

Université de Montréal

**Mécanisme d'intégration des signaux RTK-dépendants
par la protéine d'échafaudage CNK au sein de la voie de
signalisation RAS/MAPK chez la Drosophile.**

par

Gino Laberge

Programme de Biologie Moléculaire, Université de Montréal
Faculté des Études Supérieures

Thèse présentée à la Faculté des Études Supérieures
en vue de l'obtention du grade de
Philosophiæ Doctor (Ph.D.)
en Biologie Moléculaire

Août, 2005

© Gino Laberge, 2005



QH

506

U54

2006

V.009

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 :

**Mécanisme d'intégration des signaux RTK-dépendants
par la protéine d'échafaudage CNK au sein de la voie de
signalisation RAS/MAPK chez la Drosophile.**

présentée par :
Gino Laberge

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Sylvain Meloche, président-rapporteur
Marc Therrien, directeur de recherche
Gerardo Ferbeyre, membre du jury
Michel Tremblay, examinateur externe
Sylvain Meloche, représentant du doyen de la FES

Thèse acceptée le :

Résumé

Les cellules ont développé au cours de l'évolution des mécanismes moléculaires leur permettant de percevoir, d'intégrer et d'élaborer une réponse adéquate suite à une stimulation donnée. Ces mécanismes sont entre autres assurés par des récepteurs membranaires qui ont la capacité de percevoir les variations de l'environnement externe et de relayer cette information aux différentes voies de signalisation intracellulaires, assurant ainsi la programmation de processus cellulaires appropriés. La famille des récepteurs tyrosine kinases (RTKs), par exemple, est principalement impliquée dans le contrôle de la prolifération, la différenciation et la survie cellulaire par l'intermédiaire de la voie de signalisation RAS/MAPK. Cette voie est composée de la petite GTPase RAS et du module de signalisation composé des protéines kinases RAF, MEK et MAPK. Fait à noter, cette voie de signalisation est souvent suractivée dans les cancers humains. Un crible génétique chez la *Drosophile* a permis de mettre en lumière la fonction d'une nouvelle protéine d'échafaudage essentielle à la transmission de signaux au sein de cette voie, soit CNK. Une étude de structure/fonction dans notre laboratoire a montré que CNK avait la capacité de réguler l'activité de RAF de manière positive et négative. En fait, sa partie aminotermine permet d'intégrer des signaux dépendants de RAS en favorisant la phosphorylation de MEK par RAF. Par contre, une région située dans la partie carboxyterminale appelée « RAF-Inhibitory Region » (RIR) permet d'interagir avec RAF et d'inhiber son activité kinase.

Cette thèse tente de démontrer les mécanismes moléculaires par lesquels CNK intègre les signaux RTK-dépendants au sein de la voie RAS/MAPK. Les résultats montrent que CNK devient phosphorylée sur résidus tyrosines suite à l'activation des RTKs. Cette phosphorylation est dépendante de la Tyr1163, laquelle se retrouve dans la région juste en carboxy-terminale du RIR. La caractérisation fonctionnelle de cette tyrosine a confirmé qu'elle possédait un rôle positif pour la fonction physiologique de CNK. Nous avons d'ailleurs observé que cette tyrosine avait la capacité de recruter, de manière RTK-dépendante, la tyrosine kinase Src42. Étonnamment, plusieurs allèles pertes de fonction de *cnk* ont été identifiés dans la région entourant la Tyr1163 et démontrent également un

défaut d'association à Src42. Nous avons constaté que Src42 s'associe à CNK indépendamment de son activité kinase et contrecarre l'effet inhibiteur de la région RIR, ce qui par conséquent se répercute positivement sur l'activité de RAF. Nous avons aussi remarqué que ces effets médiés par Src42 étaient des événements indépendants de RAS.

L'ensemble de ces résultats a permis d'élaborer un modèle afin d'expliquer comment CNK pourrait participer à l'intégration des signaux RTKs au sein de la voie RAS/MAPK. Suite à l'activation d'un RTK, CNK intègre deux signaux conjointement requis, l'un en provenance de RAS et l'autre de Src42, pour réguler l'activité de RAF. Le signal provenant de RAS est intégré par la partie amino-terminale de CNK et favorise l'activation de RAF alors que Src42 via son interaction avec la région Y1163 permet de relever l'inhibition sur RAF. L'intégration des deux signaux distincts par CNK contribuerait à générer de la spécificité dans l'activation de la voie RAS/MAPK.

Mots clés: signalisation intracellulaire, RTKs, RAS, module MAPK, CNK, RAF, Src42.

Abstract

Throughout evolution, eukaryotic cells have developed molecular mechanisms allowing them to perceive, integrate and elaborate an adequate response following a given stimulation. Those mechanisms depend on membrane receptors which have the capacity to perceive the external variations of the environment and to relay this information to various intracellular signalling pathways, to in turn control the programs of specific cellular processes. For example, the receptor tyrosine kinase (RTK) family regulates cell proliferation, differentiation and survival via the activation of the RAS/MAPK pathway. This signalling module is composed of the small GTPase RAS and three protein kinases called RAF, MEK and MAPK. This module is often overactivated in human cancers. A genetic screen using *Drosophila* identified a new scaffolding protein named CNK, which is essential for this pathway. A structure/function study in our laboratory showed that CNK had the capacity to control positively and negatively RAF activity. Its amino-terminal region integrates signals coming from RAS which stimulate phosphorylation of MEK by RAF. On the other hand, a region located in the carboxy-terminal part of the protein, called "RAF-Inhibitory Region" (RIR), interacts with RAF and inhibits its kinase activity.

We sought to elucidate the molecular mechanisms by which CNK integrates RTK-dependent signals in the RAS/MAPK pathway. Our results show that RTK activation induces tyrosine phosphorylation of CNK and that the Tyr1163 residue, which is found in the area next to the RIR region, is required for this event. This residue has then been functionally characterized. We found that it is positively required for the physiological function of CNK and that it recruits the tyrosine kinase Src42 in an RTK-dependent manner. Strikingly, we observed that Src42-binding is critical for the positive action of CNK by apparently relieving the inhibitory effect of the RIR. Further, this phenomenon does not appear to depend on the catalytic function of Src42, but on the ability of its SH3 and SH2 domain to associate with CNK.

Together, our results led us now to propose that CNK integrates two RTK-generated signals to regulate RAF activation: 1) pY1163-dependent Src42 binding releases the

inhibitory effect of the RIR, and 2) RAS activity is integrated by its amino-terminal portion, which in turn stimulates RAF catalytic function. The integration of two distinct signals by CNK would contribute to generate specificity regarding the activation of the MAPK module.

Keywords: Intracellular signalling, RTKs, RAS, MAPK module, CNK, RAF, Src42.

Table des matières

Résumé.....	III
Abstract.....	V
Table des matières.....	VII
Liste des tableaux.....	XI
Liste des figures.....	XII
Liste des abréviations.....	XIV
Dédicace.....	XIX
Remerciements.....	XXI
Avant-propos et contribution des auteurs.....	XXIII
1. CHAPITRE 1.....	1
Introduction.....	1
1.1. Les voies de signalisation intracellulaires.....	2
1.1.1. Homéostasie cellulaire et cancer.....	2
1.1.2. La phosphorylation.....	3
1.1.2.1. Les domaines kinases et phosphatases.....	4
1.1.3. Les domaines d'interaction protéiques.....	6
1.2. Les cascades de signalisation MAPK.....	7
1.3. Le module RAF/MEK/ERK.....	11
1.3.1. Mécanismes d'activation du module RAF/MEK/ERK.....	11
1.3.1.1. Les récepteurs.....	11
1.3.1.1.1. Les RTKs.....	11
1.3.1.1.2. Les récepteurs à cytokines.....	12
1.3.1.1.3. Les intégrines.....	13
1.3.1.1.4. Les GPCRs.....	14
1.3.1.2. RAS.....	16
1.3.1.2.1. Les GAPs et les GEFs.....	16
1.3.1.2.2. Maturation et localisation intracellulaire.....	17
1.3.1.2.3. Les protéines effectrices.....	20

1.3.1.2.4. Régulation du module RAF/MEK/ERK	21
1.3.2. RAF.....	22
1.3.2.1. Mécanisme de régulation et d'activation	24
1.3.2.2. Fonction indépendante de la voie ERK.....	30
1.3.2.3. Les partenaires de RAF	32
1.3.3. MEK.....	34
1.3.4. ERK.....	35
1.3.4.1. Mécanismes de régulation et d'activation.....	35
1.3.4.1.1. Spécificité de phosphorylation.....	36
1.3.4.1.2. Localisation subcellulaire.....	38
1.3.4.2. Fonctions biologiques	40
1.3.5. Spécificité du module RTK/RAS/ERK.....	41
1.4. Les protéines d'échafaudage	42
1.4.1. Fonction	42
1.4.2. Régulation	46
1.5. Les protéines d'échafaudage de la voie ERK	48
1.5.1. KSR.....	48
1.5.2. CNK	52
1.5.3. Autres	56
1.6. SFKs.....	60
1.6.1. Structure tridimensionnelle	61
1.6.2. Mécanismes d'activation et de régulation.....	63
1.6.3. Les SFKs chez la Drosophile	64
1.7. Organismes modèles	64
1.8. Objectifs de la thèse	66
2. CHAPITRE 2	68
Article: Src42 binding activity regulates Drosophila RAF by a novel CNK-dependent de-repression mechanism.....	68
2.1. Abstract	70

2.2. Introduction	71
2.3. Materials and methods	74
2.3.1. Plasmids	74
2.3.2. Genetics, Molecular Analysis and Histology.....	75
2.3.3. Cell Culture and Transfections	75
2.3.4. Protein Analysis and Antibodies.....	76
2.4. Results and discussion.....	77
2.4.1. Endogenous CNK is Tyrosine-Phosphorylated upon RTK Activation	77
2.4.2. CNK Tyrosine Phosphorylation and Activity Depend on its Y1163 Region	77
2.4.3. Src42 Associates with CNK and Mediates CNK Tyrosine Phosphorylation in an RTK-dependent Manner	86
2.4.4. Src42 Regulates Positively MAPK Activation through the Y1163 Region of CNK	92
2.4.5. CNK-integrated Src42 Effect on the MAPK Pathway Primarily Depends on its Binding Function	95
2.4.6. Src42 does not phosphorylate the Y1163 residue of CNK	105
2.5. Concluding remarks	110
2.6. Acknowledgements	112
2.7. References.....	113
3. CHAPITRE 3.....	115
Discussion	115
3.1. Caractérisation du processus de phosphorylation RTK-dépendant de CNK	116
3.2. Analyses structurelle et fonctionnelle des allèles de Src42	120
3.3. Caractérisation du mécanisme par lequel CNK intègre les signaux de Src42 pour réguler l'activité de RAF.....	125
3.4. Fonction de CNK dans l'orchestration des différentes voies de signalisation conduisant à l'activation du module MAPK	135
3.5. Implication de CNK dans d'autres voies de signalisation	144
3.6. Implication potentielle de CNK dans les mécanismes du cancer	149

3.7. Conclusion..... 151
Bibliographie..... 152
Annexe 1 I

Liste des tableaux

Table 2.I Genomic Rescue Experiments Revealed the RIR / Y1163 Region Interplay within CNK	85
Supplemental Table 2.I <i>Src42</i> ^{S-382} and <i>Src42</i> ^{S-527} alleles suppress <i>raf</i> ^{HM7} and <i>raf</i> ^{€110} male hemizygous lethality	98

Liste des figures

Figure 1.1 Représentation schématique des différentes voies de signalisation de type MAPK et leurs réponses biologiques	8
Figure 1.2 Représentation schématique des différentes voies de signalisation en aval de RAS et leurs réponses biologiques.....	18
Figure 1.3 Représentation schématique de la structure de C-RAF.....	23
Figure 1.4 Représentation schématique des protéines d'échafaudage appartenant aux différentes voies de signalisation de type MAPK.....	44
Figure 1.5 Représentation schématique de la structure de KSR et de ses différents partenaires protéiques.	49
Figure 1.6 Représentation schématique de la structure de CNK et de ses différents comportements au sein de la voie ERK.....	54
Figure 1.7 A : Représentation schématique de structure de c-Src. B : Représentation schématique du mécanisme d'activation de Src.	62
Figure 2.1 Activation of RTKs Induces Tyrosine Phosphorylation of Endogenous CNK.....	78
Figure 2.2 The Y1163 Region is Essential for CNK Function and Tyrosine Phosphorylation.....	81
Figure 2.3 Forced Expression of <i>cnk</i> ^{Y1163F} Interferes with Drosophila Eye Development.....	84
Figure 2.4 Src42 Associates and Mediates CNK Tyrosine Phosphorylation in an RTK-dependent manner.....	87
Figure 2.5 Src42 is a Positive Component of the MAPK pathway that Acts Through the Y1163 Region of CNK.	93
Figure 2.6 <i>Src42</i> ^{S-382} Acts as a Gain-of-function Allele in the Presence of RAS ^{V12}	97
Figure 2.7 Molecular Characterization of <i>Src42</i> Gain-of-function Alleles.	101
Figure 2.8 Characterization of the Src42 binding function on CNK.	106
Figure 3.1 Représentation schématique du mécanisme d'activation de CNK suite à l'activation d'un RTK.....	138

Supplemental Figure 2.1 Mapping of CNK Tyrosine Phosphorylation.....	79
Supplemental Figure 2.2 SEV-induced tyrosine phosphorylation of CNK is RAS-, Src64- and Tec29-independent.....	89
Supplemental Figure 2.3 Src-mediated CNK Tyrosine Phosphorylation	90
Supplemental Figure 2.4 Assessment of Catalytic Activity of Src42 Mutations Identified <i>in vivo</i>	100
Supplemental Figure 2.5 Src42 Scaffolding Effect is Integrated by the Y1163 Residue of CNK.....	103

Liste des abréviations

Abl	Abelson tyrosine kinase
ADN	Acide DésoxyriboNucléique
AFAP-110	Actin Filament-Associated Protein of 110 kDa
AKAPs	A Kinase Anchor Proteins
AMPC	cyclic Adenosine MonoPhosphate
AP-1	Activating Protein-1
AP-2	clathrin Adapter Protein-2
ARNi	ARN interférence
ASK1	Apoptosis Signal-regulating Kinase 1
AT1aR	Angiotensine II type 1a Receptor
ATP	Adénosine TriPhosphate
BAD	Bcl-2 Antagonist of cell Death
BAG1	Bcl-2-interacting protein
Bcl-2	B-cell CLL/lymphoma 2
Bem1	Bud emergence mediator 1
BTK	Bruton Tyrosine Kinase
CAPRI	Calcium-Promoted RAS Inactivator
CD	Common Docking
Cdc37	Cell division cycle 37 <i>s. cerevisiae</i> homologue
CDKs	Cyclin Dependent Kinases
CNK	Connector eNhancer of KSR
CRD	Cysteine-Rich Domain
CREB	cAMP Responsive Element Binding protein
CRIC	Conserved Region In CNK
Csk	CT Src kinase
CT	carboxy-terminale
C-TAK1	CDC25C-Associated Kinase 1
DAG	Diacylglycerol
DAL-1	Differentially expressed in Adenocarcinoma of the Lung-1

DLK	Dual Leucine zipper bearing Kinase
DVD	Domain for Versatile Docking
E3B1	Epidermal growth factor receptor-dependent
EGF	Epidermal Growth Factor
EPAC	Exchange Protein directly Activated by cAMP
EPS8	Epidermal Growth factor receptor pathway Substrate 8
ERK	Extracellular signal-Regulated Kinase
FAK	Focal Adhesion Kinase
FBS	Fetal Bovine Serum
FGF	Fibroblast Growth Factor
FRS2	FGF Receptor Substrate 2
GAB1	GRB2-Associated Binder-1
GAPs	GTPase-Activating Proteins
GDP	Guanosine DiPhosphate
GEFs	Guanine nucleotide Exchange Factors
GIT1	GRK-Interactor 1
GMP	Guanosine MonoPhosphate
GPCRs	G Protein-Coupled Receptors
GRB2	Growth factor Receptor-Binding protein 2
GRK-2	G-protein coupled Receptor Kinase 2
GTP	Guanosine TriPhosphate
HGF	Hepatocyte Growth Factor
HIV-1	Human Immunodeficiency Virus-1
HOG1	High Osmolarity Glycerol 1
Hsp90	Heat shock protein 90
HYP	HYPhen
IKAP	I- κ B Kinase complex-Associated Protein
IKK β	I- κ B Kinase B
IL	InterLeukine
IMP	Impedes Mitogenic signal Propagation

INAD	Inactivation No Afterpotential D
IP ₃	Inositol(1,4,5)tris-Phosphate
IRS	Insulin Receptor Substrate
IS	Inhibitory Sequence
JAKs	Janus Kinase
JIP-1	JNK Interacting Protein-1
JNK	Jun amino-terminal Kinase
KDN	KSR Dominant Negative
KIM	Kinase Interaction Motif
KSR	Kinase Suppressor of RAS
LPA	LysoPhosphatidic Acid
LPS	LypoPolySaccharide
LSP1	Lymphocyte-Specific Protein 1
Mae	Modulator of the activity of ets
MAGUIN	Membrane-Associated GUanylate kinase-INteracting protein
MAPK	Mitogen Activated Protein Kinase
MAPKAP	MAPK-Activated Kinase
MEK1	MAP kinase/ERK Kinase
MEKK1	MEK Kinase
MKK3	MAPK Kinase-3
MKPs	MAP Kinase Phosphatases
MLK2	Mixed-Lineage Kinase-2
MNK1	MAPK-iNteracting Kinase 1
MORG1	MAPK ORGanizer 1
MP1	Mek Partner 1
MST2	MKN28-derived non-receptor type of Serine/Threonine kinase 2
Nef	Negative factor
NES	Nuclear Export Signal
NF- κ B	Nuclear Factor κ B
NGF	Nerve Growth Factor

Nore1	Novel RAS effector 1
NT	amino-Terminale
p130CAS	130 kDa Crk-Associated Substrate
PAK	p21 Activated Kinase
PAR2	Protease-Activated Receptor 2
PDE4	cAMP-specific family 4 Phosphodiesterase
PDGF	Platelet-Derived Growth Factor
PDZ	PSD-95/DLG-1/ZO-1
PEA-15	Phosphoprotein Enriched in Astrocytes 15
PH	Pleckstrin Homology
PI-3K	Phosphatidyl Inositol-3 Kinase
PIN1	Peptidyl-prolyl <i>cis-trans</i> Isomerase NIMA-interacting 1
PIP ₂	PhosphatidylInositol-4,5-bisPhosphate
PIX	PAK-Interacting eXchange factor
PKA	Protein Kinase A
PKC	Protein Kinase C
PLC γ	Phospho-Lipase C gamma-1
PLC β	Phospho-Lipase β
PP1	Protein Phosphatase 1
PSD95	PostSynaptic Density protein of 95 kDa
PTB	PhosphoTyrosine Binding
PTK6	Protein Kinase 6
PTP-SL	Protein Tyrosine Phosphatase SL
PYK2	Proline-rich Tyrosine Kinase 2
RA	Ras Association domain
RACKs	Receptors for Activated C-Kinase
RAF	RApidly growing Fibrosarcomas
RAS	Rat Sarcoma
RASGRP1	RAS Guanyl Releasing Protein 1
RASSF1A	RAS association domain family 1A gene

Rb	Retinoblastoma tumor suppressor protein
RBD	Ras Binding Domain
RIM	RAF-Interacting Motif
RIR	Raf Inhibitory Region
RKIP	RAF-1 Kinase Inhibitor Protein
Rlf	RALGDS-like factor
Rsk	p90 Ribosomal s6 kinase
RSV	Rous Sarcoma Virus
RTKs	Receptor Tyrosine Kinases
SAM	Sterile Alpha Motif
Sam68	Src-Associated substrate during Mitosis of 68 kDa
SEF1	Similar Expression to FGF Genes
SEV	Sevenless
SFKs	Src-Family protein tyrosine Kinase
SGK	Serum and Glucocorticoid-regulated Kinase
SH2	Src-Homology 2
SHP-2	SH2 Inositol 5-Phosphatase 1
Sin	Src Interacting
SOS	Son Of Sevenless
SRF	Serum Response Factor
S-SCAM	Synaptic SCAffolding Molecule
STATs	Signal Transducers and Activators of Transcription
STE20	Sterile 20
SUR-8	SUppressor of RAS mutation-8
TAB1	TAK1 Binding protein 1
TAK1	TGF- β -Activated protein Kinase
TCFs	Ternary Complex Factor
TRP	Transient Receptor Potential
VDAC	Voltage-Dependent Anion Channel
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor

Dédicace

*À mon épouse Mélanie,
à mon fils Antoine,
à ma famille et amis.*

*"Les espèces qui survivent ne sont pas les espèces
les plus fortes, ni les plus intelligentes, mais celles
qui s'adaptent le mieux aux changements."*

Charles Darwin, 1809-1882

Remerciements

La réalisation de mon doctorat n'aurait pas été possible sans la présence à mes côtés de l'amour de ma vie, Mélanie. J'aimerais la remercier pour sa présence, son soutien et ses galettes au gruau qui m'ont permis de tenir le coup durant toutes ces années. Elle a été ma source d'inspiration la plus profonde et la plus sincère. J'aimerais également remercier mon fils Antoine pour les moments précieux que nous avons vécu et vivrons ensemble.

Je voudrais aussi souligner le support déterminant de mes parents Lise et Serge qui sont pour moi des modèles vivants d'inspiration et de courage. J'aimerais les remercier pour leurs encouragements et leur support moral. Qu'ils trouvent dans cette thèse la récompense et la fierté de tout leur labeur. Un gros merci à mes deux sœurs Sophie et Julie qui m'ont grandement soutenu dans cette aventure. J'ai la chance d'avoir deux sœurs extraordinaires. À mes beaux-frères Martin et Gino ainsi qu'à mes deux neveux Guillaume et Hugo, j'aimerais les remercier pour leur soutien et leur joie de vivre. Ma belle-famille m'a également supporté et je leur en suis très reconnaissant pour ce geste. J'aimerais remercier Francine, Jacques, Nadine et Maxime ainsi que Stéphane et Annie pour leurs encouragements. Je dois également remercier mes amis Nathalie Bériault, Patrice Racine, Caroline Bériault, Sylvain Lalonde, Tanya Rivard, Éric Côté, Marylène Hince, Éric Bériault et Francine Bériault. Leur compréhension et leur support moral m'a permis de foncer durant les moments les plus difficiles.

J'aimerais remercier mon directeur de thèse le Dr Marc Therrien pour sa supervision, sa confiance, sa disponibilité et sa détermination. Ses conseils judicieux et sa perspicacité ont été un élément crucial dans la réussite de ce projet de recherche. J'aimerais également remercier les différentes personnes passées et présentes que j'ai côtoyé durant ces années au laboratoire. Plus particulièrement, j'aimerais souligner les très belles années que j'ai passé avec le Dr François Roy. J'aimerais le remercier pour son amitié et sa générosité. J'aimerais également donner une attention particulière à Martin Lefrançois pour son dévouement et son aide précieuse. Je voudrais aussi prendre le temps de

remercier la coordonnatrice du programme de Biologie Moléculaire Viviane Jodoin pour sa disponibilité, sa perspicacité et son altruisme.

Je suis très reconnaissant envers Marc Therrien, l'IRCM, l'IRIC et le Programme de Biologie Moléculaire de l'université de Montréal pour leur support financier durant mes études doctorales.

Je tiens à remercier les Drs Sylvain Meloche, Gerardo Ferbeyre et Michel Tremblay d'avoir accepté de lire et de réviser ma thèse.

Merci à tous ceux et celles que j'oublie....

Avant-propos et contribution des auteurs

La voie de signalisation intracellulaire RAS/MAPK est souvent suractivée dans les cancers humains. Il devient donc important de s'attarder à la caractérisation moléculaire de cette voie afin de comprendre en détail les mécanismes qui contrôlent son activation. La recherche en signalisation a rapidement progressé ces dernières années suite à l'arrivée de nouvelles techniques dans le domaine de la protéomique, mais également grâce à l'élaboration de cribles génétiques utilisant des organismes modèles. La mouche à fruit (*D. melanogaster*) est un modèle d'étude qui a souvent été utilisé dans le passé pour étudier différents processus cellulaires et qui a largement contribué à l'avancement de la biologie expérimentale. Différents cribles génétiques axés sur la caractérisation des voies de signalisation en aval des RTKs ont été élaborés. L'un d'entre eux a permis de mettre en lumière la participation d'une nouvelle composante appelée CNK, laquelle constitue le sujet principal de cette thèse. La combinaison de techniques génétiques et biochimiques a été utilisée afin d'investiguer le rôle que pourrait jouer cette composante au sein de la voie RAS/MAPK.

Cette thèse est structurée en trois chapitres. Le premier chapitre est constitué d'une introduction présentant une revue littéraire des différents mécanismes qui régulent la transmission des signaux au sein de la voie RAS/MAPK.

Le chapitre 2 est représenté par un article scientifique récemment publié dans la revue EMBO J. Son contenu traite de la caractérisation moléculaire par laquelle CNK intègre les signaux provenant des RTKs lors de l'activation de la voie MAPK. Cet article regroupe la majeure partie des travaux de recherche que j'ai effectués durant ma formation dans le laboratoire du Dr Marc Therrien et constitue le corps de l'ouvrage. J'ai participé de manière significative à la conception de la majorité des figures. Les autres auteurs de ce manuscrit ont participé à la réalisation de certaines données. En effet, le Dr Marc Therrien a effectué la séquence des différents allèles de CNK (Figure 2.2B). De plus, Mélanie Douziech m'a aidé dans l'élaboration des mouches transgéniques de CNK (Table I). Elle a aussi participé à la caractérisation biochimique de CNK suite à l'activation de la voie

MAPK par Ras^{V12} (Figure 2.5D). J'ai participé à la rédaction de ce manuscrit, mais il a principalement été écrit par le Dr Marc Therrien.

Le chapitre trois constitue une discussion détaillée des données obtenues dans le corps de l'ouvrage. Cette section propose plusieurs hypothèses quant à la fonction de CNK et suggère différentes approches afin de poursuivre les travaux exposés dans cette thèse. Les dernières lignes sont consacrées à une brève conclusion.

L'annexe 1 contient un article de Mélanie Douziech publié en 2003 dans la revue EMBO J. Cet article présente les résultats d'une étude structure/fonction et démontre que CNK possède une activité à double action. La caractérisation et l'élaboration des mécanismes moléculaires dans cet article permettent de mieux comprendre les éléments qui seront discutés dans le corps de l'ouvrage. Ma contribution dans cet article a été de réaliser la Figure 1C qui démontre que les formes endogènes de CNK et RAF interagissent ensemble.

1. CHAPITRE 1

Introduction

1.1. Les voies de signalisation intracellulaires

Les êtres vivants ont développé, au cours de l'évolution, des mécanismes cellulaires qui leur permettent de percevoir et de répondre adéquatement aux variations provenant de leur environnement externe. Ces mécanismes se sont spécifiquement adaptés dans le but de permettre à la cellule de maintenir son homéostasie et d'accomplir ses fonctions biologiques. Par exemple, chez la levure, les variations osmotiques du milieu environnant sont détectées et interprétées par des mécanismes moléculaires, lesquels contribuent à la mise en place de nouvelles conditions d'adaptation (Seet and Pawson, 2004). Durant l'embryogenèse chez la souris, les cellules du système hématopoïétique doivent intégrer adéquatement les signaux afin de s'engager dans leur processus de différenciation (Lecuyer and Hoang, 2004). Les cellules expriment à leur surface toute une panoplie de récepteurs capables de percevoir des signaux extracellulaires particuliers. Ces récepteurs possèdent la capacité d'initier des cascades de signalisation intracellulaires afin de répondre de façon appropriée à une stimulation donnée. Les études sur les mécanismes de transmission des signaux ont permis de déterminer que cette information est principalement véhiculée par des voies de signalisation spécifiques. Plusieurs d'entre elles convergent vers le noyau cellulaire pour moduler la transcription de gènes particuliers. Dans certains cas, elles peuvent aussi moduler différents facteurs cytoplasmiques par des modifications post traductionnelles dans le but d'induire une réponse appropriée (Hunter, 2000).

1.1.1. Homéostasie cellulaire et cancer

L'ensemble des voies de signalisation forme un réseau complexe permettant la mise en place de divers programmes cellulaires, telles la croissance, la mobilité, la différenciation et l'apoptose. Une régulation étroite de ces différents processus est essentielle afin d'assurer l'homéostasie cellulaire autant durant l'embryogenèse que chez l'adulte. L'altération de la transmission d'un signal au sein de ces voies peut affecter négativement un ou plusieurs comportements cellulaires et mener au développement de diverses maladies humaines (Force et al., 2004). Notre laboratoire s'intéresse plus particulièrement au cancer. Cette maladie est associée à la perturbation de voies de

signalisation intracellulaires entraînant par conséquent la transformation des cellules saines en cellules cancéreuses (Vogelstein and Kinzler, 2004). Dans ces circonstances, ces cellules adoptent différentes caractéristiques telles l'incapacité de contrôler la prolifération, l'apoptose, la mobilité et la survie, tout en ayant le potentiel d'envahir les tissus environnants et éventuellement former des métastases (Hanahan and Weinberg, 2000; Martin, 2003). Nos recherches s'attardent principalement à la caractérisation des mécanismes moléculaires de transmission des signaux de la voie RAS (Rat Sarcoma) /ERK (Extracellular signal-Regulated Kinase), laquelle est souvent suractivée dans les cancers humains (Reddy et al., 2003).

1.1.2. La phosphorylation

La perception et l'interprétation de signaux s'accomplissent habituellement de la surface vers l'intérieur de la cellule par différents procédés. La nature a développé plusieurs mécanismes de régulation moléculaires afin de transmettre de façon efficace et spécifique les signaux à travers la cellule. Ces phénomènes sont basés sur deux types de mécanismes, soit la modification covalente et la régulation allostérique (Kennelly, 2003). Les voies de signalisation intracellulaire utilisent la phosphorylation/déphosphorylation comme modification covalente pour véhiculer l'information (cette réaction sera discutée plus en détail dans les prochaines lignes). La phosphorylation est une réaction enzymatique qui attache de façon covalente un groupement phosphate, provenant de l'ATP (Adénosine Triphosphate) (en position γ), sur un acide aminé spécifique telles la sérine, la thréonine ou la tyrosine. La déphosphorylation est la réaction inverse où le groupement phosphate est détaché du résidu (Morrison et al., 2000; Zhang et al., 2002). Ces réactions enzymatiques sont respectivement catalysées par des protéines qui encodent des domaines kinases et phosphatases. Ces enzymes représentent environ 2 % des 32 000 gènes identifiés lors du séquençage du génome humain, soit 520 kinases et 113 phosphatases (Blume-Jensen and Hunter, 2001; Manning et al., 2002). La phosphorylation et la déphosphorylation sont des réactions qui permettent de moduler la fonction des protéines en affectant, entre autres, leur activité enzymatique, leurs interactions avec d'autres protéines, leur localisation intracellulaire ainsi que leur stabilité. Il existe un équilibre entre l'activité des kinases et

des phosphatases pour contrôler adéquatement la transmission du signal. La dérégulation de l'activité de ces enzymes cause souvent l'apparition de maladies humaines (Blume-Jensen and Hunter, 2001; Tsatsanis and Spandidos, 2004; Zhang et al., 2002).

1.1.2.1. Les domaines kinases et phosphatases

Les domaines kinases et phosphatases sont très conservés durant l'évolution (Manning et al., 2002). On les retrouve autant chez les récepteurs que dans les protéines cytoplasmiques et nucléaires. Ces enzymes peuvent être subdivisées selon leur habileté à phosphoryler ou à déphosphoryler soit les sérines/thréonines, soit les tyrosines (Barford et al., 1998; Manning et al., 2002; Stoker, 2005). Certaines kinases/phosphatases à double spécificité possèdent la capacité d'agir autant sur les sérines/thréonines que sur les tyrosines (Blume-Jensen and Hunter, 2001; Zhang et al., 2002). L'activité de ces domaines est hautement régulée par différents mécanismes moléculaires leur permettant ainsi de contrôler spécifiquement la transmission des signaux au sein des voies de signalisation intracellulaires. Les prochaines lignes s'attardent plus particulièrement à la description de la structure des domaines kinases afin de faciliter la compréhension des résultats exposés dans cette thèse.

Les domaines kinases sont formés d'environ 250-300 acides aminés caractérisés par douze sous-domaines conservés (I-XI). La cristallisation de plusieurs domaines kinases, en condition active ou inactive, a permis de définir leur architecture en solution. Ils sont principalement formés de deux lobes. Le lobe en NT (amino-Terminale) (N-lobe) est constitué de cinq feuillets β et d'une hélice α (hélice α_C) (sous-domaine I-IV), alors que le lobe en CT (C-lobe) est principalement formé d'hélices (sous-domaine VI-XI). Le sous-domaine V encode pour une région flexible qui relie les deux lobes. L'orientation des deux lobes peut osciller entre deux conformations et ce, en fonction de l'état d'activation de l'enzyme. La fixation de l'ATP et le site actif sont localisés entre les deux lobes alors que la reconnaissance du substrat se fait plutôt au niveau du C-lobe (Huse and Kuriyan, 2002).

En condition activée, le site actif des différents domaines kinases s'oriente de façon très similaire. Cette conformation favorise le positionnement des résidus impliqués dans la

réaction catalytique. Par exemple, dans le sous-domaine I, une région riche en glycine (boucle-G ou -P) peut fixer et orienter l'adénine de l'ATP durant la catalyse. Deux autres résidus invariables dans le N-lobe, soit la lysine du sous-domaine II et le glutamate de l'hélice α C, forment également des liens avec l'ATP pour permettre de coordonner les phosphates α et β . L'orientation de l'hélice α C est très importante dans la détermination de l'état actif et inactif du domaine kinase.

Le C-lobe, de son côté, contient la boucle catalytique (sous-domaine VIB) et le segment d'activation (ou boucle-A) (sous-domaine VII-VIII). La boucle catalytique est impliquée dans le mécanisme de transfert du phosphate et l'orientation du substrat au site actif. Un résidu aspartate situé dans cette région fonctionne comme base catalytique pour enclencher la réaction de transfert du γ -phosphate. Le segment d'activation quant à lui, s'étend entre les motifs conservés Asp-Phe-Gly (DFG) et Ala-Pro-Glu (APE) et sa longueur varie selon les kinases. Ces motifs sont respectivement impliqués dans la stabilisation de l'ATP et la reconnaissance du substrat. L'aspartate du motif DFG coordonne les groupements phosphates de l'ATP par sa liaison à l'un des deux ions magnésium. Ce motif stabilise également la conformation active de l'enzyme en interagissant avec l'hélice α C du N-lobe. Le motif APE, localisé dans la boucle appelée P+1, fait contact avec le substrat par l'intermédiaire de son association au résidu qui suit le site de phosphorylation. Ce motif détermine aussi la spécificité de la kinase en déterminant sa préférence pour les Ser/Thr ou les Tyr. Le segment d'activation contient également la boucle d'activation qui est impliquée dans le mécanisme d'activation des domaines kinases. En condition inactive, le segment d'activation adopte une conformation incompatible avec la catalyse. La boucle d'activation est caractérisée par la présence d'acides aminés qui peuvent être phosphorylés soit par autophosphorylation, soit par d'autres kinases. Ces événements de phosphorylation (un ou plusieurs) provoquent la reconfiguration de la structure du segment d'activation en rapprochant le substrat et les résidus catalytiques au niveau du site actif (Johnson et al., 1996).

Même si toutes les familles de protéines kinases exécutent la même réaction enzymatique, il existe des divergences mécanistiques qui distinguent chacune d'entre elles. Pour certaines, le mécanisme de phosphorylation de la boucle d'activation n'est pas

suffisant pour reconfigurer complètement leur domaine kinase dans un état actif. Ces kinases ont développé des mécanismes d'activation distincts qui garantissent leur régulation. Fait intéressant, la diversité de ces mécanismes d'activation résulte des différentes conformations inactives qu'elles adoptent pour stabiliser leur structure. Par exemple, l'implication d'une sous-unité conjointe ou d'un motif particulier situé à l'extérieur du domaine kinase peut participer à l'adoption d'une structure inactive particulière. Ces différents mécanismes d'activation leur permettent d'assurer l'établissement d'une fonction biologique spécifique (Johnson et al., 1996; Nolen et al., 2004).

1.1.3. Les domaines d'interaction protéiques

Les protéines sont modulaires, c'est-à-dire qu'elles contiennent différentes régions distinctes principalement formées par des domaines protéiques qui collaborent entre eux afin de définir l'activité d'une protéine. De concert avec la phosphorylation, la caractérisation de ces différents domaines au sein des molécules de signalisation a permis de mieux comprendre comment l'information est spécifiquement véhiculée à travers la cellule. Les recherches ont permis de constater qu'ils étaient impliqués dans des interactions avec d'autres protéines, des lipides, des acides nucléiques et de petites molécules (Pawson, 2003). Ces domaines peuvent participer à différents niveaux dans les processus de signalisation intracellulaires. Entre autres, ils peuvent soutenir l'assemblage de complexes multiprotéiques, le ciblage d'une protéine dans un compartiment particulier et la formation d'interactions intramoléculaires au sein d'une protéine permettant l'obtention d'une structure particulière. La disposition et la combinaison des différents domaines au sein d'une protéine déterminent souvent sa spécificité d'action (Pawson and Nash, 2003).

Voici quelques exemples de ces domaines. Les domaines SH2 (Src-Homology 2) et PTB (Phosphotyrosine Binding) ont l'habileté de lier des phosphotyrosines. Les domaines SH2 reconnaissent un petit module composé d'une tyrosine phosphorylée suivi de 3 à 5 acides aminés qui détermine la spécificité de l'interaction (Buday, 1999). Pour ce qui est du domaine PTB, ce sont les acides aminés qui précèdent la phosphotyrosine qui

déterminent la spécificité (Yaffe, 2002). Les domaines SH3 et WW reconnaissent des séquences consensus formées majoritairement de prolines (Buday, 1999; Sudol et al., 2001). Les domaines SAM (Sterile Alpha Motif) sont capables de former des homo ou hétéro-oligomères avec d'autres domaines SAM (Schultz et al., 1997). Le domaine PDZ (PSD-95/DLG-1/ZO-1) reconnaît souvent des acides aminés hydrophobes dans la région CT (carboxy-terminale) des protéines et le domaine PH (Pleckstrin Homology) lie les phosphoinositides (Lemmon and Ferguson, 2000; Nourry et al., 2003).

1.2. Les cascades de signalisation MAPK

Les protéines de type MAPK (Mitogen Activated Protein Kinase) sont des kinases qui coordonnent une multitude de programmes cellulaires en réponse à différents signaux physiques et chimiques. Ces enzymes ont été conservées durant l'évolution et permettent à la cellule de maintenir sa fonction physiologique au sein d'un organisme. De plus, elles participent, avec d'autres kinases, à l'élaboration d'un réseau de voies de signalisation divisé en modules selon leur capacité à être spécifiquement activées par un signal donné (Chen et al., 2001; Pearson et al., 2001; Widmann et al., 1999). Chaque module consiste en une unité de transmission composée de trois membres : MAPKKK → MAPKK → MAPK (Figure 1.1). L'activation de chacune de ces voies de signalisation se fait par une cascade de phosphorylation séquentielle entre les membres à partir de la MAPKKK jusqu'à la MAPK. Lorsque la MAPK est activée, elle peut à son tour phosphoryler différents substrats effecteurs afin de générer une réponse adéquate. Les voies ERK, JNK (Jun amino-terminal Kinase), p38, ERK3 et ERK5 comptent parmi les voies de signalisation de type MAPK (Bogoyevitch and Court, 2004; Kolch, 2000; Nebreda and Porras, 2000; Nishina et al., 2004) (Figure 1.1).

Le mécanisme d'activation de la MAPK semble être accompli par une kinase à double spécificité (MAPKK). Ces enzymes sont capables de phosphoryler les résidus thréonine et tyrosine dans un motif spécifique Thr-X-Tyr, situé dans la boucle d'activation des MAPKs (Bogoyevitch and Court, 2004) (Figure 1.1). Cette caractéristique leur confère une spécificité d'activation typique. La boucle d'activation de ERK3 se distingue des

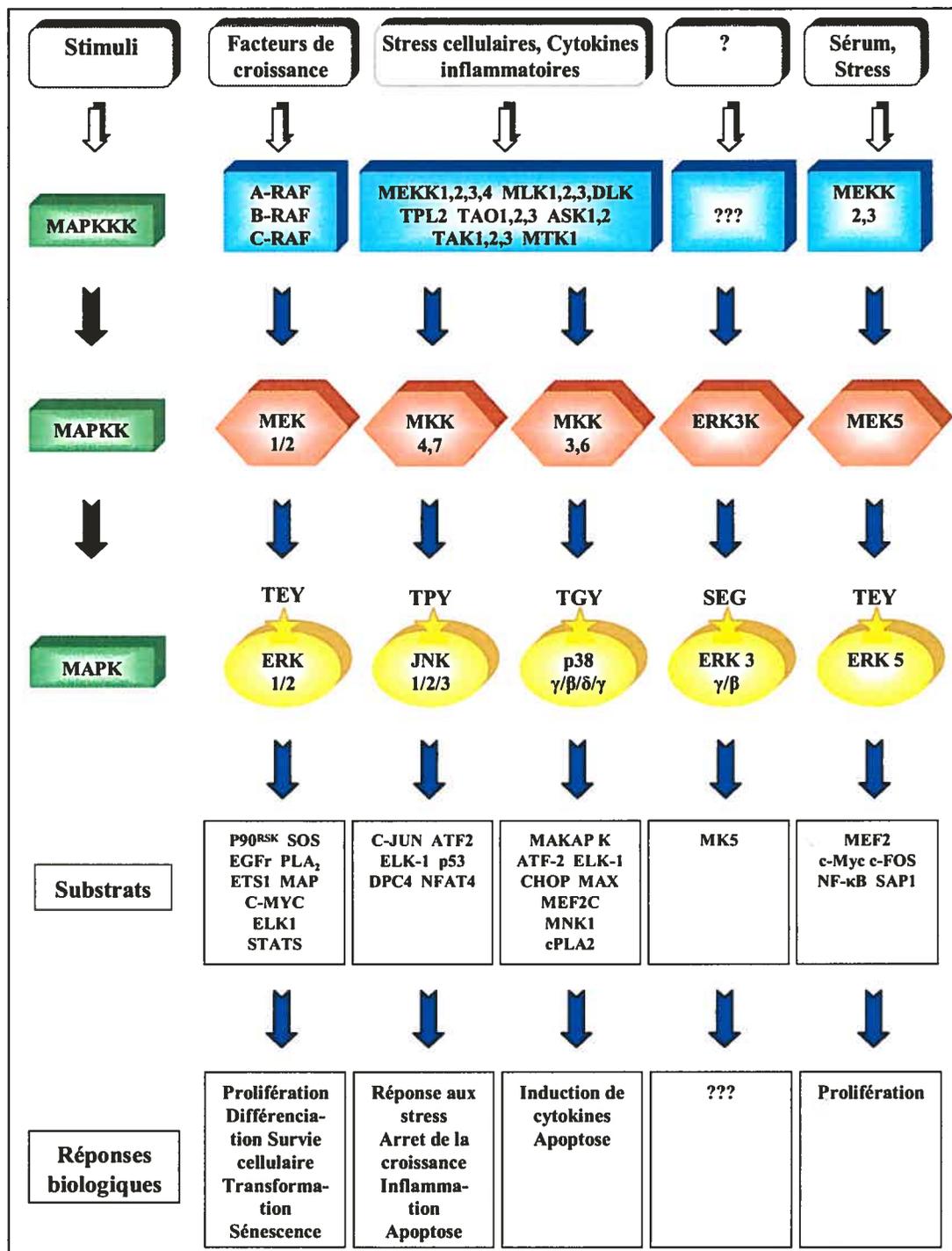


Figure 1.1 Représentation schématique des différentes voies de signalisation de type MAPK et leurs réponses biologiques (Garrington et al., 1999).

autres MAPKs. La thréonine est remplacée par une sérine alors que la tyrosine est changée en glycine (Figure 1.1). Cette sérine peut être phosphorylée, mais la répercussion biochimique de cet événement sur la fonction de ERK3 n'est pas connue (Cheng et al., 1996). Du côté des MAPKKs, elles sont activées par les MAPKKKs via une phosphorylation des résidus sérines ou thréonines également positionnés dans leur boucle d'activation. Contrairement aux MAPKKs, les MAPKKKs possèdent une spécificité d'action beaucoup moins restreinte. Par exemple, les voies JNK et p38 peuvent être activées par plusieurs MAPKKKs (Figure 1.1). Certains résultats ont cependant permis d'éclaircir la signification d'une telle diversité. Les mécanismes moléculaires qui déterminent la spécificité d'action de ces enzymes lors d'une stimulation donnée ont été étudiés. Tout d'abord, une analyse réalisée dans les cellules S2 chez la Drosophile a permis de clarifier la pertinence des différentes MAPKKKs suivant l'activation de la voie JNK par divers agents. Les résultats montrent que l'activation de la voie par le LPS (Lypopolysaccharide) ne requiert que la présence de TAK1 (TGF- β -Activated protein Kinase). Par contre, l'activation de JNK par le sorbitol requiert la présence d'au moins quatre MAPKKKs (TAK1, MLK2 (Mixed-Lineage Kinase-2), ASK1 (Apoptosis Signal-regulating Kinase 1), MEKK1 (MEK Kinase)) (Chen et al., 2002). Ces résultats montrent que pour une stimulation donnée, la cellule peut utiliser, seule ou en combinaison, différentes MAPKKKs pour propager les signaux. Par ailleurs, un domaine d'ancrage appelé DVD (Domain for Versatile Docking) a été identifié en CT du domaine kinase chez cinq MAPKKs (MEK1 (MAP kinase/ERK Kinase), MKK3 (MAPK Kinase-3), MKK4, MKK6 et MKK7). L'intégrité de ce site d'ancrage est essentielle à leur activation et semble participer à l'organisation de la cascade de signalisation en assurant leur association avec une séquence localisée dans le domaine catalytique de leur MAPKKK favorite (Takekawa et al., 2005). Ces observations ont permis de comprendre comment le signal est véhiculé spécifiquement entre les MAPKKs et les MAPKKKs lors d'une stimulation.

En sachant que chacune de ces voies peut contrôler différents processus cellulaires, leurs composantes peuvent devenir des cibles potentielles pour des drogues utilisées dans diverses interventions thérapeutiques. En fait, l'inhibition spécifique de différentes voies de signalisation de type MAPK pourrait entraver le développement de certaines maladies humaines. Par exemple, l'inhibition de la voie ERK pourrait avoir un impact sur la

progression tumorale, alors que la voie JNK pourrait aider à contrer l'arthrite rhumatoïde. L'inhibition de la voie p38 quant à elle, pourrait contrecarrer l'asthme et les maladies auto-immunes (Herrera and Sebolt-Leopold, 2002; Johnson and Lapadat, 2002; Manning and Davis, 2003). La suractivation de la voie ERK dans certaines formes de cancers constitue l'une des plus ciblées par des agents thérapeutiques (Thompson and Lyons, 2005). En fait, certaines drogues, dirigées contre RAF (Rapidly growing Fibrosarcomas) et MEK, sont présentement en essais cliniques. Par exemple, le composé BAY43-9006 possède la capacité d'inhiber RAF en ciblant son site actif (Thompson and Lyons, 2005).

Les voies de signalisation de type MAPK, caractérisées par l'alignement de trois enzymes, se distinguent des autres voies qui utilisent une seule kinase pour transmettre leurs effets de la membrane au noyau. Cette architecture, qui s'est développée durant l'évolution, possède un comportement particulier relatif à la transmission des signaux (Ferrell, 2002). Les études suggèrent que la transmission du signal au sein des membres de la voie ERK et de JNK est véhiculée de façon ultra sensible, c'est-à-dire à la manière d'un commutateur (« switchlike »). Ce modèle postule que la cascade de signalisation réagit de façon très sensible aux variations de concentration de stimuli et entraîne une activation spontanée (Bagowski et al., 2003; Ferrell and Machleder, 1998; Huang and Ferrell, 1996). Les études sur l'ultrasensibilité de la voie sont basées sur deux prémisses : les molécules doivent respectivement diffuser aléatoirement les unes par rapport aux autres et la phosphorylation de la MAPK par la MAPKK s'exécute de façon non processive. On entend par ce terme que chaque événement de phosphorylation nécessite une association indépendante avec son substrat. Les études *in vitro*, à l'aide des enzymes purifiées, démontrent en effet que ERK est activée de manière non processive par MEK (Burack and Sturgill, 1997; Ferrell and Bhatt, 1997).

1.3. Le module RAF/MEK/ERK

1.3.1. Mécanismes d'activation du module RAF/MEK/ERK

1.3.1.1. Les récepteurs

La plupart des processus cellulaires sont enclenchés par l'activation des récepteurs localisés à la membrane plasmique. Les recherches sur la signalisation intracellulaire ont permis de constater qu'une quantité impressionnante de ces récepteurs sont capables de propager leurs effets via le module de signalisation RAF/MEK/ERK. L'un des défis consiste à comprendre les mécanismes moléculaires par lesquels les composantes de cette même cascade de signalisation s'organisent pour engendrer, suite à une stimulation donnée, une réponse particulière. Les prochaines lignes discutent brièvement des différents mécanismes que ces récepteurs utilisent pour activer la voie ERK.

1.3.1.1.1. Les RTKs

Les RTKs (Receptor Tyrosine Kinases) contrôlent plusieurs processus, telles la survie, la migration, la prolifération et la différenciation cellulaire. Ils sont regroupés en 20 sous-familles distinctes dont font partie les récepteurs EGF (Epidermal Growth Factor) PDGF (Platelet-Derived Growth Factor), FGF (Fibroblast Growth Factor) et à l'insuline (Pawson, 2002; Schlessinger, 2000). Fréquemment surexprimés dans les tumeurs humaines, les récepteurs de la famille EGF ont été les premières cibles des drogues antitumorales (Mendelsohn and Baselga, 2000). Les RTKs sont des protéines transmembranaires qui contiennent, dans leur partie extracellulaire, des domaines de liaison impliqués dans la fixation de ligands particuliers. Leur portion intracellulaire se démarque par la présence d'un domaine à activité tyrosine kinase. En général, après la liaison d'un ligand, ces récepteurs vont dimériser et entraîner leur autophosphorylation, processus par lequel chacun des récepteurs se phosphoryle en trans (Heldin, 1995). Les phosphotyrosines, localisées à l'intérieur ou à l'extérieur de leur domaine kinase, vont permettre de créer des sites d'ancrage nécessaires au recrutement de molécules de

signalisation, appelées protéines adaptatrices. Ces dernières possèdent des domaines SH2 qui ont l'habileté de fixer ces phosphotyrosines. Leur recrutement à la membrane permet de transmettre les signaux provenant des récepteurs vers différentes voies de signalisation intracellulaires spécifiques. Les deux principales protéines adaptatrices impliquées dans l'activation de la voie ERK sont SHC et GRB2 (Growth factor Receptor-Binding protein 2). SHC est recrutée au récepteur par l'intermédiaire de son domaine PTB et devient phosphorylée sur des résidus tyrosines suite à son engagement (Basu et al., 1994). Cette phosphorylation est effectuée soit par le RTK lui-même, soit par un membre appartenant à la famille des SFKs (Src-Family protein tyrosine Kinase), dans le but de générer un site d'ancrage nécessaire au recrutement de GRB2 (via son domaine SH2) (Sasaoka et al., 1994). Cette dernière peut également interagir directement avec les phosphotyrosines des RTKs. De plus, cette protéine adaptatrice contient un domaine SH3 qui lui permet d'interagir avec le facteur d'échange SOS (Son of Sevenless) (Li et al., 1993). Le recrutement du complexe GRB2/SOS au récepteur favorise son rapprochement à proximité de la petite GTPase membranaire RAS. SOS est un facteur d'échange qui induit l'activation de RAS en favorisant la fixation du GTP (Guanosine Triphosphate). La conformation active de RAS (GTP-lié) constitue un événement important dans le mécanisme d'activation du module RAF/MEK/ERK (voir sections sur RAS, page 16 et sur RAF, page 22).

1.3.1.1.2. Les récepteurs à cytokines

Les récepteurs à cytokines sont impliqués dans la reconnaissance des cytokines, des interleukines (ILs) et des interférons. Même si ces récepteurs sont dépourvus d'un domaine à activité tyrosine kinase intracellulaire, leur processus d'activation ressemble à celui des RTKs (Carter-Su et al., 2000). La fixation d'un ligand va entraîner leur dimérisation (ou oligomérisation) et favoriser l'activation de tyrosine kinases associées, en l'occurrence les JAKs (Janus Kinase). Ces kinases vont phosphoryler des résidus tyrosines situés dans la région intracellulaire des récepteurs pour permettre le recrutement de la protéine adaptatrice SHC. Cette dernière ainsi localisée, sera phosphorylée en tyrosine par un mécanisme dépendant des JAKs. Cette phosphorylation va créer un site d'ancrage permettant le

recrutement du complexe GRB2/SOS à la membrane et par conséquent l'activation de la voie ERK (VanderKuur et al., 1995). Les JAKs ont aussi l'habileté de phosphoryler les facteurs de transcription de la famille des STATs (Signal Transducers and Activators of Transcription). Après leur phosphorylation, ces facteurs homo ou hétérodimérisent pour finalement être transloqués au noyau et modifier la transcription génétique (O'Shea et al., 2002).

1.3.1.1.3. Les intégrines

Les intégrines sont activées suite à l'engagement de la cellule avec la matrice extracellulaire. Ces récepteurs sont des protéines transmembranaires dépourvues d'un domaine catalytique et formées de sous-unités α et β . Leur spécificité d'action est déterminée par l'agencement des différentes combinaisons entre ces sous-unités. Suite à leur activation, ces récepteurs s'agglomèrent, induisent l'activation des protéines kinases associées pour ensuite transmettre les signaux vers différents effecteurs intracellulaires. Ces événements se traduisent souvent par la réorganisation du cytosquelette et la formation de structures particulières appelées les sites d'adhésion focaux (Giancotti and Ruoslahti, 1999). La plupart des intégrines sont fonctionnellement reliées à la protéine kinase FAK (Focal Adhesion Kinase) de par leur capacité à induire son autophosphorylation sur un résidu tyrosine. La phosphotyrosine issue de cet événement permet alors de générer un site d'ancrage pour l'engagement du domaine SH2 de Src. La liaison de Src conduit à son activation et à la phosphorylation subséquente de plusieurs protéines dont FAK directement. FAK ainsi phosphorylée assure le recrutement du complexe GRB2/SOS et entraîne l'activation de la voie ERK (Schlaepfer et al., 1994). Une autre voie de signalisation en aval des intégrines peut médier l'activation de la voie ERK. Cette dernière requiert une protéine membranaire et une tyrosine kinase de la famille des SFKs, soit cavéoline-1 et FYN. En fait, cavéoline-1 va servir d'adaptateur permettant de relier les intégrines à FYN. Suite à la stimulation des intégrines, FYN est activée et va recruter, via son domaine SH3, la protéine adaptatrice SHC. La phosphorylation de SHC (dépendant de FYN) va par la suite permettre le recrutement du complexe GRB2/SOS pour ensuite induire l'activation de la voie ERK (Wary et al., 1998).

1.3.1.1.4. Les GPCRs

Les GPCRs (G protein-Coupled Receptors) appartiennent à l'une des plus grandes familles de récepteurs du génome humain. Ces récepteurs peuvent répondre à une panoplie de stimuli en passant des odeurs aux neurotransmetteurs. Ils sont formés de sept domaines transmembranaires et interagissent, via leur région intracellulaire, avec une protéine G hétérotrimérique formée des sous-unités α , β et γ (Marinissen and Gutkind, 2001). La fixation d'un ligand aux récepteurs entraîne un changement conformationnel qui stimule l'échange du GDP (Guanosine Diphosphate) en GTP (Guanosine Triphosphate) de la sous-unité $G\alpha$. Cette sous-unité ainsi activée se dissocie du complexe $G\beta\gamma$. Les sous-unités $G\alpha$ et $G\beta\gamma$ pourront ensuite moduler l'activation de différents effecteurs cytoplasmiques. Les GPCRs sont capables de réguler une grande variété de voies de signalisation dont la voie ERK. Le mécanisme moléculaire d'activation de cette voie varie cependant selon le récepteur et le contexte cellulaire (Belcheva and Coscia, 2002; Lowes et al., 2002; Luttrell, 2003).

L'une des façons utilisées par les GPCRs pour activer la voie ERK sollicite la présence de l'adényl cyclase. Cette enzyme est notamment activée par la sous-unité G_s et favorise la synthèse d'un second messenger, soit l'AMPc (cyclic Adenosine Monophosphate). L'augmentation de la concentration de cette molécule va se répercuter positivement sur l'activité de la protéine kinase PKA (Protein Kinase A). Même s'il a été montré que la PKA régule négativement C-RAF (Dumaz and Marais, 2003; Mischak et al., 1996), d'autres études suggèrent qu'elle peut avoir un effet positif sur B-RAF. En fait, ces mécanismes d'activation font intervenir la petite GTPase RAP1. Lorsque activée par PKA, RAP1 est capable de lier B-RAF et d'induire l'activation de la voie ERK indépendamment de RAS (Vossler et al., 1997) (voir section sur la spécificité du module RAF/MEK/ERK, page 41). L'activation de RAP1 peut se faire également par un mécanisme indépendant de la PKA. Il a été montré que EPAC (Exchange Protein directly Activated by cAMP), une GEF (Guanine nucleotide Exchange Factors) spécifique pour RAP1 est activée directement par l'AMPc (de Rooij et al., 1998).

D'un autre côté, l'activation de la voie ERK par Gq se fait suite à l'activation de la PLC β (Phospho-Lipase β), une enzyme qui transforme le phospholipide PIP₂ (Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate) en IP₃ (Inositol(1,4,5)tris-phosphate) et en DAG (Diacylglycerol). Ces molécules sont impliquées entre autres dans la relâche du calcium intracellulaire et l'activation subséquente de la sérine/thréonine kinase PKC (Protein Kinase C). Cette dernière peut réguler la voie ERK de façon dépendante ou indépendante de RAS. Il semble que la PKC puisse phosphoryler C-RAF (Kolch et al., 1993; Ueda et al., 1996). Cependant, la répercussion moléculaire de cet événement sur l'activation de RAF n'est pas entièrement acceptée.

Les GPCRs peuvent également réguler la voie ERK en activant la protéine kinase Src. Le mécanisme d'activation de Src n'est pas très bien connu, mais pourrait faire intervenir la protéine PI-3K (Phosphatidyl Inositol-3 Kinase) (Lopez-Illasaca et al., 1997). Néanmoins, son activation induit la phosphorylation de plusieurs protéines dont les RTKs, SHC, PYK2 (Proline-rich Tyrosine kinase 2) et FAK. Ces événements de phosphorylation permettent de créer des sites d'ancrage à la membrane pour le recrutement du complexe GRB2/SOS (Daub et al., 1996; Della Rocca et al., 1999; Dikic et al., 1996). La phosphorylation de PYK2 est aussi un événement dépendant du calcium intracellulaire (Lev et al., 1995).

Le complexe G $\beta\gamma$ est, quant à lui, capable de stimuler la voie ERK suivant la transactivation des RTKs. Ce mécanisme requiert, entre autres, l'activation des métalloprotéases par un mécanisme dépendant de Src. Ces enzymes assurent le relâchement des facteurs de croissance nécessaires à l'activation des RTKs en clivant les précurseurs ancrés à la membrane plasmique (Prenzel et al., 1999).

Finalement, il a été montré que l'internalisation et l'endocytose des GPCRs sont importants pour l'activation de la voie ERK. Ces processus impliquent la protéine d'échafaudage β -arrestin qui est capable de recruter le module ERK (voir section sur les protéines d'échafaudage de la voie ERK, page 48).

1.3.1.2. RAS

RAS est une petite GTPase monomérique qui fait partie d'une très grande famille de protéines, comprenant plus de 150 membres, lesquelles sont subdivisées en cinq classes : RAS, RHO, RAB, SAR2/ARF et RAN. Ces protéines dirigent les signaux provenant des récepteurs vers différentes voies de signalisation (dont la voie ERK) et régulent une variété de processus cellulaires (Takai et al., 2001). Ces enzymes possèdent une activité GTPase leur permettant d'hydrolyser le GTP en GDP. Les premiers gènes identifiés de cette famille, *v-Ki-ras* et *v-Ha-ras*, sont respectivement issus des virus de Kirsten et de Harvey et encodent pour des protéines à activité oncogénique (Malumbres and Barbacid, 2003). Parallèlement, il a été observé que les gènes *ras* contenaient des mutations activatrices dans environ 20-30 % de tous les cancers humains et pouvaient atteindre jusqu'à 90 % dans les cancers pancréatiques (Downward, 2003). Les membres de la sous-famille RAS, chez les mammifères, comprennent les protéines RAS (H-RAS, N-RAS, K-RAS 4A et 4B), RAP (1A, 1B, 2A, 2B, 2C), RAL (A et B), R-RAS (R-RAS, R-RAS2/TC21, R-RAS3/M-RAS), RHEB, RIN, RIT et autres (Reuther and Der, 2000). La majorité des mutations oncogéniques (85 %), se retrouvent dans *K-ras* et affectent les résidus Gly12, Gly13 et Glu61. Chez la souris, le K.-O. (knock-out) respectif des gènes *H-ras* et *N-ras* n'affecte pas la viabilité, tandis que celui de *K-ras* est létal. Les embryons meurent entre le 12^e et 14^e jour embryonnaire, entre autres en raison d'un défaut au niveau du foie, démontrant ainsi l'importance de cette isoforme durant le développement (Johnson et al., 1997).

1.3.1.2.1. Les GAPs et les GEFs

RAS, comme toutes les GTPases, fonctionne comme un commutateur et se retrouve sous deux conformations distinctes définies par la fixation du GDP ou du GTP. Sous la forme liée au GDP, RAS est inactive. Cependant, lorsqu'elle est liée au GTP, RAS est active et peut interagir avec différents effecteurs. En elles-mêmes, les réactions d'échange (GDP→GTP et GTP→GDP) sont très lentes et requièrent donc la présence de protéines accessoires telles les GEFs (Guanine nucleotide Exchange Factors) et les GAPs (GTPase-Activating Proteins) (Cherfils and Chardin, 1999; Scheffzek et al., 1998). Les GEFs

induisent le relâchement du GDP permettant alors la fixation du GTP (nucléotide cellulaire plus abondant que le GDP) tandis que les GAPs stimulent l'activité GTPase de RAS en favorisant l'hydrolyse du GTP en GDP. L'oscillation entre les formes inactive et active entraîne des changements conformationnels des régions « Switch I » et « Switch II » de RAS. Sous sa forme activée, la « Switch I » (ou boucle effectrice) est exposée à la surface de la protéine et participe à la liaison de protéines effectrices pour assurer la transmission des signaux. Il a été montré que les formes oncogéniques de RAS sont insensibles à l'activité des GAPs et maintiennent leur association au GTP (Downward, 2003).

L'activité de RAS est modulée par la balance des GAPs et des GEFs. Ces enzymes peuvent sélectivement être activées par diverses stimulations et possèdent l'habileté à réguler les isoformes de RAS avec différentes efficacités (Figure 1.2) (Donovan et al., 2002). Les partenaires avec lesquels les GEFs interagissent peuvent également influencer leur spécificité. Par exemple, SOS, de par son interaction avec GRB2, favorise l'activation de RAS. Cependant, son association à EPS8 (Epidermal Growth factor receptor pathway Substrate 8) et E3B1 (Epidermal growth factor receptor-dependent) stimule la GTPase RAC (Nimnual and Bar-Sagi, 2002).

1.3.1.2.2. Maturation et localisation intracellulaire

La maturation des isoformes de RAS dans la cellule est essentiellement dictée par la composition de leurs 25 derniers acides aminés. Cette région, appelée le domaine hypervariable, n'est homologue qu'à 15 % entre les isoformes, comparativement au reste de la séquence qui possède une homologie d'au moins 90 %. Ce domaine contient, entre autres, le motif CaaX qui est caractérisé par une Cys suivie de deux résidus aliphatiques et d'un acide aminé aléatoire. Afin de bien comprendre comment cette région influence la maturation et la localisation des différentes isoformes de RAS, les chercheurs ont évalué leur cheminement à travers le réticulum endoplasmique et le Golgi (Hancock, 2003; Silviu, 2002). Les trois isoformes de RAS sont initialement synthétisées comme précurseurs cytoplasmiques. Trois modifications post traductionnelles sont ensuite effectuées sur leur motif CaaX. La première est l'attachement d'un groupement farnésyl ou

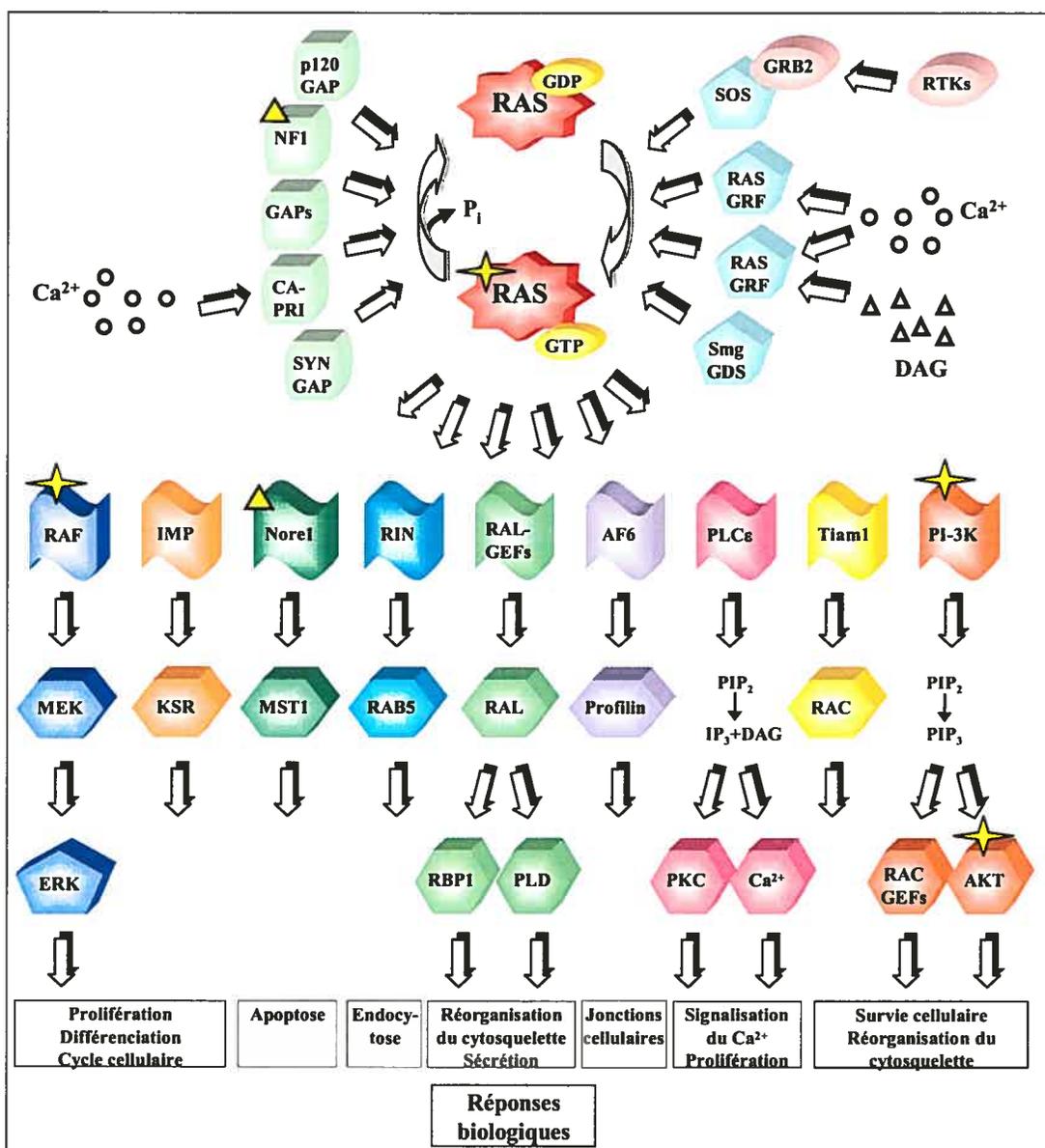


Figure 1.2 Représentation schématique des différentes voies de signalisation en aval de RAS et leurs réponses biologiques. Les étoiles représentent des mutations oncogéniques tandis que les triangles représentent des mutations au sein de molécules de type suppresseurs de tumeurs.

géranyl|géranyl sur la cystéine (prénylation). L'identité du résidu en position X de la boîte CaaX influence la spécificité de cette réaction. Plusieurs molécules antitumorales ont été développées dans le but d'inhiber cette réaction enzymatique et de prévenir la maturation de RAS (Downward, 2003; Sebolt-Leopold and Herrera, 2004). La prénylation oriente les différentes isoformes vers le réticulum endoplasmique où elles subiront des modifications subséquentes. Ces modifications incluent un clivage des trois derniers acides aminés par une endopeptidase et d'une méthylation de la cystéine-prénylée. Par la suite, il a été observé que H-RAS et N-RAS (et probablement K-RAS 4A) subissent une modification additionnelle avant de compléter leur maturation. Ces isoformes contiennent en CT, juste avant le domaine CaaX, une ou des cystéines qui seront modifiées par un groupement palmytoyl. Leur maturation se termine en transitant par le Golgi pour ensuite se diriger vers la membrane plasmique via la voie de sécrétion constitutive. D'un autre côté, K-RAS 4B, qui n'est pas palmitoylée, se rend à la membrane plasmique sans transiter au Golgi. Cette isoforme possède plusieurs résidus basiques positionnés en amont du domaine CaaX qui lui permettraient potentiellement de s'associer à la membrane par des interactions électrostatiques (Apolloni et al., 2000; Choy et al., 1999).

La membrane plasmique n'est pas une simple couche bilipidique fluide. Elle contient des microdomaines ordonnés tels que les « rafts » lipidiques et les « caveolae ». Ces microenvironnements sont des régions riches en spingolipides et en cholestérol. Ils peuvent dans certains cas contenir de la cavéoline, une protéine structurale caractéristique des « caveolae ». Ces structures agissent comme plate-forme pour réguler plusieurs processus cellulaires tels le transport vésiculaire et la transmission des signaux (Galbiati et al., 2001; Simons and Toomre, 2000). Les recherches sur la localisation intracellulaire de RAS a permis d'observer que H-RAS et N-RAS peuvent résider dans les lipides « rafts » / « caveolae » tandis que K-RAS 4B est plutôt distribuée à l'extérieur de ces structures, soit dans une région plus désorganisée de la membrane plasmique. Ces différences pourraient être attribuables à leur maturation différentielle et leur permettraient d'être distinctement régulées (Hancock, 2003; Prior et al., 2001).

1.3.1.2.3. Les protéines effectrices

Il a été montré que RAS (GTP-lié) pouvait influencer une grande variété de processus telles la prolifération, la différenciation, la mobilité et la survie cellulaire de par sa capacité à lier différentes molécules effectrices (Figure 1.2) (Ehrhardt et al., 2002; Shields et al., 2000). Étonnamment, RAS peut aussi envoyer des signaux proapoptotiques (Cox and Der, 2003; Feig and Buchsbaum, 2002). L'implication de RAS dans tous ces processus (dont certains sont antagonistes), suggère l'existence de mécanismes moléculaires qui spécifient l'activation de la ou des composantes nécessaires à l'établissement d'une réponse physiologique adéquate. Même si la compréhension de ces mécanismes demeure nébuleuse, il est proposé que les différents niveaux d'expression et la localisation intracellulaire de chacune des isoformes de RAS puissent réguler différemment les molécules effectrices. Aussi, le contexte cellulaire (combinaison précise de molécules effectrices) et l'affinité qu'elles possèdent pour chacune d'entre elles pourraient participer à la spécificité d'action au sein de la signalisation RAS (Hingorani and Tuveson, 2003; Rodriguez-Viciano et al., 2004). Les études sur la contribution de chacune des molécules effectrices durant la transformation oncogénique par RAS demeurent également un enjeu important pour l'élaboration de nouveaux traitements plus efficaces contre le cancer (Repasky et al., 2004). La découverte de mutations oncogéniques dans B-RAF, mais aussi au sein de nombreuses autres molécules effectrices, suggère fortement la participation de plusieurs voies en aval de RAS dans les processus oncogéniques (Figure 1.2) (Repasky et al., 2004).

Les effecteurs de RAS possèdent tous un domaine d'interaction spécifique qui s'associe à la forme GTP-liée de RAS. Le domaine RBD (Ras Binding Domain), le domaine RBD chez les kinases à phospholipides de classe I (PI3K-RBD) et les domaines d'association RA (Ras/Rap Association domain) sont les trois motifs possibles qui assurent cette liaison (Repasky et al., 2004).

1.3.1.2.4. Régulation du module RAF/MEK/ERK

Le mécanisme par lequel les RTKs favorisent l'activation de RAS et entraînent la stimulation du module RAF/MEK/ERK a été très étudié. De façon générale, le recrutement à la membrane du complexe GRB2/SOS par ces récepteurs contribue à maintenir RAS sous sa forme activée. Cette forme GTP-liée est capable de recruter RAF et d'induire l'activation de la voie ERK, processus reconnu pour médier plusieurs effets de la signalisation RAS (Campbell et al., 1998). Les études de localisation de la forme GTP-liée de RAS ont permis de constater que son activation ne se produisait pas aléatoirement dans la membrane plasmique, mais plutôt dans des compartiments bien précis de la cellule. Cette compartimentalisation semble d'ailleurs importante pour médier ses effets biologiques (Bivona and Philips, 2003). Par exemple, la localisation spécifique de H-RAS dans les « rafts » / « caveolae » semble requise pour l'activation de RAF, néanmoins elle nécessite sa redistribution subséquente vers l'extérieur de ces microdomaines pour transmettre ses signaux (Prior et al., 2001; Roy et al., 1999).

D'autres études montrent que le module RAF/MEK/ERK peut être activé par RAS dans d'autres compartiments cellulaires tels que les vésicules endosomales (Jiang and Sorkin, 2002). L'endocytose est un processus par lequel les récepteurs (dont les RTKs et les GPCRs), suivant leur activation, sont internalisés dans des vésicules pour ensuite être dirigés vers différentes organelles afin d'être dégradés ou recyclés. Il a été suggéré que la transmission des signaux intracellulaires puisse être régulée à partir de ces vésicules de transport (Sorkin and Von Zastrow, 2002). Par exemple, dans certains types cellulaires l'endocytose du récepteur EGF est essentielle pour activer la voie ERK (Vieira et al., 1996). En effet, ce RTK peut interagir dans ces structures avec les protéines adaptatrices SHC et GRB2, lui permettant ainsi d'activer RAS (Haugh et al., 1999; Jiang and Sorkin, 2002). Il a également été démontré que le module RAS/RAF/MEK/ERK peut être localisé dans ces structures (Pol et al., 1998). Contrairement à H-RAS, l'activation de RAF par K-RAS est indépendante de l'endocytose (Roy et al., 2002).

Certaines analyses suggèrent que, suite à l'activation du récepteur EGF, H-RAS et N-RAS peuvent transmettre des signaux à RAF à partir du Golgi et du réticulum

endoplasmique (Chiu et al., 2002). Cependant, la cinétique d'activation est différente de celle observée à la membrane plasmique. L'activation à la membrane est rapide et transitoire tandis que celle au Golgi est retardée et soutenue. L'activation de RAS dans les endomembranes nécessite la présence de Src (Chiu et al., 2002). Cette voie requiert également l'activation de la PLC γ (Phospho-Lipase C gamma-1) qui, en augmentant le Ca²⁺ intracellulaire, enclenche le recrutement au Golgi et l'activation subséquente de la GEFs RASGRP1 (RAS Guanyl Releasing Protein 1). Cette enzyme favorise l'activation de RAS dans les endomembranes (Bivona et al., 2003). L'activation transitoire de RAS à la membrane, qui dépend du complexe GRB2/SOS, semble être négativement régulée par la signalisation induite par le Ca²⁺ (Bivona et al., 2003). En effet, CAPRI (Calcium-Promoted RAS Inactivator), une GAP localisée dans le cytoplasme, est activée et transloquée à la membrane en réponse au Ca²⁺ pour ensuite réguler négativement la voie RAS/ERK (Lockyer et al., 2001). Ces résultats suggèrent qu'il existe, suite à l'activation d'un récepteur, différents modes de contrôle de l'activité de RAS qui dépendent de sa compartimentalisation intracellulaire et qui font appel à la régulation de GAPs et de GEFs (Walker et al., 2003).

1.3.2. RAF

RAF est la molécule d'entrée de la voie de signalisation ERK et, par conséquent, constitue l'un des principaux acteurs contrôlant les fonctions cellulaires associées à cette voie (Baccarini, 2005). Très conservée durant l'évolution, RAF a initialement été identifiée comme oncogène rétroviral chez la souris et le poulet (*v-raf* et *v-mil*). Chez les mammifères, RAF est représentée par trois gènes appelés *A-raf*, *B-raf* et *C-raf* (*raf-1*). On le retrouve également chez la Drosophile (*D-raf*) et chez le nématode (*lin-45*). Chaque isoforme est composée d'une architecture similaire contenant trois régions conservées (CR1, CR2 et CR3) (Figure 1.3). La région CR1 est caractérisée par un domaine de liaison à RAS (RBD) ainsi qu'un domaine CRD (Cysteine-rich domain). La région CR2 est principalement composée de sérines et de thréonines tandis qu'un domaine kinase constitue le domaine CR3. *C-raf* est exprimé de façon ubiquitaire. *A-raf* et *B-raf* sont également

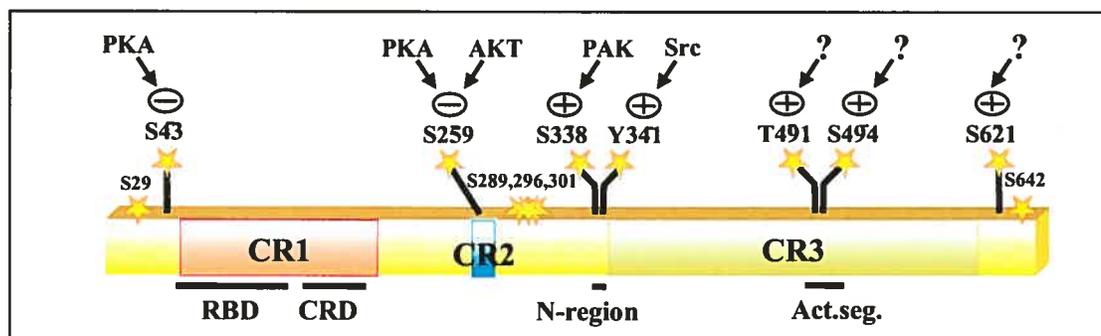


Figure 1.3 Représentation schématique de la structure de C-RAF. Les étoiles correspondent aux différents sites de phosphorylation positifs et négatifs qui modulent l'activité de C-RAF. La phosphorylation des résidus Ser29, 289, 296, 301, et 642 constitue une boucle de rétroinhibition négative effectuée par ERK.

exprimés dans plusieurs tissus mais à des niveaux plus faibles. Leur expression respective est principalement dans les tissus urogénitaux et les tissus neuronaux (Luckett et al., 2000; Wellbrock et al., 2004; Wojnowski et al., 2000).

Le K.-O. du gène *A-raf* chez la souris entraîne la mort 7 à 21 jours après la naissance du nouveau-né. La source des complications provient de défauts neurologiques et intestinaux (Pritchard et al., 1996). Pour ce qui est du K.-O. de *B-raf*, les souris meurent au stade embryonnaire. Elles manifestent des anomalies vasculaires et neuronales ainsi qu'une apoptose excessive des cellules endothéliales (Wojnowski et al., 1997). Le phénotype associé au K.-O. de *C-raf* est également létal durant l'embryogenèse. Plusieurs problèmes de développement sont observés dans la peau, le placenta, les poumons, le foie, et certains sont caractérisés par une augmentation de la mort cellulaire (Huser et al., 2001; Mikula et al., 2001; Wojnowski et al., 1998). Malgré le fait que l'ablation respective des trois gènes entraîne des retards de croissance, ces études (et celles discutées plus loin) révèlent que les différentes isoformes possèdent aussi des fonctions distinctes (Hagemann and Rapp, 1999; Murakami and Morrison, 2001; O'Neill and Kolch, 2004).

1.3.2.1. Mécanisme de régulation et d'activation

La plupart des études fonctionnelles ont été réalisées en utilisant l'isoforme C-RAF. Son processus d'activation est un mécanisme complexe qui implique plusieurs événements, tels le recrutement à la membrane, l'association/dissociation de partenaires, l'oligomérisation, des changements conformationnels intramoléculaires et des événements de phosphorylation/déphosphorylation (Chong et al., 2003; Dhillon and Kolch, 2002; Wellbrock et al., 2004).

La relocalisation de C-RAF du cytoplasme à la membrane plasmique constitue une étape importante dans le processus de régulation de son activité kinase (Stokoe et al., 1994). Cette relocalisation est également importante pour l'activation adéquate du module ERK (Harding et al., 2005). En condition non activée, C-RAF est localisée dans le cytoplasme et adopte une conformation inactive. La caractérisation des formes oncogéniques virales de RAF et les études à l'aide de mutants de troncation suggèrent

l'établissement d'une structure repliée entre ses parties NT et CT. La portion NT de C-RAF, appelée région d'autorégulation négative, interagit avec le domaine kinase par l'intermédiaire de son domaine CRD (Cutler et al., 1998; Zhang et al., 1993). De plus, plusieurs partenaires dont Hsp90 (heat shock proein 90), Hsp70 et p50/Cdc37 (Cell Divison Cycle 37 *S. cerevisiae* homologue) sont capables de lier constitutivement C-RAF (Morrison and Cutler, 1997). La formation d'un tel complexe permettrait de stabiliser et de localiser adéquatement la forme inactive de C-RAF. Les protéines chaperonnes de type 14-3-3 participent également à la stabilisation de la structure inactive de C-RAF en liant les phosphosérines 259 et 621 (Fu et al., 1994; Rommel et al., 1997). Ces protéines ont la capacité de lier spécifiquement les phosphosérines et les phosphothréonines et jouent un rôle particulièrement important dans la signalisation intracellulaire (Dougherty and Morrison, 2004). Elles ont de plus la capacité de dimériser et cette propriété semble essentielle pour médier leur effet sur la régulation de C-RAF (Tzivion et al., 1998). La conformation inactive de C-RAF permettrait de maintenir son activité kinase inhibée et empêcherait son recrutement à la membrane (Light et al., 2002). La phosphorylation de la Ser259 de C-RAF, nécessaire au maintien de cette structure, requiert les protéines kinases PKA (dépend de l'AMPc) et AKT (dépend de la PI-3K) (Dhillon et al., 2002; Zimmermann and Moelling, 1999) (Figure 1.3). La PKA bloque également l'activation de C-RAF par sa capacité à s'associer et à phosphoryler les Ser43 et Ser233 (Dumaz and Marais, 2003) (Figure 1.3). Cependant, le mécanisme par lequel cette phosphorylation entraîne l'inhibition de C-RAF n'est pas entièrement compris (Dumaz et al., 2002; Sidovar et al., 2000).

La translocation de C-RAF à la membrane (seulement une fraction des molécules totales) constitue l'une des premières étapes indispensables à son processus d'activation. Cette relocalisation est accomplie grâce à l'affinité qui existe entre la forme activée de RAS (liée au GTP) et le domaine RBD de C-RAF. Cette première interaction à la membrane entraîne également l'engagement du domaine CRD sur RAS. Cette association ne requiert cependant pas la présence d'une forme de RAS liée au GTP. Cette liaison secondaire contribuerait au processus moléculaire d'activation de C-RAF en empêchant d'une part la liaison de 14-3-3 et d'autre part, en inhibant l'association entre le CRD et le domaine

catalytique (Cutler et al., 1998). Il est à noter que la liaison du CRD à un phospholipide pourrait également participer au déplacement de 14-3-3. Ces événements entraînent l'exposition de la Ser259 et facilitent ainsi sa déphosphorylation (Clark et al., 1997; Light et al., 2002; McPherson et al., 1999). Les enzymes impliquées dans cet événement, les phosphatases PP1 (Protein Phosphatase 1) et PP2A, sont en effet capables de déphosphoryler la Ser259 et favoriser l'accumulation de C-RAF à la membrane (Abraham et al., 2000; Jaumot and Hancock, 2001). Le mécanisme de déphosphorylation s'effectue notamment par le recrutement de la sous-unité régulatrice de PP2A à C-RAF suivant l'activation de la voie par un facteur de croissance (Kubicek et al., 2002; Ory et al., 2003). PP2A a d'ailleurs été identifiée dans des cribles génétiques dépendants de RAS chez *D. melanogaster* et *C. elegans* (Sieburth et al., 1999; Wassarman et al., 1996). Cet événement de déphosphorylation est essentiel et participe avec RAS aux premières étapes du mécanisme d'activation de C-RAF (Dhillon et al., 2002). Pour ce qui est de la régulation de la Ser621, la stoechiométrie de phosphorylation/déphosphorylation durant l'activation n'est pas parfaitement comprise. Les études montrent que, contrairement à la Ser259, la capacité de 14-3-3 à s'associer à cette phosphosérine serait non seulement impliquée dans le maintien de la structure inactive, mais aussi requise positivement pour l'activité de C-RAF (Light et al., 2002; Mischak et al., 1996; Yip-Schneider et al., 2000).

D'autres événements de phosphorylation à la membrane sont requis pour la pleine activation de C-RAF. La stimulation mitogénique provoque, entre autres, la phosphorylation des Ser338 et Tyr341 dans la région N du domaine kinase de C-RAF (Diaz et al., 1997; Fabian et al., 1993) (Figure 1.3). Le nom de cette région découle spécialement du fait que la présence de charges négatives à cet endroit est essentielle pour l'activité de C-RAF (voir plus loin). Le mécanisme de phosphorylation de la Ser338 n'est pas complètement accepté, mais impliquerait les protéines de type PAK (p21 Activated Kinase) (Chiloeches et al., 2001; King et al., 1998; Zang et al., 2002) (Figure 1.3). Ces sérines/thréonines kinases sont capables de réguler C-RAF suite à leur activation par les petites GTPases de type RHO (Chaudhary et al., 2000; Sun et al., 2000). La phosphorylation de la Tyr341, quant à elle, dépend de Src et JAK (Fabian et al., 1993; Xia et al., 1996) (Figure 1.3). Ces événements de phosphorylation supportent l'ouverture et le

dépliement de la structure tridimensionnelle de C-RAF (Mason et al., 1999; Tran and Frost, 2003). De plus, la phosphorylation des Thr491 et Ser494 de C-RAF (et B-RAF [Thr598 et Ser601]), situées dans la boucle d'activation de son domaine kinase, est essentielle pour induire son activité kinase (Chong and Guan, 2003; Chong et al., 2001; Zhang and Guan, 2000) (Figure 1.3). Le mécanisme de phosphorylation de ces sites n'a pas encore été identifié. Récemment, l'implication d'une nouvelle molécule agissant dans la voie ERK capable de réguler B-RAF a été identifiée. Il s'agit de MLK3, une protéine de la famille des MAPKKK initialement identifiée comme activateur des voies JNK et p38 (Chadee and Kyriakis, 2004). Il a été montré que MLK3 était requise pour la phosphorylation des résidus Thr598 et Ser601 de B-RAF suite à une stimulation au EGF. Cette observation a été obtenue à l'aide de la technique d'ARNi (ARN interférence) qui utilise de l'ARN double brin pour éliminer spécifiquement l'ARN messager issu d'un gène sélectionné (Medema, 2004). L'action de MLK3 se situe entre RAS et RAF puisque l'enlèvement de MLK3 bloque la prolifération tumorale induite par RAS sans toutefois affecter celle induite par une forme oncogénique de B-RAF. Même si MLK3 est capable d'interagir avec B-RAF, il ne possède pas la capacité de le phosphoryler directement. Le mécanisme par lequel MLK3 régule la fonction et l'activation de B-RAF reste à être déterminé (Chadee and Kyriakis, 2004).

La régulation de l'activité kinase des différentes isoformes de RAF est contrôlée par des mécanismes de phosphorylation/déphosphorylation communs. Cependant, certaines particularités les différencient. Les trois isoformes possèdent le site de phosphorylation équivalent à la Ser259 de C-RAF, lequel est nécessaire à la liaison de 14-3-3. B-RAF possède par contre deux sites supplémentaires qui peuvent être phosphorylés soit par AKT, soit par la kinase SGK (Serum and Glucocorticoid-regulated Kinase) (Guan et al., 2000; Zhang et al., 2001). Les recherches qui ont caractérisé les mécanismes de phosphorylation ont permis d'établir que A-RAF et C-RAF disposent d'un mécanisme de régulation similaire, mais distinct de celui de B-RAF. La phosphorylation des résidus Tyr341 et Ser338 dans la région N du domaine kinase de C-RAF est différente chez B-RAF. En effet, la Tyr341 est remplacée par un aspartate alors que la Ser338 est constitutivement phosphorylée. Ces changements sont étroitement associés à une activité basale plus élevée

pour B-RAF et évoque l'hypothèse que la présence de charges négatives dans la région N, résultant soit de l'ajout d'un groupement phosphate soit d'un résidu acide, favorise une conformation active de l'enzyme (Mason et al., 1999). Contrairement aux isoformes C-RAF et A-RAF, B-RAF ne requiert que la liaison à RAS et la phosphorylation de sa boucle d'activation sur ses résidus Thr598 et la Ser601 pour induire son activité kinase (Chong et al., 2001; Marais et al., 1997; Mason et al., 1999). D'après l'homologie de séquences, il semble que les isoformes de RAF chez *D. melanogaster* et *C. elegans* puissent être régulées de façon similaire à B-RAF (Chong et al., 2001).

Récemment, plusieurs mutations dans B-RAF ont été identifiées dans des cancers humains (Garnett and Marais, 2004; Mercer and Pritchard, 2003; Morrison, 2004). Ces mutations se retrouvent, entre autres, dans 66 % des mélanomes et 15 % des cancers du côlon. La plupart de ces mutations sont localisées dans la région riche en glycines ou dans le segment d'activation du domaine kinase. Des 45 mutations identifiées dans B-RAF, la Val599, positionnée en aval de la Thr598, est mutée en glutamate (V599D) et constitue 90 % de toutes les mutations. Cette mutation pourrait mimer la phosphorylation d'un résidu de la boucle d'activation (Thr598 ou Ser601) et ainsi favoriser un changement de conformation permettant l'activation du domaine kinase. De fait, cette mutation stimule fortement l'activité de B-RAF et facilite la progression tumorale. Les mutations dans RAS et B-RAF sont généralement mutuellement exclusives dans les lignées tumorales, suggérant que ces deux oncogènes agissent dans la même voie d'activation pour transmettre leurs effets (Davies et al., 2002). La structure du domaine kinase de B-RAF a récemment été résolue (Wan et al., 2004). Une interaction intramoléculaire atypique entre la région riche en glycines et le segment d'activation permet de maintenir le domaine kinase dans un état inactif. La plupart des mutations de B-RAF pourraient perturber les associations entre ces régions, instabilisant ainsi leur conformation inactive. Il s'ensuit un déplacement de la boucle d'activation, ce qui invite la kinase à adopter une conformation active (Hubbard, 2004). B-RAF est l'isoforme la plus fréquemment mutée dans les cancers. Ceci s'explique par le fait que B-RAF ne requiert aucune phosphorylation dans sa région N contrairement aux deux autres isoformes. Une seule mutation telle la V599D est suffisante pour favoriser l'obtention d'une conformation active (Tran et al., 2005).

Étonnamment, certaines mutations dans B-RAF affectant des résidus normalement requis lors de la catalyse, ont néanmoins la capacité d'induire l'activation de la voie ERK *in vivo*. Ces mutants oncogéniques sont pourtant incapables d'augmenter l'activation de MEK *in vitro*. L'activation de la voie ERK serait le résultat d'une potentielle transactivation entre B-RAF et C-RAF. En effet, l'élimination de C-RAF à l'aide de la technique d'ARNi abolit l'activation de la voie ERK par B-RAF oncogénique, suggérant ainsi l'importance de C-RAF dans la transmission de ce signal (Wan et al., 2004). Ces recherches corroborent avec d'autres études qui montrent que l'activation de C-RAF requiert B-RAF et que la stimulation de la voie entraîne leur hétérodimérisation via le site de liaison de 14-3-3 à la position 621 (Mizutani et al., 2001; Weber et al., 2001). La dimérisation est un mécanisme moléculaire important pour la fonction de RAF. En effet, sa dimérisation induite de façon artificielle stimule son activité kinase (Farrar et al., 1996; Farrar et al., 2000; Luo et al., 1996). L'impact de ce phénomène moléculaire ne semble pas impliquer des événements de transphosphorylation des résidus Ser338, Thr491, Thr494, mais semble plutôt agir conformationnellement en modifiant ou stabilisant des interactions protéine/protéine (Goetz et al., 2003). Parallèlement, il a été observé que RAS puisse former des dimères (Inouye et al., 2000).

C-RAF est soumis à une régulation négative suivant l'activation de la voie (Dumaz and Marais, 2005). Lorsque activée, ERK engendre une rétroinhibition négative sur C-RAF et phosphoryle directement cinq résidus (S29, S289, S296, S301, S642) (Dougherty et al., 2005) (Figure 1.3). Cette phosphorylation désactive RAF en le rendant insensible à une éventuelle stimulation et exerce un effet négatif sur son association avec RAS. Il a été montré que la mutation des Ser296 et Ser301 en alanines stimule l'activité de C-RAF, démontrant ainsi leur rôle négatif sur sa fonction (Hekman et al., 2005). La déphosphorylation de ces sites négatifs est indispensable pour recycler C-RAF et le convertir en une molécule de signalisation à nouveau compétente. Cette déphosphorylation s'effectue grâce à la phosphatase PP2A de concert avec la protéine PIN1 (Peptidyl-prolyl *cis-trans* Isomerase NIMA-interacting 1). Cette dernière encode une enzyme peptidyl-prolyl isomérase impliquée dans l'isomérisation des motifs pSer/Thr-Pro. Son activité est

nécessaire afin de favoriser la conformation *trans* du lien peptidique, une conformation essentielle à la déphosphorylation par PP2A (Dougherty et al., 2005; Lu, 2004).

Le K.-O. du gène *B-raf* compromet l'activation de la voie ERK contrairement aux gènes *A-RAF* et *C-RAF* dans les fibroblastes embryonnaires de souris (MEFs) (Huser et al., 2001; Mercer et al., 2002; Mikula et al., 2001). Ces recherches suggèrent ainsi que B-RAF puisse être le principal activateur de MEK. Le fait que B-RAF phosphoryle plus facilement MEK que C-RAF et A-RAF dans un essai kinase *in vitro*, corrobore ces observations (Marais et al., 1997; Pritchard et al., 1995). La spécificité d'action de chacune des isoformes peut également se répercuter sur le niveau d'activation de la voie ERK et par conséquent, sur l'induction de réponses biologiques particulières. Par exemple, dans les fibroblastes, la forme oncogénique de A-RAF entraîne la progression du cycle cellulaire, tandis que C-RAF et B-RAF provoquent l'arrêt du cycle cellulaire par l'induction de la protéine p21^{CIP} (Pritchard et al., 1995; Woods et al., 1997).

1.3.2.2. Fonction indépendante de la voie ERK

Plusieurs évidences démontrent que RAF possède non seulement la capacité de contrôler la voie ERK en phosphorylant MEK, mais aussi de réguler d'autres molécules impliquées dans des voies de signalisation distinctes (Hindley and Kolch, 2002). Un exemple nous provient du K.-O. de *C-raf*. Les fibroblastes de cette souris ne démontrent aucun défaut spécifique dans l'activation de la voie ERK. Pourtant, les souris meurent durant l'embryogenèse. Il est suggéré que cette létalité soit causée par un défaut relié à une fonction qui est indépendante de sa capacité à activer la voie ERK (Huser et al., 2001; Mikula et al., 2001).

C-RAF participe, entre autres, à la régulation positive du cycle cellulaire par sa capacité à interagir et à phosphoryler la protéine Rb (Retinoblastoma), une molécule impliquée dans la répression du cycle cellulaire en phase G1 (Wang et al., 1998). Cette interaction est très importante puisque son empêchement se répercute négativement sur la croissance tumorale (Dasgupta et al., 2004). C-RAF peut également phosphoryler et activer la protéine CDC25, une phosphatase impliquée dans la déphosphorylation des

CDKs (Cyclin Dependent Kinases) et la progression subséquente du cycle cellulaire (Galaktionov et al., 1995). D'autres évidences montrent que les isoformes de A-RAF et C-RAF peuvent médier la synthèse d'ADN (Acide Désoxyribonucléique) indépendamment de l'activation de la voie ERK (Karasarides et al., 2004).

L'une des principales fonctions de C-RAF, qui est indépendante de l'activation de la voie ERK, est probablement son impact négatif sur l'apoptose (Troppmair and Rapp, 2003). Les premières évidences proviennent du K.-O. de *C-raf* où un accroissement de cellules apoptotiques a été observé (Huser et al., 2001; Mikula et al., 2001; Wojnowski et al., 1998). C-RAF peut inhiber l'apoptose par différents mécanismes d'action. La régulation de la voie de signalisation NF- κ B (Nuclear Factor κ B), impliquée dans la prolifération et la protection contre l'apoptose, en est un exemple (Pearson et al., 2000). Cependant, le mécanisme par lequel C-RAF régule le complexe NF- κ B n'est pas très bien connu, mais nécessiterait la présence des protéines IKK β (I- κ B Kinase B) et MEKK1 (Baumann et al., 2000; Mikula et al., 2001). Parallèlement, il a été observé dans une lignée cancéreuse exprimant une forme oncogénique de RAF que la voie de signalisation NF- κ B est suractivée (Baumann et al., 2000; Ikenoue et al., 2003). Ces résultats suggèrent ainsi que cette voie pourrait participer aux mécanismes de carcinogenèse qui dépendent de RAF.

C-RAF peut également être relocalisée à la surface externe des membranes de la mitochondrie pour ensuite interagir fonctionnellement avec plusieurs molécules impliquées dans l'apoptose. Fait intéressant, A-RAF a été localisée dans cette organelle, proposant ainsi la possibilité que cette isoforme soit également impliquée dans la régulation de la mort cellulaire (Yuryev et al., 2000). La participation de C-RAF dans ce phénomène résulte entre autres de son association avec la protéine antiapoptotique Bcl-2 (B-cell CLL/lymphoma 2) (Wang et al., 1996). Cette interaction permet le recrutement de C-RAF à la mitochondrie et favorise la phosphorylation et l'inhibition du facteur proapoptotique BAD (Bcl-2 Antagonist of cell Death) (Wang et al., 1996). L'activation de C-RAF pourrait faire intervenir la protéine antiapoptotique BAG1 (Bcl-2-interacting protein), un partenaire de Bcl-2. En effet, cette dernière est également capable de s'associer à C-RAF et pourrait stimuler son activité kinase à la mitochondrie (Wang et al., 1996). Parallèlement, l'induction de l'apoptose causée par la déprivation de l'IL-3 occasionne le clivage de C-

RAF par la caspase 9. Les données indiquent que ce clivage se produit sur le résidu Asp279 de C-RAF, séparant ainsi la partie NT autorégulatrice du domaine catalytique. Le fragment du domaine kinase est préférentiellement localisé à la mitochondrie dans ces conditions et antagoniserait l'apoptose (Cornelis et al., 2005).

Malgré le fait que le K.-O. de *Bcl-2* soit en mesure de retarder l'induction des cancers produits par la forme oncogénique de C-RAF, il semble que C-RAF soit également capable de moduler l'apoptose indépendamment de *Bcl-2* (Fedorov et al., 2002; Zhong et al., 2001). En effet, C-RAF est capable de moduler négativement la protéine VDAC (Voltage-Dependent Anion Channel), évitant ainsi la relâche du cytochrome c et l'activation subséquente des caspases (Le Mellay et al., 2002). Fait intéressant, C-RAF peut promouvoir la survie cellulaire indépendamment de son activité kinase. C-RAF peut lier la protéine proapoptotique ASK1 et participer par un mécanisme toujours inconnu à l'inhibition de l'apoptose (Chen et al., 2001; Yamaguchi et al., 2004). De façon similaire, C-RAF peut contrôler l'apoptose par sa liaison avec MST2 (MKN28-derived non-receptor type of Serine/Threonine kinase 2), une protéine kinase de la famille des STE20 (Sterile 20). Cette interaction permet de réguler négativement MST2 en empêchant sa dimérisation, ce qui par conséquent prévient son activation. Le complexe C-RAF/MST2 permet de contrôler l'apoptose en présence de faibles signaux mitogéniques (O'Neill and Kolch, 2005; O'Neill et al., 2004). La caractérisation de HIPPO, l'homologue de MST2 chez la *Drosophile*, a permis de confirmer son implication dans la régulation de l'apoptose et de la prolifération cellulaire (Harvey et al., 2003; Wu et al., 2003).

1.3.2.3. Les partenaires de RAF

Les interactions protéine-protéine jouent un rôle important dans la régulation de la fonction de RAF. Il existe, entre autres, trois protéines d'échafaudage identifiées dans des cribles génétiques chez *D. melanogaster* ou chez *C. elegans* qui ont la capacité d'interagir et d'influencer la fonction de RAF. Il s'agit de CNK (Connector enhancer of KSR), KSR (Kinase Suppressor of RAS) et SUR-8 (Suppressor of RAS mutation-8) (Kornfeld et al., 1995; Sieburth et al., 1998; Therrien et al., 1995; Therrien et al., 1998). La régulation de ces protéines est discutée dans la section des protéines d'échafaudage de la voie ERK (voir

page 48). Ces partenaires pourraient stabiliser, coordonner et rapprocher les différents régulateurs de RAF et ainsi assurer entre autres, la spécificité des événements de phosphorylation/déphosphorylation nécessaires à sa régulation.

La fonction de RAF peut également être régulée par sa liaison à Sprouty (Spry) et à RKIP (RAF-1 Kinase Inhibitor Protein), deux régulateurs négatifs de la voie ERK (Kim and Bar-Sagi, 2004; Trakul and Rosner, 2005). Spry est une molécule identifiée lors d'un cribble génétique chez *D. melanogaster* qui inhibe la signalisation en aval du RTK FGF (Hacohen et al., 1998). La caractérisation des membres de la famille de Sprouty a démontré que leur mode d'action se situe à différents endroits dans la voie, autant en amont qu'en aval de Ras (Kim and Bar-Sagi, 2004). Entre autres, Spry4 a la capacité d'interagir avec le domaine kinase de C-RAF et d'inhiber son activation. Cette inhibition se manifeste au cours de l'activation par le VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) qui active C-RAF par un mécanisme dépendant de la PKC, mais indépendant de RAS. Spry 4 n'a cependant pas d'effet sur l'activation par les récepteurs EGF et FGF qui régule C-RAF via l'activation de RAS. Spry2 semble également important pour l'inactivation de B-RAF puisqu'il est sous exprimée dans les mélanomes associés à B-RAF oncogénique (Tsvachidou et al., 2004). La surexpression de Spred, une molécule apparentée à la famille des Sprys, régule également de façon négative la voie ERK. Cependant, même si l'effet répresseur de Spred suite à la stimulation par l'EGF inhibe l'activation de C-RAF, aucune interaction entre les deux n'a été détectée. Spred interagit plutôt avec RAS et inhibe l'activation de C-RAF en bloquant la phosphorylation de la Ser338 (Wakioka et al., 2001). D'autres recherches proposent que Spry2 possède également la capacité de réguler positivement la voie ERK (Li et al., 2003). Ces résultats suggèrent donc que les différentes formes de SPRY régulent l'activation de la voie ERK par différents mécanismes d'action et ce, en fonction du type cellulaire et/ou de la stimulation (Sasaki et al., 2003).

De son côté, RKIP est également capable de réguler négativement la voie ERK. Cette inhibition requiert non seulement sa liaison à C-RAF, mais aussi celle à MEK-1 et ERK-2. RKIP agit comme un inhibiteur compétitif en liant C-RAF et MEK-1 de façon mutuellement exclusive, ce qui par conséquent réprime la phosphorylation de MEK-1 par C-RAF (Trakul et al., 2005; Yeung et al., 2000; Yeung et al., 1999). La régulation de

l'interaction entre C-RAF et RKIP requiert la PKC. En effet, la PKC phosphoryle RKIP (Ser153) en réponse aux RTKs, ce qui entraîne la dissociation du complexe C-RAF/RKIP (Corbit et al., 2003). RKIP ainsi phosphorylée est maintenant capable de lier et d'inhiber GRK-2 (G-protein coupled Receptor Kinase 2), une kinase impliquée dans la phosphorylation et l'internalisation spécifique des GPCRs. Cette association a pour conséquence de diminuer fortement l'activité de GRK2 et ainsi retarder l'internalisation du récepteur. Par conséquent, la phosphorylation de RKIP transfère son potentiel inhibiteur de C-RAF à GRK-2 et couple l'activation de la voie ERK à l'inhibition d'une voie dépendante de GRK-2 (Goel and Baldassare, 2004; Lorenz et al., 2003). Ces observations corrént parfaitement avec la fonction de gène suppresseur de tumeurs imputée à RKIP. En effet, l'expression de RKIP est fortement diminuée dans les lignées cellulaires métastatiques comparativement à celles non métastatiques (Keller, 2004).

1.3.3. MEK

La fonction physiologique de MEK au sein de la voie est de percevoir et d'orchestrer, via phosphorylation, la transmission du signal provenant de RAF et de le transmettre à ERK. MEK est principalement constituée d'un domaine kinase à double spécificité. Sa partie NT contient une séquence NES (Nuclear Export Signal) impliquée dans l'exportation nucléaire et un site d'ancrage pour son substrat favori, ERK. La structure cristalline des formes humaines de MEK1 et MEK2 a été résolue (Ohren et al., 2004). Les études d'inactivation des gènes *mek1* et *mek2* chez la souris ont été réalisées. Le phénotype de *mek1*^{-/-} est létal au cours de l'embryogenèse et démontre des défauts au niveau de la vascularisation du placenta (Giroux et al., 1999). L'inactivation de *mek2* est par contre viable sans aucun phénotype apparent (Belanger et al., 2003). Ces résultats suggèrent que MEK1 possède une fonction distincte et que la fonction de MEK2 peut potentiellement être compensée par celle de MEK1.

L'activation de MEK1 par RAF est accomplie suite à la phosphorylation des résidus Ser218 et Ser222 localisés dans sa boucle d'activation. La régulation de MEK1 ou MEK2 par les différentes isoformes de RAF varie selon la stimulation et le type cellulaire. Par exemple, la forme oncogénique de RAS active de façon préférentielle la voie ERK via

C-RAF et MEK1 dans les NIH 3T3 (Jelinek et al., 1994). Le domaine kinase de MEK se distingue par l'insertion d'une région riche en prolines située entre ses sous-domaines IX et X. Même si cette région n'est pas impliquée au niveau de l'interaction entre RAF et MEK, sa présence est essentielle pour son activation et la transmission du signal (Catling et al., 1995; Dang et al., 1998). Assujettie à une régulation particulière, cette région peut médier des interactions avec d'autres protéines et contient plusieurs sites de phosphorylation. MP1 (Mek Partner 1) et GRB10, deux protéines d'échafaudage de la voie ERK, sont capables de lier cette région (Nantel et al., 1998; Schaeffer et al., 1998). Ces interactions pourraient conduire MEK vers une localisation subcellulaire précise pour y induire l'activation de la voie ERK. De façon surprenante, MEK est le point d'entrée d'une autre voie de signalisation via cette région. En effet, les petites GTPases de type RHO, CDC42 et RAC peuvent transmettre des signaux à la voie ERK par l'entremise de MEK1. Ces effets semblent être transmis par l'effecteur de RAC, PAK, qui est capable de phosphoryler la Ser298 de MEK1 localisée au sein de cette région riche en proline (Frost et al., 1997). Cette phosphorylation influence positivement l'activation de MEK par C-RAF (Coles and Shaw, 2002). Ce mécanisme particulier est aussi utilisé par les voies de transmission provenant des récepteurs aux intégrines. Cependant, le mécanisme d'activation de PAK établi par ces récepteurs se fait par l'entremise des protéines kinases FAK et Src (Slack-Davis et al., 2003).

1.3.4. ERK

1.3.4.1. Mécanismes de régulation et d'activation

ERK1 et ERK2 ont été les premières protéines de type MAPK à être identifiées chez les mammifères. Elles ont été découvertes parce qu'elles deviennent phosphorylées suite à l'activation des RTKs par des facteurs de croissance (English et al., 1999). Leur activité est principalement contrôlée par phosphorylation dans leur boucle d'activation par les MEKs. ERK1 et ERK2 sont exprimées de façon ubiquitaire, mais leur niveau varie selon le type cellulaire. La spécificité et la redondance entre ERK1 et ERK2 ont été évaluées chez la souris. L'inactivation de *erk1* est viable et ne présente que des troubles au

niveau de la maturation des thymocytes. Ces résultats suggèrent que *erk2* complète l'absence de *erk1* (Pages et al., 1999). De l'autre côté, le phénotype *erk2*^{-/-} est létal durant l'embryogenèse, ce qui serait provoqué par un défaut de développement du trophoblaste (Saba-El-Leil et al., 2003). Ces résultats suggèrent que *erk2* est spécifiquement requis durant le développement et que sa fonction n'est pas remplaçable par celle de *erk1*.

1.3.4.1.1. Spécificité de phosphorylation

ERK est capable de phosphoryler une panoplie de substrats distribués à différents endroits dans la cellule. Le type cellulaire et la localisation subcellulaire de ERK peuvent être des critères qui influencent la disponibilité et la spécificité de phosphorylation de ces substrats. Ces derniers sont caractérisés par une séquence minimale de phosphorylation Ser/Thr-Pro reconnue par ERK. La structure cristalline de ERK2 en condition activée et non activée a été résolue, ce qui a permis de mieux comprendre la régulation de l'activation de cette enzyme et le mécanisme de reconnaissance de ses substrats (Canagarajah et al., 1997; Zhang et al., 1994). La phosphorylation des deux résidus dans sa boucle d'activation favorise l'alignement du site actif pour la catalyse et entraîne la formation d'une pochette à la surface de l'enzyme qui est reconnue par la proline de la molécule cible. Cependant, ce motif de reconnaissance n'est pas suffisant pour élaborer un mécanisme de haute spécificité. L'identification d'un site d'interaction secondaire sur ERK, appelé CD (Common Docking), a permis de mettre en lumière comment la spécificité de phosphorylation est précisément régulée (Tanoue and Nishida, 2003). Structuralement opposé au site catalytique, ce motif assure la spécificité d'interaction avec ses différents partenaires fonctionnels. Ce motif CD est caractérisé par la présence d'acides aminés chargés négativement (aspartate et glutamate) (Tanoue et al., 2000). L'identification d'un second motif appelé ED (aspartate et glutamate), a permis de constater que le motif CD n'était pas le seul à influencer la spécificité d'interaction des partenaires de ERK. Structuralement rapprochés, ces deux motifs sont conjointement requis pour édifier une conformation s'apparentant à une pochette d'interaction spécifique (Tanoue et al., 2001). Cette pochette, conservée durant l'évolution, caractérise toutes les protéines de type MAPK et serait requise pour leur fonction physiologique. Chaque acide aminé retrouvé dans cette

pochette contribue à établir une conformation particulière propre à chacune des MAPKs. Cette structure est reconnue par toute une variété de protéines. Par exemple, ERK peut interagir avec MEK1, MKP3 (MAPK Phosphatase 3) et (une MAPKAP (MAPK-Activated Kinase)) par l'intermédiaire de cette pochette (Tanoue et al., 2000). Cependant, ces liaisons sont mutuellement exclusives, régulant ainsi la séquence d'événements de la cascade MAPK (Tanoue and Nishida, 2002). Fait à noter, la mutation gain-de-fonction de ERK chez la Drosophile (*Sevenmaker*), est située dans son domaine CD (Brunner et al., 1994). Cette mutation crée un déséquilibre au niveau de ses partenaires respectifs et semble désavantager le recrutement de phosphatases impliquées dans la régulation négative de ERK (Camps et al., 1998).

Toutes les protéines qui lient les MAPKs via cette pochette d'interaction possèdent en contrepartie un site spécifique de liaison que l'on appelle un domaine d'ancrage (Biondi and Nebreda, 2003). Contrairement au motif CD, ce domaine est principalement composé d'une série d'acides aminés chargés positivement (basiques) entourée d'acides aminés hydrophobes. En général, chez les facteurs de transcription, ce domaine d'ancrage contient également un site LXL pour former ce que l'on appelle le domaine D (ou domaine KIM (Kinase Interaction Motif). La disposition et la distance séparant toutes ces régions permettent de réguler l'affinité et la spécificité d'association du domaine d'ancrage aux différentes MAPKs. Chez les facteurs de transcription, ce domaine est toujours localisé en NT du domaine d'activation transcriptionnel qui contient les sites de phosphorylation par la MAPK. Cette observation suggère que cette organisation fonctionnelle fait partie d'un mécanisme de régulation commun qui assure l'activation spécifique des facteurs de transcription par les MAPKs. Certains facteurs de transcription et protéines de signalisation possèdent également un domaine d'interaction additionnel appelé le motif FXFP, qui est spécifiquement reconnu par ERK (ou domaine DEF) (Jacobs et al., 1999). Ce motif, toujours situé en aval des sites de phosphorylation potentiels de ERK, participe à la spécificité de phosphorylation (Fantz et al., 2001). La région nécessaire à la liaison de ce domaine sur ERK n'a cependant pas encore été identifiée. Conformément au domaine D, la disposition et la distance de la séquence FXFP par rapport aux sites de phosphorylation contribuent à générer la spécificité pour les protéines de type MAPK (Sharrocks et al.,

2000). Cependant, l'association des MAPKs avec certaines protéines via ces domaines d'interaction n'est pas uniquement utilisée pour promouvoir la phosphorylation. À titre d'exemple, la protéine d'échafaudage JIP-1 (JNK Interacting Protein-1) recrute JNK par l'intermédiaire de son domaine d'ancrage et induit la formation d'un complexe multiprotéique rapprochant les membres de la cascade JNK (Whitmarsh et al., 1998).

1.3.4.1.2. Localisation subcellulaire

La relocalisation subcellulaire de ERK est un critère important dans la mise en place d'une réponse physiologique adéquate. En condition non stimulée, ERK est majoritairement cytoplasmique. En réponse à différents stimuli, l'activation de la voie induit sa translocation au noyau. Cette relocalisation est un événement essentiel pour contrôler l'activation de facteurs de transcription particuliers et par conséquent, l'exécution de divers processus cellulaires (Brunet et al., 1999). L'activation de la voie ERK entraîne entre autres la régulation de facteurs de transcription de la famille AP-1 (activating protein-1) et TCFs (ternary complex factors) (Pearson et al., 2001). La rétention de ERK dans le cytoplasme est assurée par différentes protéines. Les phosphatases MKP-3 et PTP-SL (Protein Tyrosine Phosphatase SL), deux enzymes qui inactivent ERK par déphosphorylation, sont impliquées dans la rétention de ERK2 dans le cytoplasme (Blanco-Aparicio et al., 1999; Karlsson et al., 2004). Ce phénomène de rétention cytoplasmique peut également être accompli par MEK, lequel possède une séquence d'exclusion nucléaire dans sa partie NT (Fukuda et al., 1996). Après stimulation, la phosphorylation de ERK par MEK occasionne la dissociation de ce complexe et permet à ERK de transiter au noyau (Fukuda et al., 1997). Les études ont permis de proposer trois mécanismes plausibles de relocalisation nucléaire. Le premier consiste en une translocation passive de la forme monomérique de ERK (Adachi et al., 1999). Le second résulte du transport actif de la forme dimérique de ERK en utilisant la petite GTPase RAN et les importines (Adachi et al., 1999). Il a été montré chez la Drosophile que ERK pouvait interagir avec l'importine DIM-7. Cette dernière est importante pour induire la relocalisation active de ERK au noyau (Lorenzen et al., 2001). La dimérisation de ERK est nécessaire à sa relocalisation par transport actif (Cobb and Goldsmith, 2000; Khokhlatchev et al., 1998). Le dernier

mécanisme de translocation nucléaire consiste en une interaction directe entre ERK et le complexe des pores nucléaires (Matsubayashi et al., 2001).

Une fois au noyau, sa rétention nécessite la présence d'une protéine d'ancrage qui est synthétisée uniquement suivant l'activation soutenue de la voie (Lenormand et al., 1998). Le recyclage de ERK dans le cytoplasme est médié par MEK grâce à sa séquence d'exportation nucléaire. Cette relocalisation dépend cependant de l'inactivation préalable de ERK, puisque MEK ne reconnaît que la forme non phosphorylée (Adachi et al., 2000). L'inactivation de ERK est réalisée grâce aux MKPs ((MAP) kinase phosphatases). Ces phosphatases à double spécificité sont requises pour déphosphoryler les résidus de la boucle d'activation de ERK et par conséquent inhiber son activité catalytique (Farooq and Zhou, 2004; Keyse, 2000). Ces enzymes sont spécifiquement régulées même si certaines d'entre elles possèdent la capacité de déphosphoryler plusieurs protéines de types MAPK (Saxena and Mustelin, 2000). MKP1 et MKP2 sont induites par exemple suivant l'activation de la voie ERK (Brondello et al., 1997). L'activité catalytique de MKP3 est quant à elle stimulée suite à son association à ERK (Camps et al., 1998).

Suivant son activation, ERK peut dans certains cas être séquestrée dans le cytoplasme pour favoriser l'activation de ses effecteurs cytosoliques. En effet, il a été montré que certaines protéines d'échafaudage comme SEF1 (Similar Expression to FGF Genes) et β -arrestin en ont la capacité (voir section sur les protéines d'échafaudage de la voie ERK, page 48) (Tohgo et al., 2002; Torii et al., 2004). PEA-15 (Phosphoprotein Enriched in Astrocytes 15), une molécule également capable de lier ERK, peut empêcher sa translocation au noyau, prévenant ainsi l'induction de la transcription et la prolifération des astrocytes. Elle contient, au même titre que MEK, une séquence d'exclusion nucléaire qui assure sa localisation cytoplasmique par un mécanisme de transport actif (Formstecher et al., 2001). PEA-15 pourrait également être impliquée dans la sénescence des fibroblastes humains (Gaumont-Leclerc et al., 2004).

1.3.4.2. Fonctions biologiques

La voie ERK est impliquée dans la régulation de plusieurs processus cellulaires. Les réponses biologiques élaborées suite à l'activation de la voie entraînent la phosphorylation de différents substrats à différents endroits de la cellule. La plupart du temps, ces événements se répercutent sur la modulation de la transcription de gènes particuliers dans le but d'assurer la mise en place d'une réponse appropriée.

La croissance et la prolifération cellulaire sont des processus principalement contrôlés par les niveaux d'activation de la voie ERK. Cette régulation s'effectue entre autres par l'induction de l'expression de la cycline D1, laquelle constitue l'une des premières molécules exprimées lors de la progression du cycle cellulaire de la phase G1 à S (Lavoie et al., 1996 JBC). ERK peut aussi agir par des mécanismes indépendants de la transcription en affectant par exemple, la synthèse des nucléotides (Graves et al., 2000).

La participation de la voie ERK dans les mécanismes de différenciation de plusieurs types cellulaires a également été démontrée. Par exemple, la stimulation des cellules PC12 avec le NGF (Nerve Growth Factor) induit la différenciation neuronale par un mécanisme qui requiert la voie ERK (Marshall, 1995).

Un autre phénomène biologique important où la voie ERK joue un rôle indispensable est la survie cellulaire. Par exemple dans la lignée cellulaire phéochromocytome PC12, la privation du ligand NGF mène à l'inhibition de la voie ERK et à l'activation des mécanismes d'apoptose (Xia et al., 1995). La voie ERK régule certaines composantes possédant la capacité d'influencer adéquatement la balance entre les signaux proapoptotique et antiapoptotique (Ballif and Blenis, 2001). Par exemple, la sérine/thréonine kinase Rsk, une MAPKAP qui peut être phosphorylée et activée par ERK, est notamment impliquée dans la promotion de la survie cellulaire. En effet, Rsk (p90 Ribosomal s6 kinase) est capable de phosphoryler BAD, une molécule proapoptotique, et d'interférer dans son mécanisme d'action (Bonni et al., 1999). Une évidence supplémentaire montrant l'implication de Rsk se rattache à son habileté à phosphoryler le

facteur de transcription CREB (cAMP Responsive Element Binding protein) qui induit la transcription de molécules favorisant la survie cellulaire (Bonni et al., 1999).

1.3.5. Spécificité du module RTK/RAS/ERK

Les RTKs ont la capacité de réguler plusieurs processus biologiques. Il a été montré que la voie de signalisation ERK est essentielle à l'exécution de plusieurs de ces processus. Des études récentes ont tenté par conséquent d'identifier les mécanismes moléculaires qui permettent à la voie ERK d'élaborer une réponse spécifique suivant l'activation d'un RTK donné (Pouyssegur et al., 2002; Simon, 2000; Tan and Kim, 1999). Il a été remarqué que l'amplitude et la durée d'activation de la voie pouvaient entraîner une réponse cellulaire adéquate. Cette observation provient entre autres de travaux effectués dans les cellules PC12 qui montrent qu'une activation transitoire de la voie ERK par le RTK EGF entraîne la prolifération tandis qu'une activation soutenue par le NGF induit la différenciation cellulaire (Marshall, 1995; Schaeffer and Weber, 1999). Cette différence d'activation est entre autres contrôlée par l'intégration d'une nouvelle voie de signalisation indépendante de RAS qui converge vers RAF. La caractérisation des différentes isoformes de RAF suite à l'activation des RTKs EGF et NGF a permis d'éclaircir ces mécanismes. En fait, le récepteur NGF, contrairement à l'EGF, est capable de stimuler de façon soutenue l'activité kinase de B-RAF (Wixler et al., 1996). Cette nouvelle voie d'activation requiert la PKA (dépend de l'AMPc) et la petite GTPase RAPI. Cette dernière est capable d'inhiber C-RAF, mais stimule de façon soutenue la voie ERK en s'associant à B-RAF (Ohtsuka et al., 1996; Vossler et al., 1997; York et al., 1998). Ces études ont par le fait même permis d'élucider le comportement associé à l'activation de la voie ERK par l'AMPc dans différentes lignées cellulaires. Certaines lignées démontrent une inhibition, alors que d'autres, comme dans les PC12, affichent une stimulation. Cette différence s'expliquerait par la présence de B-RAF dans ces lignées cellulaires. Lorsque B-RAF est présent, l'activation de la voie par l'AMPc est possible. Cependant, lorsque B-RAF n'est pas présent, RAPI exerce un effet négatif sur C-RAF et bloque la voie (Houslay and Kolch, 2000). Les recherches sur la différenciation des PC12 ont permis d'observer que la voie ERK coordonne et intègre une voie parallèle (indépendante de RAS), affectant ainsi la

transmission du signal et la spécificité d'une réponse cellulaire (Schaeffer and Weber, 1999).

1.4. Les protéines d'échafaudage

De façon générale, les protéines d'échafaudage servent de plates-formes pour l'assemblage de complexes multiprotéiques en liant simultanément plusieurs protéines, facilitant ainsi la transmission d'un signal (Pawson and Scott, 1997). Présentement, une grande partie des recherches s'attardent à analyser leurs rôles dans la régulation des voies de signalisation intracellulaires. Plusieurs questions demeurent encore inexplicées concernant la fonction qu'elles exercent et les mécanismes de régulation auxquels elles sont soumises. Les prochaines lignes traitent des différentes hypothèses et découvertes qui ont été effectuées afin d'élucider le fonctionnement de ces protéines (Burack and Shaw, 2000; Vondriska et al., 2004).

1.4.1. Fonction

Tout d'abord, il est important de mentionner que la caractérisation des mécanismes de transmission des signaux chez *S. cerevisiae* a permis pour la première fois de mettre en évidence la participation d'une protéine d'échafaudage au sein d'une cascade de signalisation. Il s'agit de la protéine Ste5 (Elion, 2001). Cette molécule a été décrite comme étant essentielle à la transmission des signaux au sein de la voie assurant la reproduction (Bardwell, 2004). Cette voie de signalisation fait partie de l'une des six cascades de type MAPK que l'on retrouve chez la levure. Ces voies contrôlent différents processus tels la sporulation, l'invasion/filamentation, l'intégrité cellulaire et la réponse aux stress osmotiques (Gustin et al., 1998). Le mécanisme de reproduction chez la levure est régulé par la fixation d'une phéromone à un récepteur de type GPCR. L'activation du récepteur entraîne la dissociation du complexe formé d'une protéine G hétérotrimérique ($\alpha/\beta\gamma$). STE5 est capable d'interagir avec le complexe $\beta\gamma$, STE11 (MAPKKK), STE7 (MAPKK) et FUS3 (MAPK) afin de coordonner cette voie (Feng et al., 1998; Marcus et al., 1994; Printen and Sprague, 1994; Pryciak and Huntress, 1998) (Figure 1.4). La caractérisation d'une autre protéine d'échafaudage chez la levure a permis de mieux

comprendre la fonction de ces molécules au sein des cascades de signalisation. La protéine PBS2 est une MAPKK qui fonctionne au sein de la voie assurant la réponse aux stress osmotiques et possède la capacité d'interagir avec différentes composantes de cette voie. En fait, PBS2 s'associe à SHO1, une protéine membranaire qui détecte les variations osmotiques du milieu environnant. PBS2 peut également interagir avec STE11 (MAPKKK) et HOG1 (High Osmolarity Glycerol 1) (MAPK) (Posas and Saito, 1997; Whitmarsh and Davis, 1998) (Figure 1.4). Ces deux molécules ont été des références dans les études permettant de définir le comportement des protéines d'échafaudage au sein des voies de signalisation intracellulaires.

Les recherches suggèrent fortement que les protéines d'échafaudage pourraient faciliter le rapprochement des molécules. Cette hypothèse a d'ailleurs été vérifiée biochimiquement en utilisant une forme de STE5 caractérisée par une mutation dans son domaine de liaison à la MAPKKK STE11. Évidemment, cette mutation entraîne une déficience dans l'activation de la voie responsable de la reproduction chez la levure. Pour contourner ce défaut, le rapprochement des deux molécules a été accompli par l'ajout d'un domaine de liaison alternatif de part et d'autre des molécules. Cette reconstitution permet de restaurer substantiellement le défaut de signalisation associé à la perte de l'interaction STE5/STE11 et de recouvrir l'activation de FUS3 (Park et al., 2003). Cette étude démontre bien que le rapprochement entre les membres d'une même cascade de kinases par l'intermédiaire des protéines d'échafaudage peut faciliter la transmission du signal (Ferrell and Cimprich, 2003; Ptashne and Gann, 2003).

Les protéines d'échafaudage permettent également de prévenir le chevauchement entre les voies de signalisation, ce qui par conséquent assure l'établissement d'une réponse spécifique. En effet, elles agissent comme isolant en empêchant certaines composantes partagées par différentes voies de signalisation, d'être activées inadéquatement. Par exemple, STE11 est capable de lier les protéines d'échafaudage STE5 et PBS2 de façon indépendante (Figure 1.4). Afin de montrer comment ces interactions permettent d'engendrer de la spécificité, des protéines de fusion STE11/STE5 et STE11/PBS2 ont été générées. L'association forcée de STE11 avec STE5 favorise une activation de la voie

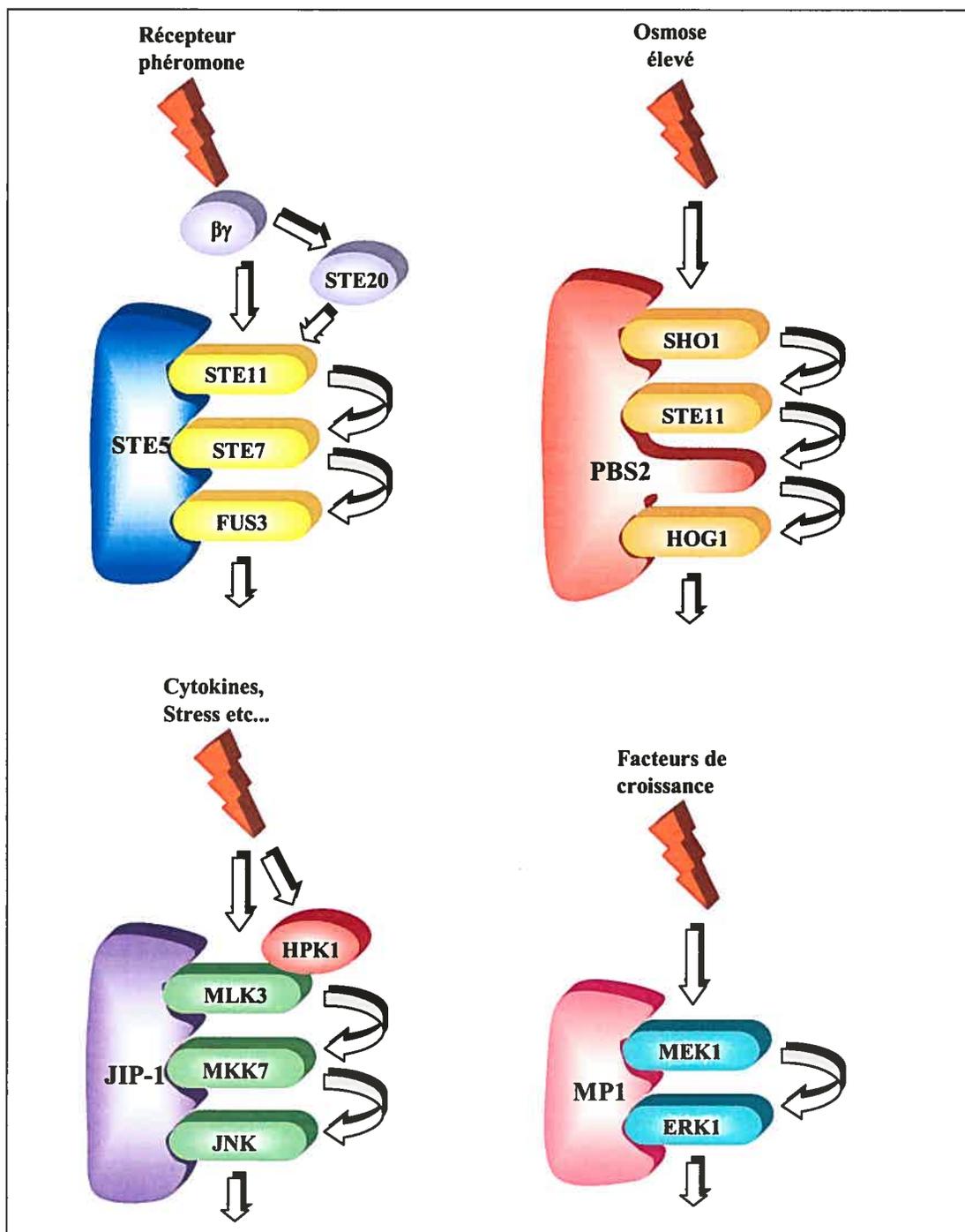


Figure 1.4 Représentation schématique des protéines d'échafaudage appartenant aux différentes voies de signalisation de type MAPK.

reliée à la reproduction sans toutefois induire la réponse osmotique. La liaison STE11/PBS2 à l'inverse favorise la réponse osmotique au détriment de la reproduction. De par ces interactions, STE11 est confinée à phosphoryler spécifiquement les substrats qui lui sont exposés et incite l'engagement d'une réponse biologique précise. De plus, ces phénomènes sont inhérents aux protéines d'échafaudage et ne requièrent aucun signal en amont (Harris et al., 2001).

Plusieurs protéines de signalisation contiennent leur propre séquence de localisation intracellulaire. Toutefois, certaines dépendent de leur association préalable à une protéine d'échafaudage donnée pour assurer leur ciblage intracellulaire particulier. Par exemple, MP1 est une protéine d'échafaudage de la voie ERK qui recrute MEK1 et ERK1 dans les endosomes tardifs (Teis et al., 2002; Wunderlich et al., 2001) (Figure 1.4). La paxillin recrute, quant à elle, le module ERK aux sites d'adhésion focaux (Ishibe et al., 2003). Il est à noter que les protéines d'ancrage appartiennent à la famille des protéines d'échafaudage. Leur fonction est directement reliée au ciblage intracellulaire des protéines avec lesquelles elles interagissent (la plupart des kinases), favorisant ainsi l'efficacité de la propagation du signal en les plaçant à proximité de leurs substrats. Ces protéines regroupent, entre autres, les AKAPs (A Kinase Anchor Proteins) et RACKs (Receptors for Activated C-Kinase) qui agissent respectivement sur les protéines kinases PKA et PKC (Pawson and Scott, 1997; Smith and Scott, 2002).

Certaines évidences suggèrent l'implication des protéines d'échafaudage dans l'activation des protéines kinases avec lesquelles elles interagissent. Ces protéines d'échafaudage pourraient être impliquées dans la régulation allostérique de ces kinases (Vondriska et al., 2004). Par exemple, une étude démontre que l'activation de p38 α peut être induite suite à son association à la protéine d'échafaudage TAB1 (TAK1 Binding protein 1) et ce, indépendamment de ses activateurs MKK3 et MKK6 (Ge et al., 2002). TAB1 pourrait également agir de manière similaire sur la MAPKKK TAK1 (Sakurai et al., 2000). De plus, au même titre que TAB1, STE5 ne serait pas une simple protéine d'échafaudage passive. En effet, les recherches proposent qu'elle pourrait agir directement sur l'activation de la MAPKKK STE11 avec laquelle elle interagit (Elion, 2001).

Tel que mentionné auparavant, l'activation de la voie de signalisation ERK s'effectue spontanément à la manière d'un commutateur (Ferrell and Machleder, 1998; Huang and Ferrell, 1996). Les prémisses qui appuient ce phénomène ne sont pas en accord avec la fonction suggérée exercée par les protéines d'échafaudage. Par exemple, elles limitent la diffusion aléatoire des différentes composantes de la voie de signalisation ERK. Également, la phosphorylation non processive de ERK par MEK est contrecarrée par les protéines d'échafaudage qui favorisent, en contrepartie, la réaction processive en maintenant à proximité les enzymes et leurs substrats (Levchenko et al., 2000). La fonction des protéines d'échafaudage ne semble pas non plus favoriser l'amplification des cascades de signalisation. Cet énoncé est cependant basé sur une seule étude réalisée chez la *Drosophile* qui utilise la cascade de phototransduction impliquant la protéine d'échafaudage INAD (Inactivation No Afterpotential D) (Scott and Zuker, 1998). Cette dernière interagit avec la PLC, la PKC et les canaux ioniques TRP (Transient Receptor Potential), permettant ainsi la transmission du signal en réponse à l'induction de la rhodopsine par un photon lumineux (Tsunoda et al., 1997; Tsunoda and Zuker, 1999). La compréhension de la fonction des protéines d'échafaudage au sein de ces mécanismes reste à être déterminée.

1.4.2. Régulation

Les protéines d'échafaudage sont régulées afin d'assurer l'accomplissement de leur fonction au sein des voies de signalisation. Un aspect important de cette régulation concerne leur niveau d'expression. La variation du niveau d'expression des protéines d'échafaudage, au sein d'une cascade de signalisation, a été évaluée grâce à des modèles mathématiques. Ces expériences ont permis de suggérer que les protéines d'échafaudage ont la capacité d'augmenter la transmission du signal seulement si elles ne sont pas en excès (Bray and Lay, 1997; Levchenko et al., 2000). Des études biochimiques ont également permis d'observer ce comportement. En effet, il a été remarqué que la surexpression des protéines d'échafaudage entraîne une inhibition de la signalisation intracellulaire. Plusieurs études ont montré que la surexpression de ces protéines ne reflétait pas précisément leur rôle *in vivo*. Par exemple, la protéine JIP-1, qui facilite la signalisation de la voie JNK en a initialement été caractérisée comme régulateur négatif

(Dickens et al., 1997; Whitmarsh et al., 1998). Cette protéine d'échafaudage a la capacité d'interagir avec plusieurs composantes de la voie dont MLK3, MKK7 et JNK (Figure 1.4). Parallèlement, la surexpression de KSR et de IKAP (I- κ B Kinase complex-Associated Protein), deux protéines d'échafaudage régulant respectivement les voies ERK et NF- κ B, inhibent la transmission des signaux (Cacace et al., 1999; Cohen et al., 1998). Cet effet est appelé inhibition combinatoire. L'augmentation du niveau de concentration de la protéine d'échafaudage renverse l'équilibre stoechiométrique qui est normalement établi avec ses partenaires, probablement en séquestrant les protéines du complexe indépendamment les unes des autres (Vondriska et al., 2004). Il est à noter que la concentration des protéines associées à la protéine d'échafaudage est tout aussi critique puisqu'elles ont également la capacité d'interagir les unes avec les autres. Par conséquent, les recherches proposent que l'activation des voies de signalisation via les protéines d'échafaudage est une question d'équilibre et que trop ou pas assez de chacun des membres peut affecter le taux de signalisation (Ferrell, 2000).

Les protéines d'échafaudage sont aussi régulées par modifications post traductionnelles. Ces modifications, qui souvent corrént avec l'activation des voies de signalisation, semblent être directement impliquées dans la régulation de ces protéines. La phosphorylation sur résidus sérine/thréonine ou tyrosine est l'une des modifications fréquemment observées qui influence positivement ou négativement la fonction de ces protéines. Dans certains cas, la phosphorylation entraîne une augmentation des interactions de la protéine d'échafaudage avec ses partenaires. Par exemple, le recrutement de ERK sur paxillin, une molécule d'échafaudage au site d'adhésion focal, est contrôlé par Src via phosphorylation en tyrosine suite à l'activation du RTK HGF (Ishibe et al., 2003). JIP3 est quant à elle phosphorylée par la MAPKKK ASK1. Cette phosphorylation est essentielle à l'établissement de la fonction de JIP3 puisqu'elle stimule les interactions avec ses partenaires MKK4, MKK7 et JNK3 (Matsuura et al., 2002).

Plusieurs mécanismes de régulation additionnels ont été observés au sein des différentes protéines d'échafaudage. La dimérisation, la relocalisation subcellulaire et le clivage protéolytique en sont des exemples (Kelkar et al., 2000; Mahanty et al., 1999; Yablonski et al., 1996; Yasuda et al., 1999).

1.5. Les protéines d'échafaudage de la voie ERK

Plusieurs protéines d'échafaudage participant au sein de la voie de signalisation RAS/ERK ont été caractérisées. Elles sont pour la plupart hautement conservées durant l'évolution. Les prochaines sections expliquent leurs fonctions respectives (Morrison and Davis, 2003; Whitmarsh and Davis, 1998).

1.5.1. KSR

KSR a initialement été isolée à partir de cribles génétiques RAS-dépendent chez *D. melanogaster* et *C. elegans* (Kornfeld et al., 1995; Sundaram and Han, 1995; Therrien et al., 1995). Par homologie de séquence, KSR a ensuite été identifiée dans plusieurs organismes et s'apparente aux kinases de type RAF (Therrien et al., 1995). Cette molécule est exprimée de façon ubiquitaire et comprend une forme spécifique au cerveau, B-KSR1, issue de l'épissage alternatif (Cacace et al., 1999; Giblett et al., 2002; Muller et al., 2000). KSR est composée de cinq domaines conservés (CA1-CA5). La région CA1, formée de 40 acides aminés, est unique à KSR. Le domaine CA2 est une région riche en prolines, alors que le domaine CA3 est riche en résidus cystéines (CRD). Le domaine CA4 comporte plusieurs résidus sérines et thréonines et le domaine CA5, situé en CT, correspond à un domaine kinase (Figure 1.5). Chez les mammifères, la lysine invariable du sous-domaine II, impliquée dans la réaction du phosphotransfert, est en fait une arginine. Cette propriété porte à croire que KSR puisse être dépourvue d'activité catalytique (Therrien et al., 1995). KSR ne possède aucun domaine RBD alors que son domaine CRD est structuralement distinct de celui de RAF (Zhou et al., 2002).

Chez la souris, le K.-O. de *ksr* (*ksr*^{-/-}) est viable sans aucun phénotype apparent. Néanmoins, une atténuation significative de la prolifération des cellules T et de l'activation de la voie ERK a été observée. Les souris KSR^{-/-} sont également caractérisées par la capacité d'inhiber la formation des tumeurs induite par une forme oncogénique de RAS (RAS^{V12}) (Lozano et al., 2003; Nguyen et al., 2002; Xing et al., 2003). Chez les mammifères, il semble y avoir une seconde isoforme de KSR, suggérant la possibilité d'une

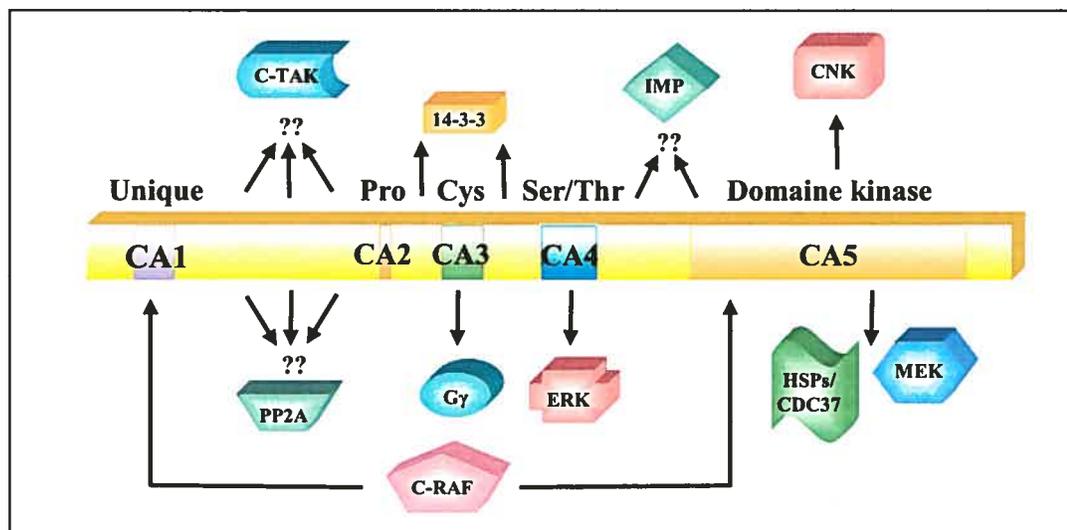


Figure 1.5 Représentation schématique de la structure de KSR et de ses différents partenaires protéiques.

redondance fonctionnelle entre ces isoformes (aucune étude n'a cependant été effectuée sur cette dernière). Du fait, chez *C. elegans*, le K.-O. des deux isoformes de *ksr* est requis pour obtenir un phénotype létal, validant ainsi cette possibilité (Ohmachi et al., 2002).

Les études génétiques et biochimiques chez la Drosophile ont montré que KSR est requise en aval des RTKs à l'insuline, SEV (Sevenless) et TORISO, lesquels sont reconnus pour activer la voie RAS/ERK (Anselmo et al., 2002; Roy et al., 2002; Therrien et al., 1995). De plus, sa fonction serait requise en aval de RAS, mais en amont ou en parallèle de RAF. Depuis sa découverte, certains groupes prétendent que KSR possède une activité kinase alors que d'autres décrivent KSR comme une molécule d'échafaudage (Kolesnick and Xing, 2004; Morrison, 2001; Roy and Therrien, 2002). En effet, certaines études suggèrent que l'activité kinase de KSR est stimulée par le récepteur EGF ou les cytokines (Grassme et al., 2001; Kolesnick and Xing, 2004; Xing et al., 2000; Zhang et al., 1997). KSR, ainsi activée, phosphoryle RAF sur sa Thr269, participant dès lors à son processus d'activation (Wang and Studzinski, 2001; Xing et al., 2004; Xing and Kolesnick, 2001). Plusieurs groupes n'ont par contre jamais réussi à reproduire ces résultats (Denouel-Galy et al., 1998; Michaud et al., 1997; Muller et al., 2000; Stewart et al., 1999). D'ailleurs, des mutations dans KSR qui normalement abolissent l'activité d'une kinase sont capables de compléter chez *C. elegans* un phénotype causé par une perte de fonction de KSR (Stewart et al., 1999). D'autres travaux proposent plutôt que KSR agit comme protéine d'échafaudage en permettant le recrutement de plusieurs membres de la voie ERK pour faciliter la transmission des signaux (Muller et al., 2000; Nguyen et al., 2002; Roy et al., 2002; Stewart et al., 1999) (Figure 1.5). Entre autres, le domaine kinase de KSR interagit avec MEK de manière constitutive (Cacace et al., 1999; Denouel-Galy et al., 1998; Yu et al., 1998). Des recherches ont montré que cette interaction est fonctionnellement requise puisque plusieurs mutations dans KSR, issues des cribles génétiques, abolissent cette association (Muller et al., 2000; Roy et al., 2002; Stewart et al., 1999). Ces études ont également montré que cette association était responsable de l'inhibition de la voie ERK suivant la surexpression de KSR (Denouel-Galy et al., 1998; Johnson et al., 1998; Sugimoto et al., 1998; Yu et al., 1998). Cette propriété a par le fait même été utilisée dans le but d'élaborer des cribles génétiques chez la Drosophile (Huang and Rubin, 2000;

Therrien et al., 2000). Les autres membres du complexe qui interagissent avec le domaine kinase de KSR sont les protéines HSP70, HSP90 et CDC37. Ces protéines pourraient avoir un effet sur la stabilité de KSR (Ory et al., 2003; Stewart et al., 1999) (Figure 1.5).

Après stimulation, KSR est recrutée à la membrane via son domaine CRD (Michaud et al., 1997). Même si ce domaine est capable d'interagir entre autres avec la sous-unité γ de la petite protéine G, aucune autre interaction impliquant un lipide n'a été rapportée (Bell et al., 1999) (Figure 1.5). KSR est capable d'interagir avec RAF de façon inductible à la membrane et cette interaction semble dépendre de son domaine kinase (Therrien et al., 1996; Xing et al., 1997). Toutefois, chez la Drosophile, l'association semble constitutive et nécessite également l'intégrité du domaine CA1 de KSR. Ces études suggèrent fortement que la fonction de KSR est de coordonner le rapprochement de RAF à son substrat MEK, pour faciliter la transmission du signal (Roy et al., 2002). La régulation de la localisation intracellulaire de KSR nécessite des interactions avec plusieurs protéines dont 14-3-3, C-TAK1 (CDC25C-Associated Kinase 1), PP2A, IMP (Impedes Mitogenic signal Propagation), mais aussi des événements de phosphorylation et de déphosphorylation (Ory and Morrison, 2004; Raabe and Rapp, 2003) (Figure 1.5). De façon similaire à RAF, KSR est capable d'interagir avec les protéines chaperonnes de type 14-3-3 afin de stabiliser sa conformation inactive par l'intermédiaire des phosphosérines Ser297 et Ser392 (Cacace et al., 1999; Muller et al., 2001; Stewart et al., 1999; Volle et al., 1999; Xing et al., 1997) (Figure 1.5). La phosphorylation de la Ser392 est assurée par la kinase C-TAK1 qui est capable de s'associer de manière constitutive à KSR (Muller et al., 2001) (Figure 1.5). Nm23-H1, une kinase impliquée dans la suppression des métastases, est également capable d'interagir avec KSR et de phosphoryler sa Ser392 (Hartsough et al., 2002; Salerno et al., 2005). KSR peut interagir avec la sérine/thréonine phosphatase PP2A. Cette dernière, de manière inductible, peut déphosphoryler la Ser392 pour favoriser la relocalisation de KSR à la membrane (Ory et al., 2003). Récemment, un nouvel effecteur de RAS-GTP, IMP, a été identifié comme partenaire de KSR. IMP est capable de réguler négativement la voie ERK en limitant la formation d'un complexe RAF/MEK par la séquestration de KSR dans un compartiment cellulaire Triton-insoluble. Après activation, RAS recrute IMP et stimule sa dégradation via sa propre activité E3 ligase pour permettre à KSR d'exercer sa fonction sur

le module ERK (Matheny et al., 2004; Ory and Morrison, 2004). Les études proposent que l'ouverture de KSR entraîne l'exposition de son domaine CA4 (région riche en sérines et thréonines). Situé dans cette région, le motif FXFP serait dévoilé, permettant alors le recrutement de ERK (Cacace et al., 1999; Jacobs et al., 1999; Muller et al., 2000). Ainsi, KSR pourrait participer à la transmission des signaux en favorisant la phosphorylation séquentielle entre RAF/MEK/ERK. ERK peut aussi phosphoryler KSR, mais le motif de cet événement n'est pas encore compris (Cacace et al., 1999).

Récemment, la fonction de KSR au sein du complexe KSR/RAF/MEK a davantage été caractérisée dans notre laboratoire (Douziech et al., 2005, manuscrit en préparation). En fait, KSR ne serait pas une simple protéine d'échafaudage, elle participerait activement au processus d'activation de RAF. Ce mécanisme encore mal définis requiert non seulement une association entre CNK NT et le domaine catalytique de KSR, il dépend également d'une nouvelle protéine principalement composée d'un domaine SAM appelée HYP (Hyphen) (voir Figure 1.5). Cette dernière assure le recrutement de KSR au domaine SAM de CNK. D'un point de vue moléculaire, il semble que CNK NT puisse, suivant l'intégration d'un signal RAS, moduler l'activité de KSR par l'intermédiaire d'un changement allostérique. KSR ainsi stimulée pourrait à son tour activer le domaine kinase de RAF également via un changement conformationnel (Douziech et al., 2005, manuscrit en préparation).

1.5.2. CNK

CNK a été identifiée lors d'un crible génétique dépendant de KSR chez *D. melanogaster* (Therrien et al., 1998). Différents homologues ont par la suite été identifiés chez *A. gambiae*, *C. elegans* et l'humain (CNK1-2-3). Le gène *cnk2* (ou *MAGUIN* [Membrane-Associated GUanylate Kinase-INteracting protein] chez le rat) encode deux transcrits résultant d'un épissage alternatif, soit *cnk2A* et *2B* (*maguin-1* et *-2*) (Lanigan et al., 2003; Yao et al., 1999). Le gène *cnk3* correspond à deux ESTs situés sur le même chromosome et séparés par 100 kb (CNK3A et CNK3B/PIP3-E) (Douziech et al., 2003; Krugmann et al., 2002).

Les homologues de CNK ont tous une architecture similaire (Figure 1.6). Ils contiennent tous un domaine SAM (Schultz et al., 1997), un domaine PDZ (Nourry et al., 2003) et un domaine PH (Lemmon and Ferguson, 2000). Une région de 80 acides aminés très conservée, située entre les domaines SAM et PDZ, a permis de définir une nouvelle région appelée CRIC (conserved region in CNK). Une délétion de trois acides aminés dans cette région, identifiée lors d'un crible génétique chez *D. melanogaster*, a montré son importance fonctionnelle (Therrien et al., 1998). CNK possède aussi des régions riches en prolines ainsi que des tyrosines situées au sein de sites consensus pour la liaison de domaines SH2.

Les premières analyses génétiques réalisées chez la Drosophile à l'aide d'allèles mutants de CNK ont permis de démontrer qu'elle avait un rôle important dans plusieurs processus dépendants des RTKs, telles la différenciation, la prolifération et la survie cellulaire. Sa fonction au sein de la voie ERK se situe en aval de RAS, mais en amont ou en parallèle de RAF (Therrien et al., 1998). Simultanément, des études biochimiques ont montré que la déplétion de CNK par la ARNi dans plusieurs systèmes de cellules en culture (Drosophile et mammifères), empêche l'activation de la voie ERK par les RTKs SEV, NGF et à l'insuline (Anselmo et al., 2002; Bumeister et al., 2004; Douziech et al., 2003).

Les premières études ont montré que CNK avait la capacité d'interagir avec RAF et ont proposé qu'elle pourrait agir comme protéine d'échafaudage dans la voie RAS/ERK (Therrien et al., 1998). Des études génétiques et biochimiques de surexpression ont permis de mieux caractériser sa fonction. La surexpression de la partie NT de CNK (SAM+CRIC+PDZ) dans l'oeil de la Drosophile augmente le phénotype d'oeil rugueux causé par RAS^{V12} contrairement à la partie CT (Therrien et al., 1999). Ces observations ont aussi été remarquées dans un essai d'activation de la voie ERK sur des cellules en culture (Douziech et al., 2003). Ces résultats suggèrent que la partie NT intègre positivement des signaux RAS alors que la partie CT inhibe le flux de signalisation de la voie ERK. L'intégration d'un signal RAS nécessite ses domaines SAM et CRIC. Cet effet fonctionnel, situé entre RAS et RAF, pourrait réguler directement la fonction intrinsèque de RAF et promouvoir l'activation de la voie ERK (Douziech et al., 2003; Therrien et al., 1999) (Figure 1.6).

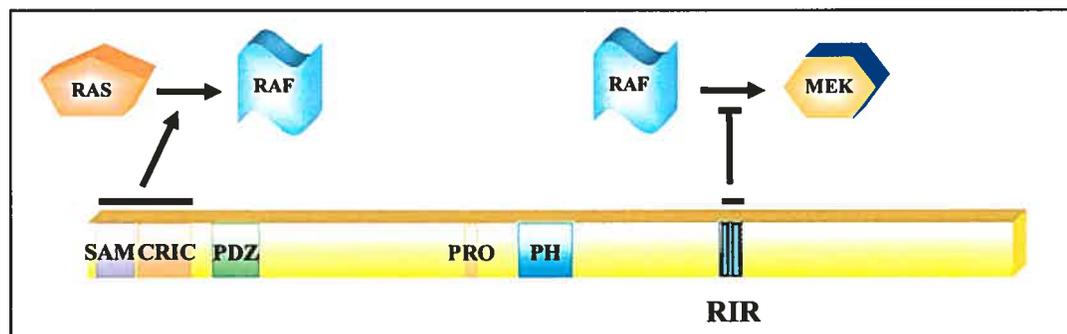


Figure 1.6 Représentation schématique de la structure de CNK et de ses différents comportements au sein de la voie ERK.

D'un autre côté, l'effet inhibiteur de CNK CT est situé entre RAF et MEK et semble prévenir la phosphorylation de MEK par RAF (Douziech et al., 2003) (Figure 1.6). CNK interagit directement avec le domaine kinase de RAF et cette association semble être conservée chez la plupart des homologues (Lanigan et al., 2003; Rabizadeh et al., 2004; Therrien et al., 1998; Yao et al., 2000). CNK de *Drosophile* contient une région appelée RIR (Raf Inhibitory Region) d'environ 40 acides aminés qui constitue la séquence minimale requise pour exercer l'effet inhibiteur (Figure 1.6). Cette région est formée de deux motifs appelés RIM (RAF-Interacting Motif) et IS (Inhibitory sequence) corequis pour l'effet inhibiteur de CNK. Le motif RIM est essentiel pour l'interaction avec RAF. Le RIR pourrait agir comme pseudosubstrat en inhibant l'activité kinase de RAF (Douziech et al., 2003).

Chez les mammifères, différentes observations suggèrent que CNK pourrait participer dans la régulation de différentes voies de signalisation en aval des petites GTPases. Par exemple, CNK semble posséder la capacité de réguler la voie RAL. En effet, il a été observé que CNK pouvait interagir avec RAL et l'une de ses GEFs, Rlf (RALGDS-like factor) (Jaffe et al., 2004; Lanigan et al., 2003). La voie de signalisation RHO semble également être influencée par CNK. En effet, CNK1, via son domaine PH, a la capacité d'interagir avec une forme constitutivement activée de RHOA (RHOA^{L63}). Du point de vue fonctionnel, CNK1 est impliquée dans la régulation de la transcription RHOA spécifique de type SRF (Serum Response Factor) (Jaffe et al., 2004; Lopez-Illasaca et al., 2005). Une autre étude a également démontré l'implication de CNK1 dans l'activation de la voie JNK par RHO et qu'elle est capable d'interagir avec deux GEFs de type RHO et des composantes de la voie JNK, soit MLK2, MLK3 et MKK7 (Jaffe et al., 2005).

CNK aurait aussi la capacité de réguler l'apoptose de concert avec l'effecteur de RAS appelé Nore1 (Novel RAS effector 1). En effet, CNK1 interagit avec RASSF1A (RAS association domain family 1A gene), une molécule adaptatrice ayant le potentiel d'hétérodimériser avec Nore1 pour induire l'apoptose (Rabizadeh et al., 2004). Finalement, la forme de rat de CNK, MAGUIN, a été identifiée comme partenaire des protéines S-SCAM (Synaptic Scaffolding Molecule), PSD95 (Postsynaptic Density protein

of 95 kDa) et Densin-180 (Ohtakara et al., 2002; Yao et al., 1999). Ces études suggèrent que CNK puisse jouer un rôle dans la formation des complexes protéiques localisés à la jonction post synaptique des neurones (Ohtakara et al., 2002; Yao et al., 1999).

1.5.3. Autres

SUR-8 a été identifiée dans des cribles génétiques chez *C. elegans* (Selfors et al., 1998; Sieburth et al., 1998). SUR-8, qui est un régulateur positif de la voie, est principalement formée de motifs riches en leucines fonctionnant en aval de RAS, mais en amont ou en parallèle de RAF. SUR-8 interagit avec RAS et ce, indépendamment de son activité GTPase (Sieburth et al., 1998). En surexpression, SUR-8 coopère avec RAS^{V12} pour stimuler la voie ERK. Elle possède également la capacité d'interagir avec RAF. Certaines analyses suggèrent que SUR-8 puisse augmenter l'interaction RAS-RAF pour favoriser la transmission des signaux (Li et al., 2000).

MP1 a été identifiée comme partenaire de MEK1 dans un crible double hybride chez la levure. MP1 est une petite protéine de 13,5 kDa qui interagit sélectivement avec MEK1 et ERK1. Des études biochimiques montrent que MP1 favorise spécifiquement le rapprochement de ces deux composantes pour faciliter la transmission des signaux dans la cascade ERK (Schaeffer et al., 1998). L'association entre MP1 et ERK1 varie selon le signal contrairement à son association à MEK1 (Sharma et al., 2005). Le complexe MP1/MEK1/ERK1 est localisé, par l'intermédiaire d'une petite protéine appelée p14, à la surface externe des endosomes tardifs (Wunderlich et al., 2001). La présence de MP1 et de p14 est essentielle pour l'activation de la voie ERK1 après stimulation à l'EGF. p14, de par sa capacité à recruter le complexe MP1/MEK1/ERK dans les endosomes tardifs, permet de compartimentaliser l'activation de la voie ERK (Teis et al., 2002). Cette particularité régulerait la signalisation à partir des récepteurs internalisés.

SEF est une protéine transmembranaire initialement identifiée chez le poisson zèbre. Sa fonction serait d'antagoniser la signalisation FGF en aval ou en parallèle de MEK. L'induction de sa transcription est positivement régulée par la signalisation FGF, suggérant ainsi un mécanisme de rétroinhibition potentiel (Furthauer et al., 2002; Tsang et al., 2002).

Une autre étude a montré que SEF pouvait également bloquer l'activation de la voie RAS/ERK en interagissant avec le récepteur FGFR1 (Kovalenko et al., 2003; Tsang et al., 2002). Ces deux résultats suggèrent donc que SEF peut moduler négativement la voie ERK à plusieurs niveaux. Or, la caractérisation de l'inhibition MEK par la forme humaine de SEF a permis de proposer qu'elle pouvait également agir comme protéine d'échafaudage. En effet, SEF est capable de lier conjointement MEK et ERK. Cette interaction inhibe la dissociation du complexe MEK/ERK en les retenant principalement au Golgi. La translocation de ERK au noyau est ainsi bloquée sans que son activité kinase ne soit affectée. Cette compartimentalisation favorise plutôt la phosphorylation de substrats cytoplasmiques. Par conséquent, SEF contrôle spécifiquement la localisation du complexe MEK/ERK (Torii et al., 2004).

MEKK1 a originellement été identifiée par similarité de séquence avec STE11, son homologue chez la levure (Lange-Carter et al., 1993). MEKK1 est une sérine/thréonine kinase constituée d'une longue région régulatrice en NT (Xu et al., 1996). Les premières études de surexpression montrent que MEKK1 est capable d'activer les voies JNK, p38 et ERK (Lange-Carter et al., 1993; Minden et al., 1994; Xu et al., 1996). Par la suite, les études ont établi que son activité était principalement requise pour l'activation de la voie JNK (Minden et al., 1994; Yan et al., 1994; Yujiri et al., 1998). Son rôle au sein de cette voie a d'ailleurs été confirmé en utilisant les cellules MEKK1^{-/-}. L'activation de la voie ERK par le sorbitol, le sérum et le LPA (Lysophosphatidic acid) dans ces mêmes cellules, est également diminuée. Ces résultats suggèrent donc que la fonction de MEKK1 est requise non seulement dans la voie JNK, mais aussi dans la voie ERK (Yujiri et al., 1998). Or, MEKK1 peut interagir avec RAF-1, MEK1 et ERK2 et pourrait donc agir comme protéine d'échafaudage de la voie ERK (Karandikar et al., 2000). Le mécanisme moléculaire par lequel MEKK1 facilite la transmission des signaux de cette voie n'est pas connu. Néanmoins, des analyses *in vitro* montrent que MEKK1 peut phosphoryler MEK1 sur les mêmes résidus que son activateur naturel RAF (Gardner et al., 1994; Yan and Templeton, 1994). L'hypothèse est que MEKK1, en tant que protéine d'échafaudage, pourrait contrôler l'activation spécifique des voies JNK et ERK dans le but de maintenir un équilibre dynamique entre un signal apoptotique et un signal de survie cellulaire en réponse

aux stress. Par exemple, l'induction de l'apoptose par une stimulation soutenue au sorbitol entraîne l'activation de la voie ERK pour ensuite induire sa dégradation par le protéasome. Cette dégradation est directement assurée par l'activité E3 ligase de MEKK1 (Lu et al., 2002). En effet, l'abolition de l'interaction entre MEKK1 et ERK, prévient sa dégradation de même que l'induction de l'apoptose (Lu et al., 2002). Ces résultats suggèrent que dans la phase initiale, les deux voies (ERK et JNK) permettent de répondre au stress adéquatement, par contre si le stress est maintenu, la survie cellulaire médiée par la voie ERK est régulée négativement, permettant ainsi à la cellule d'entrer en apoptose.

La β -arrestin est une molécule impliquée dans la régulation de la signalisation en aval des GPCRs (récepteurs couplés aux protéines G). Sa fonction très versatile est essentielle au niveau de la désensibilisation et de l'internalisation des récepteurs de même que dans la modulation des voies de signalisation p38, JNK et ERK. Suite à l'activation des GPCRs, β -arrestin est recrutée à la membrane, laquelle peut s'associer directement à ces récepteurs (Lefkowitz and Whalen, 2004; Shenoy and Lefkowitz, 2003). Il existe un réseau complexe de signalisation menant à l'activation de la voie ERK en aval des GPCRs (Luttrell, 2003). β -arrestin peut agir comme protéine d'échafaudage pour relier les GPCRs à l'activation de la voie ERK. En effet, suite à l'activation du récepteur PAR2 (protease-activated receptor 2), β -arrestin-1 interagit avec RAF1 et ERK1/2 dans les vésicules internalisées (DeFea et al., 2000). De façon similaire, la stimulation du récepteur AT1aR (Angiotensine II type 1a Receptor) permet de recruter le complexe formé par la β -arrestin-2, C-RAF, MEK1 et ERK2 dans les vésicules endosomales (Luttrell et al., 2001). Ces études suggèrent que l'endocytose du complexe β -arrestin-récepteur peut être étroitement reliée dans le contrôle de l'activation de la voie ERK. En effet, suite à l'activation du récepteur AT1aR, β -arrestin inhibe la translocation nucléaire de ERK, favorisant ainsi la phosphorylation de ses substrats dans le cytoplasme (Tohgo et al., 2002). Par conséquent, ce complexe peut influencer les processus physiologiques associés à l'activation de la voie ERK par ces récepteurs (DeFea et al., 2000; Luttrell et al., 2001; Tohgo et al., 2003).

Paxillin est principalement formée de domaines susceptibles de médier des interactions protéine-protéine. Située au site d'adhésion focal, lieu où les intégrines sont

engagées avec la matrice extracellulaire, paxillin possède un rôle critique dans la signalisation en aval des molécules d'adhésion et de certains RTKs. Paxillin favorise l'assemblage de complexes multiprotéiques et permet d'établir un lien entre ces récepteurs et la réorganisation du cytosquelette via la régulation de l'activité des petites GTPases de type RHO (Brown and Turner, 2004). Plus particulièrement, paxillin est capable de réguler la signalisation en aval du RTK HGF. Ce dernier est impliqué dans la morphogenèse des cellules épithéliales de par sa capacité à induire l'étalement cellulaire, la migration et la formation des tubules. Ces événements requièrent entre autres l'activation de la voie ERK (Fincham et al., 2000). Paxillin semble agir comme protéine d'échafaudage en interagissant avec RAF, MEK et ERK. Suite à l'activation du récepteur HGF (Hepatocyte Growth Factor), Src phosphoryle paxillin dans un site d'ancrage consensus de type FXFP dans le but d'induire le recrutement de ERK (Ishibe et al., 2003). Lorsque le complexe est formé, le module ERK est activé directement sur paxillin et permet à ERK de phosphoryler à son tour paxillin, régulant ainsi l'association paxillin-FAK. Cette tyrosine kinase est impliquée, entre autres, dans l'activation des petites GTPases qui régulent la réorganisation du cytosquelette (Ishibe et al., 2004; Liu et al., 2002).

GIT1 (GRK-interactor 1) a initialement été identifiée par double hybride comme partenaire de GRK2 (Premont et al., 1998). GIT1 fait partie d'une famille de protéines formée de GIT1/CAT-1 et de GIT2/CAT-2/PKL/KIAA0148 (Bagrodia et al., 1999; Premont et al., 1998; Premont et al., 2000; Turner et al., 1999). Ces protéines possèdent une activité GAP et peuvent réguler les GTPases de type ARF, lesquelles sont impliquées dans la régulation du transport vésiculaire et de l'actine cytosquelettique (Vitale et al., 2000). GIT1 et GIT2 sont impliquées dans l'endocytose des GPCRs et des RTKs (Premont et al., 1998; Premont et al., 2000). GIT1 est également impliquée dans la formation de complexes protéiques aux sites d'adhésion focaux via son interaction avec paxillin. Ces complexes sont composés des protéines PIX (PAK-Interacting exchange factor)/PAK, NCK, FAK dans le but de réguler la motilité cellulaire aux sites d'adhésion focaux (Bagrodia et al., 1999; Premont et al., 2000; Turner et al., 1999; West et al., 2001; Zhao et al., 2000). L'activation de la voie ERK par Src nécessite la présence de GIT. En effet, la surexpression de GIT1 prolonge l'activation de la voie tandis que sa déplétion

l'inhibe. Le comportement de GIT1 s'apparente à celui des protéines d'échafaudage de la voie ERK. GIT1 interagit constitutivement avec MEK. La phosphorylation de GIT1 par Src est nécessaire pour l'activation de la voie ERK, cependant la conséquence moléculaire de cet événement demeure inconnue (Yin et al., 2004). GIT1 pourrait être impliquée dans la localisation et/ou dans l'activation du module ERK aux sites d'adhésion focaux.

MORG1 (MAPK Organizer 1) est une protéine principalement formée de domaines WD-40. Elle a été identifiée dans un crible à double hybride chez la levure comme partenaire de MP1. MORG1 est capable d'interagir avec RAF, MEK1, ERK1 et MP1. Sa surexpression augmente l'activation de la voie ERK lorsque les cellules sont stimulées au FBS (Fetal Bovine Serum). MORG1 semble donc être une nouvelle protéine d'échafaudage de la voie ERK (Vomastek et al., 2004).

LSP1 (Lymphocyte-Specific Protein 1) est une protéine du cytosquelette capable de lier l'actine et d'interagir avec MEK1, KSR et ERK2. Cette association permettrait à LSP1 de moduler la voie ERK (activation plus tardive) et de cibler spécifiquement le complexe ERK au niveau des filaments d'actine (Cao et al., 2001; Harrison et al., 2004).

1.6. SFKs

La famille des SFKs intègre des signaux provenant de plusieurs récepteurs et régule une variété impressionnante de processus biologiques, telles la prolifération, la différenciation, la mobilité et l'adhésion cellulaire (Parsons and Parsons, 2004; Thomas and Brugge, 1997). Le premier membre de cette famille à avoir été caractérisé est l'oncogène rétroviral (v-Src) qui provient du RSV (Rous Sarcoma virus) (Martin, 2004). Plusieurs protéines kinases possédant une structure similaire ont par la suite été identifiées chez les mammifères et constituent les membres de la famille des SFKs : Src, Fyn, Yes, Lyn, Hck, Lck, Fgr, Blk et Yrk (Thomas and Brugge, 1997). Ces dernières peuvent être divisées selon leur expression. Src, Fyn et Yes sont ubiquitairement exprimées alors que les autres membres de la famille semblent plutôt être exprimés au niveau des cellules du système hématopoïétique. Les membres des SFKs sont très conservés à travers les espèces et possèdent tous un arrangement de domaines fonctionnels similaires (Figure 1.7) (Boggon

and Eck, 2004). Ces protéines sont myristoylées en NT (certaines sont palmitoylées) et sont principalement associées à la surface interne de la membrane plasmique. En NT, elles possèdent une région unique spécifique à chacun des membres des SFKs. Elles contiennent également des domaines de liaison SH3 et SH2 suivis d'un domaine à activité tyrosine kinase. L'autophosphorylation de la tyrosine invariable (Tyr 416) (la numérotation des acides aminés utilisée provient de la séquence de Src chez le poulet), située dans la boucle d'activation du domaine kinase, est nécessaire pour l'activation complète de Src. La queue CT possède une tyrosine (Tyr 527) qui est importante pour leur régulation négative. Il a été observé que l'expression de Src est souvent augmentée dans différents cancers et plus particulièrement ceux du côlon où des mutations oncogéniques ont d'ailleurs été identifiées (Frame, 2002; Yeatman, 2004).

1.6.1. Structure tridimensionnelle

Afin d'élucider le mécanisme moléculaire qui régule les membres de la famille des SFKs, la structure tridimensionnelle des formes autoinhibées chez l'humain (Src, Hck) et le poulet (Src) a été générée (Sicheri et al., 1997; Williams et al., 1997; Xu et al., 1997). Ces études démontrent que dans sa conformation inactive, Src est autorégulée par des interactions intramoléculaires médiées par ses domaines SH2 et SH3. Ces domaines sont structurellement repliés sur le domaine kinase (du côté opposé au site actif), réprimant ainsi son activité catalytique. Plus précisément, le domaine SH2 lie la phospho-Tyr527 et le domaine SH3 interagit avec une portion du segment qui relie le domaine SH2 au domaine kinase appelé le « linker » (Figure 1.7) (Roskoski, 2004). Ce dernier contient une séquence qui forme une hélice polyproline de type II. Il contient également des résidus qui peuvent interagir avec le N-lobe du domaine kinase. La conformation du domaine catalytique est comparable à celle de la PKA. La plus grande différence s'observe au niveau de la position de l'hélice αC . Celle-ci adopte une structure particulière qui est complètement incompétente à l'alignement des acides aminés essentiels à la catalyse. Deux acides aminés invariables de l'hélice αC (Glu310 et la Lys295) sont désorientés et ne peuvent former une interaction nécessaire à l'alignement de l'ATP. L'ensemble des interactions

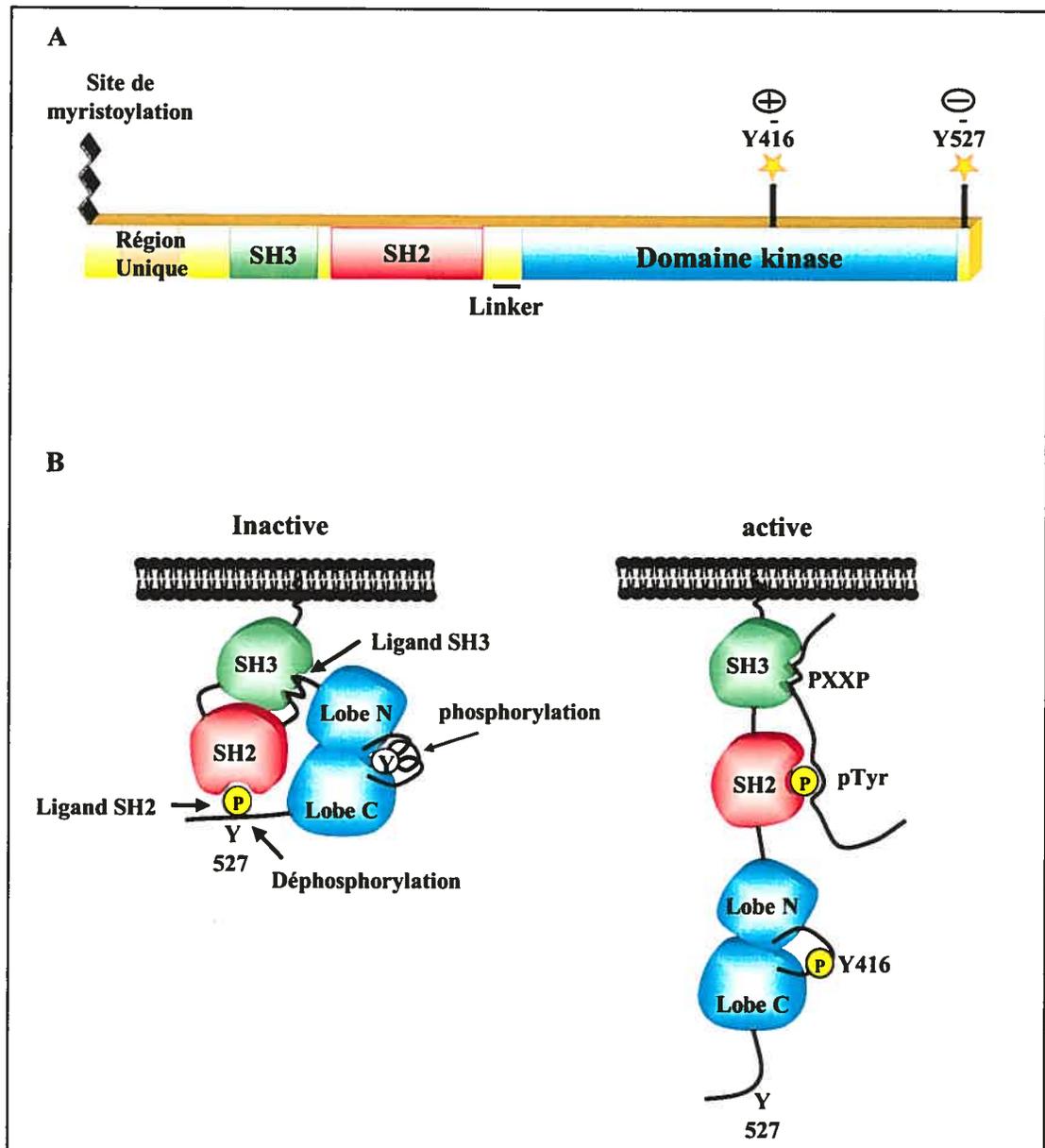


Figure 1.7 A : Représentation schématique de structure de c-Src. Les étoiles représentent les différents sites de phosphorylation positif (416) et négatif (527). B : Représentation schématique du mécanisme d'activation de Src.

intramoléculaires stabilise le domaine catalytique dans une conformation inactive et empêche la phosphorylation de la boucle d'activation ainsi que la liaison de substrats (Boggon and Eck, 2004).

La conformation adoptée par les domaines SH3 et SH2 de Src a été observée dans d'autres protéines tyrosine kinases. La protéine Abl (Abelson kinase), qui possède un arrangement structurel similaire aux SFKs, en est un exemple. Même si Abl ne contient pas de phosphotyrosine dans sa partie CT, sa structure cristalline a montré que son groupement myristoylé en NT contribue à l'auto-inhibition en liant une poche hydrophobe située dans le C-lobe (Harrison, 2003). Étonnamment, la structure cristalline active de Src a également révélé la présence d'une telle poche hydrophobe, supportant l'hypothèse d'une régulation par la liaison de son groupement myristoylé (Cowan-Jacob et al., 2005).

1.6.2. Mécanismes d'activation et de régulation

L'oscillation entre l'état inactif et actif de Src peut être influencée par différents facteurs. D'après les études structurales, les domaines régulateurs forment des interactions intramoléculaires qui participent au maintien de l'état inactif de la kinase. L'engagement de ces domaines suivant la fixation de partenaires pourrait relâcher ces contraintes exercées sur le domaine kinase (Boggon and Eck, 2004) (Figure 1.7). La protéine Nef (Negative Factor) provenant du HIV-1 (Human Immunodeficiency Virus-1), par exemple, possède une haute affinité pour le domaine SH3 de Hck. La liaison entre ces protéines stimule l'activité kinase de Hck (Moarefi et al., 1997). Plusieurs protéines possédant des phosphotyrosine qui ont de l'affinité pour le domaine SH2 de Src peuvent également compétitionner et prévenir l'association intramoléculaire de ce domaine avec la Tyr527. De façon comparable, la délétion de la Tyr527 caractéristique de la forme v-Src du RSV lui permet de se comporter comme un oncogène, suggérant ainsi que cette région est essentielle pour la stabilisation d'une conformation inactive. La régulation de l'interaction du domaine SH2 avec la Tyr527 dépend de sa phosphorylation préalable par la tyrosine kinase Csk (CT Src kinase). Cette réaction peut cependant être négativement régulée par une phosphatase. Plusieurs phosphatases ont d'ailleurs été identifiées telles que PTP- α ,

PTP- λ , SHP-1 (SH2 Inositol 5-Phosphatase 1), SHP-2, PTP1B et CD45 (Bjorge et al., 2000). Les études cristallographiques suggèrent que le désengagement des domaines régulateurs sur le domaine kinase pourrait désordonner le segment d'activation et exposer la Tyr416 pour qu'elle puisse être phosphorylée. Cette phosphorylation permettrait de stabiliser la conformation active et favoriserait la création d'une plate-forme pour la liaison de substrat (Xu et al., 1999). L'autophosphorylation de cette tyrosine est un événement intermoléculaire, c'est-à-dire qu'elle se déroule en *trans* entre deux molécules de Src (Cooper and MacAuley, 1988). D'ailleurs, il a été démontré que ses domaines SH3 et SH2 pouvait former des dimères (Eck et al., 1994).

1.6.3. Les SFKs chez la Drosophile

Deux gènes homologues aux SFKs de mammifères ont été identifiés chez *D. melanogaster*, soit *Src64* et *Src42* (Simon et al., 1985; Takahashi et al., 1996). Il a été démontré que la fonction de *Src64* est requise durant la morphogenèse des canaux en forme d'anneaux durant l'oogenèse (Dodson et al., 1998). Ces canaux permettent à l'oocyte, qui est transcriptionnellement inactif, de recevoir des cellules nourricières avoisinantes tout le matériel nécessaire pour l'embryogenèse précoce. La morphogenèse de ces canaux nécessite des réarrangements de l'actine cytosquelettique qui sont dépendants de *Src64* (Dodson et al., 1998).

Src42 constitue l'homologue le plus rapproché des SFKs. L'analyse de sa fonction dans différents tissus et à différents stades du développement suggère qu'il possède la capacité de moduler la différenciation des photorécepteurs, mais également d'altérer les jonctions cellule-cellule et l'assemblage de l'actine cytosquelettique (Takahashi et al., 1996). De façon surprenante, des données génétiques suggèrent que *Src42* possède un rôle négatif en aval des RTKs chez la Drosophile (Lu and Li, 1999; Therrien et al., 1998).

1.7. Organismes modèles

Les études sur la signalisation intracellulaire ont rapidement progressées grâce aux études utilisant les modèles animaux *D. melanogaster* et *C. elegans*. Ces organismes sont

particulièrement intéressants du fait qu'ils sont faciles à manipuler génétiquement et que les mécanismes moléculaires qui assurent leur développement sont très bien caractérisés. La réalisation de plusieurs cribles génétiques de concert avec le séquençage de leur génome a permis de démontrer que plusieurs voies de signalisation intracellulaires, dont la voie RAS/ERK, sont très conservées au sein de ces animaux (Adams et al., 2000). La plupart des membres de ces cascades de signalisation sont représentés par une seule isoforme comparativement aux mammifères où plusieurs protéines peuvent souvent exécuter la même fonction. Cette observation corrobore le fait que ces organismes possèdent une moins grande complexité ce qui facilite ainsi l'étude des différents mécanismes de transmission des signaux au sein de ces voies (Morrison et al., 2000).

Chez la *Drosophile*, plus de 178 gènes sont homologues aux 287 gènes associés à des maladies chez l'humain (Bernards and Hariharan, 2005). Il devient donc très intéressant d'étudier ces gènes et de tenter d'élaborer des cribles génétiques qui permettront d'identifier de nouveaux gènes associés à ces maladies (St Johnston, 2002). Plusieurs cribles génétiques utilisant l'œil de la *Drosophile* ont été élaborés afin de caractériser la voie RAS/ERK chez la *Drosophile* et ont permis d'identifier de nouvelles protéines. Le développement de cet organe est un processus hautement régulé par différentes voies de signalisation intracellulaires (Voas and Rebay, 2004). L'œil adulte est composé d'environ 800 unités structurales appelées ommatidies. Chaque ommatidie est composée de huit photorécepteurs (R1 à R8) et d'une douzaine de cellules non neuronales accessoires. La différenciation des photorécepteurs commence au troisième stade larvaire après qu'une constriction apicale, appelée le sillon morphogénétique, ait traversé le disque de l'œil en partant de la région postérieure vers la région antérieure. Ce processus enclenche le recrutement et la différenciation successive de chacun des photorécepteurs en commençant par le R8, suivi du R2/5, R3/4, R1/6 et du R7. La différenciation des photorécepteurs (sauf le R8) est assurée par des signaux provenant de ceux déjà différenciés et requiert entre autres la stimulation du récepteur à l'EGF (EGFr). Toutefois, contrairement aux photorécepteurs R1 à R6, la différenciation du R7 requiert l'activation d'un second RTK, soit *Sevenless* (Mollereau and Domingos, 2005). L'activation de ces RTKs entraîne la mise en place du processus de différenciation par l'entremise de la voie de signalisation

RAS/MAPK. La surexpression de certaines composantes de cette voie (forme activée ou perte de fonction) peut faire varier le nombre de photorécepteurs, se traduisant ainsi par l'apparition d'un œil d'apparence rugueux. Différents cribles génétiques ont été effectués afin d'identifier de nouvelles composantes capables de modifier soit positivement, soit négativement ce phénotype.

La spécification de la différenciation de la vulve chez *C. elegans* constitue également un processus biologique dépendant de la voie RAS/MAPK et du RTK EGF (LET-23). Plus particulièrement, son développement se fait à partir de trois des six cellules précurseurs totipotentes qui reçoivent un signal de la cellule d'ancrage (ligand EGF) et vont se différencier adéquatement pour former les structures de la vulve centrale et latérale. Les autres cellules vont former de l'épiderme. Comme chez la Drosophile, le phénotype de la vulve peut être modulé suite à l'augmentation ou la diminution du flot de signalisation de la voie RTK/RAS/ERK, permettant ainsi l'élaboration de crible génétique (Chang and Sternberg, 1999; Moghal and Sternberg, 2003).

1.8. Objectifs de la thèse

Un crible génétique chez la Drosophile a permis d'identifier CNK, une nouvelle composante positive qui participe à la signalisation de la voie RAS/MAPK (Therrien et al., 1998). CNK contient plusieurs domaines impliqués dans des interactions protéine-protéine, ce qui suggère qu'elle puisse agir comme multiadaptateur. Il a été montré que CNK pouvait interagir spécifiquement avec RAF. Elle a également la capacité d'influencer soit positivement, soit négativement la signalisation RAS/MAPK (Douziech et al., 2003; Therrien et al., 1998). De plus, la coexpression de CNK avec une forme activée du RTK SEV (SEV^{S11}) induit sa phosphorylation sur des résidus tyrosines (Therrien et al., 1998). Ces résultats suggèrent que la fonction de CNK pourrait être régulée par phosphorylation suite à l'activation des RTKs.

Ces observations forment la base sur laquelle s'appuie notre objectif principal, soit de caractériser les mécanismes moléculaires par lesquels CNK intègre les signaux RTK-dépendants au sein de la voie de signalisation RAS/MAPK. Nous avons premièrement

tenté d'identifier les résidus tyrosines importants pour la phosphorylation de CNK. Deuxièmement, nous avons cherché à démontrer l'importance fonctionnelle et le mode d'action par lequel ces résidus permettent à CNK d'intégrer et de transmettre des signaux RTK-dépendants. Nous avons finalement tenté d'élucider la fonction de Src42 au sein de ces processus.

2. CHAPITRE 2

Article:

Src42 binding activity regulates Drosophila RAF by a novel CNK-dependent de-repression mechanism

Publication dans: EMBO J. 24 (3) 487-498, 2005.

Src42 binding activity regulates Drosophila RAF by a novel CNK-dependent de-repression
mechanism

Gino Laberge, Mélanie Douziech and Marc Therrien¹

Institut de Recherche en Immunologie et en Cancérologie
Laboratory of Intracellular Signaling
Université de Montréal
C. P. 6128 Succursale Centre-Ville, Montreal, PQ Canada H3C 3J7

¹To whom correspondence should be addressed

tel.: (514) 343-7837

fax.: (514) 343-6965

email : marc.therrien@umontreal.ca

Character count: 54,965 (excluding Table 2.1)

Running title: Regulation of RAF activation

Keywords: CNK / MAPK module / RAF/ RAS / SFK

Subject Categories: Signal transduction

2.1. Abstract

CNK, an essential component of *Drosophila* RTK/MAPK pathways, regulates oppositely RAF function. This bimodal property depends on the N-terminal region of CNK, which integrates RAS activity to stimulate RAF and a bipartite element, called the RAF-Inhibitory Region (RIR), which binds and inhibits RAF catalytic activity. Here, we show that the repressive effect of the RIR is counteracted by the ability of Src42 to associate, in an RTK-dependent manner, with a conserved region located immediately C-terminal to the RIR. Strikingly, we found that several *cnk* loss-of-function alleles have mutations clustered in this area and provide evidence that these mutations impair Src42 binding. Surprisingly, the de-repressing effect of Src42 does not appear to involve its catalytic function, but critically depends on the ability of its SH3 and SH2 domains to associate with CNK. Together, these findings suggest that the integration of RTK-induced RAS and Src42 signals by CNK as a two-component input is essential for RAF activation in *Drosophila*.

2.2. Introduction

The mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway is a critical route used by numerous receptor tyrosine kinases (RTKs) to convey proliferation, differentiation and survival signals (for review, see Widmann et al., 1999). At its core, this pathway comprises one isoform of each of the RAF, MEK and ERK/MAPK family of kinases, respectively, which form an evolutionarily conserved signaling unit also referred to as the MAPK module.

Given its position in the module, RAF is the entry point for RTK-induced upstream events. Three RAF proteins exist in mammals, namely, A-RAF, B-RAF and Raf-1/C-RAF, and one member is present in *Drosophila* or *C. elegans* (for review, see Dhillon and Kolch, 2002; Chong et al., 2003). RTK-induced activation of the small GTPase RAS was recognized early on as a critical event in RAF activation. RAS triggers plasma membrane anchoring of RAF through a direct contact between GTP-loaded RAS and RAF. However, this step is insufficient to induce RAF activation, but is a pre-requisite for a complex series of regulatory events. For example, Ste20-like kinases and Src family kinases (SFKs) have been shown to collaborate with RAS in RTK-induced Raf-1 activation, owing to their ability to directly phosphorylate Raf-1 serine 338 (S338) and tyrosine 341 (Y341), respectively. However, these particular events are probably specific to Raf-1 as the equivalent S338 residue in B-RAF is constitutively phosphorylated, whereas the Y341-like residue is not conserved in B-RAF or in *Drosophila* and *C. elegans* RAF. Nonetheless, it remains possible that these kinases use different means to regulate RAF members. This would be consistent with genetic findings in *Drosophila* which suggest that RAF is also regulated by an RTK-induced, but RAS-independent pathway, linked to SFKs (Hou et al., 1995; Li et al., 2000).

In addition to kinases and phosphatases regulating RAF activity, a number of apparently non-enzymatic proteins also modulate RAF function. One of these is Connector eNhancer of KSR (CNK), an evolutionarily-conserved multidomain-containing protein originally identified in a KSR-dependent genetic screen in *Drosophila* (Therrien et al.,

2.2. Introduction

The mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway is a critical route used by numerous receptor tyrosine kinases (RTKs) to convey proliferation, differentiation and survival signals (for review, see Widmann et al., 1999). At its core, this pathway comprises one isoform of each of the RAF, MEK and ERK/MAPK family of kinases, respectively, which form an evolutionarily conserved signaling unit also referred to as the MAPK module.

Given its position in the module, RAF is the entry point for RTK-induced upstream events. Three RAF proteins exist in mammals, namely, A-RAF, B-RAF and Raf-1/C-RAF, and one member is present in *Drosophila* or *C. elegans* (for review, see Dhillon and Kolch, 2002; Chong et al., 2003). RTK-induced activation of the small GTPase RAS was recognized early on as a critical event in RAF activation. RAS triggers plasma membrane anchoring of RAF through a direct contact between GTP-loaded RAS and RAF. However, this step is insufficient to induce RAF activation, but is a pre-requisite for a complex series of regulatory events. For example, Ste20-like kinases and Src family kinases (SFKs) have been shown to collaborate with RAS in RTK-induced Raf-1 activation, owing to their ability to directly phosphorylate Raf-1 serine 338 (S338) and tyrosine 341 (Y341), respectively. However, these particular events are probably specific to Raf-1 as the equivalent S338 residue in B-RAF is constitutively phosphorylated, whereas the Y341-like residue is not conserved in B-RAF or in *Drosophila* and *C. elegans* RAF. Nonetheless, it remains possible that these kinases use different means to regulate RAF members. This would be consistent with genetic findings in *Drosophila* which suggest that RAF is also regulated by an RTK-induced, but RAS-independent pathway, linked to SFKs (Hou et al., 1995; Li et al., 2000).

In addition to kinases and phosphatases regulating RAF activity, a number of apparently non-enzymatic proteins also modulate RAF function. One of these is Connector eNhancer of KSR (CNK), an evolutionarily-conserved multidomain-containing protein originally identified in a KSR-dependent genetic screen in *Drosophila* (Therrien et al.,

1998). Genetic experiments in flies indicated that CNK activity is required downstream of RAS, but upstream of RAF, thus suggesting that CNK regulates RAF activity. In agreement with this interpretation, CNK was found to directly interact with the catalytic domain of RAF and to modulate its function (Therrien et al., 1998; Anselmo et al., 2002; Douziech et al., 2003). The role of CNK, however, is probably not restricted to the MAPK pathway. Indeed, although mammalian CNK proteins have also been found to modulate the RAS/MAPK pathway (Lanigan et al., 2003; Bumeister et al., 2004), recent studies indicated that they also control other events, including membrane/cytoskeletal rearrangement (Bumeister et al., 2004), Rho-mediated SRF transcriptional activity (Jaffe et al., 2004) and RASSF1A-induced cell death (Rabizadeh et al., 2004). Given their ability to influence distinct signaling events, it is possible that CNK proteins act as signal integrators to orchestrate crosstalks between pathways.

Intriguingly, although CNK activity is vital for RAS/MAPK signaling in *Drosophila*, we recently found that it has opposite effects on RAF function (Douziech et al., 2003). A structure/function analysis revealed, on the one hand, that two domains (SAM and CRIC) located in the N-terminal region of CNK are integrating RAS signals enabling RAF to phosphorylate MEK. However, the ability of CNK to associate with the RAF catalytic domain was mapped to a short bipartite element, named the RAF-Inhibitory Region (RIR), that strongly antagonized MEK phosphorylation by RAF. Surprisingly, the RIR exerted its effect even in the presence of RAS signals, hence resulting in lower RAS-induced MAPK signaling output.

Here, we show that the inhibitory effect of the RIR is relieved by an RTK-induced SFK signal. Specifically, we have identified a region located immediately C-terminal to the RIR including tyrosine 1163 (Y1163) that is essential for CNK's positive function *in vivo* and for Sevenless (SEV) RTK-dependent MAPK activation. We found that upon SEV expression, one of the two SFKs found in *Drosophila*, Src42 (Takahashi et al., 1996), associates and mediates, through the Y1163 region of CNK, RTK positive effects on the MAPK module. Remarkably, *cnk* loss-of-function mutations affecting the Y1163 region are fully compensated by inactivation of the RIR, thereby arguing that the Y1163 region is integrating the RTK-induced Src42 signal to counteract the RIR inhibitory function.

Unexpectedly, genetic and molecular evidence revealed that it is not Src42 catalytic function *per se*, but rather its binding capacity that is the key event in this process. Taken together, these results provide compelling evidence that CNK regulates RAF function by integrating both RAS and Src42 signals elicited by an RTK.

2.3. Materials and methods

2.3.1. Plasmids

Copper-inducible flag-tagged FL-CNK, NT-CNK and CT-CNK constructs were described in Therrien et al. (1998). Amino acid positions corresponding to additional CNK constructs are indicated in the text and were generated by standard procedures. CNK^{Y1163F} cDNA was introduced in the *psE* P-element vector to create transgenic lines similar to *P[*sE*-CNK]* (Therrien et al., 1998). For genomic rescue experiments, we assembled in pBlueScript a ~5.5 kb *cnk* genomic fragment extending 875 bp upstream of the first methionine (corresponds to sequences between *cnk* ORF and the first upstream gene) and ending immediately after the STOP codon. ADH 3'UTR sequences were introduced at the 3'-end and a 3XFlag tag was inserted at the first ATG. The engineered *cnk* genomic fragment (*pcnk-cnk*) was then mutagenized to generate desired point mutations. The genomic constructs were either used for expression in S2 cells or the inserts were moved to a P-element vector.

For Src42 constructs, a PCR-generated cDNA was introduced in a copper-inducible vector. A PYO epitope tag was introduced at the C-terminus and then was directed mutagenized to produce the different mutants used in this study. Nterm and Cterm Src42 constructs correspond to amino acid positions 2 to 240 and 224 to 517, respectively. A V5 epitope was introduced at the N-terminus for these two constructs. SH3^m and SH2^m variants had a W100K and R157K replacement, respectively. The SH3 and SH2 domains (WT and mutant versions as above) fused to GST encompassed amino acid position 59 to 128 and 120 to 231, respectively, and were expressed under a copper-inducible promoter.

The Sev^{S11} constructs were described in Therrien et al. (1998), whereas the RAS^{V12} and MAPK constructs were described in Douziech et al. (2003).

2.3.2. Genetics, Molecular Analysis and Histology

Fly culture, crosses and P-element-mediated germ line transformations were conducted according to standard procedures. The *sE-CNK^{WT}* and *RAS^{V12}* transgenic flies were described in Therrien et al., (1998). At least two independent lines were characterized for each construct (*sE-cnk^{Y1163F}* and *cnk* genomic rescue constructs). The *Src42^{l(2)k10108}* allele has a P-element inserted in the 5'UTR of the *Src42* locus which obliterates expression (data not shown).

Molecular characterization of *cnk* and *Src42* alleles (Therrien et al., 2000) was performed essentially as described (Therrien et al., 1998).

Scanning electron microscopy and sectioning of adult *Drosophila* eyes were conducted as described by Wassarman et al. (2000) and by Tomlinson and Ready (1987), respectively. At least three independent eyes were analyzed per genotype.

2.3.3. Cell Culture and Transfections

Plain and stable S2 cell lines were maintained and transfected as described in Roy et al. (2002). Heat-inducible *Sev^{S11}*- and copper-inducible *RAS^{V12}*-expressing stable cell lines were described previously (Therrien et al., 1998; Roy et al., 2002). Unless specified otherwise, *Sev^{S11}* expression (in stable cells or following *hs-Sev^{S11}* transfection) was induced by a 30 min heat-treatment at 37°C and cells were harvested 2 hr later. For *Egfr* activation, an *Egfr*-expressing S2 cell line was stimulated with supernatant from Spitz-secreting cells (Schweitzer et al., 1995). *RAS^{V12}* expression or other copper-inducible expression constructs were induced 48 hr post-transfection by adding 0.7 mM CuSO_4 to the cell medium and cells were harvested 16 hr later. The amount of transfected plasmids were always adjusted among related constructs to obtain similar protein levels. RNAi experiments were conducted essentially as described in Douziech et al. (2003).

2.3.4. Protein Analysis and Antibodies

NP-40 cell lysates were prepared and analyzed either directly or following immunoprecipitation as described in Roy et al. (2002). Sources for α -CNK, α -SEV, α -RAS1, α -pMAPK, α -FLAG, α -PYO, α -MYC and α -HA antibodies have been mentioned in Douziech et al. (2003). α -MAPK and α -pY (clone 4G10) antibodies (Ab) were from Chemicon and USB, respectively, whereas the α -V5 and α -GST antibodies were from Invitrogen and Oncogene Research Products, respectively. α -Src42 and α -Src64 polyclonal antibodies were generously provided by J. Dixon, and the α -Tec29 mAb (clone II9) was a kind gift of S. Beckendorf. Glutathione-sepharose beads were from Amersham Biosciences.

For *in vitro* kinase assays, NP-40 cell lysates were immunoprecipitated using α -CNK or α -PYO (Src42) and immunoprecipitates were washed three times in NP-40 lysis buffer and once in kinase buffer (25 mM Hepes pH7.2, 150 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 5mM MnCl₂, 1 mM DTT and 1mM Na₃VO₄). Kinase reactions were initiated by adding 10 μ Ci of γ ³²P-ATP, 5 μ M ATP and 2 μ g of acid-treated enolase (Roche) and incubated for 20 min at 30°C.

2.4. Results and discussion

2.4.1. Endogenous CNK is Tyrosine-Phosphorylated upon RTK Activation

Co-expression of a CNK construct and activated Sevenless (SEV^{S11}) in S2 cells was previously shown to induce tyrosine-phosphorylation of CNK (Therrien et al., 1998). To assess the specificity of this event, we verified whether endogenous CNK also becomes tyrosine-phosphorylated upon SEV^{S11} expression. As shown in Figure 2.1A (left panel), SEV^{S11}-expression led to sustained tyrosine phosphorylation of endogenous CNK, which paralleled MAPK kinase activation. Similar results were obtained by stimulating the *Drosophila* Egf or Insulin RTKs (Figure 2.1A, center and right panels). Together, these results indicated that CNK is a *bona fide* and common RTK-dependent tyrosine phosphorylation target.

2.4.2. CNK Tyrosine Phosphorylation and Activity Depend on its Y1163 Region

To map the region(s) associated with tyrosine phosphorylation, we transfected S2 cells with SEV^{S11} and various Flag-tagged CNK deletion constructs (Figure 2.1B). A C-terminal (CT) CNK variant was almost as efficiently phosphorylated as full-length (FL) CNK, whereas an N-terminal (NT) CNK protein was three to five times less efficiently phosphorylated (Suppl. Figure 2.1). Because of its apparently greater phosphorylation stoichiometry, we decided to narrow down the region(s) of CT-CNK associated with tyrosine phosphorylation. Five additional CT-CNK truncations (CT1 to CT5, Figure 2.1B) were co-expressed with SEV^{S11} and their respective tyrosine phosphorylation level was determined. These experiments revealed that sequences between amino acid positions 1059 and 1271 are the most critical for CNK tyrosine phosphorylation (Figure 2.1B and Suppl. Figure 2.1).

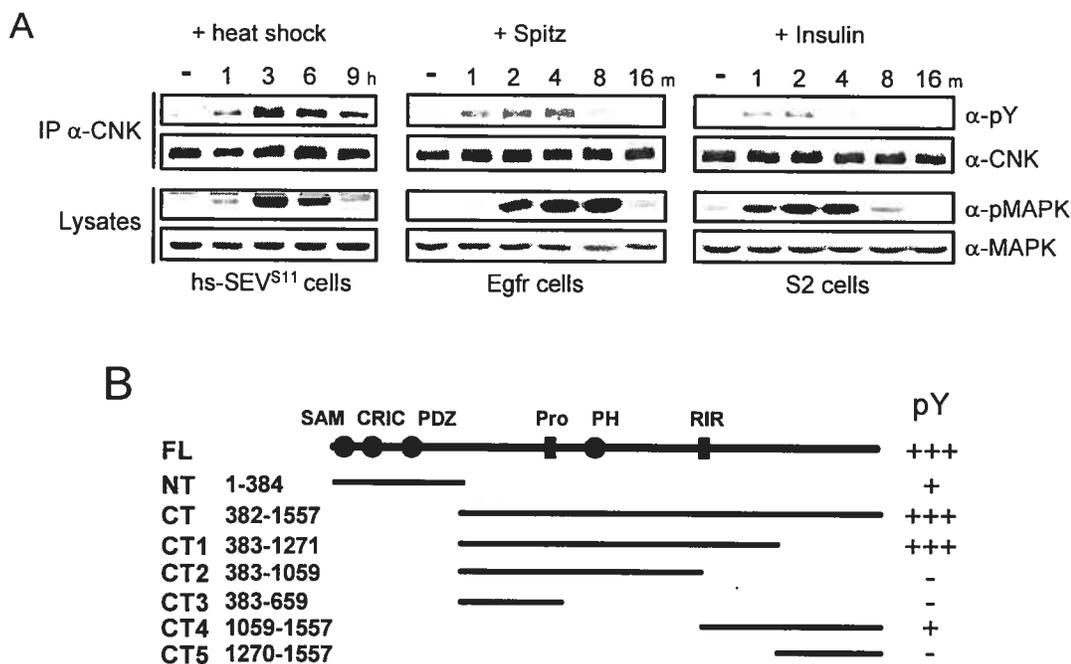
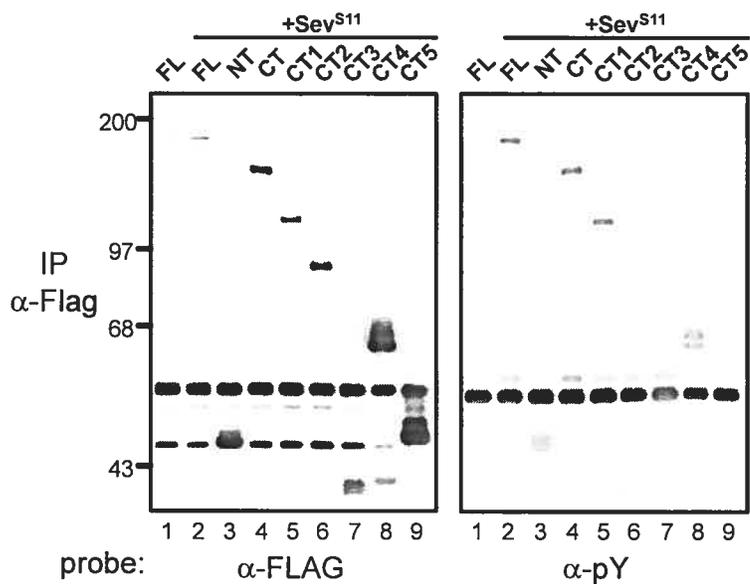


Figure 2.1 Activation of RTKs Induces Tyrosine Phosphorylation of Endogenous CNK.

(A) Stable S2 cells expressing heat-inducible SEV^{S11} (left panel), wild-type Egfr (middle panel), or plain S2 cells (right panel) were stimulated by heat-shock, Spitz or human Insulin (10 μ g/ml), respectively, and harvested at the indicated time (h [hours] or m [minutes]). Total and tyrosine phosphorylated CNK levels were assessed by immunoblots following immunoprecipitation (IP) of endogenous CNK. Total and activated MAPK (pMAPK) levels were determined from cell lysates. Results presented here and thereafter are representative of a least three similar experiments. (B) Schematic (top line) of full-length (FL: 1557 amino acid) CNK and its conserved domains/elements (Douziech et al., 2003). Representations and amino acid position of various Flag-tagged CNK variants are shown below and arbitrary + or - signs to the right indicate their relative SEV^{S11}-dependent phosphorylation levels.



Supplemental Figure 2.1 Mapping of CNK Tyrosine Phosphorylation

CNK constructs shown in Figure 2.1B were transfected (3.5 – 7.5 mg) in S2 cells and expressed for 72 hours. SEVS11 expression was induced in lanes 2 to 9. Cells lysates were immunoprecipitated (IP) using α -Flag. Total and tyrosine phosphorylation levels of the CNK variants were determined using α -Flag (left panel) and α -pY (right panel) antibodies, respectively.

The 1059-1271 area contains three tyrosine residues. Interestingly, these residues are located within a ~90 amino acid stretch that is highly conserved between *D. melanogaster* and *A. gambiae* CNK (Figure 2.2A). The conserved stretch has two other striking features: 1) the first half corresponds to the so-called RAF-Inhibitory Region (RIR) that associates with the kinase domain of RAF and inhibits its catalytic function (Douziech et al., 2003); 2) two previously characterized alleles of *cnk* (*E-1222* and *E-1756*) have amino acid changes within the second half of conservation (Therrien et al., 1998 and Figure 2.2). As these are loss-of-function alleles (Therrien et al., 1998 and data not shown), it suggested that the second half of homology plays a positive role during signaling. During the course of this work, we characterized other *cnk* alleles to identify additional functionally relevant areas. Remarkably, of the eleven alleles that were sequenced, three (one stop codon and two amino acid changes) were specifically found in this area (Figure 2.2A and 2.2B).

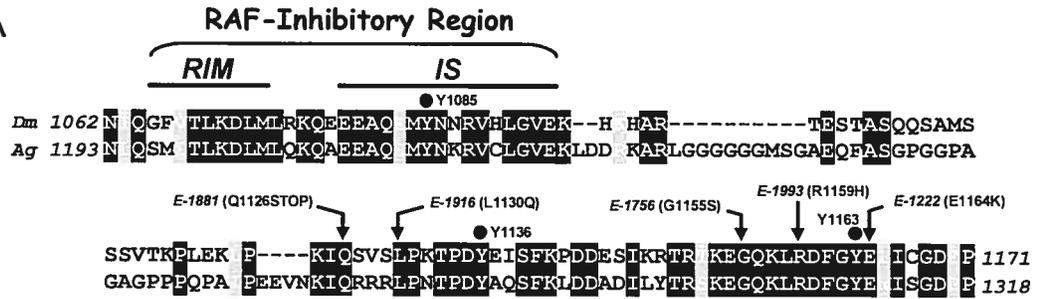
To examine the relevance of each tyrosine within the 1059-1271 area, we independently changed them to a phenylalanine residue and tested their respective impact on SEV^{S11}-induced CNK tyrosine phosphorylation. We also tested CNK variants that carried the mutation found in *cnk*^{*E-1756*} (G1155S) and *cnk*^{*E-1222*} (E1164K). Mutagenesis of the first two tyrosines (Y1085 and Y1136) did not affect phosphorylation (Figure 2.2C, lanes 4 and 5). However, mutation of Y1163 severely decreased it (Figure 2.2C, lane 7), thus identifying Y1163 as a critical residue in this event. Interestingly, the G1155S and E1164K mutations also impaired, albeit to a lesser degree, CNK phosphorylation, thus suggesting that not only the Y1163 residue, but also the second half of homology is involved in this event.

The fact that *cnk*^{*E-1756*} and *cnk*^{*E-1222*} are loss-of-function alleles and that their associated amino acid change correlates with reduced CNK phosphorylation (Figure 2.2C), suggested that this or a related event is required for CNK function. We investigated this possibility by first verifying whether mutagenesis of the Y1163 residue also affected CNK

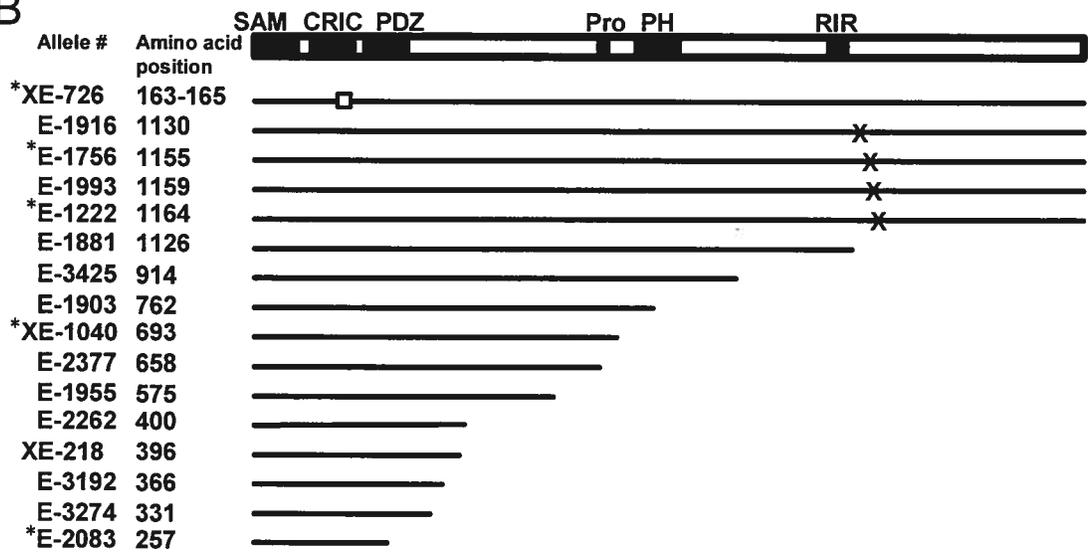
Figure 2.2 The Y1163 Region is Essential for CNK Function and Tyrosine Phosphorylation.

(A) Amino acid comparison of the 1062-1171 region of *D. melanogaster* (*Dm*) CNK to an equivalent region (pos. 1193-1318) in *A. Gambiae* (*Ag*) CNK. Identical and conserved residues are in black and grey boxes, respectively. The RAF-Inhibitory Region is a negatively acting bipartite region made of a RAF-Interacting Motif (RIM) and an adjacent Inhibitory Sequence (IS; Douziech et al., 2003). Black dots highlight the three tyrosine residues of the area. Position and amino acid change found in five *cnk* alleles are also indicated. (B) Schematic representation of CNK is shown as a reference to position *cnk* mutations characterized in this study, or previously (Therrien et al., 1998; denoted by a star). Allele numbers and affected amino acid positions are shown to the left. The hollow square indicates a three amino acid in-frame deletion. X denotes missense mutations, whereas a truncated line indicates premature ORF termination caused by either a frame-shift mutation (XE-1040 and XE-218) or by a nonsense mutation (remaining alleles). (C) S2 cells were transfected with the indicated FL-CNK variants (0.5 – 0.7 μ g), kinase-inactivated SEV^{S11KM} (0.5 μ g) or SEV^{S11} (0.5 μ g). The CNK variants were expressed for a total of 36 hours under the control of the constitutive *cnk* promoter. WT denotes wild-type.

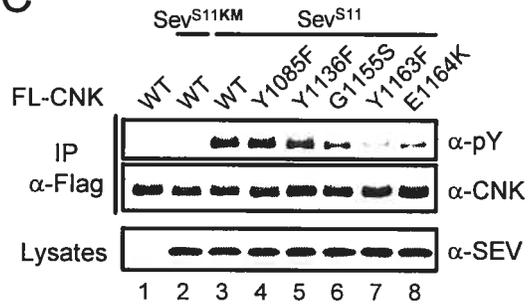
A



B



C



activity. Overexpression of FL-CNK during *Drosophila* eye development was previously shown to weakly antagonize RAS signaling apparently owing to its ability to inhibit RAF catalytic function (Douziech et al., 2003). We reasoned that if the Y1163 residue is normally integrating an RTK-dependent signal, then its mutagenesis should increase CNK dominant-negative effect. To verify this, we overexpressed FL-CNK^{Y1163F} during eye development. In contrast to wild-type FL-CNK (Figures 2.3A and 2.3C), overexpression of one copy of the FL-CNK^{Y1163F} transgene potentially antagonized normal eye development (Figures 2.3B and 2.3D) therefore arguing that the Y1163 residue is important for CNK activity.

To show that the Y1163 residue is genuinely required for CNK function, distinct *cnk* genomic rescue constructs were generated and tested in transgenic flies for their ability to rescue the recessive lethality associated with *cnk* loss-of-function. While the wild-type CNK construct fully restored viability to a lethal *cnk* allelic combination, the CNK^{Y1163F} construct was devoid of activity (Table 2.I and data not shown), thus confirming the functional importance of that residue. The inhibitory activity of CNK has been shown to be mediated by the RIR (Douziech et al., 2003). Because the Y1163F mutation elevated CNK's dominant-negative effect (Figure 2.3), we suspected that in that context, the RIR has an increased inhibitory potential. If that was the case, then mutagenesis of the RIR should counteract the effect of the Y1163F mutation. To test this, we inactivated the RIR in the Y1163F context by introducing a three amino acid change in the Inhibitory Sequence (IS) of the RIR (RIR^{mut}; Douziech et al., 2003). Remarkably, the CNK^{RIRmut-Y1163F} double mutant construct rescued the recessive lethality associated with *cnk* loss-of-function alleles to the same extent as CNK^{WT} (Table 2.I and data not shown) thereby demonstrating that disruption of the RIR can reverse the *cnk*^{Y1163F} mutation. Together, these findings revealed that the two conserved regions within the 1059-1271 area act oppositely and that the Y1163 region is integrating an RTK-produced signal that apparently releases the RIR inhibitory effect.

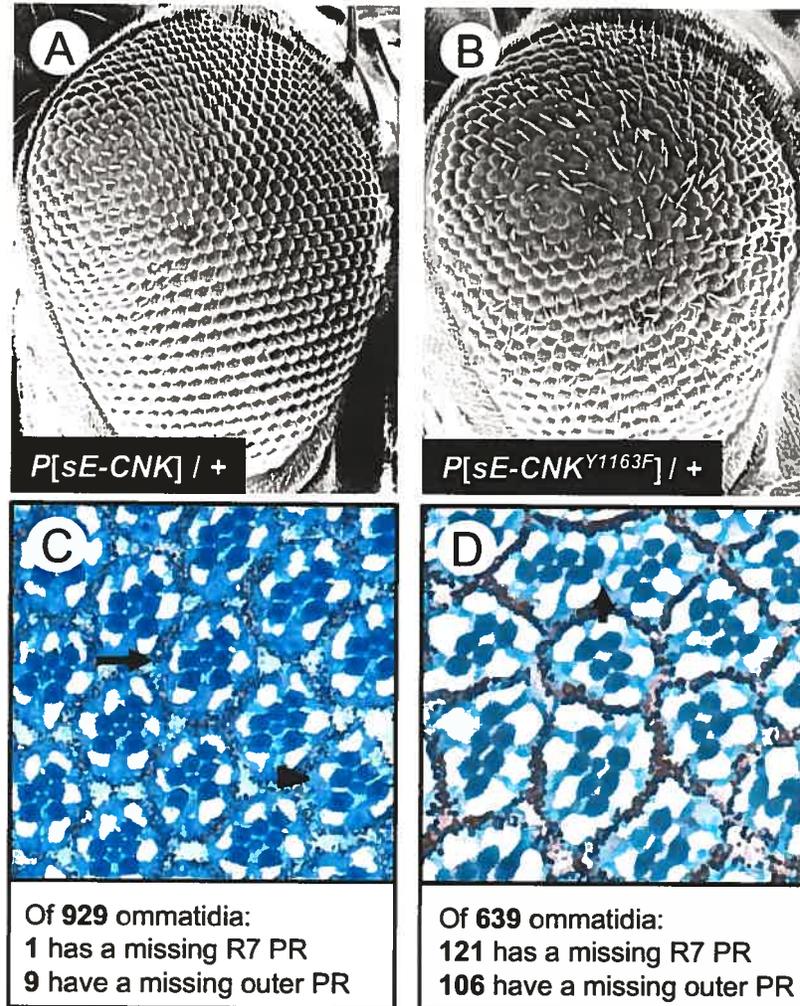


Figure 2.3 Forced Expression of cnk^{Y1163F} Interferes with *Drosophila* Eye Development.

(A-B) Scanning electron micrographs of adult eyes. Anterior is to the right. (C-D) Apical eye sections at the plane of photoreceptor cells for the following genotypes: (C) $P[sE-CNK] / +$; (D) $P[sE-CNK^{Y1163F}] / +$. Example of a normal ommatidium is indicated by the arrow in (C): it comprises six large rhabdomeres (one for each outer photoreceptor [PR] cell) surrounding a smaller rhabdomere associated with the R7 PR cell. Dark staining granules around each ommatidium are produced by pigment cells. Arrow head in (C) highlights one ommatidium missing an outer PR cell. Expression of CNK^{Y1163} also affects pigment cells [arrow in (D)]. Number of ommatidia analyzed and missing PR cells are indicated at the bottom.

Genotype	% of <i>cnk^{E-1088} / cnk^{l(2)k16314}</i> adult flies ^a	# of flies scored ^b
<i>cnk^{E-1088} / cnk^{l(2)k16314}</i>	0	315
<i>cnk^{E-1088} / cnk^{l(2)k16314}, pcnk-cnkn^{WT}</i>	19.6	825
<i>cnk^{E-1088} / cnk^{l(2)k16314}, pcnk-cnkn^{Y1163F}</i>	0	578
<i>cnk^{E-1088} / cnk^{l(2)k16314}, pcnk-cnkn^{RIRmut}</i>	21.2	663
<i>cnk^{E-1088} / cnk^{l(2)k16314}, pcnk-cnkn^{RIRmut-Y1163F}</i>	19.5	619

Table 2.I Genomic Rescue Experiments Revealed the RIR / Y1163 Region Interplay within CNK

The fully penetrant larval lethality associated with *cnk^{E-1088} / cnk^{l(2)k16314}* trans-heterozygous flies is completely rescued by introduction of one copy of a wild-type *cnk* genomic rescue construct (*pcnk-cnkn^{WT}*). ^a For a full rescue, the expected ratio of viable *cnk^{E-1088} / cnk^{l(2)k16314}* flies over total progeny is 20%. ^b The number of flies scored represents a compilation of two independent transgenic lines.

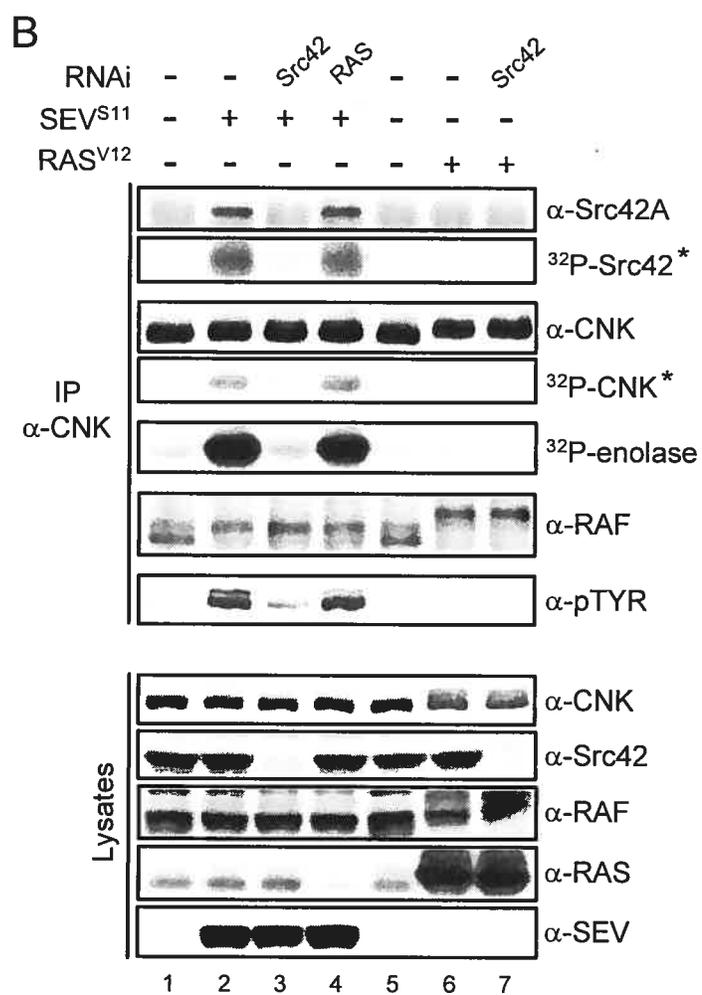
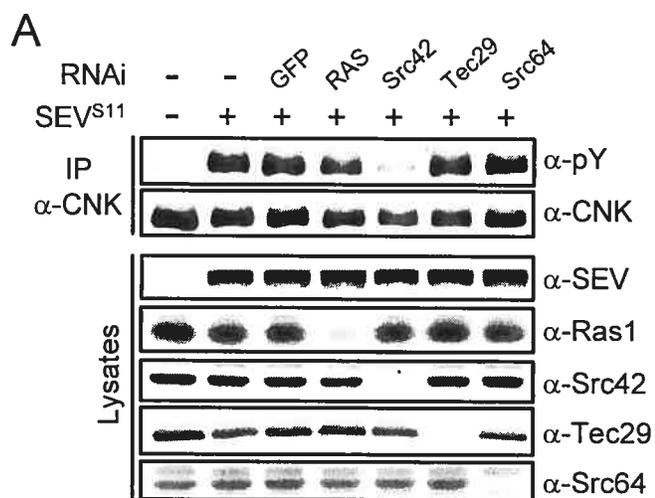
2.4.3. Src42 Associates with CNK and Mediates CNK Tyrosine Phosphorylation in an RTK-dependent Manner

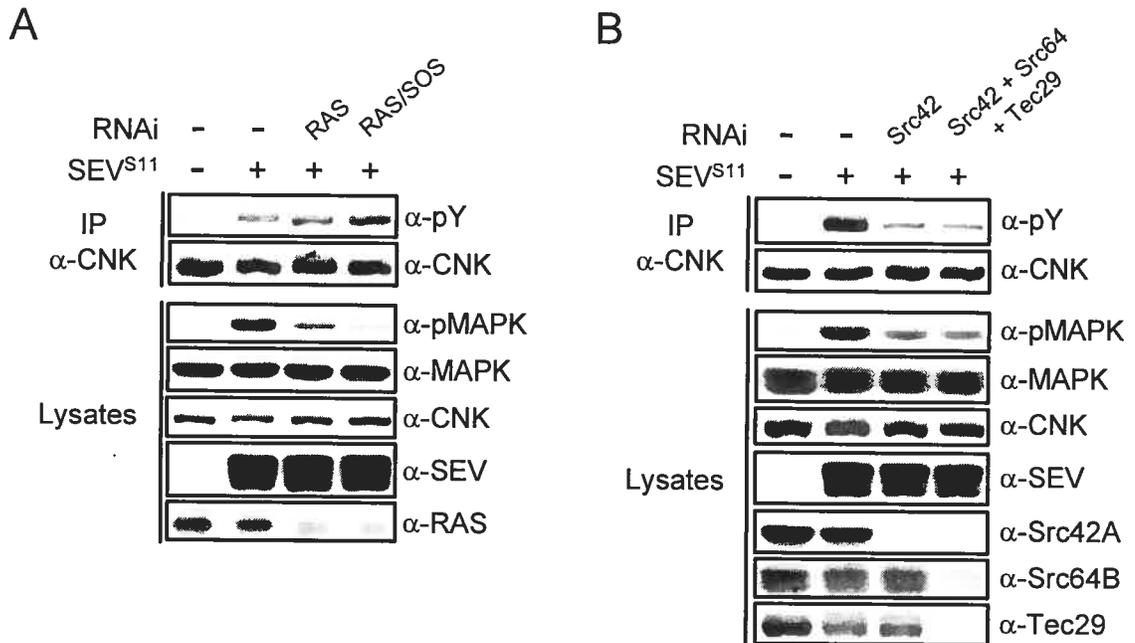
To characterize the functional connection between the RIR and the Y1163 region, we sought to identify the tyrosine kinase mediating CNK phosphorylation. As we failed to detect direct *in vitro* phosphorylation of CNK by SEV^{S11} (data not shown), we examined whether non-receptor tyrosine kinases of the Src family could be implicated.

Drosophila has two SFKs, Src42 and Src64 (Simon et al., 1985; Takahashi et al., 1996). To verify their involvement, we separately eliminated their contribution by RNAi. In addition, we tested the effect of removing endogenous RAS as well as Tec29, a non-receptor tyrosine kinase of the Tec family (TFKs; Smith et al., 2001). Interestingly, depletion of endogenous Src42 reduced SEV^{S11}-induced CNK phosphorylation, whereas none of the other targets had an effect (Figure 2.4A). To investigate whether the inability of RAS depletion to affect CNK phosphorylation could be due to residual, but sufficient RAS activity, we depleted concomitantly endogenous RAS and its exchange factor SOS to further lower down the RAS-dependent signaling branch regulating MAPK. As shown in Suppl. Figure 2.2A, simultaneous depletion of both proteins almost eliminated SEV-induced MAPK activation, but did not decrease CNK tyrosine phosphorylation. Moreover, to determine whether Src64 or Tec29 could contribute, yet to a lower extent than Src42, to the total phosphorylation level of CNK, we verified whether removing concomitantly the two SFKs and Tec29 had a greater impact than Src42 depletion alone. As shown in Suppl. Figure 2.2B, no further decrease was observed. Therefore, these data indicated that Src42 acts as an intermediate kinase linking activated SEV to CNK tyrosine phosphorylation and suggested that this event is RAS-independent. Consistent with this, co-expression of activated Src42 (Src42^{Y511F}) and the FL-CNK variants recapitulated the Y1163-dependent phosphorylation of CNK (Suppl. Figure 2.3). However, these results taken together are not sufficient to conclude that Src42 is specifically phosphorylating the Y1163 residue of CNK. Among various scenarios, it is possible that this residue is first phosphorylated by another

Figure 2.4 Src42 Associates and Mediates CNK Tyrosine Phosphorylation in an RTK-dependent manner.

(A) SEV^{S11} stable cells were incubated \pm the indicated double-stranded RNAs (15 μ g/ml) for four days prior to inducing SEV^{S11} expression. (B) SEV^{S11} or RAS^{V12} stable cells were cultured as in (A) and treated as indicated. Endogenous CNK was then immunoprecipitated (IP) using α -CNK and subjected to an *in vitro* kinase assay. Samples were resolved by SDS-PAGE and analyzed by autoradiography and immunoblotting. A star indicates the putative identity of the radioactive band. Src42 RNAi reversed the effects of SEV^{S11} expression (lane 3), thus demonstrating the involvement of Src42 in mediating the effects of SEV on CNK.





Supplemental Figure 2.2 SEV-induced tyrosine phosphorylation of CNK is RAS-, Src64- and Tec29-independent

(A and B) SEVS11 stable cells were plated with or without the indicated dsRNAs (15 mg/ml) for four days prior to inducing SEVS11 expression. Cell lysates or immunoprecipitated (IP) lysates were analyzed by immunoblots with the indicated antibodies.



Supplemental Figure 2.3 Src-mediated CNK Tyrosine Phosphorylation

S2 cells were transfected with the indicated combinations of Flag-tagged FL-CNK variants (0.5 – 0.7 mg), kinase-inactivated Src42K276R (0.35 mg) or constitutively activated Src42Y511F (0.5 mg). Expression of pyo-Src42 constructs were induced 2.5 hours prior to harvesting the cells. The CNK variants were expressed for a total of 36 hours under the control of the constitutive *cnk* promoter. WT denotes wild-type. Cell lysates were immunoprecipitated and analyzed using indicated antibodies.

kinase and then serves as a docking site for Src42 SH2 domain, thereby allowing Src42 to phosphorylate (an)other tyrosine residue(s) on CNK. Incidentally, this model turned out to be the most likely (see below).

To determine whether Src42 associates with CNK, we immunoprecipitated endogenous CNK from lysates of untreated or heat-treated hs-SEV^{S11} cells and probed the immunoprecipitates for the presence of Src42. Indeed, Src42 was found to interact with CNK, but only upon SEV expression (Figure 2.4B, top panel, compare lanes 1 and 2). Immunoprecipitation of endogenous Src42 also co-precipitated CNK upon SEV expression (data not shown). Consistent with the fact that RAS is apparently not involved in SEV-induced tyrosine phosphorylation of CNK, elimination of endogenous RAS did not affect the Src42/CNK association (lane 4). Furthermore, expression of activated RAS (RAS^{V12}) did not stimulate CNK tyrosine phosphorylation nor did it induce its association with Src42 (compare lanes 5 and 6). Together, these findings demonstrated that CNK and Src42 form a complex *in vivo* and that their association is SEV-dependent, but RAS-independent. As expected, no SEV-induced association with CNK has been detected with either endogenous Src64 or Tec29 (data not shown).

The presence of endogenous Src42 in the CNK immunoprecipitates prompted us to ask if it was catalytically active, and if so, whether it could promote CNK phosphorylation *de novo*. We thus prepared anti-CNK immunoprecipitates as above and incubated them in a kinase assay cocktail containing $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP and the Src substrate enolase. As shown in Figure 2.4B, strong phosphorylation of enolase was detected (fifth panel from the top) as well as in a band migrating at the position of Src42 (second panel from the top), which most likely corresponds to auto-phosphorylated Src42. Interestingly, another major radioactive band was observed at the position of CNK (fourth panel from the top) that we believe is CNK, although it is possible that this signal represents an irrelevant protein co-migrating with CNK. Taken together, these results provide compelling evidence that CNK-associated Src42 is catalytically active. Furthermore, although we cannot rule out the involvement of intermediate kinase(s), these data suggest that Src42 phosphorylates CNK.

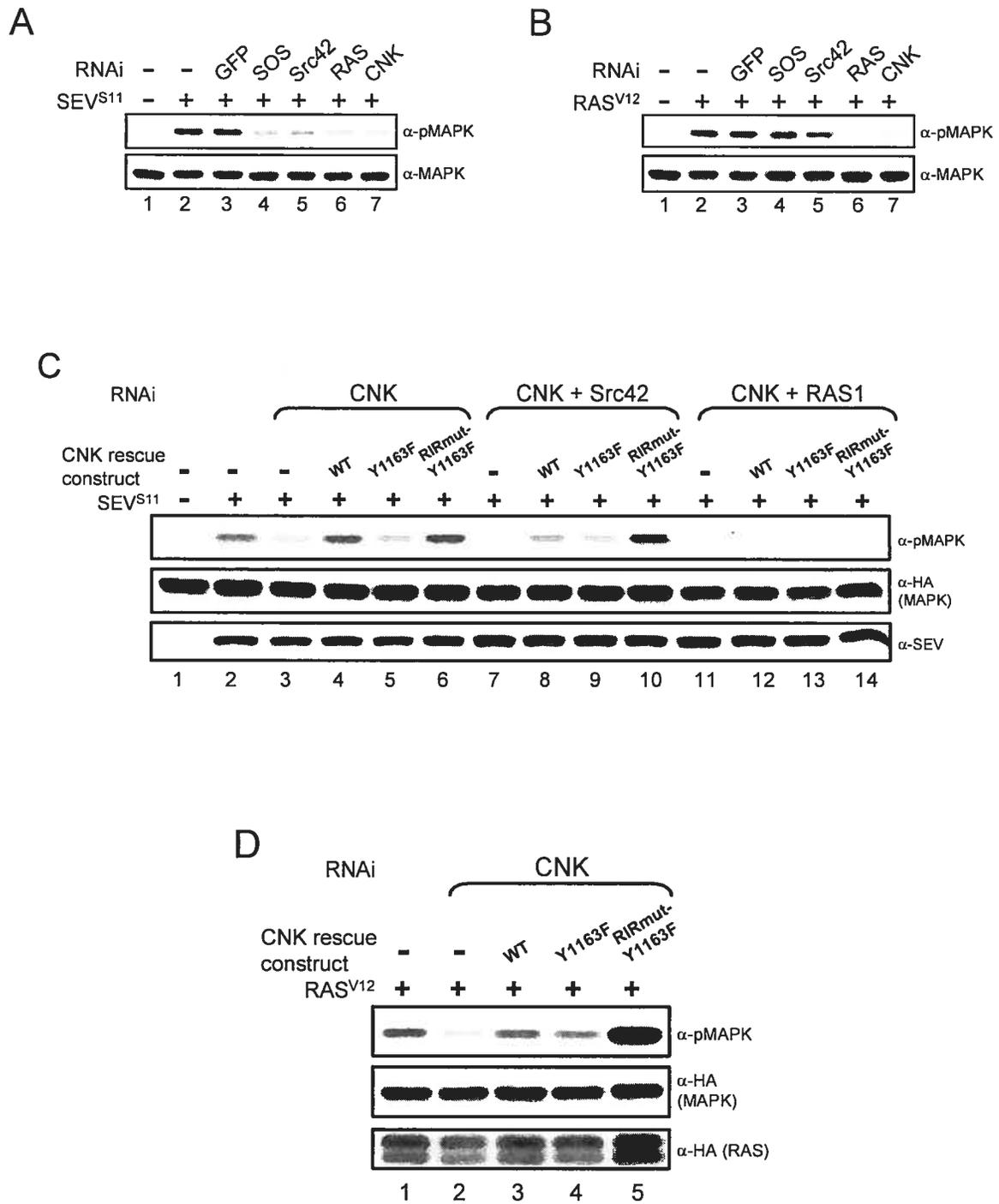
2.4.4. Src42 Regulates Positively MAPK Activation through the Y1163 Region of CNK

We next wanted to investigate the relationship linking Src42 and CNK and its relevance with respect to RTK-dependent MAPK activation. Using RNAi, we first depleted endogenous Src42 levels from SEV^{S11} cells and tested the ability of SEV^{S11} to activate endogenous MAPK. Similar to decreasing endogenous SOS, RAS or CNK by RNAi (Figure 2.5A, lanes 4, 6 and 7), depletion of Src42 impaired MAPK activation (lane 5), thus showing that Src42 plays a positive role in RTK-mediated MAPK activation. In contrast, removal of endogenous Src64 (or Tec29) had no effect (Suppl. Figure 2.2B, and data not shown), which suggest that the two *Drosophila* SFKs perform distinct roles downstream of the RTKs or respond differently depending on the RTK. Consistent with these possibilities, depletion of endogenous Src42 also affected EGFR- and InsR-dependent MAPK activation, whereas elimination of endogenous Src64 (or Tec29) had no effect (data not shown). Finally, removal of endogenous Src42 had no effect on RAS^{V12}-induced MAPK activation (Figure 2.5B, lane 5), thus implying that Src42 is acting upstream and/or in parallel to RAS.

To investigate whether the Y1163 region of CNK is relevant for Src42 positive effect, we used an RNAi-based rescue assay developed previously to identify functionally-relevant regions of CNK (Douziech et al., 2003). In brief, a dsRNA targeting the 3'-UTR of CNK was used to deplete endogenous CNK, which was then complemented by transfecting a CNK rescue construct that uses heterologous 3'-UTR sequences. In contrast to a wild-type (WT) construct, a CNK^{Y1163F} construct barely restored SEV-dependent MAPK activation in cells depleted of endogenous CNK (Figure 2.5C, lanes 2-5), which demonstrated that the Y1163 residue is integrating an RTK signal required for full activation of the MAPK module. Given the inhibitory role of the RIR on the MAPK pathway (Douziech et al., 2003) and that its inactivation *in vivo* is reversing *cnk* loss-of-function caused by the Y1163F mutation (Table 2.1), we verified whether inactivating the RIR in the Y1163F context would reinstate CNK activity. As shown in Figure 2.5C (lane 6), the CNK^{RIRmut-Y1163F} construct was as active as CNK^{WT}, thus providing biochemical evidence that the Y1163 region is integrating a signal that relieves the inhibitory effect of the RIR.

Figure 2.5 Src42 is a Positive Component of the MAPK pathway that Acts Through the Y1163 Region of CNK.

(A - B) SEV^{S11} or RAS^{V12} stable cells were incubated \pm the indicated double-stranded RNAs (15 μ g/ml) for four days prior to inducing SEV^{S11} or RAS^{V12} expression. (C - D) Rescue of MAPK activation caused by depletion of endogenous CNK in S2 cells. For these experiments, cells were pre-plated \pm RNAi (10 μ g/ml) and then transfected 24 hours later with the indicated constructs: (C) HA-tagged MAPK (0.15 μ g), SEV^{S11} (0.1 μ g), and the CNK rescue constructs (0.04 μ g). SEV expression was induced 48 hours post-transfection. (D) HA-MAPK (0.15 μ g), HA-RAS^{V12} (0.1 μ g), and the CNK rescue constructs (0.01 μ g). Transgene expression was induced 48 hours post-transfection. CNK rescue constructs produced identical protein levels (not shown).



We then reasoned that if the RTK-induced signal integrated by the Y1163 region is mediated by Src42, then removing endogenous Src42 and CNK concomitantly should abolish CNK^{WT} rescuing activity to the same extent as CNK^{Y1163F}, but should not affect the rescuing potential of CNK^{RIRmut-Y1163F} as this construct should bypass the need in Src42 activity. Interestingly, we found that CNK^{WT} was not totally devoid of activity, but could somewhat rescue Src42 depletion (Figure 2.5C, compare lanes 7 and 8) probably because endogenous RAS activated by SEV^{S11} plays a dominant role during RAF activation and as CNK^{WT} still integrates RAS activity through its N-terminal domains, this leads to detectable phospho-MAPK. Nonetheless, the CNK^{Y1163F} construct was as active as CNK^{WT} in this context (lane 9), which strongly suggested that Src42 effect is indeed mediated by the Y1163 region. Furthermore and as predicted, the CNK^{RIRmut-Y1163F} construct was not affected by Src42 depletion (lane 10), thus demonstrating its ability to circumvent the need in Src42. Finally, in support of the view that RAS plays a major role in these events, abrogation of MAPK activation by depleting both endogenous CNK and RAS could not be rescued by any of the CNK constructs (Figure 2.5C, lanes 11 to 14).

Taken together, the results presented above suggest that the Y1163 region is integrating a Src42-dependent, but RAS-independent signal. If this view is correct, then RAS^{V12}-induced MAPK activation should not depend on the Y1163 residue. Moreover, as the RIR is inhibitory in a RAS^{V12}-only context (Douziech et al., 2003), its inactivation should promote a stronger MAPK activation as it would imitate the reception of a Src42 signal. This is indeed what we observed. As shown in Figure 2.5D, CNK^{Y1163F} was as active as CNK^{WT} in a RAS^{V12} context (compare lanes 2 to 4), whereas CNK^{RIRmut-Y1163F} elevated RAS^{V12}-induced MAPK activation to a much greater extent (lane 5).

2.4.5. CNK-integrated Src42 Effect on the MAPK Pathway Primarily Depends on its Binding Function

Intriguingly, two previous studies suggested that Src42 negatively regulates the RAS/MAPK pathway (Therrien et al., 1998; Lu and Li, 1999). Because we found no such

role in S2 cells, it is possible that these observations were cell-specific and/or RTK-specific. A more trivial explanation would be that the *Src42* alleles used in those genetic studies were not loss-of-function, but instead had gain-of-function activity with respect to the RAS/MAPK pathway. To explore the second possibility, we compared some of the *Src42* alleles used to conclude a negative role for Src42, namely *Src42^{S-382}* and *Src42^{S-527}* (Therrien et al., 1998), as well as a *bona fide* *Src42* loss-of-function (*Src42^{l(2)k10108}*), for their ability to modify dominantly a RAS^{V12} rough eye phenotype. Surprisingly, in contrast to *Src42^{S-382}*, which strongly enhanced the RAS^{V12} rough eye phenotype (Figure 2.6, compare A and B), *Src42^{l(2)k10108}* did not enhance the phenotype (Figure 2.6; compare A and C). *Src42^{S-527}* also behaved like *Src42^{S-382}* (data not shown). Therefore, these findings suggest that the alleles used to conclude a negative function for Src42, are not loss-of-function, but act as activated alleles with respect to the RAS/MAPK pathway. In support for this claim, we found that the *Src42^{S-382}* and *Src42^{S-527}* alleles efficiently rescued the lethality associated with two independent hypomorphic alleles of *raf*, whereas the *Src42^{l(2)k10108}* could not (Suppl. Table 2.1). These results not only provide additional evidence that *Src42^{S-382}* and *Src42^{S-527}* act as gain-of-functions with respect to the RAS/MAPK pathway, but also suggest that the role of Src42 on this pathway is not restricted to the eye.

To determine the molecular basis responsible for the apparent gain-of-function effect of *Src42^{S-382}* and *Src42^{S-527}*, we isolated their genomic DNA and sequenced the *Src42* exons. *Src42^{S-382}* has a point mutation that changes tryptophan 241 to an arginine (W241R). Strikingly, the equivalent residue (W260) in mammalian Src and Hck, which resides at the junction between the SH2 domain-kinase domain (SH2-KD) linker and the kinase domain (Figure 2.7A) has been predicted from crystallographic and functional studies to be structurally important for maintaining SFKs in an auto-inhibited conformation (for review, see Hubbard, 1999), thus supporting the possibility that the W241R mutation is a gain-of-function. Unexpectedly, however, the *Src42^{S-527}* allele has a single point mutation that changes aspartate 370 (D370) to a valine residue. As D370 corresponds to the critical “catalytic base” found in kinase sub-domain VI, this mutation should destroy Src42

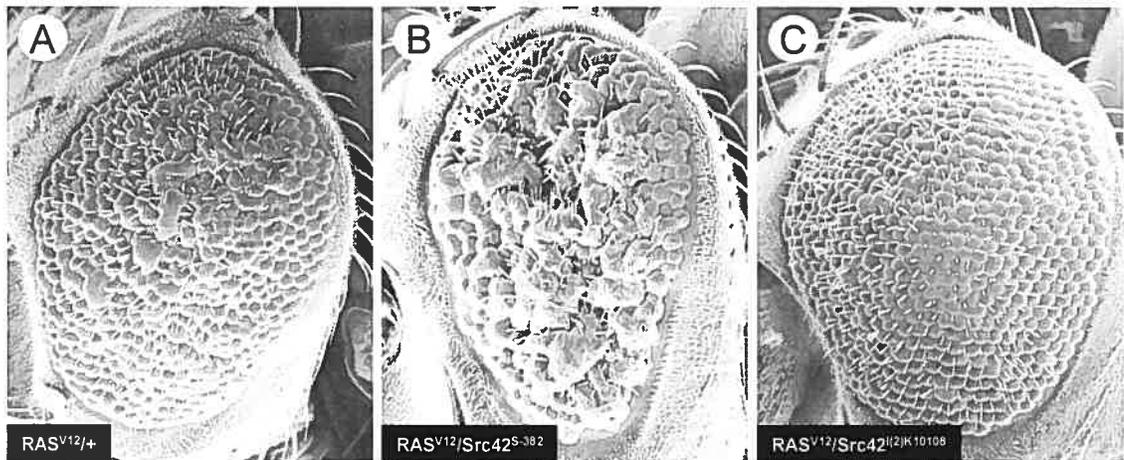


Figure 2.6 *Src42^{S-382}* Acts as a Gain-of-function Allele in the Presence of *RAS^{V12}*.

Scanning electron micrographs of adult eyes of the following genotypes: (A) *CyO, P[sev-RAS^{V12}] / +*. (B) *CyO, P[sev-RAS^{V12}] / Src42^{S-382}*. (C) *CyO, P[sev-RAS^{V12}] / Src42^{l(2)k10108}}*. Anterior is to the left.

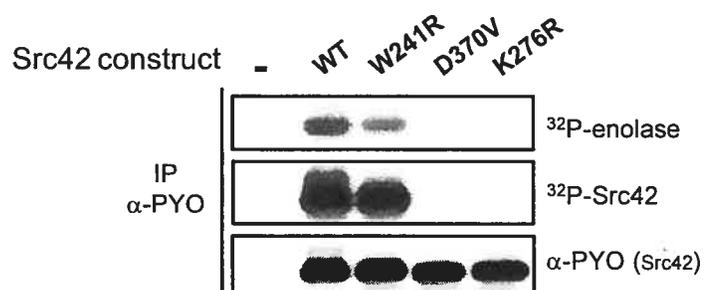
♀		<i>raf^{HM7}/FM6K; +/+</i>		<i>raf^{E110}/FM7; +/+</i>	
		# of <i>raf^{HM7}</i> males	# of non-CyO <i>FM6K</i> males	# of <i>raf^{E110}</i> males	# of non-CyO <i>FM7</i> males
♂	<i>w⁻; +/+</i>	0	76	0	34
	<i>w⁻; Src42^{S-382}/Cyo</i>	29	36	25	31
	<i>w⁻; Src42^{S-527}/Cyo</i>	15	32	14	11
	<i>w⁻; Src42^{l(2)k10108}/Cyo</i>	0	58	0	25

Supplemental Table 2.1 *Src42^{S-382}* and *Src42^{S-527}* alleles suppress *raf^{HM7}* and *raf^{E110}* male hemizygous lethality

Male progeny distribution of a representative large-scale cross (15 males X 20 females) to demonstrate the ability of *Src42^{S-382}* and *Src42^{S-527}* alleles to suppress the lethality associated with two *raf* hypomorphic alleles, compared to a *bona fide Src42* loss-of-function allele (*Src42^{l(2)k10108}*).

catalytic function. An *in vitro* kinase assay confirmed this prediction, whereas the W241R mutation was found to be nearly as active as wild-type Src42 (Suppl. Figure 2.4). Given that the D370V mutation impairs Src42 catalytic function, it suggested that catalytic activity *per se* is not critical for Src42 effect on the pathway and that structural changes imposed by the W241R or D370V mutations are activating other aspects of Src42 function, such as its capacity to associate with specific targets. This possibility is likely considering that even mutations affecting catalytic function can have gain-of-function consequences provided that they disrupt the overall auto-inhibited configuration and make available the SH3 and SH2 domains. As the catalytic center of SFK also appear to stabilize the global auto-inhibited state (Hubbard, 1999), it is possible that not only the W241R mutation, but also the D370V mutation destabilizes Src42 auto-inhibited state thereby increasing the ratio of Src42 molecules bound to some targets, including CNK.

The observation that one of the *Src42* gain-of-function allele is a kinase-dead variant was intriguing given the correlation that we observed between CNK positive function on the pathway and Src42-mediated CNK tyrosine phosphorylation. To investigate this issue, we first used a simple co-transfection assay that monitored the ability of Src42 constructs to augment RAS^{V12}-induced MAPK activation. As shown in Figure 2.7B, kinase-inactive Src42^{D370V} and Src42^{K276R} variants (lanes 5 and 6) were found to be as competent to collaborate with RAS^{V12} as Src42^{Y511F} and Src42^{W241R} (lanes 3 and 4). Interestingly, even an N-terminal (NT) Src42 protein (including only the SH3 and SH2 domains) was active as the full-length constructs (lane 7). In contrast, a construct corresponding to the catalytic domain alone was inert (data not shown). To ensure that the activity of these mutants was not caused by endogenous Src42, we tested their activity in a context where endogenous Src42 has been depleted by RNAi. As shown in Figure 2.7B (lanes 9 to 13), none of the mutants was affected. We showed above that, unlike RAS activity, Src42 activity is integrated by the Y1163 residue of CNK (Figures 2.5C and 2.5D). To verify the relevance of this residue with respect to the ability of kinase-impaired Src42 to collaborate with RAS^{V12}, we depleted endogenous CNK and rescued its contribution with CNK^{Y1163}. Remarkably, we found that the positive effect of the Src42 mutants strictly depended on the integrity of the Y1163 residue (Suppl. Figure 2.5). Together, these results are consistent with the idea that



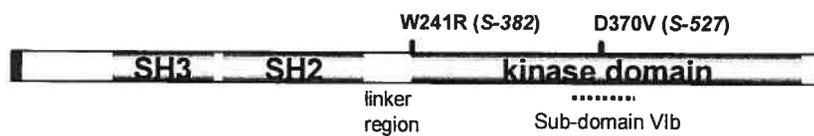
Supplemental Figure 2.4 Assessment of Catalytic Activity of Src42 Mutations Identified *in vivo*

S2 cells were left alone (-) or transfected with the indicated of Pyo-tagged Src42 variants (0.4 – 0.6 mg). Expression of pyo-Src42 constructs was induced 48 hr post-transfection and the cells were harvested 24 hr later. Cell lysates were immunoprecipitated using α -PYO and Src42 kinase activity was detected in the immunoprecipitates as described in the Experimental Procedures. Src42 levels were monitored by immunoblots. The W241R mutant has an activity comparable to wild-type Src42 in its ability to phosphorylate enolase (^{32}P -enolase) or to autophosphorylate (^{32}P -Src42). In contrast, the D370V mutant is completely inert as the catalytically-inactivated K276R mutant.

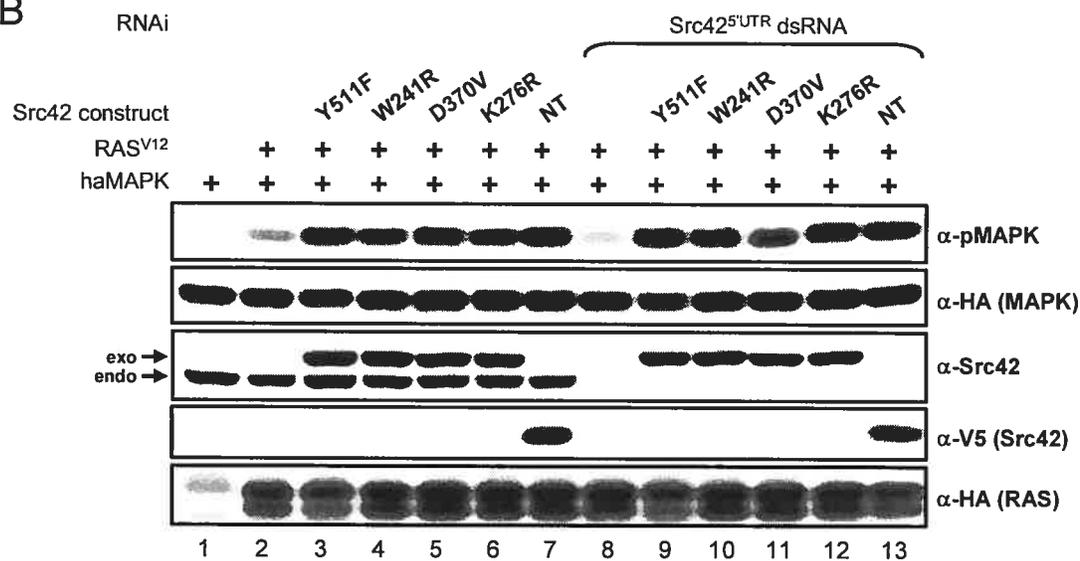
Figure 2.7 Molecular Characterization of *Src42* Gain-of-function Alleles.

(A) Schematic structure of *Src42*. Like mammalian SFKs, the 517 amino acid long *Src42* contains a myristoylation signal (black box), followed by an SH3, SH2 and kinase domain. Relative positions of amino acid change found in *Src42*^{S-382} and *Src42*^{S-527} are shown. (B) S2 cells were first incubated ± the *Src42* dsRNA (15 µg/ml) one day prior transfection and then transfected with the HA-MAPK reporter construct (0.15 µg) either alone (lane 1) or with the indicated combinations of HA-RAS^{V12} (0.1 µg) and PYO-*Src42* (0.075 – 0.175 µg) constructs or the truncated V5-tagged NT-*Src42* construct (0.075 µg). Endo and exo denote the position of the endogenous and exogenous *Src42* proteins, respectively. (C) S2 cells were transfected as in (B). The amount of *Src42* constructs used (0.065 – 0.3 µg) were adjusted to obtain similar protein levels.

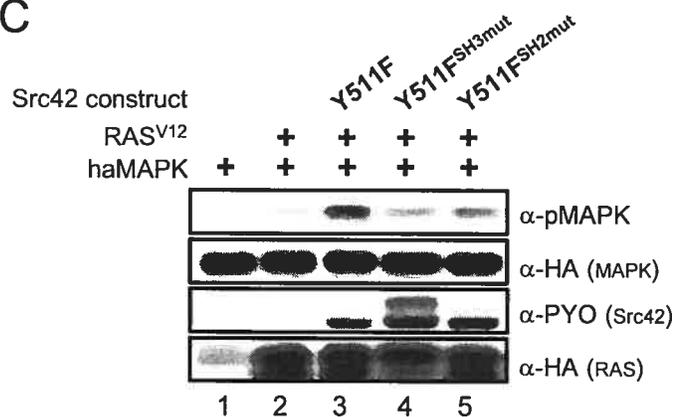
A

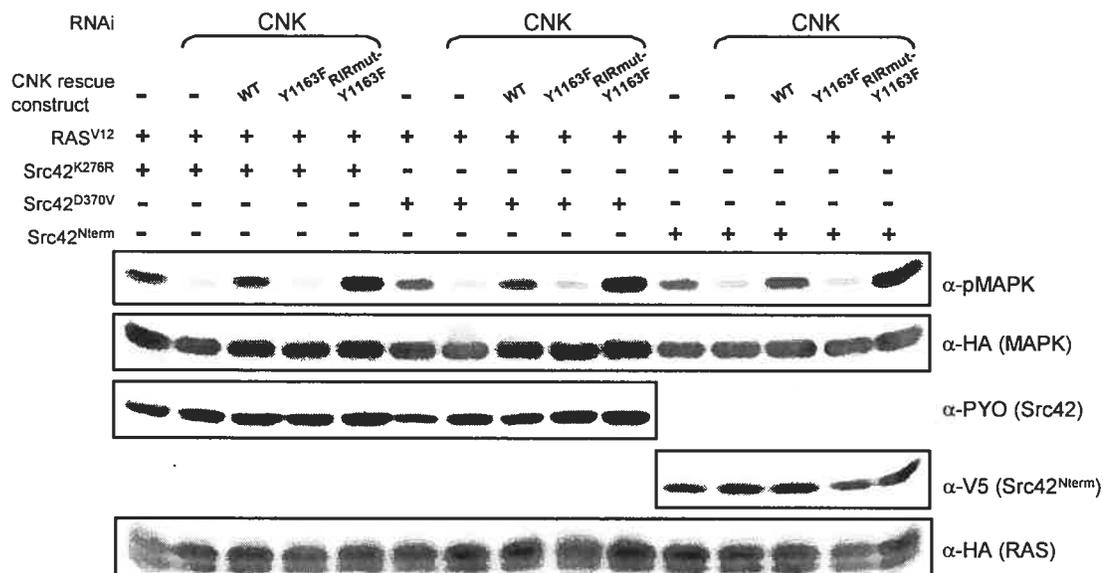


B



C





Supplemental Figure 2.5 Src42 Scaffolding Effect is Integrated by the Y1163 Residue of CNK

Cells were pre-plated with or without RNAi (10 mg/ml) and then transfected 24 hours later with the indicated construct combinations: HA-MAPK (150 ng), HA-RASV12 (100 ng), PYO-Src42 variants (25 ng) and the CNK rescue constructs (10 ng). RAS and Src42 transgene expression was induced 48 hours post-transfection and cells were cultured for an additional 16 hours prior to harvest. Cell lysates were analyzed by immunoblots using the indicated antibodies.

Src42 kinase activity is not critical for the positive effect of Src42 on the MAPK pathway and further suggest that Y1163-dependent CNK activity and Src42-mediated CNK tyrosine phosphorylation are not functionally related. In support for these conclusions, we found that kinase-inactive Src42^{K276R} is as competent as wild-type Src42 to rescue a decrease of SEV-dependent MAPK activation caused by depletion of endogenous Src42 (data not shown).

In addition to their catalytic function, SFKs are known to mediate positive signaling by the binding properties of their SH3 and SH2 domains (Kaplan et al., 1995; Schlaepfer et al., 1997). To verify their respective relevance, we mutagenized them individually in Src42^{Y511F} and tested their ability to augment RAS-mediated MAPK activation. As shown in Figure 2.7C, inactivation of either domain impaired Src42 activity (lanes 4 and 5). Similar findings were obtained with Src42^{K276R} or NT-Src42 (data not shown), therefore suggesting that Src42 binding was critical for its function through CNK. We then investigated whether the Src42 variants could associate with CNK through its Y1163 region. As shown in Figure 2.8A, co-immunoprecipitation experiments revealed that NT-Src42 indeed interacted with CNK (lane 1), and this, independently of a co-expressed activated RTK. Similar results were obtained with the full-length Src42 constructs (data not shown), thereby possibly explaining their ability to collaborate with RAS^{V12}. Nonetheless, as expected, SEV expression greatly increased the interaction (lane 2), which suggested that binding is normally signal-dependent (see below). Using this simple binding assay, we next verified the relevance of the Y1163 region in this interaction. Remarkably, we found that not only the Y1163 residue is critical for binding (lanes 11 and 12), but also the four missense mutations found in this region affected the association (lanes 3-10). Therefore, these results confirm the relevance of this area for Src42 binding and provide a common molecular explanation for the various loss-of-function mutations found in this area. Although it remains to be verified, the correlation between Src42 binding to CNK and its positive effect on the pathway is consistent with the type of mutations found in the two putative *Src42* gain-of-function alleles.

The ability of full-length or NT-Src42 variants to bind CNK without SEV expression was intriguing as it depended on the Y1163 residue (Figure 2.8B, compare lanes

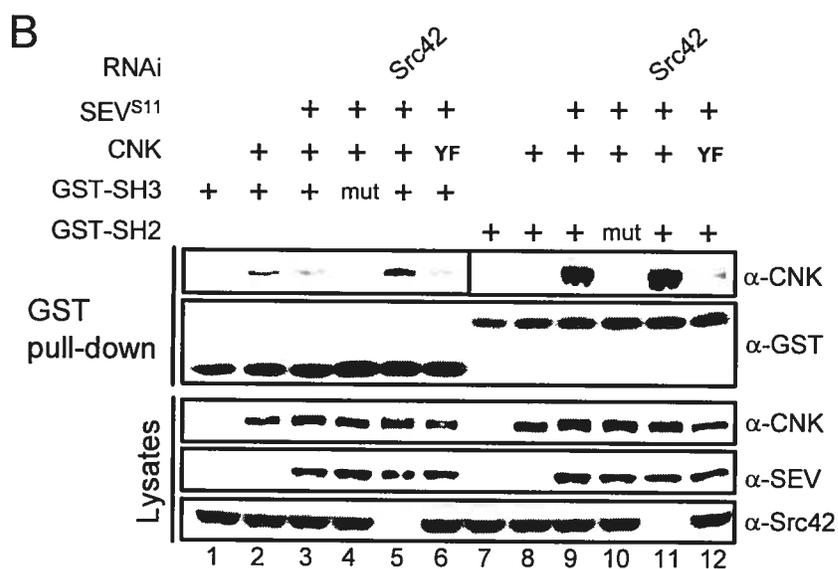
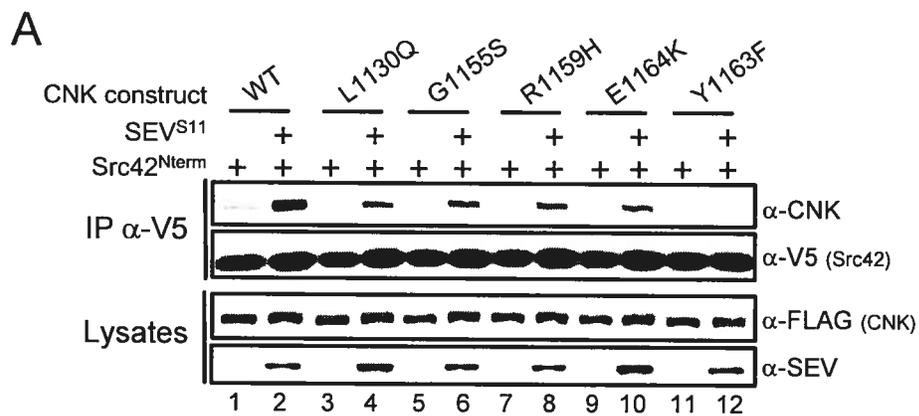
1 and 11; and data not shown) as well as on the SH3 and SH2 domains (data not shown). Moreover, it occurred independently of endogenous Src42 (data not shown). These observations suggested that both domains are engaged in binding CNK and that either the Y1163 residue is phosphorylated at an undetectable level or binding of the SH3 domain somehow stabilizes the SH2 domain to its unphosphorylated binding site. To eliminate a possible inter-dependency between the two domains with respect to CNK binding, we separately fused them to GST and directly assessed their respective binding ability. As shown in Figure 2.8B, the SH3 domain associated with CNK independently of SEV (compare lanes 2 and 3) and of the Y1163 residue (lane 6). In sharp contrast, the SH2 domain associated with CNK in a strict SEV-dependent manner (compare lanes 8 and 9) that required the integrity of the Y1163 residue (lane 12). Therefore, given that the SH2 domain cannot bind CNK when tested alone in the absence of SEV, but is involved when the SH3 domain is present, suggests that binding of the SH3 domain to CNK stabilizes the SH2 domain to its binding site thereby allowing it to participate to CNK binding in the absence of Y1163 phosphorylation. This phenomenon, possibly magnified by the artificial set-up used to test the constructs, might explain why the collaboration between Src42 and RAS^{V12} depends on the SH3 and SH2 domains of Src42 as well as on the Y1163 residue of CNK.

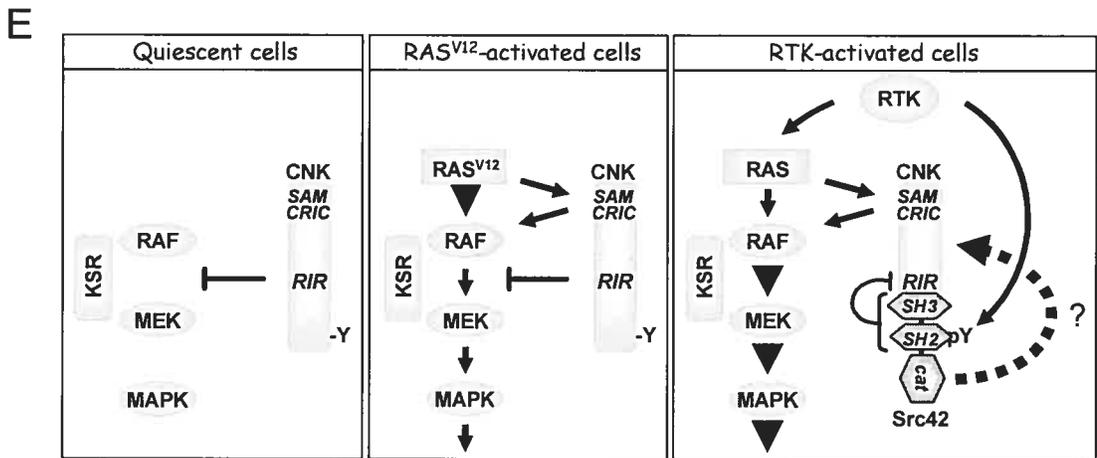
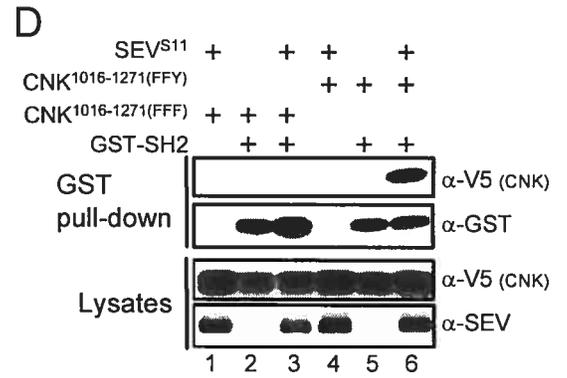
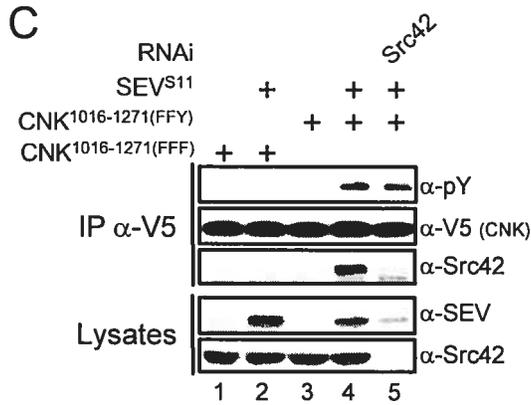
2.4.6. Src42 does not phosphorylate the Y1163 residue of CNK

The strong SEV dependency of Src42 SH2 domain binding to CNK suggests that in normal conditions, binding of this domain requires the phosphorylation of at least one tyrosine residue in CNK. Because we found that endogenous Src42 is mediating SEV-induced CNK tyrosine phosphorylation, it is conceivable that upon activation by SEV, Src42 phosphorylates its own binding site on CNK thereby inducing normal binding. However, this would be inconsistent with the functional data that suggest that Src42 kinase activity is not involved in the regulation of MAPK activation through CNK. To verify this, we eliminated endogenous Src42 by RNAi and tested the impact on SEV-dependent GST-SH2 domain binding to CNK. As shown in Figure 2.8B (compare lanes 9 and 11), Src42

Figure 2.8 Characterization of the Src42 binding function on CNK.

(A) S2 cells were transfected with the indicated FL-CNK variants (0.55 – 0.8 μg) and the NT-Src42 construct (0.09 – 0.25 μg) \pm SEV^{S11} (0.6 μg). The CNK variants were expressed for a total of 36 hours under the control of the constitutive *cnk* promoter, whereas NT-Src42 and SEV^{S11} expression were induced 16 hr and 3 hr, respectively, prior to harvesting the cells. (B) S2 cells were first incubated \pm the Src42 dsRNA (15 $\mu\text{g}/\text{ml}$) one day prior transfection and then transfected with the indicated combinations of CNK (0.5 μg), SEV^{S11} (0.6 μg) or GST constructs (0.1 – 0.3 μg). CNK and SEV^{S11} expression time was as in (A), whereas GST constructs were expressed for 16 hr prior to cell lysis. GST-fused proteins were collected using glutathione-sepharose beads. YF denotes the CNK^{Y1163F} variant. Interestingly, depletion of endogenous Src42 slightly increased GST-SH3 binding to CNK (lane 5). (C) The short CNK mutant variants (0.35 – 0.8 μg) were co-transfected \pm SEV^{S11} (0.5 μg) as indicated and expressed for 16 hr prior to cell lysis. RNAi treatment was as in (B). (D) Transfections, including the GST-SH2 construct (0.15 – 0.8 μg), were conducted as in (C). (E) Model depicting the integration of RAS and Src42 signals by CNK. See text for details.





depletion did not reduce the interaction. Identical results were obtained with NT-Src42 (data not shown). Therefore, in agreement with our functional results, these findings indicate that the kinase activity of Src42 is not involved in generating a high affinity binding site on CNK for its SH2 domain.

The binding data presented thus far strongly suggest that the Y1163 residue is part of a Src42 SH2 domain binding site. Furthermore, this residue is probably specifically phosphorylated in response to SEV expression, but this event should not be mediated by Src42. To specifically monitor the phosphorylation status of the Y1163 residue, we generated a short V5-tagged CNK construct (position 1016 to 1271) that encompassed the Y1163 region and included only three tyrosine residues (Y1085, Y1136 and Y1163; Figure 2.2). We tested two versions of it: one had the three tyrosine residues changed to phenylalanine (FFF), while the other (FFY) only kept intact the Y1163 residue. As shown in Figure 2.8C, we found that the FFY protein, but not the FFF variant, was tyrosine phosphorylated upon SEV^{S11} expression and associated with endogenous Src42, therefore demonstrating that the Y1163 residue is genuinely phosphorylated upon SEV expression and that this event is critical for endogenous Src42 association. Consistent with the results shown above, depletion of endogenous Src42 did not affect the tyrosine phosphorylation of the FFY protein, thus providing strong evidence that a tyrosine kinase other than Src42 is phosphorylating the Y1163 residue. Finally, to show that the SH2 domain of Src42 is most likely interacting with the phosphorylated Y1163 residue, we tested the ability of the GST-SH2 domain protein to associate with the short CNK variants in a SEV-dependent manner. As shown in Figure 2.8D, the SH2 domain specifically associated with the FFY variant and this occurred only upon SEV co-expression (lane 6). Therefore, these results provide compelling evidence that the Y1163 residue is indeed phosphorylated in a SEV-dependent, but Src42-independent manner, and serves as a binding site for the SH2 domain of Src42. Given that Src42 is apparently not phosphorylating the Y1163 residue, it remains possible that the receptor itself is performing this event and that inappropriate *in vitro* enzymatic condition explains our failure to detect it. Alternatively, another tyrosine kinase could be involved.

2.5. Concluding remarks

In this study, we showed that CNK integrates RAS and Src42 signals as a binary input, thereby allowing RAF to send signals to MEK (Figure 2.8E). The RAS signal is received by the N-terminal SAM and CRIC domains of CNK which appears to enhance RAF catalytic function (Douziech et al., 2003), whereas Src42 activity is integrated by the Y1163 region of CNK and seems to relieve the inhibitory effect that the RIR imposes on RAF's ability to phosphorylate MEK (Douziech et al., 2003). Why would RAF activation depend on two distinct, but co-required signals emitted by the same RTK? One possibility is that this requirement generates specificity downstream of an RTK. For example, only receptors that activate both RAS and Src42 would lead to activation of the MAPK module within discretely localized CNK complexes. Consequently, the combinatorial use of multi-functional signals might be a means to produce a specific output from generic signals.

Intriguingly, despite the fact that the second *Drosophila* SFK, Src64, is naturally expressed in S2 cells, it did not act like Src42 in response to SEV, EGFR and InsR activation. Although the reason for this difference is not immediately clear, we found that, unlike Tec29, overexpression of a Src64^{YF} variant is nonetheless capable of associating with CNK and inducing its tyrosine phosphorylation (data not shown). It is thus possible that Src64 fulfills a similar role to Src42, but downstream of other RTKs or in response to other types of stimuli and that difference in their subcellular localization, requirement for specific co-factors or additional regulatory events account for their distinct behavior.

The mechanism by which the binding of Src42 to CNK de-activates the RIR is currently unknown and a number of scenarios can be envisioned. For example, it might induce a conformational change that suppresses the inhibitory effect that the RIR imposes on RAF catalytic activity. Alternatively, it is possible that Src42 binding displaces an inhibitory protein interacting with CNK or facilitates the re-localization of a CNK/RAF complex to a subcellular compartment that is required for RAS-dependent RAF activation. However, we do not believe that this mechanism involves displacing CNK away from RAF

as neither SEV expression nor Src42 depletion altered the CNK/RAF interaction (Figure 2.4B and data not shown).

Although several questions are left unanswered regarding the Src42/CNK association, collectively, our data suggest a subtle binding mode reminiscent of the mammalian Src/FAK interaction (Thomas et al., 1998). Indeed, it appears that CNK is phosphorylated on the Y1163 residue not by Src42 itself, but either by the receptor or by another kinase (Figure 2.8E) and that this step generates a high affinity binding site for the SH2 domain of Src42 thereby triggering its recruitment. This event is presumably not sufficient for a stable association and/or de-repression of the RIR, but also requires the binding of the SH3 domain to an unidentified sequence element within CNK. The engagement of the SH3 and SH2 domains of Src42 on CNK would not only relieve the RIR's inhibitory effect, but would also de-repress Src42 auto-inhibited configuration and possibly orient favorably Src42 to phosphorylate one or a few specific tyrosine residues on CNK (dotted arrow in Figure 2.8E). This scenario is certainly plausible considering that CNK has a total of 39 tyrosine residues. This would explain why depletion of endogenous Src42 led to a reduction, but not a complete elimination, of SEV-induced CNK tyrosine phosphorylation (Figure 2.4) or why the Y1163F mutation impaired CNK phosphorylation mediated by Src42^{Y511F} (Suppl. Figure 2.3) as a disruption of the Src42/CNK association would prevent Src42 from phosphorylating the other sites. Although these Src42-dependent phosphorylated residues do not appear to play a role in activating the MAPK module, their concerted regulation suggests that CNK is coordinating signaling between the MAPK module and at least another pathway.

2.6. Acknowledgements

We are grateful to David Wassarman and Caroline Baril for critical reading of the manuscript and Frank Sicheri for helpful discussions. We would like to thank S. Beckendorf, J. Dixon, S. Katzav and B. Shilo for providing reagents. We would also like to thank Allan Wong for generating a number of Src42 constructs, Alexandre Viau for assembling the initial *pcnk-cnk* construct and François Roy for help with the RNAi technique. M.T. is recipient of a Canadian Research Chair. This work was supported in part by a CIHR and a NCIC grant to M.T.

2.7. References

- Anselmo,A.N., Bumeister,R., Thomas,J.M., and White,M.A. (2002) Critical contribution of linker proteins to Raf kinase activation. *J. Biol. Chem.* **277**, 5940-5943.
- Bumeister,R., Rosse,C., Anselmo,A., Camonis,J., and White,M.A. (2004) CNK2 couples NGF signal propagation to multiple regulatory cascades driving cell differentiation. *Curr. Biol.* **14**, 439-445.
- Chong,H., Vikis,H.G., and Guan,K.L. (2003) Mechanisms of regulating the Raf kinase family. *Cell. Signal.* **15**, 463-469.
- Dhillon,A.S. and Kolch,W. (2002) Untying the regulation of the Raf-1 kinase. *Arch. Biochem. Biophys.* **404**, 3-9.
- Douziech,M., Roy,F., Laberge,G., Lefrancois,M., Armengod,A.V., and Therrien,M. (2003) Bimodal regulation of RAF by CNK in *Drosophila*. *EMBO J.* **22**, 5068-5078.
- Hou,X.S., Chou,T.B., Melnick,M.B., and Perrimon,N. (1995) The torso receptor tyrosine kinase can activate Raf in a Ras-independent pathway. *Cell* **81**, 63-71.
- Hubbard,S.R. (1999) Src autoinhibition: let us count the ways. *Nat. Struct. Biol.* **6**, 711-714.
- Jaffe,A.B., Aspenstrom,P., and Hall,A. (2004) Human CNK1 acts as a scaffold protein, linking Rho and Ras signal transduction pathways. *Mol. Cell. Biol.* **24**, 1736-1746.
- Kaplan,K.B., Swedlow,J.R., Morgan,D.O., and Varmus,H.E. (1995) c-Src enhances the spreading of src^{-/-} fibroblasts on fibronectin by a kinase-independent mechanism. *Genes Dev.* **9**, 1505-1517.
- Lanigan,T.M., Liu,A., Huang,Y.Z., Mei,L., Margolis,B., and Guan,K.L. (2003) Human homologue of *Drosophila* CNK interacts with Ras effector proteins Raf and Rlf. *FASEB J.* **17**, 2048-2060.
- Li,W., Noll,E., and Perrimon,N. (2000) Identification of autosomal regions involved in *Drosophila* Raf function. *Genetics* **156**, 763-774.
- Lu,X. and Li,Y. (1999) *Drosophila* Src42A is a negative regulator of RTK signaling. *Dev. Biol.* **208**, 233-243.
- Rabizadeh,S., Xavier,R.J., Ishiguro,K., Bernabeortiz,J., Lopez-Illasaca,M., Khokhlatchev,A., Mollahan,P., Pfeifer,G.P., Avruch,J., and Seed,B. (2004) The Scaffold Protein CNK1 Interacts with the Tumor Suppressor RASSF1A and Augments RASSF1A-induced Cell Death. *J. Biol. Chem.* **279**, 29247-29254.

Roy,F., Laberge,G., Douziech,M., Ferland-McCollough,D., and Therrien,M. (2002) KSR is a scaffold required for activation of the ERK/MAPK module. *Genes Dev.* **16**, 427-438.

Schlaepfer,D.D., Broome,M.A., and Hunter,T. (1997) Fibronectin-stimulated signaling from a focal adhesion kinase-c-Src complex: involvement of the Grb2, p130cas, and Nck adaptor proteins. *Mol. Cell. Biol.* **17**, 1702-1713.

Schweitzer,R., Shaharabany,M., Seger,R. and Shilo,B.Z. (1995) Secreted spitz triggers the DER signaling pathway and is a limiting component in embryonic ventral ectoderm determination. *Genes Dev.* **9**, 1518-1529.

Simon,M.A., Drees,B., Kornberg,T., Bishop,J.M. (1985) The nucleotide sequence and the tissue-specific expression of *Drosophila* c-src. *Cell* **42**, 831-840.

Smith,C.I., Islam,T.C., Mattsson,P.T., Mohamed,A.J., Nore,B.F., and Vihinen,M. (2001) The Tec family of cytoplasmic tyrosine kinases: mammalian Btk, Bmx, Itk, Tec, Txk and homologs in other species. *Bioessays* **23**, 436-446.

Takahashi,F., Endo,S., Kojima,T., Saigo,K. (1996) Regulation of cell-cell contacts in developing *Drosophila* eyes by Dsrc41, a new, close relative of vertebrate c-src. *Genes Dev.* **10**: 1645-1656.

Therrien,M., Wong,A.M., and Rubin,G.M. (1998) CNK, a RAF-binding multidomain protein required for RAS signaling. *Cell* **95**: 343-353.

Therrien,M., Morrison,D.K., Wong,A.M., and Rubin, G.M. (2000) A genetic screen for modifiers of a kinase suppressor of Ras-dependent rough eye phenotype in *Drosophila*. *Genetics* **156**: 1231-1242.

Thomas, J.W., Ellis, B., Boerner, R.J., Knight, W.B., White, G.C.2nd, and Schaller, M.D. (1998) SH2- and SH3-mediated interactions between focal adhesion kinase and Src. *J. Biol. Chem.* **273**: 577-583.

Tomlinson,A. and Ready,D.F. (1987) Neuronal differentiation in the *Drosophila* ommatidium. *Dev. Biol.* **120**: 366-376.

Wassarman,D.A., Aoyagi,N., Pile,L.A., and Schlag,E.M. (2000) TAF250 is required for multiple developmental events in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **97**: 1154-1159.

Widmann,C., Gibson,S., Jarpe,M.B., and Johnson,G.L. (1999) Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human. *Physiol. Rev.* **79**: 143-180.

3. CHAPITRE 3

Discussion

Il est connu que la voie de signalisation ERK est couramment utilisée par les RTKs pour coordonner une multitude de processus biologiques, telles la prolifération, la différenciation et la migration cellulaire (Pawson, 2002; Schlessinger, 2000). Cependant les mécanismes moléculaires, qui permettent de définir comment cette voie de signalisation partagée par plusieurs RTKs peut adéquatement spécifier la transmission des signaux, demeurent encore nébuleux. La caractérisation des protéines d'échafaudage de la voie ERK a permis d'amorcer la compréhension de ces mécanismes et de proposer de nouveaux concepts quant à l'intégration précise et efficace d'un signal à travers cette cascade de signalisation (Morrison and Davis, 2003; Whitmarsh and Davis, 1998). Cette thèse tente de démontrer la participation et la pertinence de l'une d'entre elles, appelée CNK, au sein des processus d'activation et de régulation de la voie ERK par les RTKs (afin de simplifier la terminologie, le mot MAPK sera utilisé pour désigner la voie ERK). CNK a initialement été identifiée dans un crible génétique dépendant de KSR chez la *Drosophile* et possède la capacité d'interagir avec RAF (Therrien et al., 1998). Nous avons par la suite remarqué que suivant l'activation des RTKs, CNK devenait phosphorylée sur des résidus tyrosines (Therrien et al., 1998). Nous avons donc tenté d'évaluer l'impact de cet événement sur sa fonction et sa régulation en utilisant à la fois des techniques génétiques et biochimiques (Laberge et al., 2005). Cette étude nous a également amenés à caractériser l'homologue le plus conservé des SFKs chez la *Drosophile*, soit Src42. Les prochaines pages discutent des différents résultats obtenus et interprètent de façon plus détaillée la répercussion de nos recherches sur les mécanismes de régulation de la voie MAPK tout en proposant certaines avenues possibles permettant de poursuivre la caractérisation moléculaire de CNK.

3.1. Caractérisation du processus de phosphorylation RTK-dépendant de CNK

Dans un système de cellules en culture chez la *Drosophile*, nous avons montré que la forme endogène de CNK devenait phosphorylée en tyrosines non seulement en coexpression avec SEV^{S11}, mais aussi suite à l'activation des récepteurs à l'EGF et à l'insuline (Figure 2.1A). Sachant que tous ces RTKs ont la capacité d'induire l'activation de la voie MAPK, ces résultats suggèrent donc que la phosphorylation de CNK pourrait

être un événement conservé au sein des mécanismes d'activation de cette voie. Certains indices suggèrent également que les mécanismes moléculaires de phosphorylation de CNK puissent être conservés chez les mammifères. En fait, la stimulation des cellules COS-7 avec le ligand EGF induit la phosphorylation d'une forme surexprimée de CNK (la forme de *Drosophile*) (Therrien et al., 1998). Il a aussi été montré que la forme humaine CNK2B devenait phosphorylée suite au traitement des cellules HEK293 avec le pervanadate, un inhibiteur de l'activité tyrosine phosphatase (Lanigan et al., 2003; Mikalsen and Kaalhus, 1998). Récemment, il a été observé que CNK1 (la partie CT) devenait phosphorylée en coexpression avec Src (Ziogas et al., 2005). La cartographie de ces sites de phosphorylation n'a toutefois pas été réalisée. Davantage d'analyses seront donc nécessaires afin de déterminer si la phosphorylation de CNK chez les mammifères, comme chez la *Drosophile*, est un processus important pour moduler sa fonction et par le fait même réguler la signalisation MAPK en aval des RTKs. De plus, il serait intéressant de savoir si la phosphorylation de CNK est également observée en aval des GPCRs et des récepteurs à intégrines, lesquels ont la capacité de médier leurs effets via la voie MAPK.

Toujours dans notre système de cellules en culture, nous avons montré que la stimulation des récepteurs à l'EGF et à l'insuline, comparativement à la surexpression de SEV^{S11}, induit transitoirement l'activation de la voie MAPK (Figure 2.1A). Cette cinétique d'activation corrèle avec les niveaux de phosphorylation/déphosphorylation de CNK (Figure 2.1A). Ces observations suggèrent fortement que la phosphorylation de CNK puisse être un processus hautement régulé. Plus particulièrement, la phosphorylation de CNK précède légèrement l'activation de la voie MAPK, suggérant ainsi que cet événement de phosphorylation puisse avoir lieu précocement dans la cascade de signalisation (Figure 2.1A). Aussi, la déphosphorylation rapide de CNK après l'activation de la voie implique probablement une ou plusieurs protéines à activité tyrosine phosphatase. Le séquençage du génome de la *Drosophile* prédit la présence de 38 tyrosines phosphatases (Morrison et al., 2000). Il serait possible de vérifier par ARNi laquelle (lesquelles) a (ont) la capacité d'influencer le niveau de phosphorylation de CNK suite à l'activation des RTKs. De façon encore indéterminée, ce phénomène de rétroinhibition de CNK pourrait être contrôlé par des événements de phosphorylation en sérines ou thréonines. En effet,

suite à l'activation de la voie MAPK par RAS^{V12}, nous avons observé que CNK présente un retard de migration sur gel SDS-PAGE résultant d'une réaction de phosphorylation non pas sur résidus tyrosines, mais bien sur sérine(s)/thréonine(s) (Laberge et Therrien, résultats non publiés). Même si nous ne connaissons pas la conséquence de cette phosphorylation, celle-ci semble être médiée par une composante de la voie MAPK en aval de RAS et pourrait potentiellement réguler négativement la phosphorylation en tyrosines de CNK. Il a souvent été montré que MAPK, suite à son activation, pouvait phosphoryler des composantes de la voie situées plus en amont, dont le récepteur EGF, SOS, RAF et MEK, dans le but de réduire leur activité biologique (Widmann et al., 1999). Ce comportement a également été observé sur des protéines d'échafaudage. Par exemple, FRS2 (FGF Receptor Substrate 2) et GAB1 (GRB2-associated Binder-1) sont phosphorylées par MAPK entraînant ainsi la régulation négative des voies de signalisation contrôlées par ces molécules (Lax et al., 2002; Lehr et al., 2004; Wu et al., 2003). CNK possède quelques sites potentiels de phosphorylation par MAPK (Pro-X-Ser/Thr-Pro) dont l'un est situé dans la région Tyr1163 (1131-1134). Même si cette hypothèse n'a pas encore été vérifiée, il serait possible de penser que la phosphorylation de ce motif pourrait avoir un effet négatif sur l'activation de la voie MAPK en régulant négativement l'association Src42/CNK. L'identification et la pertinence des différents sites de phosphorylation sur résidus sérines/thréonines devront donc être caractérisées afin de comprendre leur implication sur la fonction et la régulation de CNK au sein de la voie MAPK.

L'un de nos premiers objectifs était d'identifier les tyrosines de CNK qui devenaient phosphorylées suite à l'expression de SEV^{S11}. L'analyse de la phosphorylation des différents mutants de troncation de CNK nous a permis de cibler la région Tyr1163 et de proposer que ce résidu pouvait être un site de phosphorylation potentiel. Même si la mutation de cette tyrosine en phénylalanine dans le contexte pleine longueur de CNK diminuait fortement la phosphorylation induite autant par SEV^{S11} que par Src42, nous n'avions aucune preuve que ce site était réellement phosphorylé de façon endogène. Les études d'association entre CNK et Src42 semblaient nous dire que la diminution de phosphorylation de CNK^{Y1163F} était plutôt causée par son incapacité à recruter la tyrosine kinase Src42. Cependant, après avoir observé que cette association dépendait d'un signal et

que le domaine SH2 de Src42 était important pour l'interaction, nous avons postulé que la Tyr1163 pouvait tout de même être phosphorylée. Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons généré une protéine tronquée (CNK^{1016-1271(FFY)}) qui possédait seulement la Tyr1163, pour ensuite la tester en surexpression avec SEV^{S11}. Même si cette expérience nous a montré que CNK pouvait être phosphorylée par SEV et que le domaine SH2 de Src42 s'y associait, ces résultats ne nous permettaient toujours pas de prétendre avec certitude que cette tyrosine était bel et bien phosphorylée *in vivo*. La surexpression de cette petite protéine à haute concentration aurait pu exposer la Tyr1163 et ainsi forcer sa phosphorylation suite à l'activation du récepteur SEV. Cette phosphorylation pourrait donc être non physiologique.

Afin de confirmer avec certitude que CNK endogène était phosphorylée sur cette tyrosine, nous avons tenté de réaliser sa cartographie de phosphorylation à l'aide de la technique de spectrométrie de masse en condition non stimulée versus stimulée par le récepteur SEV^{S11}. Cependant, même si nous avons couvert plus de 30 % de la séquence peptidique de CNK, dont la région contenant la Tyr1163, aucun site de phosphorylation n'a pu être détecté (Laberge et Therrien, résultats non publiés). Ces résultats suggèrent que la stoechiométrie de phosphorylation de CNK est faible ou que seulement une faible proportion de CNK phosphorylée a pu être purifiée. Dans le but d'accroître l'efficacité de cette approche, une étape de purification additionnelle devrait être ajoutée afin d'augmenter la concentration des peptides phosphorylés. Cette technique devrait être efficace pour confirmer que la Tyr1163 est réellement phosphorylée *in vivo*. Elle permettrait par le fait même d'identifier d'autres sites de phosphorylation soit en sérines/thréonines, soit en tyrosines qui pourraient également être requis pour la fonction et la régulation de CNK. Par la suite, toujours dans le but de confirmer la phosphorylation de la Tyr1163, nous avons fait synthétiser un anticorps spécifiquement contre ce résidu dans son contexte phosphorylé. La caractérisation de cet anticorps est présentement en cours au laboratoire et constituera un outil important non seulement pour valider la phosphorylation de la Tyr1163 *in vivo*, mais également pour évaluer la régulation de CNK en aval des RTKs.

La phosphorylation de la Tyr1163 ne semble pas dépendre de l'activité kinase de Src42. L'ajout d'un ARN double brin contre ce dernier ne diminue en rien la

phosphorylation de CNK^{1016-1271(FFY)} induite par SEV^{S11} (Figure 2.8C). Cet événement moléculaire est peut-être induit soit directement par le récepteur, soit par l'intermédiaire d'une autre tyrosine kinase. Nos essais kinases *in vitro* avec le récepteur SEV ne nous ont pas démontré qu'il avait la capacité de phosphoryler directement CNK. Cependant, ces résultats n'excluent pas la possibilité qu'il en soit capable et que notre essai ne reproduise pas nécessairement les conditions physiologiques nécessaires à cette réaction. Nous avons utilisé dans cet essai la forme pleine longueur de CNK comme substrat. Il est possible que la Tyr1163 ne soit stériquement pas accessible dans ces conditions. La forme CNK^{1016-1271(FFY)} pourrait être un meilleur substrat pour SEV. D'un autre côté, si la phosphorylation n'est pas induite par SEV, mais par une kinase intermédiaire, il serait possible de vérifier par ARNi laquelle aurait la capacité d'influencer le niveau de phosphorylation de CNK puisque le génome de *Drosophila* prédit l'existence de 32 protéines tyrosine kinases (Morrison et al., 2000).

3.2. Analyses structurelle et fonctionnelle des allèles de Src42

Chez les mammifères, la caractérisation des protéines de type SFKs en aval des RTKs suggère qu'elles jouent un rôle positif dans les mécanismes d'activation de la voie MAPK (Bromann et al., 2004). Chez la *Drosophila*, l'analyse des allèles mutants de Src42, issus du crible génétique KDN (KSR Dominant Negative), lui attribue pourtant un rôle négatif dans la voie RAS/MAPK (Lu and Li, 1999; Therrien et al., 1998). L'ensemble de nos données propose que l'association CNK/Src42 entraîne la désinhibition de RAF et que ce mécanisme semble positivement requis pour l'activation de la voie MAPK (Table 2.I et Figures 2.5). De plus, nos essais à l'aide de la technique d'ARNi dans les cellules S2 confirment clairement le rôle positif de Src42 en aval de plusieurs RTKs (figure 2.4A et Laberge et Therrien, résultats non publiés). Ces résultats contradictoires nous ont poussés à analyser plus attentivement le comportement des allèles mutants de Src42. De façon surprenante, la perte de fonction de Src42 (Src42^{l(2)k10108}), résultant de l'insertion d'un élément P dans sa portion 5'UTR qui diminue de 50 % son niveau d'expression (Laberge et Therrien, résultats non publiés), se comporte différemment des allèles issus du crible lorsqu'ils sont en présence de RAS^{V12} dans l'œil de la *Drosophila* (Figure 2.6). Cette

observation nous a incités à proposer que ces allèles n'étaient pas de réelles pertes de fonction, mais plutôt des gains de fonction. Afin de confirmer ces présomptions, nous avons entrepris la caractérisation moléculaire de ces derniers. Cette analyse nous a permis de détecter que les allèles Src42^{S-382} et Src42^{S-527} comportaient des mutations ponctuelles respectivement localisées dans la région appelée « linker » et dans le domaine kinase (Figure 2.7A). À l'aide des structures tridimensionnelles des SFKs déjà établies chez les mammifères, il est possible d'extrapoler l'impact structurel de ces mutations dans le but de comprendre pourquoi ces allèles sont des gains de fonction (Boggon and Eck, 2004; Hubbard, 1999).

La structure tridimensionnelle des protéines de type SFKs a démontrée que les domaines SH3 et SH2 sont impliqués dans des interactions intramoléculaires permettant de maintenir le domaine kinase inactif (Sicheri et al., 1997; Williams et al., 1997; Xu et al., 1997). En fait, le domaine SH2 lie une tyrosine phosphorylée dans la queue CT (Tyr527) alors que le domaine SH3 s'associe à une hélice polyproline de type II située dans la région du « linker » (Figure 1.7). Le séquençage de l'allèle Src42^{S-382} nous a permis de détecter à la position 241 (résidu situé dans la région du « linker » en aval de l'hélice polyproline) une arginine à la place d'un tryptophane, position qui correspond au Tryp260 chez Src (Figure 2.7A). Ce tryptophane est hautement conservé chez les membres des SFKs et permet, au même titre que d'autres résidus situés cette région, des interactions intramoléculaires avec le N-lobe du domaine kinase (Sicheri et al., 1997). Dans une conformation inactive, il stabilise la conformation de l'hélice α C vers l'extérieur du N-lobe dans une position incompatible pour la catalyse. En fait, cette position empêche le Glu291 (Glu310), acide aminé conservé de l'hélice α C, de faire un pont salin avec la Lys276 (Lys295) pour aligner adéquatement les phosphates α et β de l'ATP (Sicheri et al., 1997). D'après les études structurales, le maintien de l'hélice α C par ce tryptophane et la liaison du domaine SH3 au « linker » semblent être étroitement reliés l'un à l'autre. D'ailleurs, ces structures sont préférentiellement formées de régions hydrophobes. La mutation du tryptophane pourrait entraîner la déstabilisation de la structure inactive de Src (Sicheri et al., 1997). Une étude biochimique avec Hck montre que la mutation de ce tryptophane augmente, entre autres, son activité catalytique et l'accessibilité de ses domaines SH3 et SH2 pour leur ligand

respectif. Ces expériences ont permis de confirmer que cette mutation pourrait favoriser l'association du domaine SH3 à un partenaire protéique plutôt que d'interagir avec le « linker » (Gonfloni et al., 1997; LaFevre-Bernt et al., 1998). La mutation d'un autre résidu dans cette région (Leu255) a également montré son importance dans le maintien de la structure inactive de Src (Gonfloni et al., 1997). Il n'est pas clairement établi si la dissociation du domaine SH3 au « linker » cause la déstabilisation du domaine SH2. Il a déjà été montré que l'engagement du domaine SH3 pouvait stimuler l'autophosphorylation de Src sans affecter l'association du domaine SH2 à la phosphotyrosine de la queue CT (Lerner and Smithgall, 2002). Paradoxalement, une étude à l'aide de PTK6 (Protein Kinase 6), une tyrosine kinase cytoplasmique dont la structure s'apparente à celle des SFKs, démontre que la mutation du même tryptophane inhibe son activité catalytique (Kim and Lee, 2005). Indubitablement, la détermination de la structure cristalline des formes sauvage et mutante de Src42 (W241R ou D370V) pourrait montrer l'orientation réelle de ses domaines régulateurs en conditions native et mutante et déterminer si leur mutation a bel et bien un impact sur leur conformation tridimensionnelle.

D'un autre côté, la caractérisation de l'allèle Src42^{S-527} nous a permis de constater qu'à la position 370, un aspartate était remplacé par une valine, lequel correspond à l'Asp386 chez Src (Figure 2.7A). Cet acide aminé est conservé dans tous les domaines kinases et correspond à la base catalytique nécessaire à la réaction de transfert du γ -phosphate (Johnson et al., 1996). D'ailleurs, cette mutation abolit complètement l'activité kinase de Src (Suppl. Figure 2.4). Pour bien comprendre l'impact structurel de cette mutation, il faut analyser l'orientation du segment d'activation dans la conformation active et inactive de l'enzyme. Comme dans la plupart des kinases, le changement de position de ce segment est principalement contrôlé par la phosphorylation de résidus situés dans cette région (Johnson et al., 1996). Dans Src, il s'agit de la Tyr416 qui s'autophosphoryle (en *trans*) pour permettre la réorganisation de ce segment et ainsi favoriser la catalyse. En condition non stimulée, la région de la Tyr416 forme une petite hélice qui s'imbrique entre les deux lobes du domaine kinase (Figure 1.7). Plus particulièrement, la Tyr416 forme deux liens hydrogènes médiés par deux molécules d'eau avec l'Arg385 et l'Asp386 de la boucle catalytique. Le segment d'activation interagit

également avec l'hélice α C via une interaction entre l'Arg409 et le Glu310. L'aspartate du motif DFG et la Lys295 (résidu invariable qui aligne l'ATP) peuvent aussi s'associer. L'ensemble de ces liens, de concert avec ceux de la région du « linker », prévient l'adoption de la bonne conformation de l'hélice α C au site actif, empêche la Tyr416 d'être phosphorylée et interfère dans la liaison productive d'un peptide substrat (Schindler et al., 1999; Xu et al., 1999). En condition activée, la Tyr416 phosphorylée favoriserait un changement conformationnel au niveau du segment d'activation et formerait une boucle à l'extérieur du site actif. Il n'y a, par conséquent, plus d'interférence pour la liaison du substrat. De concert avec la réorientation de l'hélice α C, cette nouvelle conformation pourrait alors favoriser l'alignement des différents acides aminés dans une conformation compétente pour initier la catalyse (Schindler et al., 1999; Xu et al., 1999). La mutation de l'Asp386 pourrait empêcher son interaction avec la Tyr416 et ainsi déstabiliser la conformation inactive du segment d'activation. Par conséquent, cet événement pourrait se répercuter sur la conformation inactive de l'hélice α C et sur le lien moléculaire qu'elle entretient avec le « linker » déstabilisant par conséquent l'engagement de la région polyproline au domaine SH3. Ce changement pourrait entraîner la déstabilisation de la structure inactive de Src et favoriser une conformation où les domaines régulateurs interagiraient plus facilement avec leurs partenaires protéiques plutôt qu'avec leur séquence intramoléculaire. L'allèle de Src42 (Src42¹⁵⁻¹), issu d'un crible génétique indépendant, mais qui se comporte comme les deux allèles du crible KDN (augmente le phénotype d'œil rugueux de RAS^{V12}), contient une mutation au niveau de l'aspartate du motif DFG (DFG → NDG) (Lu and Li, 1999). Ce résidu établit en conformation inactive un lien avec la Lys295. Sa mutation pourrait négativement se répercuter sur l'orientation du segment d'activation et par conséquent sur la structure de Src42. Aucune étude biochimique sur l'impact de telles mutations n'a été répertoriée jusqu'à présent. Il serait intéressant de savoir si ces mutants pourraient faciliter l'association de partenaires protéiques à leurs domaines régulateurs. On pourrait penser que l'effet de ces mutations mime la conformation normalement induite suivant la phosphorylation de la Tyr416, soit de favoriser la réorientation du segment d'activation et de l'hélice α C dans une conformation idéale pour la catalyse. Cependant, aucune évidence ne suggère la possibilité d'une telle répercussion. Il n'est d'ailleurs pas connu si ces mutations pourraient se répercuter sur la

réorientation des domaines régulateurs dans un contexte inactif, c'est-à-dire lorsque ceux-ci ne sont pas engagés par des partenaires protéiques et que la Tyr527 est phosphorylée. La structure cristalline d'une forme de Src doublement phosphorylée sur ses Tyr416 et Tyr527 pourrait répondre à cette question.

D'après l'analyse structurale de ces allèles mutants et nos études de coopération dans l'œil de la *Drosophile* avec RAS^{V12}, nos résultats suggèrent que ces allèles pourraient avoir une structure relativement instable et ouverte qui favoriserait des interactions avec des partenaires protéiques, ce qui par conséquent se traduirait en un effet gain de fonction. Il a été montré que la déstabilisation de la structure de Src, au même titre que la déphosphorylation de la tyrosine en CT, entraîne sa relocalisation cellulaire des membranes endosomales aux sites d'adhésion focaux (Kaplan et al., 1994). La déstabilisation de la structure de Src pourrait lui permettre de changer de localisation et atteindre ces partenaires protéiques nécessaires à la stimulation de la voie MAPK en présence de RAS^{V12}. Nos études biochimiques ont montré que ces événements de coopération entre les allèles mutants de Src42 et RAS^{V12} sont dépendants de CNK (Suppl. Figure 2.5). CNK et Src42 sont capables d'interagir l'une avec l'autre, une association qui semble d'ailleurs être essentielle pour l'activation de la voie MAPK (Figure 2.4B et 5C). Cette interaction s'effectue d'ailleurs dans une région requise positivement pour la fonction de CNK (Table I). Ces résultats suggèrent par conséquent que CNK puisse potentiellement médier les effets gain de fonction des allèles de Src42. Le mécanisme par lequel CNK pourrait intégrer les signaux de Src42 (indépendamment de son activité kinase) pour l'activation de la voie MAPK sera discuté dans la prochaine section (section 3.3, page 125).

L'analyse des allèles de Src42 a permis de constater qu'elles se comportaient de façon particulière. Dans notre étude, nous proposons que la fonction de Src42 soit positivement requise dans la voie RAS/MAPK et que les allèles identifiés soient en fait des gains de fonction. Cependant, en homozygote ou en trans hétérozygote, ces allèles ne sont pas viables et aucun phénotype associé à une prolifération ou une différenciation excessive n'est apparent (Lu and Li, 1999). Ces observations corrént avec les résultats obtenus suivant l'analyse de clones mitotiques dans l'œil à l'aide de l'allèle Src42¹⁵⁻¹. Cette étude ne démontre aucun photorécepteur additionnel, pourtant une suractivation de la voie

RAS/MAPK est souvent associée à l'augmentation du nombre de ces photorécepteurs (Lu and Li, 1999). Pourquoi les allèles gains de fonction de Src42 ne permettent pas en eux-mêmes d'induire ce phénotype caractéristique ? Nous croyons que le signal que médient ces mutants (dans un contexte non sensibilisé) n'est pas suffisant pour suractiver la voie MAPK. Leur propriété gain de fonction se répercute positivement seulement dans des contextes particuliers, soit lorsque la voie est déjà sensibilisée par RAS^{V12} ou KDN. Ces observations pourraient être reliées à la propriété de CNK d'intégrer deux signaux (RAS et Src) requis pour assurer l'activation de la voie MAPK. Ces résultats seront ultérieurement discutés dans la section de la fonction de CNK dans l'orchestration des différentes voies de signalisation conduisant à l'activation du module MAPK (page 135). Le fait que les allèles ne soient pas viables suggère par contre que l'activité kinase de Src42 puisse être requise pour assurer la viabilité de la mouche (dans le cas des allèles Src42^{S-527} et Src42¹⁵⁻¹). Pour ce qui est de l'allèle Src42^{S-382}, dont la mutation ne semble pas affecter son activité kinase, d'autres analyses devront être effectuées afin de déterminer la cause de son phénotype létal dans l'embryon.

3.3. Caractérisation du mécanisme par lequel CNK intègre les signaux de Src42 pour réguler l'activité de RAF.

L'observation que l'activité kinase de Src42 ne soit pas essentielle à l'activation de la voie MAPK est une donnée qui a suscité notre attention. Nous avons donc tenté de confirmer biochimiquement cette propriété de Src42. Nos études dans les cellules S2 semblent soutenir cette hypothèse puisque l'expression de la partie NT de Src42 est capable de restaurer l'activation de la voie MAPK induite par SEV suivant l'élimination de la contribution endogène de Src42 (Laberge et Therrien, résultats non publiés). Ces résultats suggèrent fortement que Src42, via ses domaines régulateurs, possède la capacité de réguler positivement l'activation de la voie MAPK. Ces observations n'éliminent pas la possibilité que l'activité kinase de Src42 puisse être requise dans d'autres types cellulaires pour l'activation de cette voie. Cependant, si l'on s'en tient au résultat obtenu dans les cellules S2, cette activité kinase de Src42 pourrait être impliquée dans la régulation de voies de signalisation indépendantes de la voie MAPK, lesquelles seraient essentielles à la viabilité

de la mouche. Par exemple, comme chez les mammifères, il serait possible que son activité kinase puisse être indispensable dans différentes voies de signalisation régulant la réorganisation du cytosquelette (Frame, 2004). Afin de poursuivre l'analyse du comportement des allèles de Src42, nous avons reproduit biochimiquement leur coopération avec RAS^{V12}. Ces résultats nous ont permis de déterminer que l'activité kinase de Src n'avait aucun effet négatif sur la voie puisqu'une forme constitutivement activée de Src42 se comportait de façon similaire à une forme dont l'activité kinase était abolie (Figure 2.7B). De plus, ces expériences ont permis de montrer que la coopération ne dépendait pas de la forme endogène de Src42 (Figure 2.7B). De telles observations ne sont pas exclusives à la Drosophile. En effet, il a été montré chez les mammifères que les SFKs pouvaient réguler différents processus indépendamment de leur activité kinase. Par exemple, l'expression de la partie NT de Src peut restaurer partiellement le phénotype associé aux souris *Src*^{-/-} (Schwartzberg et al., 1997). Des résultats similaires, toujours dans les cellules *Src*^{-/-}, montrent que ses domaines SH3 et SH2 en eux-mêmes peuvent sauvegarder les effets au niveau des processus d'adhésion et d'étalement cellulaires, lesquels requièrent entre autres l'activation de la voie MAPK (Kaplan et al., 1995). La surexpression ne restaure toutefois pas la liaison de GRB2 sur FAK (requiert l'activité kinase de Src). Elle semble plutôt faire le pont entre FAK et p130CAS (130 kDa CRK-associated substrate). Cette interaction permettrait la phosphorylation de CAS par FAK et le recrutement de molécules à domaine SH2, telles CRK ou Nck nécessaires à l'activation de la voie MAPK (Schlaepfer et al., 1997). Ces résultats ne sont cependant pas acceptés par tous puisqu'ils ont été observés en surexpression. En fait, la fonction de liaison de Src42 en condition physiologique ne semble pas suffisante pour restaurer totalement la signalisation en aval des intégrines (Cary et al., 2002). Néanmoins, il a été observé que plusieurs autres kinases sont capables de médier des effets de manière indépendante de leur activité kinase. Par exemple, chez la Drosophile, Abl (Abelson tyrosine kinase) est capable de compléter le phénotype létal associé à une mouche *abl*^{-/-} indépendamment de son activité kinase (Henkemeyer et al., 1990). Chez la souris, une observation similaire a été constatée avec la kinase BTK (Bruton Tyrosine Kinase) qui peut médier des effets tumeurs suppresseurs même si son domaine kinase est muté (Middendorp et al., 2005).

La détermination des domaines impliqués de part et d'autre des molécules lors de l'interaction CNK/Src42 nous a permis de mieux comprendre les mécanismes moléculaires par lesquels CNK pourrait intégrer les signaux de Src42 durant l'activation de la voie MAPK. D'abord, nous avons déterminé que la phosphorylation de la Tyr1163 était requise pour interagir avec le domaine SH2 de Src42 (Figure 2.8A). Nous avons ensuite montré que le domaine SH3 de Src42 pouvait interagir avec CNK. Tout comme le domaine SH2, le domaine SH3 est requis pour la coopération avec RAS^{V12}, suggérant ainsi la possibilité qu'il participe au mécanisme de désinhibition suivant son association à proximité de la Tyr1163 (Figure 2.7C). Nos données préliminaires supportent effectivement cette possibilité. Par exemple, nous avons identifié un motif PXXP situé à 29 résidus en amont de la Tyr1163, qui lorsque muté, abolit l'association du domaine SH3 de Src42 à CNK (Laberge et Therrien, résultats non publiés). La région Tyr1163 pourrait donc être une plate-forme permettant de recruter et d'engager les deux domaines régulateurs de Src42. Dans un contexte endogène, le domaine SH2 pourrait être recruté sur la phosphotyrosine 1163 de CNK suivant l'activation d'un RTK, ce qui permettrait de positionner et de faciliter l'engagement du domaine SH3 dans le but d'initier la désinhibition du RIR et l'activation de RAF. Il est connu que les domaines SH3 et SH2 des SFKs peuvent communiquer entre eux. En effet, l'engagement du domaine SH2 de Fyn par un peptide phosphotyrosine spécifique augmente l'association d'un ligand au domaine SH3. L'inverse est également possible (Panchamoorthy et al., 1994). Le mécanisme d'action des deux domaines régulateurs de Src42 devra être étudié plus en détail afin de déterminer leur participation dans la désinhibition de RAF. Il serait intéressant de vérifier si ces domaines, individuellement surexprimés en conditions non activée et activée, ont la capacité d'influencer négativement la région RIR. De façon générale, cette interaction s'apparente à celle observée chez les mammifères entre les protéines tyrosine kinases Src et FAK. En effet, la présence des deux domaines de Src est requise pour son interaction avec FAK, permettant ainsi d'obtenir une association de haute affinité (Thomas et al., 1998). D'autres molécules ont aussi été décrites comme ayant la capacité de lier les deux domaines de Src comme p62, Sam68 (Src-Associated substrate during Mitosis of 68 kDa), p130CAS, AFAP-110 (Actin Filament-Associated Protein of 110 kDa) et Sin (Src Interacting) (Guappone and Flynn, 1997; Nakamoto et al., 1996; Richard et al., 1995; Taylor et al.,

1995). Dans plusieurs cas, l'activation de Src suivant l'engagement de ses domaines régulateurs, entraîne la phosphorylation de ses partenaires protéiques. La caractérisation de la phosphorylation de CNK par Src42 sera discutée dans la section 3.5 (page 144).

Les études de complémentation de la létalité des différents mutants de CNK nous ont permis d'obtenir d'importants indices sur les mécanismes de régulation de CNK par Src42. En effet, la présence d'un transgène CNK^{RIRmut-Y1163F} dans un contexte *cnk*^{-/-} restaure parfaitement la viabilité, contrairement à un transgène CNK^{Y1163F} (Table I). Ces résultats suggèrent que l'effet positif intégré par la région Tyr1163 puisse être impliqué dans la désinhibition du RIR. Fait à noter, la mutation de la Tyr1163 en résidu phosphomimétique (acide glutamique) n'affecte en rien le potentiel inhibiteur de CNK, suggérant ainsi que la phosphorylation de la Tyr1163 ne semble pas être suffisante pour permettre le désengagement du RIR. En sachant que la Tyr1163 est requise pour l'association CNK/Src42, ces observations suggèrent qu'il existe une corrélation entre la désinhibition et la liaison de Src42. Il faut préciser que la mutation du RIR que nous avons utilisée est définie par le changement de trois acides aminés en alanine dans la région IS (M11). Cette mutation renverse l'effet inhibiteur de CNK tout en maintenant son interaction à RAF. En contrepartie, la mutation du RIM qui empêche l'association de RAF est incapable de restaurer la viabilité des mouches *cnk*^{-/-}, démontrant par conséquent l'importance physiologique de cette interaction pour la fonction de CNK (Douziech et al., 2005, manuscrit en préparation). Ces résultats sont contradictoires avec ceux obtenus biochimiquement dans les cellules S2. Selon ces études, l'activation de la voie ne requiert pas cette association. Le RIR aurait simplement la capacité d'inhiber l'activité de RAF. Ces observations semblent suggérer que l'interaction CNK/RAF n'est pas requise pour l'activation de la voie MAPK, quoique ce résultat puisse dépendre du type cellulaire utilisé. Elle pourrait cependant être essentielle dans la régulation d'autres voies de signalisation nécessaires pour la viabilité de la mouche. L'éventualité que CNK puisse être impliquée dans d'autres voies de signalisation sera discutée dans la section 3.5 (page 144). Le mécanisme moléculaire par lequel la liaison de Src42 à la région Tyr1163 pourrait contrecarrer l'effet inhibiteur du RIR n'a pas encore été clairement défini. Afin de déterminer précisément ces phénomènes, il faudrait tout d'abord connaître le mécanisme

moléculaire par lequel le RIR inhibe l'activité de RAF. Plusieurs hypothèses ont été avancées afin d'expliquer ce comportement. L'une des plus probables serait que le RIR puisse agir de façon allostérique sur le domaine kinase de RAF en maintenant sa conformation inactive. Les études cristallographiques de plusieurs kinases suggèrent qu'il existe différentes façons de maintenir un domaine kinase dans une conformation inactive incompatible pour la catalyse (Taylor and Radzio-Andzelm, 1997). Entre autres, CNK pourrait agir comme un pseudosubstrat, c'est-à-dire en prévenant l'accès de MEK au site actif de RAF. La kinase Twitchin et la PKA sont des exemples de protéines régulées par un mécanisme de pseudosubstrat. De façon surprenante, la séquence qui mime le substrat de ces kinases est composée de deux régions dont l'une lie le site actif et l'autre s'associe à une région en périphérie de ce dernier (Gibson et al., 1997; Hu et al., 1994; Taylor and Radzio-Andzelm, 1997). Le RIR de CNK pourrait se comporter de manière similaire. Un autre mécanisme d'inhibition serait qu'un acide aminé du RIR pourrait mimer l'anneau adénine de l'ATP et s'introduirait dans la pochette de fixation du nucléotide. Un mécanisme similaire a déjà été observé suite à la résolution de la structure cristalline de l'inhibiteur p27^{KIP} au complexe Cdk2-cyclinA. En effet, p27^{KIP} interagit entre autres avec le site actif en mimant l'ATP pour inhiber l'activité de Cdk2 (Russo et al., 1996; Taylor and Radzio-Andzelm, 1997). D'autres surfaces, autres que le site actif, pourraient également être utilisées afin de réguler négativement la conformation du domaine kinase de RAF. D'un autre côté, une autre explication plausible impliquerait l'association d'une protéine supplémentaire avec la séquence IS. Par exemple, la liaison d'un régulateur négatif qui réprimerait l'activité de RAF permettrait d'expliquer pourquoi, lorsque cette région est mutée, CNK n'est plus en mesure d'inhiber RAF et coopère avec RAS^{V12}.

En ne connaissant pas exactement le mécanisme d'inhibition de RAF par CNK, le mécanisme moléculaire de désinhibition médié par la liaison de Src42 demeure hypothétique. Nous savons que la désinhibition par Src42 n'entraîne pas de dissociation entre CNK et RAF. En effet, l'activation de la voie MAPK par SEV^{S11} dans les cellules S2 montre que le complexe CNK/RAF est maintenu (Figure 2.4B). La liaison CNK/Src42 sur la région Tyr1163 pourrait entraîner un changement conformationnel de la région du RIR et contrecarrer son effet négatif sur l'activité de RAF. Il a déjà été montré que la liaison des

domaines régulateurs des SFKs pouvait provoquer des changements conformationnels sur les protéines avec lesquelles elles interagissent. Entre autres, la liaison du domaine SH3 de Lyn sur la PDE4 (cAMP-specific family 4 phosphodiesterase), une enzyme impliquée dans la régulation de la signalisation de l'AMPc, entraîne un changement de conformation au niveau de son site actif, régulant ainsi l'association d'un inhibiteur compétitif spécifique (McPhee et al., 1999). Src semble également induire un changement conformationnel suite à son association à β -arrestin, lui permettant ainsi d'interagir avec AP-2 (clathrin adapter protein), une protéine essentielle à l'internalisation des GPCRs (Fessart et al., 2005). La désinhibition du RIR par Src42 pourrait également se faire par l'intermédiaire d'une protéine recrutée par la partie NT de Src42. Évidemment, il faudrait que cette composante médie ses effets positifs sur RAF via la désinhibition du RIR.

Le recrutement de RAF du cytoplasme à la membrane lors de l'activation de la voie MAPK par un RTK, constitue un aspect important de sa régulation. Le mécanisme moléculaire qui contrôle cette relocalisation n'est cependant pas encore compris. En sachant que CNK interagit avec RAF et que cette association n'est pas perturbée durant l'activation, il serait possible que CNK puisse être un transporteur de RAF alors que la liaison de Src42 permettrait de contrôler la modulation de ce complexe dans différents compartiments cellulaires. Une étude suggère d'ailleurs la participation de CNK dans ces phénomènes (Anselmo et al., 2002). Cependant, dans notre laboratoire, nous n'avons pas réussi à démontrer que CNK avait la capacité de contrôler la redistribution de RAF lors de l'activation de la voie MAPK. En fait, la localisation intracellulaire exacte de CNK durant l'activation de la voie demeure nébuleuse. Des études en immunohistochimie sur plusieurs tissus en développement ou des cellules en culture révèlent que CNK est localisée dans le cytoplasme, à la membrane, aux jonctions cellule-cellule de même que dans les compartiments périmoléculaires (Lanigan et al., 2003; Therrien et al., 1998) (Douziech et Therrien, résultats non publiés). Les études de fractionnement dans les cellules S2 nous ont révélé la présence de CNK autant dans la fraction cytoplasmique que membranaire. Plus précisément, sa localisation membranaire, comme celle de MAGUIN-1, se retrouve dans un complexe totalement Triton-insoluble (Yao et al., 1999). Curieusement, une étude dans les cellules COS montre que 80 % de la forme activée de C-RAF est localisée dans des

compartiments insolubles (Stokoe et al., 1994). Suite à l'activation du récepteur SEV^{S11}, nous n'avons remarqué aucune variation dans la localisation intracellulaire de CNK (fractionnement cellulaire). Ces résultats n'écartent pas totalement sa participation dans les phénomènes de relocalisation de RAF. Il est connu que seulement une fraction de RAF est relocalisée à la membrane, par conséquent, il serait possible que la sensibilité de nos essais ne nous permette pas de détecter les molécules de CNK qui ont été redistribuées. Fait à noter, la distribution subcellulaire de CNK n'affecte en rien, suivant l'activation du récepteur Sev, son niveau de phosphorylation en tyrosine. Autant la forme soluble que la forme Triton-insoluble deviennent phosphorylées. La caractérisation de la localisation intracellulaire du complexe CNK/RAF/Src42 suivant ou non l'activation de la voie MAPK par un RTK nécessitera d'autres analyses afin de comprendre comment ces molécules s'influencent mutuellement dans l'établissement de ces processus.

Les prochaines lignes comparent les différents mécanismes de régulation de RAF par les protéines de type SFKs et tentent de prédire si les processus décrits dans cette étude sont transposables aux mammifères. Tout d'abord, l'alignement des séquences entre les différents homologues de CNK n'a pas permis d'identifier les régions RIR et Tyr1163 dans les protéines de mammifères. Cependant, sachant que l'interaction de CNK avec RAF est conservée chez tous les homologues, il est possible de croire que les mécanismes moléculaires de régulation de CNK chez la Drosophile pourraient être similaires chez les mammifères même si leur séquence a divergé durant l'évolution. Il est connu que les petits motifs linéaires peuvent être soumis à de grandes variations évolutives (Nedeva and Russell, 2005). Il est possible de proposer que ce motif spécifique puisse avoir évolué parallèlement à RAF dans le but d'assurer son association. Un phénomène similaire a d'ailleurs été démontré chez la levure (Zarrinpar et al., 2003). La régulation positive de C-RAF (et probablement A-RAF) par Src chez les mammifères est principalement dictée par un événement de phosphorylation sur sa Tyr341. Cependant, cette régulation n'est pas conservée par toutes les isoformes de RAF. En effet, B-RAF n'est pas soumise à une phosphorylation par Src. Cette particularité provient principalement du fait que B-RAF ne possède pas la tyrosine normalement phosphorylée par Src (Tyr341 chez C-RAF) dans la région N. Chez C-RAF, la présence de charges négatives dans cette région, dictées par la

phosphorylation de la Tyr341 et de la Ser338, contribue à contrecarrer sa conformation inactive et à promouvoir son activation (Diaz et al., 1997; Fabian et al., 1993; Mason et al., 1999). Chez B-RAF, la Ser338 est constitutivement phosphorylée et la Tyr341 est remplacée par un aspartate (charge négative). Par conséquent, il a été observé que B-RAF possédait une activité basale élevée et qu'il ne requérait aucun événement de phosphorylation dans cette région pour faciliter son activation (Mason et al., 1999). Étant donné que B-RAF s'apparente fortement à RAF de Drosophile, on pourrait supposer que leur régulation puisse être similaire. En effet, chez la Drosophile, la Ser338 est conservée alors que la Tyr341 correspond à un résidu asparagine. Même si aucune étude n'a montré que le résidu équivalent à la Ser338 pouvait être phosphorylée, il est à noter que deux glutamates suivent ce résidu et que, comme chez B-RAF, ils pourraient contribuer aux charges négatives. Le fait que B-RAF possède une activité basale élevée suggère qu'il requiert un signal inhibiteur fort pour maintenir son activité kinase inactive (Mason et al., 1999). Il est donc possible de penser que B-RAF puisse être régulée par la liaison d'une séquence analogue au RIR située dans CNK de mammifères et que Src pourrait être impliquée dans cette désinhibition. Même si cette hypothèse reste à être évaluée, il est plausible de penser que B-RAF puisse être l'isoforme ancestrale qui aurait conservée le mécanisme de régulation qui dépend à la fois de CNK et de Src comparativement aux autres isoformes qui auraient divergé.

Il n'est pas exclu que les isoformes de C-RAF et de A-RAF puissent également être régulées par CNK. Même si ces isoformes sont régulées par une phosphorylation directe de Src, il serait possible que durant l'évolution, la présence de CNK soit demeurée essentielle. En fait, une étude récente suggère que CNK1 recrute Src et C-RAF pour former un complexe trimérique, facilitant ainsi la phosphorylation de C-RAF par Src (Ziogas et al., 2005). De façon surprenante, il a déjà été montré que C-RAF était capable d'interagir avec Src et que cette association nécessitait la présence des domaines SH2 et SH3 de Src (Cleghon and Morrison, 1994). Cependant, aucune interaction directe n'a été rapportée entre ces deux composantes. Une molécule intermédiaire (telle que CNK) pourrait donc participer à la formation d'un tel complexe.

Chez la *Drosophile*, nos résultats suggèrent que l'activité kinase de Src42 n'est pas requise pour l'activation de RAF et par conséquent, de la voie MAPK. Toutefois, il n'est pas complètement écarté que Src42 puisse phosphoryler RAF dans le but de réguler sa fonction au sein des processus indépendants de la voie MAPK. Nous avons de fait vérifié si, en coexpression, Src42 pouvait induire la phosphorylation de RAF. Cette analyse semble indiquer que RAF est phosphorylable par Src42. La caractérisation de ces événements reste à être effectuée.

La caractérisation des mutations issues des différents cribles génétiques dévoilent de l'information précieuse quant à l'identification des régions essentielles à la fonction d'une protéine. Il devient intéressant de tenter d'associer ces mutations à une fonction précise de la protéine et par conséquent de démontrer que cette fonction est requise dans un processus particulier *in vivo*. De façon surprenante, plusieurs mutations ponctuelles provenant des allèles de CNK identifiées durant le crible KDN sont situées dans la région Tyr1163. De plus, nous avons constaté qu'elles ont un impact négatif sur la phosphorylation de la Tyr1163 par SEV de même que sur l'interaction avec Src42. Nous suggérons, par conséquent, que la perte de fonction associée à ces mutations pourrait prévenir l'intégration des signaux RTKs en empêchant le mécanisme de désinhibition. Cette effet entraînerait l'inhibition de la voie MAPK et provoquerait la létalité des mouches. Toutefois, d'après nos résultats, nous n'avons pas été en mesure d'identifier le défaut moléculaire associé à ces mutations puisque l'anticorps anti phosphotyrosine (4G10) que nous utilisons n'est pas spécifique à la Tyr1163. Plus précisément, lorsque nous évaluons l'effet d'une mutation sur la phosphorylation de CNK, nous ne pouvons distinguer si la phosphorylation de la Tyr1163 est directement affectée ou si c'est le recrutement de Src42 qui est empêché, ce qui par conséquent, préviendrait la phosphorylation des autres tyrosines localisées ailleurs sur CNK (CNK en possède 39). Afin d'évaluer l'impact des allèles sur ces phénomènes, il serait possible en utilisant les petites formes de CNK qui ne possède que la Tyr1163 (CNK^{1016-1271(FFY)}), de vérifier si dans ce contexte, la reproduction des allèles affecte ou non la phosphorylation de cette tyrosine. L'utilisation d'un anticorps spécifique anti-phospho-Tyr1163 pourrait aussi faciliter l'éclaircissement de l'impact associé à ces allèles.

Du côté des allèles de Src42, nous proposons qu'ils soient des gains de fonction. En effet, selon l'analyse structurale, ces mutants à conformation ouverte seraient capables de lier CNK pour contrecarrer la région inhibitrice. Le mécanisme moléculaire qui pourrait expliquer la corrélation entre l'activité gain de fonction de ces allèles et leur interaction à la région Tyr1163 reste cependant à être démontré. Une possibilité serait que la stoechiométrie d'association entre CNK et ces mutants soit déséquilibrée. Par exemple, les mutations pourraient favoriser une association soutenue avec CNK suivant l'exposition de leurs domaines régulateurs, se traduisant alors en une désinhibition constante du RIR. Il faudrait déterminer si *in vivo*, ces mutants s'associent plus fortement ou plus longtemps à CNK comparativement à une forme sauvage. Parallèlement, nous ne savons pas si ces mutants dépendent toujours de la signalisation endogène. En fait, il se pourrait que ces mutations ne soient pas en elles-mêmes suffisantes pour ouvrir complètement la structure tridimensionnelle et dépendraient d'un signal RTK pour s'associer à CNK. Cependant, suite à leur association, leur structure pourrait être stabilisée prolongeant ainsi leur association et la désinhibition du RIR de façon soutenue.

Les protéines de la famille des SFKs possèdent plusieurs fonctions redondantes chez les mammifères (Bromann et al., 2004). Il devenait donc important de s'assurer que les mécanismes de régulation de CNK par Src42 n'étaient pas redondants avec d'autres SFKs chez la Drosophile. Plus particulièrement, il existe deux gènes appartenant à la famille des SFKs, soit *Src42* et *Src64* (Simon et al., 1985; Takahashi et al., 1996). Même si Src42 semble être le plus proche homologue de Src de mammifères, il a été montré que sa fonction pouvait tout de même être redondante avec celle de Src64 au cours des nombreux processus cellulaires régissant l'embryogenèse (Takahashi et al., 2005; Tateno et al., 2000). De plus, Src64 possède entre autres la capacité d'influencer la différenciation des photorécepteurs, suggérant ainsi qu'elle puisse participer à la régulation de la voie MAPK (Kussick et al., 1993; Li et al., 2000). Nous avons également tenté de voir si d'autres protéines tyrosine kinases pouvaient être impliquées dans la régulation de CNK. Tec29, qui n'est pas une SFKs, appartient plutôt aux protéines tyrosine kinases cytoplasmiques de la famille des BTKs/TECs. Ces enzymes sont impliquées dans la signalisation en aval des cytokines et du récepteur des cellules T. Elles participent, entre autres, à l'activation de la

voie MAPK chez les mammifères (Schwartzberg et al., 2005). L'activation des TECs requiert préalablement une phosphorylation par un membre des SFKs (Rawlings et al., 1996). Chez la Drosophile, Tec29 a été identifiée comme molécule fonctionnant en aval de Src64 durant la formation des canaux en forme d'anneaux durant l'oogenèse (Guarnieri et al., 1998; Roulier et al., 1998). De plus, une étude génétique réalisée chez la Drosophile a montré que Tec29 pouvait être impliquée positivement dans l'activation de la voie MAPK et qu'elle avait la capacité d'interagir génétiquement avec Src42 (Li et al., 2000; Tateno et al., 2000). Nous nous sommes donc intéressés à la fonction de ces deux protéines tyrosine kinases dans les mécanismes de régulation de CNK par les RTKs. L'analyse de Src64 et Tec29 dans notre système de cellules en culture nous a cependant montré qu'aucune de ces composantes n'avait la capacité d'influencer la phosphorylation de CNK, ni l'activation de la voie MAPK en aval de SEV. Leur présence ne semble pas non plus être requise pour l'activation de la voie MAPK par d'autres récepteurs dont celui à l'EGF et à l'insuline. Aucune redondance n'a d'ailleurs été observée durant notre étude (Laberge et Therrien, résultats non publiés). Néanmoins, ceci n'exclut pas qu'elles pourraient être impliquées dans la régulation de CNK en aval d'autres RTKs ou dans d'autres types cellulaires. Certaines données préliminaires montrent qu'en surexpression, Src64 (et non Tec29) peut phosphoryler et s'associer à CNK. Nous ne savons pas si la Tyr1163 est importante pour cette association. La fonction de Src64 au sein des mécanismes de régulation de CNK reste donc à être déterminée.

3.4. Fonction de CNK dans l'orchestration des différentes voies de signalisation conduisant à l'activation du module MAPK

Les protéines d'échafaudage ont été décrites comme étant des molécules qui facilitent l'assemblage de complexes multiprotéiques et qui participent à l'établissement d'une spécificité au sein des mécanismes de transmission des signaux (Burack and Shaw, 2000; Vondriska et al., 2004). L'ensemble des études de notre laboratoire démontre que CNK interagit avec plusieurs composantes de la voie MAPK et qu'elle possède la capacité d'intégrer au moins deux signaux indépendants impliqués dans la régulation de l'activité de RAF. Ces observations supportent son rôle comme protéine d'échafaudage de la voie

MAPK. L'analyse des différentes propriétés de CNK aurait de plus confirmé sa capacité d'orchestrer les différentes voies de signalisation qui convergent vers la cascade MAPK. En fait, la détermination de son comportement provient essentiellement d'une étude structure-fonction qui a permis de mettre en lumière son activité bimodale, c'est-à-dire de réguler soit positivement, soit négativement l'activité de RAF (Douziech et al., 2003). En résumé, ces données ont montré que sa partie NT, via ses domaines SAM et CRIC, intègre positivement les signaux provenant de RAS alors que le RIR, situé en CT, exerce un effet négatif sur RAF. D'un côté, ces effets permettent de stimuler la transmission du signal entre RAS et RAF et de l'autre, prévenir la phosphorylation de MEK par RAF (Douziech et al., 2003). Récemment, le mécanisme d'intégration des signaux positifs de la partie NT a été mieux défini. En fait, il a été montré que les effets de RAS intégrés dans cette région auraient la capacité de moduler spécifiquement l'activité kinase de RAF. Ce mécanisme provient d'une étude qui démontre qu'une forme activée du domaine kinase de RAF, caractérisée par la présence d'acides aminés acides dans sa boucle d'activation (RAF^{ED}), peut toujours être stimulée par RAS^{V12} mais n'est plus en mesure d'intégrer les effets induits suivant la surexpression de la partie NT de CNK (Douziech et al., 2005, manuscrit en préparation). Des observations concordantes ont été récemment rapportées chez *C. elegans* (Rocheleau et al., 2005). L'effet positif du NT de CNK sur l'activation de RAF dépend à la fois de KSR et de HYP, une nouvelle composante de la voie (Douziech et al., 2005, manuscrit en préparation). Cette dernière est principalement composée d'un domaine SAM et, au même titre que KSR, interagit avec la partie NT de CNK. La façon dont cette molécule pourrait participer dans la transmission des signaux n'est pas encore tout à fait clair, mais il a été proposé qu'elle puisse agir comme molécule stabilisant la liaison CNK/KSR. Cette hypothèse provient du fait que l'enlèvement de HYP prévient l'association entre CNK et KSR (Douziech et al., 2005, manuscrit en préparation). Il a aussi été observé que ce type de molécules, suite à leur association à d'autres domaines SAM, peut réguler la transmission des signaux en modulant les processus d'oligomérisation et/ou de polymérisation (Qiao and Bowie, 2005). Par exemple, la phosphorylation de YAN par MAPK, lequel est un facteur de transcription de la famille Ets, est dépendante de son association avec une autre protéine appelée Mae (modulator of the activity of Ets) via l'association de leurs domaines SAM respectifs (Baker et al., 2001). En fait, Mae est

capable de recruter MAPK et d'induire la dépolymérisation du domaine SAM de YAN, favorisant ainsi l'exposition de son site de phosphorylation (Ser127) (Qiao et al., 2004). HYP pourrait être impliqué dans la régulation de l'oligomérisation du domaine SAM de CNK et par le fait même dans la modulation positive de l'activité de RAF par KSR. Même si certaines évidences suggèrent que CNK pourrait exister sous forme d'oligomères chez les mammifères, d'autres analyses seront nécessaires afin de montrer comment ces phénomènes régulent la fonction de CNK et de déterminer le rôle de HYP dans ces événements (Ohtakara et al., 2002; Ziogas et al., 2005).

L'analyse des partenaires de CNK suggère que la majorité de ces composantes (sauf Src42) sont préassemblées, c'est-à-dire qu'elles forment un complexe multiprotéique en condition inactive (Figure 3.1). Suite à l'activation d'un RTK, différents signaux impliquant RAS et Src sont intégrés par CNK. Il est connu que RAS peut interagir directement avec RAF afin d'initier son recrutement à la membrane et de participer à l'ouverture de sa conformation inactive. Cependant, il est connu que ces événements ne sont pas suffisants pour activer complètement RAF. CNK, via HYP et KSR, pourrait permettre l'intégration d'un signal également en provenance de RAS, provoquant ainsi un effet positif sur l'activité de RAF (Figure 3.1). Le mécanisme moléculaire par lequel CNK stimule la fonction de KSR n'est pas encore clairement défini. Cependant, il a été proposé que CNK puisse moduler la conformation du domaine kinase de KSR au moyen d'une régulation allostérique (Douziech et al., 2005, manuscrit en préparation). KSR ne semble pas avoir d'activité kinase. Son rôle au sein du processus d'activation de la voie serait de rapprocher et d'exposer le substrat MEK à RAF (Roy et al., 2002). Cependant, la caractérisation de la fonction de KSR au sein du complexe KSR/RAF/MEK/CNK^{NT} suggère que son mécanisme d'action ne se résume pas à une simple activité d'échafaudage (Douziech et al., 2005, manuscrit en préparation). En effet, des mutants du domaine kinase de KSR (KSR^{A696V-A703T} et KSR^{R732H}) qui possèdent toujours la capacité d'échafauder ne peuvent plus soutenir l'activation de MEK par RAF. Il a été proposé que KSR puisse favoriser l'ouverture de la boucle d'activation du domaine kinase de RAF, facilitant ainsi son activation (Figure 3.1). D'ailleurs le mutant RAF^{ED} est insensible à l'activité de KSR, supportant ainsi cette hypothèse (Douziech et al., 2005, manuscrit en préparation). Ce

mécanisme de transactivation entre KSR et RAF pourrait s'apparenter à celui proposé pour induire l'activation de C-RAF par B-RAF. En effet, il semblerait que des mutants de B-RAF (oncogéniques) qui n'ont aucune activité catalytique ont pourtant la capacité d'activer la voie MAPK endogène par un mécanisme qui dépend de C-RAF. Il a été proposé que cette transactivation soit le résultat d'une modification allostérique résultant de leur

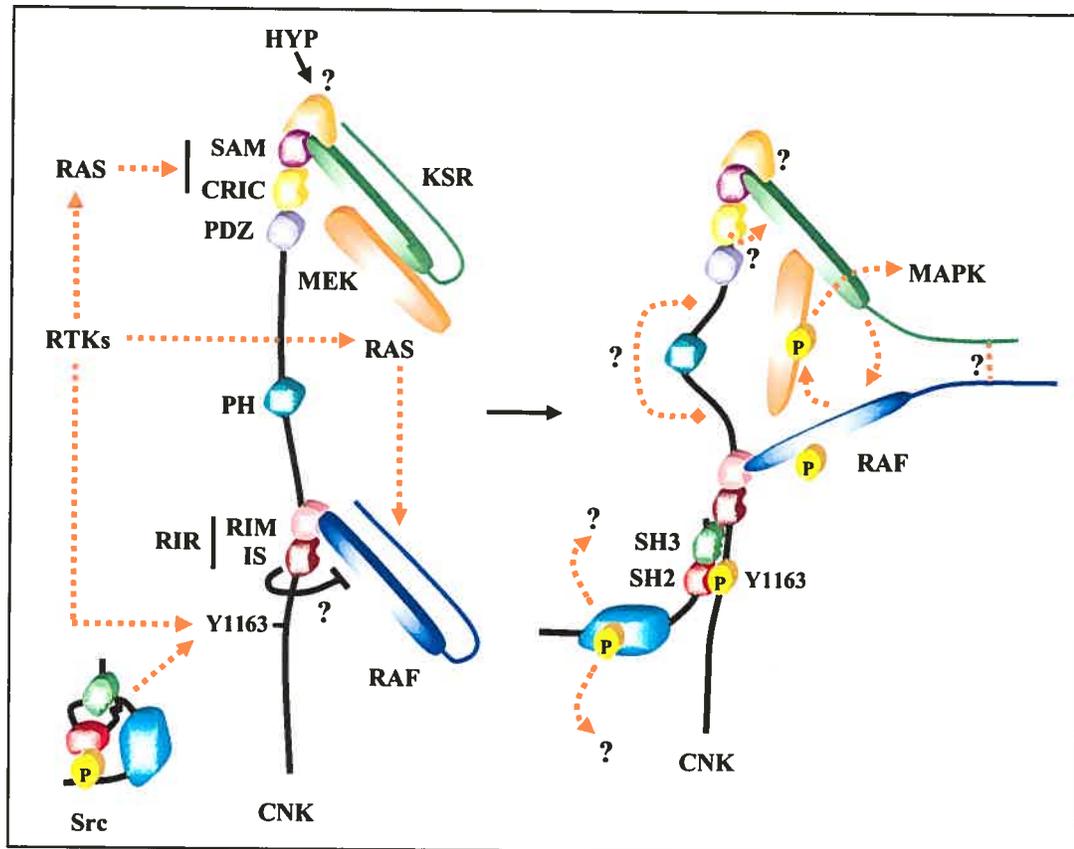


Figure 3.1 Représentation schématique du mécanisme d'activation de CNK suite à l'activation d'un RTK.

hétérodimérisation (Wan et al., 2004). CNK pourrait, au même titre que la protéine d'échafaudage STE5, avoir la capacité de moduler l'accessibilité des différentes kinases associées pour faciliter la transmission de signaux au sein de la voie MAPK. En fait, dans le cas de STE5, il a été suggéré que le recrutement de STE5 aux sous-unités G β γ , suite à une stimulation par la phéromone, induit un changement conformationnel qui lui permettrait l'exposition et l'orientation adéquates des kinases associées favorisant ainsi la phosphorylation séquentielle de la cascade (Sette et al., 2000). De façon analogue, même si le complexe CNK/KSR/RAF semble préformé, l'intégration d'un signal RAS pourrait de façon conformationnelle favoriser leur rapprochement et soutenir l'activation de RAF par KSR. Ce rapprochement pourrait également être stabilisé par l'interaction des parties NT de KSR et de RAF (Roy et al., 2002) (Figure 3.1).

Du côté des signaux de Src42, ceux-ci pourraient s'assurer que l'inhibition sur RAF soit relevée (Figure 3.1). Cependant, il n'est pas totalement écarté que cette association puisse également induire un changement de conformation qui se répercute non seulement sur le RIR, mais également sur la structure globale de CNK, favorisant ainsi la transmission des signaux entre KSR et RAF. Il serait intéressant de vérifier si l'association de Src42 influence positivement l'association entre KSR/RAF. L'ensemble de ces événements permettrait de contrôler spécifiquement l'activation de RAF et suggère fortement que CNK, tout comme STE5, n'est pas une simple protéine d'échafaudage qui agit passivement. Pour ce qui est du domaine CRIC, aucune fonction précise n'a pu lui être attribuée (Douziech et al., 2005, manuscrit en préparation). Récemment, MLK3, une MAPKKK principalement impliquée dans la voie JNKs, a été caractérisée comme molécule capable d'induire l'activation de RAF (Chadee and Kyriakis, 2004). Il a été montré que CNK1 pouvait interagir avec cette dernière via son domaine CRIC (Jaffe et al., 2004). La fonction de cette interaction et son impact sur la régulation de RAF chez la *Drosophile* restent à être démontrés.

Nous croyons que les différentes propriétés de CNK pourraient générer de la spécificité lors de l'activation de la voie MAPK. Tout d'abord, le comportement de CNK permet de contrôler les mécanismes de transmission de signaux autant en condition inactive

qu'active. En condition non stimulée, CNK maintient RAF et l'empêche de phosphoryler MEK. Lorsque la voie est stimulée, les deux signaux sont intégrés pour réguler positivement l'activité de RAF. Un tel comportement (à double activité) a aussi été observé chez d'autres protéines d'échafaudage impliquées au sein de différentes voies de signalisation. La protéine Costal-2 (drosophile) par exemple, est requise positivement durant l'activation de la voie Hedgehog et forme un complexe multiprotéique avec différentes molécules, facilitant ainsi la transmission du signal. Dans une condition inactive par contre, Costal-2 prévient l'accumulation nucléaire de Cubitus interruptus, un facteur de transcription essentiel à l'expression des gènes cibles de cette voie (Kalderon, 2004; Lum et al., 2003). La protéine d'échafaudage de la voie JNK appelée JIP, semble également avoir des propriétés qui lui permettent de réguler positivement et négativement la voie. En absence d'un signal, JIP est capable de s'associer avec une forme monomérique et inactive de DLK (Dual Leucine zipper bearing Kinase). Après stimulation, DLK dimérise et s'autophosphoryle pour permettre l'activation du module JNK. Même si l'activation de DLK requiert sa dissociation du complexe, la fonction de JIP favorise la formation d'un complexe multiprotéique rapprochant les membres de la cascade JNK (Nihalani et al., 2001; Whitmarsh et al., 1998).

La particularité de CNK à intégrer deux signaux indépendants pourrait générer de la spécificité lors de l'activation de RAF par RAS pour la mise en œuvre de processus cellulaires particuliers. Il est connu que RAS peut interagir avec plusieurs molécules effectrices pour ensuite contrôler l'activation des différentes voies de signalisation (Ehrhardt et al., 2002; Shields et al., 2000). CNK pourrait être l'intégrateur spécifique de la voie MAPK en recevant, directement du RTK, un signal lui indiquant de relever l'inhibition sur RAF pour que RAS puisse moduler positivement son activité. Cette spécificité d'action pourrait se manifester dans différents compartiments ou types cellulaires. Par exemple, il est connu que les protéines d'échafaudage peuvent recruter des modules de signalisation dans des compartiments cellulaires distincts afin de contrôler spécifiquement la transmission des signaux (Garrington and Johnson, 1999). Il est connu que MP1, par exemple, régule la voie MAPK à partir des endosomes tardifs (Teis et al., 2002; Wunderlich et al., 2001). Il serait possible que CNK recrute RAF dans des endroits

précis de la cellule pour la régulation de la voie MAPK lors de la mise en œuvre de processus biologiques particuliers. L'intégration de ces deux signaux serait nécessaire pour médier l'activation du module MAPK dans ces compartiments. D'un autre côté, la spécificité d'activation d'une voie de signalisation en aval d'un RTK peut être précisément déterminée par les différentes composantes présentes en aval de ce récepteur. En effet, chez *C. elegans*, une étude montre que la fonction du RTK LET-23 dans divers tissus pourrait être déterminée par ses phosphotyrosines qui recrutent différentes molécules effectrices présentes dans un type cellulaire particulier (Lesa and Sternberg, 1997; Tan and Kim, 1999). La régulation de RAF par CNK en aval des RTKs pourrait être régulée différenciellement selon le type cellulaire pour engendrer des réponses spécifiques. Par exemple, l'activation de la voie MAPK par un RTK donné dans deux types cellulaires différents peut ou non faire intervenir l'activation de Src. Cette différence pourrait faire varier l'activation de différents effecteurs de RAS puisque CNK n'a pas reçu le signal de désengager RAF.

Il serait également possible que cette particularité d'intégrer deux signaux se répercute sur différents aspects de l'activation de la voie MAPK tels que la durée et l'amplitude du signal. La régulation de RAF par le RIR pourrait modifier la cinétique de phosphorylation de MEK. Dans un sens opposé, la partie NT, via HYP et KSR, pourrait agir comme catalyseur et stimuler l'activité de RAF. Afin d'investiguer ces questions, il faudrait déterminer si dans certains cas, RAF peut être activée indépendamment de CNK. Par le fait même, il serait également intéressant d'analyser le comportement enzymatique de RAF lorsque ce dernier est associé ou non à CNK.

Une question importante par rapport à l'intégration des deux signaux par CNK concerne la pertinence de chacun d'eux au sein du processus d'activation de RAF. Les signaux RAS et Src sur CNK sont-ils corequis ou bien la présence de l'un d'eux est-elle suffisante pour médier l'activation de RAF ? Nos expériences ne permettent pas d'établir clairement l'impact individuel de chacune de ces voies sur l'activité de RAF. Les prochaines lignes discutent de certains résultats obtenus par rapport à la participation de chacune de ces voies qui convergent sur CNK.

Tout d'abord, l'abolition du potentiel inhibiteur de la région RIR ne semble pas suffisante, en elle-même, pour médier une suractivation de la voie MAPK et causer un phénotype d'œil rugueux. Par exemple, la présence d'un transgène de CNK (CNK^{M11}) ou d'un allèle mutant de Src42 (Src42^{S-382}) qui ont la capacité de réprimer l'effet inhibiteur de CNK, ne sont pas en eux-même des gains de fonction. Ces observations pourraient être reliées à la propriété de CNK d'intégrer deux signaux (RAS et Src) corequis pour assurer l'activation de la voie MAPK. Même si dans une condition où le RIR n'exerce plus d'effet inhibiteur (CNK^{M11} ou Src42^{S-382}), l'activation de RAF n'est pas complète et requiert également un signal provenant de RAS. À ce moment, le signal RAS s'apparente à une situation physiologique et n'augmente pas plus la fraction de RAF activée, ce qui se traduit par une activation normale de la voie MAPK. Cependant, lorsque RAS^{V12} est surexprimée, l'équilibre entre les signaux RAS et Src intégrés par CNK est modifié. La partie NT de CNK reçoit constitutivement un signal RAS qui se répercute positivement sur l'activité de RAF. Dès lors, la signalisation Src42 endogène n'est pas suffisante pour totalement relever l'inhibition de la région RIR. La présence des allèles de Src42 (ou CNK^{M11}) peuvent par conséquent augmenter la fraction de RAF désinhibée et stimuler son activation. Il serait donc possible de proposer que CNK puisse être une composante se retrouvant à la jonction de deux voies de signalisation convergentes et que celles-ci soient corequises pour l'activation maximale de RAF et de la voie MAPK. Certains résultats corroborent cette hypothèse. Nous avons observé que dans les cellules S2, l'activation de la voie MAPK par Src42 requiert non seulement CNK, mais aussi RAS, DRK (GRB2) et SOS. De plus, une mutation dans RAS supprime le nombre de cellules R7 additionnelles dans les mouches Src42^{Y511F} (Takahashi et al., 1996). Ceci pourrait également expliquer pourquoi les deux voies RAS et Src, qui convergent sur CNK, coopèrent très bien ensemble (Figure 7B).

Nos recherches proposent que CNK ait la capacité d'intégrer, indépendamment de l'activation de RAS, un signal Src qui se répercute positivement sur la fonction de RAF en désengageant le RIR. Ceci nous amène à nous questionner sur l'impact moléculaire de cet événement. Dans certains cas, serait-il possible que cette désinhibition soit suffisante en elle-même pour stimuler l'activité de RAF en absence de RAS ? Les premières évidences d'un tel mécanisme ont été démontrées chez la Drosophile. Ces analyses ont été effectuées

à l'aide du RTK TORSO. Ce récepteur régule la différenciation des deux extrémités terminales de l'embryon via l'activation de la voie RAS/MAPK (Duffy and Perrimon, 1994). Le niveau d'activation de la voie peut être évalué en mesurant la surface d'expression de facteurs de transcription spécifiques au niveau des pôles de l'embryon. Les résultats suggèrent que RAF puisse être activée par TORSO même en complète absence de RAS. En fait, l'analyse d'un allèle nul de *RAF* produit un phénotype beaucoup plus sévère que ceux générés par l'élimination des gènes *RAS*, *DRK* ou *SOS*, suggérant ainsi la possibilité que RAF puisse être activée par une voie indépendante de RAS (Hou et al., 1995). Ces analyses sont d'ailleurs supportées par la caractérisation d'un phénotype associé à un allèle hypomorphique de RAF, appelé *RAF^{C110}*. Même si cet allèle contient une mutation dans son domaine RBD qui prévient son association à RAS, il produit un phénotype moins sévère qu'une perte de fonction (*D-Raf¹⁻²⁹*), suggérant ainsi que RAF puisse toujours avoir la capacité de recevoir des signaux du RTK TORSO (Hou et al., 1995; Melnick et al., 1993). En supposant que l'activité résiduelle de *DRAF^{C110}* dépende de l'intégration d'une voie indépendante de RAS, un crible génétique a été effectué dans le but d'identifier des mutations dominantes qui suppriment la létalité associée à cette mutation (Lu et al., 1994). Étonnement, l'un des gènes identifiés ayant le potentiel de renverser cette létalité est *Src42A* (Zhang et al., 1999). De façon comparable au crible *KDN*, la caractérisation de cet allèle propose que *Src42* fonctionne comme régulateur négatif. Cependant, une délétion qui enlève le gène de *Src42*, est incapable de supprimer la létalité (Lu and Li, 1999) (Suppl. Table 2.1). Ces résultats suggèrent donc que cette mutation possède un effet gain de fonction comme celles caractérisées dans notre étude, confirmant ainsi la possibilité que ces mutants puissent participer aux mécanismes d'activation de RAF indépendamment de RAS. D'ailleurs, contrairement à l'analyse dans l'œil de la mouche, cet allèle gain de fonction de *Src42* montre qu'il peut réguler positivement en elle-même la voie MAPK en aval du récepteur TORSO même en complète absence de RAS (Lu and Li, 1999). La particularité de cet allèle de *Src42* capable de renverser la létalité associée à *DRAF^{C110}* a été mise à profit dans le but de générer un autre crible génétique qui permettrait d'identifier les molécules nécessaires à cette sauvegarde. Ce crible a isolé, entre autres, un gène appelé *semang* qui encode pour une protéine dont la fonction est requise dans la voie MAPK (Zhang and Lu, 2000; Zhang et al., 1999). Afin de déterminer

si CNK, comme *semang*, peut participer à la régulation de RAF par Src en absence de RAS, il serait intéressant de déterminer si une perte de fonction de CNK a la capacité d'inhiber la sauvegarde de l'allèle *DRAF*^{C110} dans cette condition. Il reste que cette régulation pourrait s'effectuer dans un contexte cellulaire particulier ou en aval d'un RTK spécifique.

La caractérisation d'une telle voie chez les mammifères n'a pas encore été clairement caractérisée. Toutefois, quelques articles abordent la possibilité de son existence. La caractérisation d'un mutant de C-RAF incapable de lier RAS peut toujours s'autophosphoryler et induire l'activation de MEK1 lorsqu'il est coexprimé avec une forme activée de Src. Le mécanisme d'activation de ce mutant de C-RAF pourrait impliquer une phosphorylation directe par Src et pourrait même conduire à la phosphorylation de substrats autres que MEK (Fabian et al., 1994; Ziogas et al., 1998). Par contre, dans d'autres systèmes cellulaires, l'activation de C-RAF par un mécanisme indépendant de RAS, peut se faire sans phosphorylation sur résidus tyrosines (Lee et al., 2003; Zou et al., 1996). Du côté de B-RAF, la caractérisation d'une voie indépendante de RAS a cependant été démontrée. Son activation est médiée par RAP1, une petite GTPase très apparentée à RAS qui permet une activation soutenue de la voie MAPK en réponse au NGF en s'associant à B-RAF (Ohtsuka et al., 1996; Vossler et al., 1997; York et al., 1998). La pertinence de Src au sein de ce processus a également été exposée (Schmitt and Stork, 2002). Parallèlement, la présence de RAP1 chez la *Drosophile* semble participer à l'activation de la voie MAPK de manière indépendante de RAS en aval du RTK TORISO (Hariharan, 2005; Mishra et al., 2005). La détermination de cette voie de signalisation indépendante de RAS reste à être caractérisée.

3.5. Implication de CNK dans d'autres voies de signalisation

Notre étude a permis de caractériser la fonction de CNK au sein des mécanismes de régulation et d'activation de la voie MAPK. Cependant, plusieurs études chez les mammifères suggèrent que CNK puisse également posséder la capacité de réguler d'autres processus cellulaires dont plusieurs sont indépendants de l'activation de la voie MAPK tels que l'apoptose, la différenciation neuronale et la signalisation RHO (Bumeister et al., 2004; Jaffe et al., 2004; Jaffe et al., 2005; Rabizadeh et al., 2004).

Nous savons que la phosphorylation de la Tyr1163 ne nécessite pas la présence de Src42. Cependant, nous observons que sa déplétion par ARNi diminue fortement la phosphorylation globale de CNK induite par SEV. Nous avons remarqué que ces événements de phosphorylation ne semblent pas influencer les niveaux d'activation de la voie MAPK, suggérant ainsi qu'ils puissent potentiellement participer à l'activation d'autres voies de signalisation. L'engagement des domaines régulateurs de Src42 sur CNK pourrait non seulement se répercuter positivement sur la région RIR, mais pourrait également avoir un effet en stimulant sa propre activité kinase. D'ailleurs, il a été observé que le mécanisme d'activation de Src, via l'association de ses domaines SH3 et SH2, est directement couplé au rapprochement de ces substrats cellulaires appropriés (Boggon and Eck, 2004). De façon similaire, il a été montré que l'engagement des domaines SH3 et SH2 de Src sur FAK favorise la stimulation de son activité kinase. En fait, FAK devient une meilleure cible de phosphorylation (Thomas et al., 1998). Nous proposons que la région Tyr1163 de CNK encode pour une séquence de haute affinité pour la liaison des domaines régulateurs de Src42, ce qui favoriserait par la suite la phosphorylation de CNK. Les essais kinase *in vitro* effectués sur les immunoprécipitations de CNK ont permis de supporter cette hypothèse. En effet, dans ces conditions, CNK devient phosphorylée sur résidus tyrosines par Src42. Même si nous ne pouvons exclure à 100 % que cet événement pourrait provenir d'une autre tyrosine kinase (qui dépend de Src42), ces expériences suggèrent fortement que Src42, complexé à CNK suivant l'activation de SEV, est actif pour ensuite phosphoryler CNK.

Nous ne connaissons pas l'identité de ces nouveaux sites de phosphorylation, mais leur identification et leur caractérisation *in vivo* nous permettront peut-être de démontrer leur pertinence sur la fonction de CNK dans d'autres voies de signalisation intracellulaires. CNK pourrait agir comme plate-forme protéique multifonctionnelle en recrutant des composantes possédant des domaines SH2 capables de réguler l'activation de ces différentes voies. Il existe une variété de ce type de protéines en aval des RTKs qui exerce une telle fonction, dont IRS (Insulin Receptor Substrate), FRS2 et GAB (Schlessinger, 2000). Ces protéines sont localisées à la membrane via un site d'ancrage spécifique, et deviennent phosphorylées en tyrosines suivant l'activation des RTKs. Ces

phosphotyrosines vont recruter différentes molécules de signalisation qui ont des domaines SH2 dans le but d'initier des cascades de signalisation et ainsi mettre en œuvre certains processus cellulaires spécifiques. La phosphorylation de CNK par Src42, suite à l'activation des RTKs, pourrait faciliter la transmission par un mécanisme analogue. Entre autres, nous avons observé que la partie NT de CNK pouvait être phosphorylée par SEV (Figure 2.1B et Suppl. Figure 2.1). Une tyrosine conservée dans le domaine SAM de CNK (Tyr28) pourrait être un site potentiel. D'ailleurs, il a été démontré que ce résidu, au sein du domaine SAM du récepteur à l'éphrine, était capable de recruter des protéines à domaines SH2 (Stein et al., 1996; Stein et al., 1998).

La phosphorylation de CNK pourrait être impliquée au cours de la différenciation neuronale. En effet, l'ensemble des recherches réalisées à la fois au laboratoire et dans les cellules de mammifères, suggère qu'il puisse exister une corrélation entre CNK, les SFKs et la croissance des axones. De façon surprenante, l'activation du module RAS/MAPK, suite à l'activation d'un RTK, est requise sans toutefois être suffisante en elle-même pour induire la différenciation des cellules PC12 (Peng et al., 1995). La participation d'une voie de signalisation indépendante nécessitant Src serait également essentielle à la croissance des axones (Kremer et al., 1991; Vaillancourt et al., 1995). Il semble qu'il en soit également ainsi durant la différenciation des cellules H19-7 en neurones. En effet, la voie MAPK est essentielle, mais insuffisante en elle-même pour assurer leur différenciation. En fait, deux voies de signalisation sont requises, l'une sollicitant la participation de Src, l'autre celle de RAS et RAF par des mécanismes qui sont à la fois dépendants et indépendants de MAPK (Kuo et al., 1996; Kuo et al., 1997). En sachant que CNK peut intégrer des signaux RAS et Src qui se répercutent sur l'activité de RAF, serait-il possible que CNK puisse être la composante permettant la régulation de ces processus ? Certaines études sur la fonction physiologique de Src dans la formation des axones a permis de mieux comprendre cette voie de signalisation. D'abord, il a été montré que la fonction *in vivo* des SFKs était importante dans la formation des axones (Beggs et al., 1994; Ignelzi et al., 1994). La caractérisation de ces événements montre que l'association de Src aux protéines d'échafaudage CAS et SIN est essentielle. Cette interaction entraîne leur phosphorylation par Src et médie le recrutement de molécules à domaines SH2 telles CrkL (or CrkII) ou

Nck (Teng et al., 1995; Yang et al., 2002). Évidemment, ces molécules ont le potentiel d'influencer la réorganisation du cytosquelette via la modulation des petites GTPases, un processus qui est d'ailleurs essentiel pour la croissance des axones durant la différenciation neuronale. Par exemple, la signalisation en aval de Crk requiert la présence des petites GTPases RHO et RAC (Altun-Gultekin et al., 1998; Klemke et al., 1998). Il a également été montré que cette signalisation Src via le recrutement du complexe Crk/C3G conduit à l'activation de la petite GTPase Rap1 (Anneren et al., 2000; Xing et al., 2000).

De concert avec la caractérisation de Src dans les cellules PC12 et les résultats obtenus durant notre étude, nous suggérons que CNK puisse se comporter de manière similaire aux protéines d'échafaudage CAS/Sin en intégrant un signal Src nécessaire à l'induction des mécanismes impliqués dans la formation des axones. La première évidence qui suggère la participation de CNK dans la différenciation neuronale, et plus particulièrement dans la croissance des axones, nous provient d'une étude chez les mammifères. Il a été montré que CNK2 joue un rôle dans la différenciation des cellules PC12 indépendamment de sa contribution lors de l'activation de la voie MAPK par le RTK NGF (Bumeister et al., 2004). D'autre part, l'interaction de CNK avec Src42 induit la phosphorylation de CNK et ressemble fortement à celle de Src avec CAS/Sin. CNK pourrait être l'intégrateur des différentes voies de signalisation relayées par RAS et Src dans le but d'induire la différenciation neuronale. En fait, l'activation de la voie MAPK pourrait être médiée par les mécanismes que nous avons proposés dans cette étude, soit par l'intégration des signaux RAS par la partie NT et relâcher l'effet inhibiteur du RIR suivant la liaison de Src42 à la région Y1163. Sachant que durant la différenciation neuronale l'activation de la voie MAPK n'est pas suffisante pour induire la croissance des axones, il serait possible que la phosphorylation de CNK par Src puisse inciter le recrutement de molécules à domaines SH2 impliquées dans la transmission des signaux requis pour la formation des axones. Cette activation pourrait aussi nécessiter l'activité de RAF pour la régulation de substrats autres que MEK. Par le fait même, C-RAF est capable de réguler la signalisation RHO et la migration cellulaire en s'associant avec la kinase Rok- α , un effecteur de RHO (Ehrenreiter et al., 2005).

Les signaux intégrés par CNK suite à l'activation de SEV, un récepteur réputé pour induire la différenciation du photorécepteur R7, permettraient par conséquent l'activation des différentes voies nécessaires à une réponse spécifique. CNK pourrait par exemple soutenir la transcription via l'activation de la voie MAPK tout en assurant la réorganisation du cytosquelette essentielle au processus de croissance des axones. Cette potentielle voie de signalisation Src corrobore certaines données démontrant l'interrelation de la fonction de CNK avec plusieurs molécules impliquées dans la réorganisation du cytosquelette (Bumeister et al., 2004; Jaffe et al., 2004; Jaffe et al., 2005). CNK pourrait être impliquée dans la formation d'un complexe multiprotéique regroupant non seulement des composantes de la voie MAPK, mais également des molécules impliquées dans la réorganisation du cytosquelette. Chez la levure, STE5 semble faire partie d'un tel complexe. En effet, il a été montré qu'elle pouvait interagir avec Bem1 (Bud Emergence mediator 1), une protéine d'échafaudage ayant la capacité de s'associer à des molécules contrôlant le réarrangement polarisé de l'actine cytosquelettique suite à la stimulation d'une phéromone (Hall, 1998; Leeuw et al., 1995; Lyons et al., 1996). La surexpression de GFP-CNK dans l'œil est entre autres localisée le long des axones, ce qui vient supporter sa fonction potentielle dans ces structures (Douziech et Therrien, résultats non publiés). En sachant que la voie MAPK est essentielle pour la plasticité synaptique et que la caractérisation de CNK chez le rat (MAGUIN) suggère sa participation dans la formation des complexes multiprotéiques post synaptiques, il est possible de penser que CNK puisse être impliquée dans le maintien des fonctions neuronales (Ohtakara et al., 2002; Thomas and Haganir, 2004; Yao et al., 1999). Une étude sur la pertinence de CNK dans les processus d'extension des axones dans l'œil de la Drosophile pourrait être entamée afin de caractériser ces phénomènes. L'analyse de l'allèle hypomorphique CNK^{E-1222} (E1164K), comportant une mutation du résidu qui suit la Tyr1163, démontre que 80 % des photorécepteurs R7 et 15% des photorécepteurs externes sont absents (Therrien et al., 1998). Il serait intéressant d'analyser et de déterminer si la migration neuronale dans ce mutant est affectée. Afin d'identifier de nouvelles composantes impliquées dans la régulation de CNK, notre laboratoire a élaboré un crible génétique basé sur la surexpression de la partie CT dans l'œil de la Drosophile. Le phénotype d'un œil rugueux, associé à l'inhibition de la différenciation neuronale, nous permettra peut-être d'identifier de

nouvelles molécules en amont ou en aval de la voie de signalisation Src. Évidemment, la caractérisation des partenaires de CNK à partir de cellules ou de tissus neuronaux provenant de la mouche nous permettrait également de valider l'hypothèse voulant que CNK puisse participer à la croissance des axones. En parallèle, la purification de CNK à partir de cellules S2 au moyen de la méthode TAP couplée à une analyse d'identification de protéines par spectrométrie de masse pourrait nous aider. Cette approche est présentement en cours au laboratoire.

3.6. Implication potentielle de CNK dans les mécanismes du cancer

En sachant que la voie MAPK est souvent suractivée dans les cancers (Reddy et al., 2003; Thompson and Lyons, 2005) et que CNK est une molécule requise positivement dans cette voie, il est concevable de proposer que CNK puisse être impliquée dans la carcinogenèse. À l'aide des études génétiques et biochimiques effectuées chez la *Drosophile*, il serait possible de déterminer comment CNK pourrait contribuer à la progression tumorale. L'étude de la région RIR de CNK suggère qu'elle puisse agir comme suppresseur de tumeurs. En fait, il a été montré que la mutation du RIR entraîne une forte coopération avec RAS^{V12}. Sa mutation, *in vivo*, pourrait également mener à la suractivation de la voie MAPK et participer avec RAS (forme oncogénique) à la transformation cellulaire. Chez les mammifères, même si peu d'études sur l'implication de CNK dans la voie MAPK ont été réalisées, certaines d'entre elles montrent que CNK puisse être capable d'interagir avec des molécules impliquées dans la régulation des processus cancérogènes. Par exemple, CNK interagit avec les suppresseurs de tumeurs RASSF1A et BAND 4.1B/DAL-1 (Differentially expressed in Adenocarcinoma of the Lung-1) (Bumeister et al., 2004; Rabizadeh et al., 2004; Sun et al., 2002). Une association a aussi été observée avec les petites GTPases RAL et RHO, deux composantes qui ont la capacité de réguler les mécanismes tumoraux (Benitah et al., 2004; Jaffe et al., 2004; Jaffe et al., 2005; Lanigan et al., 2003; Oxford and Theodorescu, 2003).

Même si nous ne connaissons pas encore exactement la participation de CNK au sein de ces mécanismes, ne serait-il pas possible d'exploiter ses différents comportements au sein de la voie MAPK à des fins thérapeutiques ? La caractérisation de CNK a permis de mettre en lumière sa capacité de réguler la signalisation en aval de trois oncogènes connus chez l'humain soit RAS, RAF et Src. Les propriétés positives et négatives de CNK, identifiées chez la Drosophile, devront être analysées plus attentivement dans les cellules humaines afin de déterminer s'il est possible de les utiliser dans le but de développer des outils thérapeutiques permettant de contrôler la transformation cellulaire induite par ces oncogènes. L'utilisation d'un peptide ou d'une molécule qui reproduirait l'interface de la région RIR impliquée dans l'interaction avec RAF, par exemple, pourrait agir comme un inhibiteur spécifique. Plusieurs inhibiteurs utilisés comme agents thérapeutiques ciblant la structure du domaine kinase de diverses protéines ont déjà été générés (Noble et al., 2004). La détermination de la surface d'interaction de ces composantes pourrait être approfondie par la résolution de la structure tridimensionnelle du RIR associé à RAF. De plus, l'interaction de HYP avec le domaine SAM de CNK pourrait être compétitionnée à l'aide d'une molécule mimant l'interface de cette association afin d'inhiber la transmission des signaux. Cette stratégie pourrait par le fait même empêcher la fonction normale de KSR qui a déjà été montré comme étant une molécule requise pour la transformation par RAS^{V12} (Lozano et al., 2003; Nguyen et al., 2002; Xing et al., 2003).

Dans un autre sens, CNK pourrait devenir une cible thérapeutique afin de réguler négativement la voie MAPK. Sa fonction positive au sein de la voie MAPK suggère fortement sa capacité d'inhiber cette voie de signalisation impliquée dans les cancers. Cependant, aucune évidence ne suggère que l'ablation de CNK puisse affecter spécifiquement les cellules tumorales et non les cellules saines. Même si CNK semble ubiquitaire chez la Drosophile, il serait possible d'imaginer que CNK (chez l'humain) puisse réguler de façon spécifique l'activation de la voie MAPK, dans un contexte particulier tel que dans un tissu spécifique ou en aval d'un récepteur donné. L'inhibition de CNK pourrait dès lors permettre de réduire spécifiquement la transformation cellulaire. Ces hypothèses restent à être démontrées.

3.7. Conclusion

L'élaboration d'une réponse cellulaire spécifique, suite à l'activation de la voie MAPK par les RTKs, nécessite l'orchestration précise des signaux par différentes protéines. Entre autres, les protéines d'échafaudage participent à cette spécificité d'action en permettant le rapprochement de différentes composantes, favorisant par le fait même la transmission du signal. La caractérisation de CNK nous a permis de mieux comprendre sa fonction au sein du module MAPK tout en permettant d'éclaircir la spécificité des mécanismes d'activation de cette voie en aval des RTKs. Plus particulièrement, l'analyse du comportement de CNK au sein de cette voie nous a permis de proposer qu'elle pouvait relayer différents signaux dont l'un provenant de RAS et l'autre de Src, afin de réguler la fonction de RAF. L'intégration de ces signaux a permis de proposer un modèle qui expliquerait la relation entre RAS et Src dans les processus d'activation de la voie MAPK. Cette étude a également permis de préciser la fonction de Src42 chez la Drosophile et d'éclaircir son rôle au sein des mécanismes de transmission de la voie MAPK. La caractérisation moléculaire de CNK a permis de proposer de nouvelles avenues qui pourraient être utilisées afin de contrebalancer les effets de cette cascade de signalisation durant la carcinogenèse.

Bibliographie

Abraham, D., Podar, K., Pacher, M., Kubicek, M., Welzel, N., Hemmings, B. A., Dilworth, S. M., Mischak, H., Kolch, W., and Baccarini, M. (2000). Raf-1-associated protein phosphatase 2A as a positive regulator of kinase activation. *J Biol Chem* 275, 22300-22304.

Adachi, M., Fukuda, M., and 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., and 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.

Adams, M. D., Celniker, S. E., Holt, R. A., Evans, C. A., Gocayne, J. D., Amanatides, P. G., Scherer, S. E., Li, P. W., Hoskins, R. A., Galle, R. F., *et al.* (2000). The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science* 287, 2185-2195.

Altun-Gultekin, Z. F., Chandriani, S., Bougeret, C., Ishizaki, T., Narumiya, S., de Graaf, P., Van Bergen en Henegouwen, P., Hanafusa, H., Wagner, J. A., and Birge, R. B. (1998). Activation of Rho-dependent cell spreading and focal adhesion biogenesis by the v-Crk adaptor protein. *Mol Cell Biol* 18, 3044-3058.

Anneren, C., Reedquist, K. A., Bos, J. L., and Welsh, M. (2000). GTK, a Src-related tyrosine kinase, induces nerve growth factor-independent neurite outgrowth in PC12 cells through activation of the Rap1 pathway. Relationship to Shb tyrosine phosphorylation and elevated levels of focal adhesion kinase. *J Biol Chem* 275, 29153-29161.

Anselmo, A. N., Bumeister, R., Thomas, J. M., and White, M. A. (2002). Critical contribution of linker proteins to Raf kinase activation. *J Biol Chem* 277, 5940-5943.

Apolloni, A., Prior, I. A., Lindsay, M., Parton, R. G., and Hancock, J. F. (2000). H-ras but not K-ras traffics to the plasma membrane through the exocytic pathway. *Mol Cell Biol* 20, 2475-2487.

Baccarini, M. (2005). Second nature: biological functions of the Raf-1 "kinase". *FEBS Lett* 579, 3271-3277.

Bagowski, C. P., Besser, J., Frey, C. R., and Ferrell, J. E., Jr. (2003). The JNK cascade as a biochemical switch in mammalian cells: ultrasensitive and all-or-none responses. *Curr Biol* 13, 315-320.

Bagrodia, S., Bailey, D., Lenard, Z., Hart, M., Guan, J. L., Premont, R. T., Taylor, S. J., and Cerione, R. A. (1999). A tyrosine-phosphorylated protein that binds to an important

regulatory region on the cool family of p21-activated kinase-binding proteins. *J Biol Chem* 274, 22393-22400.

Baker, D. A., Mille-Baker, B., Wainwright, S. M., Ish-Horowicz, D., and Dibb, N. J. (2001). Mae mediates MAP kinase phosphorylation of Ets transcription factors in *Drosophila*. *Nature* 411, 330-334.

Ballif, B. A., and Blenis, J. (2001). Molecular mechanisms mediating mammalian mitogen-activated protein kinase (MAPK) kinase (MEK)-MAPK cell survival signals. *Cell Growth Differ* 12, 397-408.

Bardwell, L. (2004). A walk-through of the yeast mating pheromone response pathway. *Peptides* 25, 1465-1476.

Barford, D., Das, A. K., and Egloff, M. P. (1998). The structure and mechanism of protein phosphatases: insights into catalysis and regulation. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 27, 133-164.

Basu, T., Warne, P. H., and Downward, J. (1994). Role of Shc in the activation of Ras in response to epidermal growth factor and nerve growth factor. *Oncogene* 9, 3483-3491.

Baumann, B., Weber, C. K., Troppmair, J., Whiteside, S., Israel, A., Rapp, U. R., and Wirth, T. (2000). Raf induces NF-kappaB by membrane shuttle kinase MEKK1, a signaling pathway critical for transformation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 4615-4620.

Beggs, H. E., Soriano, P., and Maness, P. F. (1994). NCAM-dependent neurite outgrowth is inhibited in neurons from Fyn-minus mice. *J Cell Biol* 127, 825-833.

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

Belcheva, M. M., and Coscia, C. J. (2002). Diversity of G protein-coupled receptor signaling pathways to ERK/MAP kinase. *Neurosignals* 11, 34-44.

Bell, B., Xing, H., Yan, K., Gautam, N., and Muslin, A. J. (1999). KSR-1 binds to G-protein betagamma subunits and inhibits beta gamma-induced mitogen-activated protein kinase activation. *J Biol Chem* 274, 7982-7986.

Benitah, S. A., Valeron, P. F., van Aelst, L., Marshall, C. J., and Lacal, J. C. (2004). Rho GTPases in human cancer: an unresolved link to upstream and downstream transcriptional regulation. *Biochim Biophys Acta* 1705, 121-132.

Bernards, A., Hariharan, I. (2001). Of flies and men - studying human disease in *Drosophila*. *Curr Opin Gen Dev* 11, 274-278.

Biondi, R. M., and Nebreda, A. R. (2003). Signalling specificity of Ser/Thr protein kinases through docking-site-mediated interactions. *Biochem J* 372, 1-13.

- Bivona, T. G., Perez De Castro, I., Ahearn, I. M., Grana, T. M., Chiu, V. K., Lockyer, P. J., Cullen, P. J., Pellicer, A., Cox, A. D., and Philips, M. R. (2003). Phospholipase Cgamma activates Ras on the Golgi apparatus by means of RasGRP1. *Nature* *424*, 694-698.
- Bivona, T. G., and Philips, M. R. (2003). Ras pathway signaling on endomembranes. *Curr Opin Cell Biol* *15*, 136-142.
- Bjorge, J. D., Jakymiw, A., and Fujita, D. J. (2000). Selected glimpses into the activation and function of Src kinase. *Oncogene* *19*, 5620-5635.
- Blanco-Aparicio, C., Torres, J., and 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.
- Blume-Jensen, P., and Hunter, T. (2001). Oncogenic kinase signalling. *Nature* *411*, 355-365.
- Boggon, T. J., and Eck, M. J. (2004). Structure and regulation of Src family kinases. *Oncogene* *23*, 7918-7927.
- Bogoyevitch, M. A., and Court, N. W. (2004). Counting on mitogen-activated protein kinases--ERKs 3, 4, 5, 6, 7 and 8. *Cell Signal* *16*, 1345-1354.
- Bonni, A., Brunet, A., West, A. E., Datta, S. R., Takasu, M. A., and Greenberg, M. E. (1999). Cell survival promoted by the Ras-MAPK signaling pathway by transcription-dependent and -independent mechanisms. *Science* *286*, 1358-1362.
- Bray, D., and Lay, S. (1997). Computer-based analysis of the binding steps in protein complex formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* *94*, 13493-13498.
- Bromann, P. A., Korkaya, H., and Courtneidge, S. A. (2004). The interplay between Src family kinases and receptor tyrosine kinases. *Oncogene* *23*, 7957-7968.
- Brondello, J. M., Brunet, A., Pouyssegur, J., and McKenzie, F. R. (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.
- Brown, M. C., and Turner, C. E. (2004). Paxillin: adapting to change. *Physiol Rev* *84*, 1315-1339.
- Brunet, A., Roux, D., Lenormand, P., Dowd, S., Keyse, S., and Pouyssegur, J. (1999). 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, W. H., 3rd, Zipursky, S. L., and Hafen, E. (1994). A gain-of-function mutation in *Drosophila* MAP kinase activates multiple receptor tyrosine kinase signaling pathways. *Cell* *76*, 875-888.

- Buday, L. (1999). Membrane-targeting of signalling molecules by SH2/SH3 domain-containing adaptor proteins. *Biochim Biophys Acta* 1422, 187-204.
- Bumeister, R., Rosse, C., Anselmo, A., Camonis, J., and White, M. A. (2004). CNK2 couples NGF signal propagation to multiple regulatory cascades driving cell differentiation. *Curr Biol* 14, 439-445.
- Burack, W. R., and Shaw, A. S. (2000). Signal transduction: hanging on a scaffold. *Curr Opin Cell Biol* 12, 211-216.
- Burack, W. R., and Sturgill, T. W. (1997). The activating dual phosphorylation of MAPK by MEK is nonprocessive. *Biochemistry* 36, 5929-5933.
- Cacace, A. M., Michaud, N. R., Therrien, M., Mathes, K., Copeland, T., Rubin, G. M., and Morrison, D. K. (1999). Identification of constitutive and ras-inducible phosphorylation sites of KSR: implications for 14-3-3 binding, mitogen-activated protein kinase binding, and KSR overexpression. *Mol Cell Biol* 19, 229-240.
- Campbell, S. L., Khosravi-Far, R., Rossman, K. L., Clark, G. J., and Der, C. J. (1998). Increasing complexity of Ras signaling. *Oncogene* 17, 1395-1413.
- Camps, M., Nichols, A., Gillieron, C., Antonsson, B., Muda, M., Chabert, C., Boschert, U., and Arkinstall, S. (1998). Catalytic activation of the phosphatase MKP-3 by ERK2 mitogen-activated protein kinase. *Science* 280, 1262-1265.
- Canagarajah, B. J., Khokhlatchev, A., Cobb, M. H., and Goldsmith, E. J. (1997). Activation mechanism of the MAP kinase ERK2 by dual phosphorylation. *Cell* 90, 859-869.
- Cao, M. Y., Shinjo, F., Heinrichs, S., Soh, J. W., Jongstra-Bilen, J., and Jongstra, J. (2001). Inhibition of anti-IgM-induced translocation of protein kinase C beta I inhibits ERK2 activation and increases apoptosis. *J Biol Chem* 276, 24506-24510.
- Carter-Su, C., Rui, L., and Herrington, J. (2000). Role of the tyrosine kinase JAK2 in signal transduction by growth hormone. *Pediatr Nephrol* 14, 550-557.
- Cary, L. A., Klinghoffer, R. A., Sachsenmaier, C., and Cooper, J. A. (2002). SRC catalytic but not scaffolding function is needed for integrin-regulated tyrosine phosphorylation, cell migration, and cell spreading. *Mol Cell Biol* 22, 2427-2440.
- Catling, A. D., Schaeffer, H. J., Reuter, C. W., Reddy, G. R., and Weber, M. J. (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.
- Chadee, D. N., and Kyriakis, J. M. (2004). MLK3 is required for mitogen activation of B-Raf, ERK and cell proliferation. *Nat Cell Biol* 6, 770-776.
- Chadee, D. N., and Kyriakis, J. M. (2004). A novel role for mixed lineage kinase 3 (MLK3) in B-Raf activation and cell proliferation. *Cell Cycle* 3, 1227-1229.

- Chang, C., and Sternberg, P. W. (1999). *C. elegans* vulval development as a model system to study the cancer biology of EGFR signaling. *Cancer Metastasis Rev* 18, 203-213.
- Chaudhary, A., King, W. G., Mattaliano, M. D., Frost, J. A., Diaz, B., Morrison, D. K., Cobb, M. H., Marshall, M. S., and Brugge, J. S. (2000). Phosphatidylinositol 3-kinase regulates Raf1 through Pak phosphorylation of serine 338. *Curr Biol* 10, 551-554.
- Chen, J., Fujii, K., Zhang, L., Roberts, T., and Fu, H. (2001). Raf-1 promotes cell survival by antagonizing apoptosis signal-regulating kinase 1 through a MEK-ERK independent mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 7783-7788.
- Chen, W., White, M. A., and Cobb, M. H. (2002). Stimulus-specific requirements for MAP3 kinases in activating the JNK pathway. *J Biol Chem* 277, 49105-49110.
- Chen, Z., Gibson, T. B., Robinson, F., Silvestro, L., Pearson, G., Xu, B., Wright, A., Vanderbilt, C., and Cobb, M. H. (2001). MAP kinases. *Chem Rev* 101, 2449-2476.
- Cheng, M., Boulton, T. G., and Cobb, M. H. (1996). ERK3 is a constitutively nuclear protein kinase. *J Biol Chem* 271, 8951-8958.
- Cherfils, J., and Chardin, P. (1999). GEFs: structural basis for their activation of small GTP-binding proteins. *Trends Biochem Sci* 24, 306-311.
- Chiloeches, A., Mason, C. S., and Marais, R. (2001). S338 phosphorylation of Raf-1 is independent of phosphatidylinositol 3-kinase and Pak3. *Mol Cell Biol* 21, 2423-2434.
- Chiu, V. K., Bivona, T., Hach, A., Sajous, J. B., Silletti, J., Wiener, H., Johnson, R. L., 2nd, Cox, A. D., and Philips, M. R. (2002). Ras signalling on the endoplasmic reticulum and the Golgi. *Nat Cell Biol* 4, 343-350.
- Chong, H., and Guan, K. L. (2003). Regulation of Raf through phosphorylation and N terminus-C terminus interaction. *J Biol Chem* 278, 36269-36276.
- Chong, H., Lee, J., and Guan, K. L. (2001). Positive and negative regulation of Raf kinase activity and function by phosphorylation. *Embo J* 20, 3716-3727.
- Chong, H., Vikis, H. G., and Guan, K. L. (2003). Mechanisms of regulating the Raf kinase family. *Cell Signal* 15, 463-469.
- Choy, E., Chiu, V. K., Silletti, J., Feoktistov, M., Morimoto, T., Michaelson, D., Ivanov, I. E., and Philips, M. R. (1999). Endomembrane trafficking of ras: the CAAX motif targets proteins to the ER and Golgi. *Cell* 98, 69-80.
- Clark, G. J., Drugan, J. K., Rossman, K. L., Carpenter, J. W., Rogers-Graham, K., Fu, H., Der, C. J., and Campbell, S. L. (1997). 14-3-3 zeta negatively regulates raf-1 activity by interactions with the Raf-1 cysteine-rich domain. *J Biol Chem* 272, 20990-20993.

- Cleghon, V., and Morrison, D. K. (1994). Raf-1 interacts with Fyn and Src in a non-phosphotyrosine-dependent manner. *J Biol Chem* 269, 17749-17755.
- Cobb, M. H., and Goldsmith, E. J. (2000). Dimerization in MAP-kinase signaling. *Trends Biochem Sci* 25, 7-9.
- Cohen, L., Henzel, W. J., and Baeuerle, P. A. (1998). IKAP is a scaffold protein of the I κ B kinase complex. *Nature* 395, 292-296.
- Coles, L. C., and Shaw, P. E. (2002). PAK1 primes MEK1 for phosphorylation by Raf-1 kinase during cross-cascade activation of the ERK pathway. *Oncogene* 21, 2236-2244.
- Cooper, J. A., and MacAuley, A. (1988). Potential positive and negative autoregulation of p60c-src by intermolecular autophosphorylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85, 4232-4236.
- Corbit, K. C., Trakul, N., Eves, E. M., Diaz, B., Marshall, M., and Rosner, M. R. (2003). Activation of Raf-1 signaling by protein kinase C through a mechanism involving Raf kinase inhibitory protein. *J Biol Chem* 278, 13061-13068.
- Cornelis, S., Bruynooghe, Y., Van Loo, G., Saelens, X., Vandenabeele, P., and Beyaert, R. (2005). Apoptosis of hematopoietic cells induced by growth factor withdrawal is associated with caspase-9 mediated cleavage of Raf-1. *Oncogene* 24, 1552-1562.
- Cowan-Jacob, S. W., Fendrich, G., Manley, P. W., Jahnke, W., Fabbro, D., Liebetanz, J., and Meyer, T. (2005). The crystal structure of a c-Src complex in an active conformation suggests possible steps in c-Src activation. *Structure (Camb)* 13, 861-871.
- Cox, A. D., and Der, C. J. (2003). The dark side of Ras: regulation of apoptosis. *Oncogene* 22, 8999-9006.
- Cutler, R. E., Jr., Stephens, R. M., Saracino, M. R., and Morrison, D. K. (1998). Autoregulation of the Raf-1 serine/threonine kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 9214-9219.
- Dang, A., Frost, J. A., and Cobb, M. H. (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.
- Dasgupta, P., Sun, J., Wang, S., Fusaro, G., Betts, V., Padmanabhan, J., Sebt, S. M., and Chellappan, S. P. (2004). Disruption of the Rb--Raf-1 interaction inhibits tumor growth and angiogenesis. *Mol Cell Biol* 24, 9527-9541.
- Daub, H., Weiss, F. U., Wallasch, C., and Ullrich, A. (1996). Role of transactivation of the EGF receptor in signalling by G-protein-coupled receptors. *Nature* 379, 557-560.
- Davies, H., Bignell, G. R., Cox, C., Stephens, P., Edkins, S., Clegg, S., Teague, J., Woffendin, H., Garnett, M. J., Bottomley, W., *et al.* (2002). Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature* 417, 949-954.

de Rooij, J., Zwartkruis, F. J., Verheijen, M. H., Cool, R. H., Nijman, S. M., Wittinghofer, A., and Bos, J. L. (1998). Epac is a Rap1 guanine-nucleotide-exchange factor directly activated by cyclic AMP. *Nature* *396*, 474-477.

DeFea, K. A., Zalevsky, J., Thoma, M. S., Dery, O., Mullins, R. D., and Bunnett, N. W. (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.

Della Rocca, G. J., Mukhin, Y. V., Garnovskaya, M. N., Daaka, Y., Clark, G. J., Luttrell, L. M., Lefkowitz, R. J., and Raymond, J. R. (1999). Serotonin 5-HT_{1A} receptor-mediated Erk activation requires calcium/calmodulin-dependent receptor endocytosis. *J Biol Chem* *274*, 4749-4753.

Denouel-Galy, A., Douville, E. M., Warne, P. H., Papin, C., Laugier, D., Calothy, G., Downward, J., and Eychene, A. (1998). Murine Ksr interacts with MEK and inhibits Ras-induced transformation. *Curr Biol* *8*, 46-55.

Dhillon, A. S., and Kolch, W. (2002). Untying the regulation of the Raf-1 kinase. *Arch Biochem Biophys* *404*, 3-9.

Dhillon, A. S., Meikle, S., Yazici, Z., Eulitz, M., and Kolch, W. (2002). Regulation of Raf-1 activation and signalling by dephosphorylation. *Embo J* *21*, 64-71.

Dhillon, A. S., Pollock, C., Steen, H., Shaw, P. E., Mischak, H., and Kolch, W. (2002). Cyclic AMP-dependent kinase regulates Raf-1 kinase mainly by phosphorylation of serine 259. *Mol Cell Biol* *22*, 3237-3246.

Diaz, B., Barnard, D., Filson, A., MacDonald, S., King, A., and Marshall, M. (1997). Phosphorylation of Raf-1 serine 338-serine 339 is an essential regulatory event for Ras-dependent activation and biological signaling. *Mol Cell Biol* *17*, 4509-4516.

Dickens, M., Rogers, J. S., Cavanagh, J., Raitano, A., Xia, Z., Halpern, J. R., Greenberg, M. E., Sawyers, C. L., and Davis, R. J. (1997). A cytoplasmic inhibitor of the JNK signal transduction pathway. *Science* *277*, 693-696.

Dikic, I., Tokiwa, G., Lev, S., Courtneidge, S. A., and Schlessinger, J. (1996). A role for Pyk2 and Src in linking G-protein-coupled receptors with MAP kinase activation. *Nature* *383*, 547-550.

Dodson, G. S., Guarnieri, D. J., and Simon, M. A. (1998). Src64 is required for ovarian ring canal morphogenesis during *Drosophila* oogenesis. *Development* *125*, 2883-2892.

Donovan, S., Shannon, K. M., and Bollag, G. (2002). GTPase activating proteins: critical regulators of intracellular signaling. *Biochim Biophys Acta* *1602*, 23-45.

Dougherty, M. K., and Morrison, D. K. (2004). Unlocking the code of 14-3-3. *J Cell Sci* *117*, 1875-1884.

- Dougherty, M. K., Muller, J., Ritt, D. A., Zhou, M., Zhou, X. Z., Copeland, T. D., Conrads, T. P., Veenstra, T. D., Lu, K. P., and Morrison, D. K. (2005). Regulation of Raf-1 by direct feedback phosphorylation. *Mol Cell* 17, 215-224.
- Douziech, M., Roy, F., Laberge, G., Lefrancois, M., Armengod, A. V., and Therrien, M. (2003). Bimodal regulation of RAF by CNK in *Drosophila*. *Embo J* 22, 5068-5078.
- Downward, J. (2003). Targeting RAS signalling pathways in cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 3, 11-22.
- Duffy, J. B., and Perrimon, N. (1994). The torso pathway in *Drosophila*: lessons on receptor tyrosine kinase signaling and pattern formation. *Dev Biol* 166, 380-395.
- Dumaz, N., Light, Y., and Marais, R. (2002). Cyclic AMP blocks cell growth through Raf-1-dependent and Raf-1-independent mechanisms. *Mol Cell Biol* 22, 3717-3728.
- Dumaz, N., and Marais, R. (2003). Protein kinase A blocks Raf-1 activity by stimulating 14-3-3 binding and blocking Raf-1 interaction with Ras. *J Biol Chem* 278, 29819-29823.
- Dumaz, N., and Marais, R. (2005). Raf phosphorylation: one step forward and two steps back. *Mol Cell* 17, 164-166.
- Eck, M. J., Atwell, S. K., Shoelson, S. E., and Harrison, S. C. (1994). Structure of the regulatory domains of the Src-family tyrosine kinase Lck. *Nature* 368, 764-769.
- Ehrenreiter, K., Piazzolla, D., Velamoor, V., Sobczak, I., Small, J. V., Takeda, J., Leung, T., and Baccarini, M. (2005). Raf-1 regulates Rho signaling and cell migration. *J Cell Biol* 168, 955-964.
- Ehrhardt, A., Ehrhardt, G. R., Guo, X., and Schrader, J. W. (2002). Ras and relatives--job sharing and networking keep an old family together. *Exp Hematol* 30, 1089-1106.
- Elion, E. A. (2001). The Ste5p scaffold. *J Cell Sci* 114, 3967-3978.
- English, J., Pearson, G., Wilsbacher, J., Swantek, J., Karandikar, M., Xu, S., and Cobb, M. H. (1999). New insights into the control of MAP kinase pathways. *Exp Cell Res* 253, 255-270.
- Fabian, J. R., Daar, I. O., and Morrison, D. K. (1993). Critical tyrosine residues regulate the enzymatic and biological activity of Raf-1 kinase. *Mol Cell Biol* 13, 7170-7179.
- Fabian, J. R., Vojtek, A. B., Cooper, J. A., and Morrison, D. K. (1994). A single amino acid change in Raf-1 inhibits Ras binding and alters Raf-1 function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 5982-5986.
- Fantz, D. A., Jacobs, D., Glossip, D., and 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., and Zhou, M. M. (2004). Structure and regulation of MAPK phosphatases. *Cell Signal* 16, 769-779.
- Farrar, M. A., Alberol, I., and Perlmutter, R. M. (1996). Activation of the Raf-1 kinase cascade by coumermycin-induced dimerization. *Nature* 383, 178-181.
- Farrar, M. A., Tian, J., and Perlmutter, R. M. (2000). Membrane localization of Raf assists engagement of downstream effectors. *J Biol Chem* 275, 31318-31324.
- Fedorov, L. M., Tyrsin, O. Y., Papadopoulos, T., Camarero, G., Gotz, R., and Rapp, U. R. (2002). Bcl-2 determines susceptibility to induction of lung cancer by oncogenic CRaf. *Cancer Res* 62, 6297-6303.
- Feig, L. A., and Buchsbaum, R. J. (2002). Cell signaling: life or death decisions of ras proteins. *Curr Biol* 12, R259-261.
- Feng, Y., Song, L. Y., Kincaid, E., Mahanty, S. K., and Elion, E. A. (1998). Functional binding between Gbeta and the LIM domain of Ste5 is required to activate the MEKK Ste11. *Curr Biol* 8, 267-278.
- Ferrell, J. E., Jr. (2000). What do scaffold proteins really do? *Sci STKE* 2000, PE1.
- Ferrell, J. E., Jr. (2002). Self-perpetuating states in signal transduction: positive feedback, double-negative feedback and bistability. *Curr Opin Cell Biol* 14, 140-148.
- Ferrell, J. E., Jr., and Bhatt, R. R. (1997). Mechanistic studies of the dual phosphorylation of mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem* 272, 19008-19016.
- Ferrell, J. E., Jr., and Cimprich, K. A. (2003). Enforced proximity in the function of a famous scaffold. *Mol Cell* 11, 289-291.
- Ferrell, J. E., Jr., and Machleder, E. M. (1998). The biochemical basis of an all-or-none cell fate switch in *Xenopus* oocytes. *Science* 280, 895-898.
- Fessart, D., Simaan, M., and Laporte, S. A. (2005). c-Src regulates clathrin adapter protein 2 interaction with beta-arrestin and the angiotensin II type 1 receptor during clathrin-mediated internalization. *Mol Endocrinol* 19, 491-503.
- Fincham, V. J., James, M., Frame, M. C., and Winder, S. J. (2000). Active ERK/MAP kinase is targeted to newly forming cell-matrix adhesions by integrin engagement and v-Src. *Embo J* 19, 2911-2923.
- Force, T., Kuida, K., Namchuk, M., Parang, K., and Kyriakis, J. M. (2004). Inhibitors of protein kinase signaling pathways: emerging therapies for cardiovascular disease. *Circulation* 109, 1196-1205.

- Formstecher, E., Ramos, J. W., Fauquet, M., Calderwood, D. A., Hsieh, J. C., Canton, B., Nguyen, X. T., Barnier, J. V., Camonis, J., Ginsberg, M. H., and Chneiweiss, H. (2001). PEA-15 mediates cytoplasmic sequestration of ERK MAP kinase. *Dev Cell* *1*, 239-250.
- Frame, M. C. (2002). Src in cancer: deregulation and consequences for cell behaviour. *Biochim Biophys Acta* *1602*, 114-130.
- Frame, M. C. (2004). Newest findings on the oldest oncogene; how activated src does it. *J Cell Sci* *117*, 989-998.
- Frost, J. A., Steen, H., Shapiro, P., Lewis, T., Ahn, N., Shaw, P. E., and Cobb, M. H. (1997). Cross-cascade activation of ERKs and ternary complex factors by Rho family proteins. *Embo J* *16*, 6426-6438.
- Fu, H., Xia, K., Pallas, D. C., Cui, C., Conroy, K., Narsimhan, R. P., Mamon, H., Collier, R. J., and Roberts, T. M. (1994). Interaction of the protein kinase Raf-1 with 14-3-3 proteins. *Science* *266*, 126-129.
- Fukuda, M., Gotoh, I., Gotoh, Y., and 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., and Nishida, E. (1997). 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.
- Furthauer, M., Lin, W., Ang, S. L., Thisse, B., and Thisse, C. (2002). Sef is a feedback-induced antagonist of Ras/MAPK-mediated FGF signalling. *Nat Cell Biol* *4*, 170-174.
- Galaktionov, K., Jesus, C., and Beach, D. (1995). Raf1 interaction with Cdc25 phosphatase ties mitogenic signal transduction to cell cycle activation. *Genes Dev* *9*, 1046-1058.
- Galbiati, F., Razani, B., and Lisanti, M. P. (2001). Emerging themes in lipid rafts and caveolae. *Cell* *106*, 403-411.
- Gardner, A. M., Vaillancourt, R. R., Lange-Carter, C. A., and Johnson, G. L. (1994). MEK-1 phosphorylation by MEK kinase, Raf, and mitogen-activated protein kinase: analysis of phosphopeptides and regulation of activity. *Mol Biol Cell* *5*, 193-201.
- Garnett, M. J., and Marais, R. (2004). Guilty as charged: B-RAF is a human oncogene. *Cancer Cell* *6*, 313-319.
- Garrington, T. P., and Johnson, G. L. (1999). Organization and regulation of mitogen-activated protein kinase signaling pathways. *Curr Opin Cell Biol* *11*, 211-218.

Gaumont-Leclerc, M. F., Mukhopadhyay, U. K., Goumard, S., and Ferbeyre, G. (2004). PEA-15 is inhibited by adenovirus E1A and plays a role in ERK nuclear export and Ras-induced senescence. *J Biol Chem* 279, 46802-46809.

Ge, B., Gram, H., Di Padova, F., Huang, B., New, L., Ulevitch, R. J., Luo, Y., and Han, J. (2002). MAPKK-independent activation of p38alpha mediated by TAB1-dependent autophosphorylation of p38alpha. *Science* 295, 1291-1294.

Giancotti, F. G., and Ruoslahti, E. (1999). Integrin signaling. *Science* 285, 1028-1032.

Giblett, S. M., Lloyd, D. J., Light, Y., Marais, R., and Pritchard, C. A. (2002). Expression of kinase suppressor of Ras in the normal adult and embryonic mouse. *Cell Growth Differ* 13, 307-313.

Gibson, R. M., Ji-Buechler, Y., and Taylor, S. S. (1997). Identification of electrostatic interaction sites between the regulatory and catalytic subunits of cyclic AMP-dependent protein kinase. *Protein Sci* 6, 1825-1834.

Giroux, S., Tremblay, M., Bernard, D., Cardin-Girard, J. F., Aubry, S., Larouche, L., Rousseau, S., Huot, J., Landry, J., Jeannotte, L., and 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.

Goel, R., and Baldassare, J. J. (2004). Killing two birds with one RKIP. *Trends Endocrinol Metab* 15, 91-92.

Goetz, C. A., O'Neil, J. J., and Farrar, M. A. (2003). Membrane localization, oligomerization, and phosphorylation are required for optimal raf activation. *J Biol Chem* 278, 51184-51189.

Gonfloni, S., Williams, J. C., Hattula, K., Weijland, A., Wierenga, R. K., and Superti-Furga, G. (1997). The role of the linker between the SH2 domain and catalytic domain in the regulation and function of Src. *Embo J* 16, 7261-7271.

Grassme, H., Schwarz, H., and Gulbins, E. (2001). Molecular mechanisms of ceramide-mediated CD95 clustering. *Biochem Biophys Res Commun* 284, 1016-1030.

Graves, L. M., Guy, H. I., Kozlowski, P., Huang, M., Lazarowski, E., Pope, R. M., Collins, M. A., Dahlstrand, E. N., Earp, H. S., 3rd, and Evans, D. R. (2000). Regulation of carbamoyl phosphate synthetase by MAP kinase. *Nature* 403, 328-332.

Guan, K. L., Figueroa, C., Brtva, T. R., Zhu, T., Taylor, J., Barber, T. D., and Vojtek, A. B. (2000). Negative regulation of the serine/threonine kinase B-Raf by Akt. *J Biol Chem* 275, 27354-27359.

Guappone, A. C., and Flynn, D. C. (1997). The integrity of the SH3 binding motif of AFAP-110 is required to facilitate tyrosine phosphorylation by, and stable complex formation with, Src. *Mol Cell Biochem* 175, 243-252.

- Guarnieri, D. J., Dodson, G. S., and Simon, M. A. (1998). SRC64 regulates the localization of a Tec-family kinase required for *Drosophila* ring canal growth. *Mol Cell* *1*, 831-840.
- Gustin, M. C., Albertyn, J., Alexander, M., and Davenport, K. (1998). MAP kinase pathways in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev* *62*, 1264-1300.
- Hacohen, N., Kramer, S., Sutherland, D., Hiromi, Y., and Krasnow, M. A. (1998). sprouty encodes a novel antagonist of FGF signaling that patterns apical branching of the *Drosophila* airways. *Cell* *92*, 253-263.
- Hagemann, C., and Rapp, U. R. (1999). Isotype-specific functions of Raf kinases. *Exp Cell Res* *253*, 34-46.
- Hall, A. (1998). Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science* *279*, 509-514.
- Hanahan, D., and Weinberg, R. A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* *100*, 57-70.
- Hancock, J. F. (2003). Ras proteins: different signals from different locations. *Nat Rev Mol Cell Biol* *4*, 373-384.
- Harding, A., Tian, T., Westbury, E., Frische, E., and Hancock, J. F. (2005). Subcellular localization determines MAP kinase signal output. *Curr Biol* *15*, 869-873.
- Hariharan, I. K. (2005). Ras and Rap: are former enemies now friends? *Dev Cell* *8*, 303-304.
- Harris, K., Lamson, R. E., Nelson, B., Hughes, T. R., Marton, M. J., Roberts, C. J., Boone, C., and Pryciak, P. M. (2001). Role of scaffolds in MAP kinase pathway specificity revealed by custom design of pathway-dedicated signaling proteins. *Curr Biol* *11*, 1815-1824.
- Harrison, R. E., Sikorski, B. A., and 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.
- Harrison, S. C. (2003). Variation on an Src-like theme. *Cell* *112*, 737-740.
- Hartsough, M. T., Morrison, D. K., Salerno, M., Palmieri, D., Ouatas, T., Mair, M., Patrick, J., and Steeg, P. S. (2002). Nm23-H1 metastasis suppressor phosphorylation of kinase suppressor of Ras via a histidine protein kinase pathway. *J Biol Chem* *277*, 32389-32399.
- Harvey, K. F., Pflieger, C. M., and Hariharan, I. K. (2003). The *Drosophila* Mst ortholog, hippo, restricts growth and cell proliferation and promotes apoptosis. *Cell* *114*, 457-467.
- Haugh, J. M., Huang, A. C., Wiley, H. S., Wells, A., and Lauffenburger, D. A. (1999). Internalized epidermal growth factor receptors participate in the activation of p21(ras) in fibroblasts. *J Biol Chem* *274*, 34350-34360.

- Hekman, M., Fischer, A., Wennogle, L. P., Wang, Y. K., Campbell, S. L., and Rapp, U. R. (2005). Novel C-Raf phosphorylation sites: serine 296 and 301 participate in Raf regulation. *FEBS Lett* 579, 464-468.
- Heldin, C. H. (1995). Dimerization of cell surface receptors in signal transduction. *Cell* 80, 213-223.
- Henkemeyer, M., West, S. R., Gertler, F. B., and Hoffmann, F. M. (1990). A novel tyrosine kinase-independent function of *Drosophila* abl correlates with proper subcellular localization. *Cell* 63, 949-960.
- Herrera, R., and Sebolt-Leopold, J. S. (2002). Unraveling the complexities of the Raf/MAP kinase pathway for pharmacological intervention. *Trends Mol Med* 8, S27-31.
- Hindley, A., and Kolch, W. (2002). Extracellular signal regulated kinase (ERK)/mitogen activated protein kinase (MAPK)-independent functions of Raf kinases. *J Cell Sci* 115, 1575-1581.
- Hingorani, S. R., and Tuveson, D. A. (2003). Ras redux: rethinking how and where Ras acts. *Curr Opin Genet Dev* 13, 6-13.
- Hou, X. S., Chou, T. B., Melnick, M. B., and Perrimon, N. (1995). The torso receptor tyrosine kinase can activate Raf in a Ras-independent pathway. *Cell* 81, 63-71.
- Houslay, M. D., and Kolch, W. (2000). Cell-type specific integration of cross-talk between extracellular signal-regulated kinase and cAMP signaling. *Mol Pharmacol* 58, 659-668.
- Hu, S. H., Parker, M. W., Lei, J. Y., Wilce, M. C., Benian, G. M., and Kemp, B. E. (1994). Insights into autoregulation from the crystal structure of twitchin kinase. *Nature* 369, 581-584.
- Huang, A. M., and Rubin, G. M. (2000). A misexpression screen identifies genes that can modulate RAS1 pathway signaling in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 156, 1219-1230.
- Huang, C. Y., and Ferrell, J. E., Jr. (1996). Ultrasensitivity in the mitogen-activated protein kinase cascade. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 10078-10083.
- Hubbard, S. R. (1999). Src autoinhibition: let us count the ways. *Nat Struct Biol* 6, 711-714.
- Hubbard, S. R. (2004). Oncogenic mutations in B-Raf: some losses yield gains. *Cell* 116, 764-766.
- Hunter, T. (2000). Signaling--2000 and beyond. *Cell* 100, 113-127.
- Huse, M., and Kuriyan, J. (2002). The conformational plasticity of protein kinases. *Cell* 109, 275-282.

- Huser, M., Luckett, J., Chiloeches, A., Mercer, K., Iwobi, M., Giblett, S., Sun, X. M., Brown, J., Marais, R., and Pritchard, C. (2001). MEK kinase activity is not necessary for Raf-1 function. *Embo J* 20, 1940-1951.
- Ignelzi, M. A., Jr., Miller, D. R., Soriano, P., and Maness, P. F. (1994). Impaired neurite outgrowth of src-minus cerebellar neurons on the cell adhesion molecule L1. *Neuron* 12, 873-884.
- Ikenoue, T., Hikiba, Y., Kanai, F., Tanaka, Y., Imamura, J., Imamura, T., Ohta, M., Ijichi, H., Tateishi, K., Kawakami, T., *et al.* (2003). Functional analysis of mutations within the kinase activation segment of B-Raf in human colorectal tumors. *Cancer Res* 63, 8132-8137.
- Inouye, K., Mizutani, S., Koide, H., and Kaziro, Y. (2000). Formation of the Ras dimer is essential for Raf-1 activation. *J Biol Chem* 275, 3737-3740.
- Ishibe, S., Joly, D., Liu, Z. X., and Cantley, L. G. (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., and Cantley, L. G. (2003). Phosphorylation-dependent paxillin-ERK association mediates hepatocyte growth factor-stimulated epithelial morphogenesis. *Mol Cell* 12, 1275-1285.
- Jacobs, D., Glossip, D., Xing, H., Muslin, A. J., and 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.
- Jaffe, A. B., Aspenstrom, P., and Hall, A. (2004). Human CNK1 acts as a scaffold protein, linking Rho and Ras signal transduction pathways. *Mol Cell Biol* 24, 1736-1746.
- Jaffe, A. B., Hall, A., and Schmidt, A. (2005). Association of CNK1 with Rho guanine nucleotide exchange factors controls signaling specificity downstream of Rho. *Curr Biol* 15, 405-412.
- Jaumot, M., and Hancock, J. F. (2001). Protein phosphatases 1 and 2A promote Raf-1 activation by regulating 14-3-3 interactions. *Oncogene* 20, 3949-3958.
- Jelinek, T., Catling, A. D., Reuter, C. W., Moodie, S. A., Wolfman, A., and Weber, M. J. (1994). RAS and RAF-1 form a signalling complex with MEK-1 but not MEK-2. *Mol Cell Biol* 14, 8212-8218.
- Jiang, X., and Sorkin, A. (2002). Coordinated traffic of Grb2 and Ras during epidermal growth factor receptor endocytosis visualized in living cells. *Mol Biol Cell* 13, 1522-1535.
- Johnson, G. L., and Lapadat, R. (2002). Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. *Science* 298, 1911-1912.

- Johnson, L., Greenbaum, D., Cichowski, K., Mercer, K., Murphy, E., Schmitt, E., Bronson, R. T., Umanoff, H., Edelman, W., Kucherlapati, R., and Jacks, T. (1997). K-ras is an essential gene in the mouse with partial functional overlap with N-ras. *Genes Dev* *11*, 2468-2481.
- Johnson, L. N., Lowe, E. D., Noble, M. E., and Owen, D. J. (1998). The Eleventh Datta Lecture. The structural basis for substrate recognition and control by protein kinases. *FEBS Lett* *430*, 1-11.
- Johnson, L. N., Noble, M. E., and Owen, D. J. (1996). Active and inactive protein kinases: structural basis for regulation. *Cell* *85*, 149-158.
- Kalderon, D. (2004). Hedgehog signaling: Costal-2 bridges the transduction gap. *Curr Biol* *14*, R67-69.
- Kaplan, K. B., Bibbins, K. B., Swedlow, J. R., Arnaud, M., Morgan, D. O., and Varmus, H. E. (1994). Association of the amino-terminal half of c-Src with focal adhesions alters their properties and is regulated by phosphorylation of tyrosine 527. *Embo J* *13*, 4745-4756.
- Kaplan, K. B., Swedlow, J. R., Morgan, D. O., and Varmus, H. E. (1995). c-Src enhances the spreading of src-/- fibroblasts on fibronectin by a kinase-independent mechanism. *Genes Dev* *9*, 1505-1517.
- Karandikar, M., Xu, S., and Cobb, M. H. (2000). MEKK1 binds raf-1 and the ERK2 cascade components. *J Biol Chem* *275*, 40120-40127.
- Karasarides, M., Chiloehes, A., Hayward, R., Niculescu-Duvaz, D., Scanlon, I., Friedlos, F., Ogilvie, L., Hedley, D., Martin, J., Marshall, C. J., *et al.* (2004). B-RAF is a therapeutic target in melanoma. *Oncogene* *23*, 6292-6298.
- Karlsson, M., Mathers, J., Dickinson, R. J., Mandl, M., and Keyse, S. M. (2004). Both nuclear-cytoplasmic shuttling of the dual specificity phosphatase MKP-3 and its ability to anchor MAP kinase in the cytoplasm are mediated by a conserved nuclear export signal. *J Biol Chem* *279*, 41882-41891.
- Kelkar, N., Gupta, S., Dickens, M., and Davis, R. J. (2000). Interaction of a mitogen-activated protein kinase signaling module with the neuronal protein JIP3. *Mol Cell Biol* *20*, 1030-1043.
- Keller, E. T. (2004). Metastasis suppressor genes: a role for raf kinase inhibitor protein (RKIP). *Anticancer Drugs* *15*, 663-669.
- Kennelly, P. J. (2003). Archaeal protein kinases and protein phosphatases: insights from genomics and biochemistry. *Biochem J* *370*, 373-389.
- Keyse, S. M. (2000). Protein phosphatases and the regulation of mitogen-activated protein kinase signalling. *Curr Opin Cell Biol* *12*, 186-192.

Khokhlatchev, A. V., Canagarajah, B., Wilsbacher, J., Robinson, M., Atkinson, M., Goldsmith, E., and Cobb, M. H. (1998). Phosphorylation of the MAP kinase ERK2 promotes its homodimerization and nuclear translocation. *Cell* 93, 605-615.

Kim, H., and Lee, S. T. (2005). An intramolecular interaction between SH2-kinase linker and kinase domain is essential for the catalytic activity of protein-tyrosine kinase-6. *J Biol Chem* 280, 28973-28980.

Kim, H. J., and Bar-Sagi, D. (2004). Modulation of signalling by Sprouty: a developing story. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5, 441-450.

King, A. J., Sun, H., Diaz, B., Barnard, D., Miao, W., Bagrodia, S., and Marshall, M. S. (1998). The protein kinase Pak3 positively regulates Raf-1 activity through phosphorylation of serine 338. *Nature* 396, 180-183.

Klemke, R. L., Leng, J., Molander, R., Brooks, P. C., Vuori, K., and Cheresch, D. A. (1998). CAS/Crk coupling serves as a "molecular switch" for induction of cell migration. *J Cell Biol* 140, 961-972.

Kolch, W. (2000). Meaningful relationships: the regulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by protein interactions. *Biochem J* 351 Pt 2, 289-305.

Kolch, W., Heidecker, G., Kochs, G., Hummel, R., Vahidi, H., Mischak, H., Finkenzeller, G., Marme, D., and Rapp, U. R. (1993). Protein kinase C alpha activates RAF-1 by direct phosphorylation. *Nature* 364, 249-252.

Kolesnick, R., and Xing, H. R. (2004). Inflammatory bowel disease reveals the kinase activity of KSR1. *J Clin Invest* 114, 1233-1237.

Kornfeld, K., Hom, D. B., and Horvitz, H. R. (1995). The *ksr-1* gene encodes a novel protein kinase involved in Ras-mediated signaling in *C. elegans*. *Cell* 83, 903-913.

Kovalenko, D., Yang, X., Nadeau, R. J., Harkins, L. K., and Friesel, R. (2003). Sef inhibits fibroblast growth factor signaling by inhibiting FGFR1 tyrosine phosphorylation and subsequent ERK activation. *J Biol Chem* 278, 14087-14091.

Kremer, N. E., D'Arcangelo, G., Thomas, S. M., DeMarco, M., Brugge, J. S., and Halegoua, S. (1991). Signal transduction by nerve growth factor and fibroblast growth factor in PC12 cells requires a sequence of src and ras actions. *J Cell Biol* 115, 809-819.

Krugmann, S., Anderson, K. E., Ridley, S. H., Risso, N., McGregor, A., Coadwell, J., Davidson, K., Eguinoa, A., Ellson, C. D., Lipp, P., *et al.* (2002). Identification of ARAP3, a novel PI3K effector regulating both Arf and Rho GTPases, by selective capture on phosphoinositide affinity matrices. *Mol Cell* 9, 95-108.

Kubicek, M., Pacher, M., Abraham, D., Podar, K., Eulitz, M., and Baccharini, M. (2002). Dephosphorylation of Ser-259 regulates Raf-1 membrane association. *J Biol Chem* 277, 7913-7919.

- Kuo, W. L., Abe, M., Rhee, J., Eves, E. M., McCarthy, S. A., Yan, M., Templeton, D. J., McMahon, M., and Rosner, M. R. (1996). Raf, but not MEK or ERK, is sufficient for differentiation of hippocampal neuronal cells. *Mol Cell Biol* 16, 1458-1470.
- Kuo, W. L., Chung, K. C., and Rosner, M. R. (1997). Differentiation of central nervous system neuronal cells by fibroblast-derived growth factor requires at least two signaling pathways: roles for Ras and Src. *Mol Cell Biol* 17, 4633-4643.
- Kussick, S. J., Basler, K., and Cooper, J. A. (1993). Ras1-dependent signaling by ectopically-expressed *Drosophila* src gene product in the embryo and developing eye. *Oncogene* 8, 2791-2803.
- Laberge, G., Douziech, M., and Therrien, M. (2005). Src42 binding activity regulates *Drosophila* RAF by a novel CNK-dependent derepression mechanism. *Embo J* 24, 487-498.
- LaFevre-Bernt, M., Sicheri, F., Pico, A., Porter, M., Kuriyan, J., and Miller, W. T. (1998). Intramolecular regulatory interactions in the Src family kinase Hck probed by mutagenesis of a conserved tryptophan residue. *J Biol Chem* 273, 32129-32134.
- Lange-Carter, C. A., Pleiman, C. M., Gardner, A. M., Blumer, K. J., and Johnson, G. L. (1993). A divergence in the MAP kinase regulatory network defined by MEK kinase and Raf. *Science* 260, 315-319.
- Lanigan, T. M., Liu, A., Huang, Y. Z., Mei, L., Margolis, B., and Guan, K. L. (2003). Human homologue of *Drosophila* CNK interacts with Ras effector proteins Raf and Rlf. *Faseb J* 17, 2048-2060.
- Lax, I., Wong, A., Lamothe, B., Lee, A., Frost, A., Hawes, J., and Schlessinger, J. (2002). The docking protein FRS2alpha controls a MAP kinase-mediated negative feedback mechanism for signaling by FGF receptors. *Mol Cell* 10, 709-719.
- Le Mellay, V., Troppmair, J., Benz, R., and Rapp, U. R. (2002). Negative regulation of mitochondrial VDAC channels by C-Raf kinase. *BMC Cell Biol* 3, 14.
- Lecuyer, E., and Hoang, T. (2004). SCL: from the origin of hematopoiesis to stem cells and leukemia. *Exp Hematol* 32, 11-24.
- Lee, M., Petrovics, G., and Anderson, W. B. (2003). The synergistic activation of Raf-1 kinase by phorbol myristate acetate and hydrogen peroxide in NIH3T3 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 311, 1026-1033.
- Leeuw, T., Fourest-Lieuvin, A., Wu, C., Chenevert, J., Clark, K., Whiteway, M., Thomas, D. Y., and Leberer, E. (1995). Pheromone response in yeast: association of Bem1p with proteins of the MAP kinase cascade and actin. *Science* 270, 1210-1213.
- Lefkowitz, R. J., and Whalen, E. J. (2004). beta-arrestins: traffic cops of cell signaling. *Curr Opin Cell Biol* 16, 162-168.

- Lehr, S., Kotzka, J., Avci, H., Sickmann, A., Meyer, H. E., Herkner, A., and Muller-Wieland, D. (2004). Identification of major ERK-related phosphorylation sites in Gab1. *Biochemistry* *43*, 12133-12140.
- Lemmon, M. A., and Ferguson, K. M. (2000). Signal-dependent membrane targeting by pleckstrin homology (PH) domains. *Biochem J* *350 Pt 1*, 1-18.
- Lenormand, P., Brondello, J. M., Brunet, A., and 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.
- Lerner, E. C., and Smithgall, T. E. (2002). SH3-dependent stimulation of Src-family kinase autophosphorylation without tail release from the SH2 domain in vivo. *Nat Struct Biol* *9*, 365-369.
- Lesa, G. M., and Sternberg, P. W. (1997). Positive and negative tissue-specific signaling by a nematode epidermal growth factor receptor. *Mol Biol Cell* *8*, 779-793.
- Lev, S., Moreno, H., Martinez, R., Canoll, P., Peles, E., Musacchio, J. M., Plowman, G. D., Rudy, B., and Schlessinger, J. (1995). Protein tyrosine kinase PYK2 involved in Ca²⁺-induced regulation of ion channel and MAP kinase functions. *Nature* *376*, 737-745.
- Levchenko, A., Bruck, J., and Sternberg, P. W. (2000). Scaffold proteins may biphasically affect the levels of mitogen-activated protein kinase signaling and reduce its threshold properties. *Proc Natl Acad Sci U S A* *97*, 5818-5823.
- Li, N., Batzer, A., Daly, R., Yajnik, V., Skolnik, E., Chardin, P., Bar-Sagi, D., Margolis, B., and Schlessinger, J. (1993). Guanine-nucleotide-releasing factor hSos1 binds to Grb2 and links receptor tyrosine kinases to Ras signalling. *Nature* *363*, 85-88.
- Li, W., Han, M., and Guan, K. L. (2000). The leucine-rich repeat protein SUR-8 enhances MAP kinase activation and forms a complex with Ras and Raf. *Genes Dev* *14*, 895-900.
- Li, W., Noll, E., and Perrimon, N. (2000). Identification of autosomal regions involved in *Drosophila* Raf function. *Genetics* *156*, 763-774.
- Li, X., Wheldon, L., and Heath, J. K. (2003). Sprouty: a controversial role in receptor tyrosine kinase signalling pathways. *Biochem Soc Trans* *31*, 1445-1446.
- Light, Y., Paterson, H., and Marais, R. (2002). 14-3-3 antagonizes Ras-mediated Raf-1 recruitment to the plasma membrane to maintain signaling fidelity. *Mol Cell Biol* *22*, 4984-4996.
- Liu, G., Guibao, C. D., and Zheng, J. (2002). Structural insight into the mechanisms of targeting and signaling of focal adhesion kinase. *Mol Cell Biol* *22*, 2751-2760.
- Lockyer, P. J., Kupzig, S., and Cullen, P. J. (2001). CAPRI regulates Ca²⁺-dependent inactivation of the Ras-MAPK pathway. *Curr Biol* *11*, 981-986.

- Lopez-Illasaca, M., Crespo, P., Pellici, P. G., Gutkind, J. S., and Wetzker, R. (1997). Linkage of G protein-coupled receptors to the MAPK signaling pathway through PI 3-kinase gamma. *Science* 275, 394-397.
- Lopez-Illasaca, M. A., Bernabe-Ortiz, J. C., Na, S. Y., Dzau, V. J., and Xavier, R. J. (2005). Bioluminescence resonance energy transfer identify scaffold protein CNK1 interactions in intact cells. *FEBS Lett* 579, 648-654.
- Lorenz, K., Lohse, M. J., and Quitterer, U. (2003). Protein kinase C switches the Raf kinase inhibitor from Raf-1 to GRK-2. *Nature* 426, 574-579.
- Lorenzen, J. A., Baker, S. E., Denhez, F., Melnick, M. B., Brower, D. L., and Perkins, L. A. (2001). Nuclear import of activated D-ERK by DIM-7, an importin family member encoded by the gene moleskin. *Development* 128, 1403-1414.
- Lowes, V. L., Ip, N. Y., and Wong, Y. H. (2002). Integration of signals from receptor tyrosine kinases and g protein-coupled receptors. *Neurosignals* 11, 5-19.
- Lozano, J., Xing, R., Cai, Z., Jensen, H. L., Trempus, C., Mark, W., Cannon, R., and Kolesnick, R. (2003). Deficiency of kinase suppressor of Ras1 prevents oncogenic ras signaling in mice. *Cancer Res* 63, 4232-4238.
- Lu, K. P. (2004). Pinning down cell signaling, cancer and Alzheimer's disease. *Trends Biochem Sci* 29, 200-209.
- Lu, X., and Li, Y. (1999). Drosophila Src42A is a negative regulator of RTK signaling. *Dev Biol* 208, 233-243.
- Lu, X., Melnick, M. B., Hsu, J. C., and Perrimon, N. (1994). Genetic and molecular analyses of mutations involved in Drosophila raf signal transduction. *Embo J* 13, 2592-2599.
- Lu, Z., Xu, S., Joazeiro, C., Cobb, M. H., and 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.
- Luckett, J. C., Huser, M. B., Giagtzoglou, N., Brown, J. E., and Pritchard, C. A. (2000). Expression of the A-raf proto-oncogene in the normal adult and embryonic mouse. *Cell Growth Differ* 11, 163-171.
- Lum, L., Zhang, C., Oh, S., Mann, R. K., von Kessler, D. P., Taipale, J., Weis-Garcia, F., Gong, R., Wang, B., and Beachy, P. A. (2003). Hedgehog signal transduction via Smoothed association with a cytoplasmic complex scaffolded by the atypical kinesin, Costal-2. *Mol Cell* 12, 1261-1274.
- Luo, Z., Tzivion, G., Belshaw, P. J., Vavvas, D., Marshall, M., and Avruch, J. (1996). Oligomerization activates c-Raf-1 through a Ras-dependent mechanism. *Nature* 383, 181-185.

- Luttrell, L. M. (2003). 'Location, location, location': activation and targeting of MAP kinases by G protein-coupled receptors. *J Mol Endocrinol* 30, 117-126.
- Luttrell, L. M., Roudabush, F. L., Choy, E. W., Miller, W. E., Field, M. E., Pierce, K. L., and Lefkowitz, R. J. (2001). Activation and targeting of extracellular signal-regulated kinases by beta-arrestin scaffolds. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 2449-2454.
- Lyons, D. M., Mahanty, S. K., Choi, K. Y., Manandhar, M., and Elion, E. A. (1996). The SH3-domain protein Bem1 coordinates mitogen-activated protein kinase cascade activation with cell cycle control in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 16, 4095-4106.
- Mahanty, S. K., Wang, Y., Farley, F. W., and Elion, E. A. (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, 501-512.
- Malumbres, M., and Barbacid, M. (2003). RAS oncogenes: the first 30 years. *Nat Rev Cancer* 3, 459-465.
- Manning, A. M., and Davis, R. J. (2003). Targeting JNK for therapeutic benefit: from junk to gold? *Nat Rev Drug Discov* 2, 554-565.
- Manning, G., Plowman, G. D., Hunter, T., and Sudarsanam, S. (2002). Evolution of protein kinase signaling from yeast to man. *Trends Biochem Sci* 27, 514-520.
- Manning, G., Whyte, D. B., Martinez, R., Hunter, T., and Sudarsanam, S. (2002). The protein kinase complement of the human genome. *Science* 298, 1912-1934.
- Marais, R., Light, Y., Paterson, H. F., Mason, C. S., and Marshall, C. J. (1997). Differential regulation of Raf-1, A-Raf, and B-Raf by oncogenic ras and tyrosine kinases. *J Biol Chem* 272, 4378-4383.
- Marcus, S., Polverino, A., Barr, M., and 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.
- Marinissen, M. J., and Gutkind, J. S. (2001). G-protein-coupled receptors and signaling networks: emerging paradigms. *Trends Pharmacol Sci* 22, 368-376.
- Marshall, C. J. (1995). Specificity of receptor tyrosine kinase signaling: transient versus sustained extracellular signal-regulated kinase activation. *Cell* 80, 179-185.
- Martin, G. S. (2003). Cell signaling and cancer. *Cancer Cell* 4, 167-174.
- Martin, G. S. (2004). The road to Src. *Oncogene* 23, 7910-7917.
- Mason, C. S., Springer, C. J., Cooper, R. G., Superti-Furga, G., Marshall, C. J., and Marais, R. (1999). Serine and tyrosine phosphorylations cooperate in Raf-1, but not B-Raf activation. *Embo J* 18, 2137-2148.

- Matheny, S. A., Chen, C., Kortum, R. L., Razidlo, G. L., Lewis, R. E., and White, M. A. (2004). Ras regulates assembly of mitogenic signalling complexes through the effector protein IMP. *Nature* *427*, 256-260.
- Matsubayashi, Y., Fukuda, M., and 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.
- Matsuura, H., Nishitoh, H., Takeda, K., Matsuzawa, A., Amagasa, T., Ito, M., Yoshioka, K., and Ichijo, H. (2002). Phosphorylation-dependent scaffolding role of JSAP1/JIP3 in the ASK1-JNK signaling pathway. A new mode of regulation of the MAP kinase cascade. *J Biol Chem* *277*, 40703-40709.
- McPhee, I., Yarwood, S. J., Scotland, G., Huston, E., Beard, M. B., Ross, A. H., Houslay, E. S., and Houslay, M. D. (1999). Association with the SRC family tyrosyl kinase LYN triggers a conformational change in the catalytic region of human cAMP-specific phosphodiesterase HSPDE4A4B. Consequences for rolipram inhibition. *J Biol Chem* *274*, 11796-11810.
- McPherson, R. A., Harding, A., Roy, S., Lane, A., and Hancock, J. F. (1999). Interactions of c-Raf-1 with phosphatidylserine and 14-3-3. *Oncogene* *18*, 3862-3869.
- Medema, R. H. (2004). Optimizing RNA interference for application in mammalian cells. *Biochem J* *380*, 593-603.
- Melnick, M. B., Perkins, L. A., Lee, M., Ambrosio, L., and Perrimon, N. (1993). Developmental and molecular characterization of mutations in the *Drosophila*-raf serine/threonine protein kinase. *Development* *118*, 127-138.
- Mendelsohn, J., and Baselga, J. (2000). The EGF receptor family as targets for cancer therapy. *Oncogene* *19*, 6550-6565.
- Mercer, K., Chiloeches, A., Huser, M., Kiernan, M., Marais, R., and Pritchard, C. (2002). ERK signalling and oncogene transformation are not impaired in cells lacking A-Raf. *Oncogene* *21*, 347-355.
- Mercer, K. E., and Pritchard, C. A. (2003). Raf proteins and cancer: B-Raf is identified as a mutational target. *Biochim Biophys Acta* *1653*, 25-40.
- Michaud, N. R., Therrien, M., Cacace, A., Edsall, L. C., Spiegel, S., Rubin, G. M., and Morrison, D. K. (1997). KSR stimulates Raf-1 activity in a kinase-independent manner. *Proc Natl Acad Sci U S A* *94*, 12792-12796.
- Middendorp, S., Zijlstra, A. J., Kersseboom, R., Dingjan, G. M., Jumaa, H., and Hendriks, R. W. (2005). Tumor suppressor function of Bruton tyrosine kinase is independent of its catalytic activity. *Blood* *105*, 259-265.

- Mikalsen, S. O., and Kaalhus, O. (1998). Properties of pervanadate and permolybdate. Connexin43, phosphatase inhibition, and thiol reactivity as model systems. *J Biol Chem* 273, 10036-10045.
- Mikula, M., Schreiber, M., Husak, Z., Kucerova, L., Ruth, J., Wieser, R., Zatloukal, K., Beug, H., Wagner, E. F., and 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, R. J., Johnson, G. L., and Karin, M. (1994). Differential activation of ERK and JNK mitogen-activated protein kinases by Raf-1 and MEKK. *Science* 266, 1719-1723.
- Mischak, H., Seitz, T., Janosch, P., Eulitz, M., Steen, H., Schellerer, M., Philipp, A., and Kolch, W. (1996). Negative regulation of Raf-1 by phosphorylation of serine 621. *Mol Cell Biol* 16, 5409-5418.
- Mishra, S., Smolik, S. M., Forte, M. A., and Stork, P. J. (2005). Ras-independent activation of ERK signaling via the torso receptor tyrosine kinase is mediated by Rap1. *Curr Biol* 15, 366-370.
- Mizutani, S., Inouye, K., Koide, H., and Kaziro, Y. (2001). Involvement of B-Raf in Ras-induced Raf-1 activation. *FEBS Lett* 507, 295-298.
- Moarefi, I., LaFevre-Bernt, M., Sicheri, F., Huse, M., Lee, C. H., Kuriyan, J., and Miller, W. T. (1997). Activation of the Src-family tyrosine kinase Hck by SH3 domain displacement. *Nature* 385, 650-653.
- Moghal, N., and Sternberg, P. W. (2003). The epidermal growth factor system in *Caenorhabditis elegans*. *Exp Cell Res* 284, 150-159.
- Mollereau, B., and Domingos, P. M. (2005). Photoreceptor differentiation in *Drosophila*: from immature neurons to functional photoreceptors. *Dev Dyn* 232, 585-592.
- Morrison, D. K. (2001). KSR: a MAPK scaffold of the Ras pathway? *J Cell Sci* 114, 1609-1612.
- Morrison, D. K. (2004). Cancer: enzymes play molecular tag. *Nature* 428, 813-815.
- Morrison, D. K., and Cutler, R. E. (1997). The complexity of Raf-1 regulation. *Curr Opin Cell Biol* 9, 174-179.
- Morrison, D. K., and Davis, R. J. (2003). Regulation of MAP kinase signaling modules by scaffold proteins in mammals. *Annu Rev Cell Dev Biol* 19, 91-118.
- Morrison, D. K., Murakami, M. S., and Cleghon, V. (2000). Protein kinases and phosphatases in the *Drosophila* genome. *J Cell Biol* 150, F57-62.

- Muller, J., Cacace, A. M., Lyons, W. E., McGill, C. B., and Morrison, D. K. (2000). Identification of B-KSR1, a novel brain-specific isoform of KSR1 that functions in neuronal signaling. *Mol Cell Biol* 20, 5529-5539.
- Muller, J., Ory, S., Copeland, T., Piwnica-Worms, H., and Morrison, D. K. (2001). C-TAK1 regulates Ras signaling by phosphorylating the MAPK scaffold, KSR1. *Mol Cell* 8, 983-993.
- Murakami, M. S., and Morrison, D. K. (2001). Raf-1 without MEK? *Sci STKE* 2001, PE30.
- Nakamoto, T., Sakai, R., Ozawa, K., Yazaki, Y., and Hirai, H. (1996). Direct binding of C-terminal region of p130Cas to SH2 and SH3 domains of Src kinase. *J Biol Chem* 271, 8959-8965.
- Nantel, A., Mohammad-Ali, K., Sherk, J., Posner, B. I., and Thomas, D. Y. (1998). Interaction of the Grb10 adapter protein with the Raf1 and MEK1 kinases. *J Biol Chem* 273, 10475-10484.
- Nebreda, A. R., and Porras, A. (2000). p38 MAP kinases: beyond the stress response. *Trends Biochem Sci* 25, 257-260.
- Neduva, V., and Russell, R. B. (2005). Linear motifs: evolutionary interaction switches. *FEBS Lett* 579, 3342-3345.
- Nguyen, A., Burack, W. R., Stock, J. L., Kortum, R., Chaika, O. V., Afkarian, M., Muller, W. J., Murphy, K. M., Morrison, D. K., Lewis, R. E., *et al.* (2002). Kinase suppressor of Ras (KSR) is a scaffold which facilitates mitogen-activated protein kinase activation in vivo. *Mol Cell Biol* 22, 3035-3045.
- Nihalani, D., Meyer, D., Pajni, S., and Holzman, L. B. (2001). Mixed lineage kinase-dependent JNK activation is governed by interactions of scaffold protein JIP with MAPK module components. *Embo J* 20, 3447-3458.
- Nimnual, A., and Bar-Sagi, D. (2002). The two hats of SOS. *Sci STKE* 2002, PE36.
- Nishina, H., Wada, T., and Katada, T. (2004). Physiological roles of SAPK/JNK signaling pathway. *J Biochem (Tokyo)* 136, 123-126.
- Noble, M. E., Endicott, J. A., and Johnson, L. N. (2004). Protein kinase inhibitors: insights into drug design from structure. *Science* 303, 1800-1805.
- Nolen, B., Taylor, S., and Ghosh, G. (2004). Regulation of protein kinases; controlling activity through activation segment conformation. *Mol Cell* 15, 661-675.
- Nourry, C., Grant, S. G., and Borg, J. P. (2003). PDZ domain proteins: plug and play! *Sci STKE* 2003, RE7.

- O'Neill, E., and Kolch, W. (2004). Conferring specificity on the ubiquitous Raf/MEK signalling pathway. *Br J Cancer* *90*, 283-288.
- O'Neill, E., and Kolch, W. (2005). Taming the Hippo: Raf-1 controls apoptosis by suppressing MST2/Hippo. *Cell Cycle* *4*, 365-367.
- O'Neill, E., Rushworth, L., Baccarini, M., and Kolch, W. (2004). Role of the kinase MST2 in suppression of apoptosis by the proto-oncogene product Raf-1. *Science* *306*, 2267-2270.
- O'Shea, J. J., Gadina, M., and Schreiber, R. D. (2002). Cytokine signaling in 2002: new surprises in the Jak/Stat pathway. *Cell* *109 Suppl*, S121-131.
- Ohmachi, M., Rocheleau, C. E., Church, D., Lambie, E., Schedl, T., and Sundaram, M. V. (2002). *C. elegans* ksr-1 and ksr-2 have both unique and redundant functions and are required for MPK-1 ERK phosphorylation. *Curr Biol* *12*, 427-433.
- Ohren, J. F., Chen, H., Pavlovsky, A., Whitehead, C., Zhang, E., Kuffa, P., Yan, C., McConnell, P., Spessard, C., Banotai, C., *et al.* (2004). Structures of human MAP kinase kinase 1 (MEK1) and MEK2 describe novel noncompetitive kinase inhibition. *Nat Struct Mol Biol* *11*, 1192-1197.
- Ohtakara, K., Nishizawa, M., Izawa, I., Hata, Y., Matsushima, S., Taki, W., Inada, H., Takai, Y., and Inagaki, M. (2002). Densin-180, a synaptic protein, links to PSD-95 through its direct interaction with MAGUIN-1. *Genes Cells* *7*, 1149-1160.
- Ohtsuka, T., Shimizu, K., Yamamori, B., Kuroda, S., and Takai, Y. (1996). Activation of brain B-Raf protein kinase by Rap1B small GTP-binding protein. *J Biol Chem* *271*, 1258-1261.
- Ory, S., and Morrison, D. K. (2004). Signal transduction: implications for Ras-dependent ERK signaling. *Curr Biol* *14*, R277-278.
- Ory, S., Zhou, M., Conrads, T. P., Veenstra, T. D., and Morrison, D. K. (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.
- Oxford, G., and Theodorescu, D. (2003). Ras superfamily monomeric G proteins in carcinoma cell motility. *Cancer Lett* *189*, 117-128.
- Pages, G., Guerin, S., Grall, D., Bonino, F., Smith, A., Anjuere, F., Auberger, P., and Pouyssegur, J. (1999). Defective thymocyte maturation in p44 MAP kinase (Erk 1) knockout mice. *Science* *286*, 1374-1377.
- Panchamoorthy, G., Fukazawa, T., Stolz, L., Payne, G., Reedquist, K., Shoelson, S., Songyang, Z., Cantley, L., Walsh, C., and Band, H. (1994). Physical and functional interactions between SH2 and SH3 domains of the Src family protein tyrosine kinase p59fyn. *Mol Cell Biol* *14*, 6372-6385.

- Park, S. H., Zarrinpar, A., and Lim, W. A. (2003). Rewiring MAP kinase pathways using alternative scaffold assembly mechanisms. *Science* 299, 1061-1064.
- Parsons, S. J., and Parsons, J. T. (2004). Src family kinases, key regulators of signal transduction. *Oncogene* 23, 7906-7909.
- Pawson, T. (2002). Regulation and targets of receptor tyrosine kinases. *Eur J Cancer* 38 Suppl 5, S3-10.
- Pawson, T. (2003). Organization of cell-regulatory systems through modular-protein-interaction domains. *Philos Transact A Math Phys Eng Sci* 361, 1251-1262.
- Pawson, T., and Nash, P. (2003). Assembly of cell regulatory systems through protein interaction domains. *Science* 300, 445-452.
- Pawson, T., and Scott, J. D. (1997). Signaling through scaffold, anchoring, and adaptor proteins. *Science* 278, 2075-2080.
- Pearson, G., Bumeister, R., Henry, D. O., Cobb, M. H., and White, M. A. (2000). Uncoupling Raf1 from MEK1/2 impairs only a subset of cellular responses to Raf activation. *J Biol Chem* 275, 37303-37306.
- Pearson, G., Robinson, F., Beers Gibson, T., Xu, B. E., Karandikar, M., Berman, K., and Cobb, M. H. (2001). Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocr Rev* 22, 153-183.
- Peng, X., Greene, L. A., Kaplan, D. R., and Stephens, R. M. (1995). Deletion of a conserved juxtamembrane sequence in Trk abolishes NGF-promoted neuritogenesis. *Neuron* 15, 395-406.
- Pol, A., Calvo, M., and Enrich, C. (1998). Isolated endosomes from quiescent rat liver contain the signal transduction machinery. Differential distribution of activated Raf-1 and Mek in the endocytic compartment. *FEBS Lett* 441, 34-38.
- Posas, F., and Saito, H. (1997). Osmotic activation of the HOG MAPK pathway via Ste11p MAPKKK: scaffold role of Pbs2p MAPKK. *Science* 276, 1702-1705.
- Pouyssegur, J., Volmat, V., and Lenormand, P. (2002). Fidelity and spatio-temporal control in MAP kinase (ERKs) signalling. *Biochem Pharmacol* 64, 755-763.
- Premont, R. T., Claing, A., Vitale, N., Freeman, J. L., Pitcher, J. A., Patton, W. A., Moss, J., Vaughan, M., and Lefkowitz, R. J. (1998). beta2-Adrenergic receptor regulation by GIT1, a G protein-coupled receptor kinase-associated ADP ribosylation factor GTPase-activating protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 14082-14087.
- Premont, R. T., Claing, A., Vitale, N., Perry, S. J., and Lefkowitz, R. J. (2000). The GIT family of ADP-ribosylation factor GTPase-activating proteins. Functional diversity of GIT2 through alternative splicing. *J Biol Chem* 275, 22373-22380.

- Prenzel, N., Zwick, E., Daub, H., Leserer, M., Abraham, R., Wallasch, C., and Ullrich, A. (1999). EGF receptor transactivation by G-protein-coupled receptors requires metalloproteinase cleavage of proHB-EGF. *Nature* *402*, 884-888.
- Printen, J. A., and Sprague, G. F., 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.
- Prior, I. A., Harding, A., Yan, J., Sluimer, J., Parton, R. G., and Hancock, J. F. (2001). GTP-dependent segregation of H-ras from lipid rafts is required for biological activity. *Nat Cell Biol* *3*, 368-375.
- Pritchard, C. A., Bolin, L., Slattery, R., Murray, R., and McMahon, M. (1996). Post-natal lethality and neurological and gastrointestinal defects in mice with targeted disruption of the A-Raf protein kinase gene. *Curr Biol* *6*, 614-617.
- Pritchard, C. A., Samuels, M. L., Bosch, E., and McMahon, M. (1995). Conditionally oncogenic forms of the A-Raf and B-Raf protein kinases display different biological and biochemical properties in NIH 3T3 cells. *Mol Cell Biol* *15*, 6430-6442.
- Pryciak, P. M., and Huntress, F. A. (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*, 2684-2697.
- Ptashne, M., and Gann, A. (2003). Signal transduction. Imposing specificity on kinases. *Science* *299*, 1025-1027.
- Qiao, F., and Bowie, J. U. (2005). The many faces of SAM. *Sci STKE* *2005*, re7.
- Qiao, F., Song, H., Kim, C. A., Sawaya, M. R., Hunter, J. B., Gingery, M., Rebay, I., Courey, A. J., and Bowie, J. U. (2004). Derepression by depolymerization; structural insights into the regulation of Yan by Mae. *Cell* *118*, 163-173.
- Raabe, T., and Rapp, U. R. (2003). Ras signaling: PP2A puts Ksr and Raf in the right place. *Curr Biol* *13*, R635-637.
- Rabizadeh, S., Xavier, R. J., Ishiguro, K., Bernabeortiz, J., Lopez-Illasaca, M., Khokhlatchev, A., Mollahan, P., Pfeifer, G. P., Avruch, J., and Seed, B. (2004). The scaffold protein CNK1 interacts with the tumor suppressor RASSF1A and augments RASSF1A-induced cell death. *J Biol Chem* *279*, 29247-29254.
- Rawlings, D. J., Scharenberg, A. M., Park, H., Wahl, M. I., Lin, S., Kato, R. M., Fluckiger, A. C., Witte, O. N., and Kinet, J. P. (1996). Activation of BTK by a phosphorylation mechanism initiated by SRC family kinases. *Science* *271*, 822-825.
- Reddy, K. B., Nabha, S. M., and Atanaskova, N. (2003). Role of MAP kinase in tumor progression and invasion. *Cancer Metastasis Rev* *22*, 395-403.

Repasky, G. A., Chenette, E. J., and Der, C. J. (2004). Renewing the conspiracy theory debate: does Raf function alone to mediate Ras oncogenesis? *Trends Cell Biol* 14, 639-647.

Reuther, G. W., and Der, C. J. (2000). The Ras branch of small GTPases: Ras family members don't fall far from the tree. *Curr Opin Cell Biol* 12, 157-165.

Richard, S., Yu, D., Blumer, K. J., Hausladen, D., Olszowy, M. W., Connelly, P. A., and Shaw, A. S. (1995). Association of p62, a multifunctional SH2- and SH3-domain-binding protein, with src family tyrosine kinases, Grb2, and phospholipase C gamma-1. *Mol Cell Biol* 15, 186-197.

Rocheleau, C. E., Ronnlund, A., Tuck, S., and Sundaram, M. V. (2005). *Caenorhabditis elegans* CNK-1 promotes Raf activation but is not essential for Ras/Raf signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*.

Rodriguez-Viciano, P., Sabatier, C., and McCormick, F. (2004). Signaling specificity by Ras family GTPases is determined by the full spectrum of effectors they regulate. *Mol Cell Biol* 24, 4943-4954.

Rommel, C., Radziwill, G., Moelling, K., and Hafen, E. (1997). Negative regulation of Raf activity by binding of 14-3-3 to the amino terminus of Raf in vivo. *Mech Dev* 64, 95-104.

Roskoski, R., Jr. (2004). Src protein-tyrosine kinase structure and regulation. *Biochem Biophys Res Commun* 324, 1155-1164.

Roulier, E. M., Panzer, S., and Beckendorf, S. K. (1998). The Tec29 tyrosine kinase is required during *Drosophila* embryogenesis and interacts with Src64 in ring canal development. *Mol Cell* 1, 819-829.

Roy, F., Laberge, G., Douziech, M., Ferland-McCollough, D., and Therrien, M. (2002). KSR is a scaffold required for activation of the ERK/MAPK module. *Genes Dev* 16, 427-438.

Roy, F., and Therrien, M. (2002). MAP kinase module: the Ksr connection. *Curr Biol* 12, R325-327.

Roy, S., Luetterforst, R., Harding, A., Apolloni, A., Etheridge, M., Stang, E., Rolls, B., Hancock, J. F., and Parton, R. G. (1999). Dominant-negative caveolin inhibits H-Ras function by disrupting cholesterol-rich plasma membrane domains. *Nat Cell Biol* 1, 98-105.

Roy, S., Wyse, B., and Hancock, J. F. (2002). H-Ras signaling and K-Ras signaling are differentially dependent on endocytosis. *Mol Cell Biol* 22, 5128-5140.

Russo, A. A., Jeffrey, P. D., Patten, A. K., Massague, J., and Pavletich, N. P. (1996). Crystal structure of the p27Kip1 cyclin-dependent-kinase inhibitor bound to the cyclin A-Cdk2 complex. *Nature* 382, 325-331.

- Saba-El-Leil, M. K., Vella, F. D., Vernay, B., Voisin, L., Chen, L., Labrecque, N., Ang, S. L., and Meloche, S. (2003). An essential function of the mitogen-activated protein kinase Erk2 in mouse trophoblast development. *EMBO Rep* 4, 964-968.
- Sakurai, H., Miyoshi, H., Mizukami, J., and Sugita, T. (2000). Phosphorylation-dependent activation of TAK1 mitogen-activated protein kinase kinase by TAB1. *FEBS Lett* 474, 141-145.
- Salerno, M., Palmieri, D., Bouadis, A., Halverson, D., and Steeg, P. S. (2005). Nm23-H1 metastasis suppressor expression level influences the binding properties, stability, and function of the kinase suppressor of Ras1 (KSR1) Erk scaffold in breast carcinoma cells. *Mol Cell Biol* 25, 1379-1388.
- Sasaki, A., Taketomi, T., Kato, R., Saeki, K., Nonami, A., Sasaki, M., Kuriyama, M., Saito, N., Shibuya, M., and Yoshimura, A. (2003). Mammalian Sprouty4 suppresses Ras-independent ERK activation by binding to Raf1. *Nat Cell Biol* 5, 427-432.
- Sasaoka, T., Langlois, W. J., Leitner, J. W., Draznin, B., and Olefsky, J. M. (1994). The signaling pathway coupling epidermal growth factor receptors to activation of p21ras. *J Biol Chem* 269, 32621-32625.
- Saxena, M., and Mustelin, T. (2000). Extracellular signals and scores of phosphatases: all roads lead to MAP kinase. *Semin Immunol* 12, 387-396.
- Schaeffer, H. J., Catling, A. D., Eblen, S. T., Collier, L. S., Krauss, A., and Weber, M. J. (1998). MP1: a MEK binding partner that enhances enzymatic activation of the MAP kinase cascade. *Science* 281, 1668-1671.
- Schaeffer, H. J., and Weber, M. J. (1999). Mitogen-activated protein kinases: specific messages from ubiquitous messengers. *Mol Cell Biol* 19, 2435-2444.
- Scheffzek, K., Ahmadian, M. R., and Wittinghofer, A. (1998). GTPase-activating proteins: helping hands to complement an active site. *Trends Biochem Sci* 23, 257-262.
- Schindler, T., Sicheri, F., Pico, A., Gazit, A., Levitzki, A., and Kuriyan, J. (1999). Crystal structure of Hck in complex with a Src family-selective tyrosine kinase inhibitor. *Mol Cell* 3, 639-648.
- Schlaepfer, D. D., Broome, M. A., and Hunter, T. (1997). Fibronectin-stimulated signaling from a focal adhesion kinase-c-Src complex: involvement of the Grb2, p130cas, and Nck adaptor proteins. *Mol Cell Biol* 17, 1702-1713.
- Schlaepfer, D. D., Hanks, S. K., Hunter, T., and van der Geer, P. (1994). Integrin-mediated signal transduction linked to Ras pathway by GRB2 binding to focal adhesion kinase. *Nature* 372, 786-791.
- Schlessinger, J. (2000). Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* 103, 211-225.

Schmitt, J. M., and Stork, P. J. (2002). PKA phosphorylation of Src mediates cAMP's inhibition of cell growth via Rap1. *Mol Cell* *9*, 85-94.

Schultz, J., Ponting, C. P., Hofmann, K., and Bork, P. (1997). SAM as a protein interaction domain involved in developmental regulation. *Protein Sci* *6*, 249-253.

Schwartzberg, P. L., Finkelstein, L. D., and Readinger, J. A. (2005). TEC-family kinases: regulators of T-helper-cell differentiation. *Nat Rev Immunol* *5*, 284-295.

Schwartzberg, P. L., Xing, L., Hoffmann, O., Lowell, C. A., Garrett, L., Boyce, B. F., and Varmus, H. E. (1997). Rescue of osteoclast function by transgenic expression of kinase-deficient Src in *src*^{-/-} mutant mice. *Genes Dev* *11*, 2835-2844.

Scott, K., and Zuker, C. S. (1998). Assembly of the *Drosophila* phototransduction cascade into a signalling complex shapes elementary responses. *Nature* *395*, 805-808.

Sebolt-Leopold, J. S., and Herrera, R. (2004). Targeting the mitogen-activated protein kinase cascade to treat cancer. *Nat Rev Cancer* *4*, 937-947.

Seet, B. T., and Pawson, T. (2004). MAPK signaling: Sho business. *Curr Biol* *14*, R708-710.

Selfors, L. M., Schutzman, J. L., Borland, C. Z., and Stern, M. J. (1998). *soc-2* encodes a leucine-rich repeat protein implicated in fibroblast growth factor receptor signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* *95*, 6903-6908.

Sette, C., Inouye, C. J., Stroschein, S. L., Iaquinta, P. J., and 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.

Sharma, C., Vomastek, T., Tarcsafalvi, A., Catling, A. D., Schaeffer, H. J., Eblen, S. T., and Weber, M. J. (2005). MEK partner 1 (MP1): regulation of oligomerization in MAP kinase signaling. *J Cell Biochem* *94*, 708-719.

Sharrocks, A. D., Yang, S. H., and Galanis, A. (2000). Docking domains and substrate-specificity determination for MAP kinases. *Trends Biochem Sci* *25*, 448-453.

Shenoy, S. K., and Lefkowitz, R. J. (2003). Multifaceted roles of beta-arrestins in the regulation of seven-membrane-spanning receptor trafficking and signalling. *Biochem J* *375*, 503-515.

Shields, J. M., Pruitt, K., McFall, A., Shaub, A., and Der, C. J. (2000). Understanding Ras: 'it ain't over 'til it's over'. *Trends Cell Biol* *10*, 147-154.

Sicheri, F., Moarefi, I., and Kuriyan, J. (1997). Crystal structure of the Src family tyrosine kinase Hck. *Nature* *385*, 602-609.

Sidovar, M. F., Kozlowski, P., Lee, J. W., Collins, M. A., He, Y., and Graves, L. M. (2000). Phosphorylation of serine 43 is not required for inhibition of c-Raf kinase by the cAMP-dependent protein kinase. *J Biol Chem* 275, 28688-28694.

Sieburth, D. S., Sun, Q., and Han, M. (1998). SUR-8, a conserved Ras-binding protein with leucine-rich repeats, positively regulates Ras-mediated signaling in *C. elegans*. *Cell* 94, 119-130.

Sieburth, D. S., Sundaram, M., Howard, R. M., and Han, M. (1999). A PP2A regulatory subunit positively regulates Ras-mediated signaling during *Caenorhabditis elegans* vulval induction. *Genes Dev* 13, 2562-2569.

Silvius, J. R. (2002). Mechanisms of Ras protein targeting in mammalian cells. *J Membr Biol* 190, 83-92.

Simon, M. A. (2000). Receptor tyrosine kinases: specific outcomes from general signals. *Cell* 103, 13-15.

Simon, M. A., Drees, B., Kornberg, T., and Bishop, J. M. (1985). The nucleotide sequence and the tissue-specific expression of *Drosophila* c-src. *Cell* 42, 831-840.

Simons, K., and Toomre, D. (2000). Lipid rafts and signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol* 1, 31-39.

Slack-Davis, J. K., Eblen, S. T., Zecevic, M., Boerner, S. A., Tarcsafalvi, A., Diaz, H. B., Marshall, M. S., Weber, M. J., Parsons, J. T., and Catling, A. D. (2003). PAK1 phosphorylation of MEK1 regulates fibronectin-stimulated MAPK activation. *J Cell Biol* 162, 281-291.

Smith, F. D., and Scott, J. D. (2002). Signaling complexes: junctions on the intracellular information super highway. *Curr Biol* 12, R32-40.

Sorkin, A., and Von Zastrow, M. (2002). Signal transduction and endocytosis: close encounters of many kinds. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3, 600-614.

St Johnston, D. (2002). The art and design of genetic screens: *Drosophila melanogaster*. *Nat Rev Genet* 3, 176-188.

Stein, E., Cerretti, D. P., and Daniel, T. O. (1996). Ligand activation of ELK receptor tyrosine kinase promotes its association with Grb10 and Grb2 in vascular endothelial cells. *J Biol Chem* 271, 23588-23593.

Stein, E., Lane, A. A., Cerretti, D. P., Schoecklmann, H. O., Schroff, A. D., Van Etten, R. L., and Daniel, T. O. (1998). Eph receptors discriminate specific ligand oligomers to determine alternative signaling complexes, attachment, and assembly responses. *Genes Dev* 12, 667-678.

Stewart, S., Sundaram, M., Zhang, Y., Lee, J., Han, M., and Guan, K. L. (1999). Kinase suppressor of Ras forms a multiprotein signaling complex and modulates MEK localization. *Mol Cell Biol* *19*, 5523-5534.

Stoker, A. W. (2005). Protein tyrosine phosphatases and signalling. *J Endocrinol* *185*, 19-33.

Stokoe, D., Macdonald, S. G., Cadwallader, K., Symons, M., and Hancock, J. F. (1994). Activation of Raf as a result of recruitment to the plasma membrane. *Science* *264*, 1463-1467.

Sudol, M., Sliwa, K., and Russo, T. (2001). Functions of WW domains in the nucleus. *FEBS Lett* *490*, 190-195.

Sugimoto, T., Stewart, S., Han, M., and Guan, K. L. (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.

Sun, C. X., Robb, V. A., and Gutmann, D. H. (2002). Protein 4.1 tumor suppressors: getting a FERM grip on growth regulation. *J Cell Sci* *115*, 3991-4000.

Sun, H., King, A. J., Diaz, H. B., and Marshall, M. S. (2000). Regulation of the protein kinase Raf-1 by oncogenic Ras through phosphatidylinositol 3-kinase, Cdc42/Rac and Pak. *Curr Biol* *10*, 281-284.

Sundaram, M., and Han, M. (1995). The *C. elegans* *ksr-1* gene encodes a novel Raf-related kinase involved in Ras-mediated signal transduction. *Cell* *83*, 889-901.

Takahashi, F., Endo, S., Kojima, T., and Saigo, K. (1996). Regulation of cell-cell contacts in developing *Drosophila* eyes by Dsrc41, a new, close relative of vertebrate c-src. *Genes Dev* *10*, 1645-1656.

Takahashi, M., Takahashi, F., Ui-Tei, K., Kojima, T., and Saigo, K. (2005). Requirements of genetic interactions between Src42A, armadillo and shotgun, a gene encoding E-cadherin, for normal development in *Drosophila*. *Development* *132*, 2547-2559.

Takai, Y., Sasaki, T., and Matozaki, T. (2001). Small GTP-binding proteins. *Physiol Rev* *81*, 153-208.

Takekawa, M., Tatebayashi, K., and 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.

Tan, P. B., and Kim, S. K. (1999). Signaling specificity: the RTK/RAS/MAP kinase pathway in metazoans. *Trends Genet* *15*, 145-149.

Tanoue, T., Adachi, M., Moriguchi, T., and 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., and Nishida, E. (2001). 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., and Nishida, E. (2002). Docking interactions in the mitogen-activated protein kinase cascades. *Pharmacol Ther* 93, 193-202.
- Tanoue, T., and Nishida, E. (2003). Molecular recognitions in the MAP kinase cascades. *Cell Signal* 15, 455-462.
- Tateno, M., Nishida, Y., and Adachi-Yamada, T. (2000). Regulation of JNK by Src during *Drosophila* development. *Science* 287, 324-327.
- Taylor, S. J., Anafi, M., Pawson, T., and Shalloway, D. (1995). Functional interaction between c-Src and its mitotic target, Sam 68. *J Biol Chem* 270, 10120-10124.
- Taylor, S. S., and Radzio-Andzelm, E. (1997). Protein kinase inhibition: natural and synthetic variations on a theme. *Curr Opin Chem Biol* 1, 219-226.
- Teis, D., Wunderlich, W., and Huber, L. A. (2002). Localization of the MP1-MAPK scaffold complex to endosomes is mediated by p14 and required for signal transduction. *Dev Cell* 3, 803-814.
- Teng, K. K., Lander, H., Fajardo, J. E., Hanafusa, H., Hempstead, B. L., and Birge, R. B. (1995). v-Crk modulation of growth factor-induced PC12 cell differentiation involves the Src homology 2 domain of v-Crk and sustained activation of the Ras/mitogen-activated protein kinase pathway. *J Biol Chem* 270, 20677-20685.
- Therrien, M., Chang, H. C., Solomon, N. M., Karim, F. D., Wassarman, D. A., and Rubin, G. M. (1995). KSR, a novel protein kinase required for RAS signal transduction. *Cell* 83, 879-888.
- Therrien, M., Michaud, N. R., Rubin, G. M., and Morrison, D. K. (1996). KSR modulates signal propagation within the MAPK cascade. *Genes Dev* 10, 2684-2695.
- Therrien, M., Morrison, D. K., Wong, A. M., and Rubin, G. M. (2000). A genetic screen for modifiers of a kinase suppressor of Ras-dependent rough eye phenotype in *Drosophila*. *Genetics* 156, 1231-1242.
- Therrien, M., Wong, A. M., Kwan, E., and Rubin, G. M. (1999). Functional analysis of CNK in RAS signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 13259-13263.
- Therrien, M., Wong, A. M., and Rubin, G. M. (1998). CNK, a RAF-binding multidomain protein required for RAS signaling. *Cell* 95, 343-353.
- Thomas, G. M., and Huganir, R. L. (2004). MAPK cascade signalling and synaptic plasticity. *Nat Rev Neurosci* 5, 173-183.

Thomas, J. W., Ellis, B., Boerner, R. J., Knight, W. B., White, G. C., 2nd, and Schaller, M. D. (1998). SH2- and SH3-mediated interactions between focal adhesion kinase and Src. *J Biol Chem* 273, 577-583.

Thomas, S. M., and Brugge, J. S. (1997). Cellular functions regulated by Src family kinases. *Annu Rev Cell Dev Biol* 13, 513-609.

Thompson, N., and Lyons, J. (2005). Recent progress in targeting the Raf/MEK/ERK pathway with inhibitors in cancer drug discovery. *Curr Opin Pharmacol* 5, 350-356.

Tohgo, A., Choy, E. W., Gesty-Palmer, D., Pierce, K. L., Laporte, S., Oakley, R. H., Caron, M. G., Lefkowitz, R. J., and Luttrell, L. M. (2003). The stability of the G protein-coupled receptor-beta-arrestin interaction determines the mechanism and functional consequence of ERK activation. *J Biol Chem* 278, 6258-6267.

Tohgo, A., Pierce, K. L., Choy, E. W., Lefkowitz, R. J., and Luttrell, L. M. (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.

Torii, S., Kusakabe, M., Yamamoto, T., Maekawa, M., and Nishida, E. (2004). Sef is a spatial regulator for Ras/MAP kinase signaling. *Dev Cell* 7, 33-44.

Trakul, N., Menard, R. E., Schade, G. R., Qian, Z., and Rosner, M. R. (2005). Raf kinase inhibitory protein regulates Raf-1 but not B-Raf kinase activation. *J Biol Chem* 280, 24931-24940.

Trakul, N., and Rosner, M. R. (2005). Modulation of the MAP kinase signaling cascade by Raf kinase inhibitory protein. *Cell Res* 15, 19-23.

Tran, N. H., and Frost, J. A. (2003). Phosphorylation of Raf-1 by p21-activated kinase 1 and Src regulates Raf-1 autoinhibition. *J Biol Chem* 278, 11221-11226.

Tran, N. H., Wu, X., and Frost, J. A. (2005). B-Raf and Raf-1 are regulated by distinct autoregulatory mechanisms. *J Biol Chem* 280, 16244-16253.

Troppmair, J., and Rapp, U. R. (2003). Raf and the road to cell survival: a tale of bad spells, ring bearers and detours. *Biochem Pharmacol* 66, 1341-1345.

Tsang, M., Friesel, R., Kudoh, T., and Dawid, I. B. (2002). Identification of Sef, a novel modulator of FGF signalling. *Nat Cell Biol* 4, 165-169.

Tsatsanis, C., and Spandidos, D. A. (2004). Oncogenic kinase signaling in human neoplasms. *Ann N Y Acad Sci* 1028, 168-175.

Tsavachidou, D., Coleman, M. L., Athanasiadis, G., Li, S., Licht, J. D., Olson, M. F., and Weber, B. L. (2004). SPRY2 is an inhibitor of the ras/extracellular signal-regulated kinase

pathway in melanocytes and melanoma cells with wild-type BRAF but not with the V599E mutant. *Cancer Res* 64, 5556-5559.

Tsunoda, S., Sierralta, J., Sun, Y., Bodner, R., Suzuki, E., Becker, A., Socolich, M., and Zuker, C. S. (1997). A multivalent PDZ-domain protein assembles signalling complexes in a G-protein-coupled cascade. *Nature* 388, 243-249.

Tsunoda, S., and Zuker, C. S. (1999). The organization of INAD-signaling complexes by a multivalent PDZ domain protein in *Drosophila* photoreceptor cells ensures sensitivity and speed of signaling. *Cell Calcium* 26, 165-171.

Turner, C. E., Brown, M. C., Perrotta, J. A., Riedy, M. C., Nikolopoulos, S. N., McDonald, A. R., Bagrodia, S., Thomas, S., and Leventhal, P. S. (1999). Paxillin LD4 motif binds PAK and PIX through a novel 95-kD ankyrin repeat, ARF-GAP protein: A role in cytoskeletal remodeling. *J Cell Biol* 145, 851-863.

Tzivion, G., Luo, Z., and Avruch, J. (1998). A dimeric 14-3-3 protein is an essential cofactor for Raf kinase activity. *Nature* 394, 88-92.

Ueda, Y., Hirai, S., Osada, S., Suzuki, A., Mizuno, K., and Ohno, S. (1996). Protein kinase C activates the MEK-ERK pathway in a manner independent of Ras and dependent on Raf. *J Biol Chem* 271, 23512-23519.

Vaillancourt, R. R., Heasley, L. E., Zamarripa, J., Storey, B., Valius, M., Kazlauskas, A., and Johnson, G. L. (1995). Mitogen-activated protein kinase activation is insufficient for growth factor receptor-mediated PC12 cell differentiation. *Mol Cell Biol* 15, 3644-3653.

VanderKuur, J., Allevato, G., Billestrup, N., Norstedt, G., and Carter-Su, C. (1995). Growth hormone-promoted tyrosyl phosphorylation of SHC proteins and SHC association with Grb2. *J Biol Chem* 270, 7587-7593.

Vieira, A. V., Lamaze, C., and Schmid, S. L. (1996). Control of EGF receptor signaling by clathrin-mediated endocytosis. *Science* 274, 2086-2089.

Vitale, N., Patton, W. A., Moss, J., Vaughan, M., Lefkowitz, R. J., and Premont, R. T. (2000). GIT proteins, A novel family of phosphatidylinositol 3,4, 5-trisphosphate-stimulated GTPase-activating proteins for ARF6. *J Biol Chem* 275, 13901-13906.

Voas, M. G., and Rebay, I. (2004). Signal integration during development: insights from the *Drosophila* eye. *Dev Dyn* 229, 162-175.

Vogelstein, B., and Kinzler, K. W. (2004). Cancer genes and the pathways they control. *Nat Med* 10, 789-799.

Volle, D. J., Fulton, J. A., Chaika, O. V., McDermott, K., Huang, H., Steinke, L. A., and Lewis, R. E. (1999). Phosphorylation of the kinase suppressor of ras by associated kinases. *Biochemistry* 38, 5130-5137.

Vomastek, T., Schaeffer, H. J., Tarcsafalvi, A., Smolkin, M. E., Bissonette, E. A., and Weber, M. J. (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.

Vondriska, T. M., Pass, J. M., and Ping, P. (2004). Scaffold proteins and assembly of multiprotein signaling complexes. *J Mol Cell Cardiol* *37*, 391-397.

Vossler, M. R., Yao, H., York, R. D., Pan, M. G., Rim, C. S., and Stork, P. J. (1997). cAMP activates MAP kinase and Elk-1 through a B-Raf- and Rap1-dependent pathway. *Cell* *89*, 73-82.

Wakioka, T., Sasaki, A., Kato, R., Shouda, T., Matsumoto, A., Miyoshi, K., Tsuneoka, M., Komiya, S., Baron, R., and Yoshimura, A. (2001). Spred is a Sprouty-related suppressor of Ras signalling. *Nature* *412*, 647-651.

Walker, S. A., Cullen, P. J., Taylor, J. A., and Lockyer, P. J. (2003). Control of Ras cycling by Ca²⁺. *FEBS Lett* *546*, 6-10.

Wan, P. T., Garnett, M. J., Roe, S. M., Lee, S., Niculescu-Duvaz, D., Good, V. M., Jones, C. M., Marshall, C. J., Springer, C. J., Barford, D., and Marais, R. (2004). Mechanism of activation of the RAF-ERK signaling pathway by oncogenic mutations of B-RAF. *Cell* *116*, 855-867.

Wang, H. G., Rapp, U. R., and Reed, J. C. (1996). Bcl-2 targets the protein kinase Raf-1 to mitochondria. *Cell* *87*, 629-638.

Wang, H. G., Takayama, S., Rapp, U. R., and Reed, J. C. (1996). Bcl-2 interacting protein, BAG-1, binds to and activates the kinase Raf-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* *93*, 7063-7068.

Wang, S., Ghosh, R. N., and Chellappan, S. P. (1998). Raf-1 physically interacts with Rb and regulates its function: a link between mitogenic signaling and cell cycle regulation. *Mol Cell Biol* *18*, 7487-7498.

Wang, X., and Studzinski, G. P. (2001). Phosphorylation of raf-1 by kinase suppressor of ras is inhibited by "MEK-specific" inhibitors PD 098059 and U0126 in differentiating HL60 cells. *Exp Cell Res* *268*, 294-300.

Wary, K. K., Mariotti, A., Zurzolo, C., and Giancotti, F. G. (1998). A requirement for caveolin-1 and associated kinase Fyn in integrin signaling and anchorage-dependent cell growth. *Cell* *94*, 625-634.

Wassarman, D. A., Solomon, N. M., Chang, H. C., Karim, F. D., Therrien, M., and Rubin, G. M. (1996). Protein phosphatase 2A positively and negatively regulates Ras1-mediated photoreceptor development in *Drosophila*. *Genes Dev* *10*, 272-278.

Weber, C. K., Slusky, J. R., Kalmes, H. A., and Rapp, U. R. (2001). Active Ras induces heterodimerization of cRaf and B-Raf. *Cancer Res* *61*, 3595-3598.

Wellbrock, C., Karasarides, M., and Marais, R. (2004). The RAF proteins take centre stage. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5, 875-885.

West, K. A., Zhang, H., Brown, M. C., Nikolopoulos, S. N., Riedy, M. C., Horwitz, A. F., and Turner, C. E. (2001). The LD4 motif of paxillin regulates cell spreading and motility through an interaction with paxillin kinase linker (PKL). *J Cell Biol* 154, 161-176.

Whitmarsh, A. J., Cavanagh, J., Tournier, C., Yasuda, J., and Davis, R. J. (1998). A mammalian scaffold complex that selectively mediates MAP kinase activation. *Science* 281, 1671-1674.

Whitmarsh, A. J., and Davis, R. J. (1998). Structural organization of MAP-kinase signaling modules by scaffold proteins in yeast and mammals. *Trends Biochem Sci* 23, 481-485.

Widmann, C., Gibson, S., Jarpe, M. B., and Johnson, G. L. (1999). Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human. *Physiol Rev* 79, 143-180.

Williams, J. C., Weijland, A., Gonfloni, S., Thompson, A., Courtneidge, S. A., Superti-Furga, G., and Wierenga, R. K. (1997). The 2.35 Å crystal structure of the inactivated form of chicken Src: a dynamic molecule with multiple regulatory interactions. *J Mol Biol* 274, 757-775.

Wixler, V., Smola, U., Schuler, M., and Rapp, U. (1996). Differential regulation of Raf isozymes by growth versus differentiation inducing factors in PC12 pheochromocytoma cells. *FEBS Lett* 385, 131-137.

Wojnowski, L., Stancato, L. F., Larner, A. C., Rapp, U. R., and Zimmer, A. (2000). Overlapping and specific functions of Braf and Craf-1 proto-oncogenes during mouse embryogenesis. *Mech Dev* 91, 97-104.

Wojnowski, L., Stancato, L. F., Zimmer, A. M., Hahn, H., Beck, T. W., Larner, A. C., Rapp, U. R., and Zimmer, A. (1998). Craf-1 protein kinase is essential for mouse development. *Mech Dev* 76, 141-149.

Wojnowski, L., Zimmer, A. M., Beck, T. W., Hahn, H., Bernal, R., Rapp, U. R., and Zimmer, A. (1997). Endothelial apoptosis in Braf-deficient mice. *Nat Genet* 16, 293-297.

Woods, D., Parry, D., Cherwinski, H., Bosch, E., Lees, E., and McMahon, M. (1997). Raf-induced proliferation or cell cycle arrest is determined by the level of Raf activity with arrest mediated by p21Cip1. *Mol Cell Biol* 17, 5598-5611.

Wu, S., Huang, J., Dong, J., and Pan, D. (2003). hippo encodes a Ste-20 family protein kinase that restricts cell proliferation and promotes apoptosis in conjunction with salvador and warts. *Cell* 114, 445-456.

Wu, Y., Chen, Z., and Ullrich, A. (2003). EGFR and FGFR signaling through FRS2 is subject to negative feedback control by ERK1/2. *Biol Chem* 384, 1215-1226.

Wunderlich, W., Fialka, I., Teis, D., Alpi, A., Pfeifer, A., Parton, R. G., Lottspeich, F., and Huber, L. A. (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.

Xia, K., Mukhopadhyay, N. K., Inhorn, R. C., Barber, D. L., Rose, P. E., Lee, R. S., Narsimhan, R. P., D'Andrea, A. D., Griffin, J. D., and Roberts, T. M. (1996). The cytokine-activated tyrosine kinase JAK2 activates Raf-1 in a p21ras-dependent manner. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 11681-11686.

Xia, Z., Dickens, M., Raingeaud, J., Davis, R. J., and Greenberg, M. E. (1995). Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis. *Science* 270, 1326-1331.

Xing, H., Kornfeld, K., and Muslin, A. J. (1997). The protein kinase KSR interacts with 14-3-3 protein and Raf. *Curr Biol* 7, 294-300.

Xing, H. R., Campodonico, L., and Kolesnick, R. (2004). The kinase activity of kinase suppressor of Ras1 (KSR1) is independent of bound MEK. *J Biol Chem* 279, 26210-26214.

Xing, H. R., Cordon-Cardo, C., Deng, X., Tong, W., Campodonico, L., Fuks, Z., and Kolesnick, R. (2003). Pharmacologic inactivation of kinase suppressor of ras-1 abrogates Ras-mediated pancreatic cancer. *Nat Med* 9, 1266-1268.

Xing, H. R., and Kolesnick, R. (2001). Kinase suppressor of Ras signals through Thr269 of c-Raf-1. *J Biol Chem* 276, 9733-9741.

Xing, H. R., Lozano, J., and Kolesnick, R. (2000). Epidermal growth factor treatment enhances the kinase activity of kinase suppressor of Ras. *J Biol Chem* 275, 17276-17280.

Xing, L., Ge, C., Zeltser, R., Maskevitch, G., Mayer, B. J., and Alexandropoulos, K. (2000). c-Src signaling induced by the adapters Sin and Cas is mediated by Rap1 GTPase. *Mol Cell Biol* 20, 7363-7377.

Xu, S., Robbins, D. J., Christerson, L. B., English, J. M., Vanderbilt, C. A., and Cobb, M. H. (1996). Cloning of rat MEK kinase 1 cDNA reveals an endogenous membrane-associated 195-kDa protein with a large regulatory domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 5291-5295.

Xu, W., Doshi, A., Lei, M., Eck, M. J., and Harrison, S. C. (1999). Crystal structures of c-Src reveal features of its autoinhibitory mechanism. *Mol Cell* 3, 629-638.

Xu, W., Harrison, S. C., and Eck, M. J. (1997). Three-dimensional structure of the tyrosine kinase c-Src. *Nature* 385, 595-602.

Yablonski, D., Marbach, I., and 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, M. B. (2002). Phosphotyrosine-binding domains in signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3, 177-186.

Yamaguchi, O., Watanabe, T., Nishida, K., Kashiwase, K., Higuchi, Y., Takeda, T., Hikoso, S., Hirotsu, S., Asahi, M., Taniike, M., *et al.* (2004). Cardiac-specific disruption of the c-raf-1 gene induces cardiac dysfunction and apoptosis. *J Clin Invest* 114, 937-943.

Yan, M., Dai, T., Deak, J. C., Kyriakis, J. M., Zon, L. I., Woodgett, J. R., and Templeton, D. J. (1994). Activation of stress-activated protein kinase by MEKK1 phosphorylation of its activator SEK1. *Nature* 372, 798-800.

Yan, M., and Templeton, D. J. (1994). Identification of 2 serine residues of MEK-1 that are differentially phosphorylated during activation by raf and MEK kinase. *J Biol Chem* 269, 19067-19073.

Yang, L. T., Alexandropoulos, K., and Sap, J. (2002). c-SRC mediates neurite outgrowth through recruitment of Crk to the scaffolding protein Sin/Efs without altering the kinetics of ERK activation. *J Biol Chem* 277, 17406-17414.

Yao, I., Hata, Y., Ide, N., Hirao, K., Deguchi, M., Nishioka, H., Mizoguchi, A., and Takai, Y. (1999). MAGUIN, a novel neuronal membrane-associated guanylate kinase-interacting protein. *J Biol Chem* 274, 11889-11896.

Yao, I., Ohtsuka, T., Kawabe, H., Matsuura, Y., Takai, Y., and Hata, Y. (2000). Association of membrane-associated guanylate kinase-interacting protein-1 with Raf-1. *Biochem Biophys Res Commun* 270, 538-542.

Yasuda, J., Whitmarsh, A. J., Cavanagh, J., Sharma, M., and Davis, R. J. (1999). The JIP group of mitogen-activated protein kinase scaffold proteins. *Mol Cell Biol* 19, 7245-7254.

Yeatman, T. J. (2004). A renaissance for SRC. *Nat Rev Cancer* 4, 470-480.

Yeung, K., Janosch, P., McFerran, B., Rose, D. W., Mischak, H., Sedivy, J. M., and 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, K. D., Rose, D. W., Mischak, H., *et al.* (1999). Suppression of Raf-1 kinase activity and MAP kinase signalling by RKIP. *Nature* 401, 173-177.

Yin, G., Haendeler, J., Yan, C., and Berk, B. C. (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.

Yip-Schneider, M. T., Miao, W., Lin, A., Barnard, D. S., Tzivion, G., and Marshall, M. S. (2000). Regulation of the Raf-1 kinase domain by phosphorylation and 14-3-3 association. *Biochem J* 351, 151-159.

- York, R. D., Yao, H., Dillon, T., Ellig, C. L., Eckert, S. P., McCleskey, E. W., and Stork, P. J. (1998). Rap1 mediates sustained MAP kinase activation induced by nerve growth factor. *Nature* 392, 622-626.
- Yu, W., Fantl, W. J., Harrowe, G., and Williams, L. T. (1998). Regulation of the MAP kinase pathway by mammalian Ksr through direct interaction with MEK and ERK. *Curr Biol* 8, 56-64.
- Yujiri, T., Sather, S., Fanger, G. R., and Johnson, G. L. (1998). Role of MEKK1 in cell survival and activation of JNK and ERK pathways defined by targeted gene disruption. *Science* 282, 1911-1914.
- Yuryev, A., Ono, M., Goff, S. A., Macaluso, F., and Wennogle, L. P. (2000). Isoform-specific localization of A-RAF in mitochondria. *Mol Cell Biol* 20, 4870-4878.
- Zang, M., Hayne, C., and Luo, Z. (2002). Interaction between active Pak1 and Raf-1 is necessary for phosphorylation and activation of Raf-1. *J Biol Chem* 277, 4395-4405.
- Zarrinpar, A., Park, S. H., and Lim, W. A. (2003). Optimization of specificity in a cellular protein interaction network by negative selection. *Nature* 426, 676-680.
- Zhang, B. H., and Guan, K. L. (2000). Activation of B-Raf kinase requires phosphorylation of the conserved residues Thr598 and Ser601. *Embo J* 19, 5429-5439.
- Zhang, B. H., Tang, E. D., Zhu, T., Greenberg, M. E., Vojtek, A. B., and Guan, K. L. (2001). Serum- and glucocorticoid-inducible kinase SGK phosphorylates and negatively regulates B-Raf. *J Biol Chem* 276, 31620-31626.
- Zhang, F., Strand, A., Robbins, D., Cobb, M. H., and Goldsmith, E. J. (1994). Atomic structure of the MAP kinase ERK2 at 2.3 Å resolution. *Nature* 367, 704-711.
- Zhang, Q., and Lu, X. (2000). *semang* affects the development of a subset of cells in the *Drosophila* compound eye. *Mech Dev* 95, 113-122.
- Zhang, Q., Zheng, Q., and Lu, X. (1999). A genetic screen for modifiers of *drosophila* Src42A identifies mutations in *Egfr*, *rolled* and a novel signaling gene. *Genetics* 151, 697-711.
- Zhang, X. F., Settleman, J., Kyriakis, J. M., Takeuchi-Suzuki, E., Elledge, S. J., Marshall, M. S., Bruder, J. T., Rapp, U. R., and 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., Yao, B., Delikat, S., Bayoumy, S., Lin, X. H., Basu, S., McGinley, M., Chan-Hui, P. Y., Lichenstein, H., and Kolesnick, R. (1997). Kinase suppressor of Ras is ceramide-activated protein kinase. *Cell* 89, 63-72.
- Zhang, Z. Y., Zhou, B., and Xie, L. (2002). Modulation of protein kinase signaling by protein phosphatases and inhibitors. *Pharmacol Ther* 93, 307-317.

Zhao, Z. S., Manser, E., Loo, T. H., and Lim, L. (2000). Coupling of PAK-interacting exchange factor PIX to GIT1 promotes focal complex disassembly. *Mol Cell Biol* 20, 6354-6363.

Zhong, J., Troppmair, J., and Rapp, U. R. (2001). Independent control of cell survival by Raf-1 and Bcl-2 at the mitochondria. *Oncogene* 20, 4807-4816.

Zhou, M., Horita, D. A., Waugh, D. S., Byrd, R. A., and Morrison, D. K. (2002). Solution structure and functional analysis of the cysteine-rich C1 domain of kinase suppressor of Ras (KSR). *J Mol Biol* 315, 435-446.

Zimmermann, S., and Moelling, K. (1999). Phosphorylation and regulation of Raf by Akt (protein kinase B). *Science* 286, 1741-1744.

Ziogas, A., Lorenz, I. C., Moelling, K., and Radziwill, G. (1998). Mitotic Raf-1 is stimulated independently of Ras and is active in the cytoplasm. *J Biol Chem* 273, 24108-24114.

Ziogas, A., Moelling, K., and Radziwill, G. (2005). CNK1 is a scaffold protein that regulates Src-mediated Raf-1 activation. *J Biol Chem* 280, 24205-24211.

Zou, Y., Komuro, I., Yamazaki, T., Aikawa, R., Kudoh, S., Shiojima, I., Hiroi, Y., Mizuno, T., and Yazaki, Y. (1996). Protein kinase C, but not tyrosine kinases or Ras, plays a critical role in angiotensin II-induced activation of Raf-1 kinase and extracellular signal-regulated protein kinases in cardiac myocytes. *J Biol Chem* 271, 33592-33597.

Annexe 1

Bimodal regulation of RAF by CNK in *Drosophila*

Mélanie Douziech, François Roy,
Gino Laberge, Martin Lefrançois,
Anne-Valérie Armengod and Marc Therrien¹

Clinical Research Institute of Montreal, Laboratory of Intracellular Signaling, 110 Pine Avenue, West Montreal, PQ H2W 1R7, Canada



Connector enhancer of KSR (CNK) is a multidomain-containing protein previously identified as a positive regulator of the RAS/MAPK pathway in *Drosophila*. Using transfection experiments and an RNAi-based rescue assay in *Drosophila* S2 cells, we demonstrate that CNK has antagonistic properties with respect to RAF activity. We show that CNK's N-terminal region contains two domains (SAM and CRIC) that are essential for RAF function. Unexpectedly, we also report that the C-terminal region of CNK contains a short bipartite element that strongly inhibits RAF catalytic function. Interestingly, CNK's opposite properties appear to prevent signaling leakage from RAF to MEK in the absence of upstream signals, but then transforms into a potent RAF activator upon signal activation. Together, these findings suggest that CNK not only participates in the elusive RAF activation process, but might also contribute to the switch-like behavior of the MAPK module.

Keywords: CNK/RAS-MAPK module/RNAi /signal transduction

Introduction

The extracellular-regulated kinase/mitogen-activated protein kinase (ERK/MAPK) module, herein referred to as the MAPK module, is defined as a group of three kinases that is comprised of specific isoforms of the serine/threonine kinase RAF, the dual-specificity MAPK/ERK kinase (MEK) and the proline-directed serine/threonine kinase ERK/MAPK. This module transmits signals mainly received from the small GTPase RAS to control a number of critical cellular events such as proliferation, differentiation and survival (for review, see English *et al.*, 1999). Early characterization of this signaling pathway identified a simple relationship among the core components, whereby upon RAS activation, RAF is recruited to the plasma membrane by RAS, which in turn triggers a phosphorylation cascade from RAF to MAPK. In-depth investigations of each individual step, however, are now unraveling a surprisingly complex process that involves additional proteins whose respective role is either partially or not understood (for review, see Kolch, 2000).

RAS was recognized early on as a major player in RAF activation, principally by its ability to recruit RAF to the

plasma membrane through an interaction between its effector loop region and the RAS-binding domain (RBD) on RAF (for review, see Avruch *et al.*, 1994). However, as this event did not appear sufficient to activate mammalian Raf-1 *in vitro*, additional molecules were predicted to participate in RAF activation. A search for proteins that could bind and modify RAF activity identified the 14-3-3 protein family as potential RAF regulators (for review, see Morrison and Cutler, 1997). These abundant proteins bind as dimers a wide range of targets through the recognition of specific sequence motifs, some of which require threonine or serine phosphorylation for binding (for review, see Tzivion and Avruch, 2002). RAF proteins contain two evolutionarily-conserved 14-3-3 binding sites; one surrounding phospho-serine 259 (pS259) and the second at phospho-serine 621 (pS621) in Raf-1 (Muslin *et al.*, 1996). Growing evidence now suggests that 14-3-3-binding to these sites has opposite effects on RAF. Whereas pS621 occupancy seems critical for RAF activity (Thorson *et al.*, 1998; Yip-Schneider *et al.*, 2000), pS259 binding correlates with inactive RAF (Dhillon *et al.*, 2002; Light *et al.*, 2002), possibly by forcing RAF to adopt an inactive conformation and/or by sequestering RAF in the cytoplasm. Displacement of 14-3-3 from pS259, an event apparently triggered by RAS-binding and accompanied by pS259 dephosphorylation, appears to be one of the critical events leading to RAF activation. Despite its importance, this event does not fully account for RAF activation since mutations disrupting the pS259 site modestly enhance RAF catalytic function (Dhillon *et al.*, 2002; Light *et al.*, 2002).

Genetic and yeast two-hybrid screens conducted over the years have identified additional putative components of the RAS/MAPK pathway (for review, see Kolch 2000). As some of these appear to modulate RAF function, their molecular characterization might unveil key aspects to solve at last the mystery surrounding RAF activation. For instance, genetic screens in *Drosophila* and *Caenorhabditis elegans* identified *kinase suppressor of Ras* (*ksr*), an evolutionarily conserved gene encoding a putative protein kinase structurally related to RAF (Kornfeld *et al.*, 1995; Sundaram and Han, 1995; Therrien *et al.*, 1995). Functional studies revealed that KSR facilitates signaling from RAF to MAPK essentially by its ability to bring together the three kinases of the MAPK module (for reviews, see Morrison, 2001; Raabe and Rapp, 2002; Roy and Therrien, 2002). Besides its importance for efficient MEK and MAPK activation, KSR also appears to control RAF activity since depletion of endogenous KSR by RNA interference (RNAi) impaired RAF catalytic function in *Drosophila* S2 cells (Anselmo *et al.*, 2002). It is unclear, however, whether this effect depends on KSR's scaffolding property as recently

Antagonistic effects of CNK on RAF function

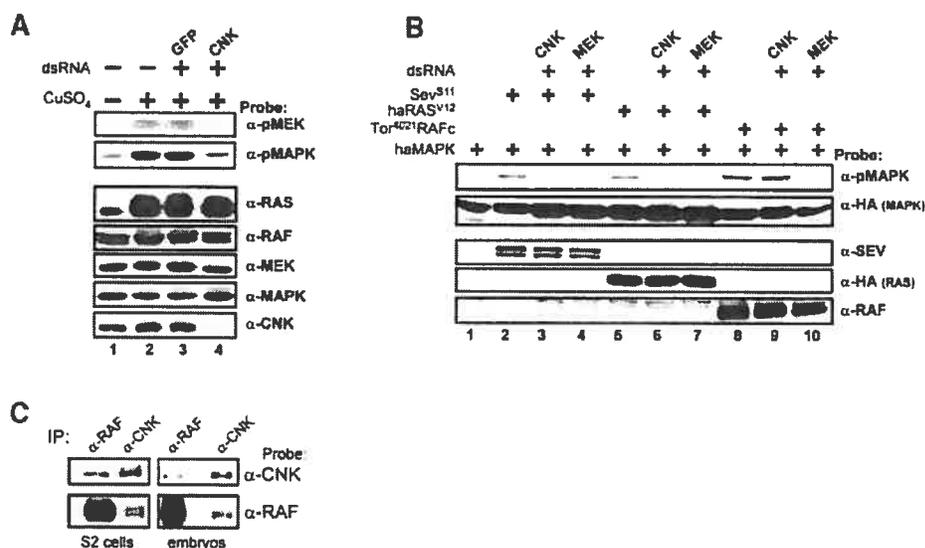


Fig. 1. CNK activity is required downstream of RAS, but upstream of RAF. (A) Untreated (–) or CuSO₄-treated (+) RAS^{V12} cells were either incubated in the absence (–) or in the presence (+) of the indicated dsRNAs. pMEK and pMAPK levels, as well as endogenous RAS, RAF, MEK, MAPK and CNK levels were assessed by immunoblot analysis using the antibodies indicated to the right. The results shown here and thereafter are representative of at least three similar experiments. (B) S2 cells were transfected with the haMAPK reporter construct (0.3 μg) either alone (lane 1) or together (+) with the indicated combinations of Sev^{S11} (0.4 μg), haRAS^{V12} (0.4 μg) or Tor^{Q21}RAFc (0.2 μg) constructs and the dsCNK or dsMEK RNAs (0.5 μg). Cells were lysed 16 h post-induction of expression and pMAPK levels were determined. Protein levels were determined as indicated. (C) Three milligrams of protein from plain S2 cells or 0–14 h *Drosophila* embryos were immunoprecipitated (IP) using either α-RAF or α-CNK antibodies.

suggested (Roy *et al.*, 2002) or is mediated by another mechanism.

Another potential RAF regulator is connector enhancer of KSR (CNK), a multidomain-containing protein conserved among metazoans, which was originally identified in a KSR-dependent genetic screen in *Drosophila* (Therrien *et al.*, 1998). As for other bona fide components of the RTK/RAS/MAPK pathway in *Drosophila*, CNK is required for photoreceptor cell differentiation, wing vein formation as well as for imaginal disc cell proliferation and/or survival (Therrien *et al.*, 1998). Genetic epistasis experiments positioned CNK downstream of RAS, but upstream or in parallel to RAF, thereby suggesting that CNK might be regulating RAF activity (Therrien *et al.*, 1998). Consistent with that possibility, CNK was found to associate with the catalytic domain of RAF (Therrien *et al.*, 1998) and depletion of endogenous CNK by RNAi in S2 cells abolished insulin-induced RAF activation (Anselmo *et al.*, 2002). The role of CNK with respect to RAF is probably not restricted to *Drosophila* since a rat homolog, named Maguin, has recently been found to associate with Raf-1 in rat brain extracts (Yao *et al.*, 2000).

Here, using a CNK-dependent MAPK activation assay in S2 cells combined to a novel RNAi-based rescue protocol, we show that CNK has both a positive and a negative impact on RAF function. We found that CNK, through two of its N-terminal domains, integrates RAS signals to control MEK phosphorylation by RAF. In contrast, we found that CNK's ability to associate with RAF is mediated by a short bipartite element that acts as an inhibitor of RAF catalytic function. Finally, we present evidence that the opposite functions of CNK amplify

signaling difference between the off and on states of a KSR/RAF/MEK complex, which might contribute to the switch-like behavior of the MAPK module. Together, these findings identify CNK as a novel type of signal regulator that specifically controls RAF function.

Results

To delineate biochemically the position of CNK with respect to the components of the RAS/MAPK module, we depleted endogenous CNK by RNAi in a stable RAS^{V12}-expressing S2 cell line and assessed its effect on endogenous MEK and MAPK activation. As shown in Figure 1A, reduction of CNK by the addition of double-stranded (ds) CNK RNA specifically abrogated MEK and MAPK activation, as revealed by the decrease in phosphorylated (activated) MEK and MAPK. These results demonstrated that CNK is required downstream of RAS for activation of the MAPK module. We next examined the effect of removing CNK on activated RAF-induced MAPK activation. Compared to the activated receptor tyrosine kinase Sevenless (Sev^{S11}) or RAS^{V12}, which did not activate MAPK upon CNK or MEK depletion (Figure 1B, lanes 3, 4, 6 and 7), activated RAF (Tor^{Q21}RAFc) was still fully capable of activating MAPK upon CNK depletion, but not when MEK was eliminated (Figure 1B, lanes 9 and 10). Together, these results strongly suggest that CNK is acting between RAS and RAF.

Overexpression of CNK has been found previously to associate with endogenous RAF in S2 cells. Furthermore, a C-terminal fragment of CNK has also been reported to

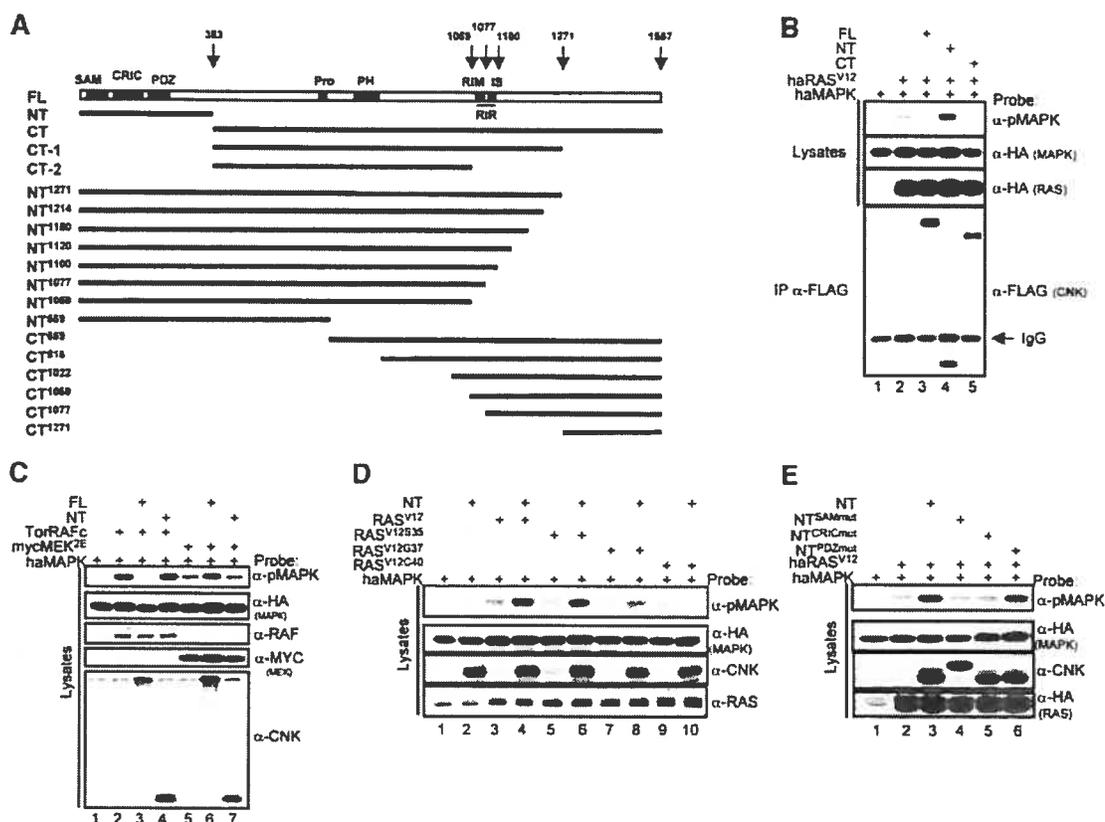


Fig. 2. Opposite behavior of CNK in the RAS/MAPK pathway. (A) Schematic representation of *Drosophila* FL-CNK (top open box) with its various domains/elements (black boxes): sterile alpha motif (SAM); conserved region in CNK (CRIC); PSD-95/DLG-1/ZO-1 (PDZ); proline-rich stretch (Pro); pleckstrin homology (PH); RIR; RIM; IS. Numbers on top correspond to amino acid positions frequently referred to in the text. Solid lines, labeled to the left, denote the various CNK deletion constructs used in this study. Every CNK construct contains one copy of the Flag epitope at the N-terminus. (B) S2 cells were transfected with haMAPK alone (lane 1) or with the indicated combinations of haRAS^{V12} (0.25 µg), FL-CNK (FL; 1.65 µg), NT-CNK (NT; 0.1 µg) and CT-CNK (CT; 1.65 µg) constructs. Cells were lysed 36 h post-induction and pMAPK levels were determined. Owing to a poor detection of Flag-tagged CNK constructs directly from cell lysates using the anti-Flag antibody, their levels were examined by immunoprecipitation (IP). (C) S2 cells were transfected with haMAPK alone (0.3 µg) or with the indicated combinations of Tor⁰²³RAF^C (0.2 µg), mycMEK^{2E} (0.3 µg), FL (0.6 µg) or NT (0.1 µg) constructs. Cells were lysed 16 h post-induction. The flag-tagged CNK variants were examined using anti-CNK. (D) S2 cells were transfected and analyzed as in (C) using the indicated combinations of haMAPK (0.6 µg), RAS^{V12} (0.6 µg), RAS^{V12S35} (0.1 µg), RAS^{V12C40} (0.25 µg), RAS^{V12G37} (0.6 µg) and NT (0.25 µg). Various amounts of the RAS constructs were used to adjust for their apparent difference in expression levels. The RAS proteins were not tagged and thus were monitored using an anti-*Drosophila* RAS monoclonal antibody, which also detected endogenous RAS as seen in lanes 1 and 2. (E) S2 cells were transfected using the indicated combinations of haMAPK (0.6 µg), haRAS^{V12} (0.25 µg), and wild-type or mutant NT constructs (0.25 µg). The mutated SAM domain (SAMmut) has a two amino acid change in conserved residues (amino acids W17S and I18S) that are critical for structural integrity (Stapleton *et al.*, 1999). For unclear reasons, this NT-CNK mutant migrates differently from the other NT constructs (lane 4). We have generated another mutant version of the SAM domain (L71K), which changes an amino acid shown to be critical for dimer formation of the EphA4 receptor SAM domain, but does not appear to alter the structural integrity of the domain (Stapleton *et al.*, 1999). This mutated SAM domain (NT^{L71K}-CNK) migrates normally, and like the SAM^{W17S-I18S} mutant, it does not cooperate with RAS^{V12} (data not shown). NT^{CRICmut} has a three amino acid deletion (A162-H163-R164) in the CRIC region similar to the mutation found in a *Drosophila* cnk loss-of-function allele (Therrien *et al.*, 1998). Finally, NT^{PDZmut} has a two amino acid change (G217S and F218S) in highly conserved residues of the PDZ domains (Ponting *et al.*, 1997).

interact directly with the catalytic domain of RAF (Therrien *et al.*, 1998). To demonstrate that a CNK/RAF complex does exist *in vivo*, we immunoprecipitated plain S2 cell or *Drosophila* embryo extracts using either anti-RAF or anti-CNK antibodies and probed immunoblots with either antibodies to look for co-immunoprecipitation. As shown in Figure 1C, the anti-RAF antibodies brought down endogenous CNK (~10% of total NP-40-soluble CNK) and, likewise, the anti-CNK monoclonal antibody co-immunoprecipitated endogenous RAF (~5% of total

NP-40-soluble RAF) in both S2 cells and embryos. These results thus demonstrate the existence of a CNK/RAF complex *in vivo*. Together with the fact that CNK activity appears to be required upstream of RAF, these findings strongly suggest that CNK directly regulates RAF function.

CNK has opposite effects on RAF function

To characterize the molecular event(s) within the RAS/MAPK pathway that is/are regulated by CNK activity, we

examined whether forced expression of CNK could modulate MAPK activation in S2 cells. For this purpose, we used three Flag epitope-tagged CNK constructs (Figure 2A), namely, full-length (FL), N-terminal (NT) and C-terminal (CT) that had previously been shown to modulate RAS^{V12}-mediated signaling in the developing *Drosophila* eye (Therrien *et al.*, 1999).

We assayed for MAPK activation by monitoring the phosphorylated levels of HA-tagged MAPK as performed above for endogenous MAPK. When expressed alone, none of the CNK constructs elevated phospho-MAPK (pMAPK) levels (data not shown and Figure 2D, lane 2 for NT-CNK). However, compared to HA-tagged RAS^{V12} expressed alone (Figure 2B, lane 2), co-expression of FL-CNK and CT-CNK inhibited MAPK activation (Figure 2B, lanes 3 and 5, respectively), whereas NT-CNK stimulated MAPK activation (Figure 2B, lane 4). Therefore, these results indicate that forced expression of CNK affects RAS-mediated MAPK activation and also suggest that CNK comprises both positively- and negatively-acting regions.

Because CNK appears to be required between RAS and RAF (Figure 1B), we reasoned that the opposite effects of CNK could be due to a modulation of RAF function. To investigate this possibility, we examined the ability of FL-CNK and NT-CNK to alter MAPK activation induced by activated RAF or activated MEK (myc-tagged MEK^{2E}). If FL-CNK blocked a positive step upstream of RAF, there should be no effect on MAPK activation induced by activated forms of RAF or MEK. In contrast, if CNK blocked a step downstream of RAF, it should either inhibit RAF or both RAF and MEK activities depending on the position of the inhibitory event. Strikingly, we found that FL-CNK (like CT-CNK, data not shown), completely prevented MAPK activation induced by activated RAF (Figure 2C, lane 3), but not by activated MEK (lane 6) [the apparent slight positive effect of FL-CNK on pMAPK levels induced by MEK^{2E} (lane 6) was not reproducible]. These results therefore indicate that the negative influence of CNK occurs at a step between RAF and MEK. We applied the same logic to position the positive effect of NT-CNK and concluded that NT-CNK exerts its positive effect in a RAS-dependent manner between RAS and RAF as NT-CNK was inert on its own and did not cooperate with either activated RAF or MEK (Figure 2C, lanes 4 and 7, respectively).

Therrien *et al.* (1999) previously reported that NT-CNK cooperated in the *Drosophila* eye not only with RAS^{V12}, but also with RAS^{V12G37}, which is a RAS effector loop mutant that has a much reduced capacity to send signals through the MAPK pathway owing to its impaired association with RAF (White *et al.* 1995). They concluded that either NT-CNK augments RAS signaling through a RAS^{V12G37}-dependent, but MAPK-independent pathway or that, if NT-CNK functions between RAS and RAF, it could rescue or compensate to some extent the defect caused by this particular effector loop mutation thereby permitting RAF activation. To distinguish between these possibilities, we co-expressed NT-CNK with RAS^{V12} or the three RAS effector loop mutations that had been tested. These included RAS^{V12S35}, which interacts normally with RAF, and RAS^{V12G37} and RAS^{V12C40}, which no longer interact with RAF (data not shown). As shown in

Figure 2D, NT-CNK strongly augmented pMAPK levels induced by either RAS^{V12} or RAS^{V12S35} (lanes 3–6) and surprisingly, it also allowed RAS^{V12G37}, which is inert on its own, to activate MAPK (compare lanes 7 and 8). These data therefore suggest that NT-CNK exerts its effect not through an alternate pathway, but largely within the RAS/MAPK pathway. The fact that NT-CNK appears to compensate to some extent the inability of RAS^{V12G37} to activate MAPK, but not for RAS^{V12C40} (Figure 2D, compare lanes 9 and 10), indicates that these two effector loop mutations are not equivalent with respect to their defect in activating RAF.

NT-CNK comprises three conserved regions (SAM, CRIC and PDZ domains; Figure 2A). To determine which of these is required for the positive effect of NT-CNK on the MAPK module, we tested the activity of NT-CNK mutant constructs affecting each domain individually. When co-expressed with RAS^{V12}, the mutated SAM and CRIC domain variants failed to cooperate with RAS (Figure 2E, lanes 4 and 5). In contrast, the PDZ domain mutant still retained activity (Figure 2E, lane 6). These results thus indicated that the SAM and CRIC domains are critical for the ability of NT-CNK to stimulate MAPK activation by RAS. Since the CRIC mutation used in this assay corresponds to the lesion found in a *cnk* loss-of-function allele (Therrien *et al.*, 1998), it strongly suggests that our assay mimics a genuine functional property of CNK (see below).

Two short amino acid sequences in CNK define a 'RAF-inhibitory region' that blocks MEK phosphorylation by RAF

Interestingly, in addition to its positive role on the MAPK module, CNK can block RAS- or RAF-dependent MAPK activation (Figure 2). We investigated this property by first mapping the region(s) of CNK that has a negative influence on the pathway. We generated a series of C-terminal deletions of CNK (Figure 2A) and tested their ability to inhibit RAS-dependent MAPK activation. As FL-CNK, the first deletion construct (NT¹²⁷¹-CNK) also blocked RAS^{V12} activity (Figure 3A, lane 4). In contrast and similar to NT-CNK, two other deletion constructs (NT¹⁰⁵⁹- and NT⁶⁵⁹-CNK) no longer inhibited, but instead cooperated with RAS^{V12} (Figure 3A, lanes 5–7). These data indicated that the C-terminal boundary of an inhibitory region, hereafter called RAF-inhibitory region (RIR), lies between amino acid position 1059 and 1271. Finer deletion constructs were then similarly tested, which positioned the RIR to a short area of ~40 amino acids between positions 1059 and 1100 (see Supplementary figure S1, available at *The EMBO Journal* Online).

As CNK associates with RAF, it could be responsible for the negative effect of CNK. To address this possibility, we mapped the RAF binding site(s) on CNK to determine whether it corresponds to the RIR. CT-CNK, but not NT-CNK, was previously found to interact with RAF (Therrien *et al.*, 1998). We first tested whether we could reproduce these findings using a transient expression assay. A polyoma (pyo) epitope-tagged RAF construct was co-expressed with either FL-, NT- or CT-CNK in S2 cells. Cell lysates were immunoprecipitated using an anti-pyo antibody and co-immunoprecipitated CNK variants were detected by probing immunoblots with an anti-flag

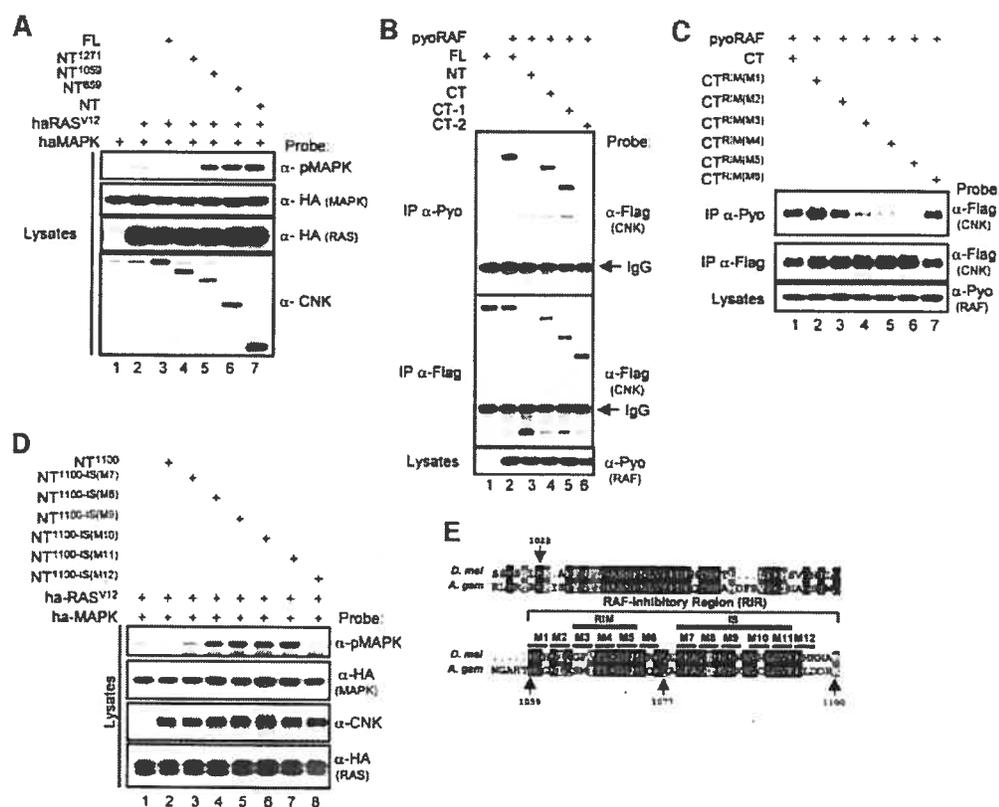


Fig. 3. Functional mapping of the RIR on CNK. (A) S2 cells were transfected with the indicated combinations of haMAPK (0.6 μ g), haRAS^{V12} (0.25 μ g), FL and NT constructs (0.1–1 μ g). Cell lysates were prepared 16 h post-induction of expression. (B) S2 cells were transfected with the indicated combinations of pyoRAF (0.7 μ g), FL and CT constructs (1–1.8 μ g) and NT construct (0.08 μ g). Cells were lysed 36 h post-induction. For these experiments and below, pyoRAF was immunoprecipitated (IP) from cell lysates using the α -Pyo antibody and co-immunoprecipitated CNK proteins were detected using the α -Flag antibody. (C) S2 cells were transfected with the indicated combinations of pyoRAF (0.7 μ g) and CT constructs (1–1.8 μ g). (D) S2 cells were transfected with the indicated combinations of haMAPK (0.3 μ g), haRAS^{V12} (0.125 μ g), NT constructs (0.6 μ g). (E) Amino acid comparison of the *Drosophila* (*D. mel*) CNK RIR (pos. 1022–1100) to the equivalent region of *A. gambiae* (*A. gam*) CNK. Identical and conserved residues are in black and grey boxes, respectively. Positions of the ‘alanine-scanning’ mutations (M1–M12) are depicted as a solid line over the amino acid sequence. Minimal amino acid sequence for the RIM and the IS are also highlighted by a solid line over the relevant area. Although sequences within the 1022–1059 interval also appear to participate in RAF-binding (Supplementary figure S2B), these are not essential.

antibody. As shown in Figure 3B (lanes 2–4), FL- and CT-CNK, but not NT-CNK, associated with RAF (~25% of RAF is associated with FL-CNK and ~50% of FL-CNK is associated with RAF in these conditions). Two C-terminal deletions of CT-CNK (CT-1 and CT-2, Figure 2A) were also included in that experiment. CT-1, which ended at position 1271, still bound to RAF, whereas CT-2, which ended at position 1059, no longer interacted (Figure 3B, lanes 5 and 6). These results thus placed the C-terminal border of the RAF-binding region, hereafter called the RAF-interacting motif (RIM), in the 1059–1271 interval. The finer C- and N-terminal truncations used above to map the RIR were then used to delineate more accurately the RIM. This analysis showed that sequences in the 1059–1077 interval are critical for RAF binding (see Supplementary figure S2). Finally, we narrowed down the RIM to a nine amino acid stretch (positions 1065–1073) by testing for RAF interaction, a series of ‘alanine scanning’ mutants within the 1059–1077 interval (M1–M6,

Figure 3C and E). Together, our data thus revealed that the RIM is part of the RIR, which strongly suggests that the binding of RAF by CNK is responsible for the inhibitory effect of CNK. In support of this conclusion, the three point mutations (M3–M5) that impeded RAF binding (Figure 3C) also abrogated the inhibitory effect of CNK (data not shown and see below).

Our mapping data showed that the RIR comprises additional sequences after the C-terminal end of the RIM (Figure 3E). This indicated that other sequences that are not required for RAF interaction have an inhibitory effect on RAS signaling. To define more precisely the position of these sequences, we tested a set of alanine scanning mutants within the 1077–1100 interval (M7–M12, Figure 3E) and found that mutants M7–M11 relieved the inhibitory effect of CNK (Figure 3D) but, as expected, did not prevent RAF binding (data not shown and see below). These results therefore confirmed that the RIR contains at least two distinct negative elements: the RIM that interacts

Antagonistic effects of CNK on RAF function

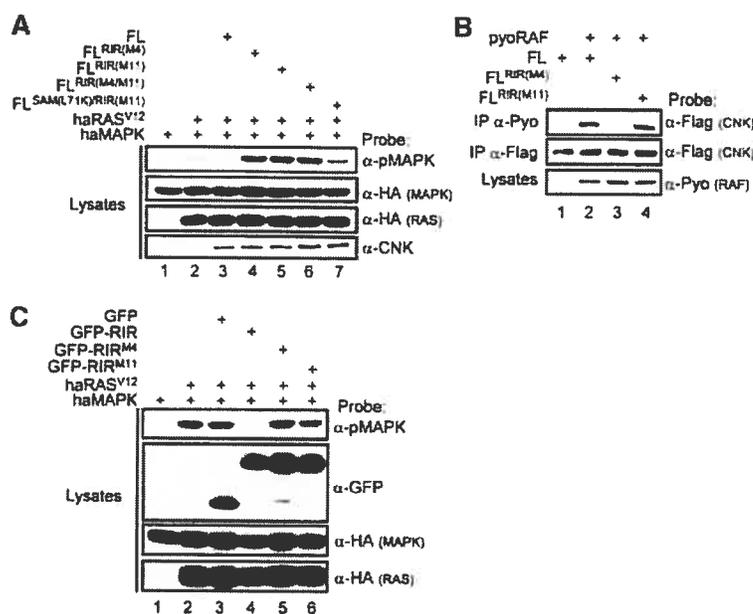


Fig. 4. The negative effect of CNK is mediated by two co-required elements. (A) S2 cells were transfected with the indicated combinations of haMAPK (0.3 μ g), haRAS^{V12} (0.14 μ g) and FL (0.5–0.8 μ g) constructs. (B) S2 cells were transfected with the indicated combinations of pyoRAF (0.7 μ g) and FL–CNK (1.5 μ g) constructs. (C) S2 cells were transfected with the indicated combinations of haMAPK (0.3 μ g), haRAS^{V12} (0.2 μ g) and GFP constructs (0.5 μ g).

with RAF and an adjacent inhibitory sequence (IS), which is required along with the RIM to inhibit signal transmission within the MAPK module.

To verify whether the two negative elements (RIM and IS) also functioned accordingly in full-length CNK, we introduced the M4 mutation (affects the RIM) or the M11 mutation (affects the IS) in FL–CNK and examined their behavior with respect to RAS-induced MAPK activation and RAF-binding. Compared to FL–CNK (Figure 4A, lane 3), FL^{RIR(M4)}–CNK and FL^{RIR(M11)}–CNK no longer inhibited MAPK activation, but instead strongly cooperated with RAS^{V12} (lanes 4 and 5). Furthermore, a double FL^{RIR(M4/M11)}–CNK mutant cooperated to the same extent as either single mutants (lane 6), thus indicating that the two elements are co-required for the negative effect. As for NT–CNK (Figure 2), the ability of those mutants to cooperate with RAS appears to depend on the N-terminal domains of CNK as a double mutant version that affects both the SAM domain and the RIR barely cooperated with RAS^{V12} (Figure 4A, lane 7). We next examined the ability of the M4 and M11 mutants to associate with RAF. As predicted, FL^{RIR(M4)}–CNK no longer interacted with RAF (Figure 4B, lane 3), whereas FL^{RIR(M11)}–CNK interacted normally with RAF (lane 4), thus confirming that only the RIM is essential for RAF-binding. Taken together, these results demonstrate that the RIM and IS elements, which constitute the RIR, are jointly required and sufficient to explain the inhibitory effect of CNK on the MAPK module.

Finally, to determine whether the RIR functions autonomously, we fused it (position 1059–1100) to the C-terminal end of GFP (GFP–RIR) and examined whether

this was sufficient to transpose CNK's negative effect on GFP. As shown in Figure 4C, GFP–RIR strongly inhibited RAS-induced MAPK activation (lane 4), whereas GFP alone (lane 3) or two inactivated versions (lanes 5 and 6) of the RIR (RIR^{M4} or RIR^{M11}) did not affect MAPK activation. These results therefore indicate that the RIR acts as an independent negative unit.

The RIR of CNK antagonizes RAS signaling during eye development

We wanted to determine whether the RIR of CNK also negatively influenced RAS signaling during *Drosophila* eye development. Intriguingly, in contrast to the data presented above, previous work showed that FL–CNK cooperated with RAS^{V12} in the *Drosophila* eye (Therrien *et al.*, 1998). We found, however, that this cooperation greatly depended on RAS^{V12} signaling strength as well as FL–CNK expression levels, that is, FL–CNK inhibited RAS^{V12} phenotype when a weaker RAS^{V12} line was used (see below) or when FL–CNK levels were increased (data not shown). Nonetheless, the ability of FL–CNK to cooperate with RAS^{V12} in the developing eye, a phenomenon not detectable in S2 cells by simply co-expressing various amounts of either protein, suggests that S2 cells might be missing a critical signal and/or factor. Although not mutually exclusive, another possibility is that there is a close relationship between the amount of activated RAS molecules and available N-terminal domains that ultimately determine RAF activation level. At low doses of RAS activity, endogenous CNK levels are probably not limiting and thus can fully mediate RAS signals for optimal RAF activation. Consequently, increasing CNK

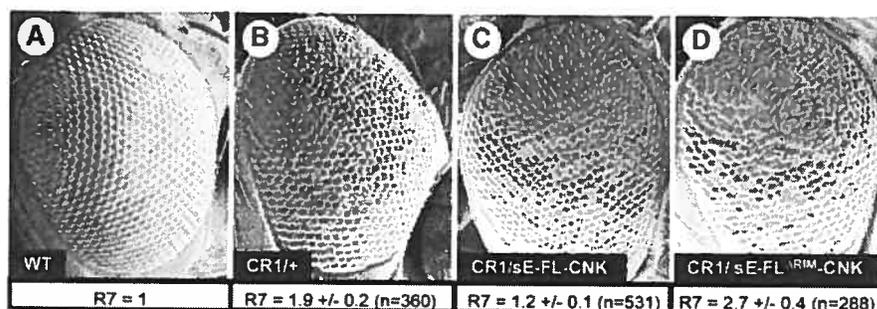


Fig. 5. CNK's RIR antagonizes RAS signaling *in vivo*. (A–D) Scanning electron micrographs of adult *Drosophila* eyes. The genotypes are indicated on the figures, as well as the average number of R7 cells per ommatidium (\pm SD). n denotes the number of ommatidia analyzed and three eyes were analyzed per genotype. A *t* test applied on the difference in mean number of R7 cells/ommatidium between the CR1 and CR1/sE-FL-CNK genotypes or the CR1 and CR1/sE-FL^{RIM}-CNK genotypes confirmed their statistical significance: $P = 0.006$ and 0.036 , respectively.

levels in that context is only providing additional RIR sequences that in turn block signal transmission. In contrast, when high levels of RAS activity are provided, endogenous CNK levels are probably limiting and thus could not fully transmit available RAS signals to RAF. Artificially increasing CNK levels in that context would provide missing CNK molecules, thereby generating greater RAF activity.

To determine whether the RIR had any inhibitory effect on RAS^{V12} signaling *in vivo*, we compared the ability of FL-CNK or a CNK transgene with no RIM (FL^{RIM}-CNK) to modulate RAS^{V12} effects in the developing *Drosophila* eye. We crossed transgenic flies expressing the FL-CNK constructs to a strong RAS^{V12} transgenic line (named CR2; Maixner *et al.*, 1998). As observed previously, FL-CNK cooperated with RAS^{V12} (data not shown). Strikingly, however, co-expression of FL^{RIM}-CNK and RAS^{V12} resulted in a complete synthetic lethality at the pupal stage with pupae presenting highly disorganized eye tissues (data not shown). This phenomenon probably resulted from a particularly strong cooperation between RAS^{V12} and FL^{RIM}-CNK. Given that both constructs are probably expressed to low levels in tissues other than the eye, the observed lethality is likely a consequence of detrimental MAPK activation in tissues required for viability. To circumvent this problem, we crossed the CNK transgenic lines to a weaker RAS^{V12} line (CR1; Maixner *et al.*, 1998). As expected, instead of cooperating with RAS^{V12}, FL-CNK slightly suppressed the CR1 rough eye phenotype (compare Figure 5B and C). To confirm this, we determined the average number of R7 cells per ommatidium for each genotype as a read-out for RAS/MAPK signaling (Fortini *et al.*, 1992). The eye section results are summarized at the bottom of each SEM (Figures 5A–D). As shown in Figure 5B, CR1 had an average of 1.9 R7 cells per ommatidium. Co-expression of FL-CNK reduced this number to 1.2 (Figure 5C), which confirmed its ability to suppress RAS^{V12} in this context. In contrast to FL-CNK, the FL^{RIM}-CNK construct cooperated with RAS^{V12} as the eyes were rougher than the CR1 parents and the average number of R7 cell per ommatidium increased to 2.7 (Figure 5D). Therefore, as in S2 cells, the RIR has a negative effect on RAS signaling during eye development. Identical results using the CR1

and CR2 lines were obtained with CNK lines that had a mutated IS element (G.Laberge and M.Therrien, unpublished results). Furthermore, and importantly, we found that the Δ RIM or IS mutant constructs were as competent as wild-type CNK at rescuing the lethality of *cnk* null alleles (data not shown), thus strongly suggesting that the RIR does not naturally function as a positive element (see below).

An RNAi-based rescue assay uncovers CNK's natural opposite effects on the MAPK module

The finding that CNK has a negative impact on the RAS/MAPK pathway is intriguing given the fact that CNK has been originally defined as a positive component for this pathway. One possibility to explain our results would be that CNK functions as a scaffold by bringing together, through independent associations, at least two signaling proteins. Therefore, as previously described for a hypothetical scaffold (Burack and Shaw, 2000), overexpression of CNK might uncouple proteins that normally require physical juxtaposition, thereby abrogating signal transmission. According to that model, the RIR might normally be required for higher order assembly of the RAS/MAPK module and thus for optimal signal transmission.

To assess unambiguously the natural effect of the RIR on the MAPK pathway, its activity needs to be monitored in non-overexpressed conditions. To that end, we devised a novel RNAi-based strategy in S2 cells that allowed us to deplete endogenous CNK levels and to restore them with exogenous, but non-targetable CNK transcripts. The ability to rescue a CNK knock-down phenotype, such as a MAPK activation defect, would indicate that relatively normal levels of exogenous CNK have been reached. This approach could then serve as a simple assay to evaluate the effect of specific CNK mutants in relatively normal stoichiometric conditions. To specifically remove endogenous CNK, we used a dsCNK RNA (dsCNK^{3'UTR}) encompassing exclusively CNK's 3'UTR sequences (Figure 6A), which reduced endogenous CNK levels by >90% after 4 days of culture (data not shown). Conversely, to obtain dsCNK^{3'UTR}-resistant CNK transcripts, we replaced the natural 3'UTR sequences in the FL-CNK construct by those of the *Drosophila alcohol dehydrogenase* (*ADH*) gene. The resulting chimeric transcripts (CNK-

Antagonistic effects of CNK on RAF function

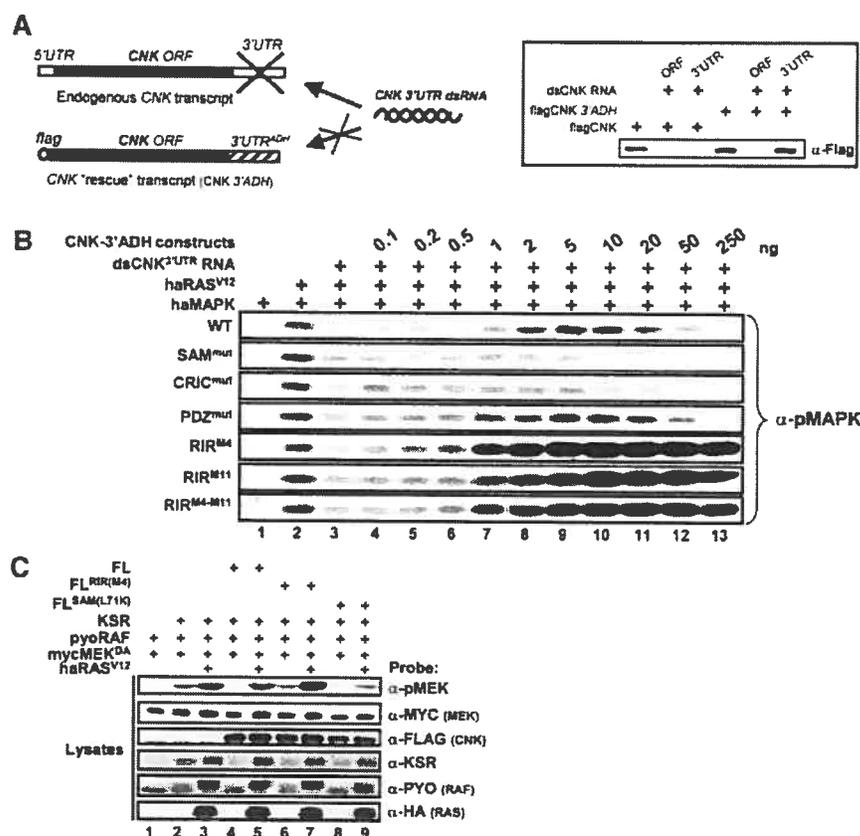


Fig. 6. CNK has a natural antagonistic effect on signal transmission through the MAPK module. (A) Diagram representing the strategy used to deplete endogenous CNK by targeting its 3'UTR sequences. CNK 'rescue' is achieved by co-transfecting a CNK construct containing the ADH 3'UTR sequences. The specificity of the CNK 3'UTR dsRNA compared to a dsRNA targeting CNK's open reading frame (ORF) is shown on the right: FL-CNK (0.4 μ g) or FL-CNK-3'ADH (0.4 μ g) constructs were transfected in S2 cells along either CNK's 3'UTR or ORF dsRNAs (0.5 μ g). Cells were lysed 36 h post-induction. (B) S2 cells were transfected with the indicated combinations of haMAPK (0.3 μ g), haRAS (0.125 μ g), dsCNK^{3'UTR} RNA (20 μ g) and the indicated amounts of the CNK-3'ADH variants. Cells were lysed 4 days post-induction of expression. Activated MAPK levels were detected (α -pMAPK) as well as those for haMAPK, haRAS^{V12} and CNK-3'UTR variants (not shown). (C) S2 cells were transfected with the indicated combinations of mycMEK^{DA} (0.3 μ g), pyoRAF (0.03 μ g), KSR (0.1 μ g), RAS^{V12} (0.6 μ g) and FL-CNK variant (1.1 μ g) constructs. Cells were lysed 36 h post-induction of expression.

3'ADH) were insensitive to the dsCNK^{3'UTR} RNA (see Figure 6A; and data not shown).

Consistent with its ability to reduce endogenous CNK levels, dsCNK^{3'UTR} RNA decreased RAS-induced MAPK activation (Figure 6B, compare lanes 2 and 3). We then determined whether introduction of a wild-type CNK-3'ADH (CNK^{WT}-3'ADH) construct would rescue MAPK activation under those conditions. Given that CNK overexpression leads to an inhibition of RAS-induced MAPK activation (Figure 2), we conducted parallel co-transfections using a spectrum of plasmid quantities to narrow down optimal rescuing amounts. Strikingly, not only did this approach restore MAPK activation, but it also revealed a dose-dependent rescue profile identifying reproducible sub-optimal (0.1–1 ng), optimal (2–10 ng) and inhibitory (>20 ng) doses of plasmids (Figure 6B, WT panel; and data not shown). To determine whether this assay faithfully identifies CNK regions that are functionally relevant with respect to RAS-mediated MAPK

activation, we tested the effect of mutations affecting the SAM, CRIC and PDZ domains, respectively. Consistent with their implication in the cooperation observed above between NT-CNK and RAS^{V12} (Figure 2E), we found that CNK^{SAMmut}-3'ADH and CNK^{CRICmut}-3'ADH behave as loss-of-functions, whereas CNK^{PDZmut}-3'ADH is as competent as wild-type CNK in restoring MAPK activation (Figure 6B). The inability of the CRIC mutation to rescue MAPK activation is consistent with its previous identification as a *cnk* loss-of-function allele (Therrien *et al.*, 1998), thereby providing compelling evidence that this assay can identify bona fide functional domains/elements. In addition, these results indicate that the SAM domain is genuinely required for RAS-induced MAPK activation, whereas the PDZ domain is not involved.

Next, we tested the ability of mutations affecting the RIR to rescue MAPK activation. If the RIR normally has a positive function, its disruption should attenuate or preclude the rescue capability of a RIR mutant construct

at doses optimal for WT CNK. Markedly, the three tested RIR mutants (M4, M11 or M4/M11) did not behave as loss-of-function, but rather as gain-of-function alleles (Figure 6B). Therefore, these results demonstrate that the RIR does not provide a positive input, but functions as a true inhibitory module.

CNK's RIR prevents 'signaling leakage' within the KSR/RAF/MEK complex

A model to explain the two opposite roles of CNK would be that they take place at different times. For example, the negative function could be required prior to signal activation to prevent RAS-independent MEK activation by RAF. We previously reported that overexpression of KSR, RAF and MEK in S2 cells induced an association between RAF and MEK, which also resulted in a significant activation of MEK (Roy *et al.*, 2002). Although RAS activity could increase further MEK activation, it did not appear to be critical for either KSR/RAF/MEK complex formation or MEK activation. We thus concluded that overexpression of KSR, RAF and MEK might bypass natural repressive mechanism(s) that are essential to prevent signaling in the absence of upstream signals. Given that CNK's negative property seems to affect precisely the RAF/MEK step, we examined whether CNK could attenuate KSR-induced MEK activation by RAF.

As previously reported (Roy *et al.*, 2002), co-expression of KSR with pyoRAF and kinase-inactivated mycMEK (mycMEK^{DΔ}), resulted in MEK activation (Figure 6C, lane 2), which could be further enhanced by co-expressing RAS^{V12} (lane 3). However, co-expression of FL-CNK along with KSR, RAF and MEK strongly blocked RAS-independent MEK activation (compare lanes 2 and 4). To determine whether the RIR was responsible for this effect, we tested the FL-CNK^{RIRM4} mutant in similar conditions. As shown in lane 6, this mutation obliterated the repressive effect of CNK. Similar results were obtained with either the RIR^{M11} or RIR^{M4-M11} mutations (data not shown). Interestingly, when RAS^{V12} was introduced in the presence of FL-CNK, RAS activity counteracted much of the inhibitory effect (compare lanes 4 and 5), presumably owing to the ability of the N-terminal portion of CNK to cooperate with activated RAS. Consistent with that possibility, FL-CNK^{SAMmut} was far less active than wild-type FL-CNK (compare lanes 5 and 9). Taken together, these results are consistent with a model whereby CNK prevents signal transmission between RAF and MEK within a KSR/RAF/MEK complex in the absence of a signal, but then facilitates signaling upon upstream activation, thus increasing significantly the signal-to-noise ratio of this signaling complex.

Discussion

CNK was originally identified as a positive component of RAS/MAPK-mediated signaling in *Drosophila*. In this paper, we provide evidence that the primary role of CNK in the RAS/MAPK module is to regulate RAF function. Unexpectedly, in addition to its critical role for RAF activity, we also found that CNK negatively controls RAF's ability to phosphorylate MEK.

Three lines of evidence support the claim that CNK is essential for RAF activity. First, depletion of endogenous CNK prevented MAPK activation by RAS^{V12}, but not by activated RAF (Figure 1B). Secondly, NT-CNK cooperated with RAS^{V12} to activate MAPK (or MEK; data not shown), but not with activated RAF (Figure 2B and C). This result not only places CNK's positive effect between RAS and RAF, but it also suggests that this activity is RAS-dependent. Finally, NT-CNK rescued MAPK activation by RAS^{V12G37} (Figure 2D). This finding is striking as it provides strong evidence that CNK function is intimately linked to the RAF activation mechanism. As for mammalian RAS (White *et al.*, 1995), *Drosophila* RAS G37 or C40 effector mutants no longer interact with *Drosophila* RAF (data not shown). Since only the G37 mutant is rescued by NT-CNK co-expression (a RAF-dependent event; data not shown), it suggests that it is either a weak loss-of-function with respect to RAF binding and/or that it retained another essential function that has been lost by the C40 mutant. The G37 mutant may thus prove useful to elucidate the role of CNK in RAF activation.

We have mapped CNK's inhibitory function to a 30 amino acid region named the RIR (see above). This region comprises at least two distinct, but co-required negative elements: the RIM and the IS elements (Figure 3E) that function together as an inhibitory unit (Figure 4A). Although its mechanism of action is unknown, the RIR appears to block signal transmission from RAF to MEK (Figures 2C and 6C) through an association between the RIM and the RAF catalytic domain. Indeed, an isolated RAF catalytic domain or the Torso-RAF catalytic domain fusion protein (Tor⁴⁰²¹-RAFc) have been found to associate with CNK (Therrien *et al.*, 1998; and data not shown). The association appears to be direct as it is detectable using a yeast two-hybrid interaction assay (M.Lefrançois and M.Therrien, unpublished results). The role of the IS element is unknown. It is not required for RAF binding, but it is essential for the inhibitory effect of the RIR (Figure 4). Interestingly, since only a catalytically competent RAF kinase domain associates with CNK (data not shown), it is possible that the RIR works as a RAF pseudosubstrate to control MEK phosphorylation.

What could be the purpose of CNK's bimodal effect? Several scenarios can be envisioned to explain our data and two of these are presented here. In quiescent cells, CNK could function together with 14-3-3 in preventing signal-independent MEK activation by RAF. This negative role might be important to ensure that no signal leaks through prior to genuine upstream activation, which otherwise might be sufficient to initiate a biological response. Upon RAS activation, CNK's N-terminal domains would then integrate RAS signals and thus convert CNK into a positive regulator of signal transmission (Figure 7A). As CNK's opposite action appears to augment the signal-to-noise ratio of the RAS/MAPK module (Figure 6C), it might contribute to switch-like activation of the pathway (Ferrell, 1998). Alternatively, CNK's negative effect might have a similar role to RKIP, a recently described RAF inhibitor (Yeung *et al.*, 1999). Namely, it might work as a rheostat to finely adjust the amount of MEK molecules activated by RAF to satisfy cell-specific requirements. For that matter, it will be

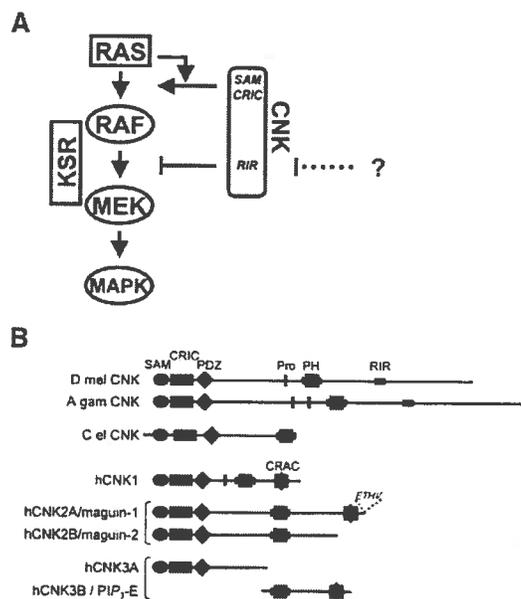


Fig. 7. CNK, a bimodal regulator of RAF function. (A) Summary of the effects of CNK on the RAS/MAPK module. The SAM and CRIC domains are two critical regions integrating RAS's signals that then feed at a step between RAS and RAF. In contrast, the RIR inhibits MEK phosphorylation by RAF by binding to the RAF catalytic domain. The question mark and the dotted line illustrate the possibility that the RIR might itself be negatively regulated. KSR acts as a scaffold bridging RAF and MEK, thereby augmenting signal transmission (see Introduction). (B) Structural comparison of CNK homologs found in *D. melanogaster* (D mel; DDBJ/EMBL/GenBank accession No. AF100152), *A. gambiae* (A gam; DDBJ/EMBL/GenBank accession No. EAA15086), *C. elegans* (C el; DDBJ/EMBL/GenBank accession No. R01H10.8) and human (h). There are at least three separate genes in humans: hCNK1 (DDBJ/EMBL/GenBank accession No. AF100153), hCNK2A/B (DDBJ/EMBL/GenBank accession Nos AF418269 and AF418270, respectively) and hCNK3A/B (DDBJ/EMBL/GenBank accession Nos AK055911 and AJ310566, respectively). Although hCNK2A and hCNK2B are splicing variants, the situation is not clear for hCNK3A and hCNK3B/PIP₃-E. Their respective ESTs were both mapped to the same chromosomal location (6q25.2; MapView NCBI), but are separated by ~100 kb and have no overlapping sequences. They might thus represent two separate genes. In addition to the domain composition previously described for the CNK homologs (Therrien *et al.*, 1998), mammalian and other CNKs found in chordates (not shown) have an additional conserved region of ~50 amino acids of unknown function. We named this novel region of homology conserved region among chordate (CRAC) CNKs and depicted it as a black star. Similar to the rat MAGUIN homolog (Yao *et al.*, 2000), hCNK2A contains a PDZ-binding motif (ETHV) at its C-terminus.

interesting to determine whether the RIR is itself negatively regulated to increase signaling flow from RAF to MEK (Figure 7A). This possibility is appealing given the large difference between the ability of WT CNK and RIR-inactivated CNK constructs to rescue the MAPK activation defect (Figure 6B).

CNK homologs are present in other metazoans (Figure 7B). This evolutionary conservation strongly suggests that ERK/MAPK modules in other species are also regulated by a CNK activity at the level of RAF. Although the SAM and CRIC domains are relatively well conserved, the sequence corresponding to the RIR

(Figure 3E) seems to be unique to *Drosophila melanogaster* and *Anopheles gambiae*. Nonetheless, rat CNK2/maguin isoforms (CNK's closest homologs; Figure 7B) have been shown to associate with c-RAF (Yao *et al.*, 2000), which suggests that they contain a region functionally similar to the RIR. If that were the case, it would be important to verify whether mutations disrupting its presumed negative function have any oncogenic properties. In addition, given the significance the RAS/MAPK module plays in tumor formation in humans, the identification of a short inhibitory peptide against RAF catalytic function might open new avenues for anticancer drug development.

Materials and methods

Plasmids

pMet-FL-CNK, NT-CNK and CT-CNK have been described previously (Therrien *et al.*, 1998) and were used as starting points to generate the various CNK mutant constructs used in this study. pMet-FL-CNK^{RM} corresponds to an internal deletion from amino acids 1059 to 1077. The pE-FL-CNK^{RM} P-element construct was generated by transferring the *KpnI/NotI* insert from the pMet construct into the pSE P-element vector (Therrien *et al.*, 1998). Finally, the CNK-3'ADH constructs were generated by removing the natural CNK 3'UTR sequences from FL-CNK constructs, which juxtaposed downstream ADH 3'UTR sequences present in pMet.

pMet-haMAPK was generated first by inserting a PCR product corresponding to *Drosophila* MAPK into the *EcoRI/SacI* sites of pMet. A double-stranded oligonucleotide encoding three HA epitopes was then inserted in the *EcoRI* site of pMet-MAPK upstream of the first methionine. pMet-pyTor⁴⁰²RAFc was generated in three steps. First, an *EcoRI* fragment corresponding to Tor⁴⁰²RAFc (Dickson *et al.*, 1992) was inserted in the pMet vector. An *AgeI* site was then introduced immediately downstream from Torso's signal peptide sequences and used to insert a PYO epitope. pMet-mycMEK^{2E} was generated by replacing the serines 234 and 238 by glutamic acid residues.

pMet-RAS^{V12} and effector loop mutants were described previously (Therrien *et al.*, 1999). pMet-haRAS^{V12}, pMet-pyRAF, pMet-KSR and pMet-mycMEK^{1A} were described by Roy *et al.* (2002). pHS-SEV¹¹ was described previously (Therrien *et al.*, 1998).

Cell culture, transfection and protein analysis

Cell culture, transfection, RNAi and immunoprecipitation experiments in S2 cells were performed essentially as described by Roy *et al.* (2002).

Cell lysates or immunoprecipitated proteins were resolved on 8 or 10% SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose membranes. Proteins were probed using appropriate primary antibodies from the following sources: α -CNK monoclonal antibody (26A6A2) was generated by Elaine Kwan in the laboratory of Gerry Rubin. α -RAS1, α -SEV, α -PYO epitope and α -HA epitope (12CA5) mAbs were kindly provided by Gerry Rubin; α -*Drosophila* RAF polyclonal antibody was a kind gift from Debbie Morrison; α -MYC epitope mAb (9E10) was from Santa Cruz Biotechnology; α -MEK-1&2 and α -pMEK-1&2 polyclonal antibodies were from Cell Signaling; and α -ERK-1&2, α -dpERK-1&2 and α -FLAG mAbs were from Sigma.

Drosophila genetics and histology

Fly maintenance and crosses were conducted according to standard procedures. CR1 transgenic flies contain one copy of the *sev-Ras1^{V12}* transgene (Fortini *et al.*, 1992) on the *Cyo* balancer. The *se-FL-CNK* transgenic line was described previously (Therrien *et al.*, 1998). Multiple lines expressing the *se-FL-CNK^{RM}* transgene or the *IS* mutant version were analyzed. P-element-mediated germline transformation was performed as described by Rubin and Spradling (1982).

Adult *Drosophila* eye sections and scanning electron microscopy was conducted as previously described by Tomlinson and Ready (1987) and Kimmel *et al.* (1988), respectively.

Supplementary data

Supplementary data are available at *The EMBO Journal* Online.

Acknowledgements

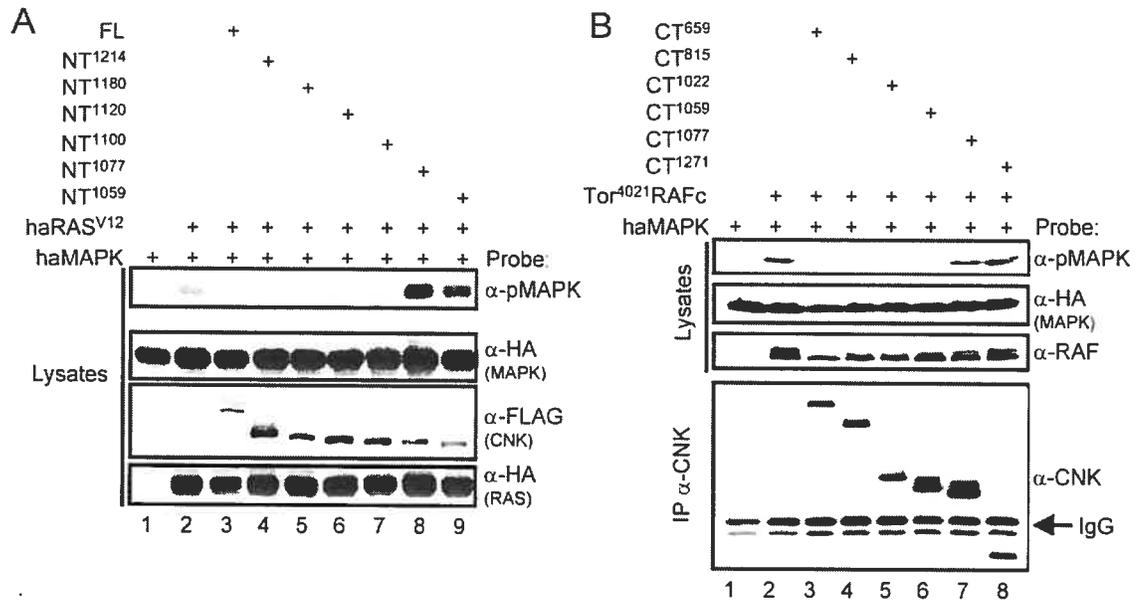
We are grateful to David Wassarman for critical reading of the manuscript and to Debbie Morrison, Gerry Rubin and Frank Sprenger for providing reagents. We would also like to thank Alexandre Viau for help in aligning the CNK homologs and Yves Lepage for help with statistical analysis of R7 cell numbers. M.D. is the recipient of a 'Société de Recherche sur le Cancer' Studentship. F.R. is the recipient of a Canadian Institutes for Health Research (CIHR) Fellowship and M.T. is the recipient of a CIHR Scholarship. This work was supported by a CIHR grant to M.T.

References

- Anselmo,A.N., Bumeister,R., Thomas,J.M. and White,M.A. (2002) Critical contribution of linker proteins to Raf kinase activation. *J. Biol. Chem.*, **277**, 5940–5943.
- Avruch,J., Zhang,X.F. and Kyriakis,J.M. (1994) Raf meets Ras: completing the framework of a signal transduction pathway *Trends Biochem. Sci.*, **19**, 279–283.
- Burack,W.R. and Shaw,A.S. (2000) Signal transduction: hanging on a scaffold. *Curr. Opin. Cell Biol.*, **12**, 211–216.
- Dhillon,A.S., Meikle,S., Yazici,Z., Eulitz,M. and Kolch,W. (2002) Regulation of Raf-1 activation and signalling by dephosphorylation. *EMBO J.*, **21**, 64–71.
- Dickson,B., Sprenger,F., Morrison,D. and Hafen,E. (1992) Raf functions downstream of Ras1 in the Sevenless signal transduction pathway. *Nature*, **360**, 600–603.
- English,J., Pearson,G., Wilshacher,J., Swantek,J., Karandikar,M., Xu,S. and Cobb,M.H. (1999) New insights into the control of MAP kinase pathways. *Exp. Cell Res.*, **253**, 255–270.
- Ferrell,J.E. (1998) How regulated protein translocation can produce switch-like responses. *Trends Biochem. Sci.*, **23**, 461–465.
- Fortini,M.E., Simon,M.A. and Rubin,G.M. (1992) Signalling by the sevenless protein tyrosine kinase is mimicked by Ras1 activation. *Nature*, **355**, 559–561.
- Kimmel,B.E., Heberlein,U. and Rubin,G.M. (1990) The homeo domain protein rough is expressed in a subset of cells in the developing *Drosophila* eye where it can specify photoreceptor cell subtype. *Genes Dev.*, **4**, 712–727.
- Kolch,W. (2000) Meaningful relationships: the regulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by protein interactions. *Biochem. J.*, **351**, 289–305.
- Kornfeld,K., Hom,D.B. and Horvitz,H.R. (1995) The *ksr-1* gene encodes a novel protein kinase involved in Ras-mediated signaling in *C. elegans*. *Cell*, **83**, 903–913.
- Light,Y., Paterson,H. and Marais,R. (2002) 14-3-3 antagonizes Ras-mediated Raf-1 recruitment to the plasma membrane to maintain signaling fidelity. *Mol. Cell Biol.*, **22**, 4984–4996.
- Maixner,A., Hecker,T.P., Phan,Q.N. and Wassarman,D.A. (1998) A screen for mutations that prevent lethality caused by expression of activated sevenless and Ras1 in the *Drosophila* embryo. *Dev. Genet.*, **23**, 347–361.
- Morrison,D.K. (2001) KSR: a MAPK scaffold of the Ras pathway? *J. Cell Sci.*, **114**, 1609–1612.
- Morrison,D.K. and Cutler,R.E. (1997) The complexity of Raf-1 regulation. *Curr. Opin. Cell Biol.*, **9**, 174–179.
- Muslim,A.J., Tanner,J.W., Allen,P.M. and Shaw,A.S. (1996) Interaction of 14-3-3 with signaling proteins is mediated by the recognition of phosphoserine. *Cell*, **84**, 889–897.
- Ponting,C.P., Phillips,C., Davies,K.E. and Blake,D.J. (1997) PDZ domains: targeting signalling molecules to sub-membranous sites. *BioEssays*, **19**, 469–479.
- Raabe,T. and Rapp,U.R. (2002) KSR—a regulator and scaffold protein of the MAPK pathway. *Sci. Sig. Trans. Know. Environ.*, **136**, PE28.
- Roy,F. and Therrien,M. (2002) MAP Kinase Module: The Ksr Connection. *Curr. Biol.*, **12**, R325–R327.
- Roy,F., Laberge,G., Douziech,M., Ferland-McCollough,D. and Therrien,M. (2002) KSR is a scaffold required for activation of the ERK/MAPK module. *Genes Dev.*, **16**, 427–438.
- Rubin,G.M. and Spradling,A.C. (1982) Genetic transformation of *Drosophila* with transposable element vectors. *Science*, **218**, 348–353.
- Stapleton,D., Balan,L., Pawson,T. and Sicheri,F. (1999) The crystal structure of an Eph receptor SAM domain reveals a mechanism for modular dimerization. *Nat. Struct. Biol.*, **6**, 44–49.
- Sundaram,M. and Han,M. (1995) The *C. elegans* *ksr-1* gene encodes a novel Raf-related kinase involved in Ras-mediated signal transduction. *Cell*, **83**, 889–901.
- Therrien,M., Chang,H.C., Solomon,N.M., Karim,F.D., Wassarman,D.A. and Rubin,G.M. (1995) KSR, a novel protein kinase required for RAS signal transduction. *Cell*, **83**, 879–888.
- Therrien,M., Wong,A.M. and Rubin,G.M. (1998) CNK, a RAF-binding multidomain protein required for RAS signaling. *Cell*, **95**, 343–353.
- Therrien,M., Wong,A.M., Kwan,E. and Rubin,G.M. (1999) Functional analysis of CNK in RAS signaling. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **96**, 13259–13263.
- Thorson,J.A., Yu,L.W., Hsu,A.L., Shih,N.Y., Graves,P.R., Tanner,J.W., Allen,P.M., Pivnicka-Worms,H. and Shaw,A.S. (1998) 14-3-3 proteins are required for maintenance of Raf-1 phosphorylation and kinase activity. *Mol. Cell Biol.*, **18**, 5229–5238.
- Tomlinson,A. and Ready,D.F. (1987) Neuronal differentiation in the *Drosophila* ommatidium. *Dev. Biol.*, **120**, 366–376.
- Tzivion,G. and Avruch,J. (2002) 14-3-3 proteins: active cofactors in cellular regulation by serine/threonine phosphorylation. *J. Biol. Chem.*, **277**, 3061–3064.
- White,M.A., Nicolette,C., Minden,A., Polverino,A., Van Aelst,L., Karin,M. and Wigler,M.H. (1995) Multiple Ras functions can contribute to mammalian cell transformation. *Cell*, **80**, 533–541.
- Yao,I., Ohtsuka,T., Kawabe,H., Matsuura,Y., Takai,Y. and Hata,Y. (2000) Association of membrane-associated guanylate kinase-interacting protein-1 with Raf-1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **270**, 538–542.
- Yeung,K. *et al.* (1999) Suppression of Raf-1 kinase activity and MAP kinase signalling by RKIP. *Nature*, **401**, 173–177.
- Yip-Schneider,M.T., Miao,W., Lin,A., Barnard,D.S., Tzivion,G. and Marshall,M.S. (2000) Regulation of the Raf-1 kinase domain by phosphorylation and 14-3-3 association. *Biochem. J.*, **351**, 151–159.

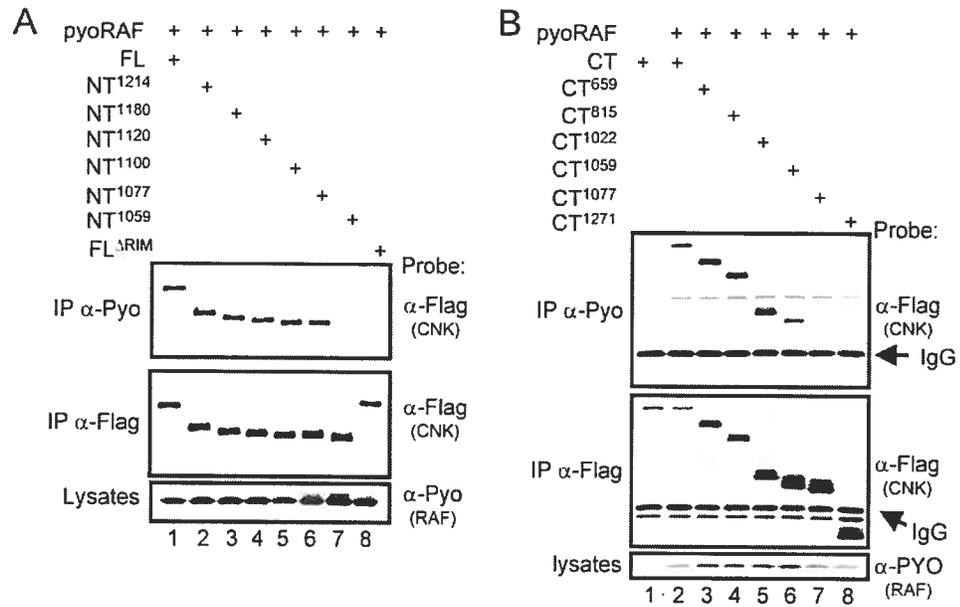
Received June 24, 2003; revised August 11, 2003;
accepted August 13, 2003

Supplementary Material

**Supplementary Figure 1. Fine mapping of the RAF-Inhibitory Region (RIR) on CNK**

(A) S2 cells were transfected with the indicated combinations of haMAPK (0.3 μ g), haRAS^{V12} (0.125 μ g), FL and NT constructs (0.1 to 0.6 μ g). To narrow down further the RIR C-terminal border, five additional C-terminal truncations within the 1059-1271 region were tested (Figure 2A). This positioned the C-terminal border within a 23 amino acid stretch (position 1077 and 1100; compare lanes 7 and 8).

(B) S2 cells were transfected with the indicated combinations of haMAPK (0.3 μ g), Tor⁴⁰²¹RAFc (0.2 μ g), and CT constructs (0.1 to 0.6 μ g). A similar deletion study was carried out as in (A) to delineate the RIR N-terminal border. Six N-terminal truncations of CT-CNK (Figure 2A) were co-expressed along with activated RAF, instead of RAS^{V12}, since Tor⁴⁰²¹RAFc is more potent than RAS^{V12} to activate MAPK, thus more sensitive to detect a release of inhibition. This placed the RIR N-terminal border between positions 1059 and 1077 (compare lanes 6 and 7).



Supplementary Figure 2. Fine mapping of the RAF-Interacting Motif (RIM) on CNK

(A) S2 cells were transfected with the indicated combinations of pyoRAF (0.7 μ g), FL and NT constructs (1 to 1.8 μ g).

(B) S2 cells were transfected with the indicated combinations of pyoRAF (0.7 μ g) and CT constructs (0.2 to 1.3 μ g). Note that the CNK/RAF interaction is significantly reduced, although not eliminated, when sequences between positions 1022 and 1059 are removed (lanes 4 and 5), which suggests that this interval includes sequences important for stable CNK/RAF association, although they are not essential for binding.