldsmith EJ (1994) Atomic structure of the MAP kinase ERK2 at 2.3 Å resolution. *Nature* **367**: 704-711

Zhang H, Shi X, Hampong M, Blanis L, Pelech S (2001) Stress-induced inhibition of ERK1 and ERK2 by direct interaction with p38 MAP kinase. *J Biol Chem* **276**: 6905-6908

Zhang J, Zhang F, Ebert D, Cobb MH, Goldsmith EJ (1995) Activity of the MAP kinase ERK2 is controlled by a flexible surface loop. *Structure* **3**: 299-307

Zhang S, Fukushi M, Hashimoto S, Gao C, Huang L, Fukuyo Y, Nakajima T, Amagasa T, Enomoto S, Koike K (2002) A new ERK2 binding protein, Naf1, attenuates the EGF/ERK2 nuclear signaling. *Biochem Biophys Res Commun* **297**: 17-23

Zhang W, Liu HT (2002) MAPK signal pathways in the regulation of cell proliferation in mammalian cells. *Cell Res* **12**: 9-18

Zhang XF, Settleman J, Kyriakis JM, Takeuchi-Suzuki E, Elledge SJ, Marshall MS, Bruder JT, Rapp UR, Avruch J (1993) Normal and oncogenic p21ras proteins bind to the amino-terminal regulatory domain of c-Raf-1. *Nature* **364**: 308-313

Zhang Y, Neo SY, Wang X, Han J, Lin S-C (1999) Axin Forms a Complex with MEKK1 and Activates c-Jun NH2-terminal Kinase/Stress-activated Protein Kinase through Domains Distinct from Wnt Signaling. *J Biol Chem* **274**: 35247-35254

Zhao C, Yu DH, Shen R, Feng GS (1999a) Gab2, a new pleckstrin homology domain-containing adapter protein, acts to uncouple signaling from ERK kinase to Elk-1. *J Biol Chem* **274**: 19649-19654

Zhao J, Yuan X, Frodin M, Grummt I (2003) ERK-dependent phosphorylation of the transcription initiation factor TIF-IA is required for RNA polymerase I transcription and cell growth. *Mol Cell* **11**: 405-413

Zhao M, New L, Kravchenko VV, Kato Y, Gram H, di Padova F, Olson EN, Ulevitch RJ, Han J (1999b) Regulation of the MEF2 family of transcription factors by p38. *Mol Cell Biol* **19**: 21-30

Zheng CF, Guan KL (1993a) Cloning and characterization of two distinct human extracellular signal-regulated kinase activator kinases, MEK1 and MEK2. *J Biol Chem* **268**: 11435-11439

Zheng CF, Guan KL (1993b) Properties of MEKs, the kinases that phosphorylate and activate the extracellular signal-regulated kinases. *J Biol Chem* **268**: 23933-23939

Zheng CF, Guan KL (1994) Activation of MEK family kinases requires phosphorylation of two conserved Ser/Thr residues. *Embo J* **13**: 1123-1131

Zhou B, Wang Z-X, Zhao Y, Brautigan DL, Zhang Z-Y (2002) The Specificity of Extracellular Signal-regulated Kinase 2 Dephosphorylation by Protein Phosphatases. *J Biol Chem* **277**: 31818-31825

Zhou B, Zhang J, Liu S, Reddy S, Wang F, Zhang Z-Y (2006a) Mapping ERK2-MKP3 Binding Interfaces by Hydrogen/Deuterium Exchange Mass Spectrometry. *J Biol Chem* **281**: 38834-38844

Zhou G, Bao ZQ, Dixon JE (1995) Components of a new human protein kinase signal transduction pathway. *J Biol Chem* **270**: 12665-12669

Zhou T, Sun L, Humphreys J, Goldsmith EJ (2006b) Docking interactions induce exposure of activation loop in the MAP kinase ERK2. *Structure* **14**: 1011-1019

Zhu X, Lee HG, Raina AK, Perry G, Smith MA (2002) The role of mitogen-activated protein kinase pathways in Alzheimer's disease. *Neuro-Signals* **11**: 270-281

Zuniga A, Torres J, Ubeda J, Pulido R (1999) Interaction of mitogen-activated protein kinases with the kinase interaction motif of the tyrosine phosphatase PTP-SL provides substrate specificity and retains ERK2 in the cytoplasm. *J Biol Chem* **274**: 21900-21907

Annexe I

Curriculum vitae (pages suivantes).

Mathieu ARCAND

Laboratoire de signalisation et croissance cellulaire,
 Institut de Recherche en Immunologie et Cancer (IRIC) et
 Département de Pharmacologie, Université de Montréal



SCOLARITÉ

- 06/1999 - 10/2007 Université de Montréal
 Ph. D. / Pharmacologie – Dr. Sylvain Meloche, directeur de recherche
- 05/1997 - 05/1999 Université de Montréal
 M. Sc. / Pharmacologie (passage direct au doctorat en juin 1999)
- 09/1994 - 05/1997 Université de Montréal
 B. Sc. / Biochimie
- 09/1991 - 05/1994 Collège du Vieux Montréal & Collège de Sherbrooke
 D.E.C. /Sciences de la santé
- 09/1986 - 06/1991 Séminaire de Sherbrooke
 Diplôme d'études secondaires

BOURSES et PRIX

- 05/2005 Prix d'excellence - Journée Gabriel L. Plaa
 Département de pharmacologie de l'Université de Montréal \$500
- 06/2004 Bourse Forces UdeM (lettres & culture)
 Projet (**n=1**) rock scientifique \$1000
- 07/2003 - 07/2007 Bourse de formation de troisième cycle (doctorat)
 en recherche en santé (FRSQ) \$20 000/an
- 05/2003 Prix Boehringer Ingelheim - Journée des étudiants de l'IRCM \$500
- 04/2003 Bourse de formation de troisième cycle (doctorat)
 en recherche en santé (FRSQ) (non obtenue)

04/2003	Bourse F.E.S./Département de Pharmacologie de l'Université de Montréal (complément de salaire)	\$3 000
05/2002	Prix AstraZeneca R&D - Journée des étudiants de l'IRCM	\$1 000
05/2002	Bourse de recherche au doctorat de l'Institut National du Cancer du Canada (NCIC)	(non obtenue)
03/2001	ASBMB graduate/postdoctoral travel award	\$400 US
06/1999 - 05/2002	Bourse de recherche au doctorat du CRM (IRSC)	\$19 030/an
06/1999 - 05/2002	FRSQ-FCAR-Santé	(déclinée)
05/1997 - 04/1999	FRSQ-FCAR-Santé	\$12 000/an

EXPÉRIENCES de RECHERCHE

- 07/2001 - 08/2001 Stage relatif à la préparation d'échantillons de protéines pour
microséquençage
Laboratoire de Chimie des Protéines
Institut de Recherches en Biotechnologies
Mme. France Dumas
- 05/1996 - 09/1996 "Étude de la régulation des événements cellulaires associés au
développement de la fibrose cardiaque *in vivo*"
Département de Physiologie
Université de Montréal
Dr. Angelo Calderone
- 06/1995 - 06/1995 Stage d'apprentissage des techniques de base en culture cellulaire
Centre de Recherches de l'Hôpital Général de Montréal
Université McGill
Dr. Francine Gervais
- 08/1994 - 03/1996 "Études des réponses biochimiques et physiologiques des macrophages
à l'hypoxie"
Centre de Recherches de l'Hôpital du Sacré-Coeur de Montréal
Université de Montréal
Dr. Sylvain Foucart & Dr. Carl F Juneau
- 06/1994 - 08/1994 Stage d'apprentissage des techniques de biologie moléculaire utilisées
en pharmacologie
Department of Pharmacology and Therapeutics
Université McGill
Dr. Paul R Albert

- 06/1993 - 08/1993 "Caractérisation pharmacologique d'un récepteur à l'angiotensine II chez le poulet"
Département de Pharmacologie
 Université de Sherbrooke
 Dr. H F Emanuel Escher & Dr. Gaétan Guillemette
- 06/1991 - 08/1991 Introduction à la pharmacologie des peptides
Département de Pharmacologie
 Université de Sherbrooke
 Dr. H F Emanuel Escher

ARTICLES

- Arcand, M.**, Lehmann, S., Coulombe, P., Dumas, F., Meloche, S.
 Phosphorylation of serine 273 is required for the nuclear entry of the MAP kinase ERK1.
 Manuscrit en preparation pour soumission à *EMBO J.* (2008)
- Kourylko, O., Fradette, C., **Arcand, M.**, DuSouich, P.
 Modulation of CYP1A2 and CYP3A6 catalytic activities by serum from rabbits with a turpentine-induced inflammatory reaction and interleukin 6.
Drug Metab. Dispos. (2006) ; **34**(1) 27-35.
- Levitchi, M., Fradette, C., Bleau, A. M., Michaud, D., Kourylko, O., **Arcand, M.**, DuSouich, P.
 Signal transduction pathways implicated in the decrease in CYP1A1, 1A2 and 3A6 activity produced by serum from rabbits and humans with an inflammatory reaction.
Biochem. Pharmacol. (2004); **68**(3) 573-582.
- Wu, C., **Arcand, M.**, Jansen, G., Zhong, M., Thomas, D. Y., Meloche, S., Whiteway, M.
 Phosphorylation of the MAPKKK regulator Ste50p in *Saccharomyces cerevisiae*: a casein kinase I phosphorylation site is required for proper mating function.
Eukaroyt. Cell. (2003); **2**(5) 949-961.
- Charron, F., Tsimiklis, G., Robitaille, L., **Arcand, M.**, Meloche, S., Nemer, M.
 Tissue-specific GATA factors are transcriptional effectors of the small GTPase RhoA.
Genes Dev. (2001); **15**(20) 2702-2719.
- Bouley, R., Gosselin, M., Plante, H. Servant, G., Pironin, J., **Arcand, M.**, Guillemette, G., Escher, E.
 Characterization of a specific binding site for angiotensin II in chicken liver.
Can. J. Physiol. Pharmacol. (1997); **75**(6) 568-575.

ABRÉGÉS

- 05/2005 Role de la serine 283 dans la fonction nucléaire de la MAP kinase ERK1.
Arcand, M., Coulombe, P., Dumas, F., Meloche, S.
La Journée de la Recherche Gabriel L. Plaa
Montréal, Québec
Département de Pharmacologie de l'Université de Montréal
- 08/2004 Phosphorylation of serine 283 is required for proper ERK1 function.
Arcand, M., Coulombe, P., Dumas, F., Meloche, S.
12th International Conference on Second Messengers and Phosphoproteins
Montréal, Québec
SMP 2004
- 05/2003 La phosphorylation de la serine 273 est requise pour l'entrée au noyau de la MAP kinase ERK1.
Arcand, M., Dumas, F., Gauthier, D., Coulombe, P., Lazure, C., Meloche, S.
La Journée de la Recherche des Etudiants de l'IRCM
Montréal, Québec
Institut de Recherches Cliniques de Montréal
- 12/2002 Characterization of novel phosphorylation sites on the MAP kinase ERK1.
Arcand, M., Dumas, F., Meloche, S.
The American Society for Cell Biology 42nd Annual Meeting
San Francisco, Californie
American Society for Cell Biology (ASCB)
- 05/2002 Caractérisation d'un nouveau site de phosphorylation sur la MAP kinase ERK1.
Arcand, M., Dumas, F., Meloche, S.
La Journée de la Recherche des Etudiants de l'IRCM
Montréal, Québec
Institut de Recherches Cliniques de Montréal
- 09/2001 Identification de nouveaux sites de phosphorylation sur la MAP kinase ERK1.
Arcand, M., Dumas, F., Meloche, S.
La 43^{ième} réunion annuelle du CRCQ
Beaupré, Québec
Club de Recherches Cliniques de Québec (CRCQ)

- 03/2001 Phosphorylation of the MAP Kinase Kinase Kinase Ste11p and the Regulatory Protein Ste50p *in vitro* and *in vivo*, in *S. Cerevisiae*.
Arcand, M., Wu, C., Whiteway, M., Meloche, S.
Experimental Biology 2001,
Orlando, Floride
Federation of American Societies for Experimental Biology (FASEB)
- 01/2001 Régulation de la MAPKKK Ste11p par phosphorylation et par la protéine Ste50p.
Arcand, M., Wu, C., Whiteway, M., Meloche, S.
Congrès annuel des stagiaires de recherche en santé de la Faculté de médecine et des Centres de l'Université de Montréal,
Montréal, Québec
Association des Etudiants aux Grades Supérieurs de la Faculté de Médecine (AEGSFM)
- 09/2000 Régulation de la MAPKKK Ste11p et de la protéine Ste50p *in vitro* et *in vivo*.
Arcand, M., Wu, C., Whiteway, M., Meloche, S.
La 42ième réunion annuelle du CRCQ
Bromont, Québec
Club de Recherches Cliniques de Québec (CRCQ)
- 05/2000 Étude de la relation entre la MAPKKK Ste11p et protéine régulatrice Ste50p.
Arcand, M., Wu, C., Whiteway, M., Meloche, S.
La Journée de la Recherche Gabriel L. Plaa
Montréal, Québec
Département de Pharmacologie de l'Université de Montréal
- 04/2000 Régulation de la MAPKKK Ste11p et de la protéine Ste50p *in vitro* et *in vivo*.
Arcand, M., Wu, C., Whiteway, M., Meloche, S.
La Journée de la Recherche des Etudiants de l'IRCM
Montréal, Québec
Institut de Recherches Cliniques de Montréal
- 01/2000 Régulation de l'activité de la MAPKKK Ste11p par phosphorylation de Ste50p.
Arcand, M., Wu, C., Whiteway, M., Meloche, S.
Congrès annuel des stagiaires de recherche en santé de la Faculté de médecine et des Centres de l'Université de Montréal,
Montréal, Québec
Association des Etudiants aux Grades Supérieurs de la Faculté de Médecine (AEGSFM)

05/1999 Phosphorylation de protéine Ste50p de *S. Cerevisiae*.
Arcand, M., Wu, C., Whiteway, M., Meloche, S.
La Journée de la Recherche Gabriel L. Plaa
 Montréal, Québec
 Département de Pharmacologie de l'Université de Montréal

EXPÉRIENCE PERTINENTE

Maîtrise parfaite du français et de l'anglais, tant oral qu'écrit
 Politesses et rudiments en allemand et japonais

Logiciels Microsoft Office: Word, Excel, PowerPoint, Outlook, Access
 Adobe Creative Suite2: Photoshop, Illustrator, InDesign
 FileMakerPro
 SwissProt pdb viewer; PyMol

04/2007 Enseignement en Pharmacologie
 Cours magistral à des étudiants à la Maîtrise et au Doctorat

03/2002 - ... Administration, relations publiques, et finances
Rock Scientifique Enr.
 L'entreprise du groupe (n=1)

02/2005 - 03/2007 Trésorier
Association des copropriétaires du 5290 Berri

RÉFÉRENCES

Disponibles sur demande