

Université de Montréal

Étude des kinases RSK : de l'interactome aux fonctions biologiques

par
Antoine Méant

Programmes de Biologie Moléculaire
Faculté de Médecine

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

Mars, 2019

© Antoine Méant, 2019

Résumé

La voie de signalisation Ras/MAPK régule de nombreuses fonctions biologiques et occupe un rôle central dans la transmission de signaux extracellulaires à des protéines cibles intracellulaires. Les dysfonctionnements de cette voie sont responsables de plusieurs maladies et syndromes génétiques, tels que le cancer ou le diabète. Cette voie de signalisation, qui régule l'activité des protéines kinases ERK1/2 comptant un grand nombre de substrats cellulaires, occupe une place primordiale dans de nombreux processus biologiques. Parmi ces substrats, on retrouve les protéines kinases de la famille RSK qui comptent quatre isoformes (RSK1-4). Bien que plusieurs substrats cellulaires aient été identifiés pour les isoformes RSK1 et RSK2, les fonctions biologiques des kinases RSK ainsi que les mécanismes moléculaires les régulant sont encore aujourd'hui peu décrits. Ainsi, afin d'améliorer nos connaissances sur la famille des RSK, nous avons utilisé plusieurs approches. Tout d'abord, nous avons déterminé les partenaires cellulaires à proximité des kinases RSK avec la mise en place d'une méthode protéomique spécifique. Cette première étape nous a permis d'identifier la protéine p120ctn comme un nouveau substrat des kinases RSK, mais aussi de démontrer le rôle de ces dernières dans la régulation des jonctions intercellulaires. D'autre part, en se focalisant sur un domaine particulier des kinases RSK encore non étudié, notre deuxième étude apporte elle aussi de nouvelles connaissances sur les différentes interactions des protéines RSK. Ces travaux ont entre autres permis de montrer que la liaison de l'isoforme RSK2 avec la protéine Scribble inhibe son activation par la voie de signalisation Ras/MAPK. En établissant donc des études à grande échelle pour déterminer les interactions propres à chaque isoforme des kinases RSK, nous avons identifié plusieurs nouveaux partenaires cellulaires de ces protéines ainsi que leurs fonctions associées. Cette étape est cruciale à la compréhension et la caractérisation du rôle des protéines RSK, notamment dans le développement des cellules cancéreuses.

Mot clés : signalisation cellulaire ; phosphorylation ; jonctions intercellulaires ; cancer ; RSK ; MAPK ; p120ctn ; Scribble.

Abstract

The Ras/MAPK signaling pathway regulates many biological functions and plays a key role in transducing extracellular signals to intracellular target proteins. Inappropriate regulation of this pathway leads to a variety of diseases and genetic syndromes, including cancer or diabetes. This signaling pathway regulates the activity of ERK1/2 protein kinases, which have many cellular substrates, and therefore regulates significant biological processes. Among these substrates, there is the RSK (p90 ribosomal S6 kinase) family of protein kinases, which is composed of four isoforms (RSK1-4). Although several cellular substrates have been identified for the RSK1 and RSK2 isoforms, the biological functions of RSK kinases and the molecular mechanisms regulating them are still poorly understood. Thus, to improve our knowledge of the RSK family, we used several approaches. First, we determined the cellular partners of the RSK kinases using a proximity-based labeling technique. This first step allowed us to identify the p120ctn protein as a new substrate of RSK kinases, but also to demonstrate the role of these proteins in the regulation of intercellular junction's integrity. Additionally, by focusing on a particular domain of RSK kinases still unstudied, our second study also provided new insights into the different interactions of RSK proteins. Finally, we demonstrated that the binding of the RSK2 isoform with the Scribble protein inhibits its activation by the Ras/MAPK signaling pathway. Consequently, by establishing large-scale studies to determine the specific interactions of each RSK isoform, we have identified several new cellular partners of these proteins and their associated functions. This step is crucial to understand and characterize the role of the RSK proteins, particularly with respect to their described functions in cancer.

Key words: cell signaling; phosphorylation; intercellular junctions; cancer; RSK; MAPK; p120ctn; Scribble.

Table des matières

Résumé	i
Abstract	ii
Table des matières	iii
Liste des figures	vii
Liste des tableaux	ix
Liste des abréviations	x
Remerciements	xvi
Chapitre 1 : Introduction	1
1 La voie de signalisation Ras/MAPK.....	1
1.1 Mécanismes d'activation de la voie de signalisation.....	1
1.2 La petite GTPase Ras.....	3
1.3 Les protéines kinases Raf et MEK.....	3
1.4 Le module ERK1/2	5
1.5 La famille des protéines kinases RSK	6
1.5.1 Découverte	6
1.5.2 Structure et conservation.....	7
1.5.3 Expression tissulaire	9
1.5.4 Localisation cellulaire.....	12
1.5.5 Mécanismes d'activation	13
1.5.6 Mécanismes d'activation alternatifs	16
1.5.7 Fonctions.....	16
1.5.7.1 Reconnaissance des substrats.....	16
1.5.7.2 Activité transcriptionnelle.....	17
1.5.7.3 Croissance cellulaire et synthèse protéique	19
1.5.7.4 Prolifération et cycle cellulaire	19
1.5.7.5 Survie cellulaire	20
1.5.7.6 Adhésion cellulaire et motilité	21
1.5.7.7 Métabolisme.....	21

1.5.7.8	Rétroaction négative	22
1.5.7.9	Régulations physiologiques	22
1.5.8	Implications et rôles des kinases RSK dans le cancer	24
1.5.9	Développement d'inhibiteurs des kinases RSK.....	25
2	Les jonctions cellulaires.....	27
2.1	Les jonctions serrées.....	27
2.2	Les jonctions communicantes.....	29
2.3	Les desmosomes	30
2.4	Les jonctions adhérentes.....	30
2.4.1	La protéine p120ctn	33
2.4.1.1	Structure et conservation.....	33
2.4.1.2	Fonctions.....	35
2.4.1.2.1	Régulation des cadhérines.....	35
2.4.1.2.2	Régulation de l'activité des Rho GTPases.....	37
2.4.1.2.3	Activité transcriptionnelle.....	39
2.4.1.3	Régulation de p120ctn par des phosphorylations	41
2.4.1.4	Implications de p120ctn dans le cancer	43
2.4.1.4.1	Fonctions oncogéniques.....	43
2.4.1.4.2	Rôle de suppresseur de tumeurs.....	44
3	Fonctions biologiques régulées par des protéines adaptatrices.....	45
3.1	Les protéines adaptatrices à domaines PDZ	46
3.1.1	Caractéristiques structurales des domaines PDZ	46
3.1.2	Interactions avec les domaines PDZ.....	48
3.1.2.1	Les différentes interactions des domaines PDZ.....	48
3.1.2.2	Régulation des interactions.....	49
3.1.3	La protéine à domaines PDZ Scribble	50
3.1.3.1	Structure.....	50
3.1.3.2	Fonctions.....	51
3.1.3.2.1	Architecture cellulaire.....	51
3.1.3.2.2	Scribble, une protéine adaptatrice.....	52
3.1.3.2.3	Régulation de la voie Ras/MAPK.....	52

3.1.3.1	La protéine Scribble dans le cancer	53
4	Objectifs de la thèse	55

Chapitre 2 : RSK promotes p120-catenin phosphorylation and regulates cell-cell adhesion in melanoma	56
Mise en Contexte	57
Abstract	58
Introduction	59
Results	62
Discussion	70
Materials and Methods	73
Acknowledgments	79
References	80
Figures	80
Supplemental Figures	98
Contribution des auteurs	100

Chapitre 3 : The cell polarity protein Scribble is a regulator of RSK2 kinase activation	101
Mise en Contexte	102
Abstract	103
Introduction	104
Results	106
Discussion	110
Materials and Methods	112
Acknowledgments	115
References	116
Figures	119
Contribution des auteurs	126

Chapitre 4 : Discussion	127
1. Caractérisation de l'interactome des kinases RSK : des nouvelles données	127
<i>Utilisation de deux techniques complémentaires</i>	127
<i>Une affinité particulière avec les protéines à domaine PDZ ?</i>	128
<i>Un rôle spécifique aux jonctions intercellulaires ?</i>	130
2. La protéine p120ctn, un nouveau substrat des kinases RSK	132
<i>Une phosphorylation comme marqueur des cellules cancéreuses ?</i>	133
<i>Une fonction exacte qui reste à déterminer</i>	133
3. Scribble, un régulateur de la voie de signalisation Ras/MAPK.....	134
 Chapitre 5 : Conclusion	 136
 Bibliographie	 137
 Annexes	 181
Dataset S1. BioID dataset from stable HEK293 Flp-In T-Rex cell lines expressing BirA*-RSK(1-4)	182
Dataset S2. BioID dataset from stable HEK293 Flp-In T-Rex cell lines expressing BirA*-p120ctnWT, S320A and S320D	187

Liste des figures

Chapitre 1

Figure 1 : Activation de la voie de signalisation Ras/MAPK.....	2
Figure 2 : Principaux effecteurs mutés de la voie de signalisation Ras/MAPK impliqués dans le développement de cancers	4
Figure 3 : Caractéristiques structurelles des kinases RSK1-4	9
Figure 4 : Patron d'expression des ARNm codant pour les protéines RSK1–4 dans les tissus humains et de souris	11
Figure 5 : Mécanisme d'activation séquentielle des kinases RSK1-4	15
Figure 6 : Fréquence WebLogo des séquences cibles pour les substrats des kinases RSK connus	17
Figure 7 : Représentation schématique des principales jonctions cellulaires entre deux cellules adjacentes.....	28
Figure 8 : Principaux constituants moléculaires des jonctions adhérentes.....	32
Figure 9 : Structure de la protéine p120ctn.....	34
Figure 10 : Régulation des petites GTPases Rho par p120ctn.....	38
Figure 11 : Régulation de l'activité transcriptionnelle par p120ctn	40
Figure 12 : Représentation schématique d'un domaine PDZ.....	47
Figure 13 : Les différents modes d'interactions avec les domaines PDZ	48
Figure 14 : Structure de la protéine Scribble	50

Chapitre 2

Figure 1. Proteomic strategy to identify RSK(1-4) proximity cellular partners	85
Figure 2. In vivo characterization of RSK kinases interactome	87
Figure 3. RSK phosphorylates p120ctn at Ser320	88
Figure 4. The Ras/MAPK pathway mediated Ser320 phosphorylation on p120ctn is RSK-dependent	90
Figure 5. p120ctn is phosphorylated on Ser320 and maintains cell-cell adhesion integrity in BRAF-mutated melanoma cells.....	92
Figure 6. RSK activity is involved in intercellular adhesion strength	94

Figure 7. p120ctn proximity cellular partners are regulated by Ser320 phosphorylation 96
Figure S1. Baits expression are sensitive to tetracycline treatment..... 98
Figure S2. p120ctn is enriched in p-bodies in response to oxidative stress..... 99

Chapitre 3

Figure 1. Proteomic strategy to identify specific RSK-PBM binding partners 119
Figure 2. Characterization of the RSK-PBM-dependent interactome 120
Figure 3. Scribble is a binding partner of RSK2 kinase..... 121
Figure 4. RSK2 interact with the PDZ3 of Scribble 122
Figure 5. Scribble interaction with RSK2 inhibits ERK1/2 binding and RSK2 activation
..... 123
Figure 6. Schematic representation of the role of Scribble in the regulation of RSK2
activation..... 125

Chapitre 4

Figure 1 : RSK2 stimule la phosphorylation de la protéine Scribble 130

Liste des tableaux

Chapitre 1

Tableau 1 : Sites de phosphorylation identifiés sur la protéine p120ctn et leurs effets spécifiques associés	42
---	----

Liste des abréviations

α -catenin : Catenin alpha-1

AKAP95 : A-kinase anchor protein 95

AMPA : α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid

AMPC : adénosine monophosphate cyclique

AP-2 : adaptor protein complex 2

Arg : Arginine

ARHGEF12 : Rho guanine nucleotide exchange factor 12

ARM : Armadillo

ARN : acide ribonucléique

ARNm : ARN messenger

ARVCF : Armadillo repeat protein deleted in velo-cardio-facial syndrome

AS160 : Akt substrate of 160 kDa

Asp : acide aspartique

Bad : Bcl-2-associated death promoter

β -catenin : Catenin bêta-1

β -Pix : Rho guanine nucleotide exchange factor 7

BTB/POZ-ZF : Broad complex, Tramtrack, Bric à brac /poxvirus and zinc finger

CAMK : Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase

Caspase : Cysteine-aspartic protease

CBD : catenin binding domain

CC : coiled coil domain

Cdc25C : M-phase inducer phosphatase 3

Cdc42 : Cell division control protein 42 homolog

CDK1/2 : Cyclin-dependent kinase $\frac{1}{2}$

C/EBP β : CCAAT-enhancer-binding protein

c-Fos : Proto-oncogene c-Fos

Chk1 : Cell cycle checkpoint kinase 1

CI50 : Concentration Inhibitrice Médiane

CK1 α/ϵ : Casein kinase 1 alpha/epsilon

CLK2 : CDC-like kinase 2
CoREST : REST corepressor 1
Cortactin : cortical actin binding protein
CREB : cAMP response element-binding protein
DAPK : Death-associated protein kinase
Dlg-1 : discs large 1
Dp : Desmoplakine
Dsc : Desmocolline
Dsg : Desmogl ine
Dyrk1A : Dual specificity tyrosine-phosphorylation-regulated kinase 1A
E-cadherin : epithelial cadherin/cadherin-1
eEF2 : Elongation factor 2
EGFR : Epidermal Growth Factor Receptor
eIF2B : Eukaryotic Initiation Factor 2 GEF
eIF4B : eukaryotic translation initiation factor 4B
Elk1 : ETS domain-containing protein Elk-1
EMT : Epithelial–Mesenchymal Transition
EPHA2 : Ephrin type-A receptor 2
EPLIN : epithelial protein lost in neoplasm
ERK1/2 : Extracellular signal–regulated kinases 1/2
FGFR2/3 : Fibroblast growth factor receptor 2/3
FLT3 : fms like tyrosine kinase 3
FMK : Z-VAD-FMK, benzyloxycarbonyl-Val-Ala-DL-Asp-fluoromethylketone
formin-1 : Limb deformity protein homolog
FOXC2 : Forkhead box protein C2
Fyn : Proto-oncogene tyrosine-protein kinase Fyn
GAP : GTPase-Activating Proteins
GDP : Guanosine Diphosphate
GEF : Guanine nucleotide Exchange Factors
Glis2 : Neuronal Krueppel-like protein
Glu : acide glutamique

GLUT4 : Glucose transporter type 4
Gly : glycine
GIT1 : ARF GTPase-activating protein GIT1
GMPc : guanosine monophosphate cyclique
GOPC : Golgi-associated PDZ and coiled-coil motif-containing protein
Grb2 : Growth factor receptor-bound protein 2
GRIP1 : Glutamate receptor-interacting protein 1
GRSF1 : G-rich sequence factor 1
GSK3 : Glycogen synthase kinase-3
GTP : Guanosine Triphosphate
GUK : guanylate kinase homology domain
HNSCC : Head and Neck squamous cell carcinoma
I κ B α/β : NF- κ B inhibitor α/β
IRS-1 : Insulin receptor substrate 1
JMD : juxtamembrane domain
JNK1/2/3 : c-Jun N-terminal kinases 1/2/3
Kaiso : Zinc finger and BTB domain-containing protein 33
KIM : Kinase Interaction Motif
LAP : LRR and PDZ protein
Lck : lymphocyte-specific protein tyrosine kinase
Leu : Leucine
Lgl : Lethal-2-giant larvae
LKB1 : Liver kinase b1
LRP4 : LDL Receptor Related Protein 4
LRR : Leucine-rich repeat
LRRK2 : Leucine-rich repeat kinase 2
Lys : Lysine
Mad1 : Mitotic spindle assembly checkpoint protein
MAGI-1/3 : membrane-associated guanylate kinase inverted- 1/3
mAKAP : muscle-specific A-kinase anchoring protein
MAPK : Mitogen-activated protein kinases

MAPKAPK : mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase
MARVELD3 : MARVEL domain-containing protein 3
MCC : Mutated in Colorectal Cancer
MDC1 : Mediator of DNA damage checkpoint protein 1
MELK : Maternal embryonic leucine zipper kinase
MITF : Microphthalmia-associated Transcription Factor
MK2/3 : MAPK-activated protein kinase 2/3
MK5 : MAPK-activated protein kinase 5
MNK : MAPK-interacting protein kinases 1/2
MRAS : Ras-related protein M-Ras
Mre11 : Meiotic recombination 11
MSK1/2 : Mitogen and stress-activated protein kinases 1/2
MST2 : Serine/threonine-protein kinase 3
mTOR : mammalian target of rapamycin
mTORC1 : mTOR complex 1
N-cadherin : neural cadherin/cadherin-2
NES : signal d'exportation nucléaire
Nezha : Calmodulin-regulated spectrin-associated protein 3
NF- κ B : Nuclear factor- κ B
NHE1 : sodium-hydrogen antiporter 1
NHERF-1 : Sodium-hydrogen antiporter 3 regulator 1
NLS : signal de localisation nucléaire
NMDA : N-methyl-D-aspartate
NOS1 : Nitric oxide synthase 1
NOS1AP : Carboxyl-terminal PDZ ligand of neuronal nitric oxide synthase protein
NUMB : Protein numb homolog
Nur77 : Nuclear receptor subfamily 4 group A member 1
N-WASP : neuronal Wiskott–Aldrich Syndrome protein
p120ctn : p120-catenin/Catenin delta-1
p190RhoGAP : Rho GTPase-activating protein 35
Pak4/5 : P21 Activated Kinase 4/5

Par-3 : Partitioning defective 3 homolog
P-cadherin : Placental cadherin
PBM : PDZ binding-motif
PDGFR : Platelet-derived Growth Factor Receptor
PDK1 : 3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1
PEA-15 : Proliferation And Apoptosis Adaptor Protein 15
PFKFB2 : 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-biphosphatase 2
Pg : Plakoglobine
PHLPP1 : PH domain leucine-rich-repeats protein phosphatase
PI3K : Phosphoinositide 3-kinase
PIM3 : Proviral integration site for Moloney murine leukemia virus-3
PIP₂ : phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate
PKA/C : Protein kinase A/C
Pkp : Plakophiline
PLEKHA7 : pleckstrin homology domain-containing family A member 7
PLK1 : polo-like kinase 1
PS-1 : presenilin-1
PSD-95 : postsynaptic density-95
PTP1B : Protein tyrosine phosphatase 1B
Rac1 : Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1
Raf : Rapidly Accelerated Fibrosarcoma
Raptor : Regulatory-associated protein of mTOR
Ras : Rat sarcoma
RD : regulatory domain
REST : RE1-silencing transcription factor
RET : rearranged during transfection proto-oncogene
RhoA : Ras homolog gene family member A
Rho GDI : GDP dissociation inhibitor of Rho protein
rpS6 : Ribosomal protein S6
RSK : 90 kDa ribosomal S6 kinase
RTK : Receptor Tyrosine Kinase

S6K : Ribosomal protein S6 kinase
Scribble : Protein scribble homolog
Ser : Sérine
SGK : Serum/glucocorticoid-regulated kinase
SH2/3 : Src Homology 2/3
SH3BP2 : SH3 domain-binding protein 2
SHANK3 : SH3 and multiple ankyrin repeat domains 3
SCHOC2 : Leucine-rich repeat protein SHOC-2
SOS1 : Son of sevenless homolog 1
Src : Proto-oncogene tyrosine-protein kinase Src
SRF : Serum response factor
Stargazin : Voltage-dependent calcium channel gamma-2 subunit
Thr : Thréonine
TIA-1 : T-cell-restricted intracellular antigen-1
Tkv : bone morphogenetic protein-type I receptor Thickveins
TSC2 : Tuberous sclerosis 2 protein
TSH : thyroid-stimulating hormone
Tyr : Tyrosine
Vav2 : vav guanine nucleotide exchange factor 2
VE-cadherin : vascular endothelial cadherin
X11 α : Amyloid-beta A4 precursor protein-binding family A member 1
Xaa : Undetermined amino acid
YB-1 : Y-box binding protein-1
ZO-1/2/3 : zonula occludens 1/2/3

Remerciements

Mes premiers remerciements s'adressent à Philippe Roux. Je te remercie de m'avoir donné l'opportunité de pouvoir réaliser mon doctorat dans ton laboratoire après y avoir effectué ma maîtrise. Merci de ta confiance et du temps investi pour me former. Travailler à tes côtés fut une expérience très enrichissante. J'ai pu apprendre de nombreuses choses, tant au niveau scientifique qu'au niveau professionnel. Le chemin parcouru est immense, je réalise aujourd'hui les connaissances et les aptitudes acquises durant mon doctorat. La formation que tu m'as donnée m'a permis de réaliser de nombreuses avancées au cours des dernières années. Elle me sera aussi utile j'en suis sûr, pour affronter les problèmes dans le monde du travail auquel je me destine. Merci encore !

J'aimerais remercier ensuite les membres du laboratoire, actuels ou anciens, qui m'ont aidé et soutenu tout au long de mon cheminement. J'ai notamment une pensée particulière pour Joe, qui m'a formé et beaucoup aidé à mon arrivée au laboratoire. Je remercie aussi les anciens membres Jacob, Marie, Xiaocui, Jérôme, Viviane, Kevin, Badr et Alexandra pour leurs aides mais surtout Beichen, qui a travaillé avec moi sur un des projets et sans qui plusieurs choses n'auraient pas abouti. Je remercie aussi Geneviève pour son travail et son aide sur les différents projets. Enfin, merci aux membres actuels du laboratoire dont Alizée et Neethi mais surtout mes compères des derniers temps : Thibaut, Sami, Louis et Léo. Merci pour votre aide et vos commentaires constructifs, mais surtout pour votre bonne humeur au quotidien. Mon doctorat n'aurait pas été le même sans vous.

Je tiens aussi à remercier les membres de mon jury pour avoir accepté d'évaluer cette thèse ainsi que Dr. Jean-François Côté et Dr. Marc Therrien pour leurs commentaires et leurs remarques constructives lors de mes comités de suivi. Je remercie aussi Dr. Anne-Claude Gingras et les membres de son laboratoire pour m'avoir accueilli le temps d'une formation.

Plus personnellement, j'aimerais remercier mes amis montréalais qui m'ont soutenu tout au long de mon doctorat, en particulier Nathan, Roméo, Arthur mais surtout Fabien et Deesha. Votre aide de tous les jours a fortement contribué à la réussite de mes études. De plus, je veux remercier mes amis de France qui, même loin, ont toujours continué à me

supporter depuis toutes ces années. Cette force que vous me donnez m'a énormément aidé pour mener à bien ce doctorat. Merci particulièrement à Guillaume, Thibaut, Thomas, Olivier, Pierre et Florian.

Enfin, rien de ceci n'aurait été possible sans ma famille et ma copine. Je remercie donc ma mère, ma sœur, mon père, ma grand-mère, mon cousin et bien évidemment Mayra pour tous leurs apports et leur soutien inconditionnel. Merci pour tout !

Chapitre 1 : Introduction

1 La voie de signalisation Ras/MAPK

La voie Ras/MAPK est l'une des voies de signalisation les plus importantes pour la vie. Cette voie régule de nombreuses fonctions cellulaires et occupe un rôle central dans la transmission de signaux extracellulaires à des protéines cibles intracellulaires (Molina and Adjei 2006). Ainsi, elle permet notamment de contrôler la prolifération, la survie, la différenciation et la migration cellulaire mais aussi l'angiogenèse et le métabolisme des cellules. Des dysfonctionnements dans la voie de signalisation Ras/MAPK sont responsables de plusieurs maladies et syndromes génétiques, tels que le cancer (Kim and Choi 2010).

1.1 Mécanismes d'activation de la voie de signalisation

L'activation de la voie de signalisation Ras/MAPK est principalement contrôlée par la réception de signaux extracellulaires par des récepteurs à activité tyrosine kinase (RTK). Le récepteur du facteur de croissance épidermique (EGFR) et le récepteur du facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGFR) sont parmi les plus importants de cette voie (Andrae, Gallini, and Betsholtz 2008; Wee and Wang 2017). Cependant, d'autres protéines membranaires sont impliquées dans la régulation de l'activité de la voie de signalisation tels que les intégrines (Yee, Weaver, and Hammer 2008), les récepteurs couplés aux protéines G (Della Rocca et al. 1997) ou les récepteurs aux cytokines (Chang et al. 2003). L'interaction d'un ligand avec un RTK entraîne l'oligomérisation de ce dernier avec un autre récepteur ou une protéine membranaire, permettant la juxtaposition de ses extrémités catalytiques cytoplasmiques et ainsi contrôler l'activation de ses domaines à activité tyrosine kinase (Lemmon and Schlessinger 2010). L'autophosphorylation des récepteurs induit le recrutement de protéines adaptatrices comme Grb2 (Growth factor receptor-bound protein 2) par le biais de son domaine SH2 (Src Homology 2). Après quoi, les protéines adaptatrices permettent le recrutement de protéines GEF (Guanine nucleotide Exchange Factors) tel que SOS1 (Son of sevenless homolog 1), qui induisent l'activation de la petite GTPase Ras (Figure 1). L'activation de la voie de signalisation Ras/MAPK peut être perturbée par l'activité aberrante des RTK et mener au développement de cellules

cancéreuses (Du and Lovly 2018). Les dernières études de séquençage de nombreux types de tumeurs ont permis d'identifier des mutations chez plusieurs RTK modifiant et stimulant leur activité basale.

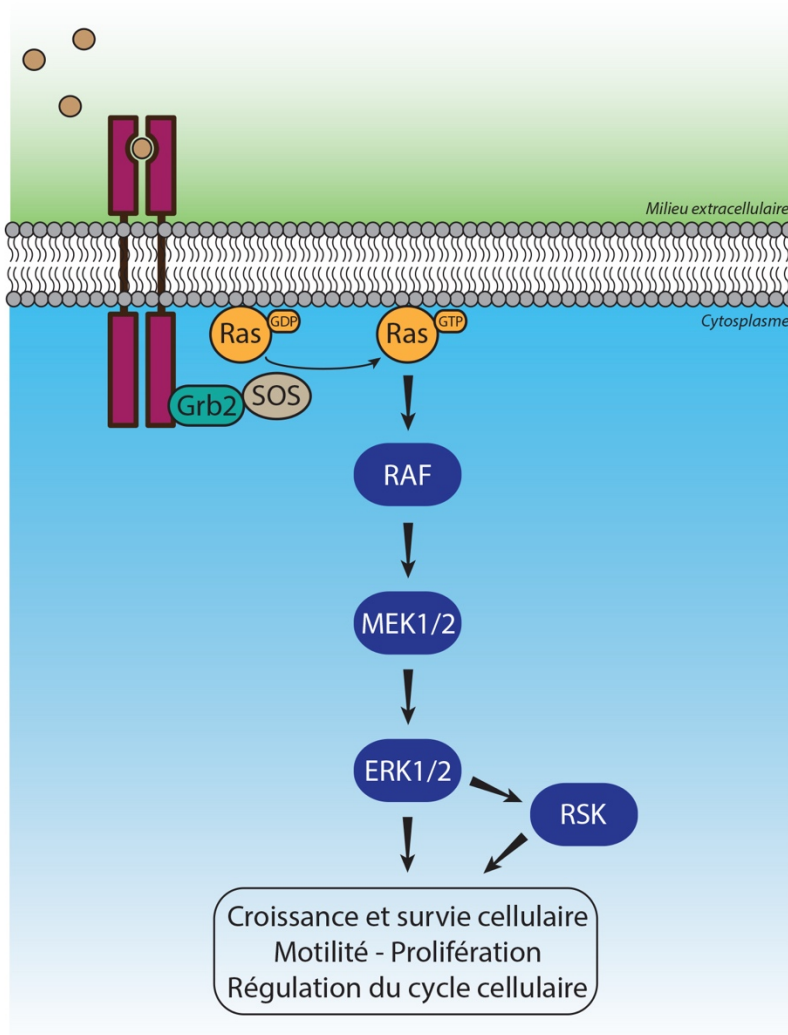


Figure 1 : Activation de la voie de signalisation Ras/MAPK

Après la réception d'un facteur de croissance, le récepteur tyrosine kinase dimérise et devient actif. Ses autophosphorylations vont permettre le recrutement de la protéine adaptatrice Grb2 qui va recruter la protéine GEF SOS. Après quoi, cette dernière permet l'activation de la petite GTPase Ras qui active ensuite la famille des kinases Raf. Une fois activée, Raf phosphoryle les kinases MEK1/2 qui phosphorylent à leur tour le module ERK1/2. Les kinases ERK1/2 vont entraîner l'activation de nombreux processus cellulaires par l'intermédiaire de plusieurs substrats cellulaires dont les kinases RSK1-4.

1.2 La petite GTPase Ras

La famille des protéines Ras (Rat sarcoma) compte trois isoformes, N-Ras, K-Ras et H-Ras. Ces trois protéines ont une activité GTPase qui leur permet de passer d'un état inactif lié au GDP (Guanosine Diphosphate) à un état actif lié au GTP (Guanosine Triphosphate). Leur localisation au niveau de la membrane cellulaire due à l'interaction de leur extrémité C-terminale avec la couche phospholipidique membranaire facilite leur activation et la transduction de signaux (Ahearn et al. 2011). Ainsi, leur activation survient lors du remplacement du GDP par le GTP médié par des protéines GEF, et inversement, leur inactivation est provoquée par l'hydrolyse du GTP en GDP stimulé par des protéines appelées GAP (GTPase-Activating Proteins) (Hennig et al. 2015). Une fois activées, les protéines Ras interagissent avec différentes enzymes intracellulaires et induisent l'activation de différentes voies de signalisation comme la voie Ras/MAPK mais aussi la voie PI3K/AKT (Castellano and Downward 2011).

Les protéines Ras sont extrêmement impliquées dans le développement du cancer puisqu'environ 30% des tumeurs humaines ont une mutation activatrice sur les gènes codant pour ces enzymes (Figure 2) (Prior, Lewis, and Mattos 2012). Ainsi le gène codant K-Ras est un des oncogènes les plus fréquemment mutés dans les cancers humains dont le cancer du pancréas (60%), colorectal (35%), des poumons (17%) et des voies biliaires (32%).

1.3 Les protéines kinases Raf et MEK

Dans la voie de signalisation Ras/MAPK, la cible directe de la petite GTPase Ras liée au GTP est la kinase Raf. La famille des protéines kinases sérine/thréonine Raf (Rapidly Accelerated Fibrosarcoma) est composée de trois membres, ARAF, BRAF et CRAF (appelé aussi Raf1). L'activation des kinases Raf intervient après leur recrutement à la membrane plasmique par la forme active de Ras liée au GTP (Leevers, Paterson, and Marshall 1994; Stokoe et al. 1994). Ensuite, cette interaction entraîne l'arrêt de l'auto-inhibition de la kinase Raf, et permet alors à cette dernière de dimériser pour être complètement active et phosphoryler ses substrats directs, les protéines MEK1/2 (Kyriakis et al. 1992; Luo et al. 1996; Weber et al. 2001; Rushworth et al. 2006). Les kinases MEK1/2 font partie d'un groupe de kinases à double spécificité, pouvant catalyser la phosphorylation à la fois d'une tyrosine mais aussi d'un résidu sérine ou thréonine sur des

protéines cibles (Roskoski 2012b). Cependant, à ce jour elles n'ont qu'un seul substrat caractérisé, les kinases ERK1/2.

Malgré que les protéines ARAF et CRAF ne sont pas ou peu mutées dans les cancers, on retrouve l'isoforme BRAF comme l'une des kinases les plus mutées (Figure 2) (Davies et al. 2002; Rahman et al. 2013). Ces mutations sont présentes dans différents cancers, dont les mélanomes (60%), les cancers colorectaux (20%) et les cancers thyroïdiens (30%). La majorité des mutations se trouvent dans le domaine kinase de BRAF et induisent son activation constitutive. Environ 98% des mutations concernent la valine en position 600 et plus de 97% de ces mutations correspondent au remplacement de cette valine par un acide glutamique (Lavoie and Therrien 2015).

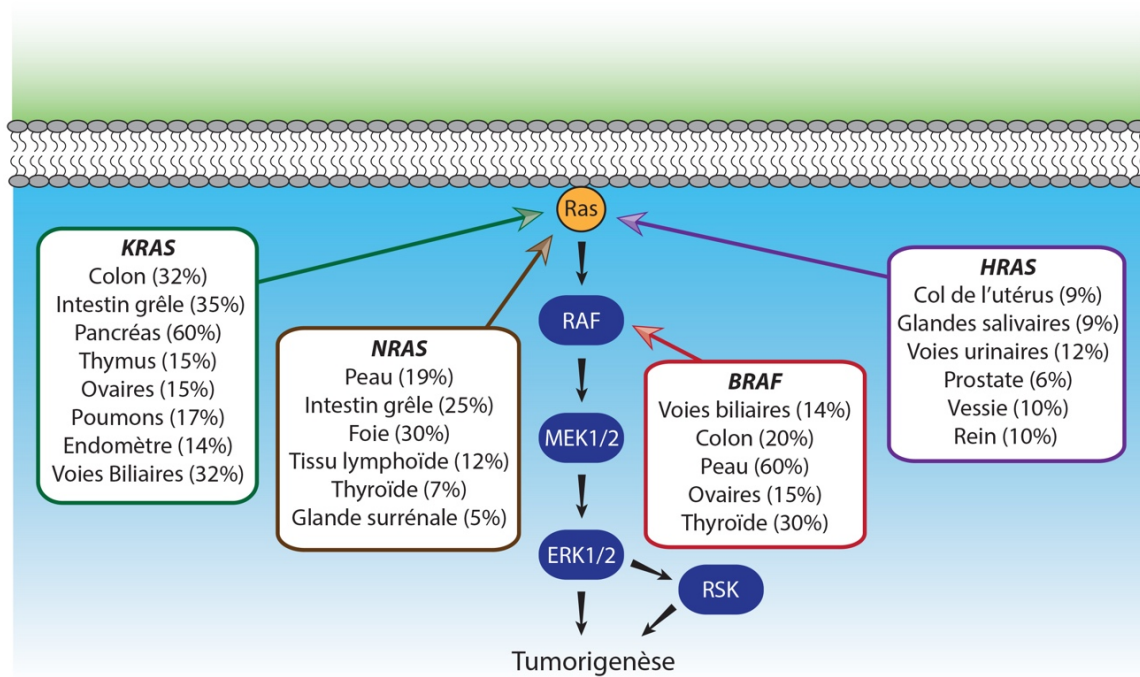


Figure 2 : Principaux effecteurs mutés de la voie de signalisation Ras/MAPK impliqués dans le développement de cancers

Les protéines KRAS, HRAS, NRAS et BRAF sont les protéines effectrices de la voie MAPK retrouvées le plus souvent mutées dans les cancers. Les principaux types de cancers où sont retrouvées ces mutations sont listés. Les pourcentages représentent la présence des mutations de la protéine indiquée par rapport au nombre total de cancers du type listé.

1.4 Le module ERK1/2

Les protéines ERK1/2 (Extracellular signal–regulated kinases 1/2) sont issues de la famille des kinases MAPK. Les MAPK (Mitogen-activated protein kinases) font partie des voies de transduction de signal les plus anciennes et sont largement utilisées tout au long de l'évolution dans de nombreux processus physiologiques (Rodriguez, Petersen, and Mundy 2010; Li, Liu, and Zhang 2011; Xu et al. 2017). Toutes les cellules eucaryotes possèdent plusieurs MAPK qui permettent de réguler différents mécanismes cellulaires tels que la survie, la différenciation, l'expression des gènes ou encore la progression du cycle cellulaire ou le métabolisme des cellules. Chez les mammifères, 14 MAPK ont été caractérisées dont les kinases ERK1/2 mais aussi les enzymes JNK1/2/3 (c-Jun N-terminal kinases 1/2/3) (Johnson and Nakamura 2007) ou p38 (Cuadrado and Nebreda 2010). Les protéines ERK1/2 ont été parmi les premières MAPK à avoir été découvertes (Cooper et al. 1982). Ces deux kinases ont une séquence homologue à 84% et sont exprimées de manière abondante dans la plupart des organes et des cellules (Roskoski 2012a).

Les protéines ERK1/2 sont activées par la phosphorylation de MEK1/2 sur un motif conservé Thr-Xaa-Tyr (où Thr est un résidu thréonine, Xaa n'importe quel acide aminé et Tyr une tyrosine) localisé à l'intérieur de la boucle d'activation de leur domaine kinase (Robbins et al. 1993). Une fois activées, les kinases ERK1/2 peuvent phosphoryler un grand nombre de substrats cellulaires sur les résidus sérine (Ser) ou thréonine (Thr) du motif consensus Thr/Ser-Proline. Cependant, dans la majorité des cas, il est nécessaire que les protéines ERK1/2 interagissent directement avec leurs substrats pour les phosphoryler, comme la plupart des autres MAPK. Cette interaction peut se faire par la liaison de ERK1/2 sur plusieurs types de domaines dont notamment le domaine de liaison D qui consiste en un noyau de résidus basiques suivi de résidus hydrophobes (Lys/Arg-Lys/Arg-Xaa₂₋₆- ϕ -Xaa- ϕ , où ϕ est un résidu hydrophobe, Lys une lysine et Arg une arginine) (Cargnello and Roux 2011).

Finalement, le module ERK1/2 agit comme l'un des effecteurs principaux de la voie de signalisation Ras/MAPK en phosphorylant dans la cellule plus d'une centaine de substrats connus à ce jour. Les kinases activées ERK1/2 phosphorylent des protéines dans différents compartiments cellulaires, notamment des protéines membranaires (Van Linden et al. 2000), des protéines du cytosquelette (Ku and Meier 2000), des facteurs de

transcriptions dans le noyau (Chung et al. 1997), mais aussi d'autres kinases (Sutherland, Campbell, and Cohen 1993). Ainsi, par le biais de ces deux kinases, la voie de signalisation va pouvoir réguler de nombreux mécanismes cellulaires et processus biologiques. Il n'est donc pas étonnant qu'une dérégulation de l'un des membres de cette voie de signalisation entraîne une activité aberrante de nombreuses protéines cellulaires sous-jacentes et mène à de multiples dérèglements biologiques.

1.5 La famille des protéines kinases RSK

Par le biais des kinases ERK1/2, la voie de signalisation Ras/MAPK permet l'activation de nombreux substrats cellulaires pour réguler de multiples processus biologiques. Parmi les protéines phosphorylées et activées par le module ERK1/2, on retrouve la famille des kinases RSK (90 kDa ribosomal S6 kinase).

1.5.1 Découverte

Au commencement, les kinases RSK ont été découvertes lors de l'étude de la protéine ribosomale S6 (rpS6). Plusieurs études ont démontré qu'il existe une corrélation entre la phosphorylation de rpS6 et l'initiation de la synthèse protéique, menant ainsi à l'élaboration de nombreux travaux depuis la caractérisation de cette protéine. (Gressner and Wool 1974; Meyuhas 2008, 2015). En 1985, alors qu'ils étudiaient les protéines responsables de la phosphorylation de rpS6, deux groupes de recherche ont purifié une protéine, appelée kinase ribosomale S6 (S6K), qui phosphorylait rpS6 à partir d'œufs de *Xenopus laevis* non fertilisés (Nielsen, Thomas, and Maller 1982; Blenis and Erikson 1984; Erikson and Maller 1985). Deux protéines kinases de 85-90 kDa (S6KI et S6KII) ont ensuite été purifiées et identifiées, conduisant au clonage d'ADN complémentaire codant pour des protéines hautement homologues renommées p90 RSK ou RSK (Jones et al. 1988). Enfin, il a été montré que la kinase S6KII est phosphorylée et activée par la protéine kinase MAP2 (renommée plus tard ERK2), mettant ainsi en évidence l'activation de la protéine S6KII (connu aujourd'hui sous le nom de RSK) en aval de la voie de signalisation Ras/MAPK (Sturgill et al. 1988).

1.5.2 Structure et conservation

La famille des kinases RSK est composée chez l'humain de quatre isoformes: RSK1, RSK2, RSK3 et RSK4, issues de quatre gènes indépendants (RSK1 : *RPS6KA1* - 1p36.11, RSK2 : *RPS6KA3* - Xp22.12, RSK3 : *RPS6KA2* - 6q27, RSK4 : *RPS6KA6* - Xq21.1) (Carriere, Ray, et al. 2008). Les différentes protéines RSK ont une séquence similaire entre elles d'environ 65 à 80%, leurs extrémités N- et C-terminale étant les parties les plus divergentes (Figure 3). Chaque isoforme RSK possède deux domaines kinases différents et fonctionnels (Jones et al. 1988; Fisher and Blenis 1996; Chrestensen and Sturgill 2002). Un premier domaine kinase situé dans la partie N-terminale de RSK appartient à la famille des protéines kinases AGC (Pearce, Komander, and Alessi 2010), qui inclut plusieurs protéines dont Akt, SGK (Serum/glucocorticoid-regulated kinase) ou encore S6K1/2. Le deuxième domaine kinase appartient à la famille des CAMK (Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase) (Swulius and Waxham 2008) et est situé dans la partie C-terminale des RSK. Par ailleurs, les RSK font partie d'un sous-groupe de la famille des CAMK appelé les MAPKAPK (Mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase), comprenant MSK1/2 (Mitogen and stress-activated protein kinases 1/2) (Reyskens and Arthur 2016), MNK (MAPK-interacting protein kinases 1/2) (Joshi and Plataniias 2014), MK2/3 (MAPK-activated protein kinase 2/3) (Ronkina, Kotlyarov, and Gaestel 2008) et MK5 (MAPK-activated protein kinase 5) (Perander, Keyse, and Seternes 2008). Les protéines de ce groupe sont toutes activées par différentes MAPK et partagent plusieurs homologues dans leurs domaines kinases (Cargnello and Roux 2011). Étrangement, bien que le domaine kinase N-terminal des RSK phosphoryle plusieurs substrats, le domaine kinase C-terminal ne semble être impliqué que dans l'autophosphorylation de RSK (Bjorbaek, Zhao, and Moller 1995). Aucune étude à ce jour n'a permis de révéler une autre fonction de ce domaine kinase. Les deux domaines kinases N- et C-terminal sont connectés par une région de liaison d'une centaine d'acides aminés primordiale à l'activation des RSK et conservée chez plusieurs kinases de la famille AGC (Pearce, Komander, and Alessi 2010). De plus, les isoformes de RSK contiennent un motif KIM (Kinase Interaction Motif) situé au niveau de leur queue C-terminale (Smith et al. 1999). Ce motif est relativement similaire au domaine de liaison D et correspond à un résidu hydrophobe suivi par deux résidus lysine ou arginine (Leu-Xaa₂-Lys/Arg-Lys/Arg-

Xaa₅-Leu). Ce domaine va permettre l'ancrage des protéines ERK1/2 sur les kinases RSK et entraîner l'activation de ces dernières (Gavin and Nebreda 1999). Aussi, à l'extrémité C-terminale de chaque RSK on retrouve un motif de liaison aux domaines PDZ constitué de quatre acides aminés (Ser-Thr-Xaa-Leu). Ce motif est spécifique à chaque RSK et semble ainsi permettre des interactions avec des protéines à domaines PDZ (Thomas et al. 2005). Enfin, on peut noter que RSK3 possède une particularité puisqu'on retrouve chez cette isoforme un motif de localisation nucléaire classique Lys-Lys-Xaa₁₀-Leu-Arg-Arg-Lys-Ser-Arg dans sa séquence N-Terminale (Zhao et al. 1995). Cependant, la fonctionnalité de ce domaine n'a jamais été testée.

Finalement, des protéines orthologues des kinases RSK chez *Caenorhabditis elegans* (*rskn-1* et *rskn-2*) (Okuyama et al. 2010) et *Drosophila melanogaster* (RPS6-protein kinase-II) (Putz et al. 2004) ont été identifiées, partageant environ 50% d'homologie avec la séquence d'acides aminés de RSK1 humaine et possédant aussi les deux domaines kinases. Aucun orthologue chez la levure ou les plantes n'a été identifié.

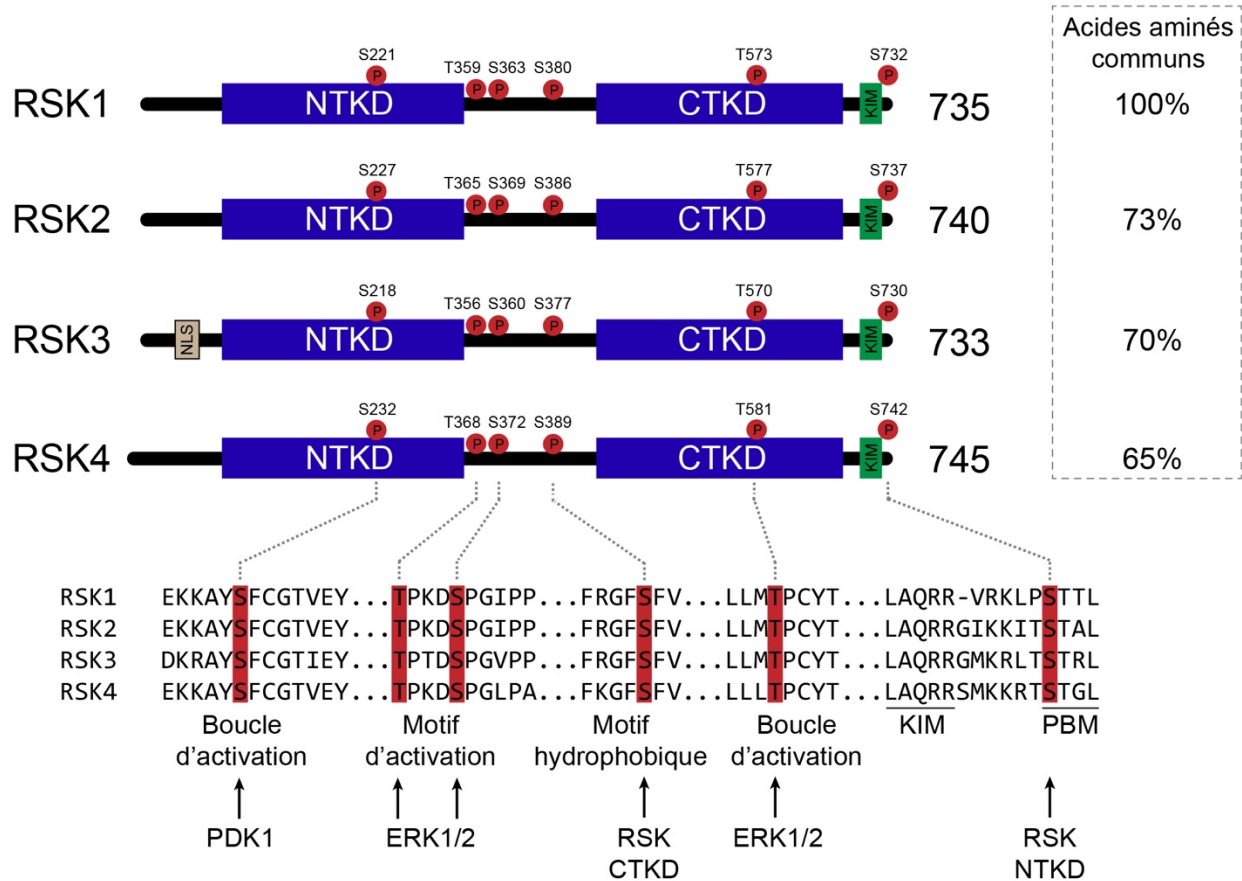


Figure 3 : Caractéristiques structurales des kinases RSK1-4

Les protéines kinases RSK1-4 sont caractérisées par la présence de deux domaines fonctionnels, le domaine kinase N-terminal (NTKD) et le domaine kinase C-terminal (CTKD), qui sont reliés par une région de liaison. Les extrémités C-terminales contiennent un domaine d'ancrage KIM des kinases ERK1/2. L'extrémité C-terminale comprend aussi un motif de liaison aux domaines PDZ (PBM). De plus, RSK3 contient un signal de localisation nucléaire (NLS) dans sa région N-terminale. L'activation des kinases RSK est associée à une phosphorylation sur plusieurs résidus (représentée au niveau de leur position respective). En bas, les sites de phosphorylation conservés nécessaires à l'activation RSK sont encadrés et les kinases responsables de la phosphorylation sont listées. À droite, le pourcentage d'identité en acides aminés pour chacune des isoformes se rapporte à la protéines RSK1 humaine. (Adapté de Houles and Roux 2018)

1.5.3 Expression tissulaire

Bien que possédant de nombreux points communs, plusieurs évidences démontrent que les quatre isoformes RSK1-4 semblent avoir un patron d'expression différents entre elles (Figure 4). Tout d'abord, bien que les gènes *RPS6KA1* et *RPS6KA2* ne codent que pour un transcrit, des analyses montrent que les gènes *RPS6KA3* et *RPS6KA6* ont respectivement un et deux transcrits alternatifs (Zeniou et al. 2002; Yntema et al. 1999). De plus, des études de l'ARN messager (ARNm) des RSK chez l'humain et la souris révèlent que l'isoforme RSK4 est beaucoup moins exprimée que les trois autres. L'ARNm de RSK1 est abondant dans les poumons, les reins et le pancréas alors que RSK2 et RSK3 sont présents dans les muscles squelettiques, le cœur et le pancréas (Alcorta et al. 1989; Moller et al. 1994; Zhao et al. 1995; Zeniou et al. 2002). Par ailleurs, bien que ces trois isoformes semblent fortement exprimées dans le cerveau, on note cependant quelques spécificités. RSK1 est enrichie dans le cervelet tandis que l'isoforme RSK2 est présente dans le cervelet mais aussi le néocortex et l'hippocampe. RSK3 est également très abondante dans le système nerveux central, avec une expression élevée de l'ARNm dans le cortex cérébral, le gyrus denté et l'amygdale. Enfin, à des niveaux d'expression très réduit, on retrouve l'ARNm de l'isoforme RSK4 dans le cerveau, le rein, le pancréas ainsi que dans le placenta (Yntema et al. 1999).

Des études développementales effectuées chez la souris ont aussi permis de déterminer le niveau d'expression et la localisation des différentes isoformes dans les embryons. Ainsi, alors que l'ARNm de RSK2 semble exprimé uniquement dans les somites, l'ARNm de RSK1 semble beaucoup plus abondant durant l'embryogenèse (Zeniou et al. 2002; Kohn et al. 2003). En effet, on le retrouve à un haut niveau dans les cellules du neuro-épithélium au niveau du tube neural en formation. Par ailleurs, à un stade plus avancé du développement, l'ARNm de RSK1 est grandement exprimé dans des organes dont les cellules prolifèrent abondamment tels que le foie, les poumons, le thymus ainsi que dans l'épithélium olfactif et intestinal. L'isoforme RSK3 semble être plutôt largement exprimée chez l'embryon au niveau de la zone ventriculaire ainsi que dans le tissu neuro-épithélial plus tard dans le développement (Zeniou et al. 2002).

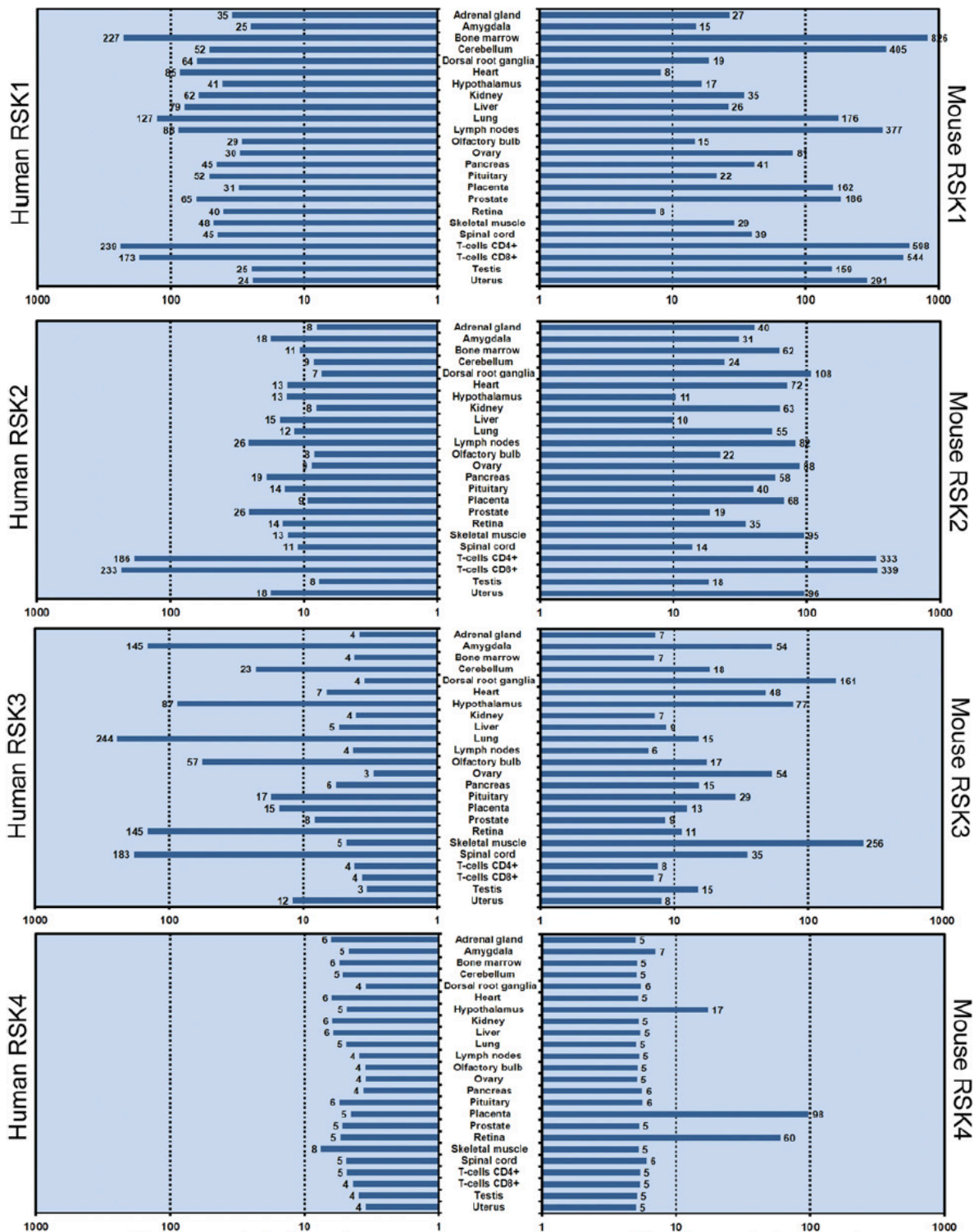


Figure 4 : Patron d'expression des ARNm codant pour les protéines RSK1-4 dans les tissus humains et de souris

Expression relative des ARNm RSK1-4 dérivés des intensités de fluorescence de multiples sondes pour chaque transcrite sur des puces Affymetrix. Les valeurs d'intensité ont été résumées en utilisant l'algorithme de traitement de données gcrma, et les données ont été extraites de la base de données BioGPS. (Extrait de Romeo, Zhang, and Roux 2012)

Enfin, l'isoforme RSK4 est exprimée de manière soutenue à travers le fœtus et semble spécifiquement enrichie dans le tissu extra-embryonnaire lors du développement chez la souris (Kohn et al. 2003; Myers et al. 2004).

1.5.4 Localisation cellulaire

Au niveau cellulaire, plusieurs travaux montrent que les isoformes RSK1-3 sont localisées dans le cytoplasme et semblent en partie relocalisées dans le noyau après leur activation (Zhao et al. 1995; Chen, Sarnecki, and Blenis 1992; Sulzmaier et al. 2016). En étudiant l'isoforme RSK1, il a été montré que cette kinase nécessite un passage à la membrane plasmique pour une activation complète avant d'être localisée au niveau du noyau (Richards et al. 2001). La protéine RSK4 est un cas particulier puisque cette isoforme semble être constamment localisée dans le cytoplasme même après son activation (Dummler et al. 2005). Le mécanisme par lequel les kinases RSK1-3 sont relocalisées dans le noyau après leur activation nécessite des études supplémentaires pour comprendre ce phénomène. Cependant, une étude suggère que la localisation de l'isoforme RSK1 dans le noyau est régulée par son interaction avec les protéines PKA (Protéine kinase A) et AKAP95 (A-kinase anchor protein 95) (Gao, Chaturvedi, and Patel 2012). Par ailleurs, l'interaction de l'isoforme RSK2 avec la protéine PEA-15 (Prolifération And Apoptosis Adaptor Protein 15) semble inhiber son transport au noyau (Vaidyanathan and Ramos 2003), indiquant différents mécanismes alternatifs régulant la relocalisation des kinases RSK au niveau nucléaire. De plus, il semblerait que la localisation des kinases RSK ne soit pas uniquement cytoplasmique. En effet, un groupe de recherche montre une localisation spécifique des kinases RSK2-3 au niveau des microtubules notamment lors de la mitose dans des fibroblastes murins immortalisés (Willard and Crouch 2001). Aussi, en interagissant avec la protéine TIA-1 (T-cell-restricted intracellular antigen-1), l'isoforme RSK2 est retrouvée au niveau des granules de stress dans des cellules tumorales mammaires humaines (Eisinger-Mathason et al. 2008). Ainsi, la localisation des kinases RSK paraît spécifique à l'isoforme mais aussi dépendante de leur activation et du type cellulaire étudié.

1.5.5 Mécanismes d'activation

L'activation des protéines RSK est un mécanisme assez complexe nécessitant l'apport de plusieurs kinases entraînant une série de phosphorylations sur plusieurs de leurs résidus (Figure 5). Toutes les isoformes RSK, y compris les orthologues de RSK chez *Caenorhabditis elegans* et *Drosophila melanogaster*, contiennent les quatre sites de phosphorylation essentiels (Ser221, Ser363, Ser380 et Thr573 chez l'isoforme RSK1 humaine) à l'activation complète des RSK (Dalby et al. 1998).

Ainsi, le modèle d'activation des RSK est plutôt bien défini. Tout d'abord, après leur liaison sur le domaine KIM, les kinases ERK1/2 phosphorylent la boucle d'activation du domaine kinase C-terminal sur le résidu Thr573 (Sutherland, Campbell, and Cohen 1993). Par ailleurs, ERK1/2 phosphorylent aussi les résidus Thr359 et Ser363 situés dans la région de liaison entre les deux domaines kinases (Dalby et al. 1998). Alors que la phosphorylation en Ser363 semble stimuler l'activité catalytique du domaine kinase N-terminal, la phosphorylation en Thr573 contribue à la translocation des RSK à la membrane plasmique et va permettre l'autophosphorylation des RSK en Ser380 *via* le domaine kinase C-terminal (Vik and Ryder 1997). La phosphorylation en Ser380 permet de créer un site d'ancrage pour la kinase PDK1 (3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1) (Frodin et al. 2000), qui une fois attachée aux RSK, phosphoryle la Ser221 dans la boucle d'activation du domaine kinase N-terminal et entraîne l'activation complète des RSK (Richards et al. 1999; Jensen et al. 1999). Par la suite, cette activation est maintenue grâce à un changement conformationnel du domaine kinase N-terminal des RSK. En effet, une fois PDK1 dissociée des RSK, la Ser380 phosphorylée interagit avec le site d'ancrage au phosphate dans le domaine kinase N-terminal, entraînant une association stable entre le motif et la poche hydrophobique de ce domaine kinase (Frodin et al. 2002). Des études structurales additionnelles laissent cependant penser que la conformation du domaine kinase N-terminal des RSK une fois activé soit plus complexe que décrit précédemment, demandant ainsi des travaux plus approfondis pour décrire ce processus (Ikuta et al. 2007; Malakhova et al. 2009). Finalement, après l'activation complète, une autophosphorylation de RSK dans sa queue C-terminale arrête l'interaction entre RSK et ERK1/2 (Roux, Richards, and Blenis 2003). Ceci ne semble pas être le cas pour l'isoforme RSK3, qui apparaît lié à ERK1/2 de manière constante.

Plusieurs éléments importants sont aussi à noter dans le processus d'activation des kinases RSK. Comme mentionné précédemment, la Ser221 est phosphorylée par la kinase PDK1, aussi impliquée dans la phosphorylation et l'activation d'autres kinases de la famille AGC, notamment Akt, SGK et S6K (Gagliardi, Puliafito, and Primo 2018). De ce fait, dans des cellules n'exprimant pas la kinase PDK1, les isoformes RSK1-3 ne peuvent pas être activées (Williams et al. 2000). Par ailleurs, bien que l'activation de la kinase Akt par PDK1 nécessite le domaine PH de cette dernière, l'activation de RSK1-3 est toujours possible sans ce domaine fonctionnel qui se lie à la membrane cellulaire (Jensen et al. 1999). Ainsi, l'activation des kinases RSK ne semble pas être dépendante des domaines membranaires PIP₃ et l'inhibition de la kinase PI3K (Phosphoinositide 3-kinase) n'affecte pas l'activité des RSK (Ray-David et al. 2013; Houles et al. 2018). De plus, alors que PDK1 est requis pour l'activation des isoformes RSK1-3, l'isoforme RSK4 ne semble pas nécessiter PDK1 et montre un haut niveau d'activité basale (Dummler et al. 2005). Finalement, il semblerait que l'interaction entre PDK1 et son site d'ancrage sur l'isoforme RSK2 augmente le niveau d'activation de la kinase PDK1, suggérant que cette interaction puisse activer RSK mais aussi PDK1 (Frodin et al. 2000).

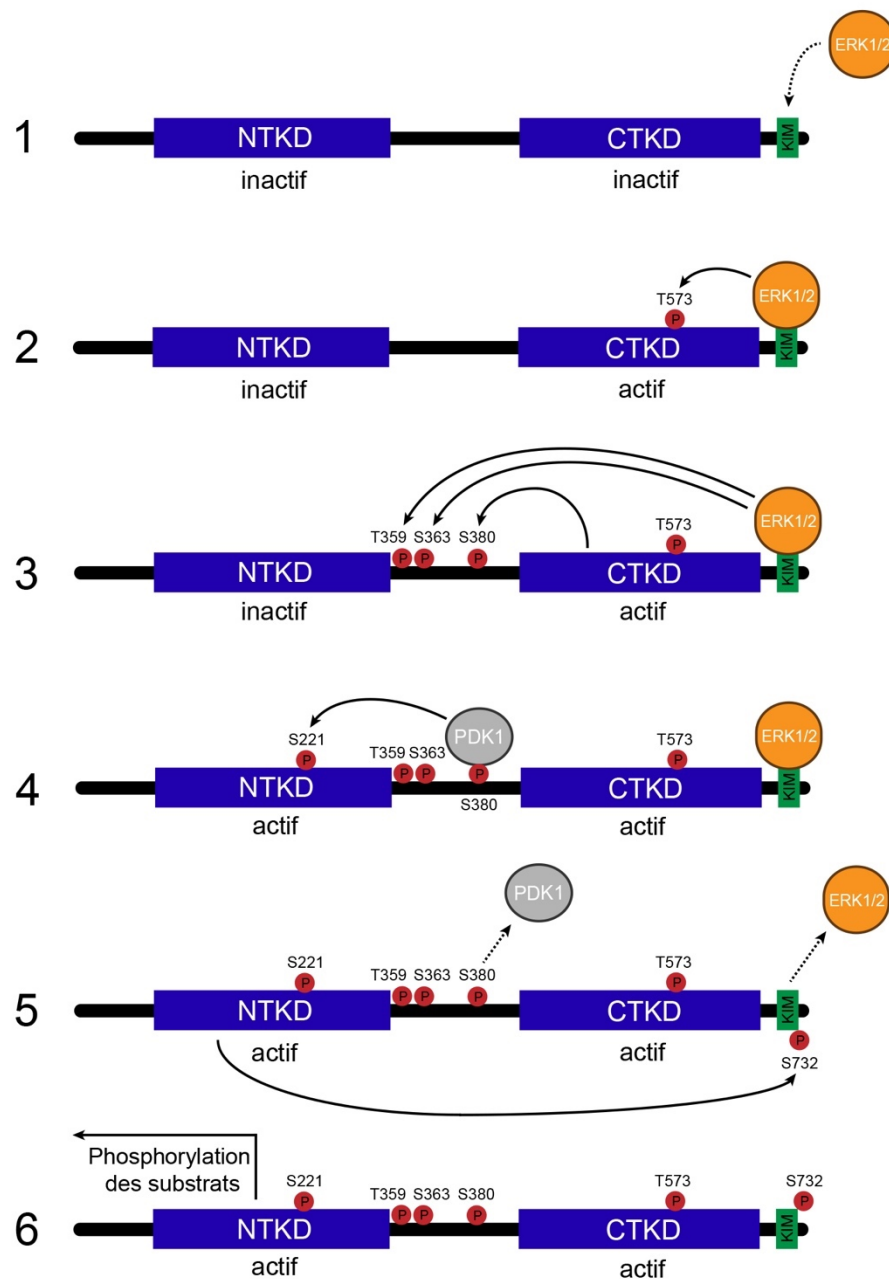


Figure 5 : Mécanisme d'activation séquentielle des kinases RSK1-4

(1) Le motif KIM sur les kinases RSK favorise l'interaction avec les protéines ERK1/2 et entraîne l'activation des RSK. (2) Les kinases ERK1/2 phosphorylent le résidu Thr573 dans le CTKD des RSK. (3) Ensuite, le CTKD activé autophosphoryle RSK au niveau de son motif hydrophobe, sur la Ser380. ERK1/2 phosphorylent aussi la Thr359 et la Ser363 dans la région entre le NTKD et le CTKD. (4) Après quoi, la kinase PDK1, se lie au motif hydrophobe phosphorylé et phosphoryle à son tour la Ser221 dans la séquence de la boucle d'activation du NTKD, entraînant une activation complète des protéines RSK. (5) Ceci est suivi par une autophosphorylation de la Ser737 par le NTKD qui entraîne la dissociation de ERK1/2 du motif KIM. (6) Enfin, les kinases RSK activées phosphorylent leurs substrats en utilisant leur NTKD. (Adapté de Romeo, Zhang, and Roux 2012)

1.5.6 Mécanismes d'activation alternatifs

Malgré un mécanisme d'activation assez bien décrit aujourd'hui, plusieurs évidences laissent penser que les kinases RSK puissent aussi être activées de manières alternatives. En effet, certaines études démontrent que l'isoforme RSK2 est phosphorylée par le biais des protéines FGFR2/3 (Fibroblast growth factor receptor 2/3), Src (Proto-oncogene tyrosine-protein kinase Src) et Fyn (Proto-oncogene tyrosine-protein kinase Fyn) sur son résidu tyrosine 529 (Kang et al. 2007; Kang et al. 2008; Czaplinska et al. 2014). Cette phosphorylation à l'intérieur du domaine kinase C-Terminal semble stabiliser l'association entre RSK2 et ERK1/2, augmentant ainsi l'activité de RSK2. Par ailleurs, dans plusieurs types cellulaires la sérine 380 nécessaire à l'activation des RSK peut être phosphorylée par l'enzyme p38 via les kinases MK2/3 (Zaru et al. 2007; Zaru et al. 2015). Des suggestions ayant déjà été émises sur la dépendance du domaine kinase C-terminal des RSK dans l'activation de ces dernières (Cohen, Hadjivassiliou, and Taunton 2007), ces résultats viennent donc corroborer l'hypothèse d'un mécanisme alternatif et indépendant du domaine kinase C-terminal pour activer les kinases RSK dans certains contextes cellulaires.

1.5.7 Fonctions

Depuis leur découverte, les kinases RSK ont beaucoup été étudiées dans le but d'élucider leurs fonctions. Aujourd'hui encore, le rôle spécifique de chaque isoforme ne semble pas clairement caractérisé. Cependant, de nombreuses recherches ont permis d'identifier des fonctions biologiques vitales contrôlées par les protéines RSK mais aussi les mécanismes moléculaires sous-jacents, notamment la phosphorylation de différents substrats caractéristiques.

1.5.7.1 Reconnaissance des substrats

À l'origine, une première étude a déterminé la spécificité des substrats phosphorylés par RSK en utilisant des peptides synthétiques (Leighton et al. 1995). Le motif minimum Arg/Lys-Xaa-Arg-Xaa-Xaa-pSer/Thr ou Arg-Xaa-Xaa-pSer/Thr a ensuite été confirmé comme étant nécessaire pour une phosphorylation par les kinases RSK (Galan et al. 2014). Par ailleurs, RSK semble nettement préférer les résidus arginine comparé aux résidus lysine, ce qui corrobore avec la majorité des substrats RSK identifiés à ce jour

(Romeo, Zhang, and Roux 2012). De plus, des analyses ont également indiqué que les kinases RSK ont une préférence à phosphoryler les résidus sérine plutôt que thréonine, la majorité des substrats RSK identifiés à ce jour ayant un résidu sérine comme site phosphoaccepteur (Figure 6) (Romeo, Zhang, and Roux 2012). Dans l'ensemble, très peu de substrats supposés se sont révélés être phosphorylés sur les résidus thréonine, jetant un doute quant à savoir si ces protéines sont de véritables substrats des kinases RSK dans la cellule. Enfin, il est nécessaire de prendre en compte le fait que RSK partage son motif de phosphorylation avec d'autres kinases de la famille AGC comme Akt ou S6K (Moritz et al. 2010), suggérant que ces kinases peuvent partager les mêmes substrats.

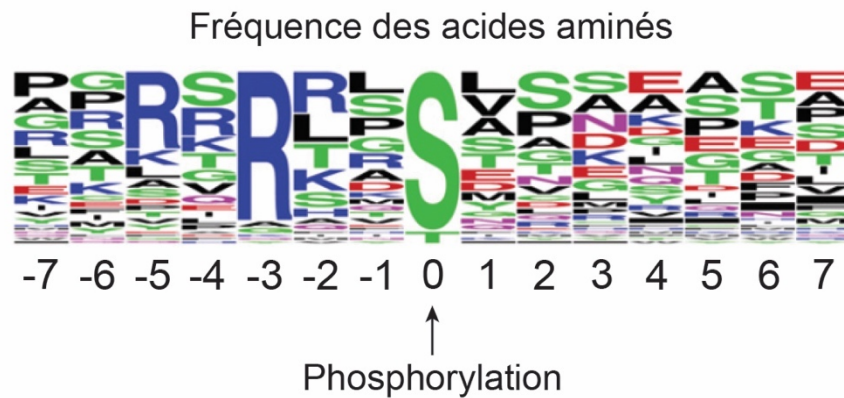


Figure 6 : Fréquence WebLogo des séquences cibles pour les substrats des kinases RSK connus

Les sites de phosphorylation des kinases RSK dans leurs substrats montrent une forte préférence pour les résidus d'arginine dans les positions -5 et -3 par rapport au site phosphoaccepteur indiqué par une flèche. Ce dernier est plus souvent un résidu sérine, car très peu de substrats RSK validés à ce jour se sont révélés phosphorylés sur des résidus thréonine. (Adapté de Romeo, Zhang, and Roux 2012)

1.5.7.2 Activité transcriptionnelle

Une des fonctions importantes des kinases RSK est le contrôle de l'expression des gènes, notamment en phosphorylant plusieurs facteurs de transcriptions spécifiques et en régulant ainsi leur activité. Des études montrent en effet que RSK1 et RSK2 phosphorylent le facteur de transcription CREB (cAMP response element-binding protein) entraînant l'expression de plusieurs gènes (Xing, Ginty, and Greenberg 1996; Bonni et al. 1999;

Kwon et al. 2000). L'activation de cette protéine ainsi que celles du complexe Elk1/SRF (ETS domain-containing protein Elk-1/Serum response factor) permet par exemple la transcription du gène *c-fos* (De Cesare et al. 1998; Bruning et al. 2000). De plus, l'isoforme RSK1 phosphoryle les protéines SRF (Rivera et al. 1993), c-Fos (Proto-oncogene c-Fos) (Chen, Abate, and Blenis 1993), mais aussi Nur77 (Nuclear receptor subfamily 4 group A member 1) (Davis et al. 1993; Wingate et al. 2006), qui sont toutes des facteurs de transcription impliqués dans l'expression de gènes à réponse immédiate essentiels à la cellule (Bahrami and Drablos 2016). D'après les travaux additionnels d'un groupe de recherche, la régulation de c-Fos par RSK serait aussi importante dans le développement osseux (David et al. 2005; Bakiri et al. 2011).

Par ailleurs, d'autres facteurs de transcriptions sont régulés par les kinases RSK. L'isoforme RSK1 entraîne la dégradation des protéines I κ B α et I κ B β (NF- κ B inhibitor α/β) en les phosphorylant (Ghoda, Lin, and Greene 1997; Schouten et al. 1997; Xu et al. 2006). Ces dernières étant des inhibiteurs du facteur de transcription NF- κ B (nuclear factor- κ B), RSK1 augmente ainsi l'activité de cette protéine. Il est aussi suggéré que RSK phosphoryle la protéine p65, une sous unité du complexe NF- κ B, pour favoriser son activation (Bohuslav et al. 2004; Zhang, Cheng, et al. 2005; Zhang, Ma, et al. 2005). De même, l'isoforme RSK1 s'associe et phosphoryle le récepteur à l'œstrogène alpha pour accroître son activité transcriptionnelle (Joel et al. 1998; Yamnik and Holz 2010). La protéine YB-1 (Y-box binding protein-1) est aussi phosphorylée par RSK1/2 (Stratford et al. 2008; Tiwari et al. 2018). Bien que cette enzyme exerce plusieurs fonctions dans la cellule, c'est un facteur de transcription actif dont la localisation semble modulée par les kinases RSK, notamment dans les cellules cancéreuses. Enfin, RSK1 phosphoryle le facteur de transcription MITF (Microphthalmia-associated Transcription Factor), un élément qui semble important dans le développement des mélanomes (Wu et al. 2000). Ainsi, tout comme leurs activateurs ERK1/2, les kinases RSK sont considérées comme des régulateurs importants de l'expression des gènes à travers des mécanismes directs ou indirects. Une étude a même estimé que RSK régule jusqu'à 20% de l'expression génique contrôlée par le module ERK1/2 (Doehn et al. 2009).

1.5.7.3 Croissance cellulaire et synthèse protéique

Au cours des dernières décennies, plusieurs études mettent en avant l'implication des kinases RSK dans l'activation de la synthèse protéique, régulant ainsi la croissance cellulaire. En effet, il a été montré que RSK phosphoryle plusieurs éléments importants dans la synthèse des protéines dont la sous unité ribosomal rpS6 (Pende et al. 2004; Roux et al. 2007), régulant ainsi l'assemblage du complexe de pré-initiation de la traduction, mais aussi la protéine TSC2 (Tuberous sclerosis 2 protein) (Roux et al. 2004; Rolfe et al. 2005), un inhibiteur de la protéine kinase mTOR (mammalian target of rapamycin). En phosphorylant TSC2, RSK va empêcher cette protéine d'inhiber mTOR et ainsi permettre la traduction de protéines. Les kinases RSK entraînent aussi l'activation de mTOR en phosphorylant la protéine Raptor (Regulatory-associated protein of mTOR), un membre important du complexe mTORC1 (mTOR complex 1) (Carriere, Cargnello, et al. 2008). Par ailleurs, la protéine GSK3 (Glycogen synthase kinase-3) est un substrat connu des kinases RSK (Sutherland, Leighton, and Cohen 1993; Angenstein, Greenough, and Weiler 1998). Après sa phosphorylation par RSK, cette kinase inhibitrice est désactivée et ses substrats dont le facteur d'initiation de la traduction eIF2B (Eukaryotic Initiation Factor 2 GEF) sont alors fonctionnels (Wang et al. 2002). De plus, RSK phosphoryle la protéine kinase LKB1 (Liver kinase b1) et inhibe son activité (Zheng et al. 2009). Ainsi, comme des études montrent l'importance des protéines GSK3 et LKB1 dans l'activation de la protéine inhibitrice TSC2 (Shaw et al. 2004; Inoki et al. 2006), on peut donc suggérer que les kinases RSK permettent aussi l'activation de mTOR par l'inhibition de GSK3 et LKB1. Finalement, RSK promeut aussi la synthèse protéique en phosphorylant la kinase eEF2 (Elongation factor 2) et le facteur d'initiation de la traduction eIF4B (eukaryotic translation initiation factor 4B) (Wang et al. 2001; Shahbazian et al. 2006).

1.5.7.4 Prolifération et cycle cellulaire

Les kinases RSK ont un impact non négligeable sur le déroulement du cycle cellulaire et la prolifération des cellules. Précédemment dans cette introduction, il a été expliqué que RSK phosphoryle le facteur de transcription c-Fos pour stabiliser son expression mais aussi la kinase GSK3 pour inhiber son activité. La phosphorylation de c-Fos a un rôle important sur la succession des étapes du cycle cellulaire puisque ce facteur

de transcription régule l'expression de la cycline D1 durant la phase G1 (Brown et al. 1998). La kinase GSK3 elle, va entraîner la dégradation des protéines c-Myc et cycline D1 (Diehl et al. 1998; Kotliarova et al. 2008). Ainsi, son inhibition par la phosphorylation de RSK permet à la cellule de proliférer en facilitant la progression du cycle cellulaire. De même, RSK2 phosphoryle la protéine Cdc25C (M-phase inducer phosphatase 3) qui va activer la kinase CDK1 (Cyclin-dependent kinase 1) liée à la cycline B (Wang, Jung, et al. 2010), et RSK1/2 phosphorylent et stoppent l'activité de p27^{kip1} (Fujita, Sato, and Tsuruo 2003; Larrea et al. 2009), un inhibiteur de la kinase CDK2 (Cyclin-dependent kinase 2). Par le biais de ces deux substrats, les kinases RSK régulent donc directement l'évolution du cycle cellulaire. De plus, RSK contrôle la prolifération cellulaire en entraînant la dégradation de la protéine Mad1 (Mitotic spindle assembly checkpoint protein), un régulateur négatif de l'activité transcriptionnelle et proliférative de Myc (Zhu, Blenis, and Yuan 2008). Finalement, les kinases RSK semblent contrôler négativement l'efficacité des points de contrôle au cours du cycle cellulaire en phosphorylant les protéines Chk1 (Cell cycle checkpoint kinase 1) et Mre11 (Meiotic recombination 11), permettant notamment aux cellules de mélanomes de proliférer (Ray-David et al. 2013; Chen et al. 2013).

1.5.7.5 Survie cellulaire

Certains travaux démontrent aussi que RSK1 et RSK2 régulent la survie cellulaire de manière positive. Comme mentionné précédemment, ces deux isoformes phosphorylent le facteur de transcription CREB et permettent ainsi la transcription de gènes favorisant la survie cellulaire (Walton et al. 1999; Arany et al. 2005; Gubbay et al. 2006). Il en est de même avec la régulation du facteur de transcription NF- κ B (Luo, Kamata, and Karin 2005). Par ailleurs, l'isoforme RSK1 est connue pour phosphoryler la protéine Bad (Bcl-2-associated death promoter) et inhiber sa fonction pro-apoptotique (Bonni et al. 1999; Shimamura et al. 2000). Deux autres substrats des kinases RSK jouent aussi un rôle dans la survie cellulaire. Tout d'abord, RSK1 et RSK2 phosphorylent la protéine DAPK (Death-associated protein kinase), un suppresseur de tumeur réprimé dans plusieurs cancers (Lin, Hupp, and Stevens 2010). Cette phosphorylation inactive les propriétés pro-apoptotique de cette protéine et augmente la survie cellulaire (Anjum et al. 2005). Enfin, RSK1 phosphoryle aussi la protéine C/EBP β (CCAAT-enhancer-binding protein), créant sur cette

dernière un site d'attache pour les protéines caspases 1 et 8 (cysteine-aspartic protease 1/8), inhibant ainsi leur activité (Buck et al. 2001).

1.5.7.6 Adhésion cellulaire et motilité

Finalelement, plusieurs études indiquent que RSK aurait un impact sur l'adhésion cellulaire et la motilité, notamment en régulant le cytosquelette d'actine (Sulzmaier and Ramos 2013). Une première étude montre en effet que RSK1 et RSK2 sont responsable de la transcription de plusieurs gènes impliqués dans la motilité cellulaire et l'invasion (Doehn et al. 2009). Ces deux isoformes sont alors décrites comme des éléments importants de la transition épithélio-mésenchymateuse (EMT). De plus, une seconde étude démontrant que l'inhibition des kinases RSK entraîne une baisse de la migration cellulaire vient confirmer le rôle de ces protéines dans ce processus biologique (Smolen et al. 2010). Par ailleurs, deux groupes de recherche ont identifié la filamine A, une protéine se fixant sur l'actine pour la stabiliser, comme un substrat de RSK1 et RSK2 (Woo et al. 2004; Gawecka et al. 2012). Cette phosphorylation supprime l'activation des intégrines ainsi que l'adhésion cellulaire et augmente ainsi la migration des cellules, notamment pour les cellules de mélanomes. Enfin, RSK semble phosphoryler et inactiver la protéine SH3BP2 (SH3 domain-binding protein 2), un régulateur négatif de la motilité cellulaire (Tanimura et al. 2011). Ainsi, en régulant la transcription de certains gènes ou la phosphorylation de protéines spécifiques, les kinases RSK réduisent l'adhésion cellulaire tout en augmentant la migration.

1.5.7.7 Métabolisme

Bien que la plupart des substrats identifiés pour les protéines RSK sont impliqués dans des processus biologiques tels que la prolifération, la croissance et la survie cellulaire ainsi que la migration, l'identification d'autres substrats des RSK suggère une implication de ces kinases dans des processus biologiques différents. En effet, des recherches démontrent que l'isoforme RSK2 phosphoryle la protéine membranaire NHE1 (sodium-hydrogen antiporter 1) et régule l'échange des ions Na^+/H^+ mais aussi le pH intracellulaire (Takahashi et al. 1999; Luo et al. 2007; Chen and Mackintosh 2009). De même, la protéine AS160 (Akt substrate of 160 kDa) a été identifiée comme un substrat des RSK (Geraghty et al. 2007). AS160 est impliquée dans la translocation de la protéine GLUT4 (Glucose

transporter type 4), un important transporteur du glucose à travers les muscles et le tissu adipeux. Par ailleurs, une étude a récemment montré que les kinases RSK phosphorylent et activent la protéine PFKFB2 (6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-biphosphatase 2), une enzyme régulatrice de la glycolyse (Houles et al. 2018). Les kinases RSK semblent aussi réguler le métabolisme du glucose en contrôlant la voie de signalisation de l'insuline par la phosphorylation de la protéine IRS-1 (Insulin receptor substrate 1), une enzyme adaptatrice des récepteurs à l'insuline (Smadja-Lamere et al. 2013). Ainsi, par l'identification de ces différents substrats, l'implication des protéines RSK dans le contrôle du métabolisme cellulaire semble évidente, notamment dans la respiration oxydative des cellules cancéreuses. L'impact des kinases RSK dans ce processus est d'autant plus confirmée par la régulation qu'elles exercent sur l'activité de la protéine GSK3, une kinase importante dans la glycogénèse (Jope, Yuskaitis, and Beurel 2007).

1.5.7.8 Rétroaction négative

Plusieurs études soulignent aussi l'impact des kinases RSK sur l'activation de la voie de signalisation Ras/MAPK. Les kinases RSK, lorsqu'elles sont activées, forment une boucle de rétroaction négative sur cette voie de signalisation et entraînent ainsi une baisse de l'activité du module ERK1/2. Ce phénomène a été identifié dans des souris knock-out pour le gène *RPS6KA3* codant pour la protéine RSK2, qui possèdent une plus grande activité des kinases ERK1/2 comparé aux souris sauvages exprimant RSK2 (Dufresne et al. 2001). Chez la drosophile, la délétion de l'orthologue des kinases RSK semble aussi augmenter le niveau d'activité des protéines ERK1/2 (Kim et al. 2006). La phosphorylation de la protéine GEF SOS1 impliquée dans l'activation de la petite GTPase Ras par RSK serait un des mécanismes moléculaires responsables de cette boucle de rétroaction négative (Douville and Downward 1997; Saha et al. 2012). Ainsi, de par leur activation, les kinases RSK semblent exercer une régulation permanente sur l'activité de la voie Ras/MAPK.

1.5.7.9 Régulations physiologiques

Les régulations physiologiques des kinases RSK ont commencé à être étudiées après l'identification du rôle de l'isoforme RSK2 dans le syndrome de Coffin-Lowry. En effet, on retrouve chez la majorité des patients atteints de ce syndrome des mutations dans le gène *RPS6KA3*, qui code pour la protéine RSK2 (Trivier et al. 1996; Hanauer and Young

2002). Environ 30% de ces mutations sont des mutations faux sens, 20% des mutations non-sens, 20% sont dues à des erreurs d'épissage et 30% sont des petites délétions ou insertions rendant ainsi la protéine RSK2 non fonctionnelle ou tronquée. Le syndrome de Coffin-Lowry est une maladie liée au chromosome X caractérisée par un retard mental chez les patients masculins, ainsi que des problèmes psychomoteurs et des malformations squelettiques (Pereira et al. 2010; Lange, Stone, and Aftimos 2010). Bien souvent, on retrouve aussi chez ces patients une baisse du volume total du cerveau, le cervelet et l'hippocampe étant particulièrement touchés (Kesler et al. 2007). Les patients féminins sont beaucoup moins touchés et il est difficile d'établir un diagnostic chez ces derniers. Les symptômes observés chez les patients coïncident avec les observations faites chez la souris knock-out pour le gène codant la protéine RSK2. En effet, ces souris montrent des défauts dans l'apprentissage et des troubles cognitifs, ainsi qu'une plus petite taille que les souris sauvages exprimant RSK2 (Poirier et al. 2007). Par ailleurs, plusieurs études suggèrent que RSK2 est impliquée dans le développement cranio-facial mais aussi dans la neurogénèse chez la souris (Dugani et al. 2010; Laugel-Haushalter et al. 2014; Castillon et al. 2018). Il est aussi intéressant de noter que l'expression des autres isoformes RSK ainsi que d'autres kinases de la famille AGC ne semble pas compenser l'effet observé par l'absence de RSK2.

Un groupe de recherche met aussi en avant le potentiel rôle de l'isoforme RSK3 dans le fonctionnement de l'activité cardiaque (Martinez et al. 2015). En effet, en utilisant des souris knock-out pour le gène codant pour RSK3, il a été montré que cette protéine serait impliquée dans l'insuffisance cardiaque et l'hypertrophie des cardiomyocytes (Passariello et al. 2013; Li et al. 2013; Passariello et al. 2016). Bien que le mécanisme moléculaire responsable de ce phénomène soit inconnu, il semblerait que ceci soit en partie dû à l'interaction entre RSK3 et la protéine musculaire mAKAP (muscle-specific A-kinase anchoring protein) (Michel et al. 2005).

Enfin, une étude suggère que le gène *RPS6KA6* codant pour l'isoforme RSK4 soit impliqué dans un syndrome de retard mental non lié au chromosome X (Yntema et al. 1999). Par ailleurs, la souris knock-out pour le gène *RPS6KA6* semble présenter de graves problèmes de développement (Cox et al. 2010), mais des études complémentaires sont nécessaires pour clairement établir le rôle de RSK4 dans ce processus biologique.

1.5.8 Implications et rôles des kinases RSK dans le cancer

De par la nature de leurs substrats régulant des fonctions biologiques telles que la prolifération, la survie ou encore la croissance cellulaire on pourrait facilement décrire les kinases RSK comme étant des éléments primordiaux dans le développement des cellules cancéreuses. Cependant, plusieurs groupes de recherche étudiant spécifiquement les quatre isoformes suggèrent que celles-ci ont des fonctions biologiques différentes. Alors que les isoformes RSK1 et RSK2 entraînent la croissance des cellules cancéreuses, les isoformes RSK3 et RSK4 semblent inhiber leur prolifération. En effet, RSK1 et RSK2 sont activées et parfois même surexprimées dans de nombreux cancers tels que le glioblastome (Sulzmaier et al. 2016), le mélanome (Romeo et al. 2013; Houles et al. 2018), le myélome multiple (Kang et al. 2007), la leucémie (Elf et al. 2011), le cancer du poumon (Abdulrahman et al. 2016; Poomakkoth et al. 2016), le cancer du sein (Smith et al. 2005; Cuesta and Holz 2016), le cancer de la prostate (Clark et al. 2005; Yu et al. 2015) mais aussi dans le carcinome épidermoïde de la tête et du cou (HNSCC) (Kang et al. 2010). Ainsi, dans plusieurs de ces cancers, l'inhibition de l'activité de RSK1 et RSK2 réduit la prolifération des cellules. Par ailleurs, l'expression de RSK2 semble promouvoir la transformation des cellules indépendamment de leur ancrage sous l'effet de différents mitogènes tel que le facteur de croissance épidermique (Cho et al. 2007). À l'inverse de RSK1 et RSK2, l'expression des isoformes RSK3 ou RSK4 est réduite dans différents types de cancers, comme le cancer des ovaires (Bignone et al. 2007), le cancer du sein (Thakur et al. 2008; Li et al. 2014), le cancer colorectal (Cai et al. 2014) et la leucémie myéloïde aiguë (Rafiee et al. 2016). Par ailleurs, des études rapportent que l'isoforme RSK4 est impliquée dans l'arrêt de la croissance cellulaire par un mécanisme dépendant de p53 (Berns et al. 2004), et qu'elle favorise aussi l'entrée des cellules en sénescence (Lopez-Vicente et al. 2009). Aussi, la délétion de la protéine RSK4 semble augmenter la prolifération des cellules d'adénocarcinome du sein (Zhu et al. 2015). Enfin, les protéines RSK3 et RSK4 sont impliquées dans la résistance aux inhibiteurs de la voie de signalisation PI3K dans des cellules de cancer du sein (Serra et al. 2013). Ainsi, les isoformes RSK1/2 et RSK3/4 semblent avoir des fonctions différentes et opposées dans la régulation des cellules cancéreuses. Les mécanismes régulés spécifiquement par RSK3 et RSK4 n'étant

pas connus à ce jour, des études plus approfondies sont donc nécessaires pour caractériser les fonctions moléculaires précises de ces isoformes.

1.5.9 Développement d'inhibiteurs des kinases RSK

Depuis quelques années, plusieurs types d'inhibiteurs dirigés contre les domaines kinases de RSK ont été identifiés (Nguyen 2008; Ludwik and Lannigan 2016). Le premier inhibiteur décrit a été le kaempferol glycoside SL0101 (Smith et al. 2005). Cet inhibiteur est un produit naturel isolé de la plante tropicale *Fosteronia refracta*. Il inhibe le domaine kinase N-terminal de RSK2 avec une CI50 (concentration inhibitrice médiane) de 89 nM (Utepbergenov et al. 2012). Alors que le SL0101 bloque l'activité des quatre isoformes RSK, d'autres protéines kinases semblent également inhibées à des concentrations plus élevées, y compris Aurora B et PIM3 (Proviral integration site for Moloney murine leukemia virus 3) (Bain et al. 2007). Finalement, plusieurs analogues de SL0101 ont été rapportés, mais certains d'entre eux semblent montrer des problèmes liés à la stabilité du composé et à une faible activité *in vivo*, limitant l'utilisation de ces composés (Hilinski et al. 2012; Ludwik et al. 2016).

Un autre inhibiteur de l'activité des kinases RSK est le BI-D1870, un composé de la famille des dihydroptéridinones (Sapkota et al. 2007). Cet inhibiteur est un antagoniste de l'ATP qui cible le domaine kinase N-terminal des quatre isoformes de RSK avec des valeurs de CI50 comprises entre 15 et 31 nM. Le BI-D1870 est très sélectif pour les protéines RSK par rapport aux autres kinases de type AGC (Bain et al. 2007). Bien qu'utilisé abondamment dans la littérature, ce composé semble cependant inhiber la kinase PLK1 (polo-like kinase 1) avec une puissance similaire (Bain et al. 2007). La protéine PLK1 étant essentielle dans le processus de la mitose, l'effet hors cible du BI-D1870 indique donc que ce composé ne peut pas être indiqué pour déterminer le rôle exact des RSK dans le cycle cellulaire et la prolifération des cellules. De plus, plusieurs autres protéines kinases sont également ciblées par le BI-D1870 à des concentrations plus élevées, notamment Aurora B, MELK (Maternal embryonic leucine zipper kinase), PIM3 et MST2 (Serine/threonine-protein kinase 3), ce qui explique probablement un grand nombre d'effets hors cible observés dans la littérature avec le composé BI-D1870 (Roffe et al. 2015). Récemment, deux dérivés du BI-D1870 ont été définis (LJH685 et LJI1308), ayant des valeurs de CI50 pour les différentes isoformes de RSK entre 4 et 13 nM (Aronchik et

al. 2014). Par ailleurs, ces composés semblent avoir moins d'effets hors cible que le BI-D1870, faisant de ces deux inhibiteurs de meilleurs outils pour des études *in vivo*.

Identifié la même année que le SL0101, un dérivé de pyrrolopyrimidine a été caractérisé comme un inhibiteur irréversible qui modifie de manière covalente le domaine kinase C-terminal des isoformes RSK1, RSK2 et RSK4 (Cohen et al. 2005). Ce composé, nommée FMK (Z-VAD-FMK, benzyloxycarbonyl-Val-Ala-DL-Asp-fluorométhylcétone), est un inhibiteur puissant et sélectif des kinases RSK, inhibant RSK2 avec une CI50 de 15 nM. D'après l'étude de ce composé, le FMK contient un motif fluorométhylcétone qui forme une liaison covalente avec la cystéine 436 située dans la poche de liaison ATP du domaine kinase C-terminal de RSK2 (Cohen et al. 2005). Néanmoins, malgré son mécanisme d'action plutôt spécifique, des concentrations plus élevées de FMK peuvent également inhiber l'activité des protéines S6K, Src mais aussi Lck (lymphocyte-specific protein tyrosine kinase) (Bain et al. 2007). Finalement, sachant qu'une fois le domaine kinase N-terminal de RSK activé le domaine C-terminal n'est plus nécessaire à l'activation de RSK, le FMK qui est dirigé contre le domaine kinase C-terminal ne sera plus utile pour inhiber les RSK dans certains cas.

Finalement, le dernier inhibiteur en date des kinases RSK est le BIX 02565 (Boyer et al. 2012; Kirrane et al. 2012). Ce composé est décrit pour cibler RSK2 avec une CI50 de 1.1 nM. À ce stade, on ne sait pas si le BIX 02565 inhibe les autres isoformes de RSK. L'inconvénient majeur de ce composé est qu'il est peu sélectif et s'avère également inhiber plusieurs kinases dont LRRK2 (Leucine-rich repeat kinase 2), RET (rearranged during transfection proto-oncogene), CLK2 (CDC-like kinase 2), FLT3 (fms like tyrosine kinase 3) mais encore PDGFR (Boyer et al. 2012; Kirrane et al. 2012). Enfin, il semblerait que le BIX 02565 puisse interagir avec au moins cinq récepteurs adrénergiques, conduisant à des diminutions dangereuses de la pression artérielle et de la fréquence cardiaque chez la souris (Fryer et al. 2012; Shi et al. 2016). L'utilisation de cet inhibiteur pour des études plus approfondies semble donc compromise.

2 Les jonctions cellulaires

Chez les métazoaires, les communications et les structures de liaison retrouvées entre chaque cellule sont nécessaires à l'organisation et la formation des tissus (Cereijido, Contreras, and Shoshani 2004). Pour les vertébrés, quatre formes principales de jonctions cellulaires ont été classées et leur composition moléculaire a été élucidée au cours des cinq dernières décennies. On retrouve ainsi les jonctions serrées, les jonctions communicantes, les desmosomes et les jonctions adhérentes (Figure 7). Chacune d'entre elles exerce des fonctions spécifiques et primordiales à l'agencement des tissus et des cellules.

2.1 Les jonctions serrées

Les premières études de microscopies électroniques ont permis de déterminer très tôt la structure des jonctions serrées (Stachelin, Mukherjee, and Williams 1969; Claude and Goodenough 1973; Montesano et al. 1975). Ainsi, on constate que ces jonctions sont formées de protéines transmembranaires qui vont se lier avec ces mêmes protéines d'une cellule adjacente. Ces contacts intercellulaires peuvent apparaître parfois sous forme d'hémi-fusions, des jonctions de membranes plasmiques avoisinantes avec une continuité entre les feuilletts exoplasmiques. Les principaux composants transmembranaires de ces jonctions sont les protéines de la famille des claudines (26 membres chez l'homme) et les trois protéines possédant un domaine MARVEL (un module de six hélices transmembranaires) : Occludine, Tricelluline et MARVELD3 (MARVEL domain-containing protein 3) (Zihni et al. 2016). Les jonctions serrées contiennent également une plaque de jonction dense constituée de protéines cytosoliques. Ces dernières forment un réseau protéique complexe qui interagit avec les domaines cytoplasmiques des protéines transmembranaires des jonctions serrées et les filaments d'actines (Madara 1987), et même les microtubules (Yano et al. 2013). Une des principales protéines de ce réseau et la première à avoir été identifiée est ZO-1 (zonula occludens 1) (Stevenson et al. 1986). Cette protéine contient plusieurs motifs d'interaction dont un domaine PDZ, un domaine SH3 et un domaine GUK (guanylate kinase homology domain) lui permettant de se lier à différents partenaires cellulaires et de garantir ainsi un rôle de protéine adaptatrice entre les jonctions serrées et les composants cytoplasmiques des cellules.

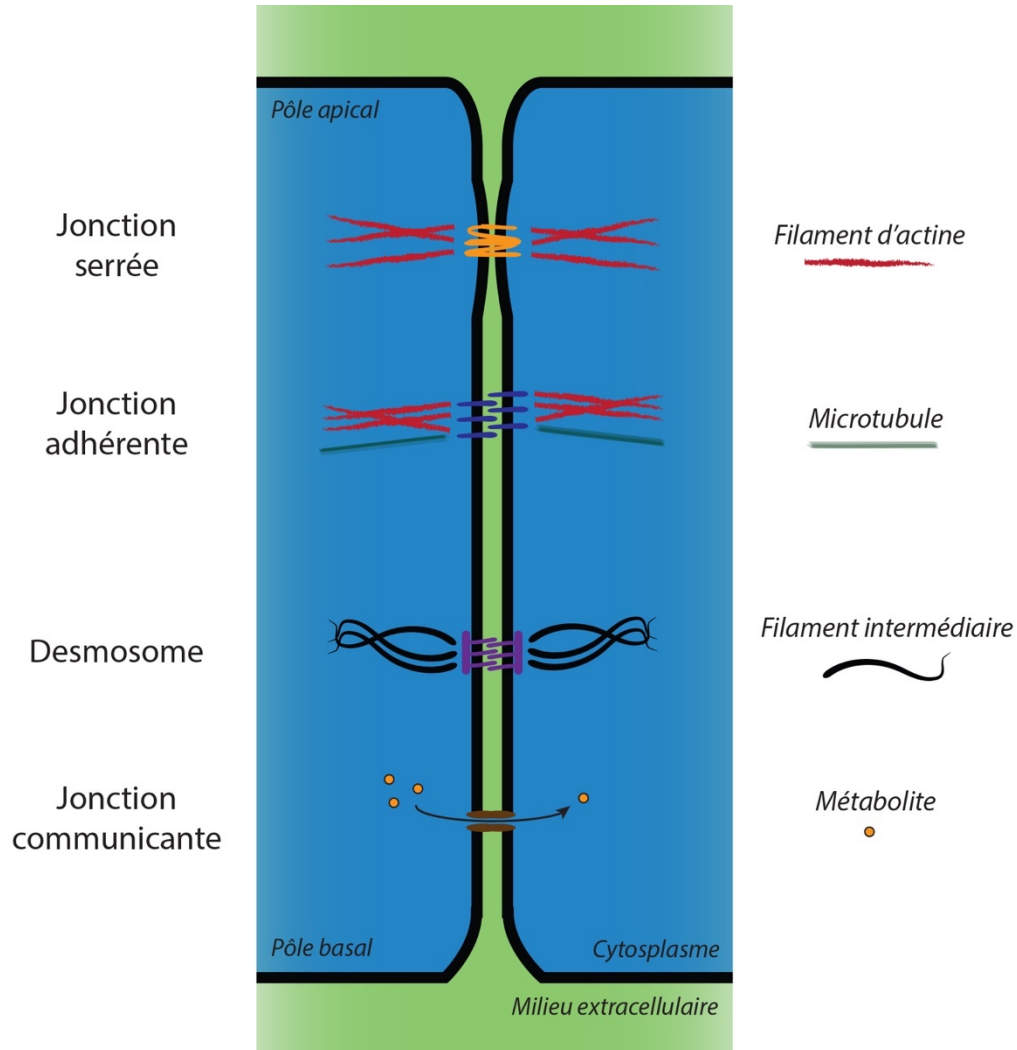


Figure 7 : Représentation schématique des principales jonctions cellulaires entre deux cellules adjacentes

Le positionnement des jonctions entre cellules épithéliales est bien organisé. Au niveau du pôle apical, on retrouve tout d'abord les jonctions serrées puis les jonctions adhérentes, qui sont liées aux filaments d'actines mais aussi aux microtubules pour les jonctions adhérentes. Enfin, les desmosomes et les jonctions communicantes occupent la seconde moitié de la cellule au niveau du pôle basal. Les desmosomes sont reliés aux filaments intermédiaires et les jonctions communicantes permettent l'échange de métabolites entre cellules adjacentes.

Par la suite, plusieurs autres protéines jouant le rôle d'adaptatrices aux jonctions serrées ont été identifiées notamment ZO-2/3, Cingulin, Afadin et MAGI-1/3 (membrane-associated guanylate kinase inverted- 1/3) (Van Itallie and Anderson 2014). De par leur structure, les jonctions serrées permettent de sceller les cellules épithéliales ou endothéliales entre elles. En effet, les protéines transmembranaires comme les claudines vont agir comme de véritables barrières et ne laisser passer que très peu d'éléments par de petits pores (Powell 1981; Van Itallie and Anderson 2006). Un dysfonctionnement d'un des membres des jonctions serrées peut entraîner des problèmes physiologiques dont des maladies vasculaires ou infectieuses (Sawada 2013). Par ailleurs, les jonctions serrées et leurs protéines adaptatrices associées vont permettre la transduction de signaux et l'organisation du trafic membranaire (Kohler and Zahraoui 2005).

2.2 Les jonctions communicantes

Les jonctions communicantes sont des structures organisées qui permettent de créer des canaux entre les cellules (Caspar et al. 1977; Makowski et al. 1977; Unwin and Zampighi 1980; Perkins, Goodenough, and Sosinsky 1997). Pour que cela fonctionne, les cellules adjacentes doivent être proches et ne laisser qu'un espace de deux à quatre nanomètres. Les jonctions communicantes sont présentes à la fois chez les vertébrés mais aussi chez les invertébrés et sont composées de protéines appelées connexines (innexines chez les invertébrés) (Goodenough 1974). Les protéines de la famille des connexines possèdent chacune quatre domaines transmembranaires qui constituent la paroi des canaux. Au niveau extracellulaire, ces domaines sont liés par deux boucles qui permettent la reconnaissance et la liaison entre deux cellules adjacentes (Mese, Richard, and White 2007). Ainsi, les jonctions communicantes vont créer une liaison entre le cytoplasme de deux cellules proches et promouvoir l'échange à la fois d'ions (K^+ et Ca^{2+}), de seconds messagers tels que l'AMPc et le GMPc (adénosine et guanosine monophosphate cyclique) mais aussi de petits métabolites comme le glucose (Harris 2007). Plusieurs études suggèrent même que de petits brins d'ARN peuvent utiliser ces jonctions pour passer d'une cellule à l'autre (Valiunas et al. 2005; Zong et al. 2016). Ces jonctions sont donc non seulement responsables de la communication entre cellules mais permettent aussi de préserver l'homéostasie à travers les cellules et les tissus. De nombreuses études montrent que le mauvais fonctionnement des jonctions communicantes chez l'humain, notamment

dû à des mutations sur les gènes codants pour les connexines, mène au développement de maladies telles que des problèmes cutanés (Srinivas, Verselis, and White 2018).

2.3 Les desmosomes

En plus des jonctions cellulaires précédemment évoquées on retrouve aussi chez les vertébrés des desmosomes. Ces structures permettent le maintien des tissus entre eux et renforcent les liaisons intercellulaires (Johnson, Najor, and Green 2014). En effet, formées par un complexe de plusieurs protéines elles établissent un lien entre la membrane plasmique et les filaments intermédiaires de la cellule. Dans ce complexe on retrouve des membres de la famille des cadhérines desmosomales, les protéines desmogléines et desmocollines (Dsg, Dsc). Ces dernières vont pouvoir interagir avec les cellules adjacentes par le biais de leur domaine extracellulaire (Harrison et al. 2016), mais aussi se lier aux protéines cytoplasmiques plakoglobines et plakophilines (Pg, Pkp) avec leur domaine intracellulaire (Trojanovsky et al. 1994; Kowalczyk et al. 1999). De plus, la protéine desmoplakine (Dp) qui se lie aux filaments intermédiaires, vient interagir avec ce complexe intracellulaire et permet donc la liaison entre les desmosomes et le réseau de filaments (Kouklis, Hutton, and Fuchs 1994; Kowalczyk et al. 1997). Ainsi, les desmosomes ont un rôle crucial à la fois pour le développement embryonnaire mais aussi pour l'intégrité des tissus adultes. Plusieurs mutations chez des protéines desmosomales peuvent mener au développement de maladies cutanées et cardiaques mortelles (Bazzi and Christiano 2007). Enfin, en plus de leurs fonctions adhésives, les composants desmosomaux régulent la signalisation intracellulaire (Broussard, Getsios, and Green 2015).

2.4 Les jonctions adhérentes

Les jonctions adhérentes sont le quatrième type de jonction retrouvé chez les vertébrés. Ces structures sont impliquées dans plusieurs processus biologiques dont la régulation du cytosquelette d'actine et la signalisation intracellulaire (Yonemura 2011; McEwen, Escobar, and Gottardi 2012). Cependant, les jonctions adhérentes sont avant tout les éléments principaux régulant l'adhésion cellulaire puisqu'une rupture de ces jonctions provoque un relâchement des contacts intercellulaires et conduit à une désorganisation de l'architecture tissulaire (Gumbiner 2005; Nelson 2008). Les composants majeurs de ces jonctions sont les cadhérines classiques. Chez les vertébrés, il existe environ une vingtaine

de cadhérines classiques réparties en deux groupes, les cadhérines de type I comprenant notamment les protéines E-cadherin (epithelial cadherin/cadherin-1) et N-cadherin (neural cadherin/cadherin-2), et de type II dont fait partie entre autres VE-cadherin (vascular endothelial cadherin) (Nollet, Kools, and van Roy 2000). L'expression de ces deux types de cadhérines est dépendante de l'organe et du type cellulaire étudié. Les cadhérines classiques possèdent cinq domaines extracellulaires répétitifs d'environ 110 acides aminés chacun. Ces domaines, en se liant aux ions calcium Ca^{2+} , vont pouvoir former des interactions avec les cadhérines des cellules voisines et initier ainsi une adhésion entre cellules adjacentes (Figure 8) (Pokutta et al. 1994; Kim et al. 2011). Cependant, bien que les deux sous-types de cadhérines classiques semblent identiques, elles possèdent des différences dans leurs résidus d'ancrages et ne peuvent pas se lier entre elles (Patel et al. 2006; Posy, Shapiro, and Honig 2008). En plus de leurs domaines extracellulaires, les cadhérines classiques possèdent sur leur queue C-terminale deux domaines intracellulaires. Le premier est le domaine JMD (juxtamembrane domain) et permet aux cadhérines d'interagir avec la protéine p120ctn (p120-catenin/Catenin delta-1) (Yap, Niessen, and Gumbiner 1998). Ce domaine semble par ailleurs important pour le regroupement des cadhérines lors de la formation de contacts intercellulaires et permettre une forte adhésion cellulaire. Le second est le domaine CBD (catenin binding domain) et permet d'interagir avec la protéine β -catenin (Catenin bêta-1) (Nagafuchi and Takeichi 1989; Jou et al. 1995). Alors que la protéine p120ctn est impliquée dans la stabilisation des cadhérines à la membrane, la protéine β -catenin permet d'établir le lien entre le cytosquelette d'actine et les jonctions adhérentes. En effet, il a été démontré que cette dernière interagit avec la protéine α -catenin (Catenin alpha-1) (Aberle et al. 1994), qui se lie directement aux filaments d'actines (Rimm et al. 1995). Par ailleurs, la protéine α -catenin s'associe aussi aux filaments d'actines de manière indirecte par le biais de protéines adaptatrices dont la vinculine (Watabe-Uchida et al. 1998) et les protéines EPLIN (epithelial protein lost in neoplasm) (Abe and Takeichi 2008) et formin-1 (Limb deformity protein homolog) (Kobiela, Pasolli, and Fuchs 2004). Plus récemment, il a été montré que les jonctions adhérentes établissent aussi un lien entre les microtubules et la membrane plasmique. En interagissant directement avec les microtubules (Franz and Ridley 2004), ou avec l'aide des protéines PLEKHA7 (pleckstrin homology domain-containing family A member 7) et

Nezha (Calmodulin-regulated spectrin-associated protein 3) (Meng et al. 2008), p120ctn permet en effet d'effectuer une liaison entre les microtubules et les cadhérines.

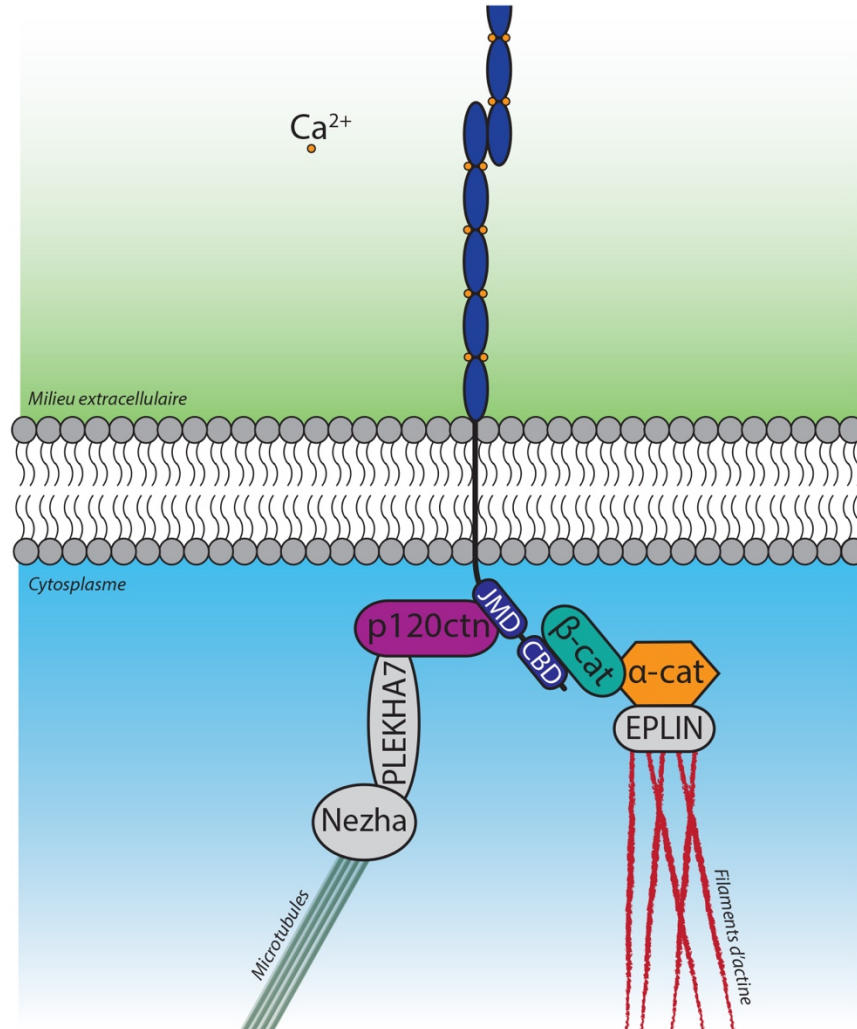


Figure 8 : Principaux constituants moléculaires des jonctions adhérentes

Représentation détaillée du complexe protéique des jonctions adhérentes. En présence de calcium, les cadhérines de cellules adjacentes peuvent interagir. La protéine cytoplasmique p120ctn permet le maintien de la cadhérine à la membrane plasmique et d'établir une liaison avec les microtubules. Les protéines α -catenin (α -cat) et β -catenin (β -cat) permettent de lier le cytosquelette d'actine aux jonctions adhérentes. JMD : juxtamembrane domain, CBD : catenin binding domain. (Adapté de Meng and Takeichi 2009)

Ainsi, en régulant l'adhésion entre les cellules, les jonctions adhérentes sont donc impliquées dans un processus biologique fondamental. Il n'est donc pas surprenant qu'un dérèglement de l'organisation de ces jonctions mène au développement de pathologies dont différents cancers. En effet, des mutations, une baisse de l'expression ou une mauvaise localisation cellulaire de la protéine E-cadherin sont souvent associées au développement des cellules cancéreuses (Vos et al. 1997; Graff et al. 2000; Harigopal et al. 2005; Petrova, Schecterson, and Gumbiner 2016). Sans E-cadherin, les cellules perdent en partie leur adhésion entre elles et adoptent alors une nouvelle morphologie mais augmentent aussi leurs capacités de migration et de prolifération. Enfin, les jonctions adhérentes et notamment les différentes cadhérines sont aussi importantes dans le maintien de l'intégrité épithéliale et du remodelage tissulaire lors du développement embryonnaire (Halbleib and Nelson 2006; Harris 2012).

2.4.1 La protéine p120ctn

Bien que les cadhérines soient les composants majeurs des jonctions adhérentes, plusieurs autres protéines ont une fonction primordiale et sont responsables du maintien de ces jonctions. Parmi elles, on retrouve la protéine p120ctn. Cette protéine fait partie de la famille des caténines à domaine Armadillo comprenant trois groupes : la sous-famille p120ctn avec les protéines ARVCF (Armadillo repeat protein deleted in velo-cardio-facial syndrome), p0071, p120ctn et delta-catenin, la sous-famille des plakophilines et enfin la sous-famille β -catenin avec les protéines plakoglobines et β -catenin (Carnahan et al. 2010).

2.4.1.1 Structure et conservation

La protéine p120ctn a été décrite il y a une trentaine d'années dans une étude qui l'identifiait comme un substrat de la kinase Src (Reynolds et al. 1989). En 1998, le gène *CTNND1* situé sur le chromosome 11q11 codant pour la forme humaine de p120ctn fut cloné pour la première fois (Keirsebilck et al. 1998). Cette étude, ainsi que d'autres travaux additionnels, ont permis de montrer que la protéine p120ctn est retrouvée sous différentes isoformes dans la cellule (Aho, Rothenberger, and Uitto 1999). En effet, il existe quatre codons d'initiation de transcription sur le gène *CTNND1* permettant de coder pour les isoformes 1 à 4 (Figure 9). L'isoforme p120ctn 1 est traduite à partir du premier codon d'initiation pour produire une protéine ayant le plus long domaine N-terminal. Les

isoformes 2 et 3 ne contiennent pas le domaine CC (coiled coil). Enfin l'isoforme 4 ne possède pas le domaine N-terminal qui précède le domaine à répétitions Armadillo, comprenant notamment le domaine RD (regulatory domain) ayant de nombreux sites de phosphorylation régulant l'activité de p120ctn. Le domaine Armadillo de p120ctn comporte neuf répétitions Armadillo, chaque répétition étant composée de trois hélices alpha (Choi and Weis 2005). Les isoformes 1 et 3 sont les plus abondamment exprimées dans les cellules. L'isoforme 1 de p120ctn semble plus exprimée dans les cellules à forte mobilité de type mésenchymateuse alors que l'isoforme 3 est plutôt caractéristique des cellules épithéliales. Cependant, on retrouve les différentes isoformes de p120ctn exprimées en même temps dans un grand nombre de types cellulaires (Montonen et al. 2001; Aho et al. 2002).

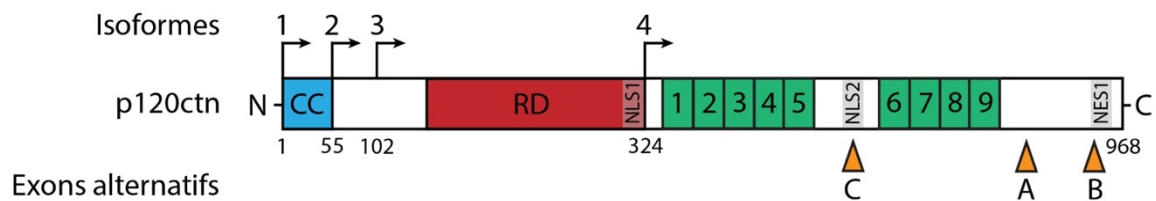


Figure 9 : Structure de la protéine p120ctn

La protéine p120ctn est composée de 968 résidus. Quatre codons d'initiation de transcription sur le gène CTNND1 codant pour p120ctn sont présents et donne lieu à quatre isoformes de longueurs différentes. Les exons alternatifs A, B et C sont retrouvés aux emplacements indiqués, dépendamment de l'épissage alternatif du transcrit du gène CTNND1. La protéine p120ctn contient 9 répétitions ARM (Armadillo) annotées de 1 à 9 et un domaine CC (coiled coil). On retrouve aussi dans p120ctn deux signaux de localisation nucléaire (NLS) et une séquence d'exportation nucléaire (NES) ainsi qu'un domaine RD (regulatory domain) constitué de nombreux sites de phosphorylation.

Par ailleurs, des évènements d'épissage alternatif pour trois exons différents (A, B et C) sur le transcrit du gène *CTNND1* augmentent aussi le nombre potentiel d'isoformes pour la protéine p120ctn. L'exon A code pour une séquence de 21 acides aminés tandis que l'exon B code pour un signal d'exportation nucléaire (NES) putatif. Enfin, l'exon C code six acides aminés qui perturbent le second signal de localisation nucléaire (NLS2) de p120ctn, le premier signal de localisation nucléaire (NLS1) se trouvant juste à la fin du domaine RD. Bien que l'ARNm contenant l'exon A soit abondamment exprimé, les exons B et C ne sont que très peu exprimés, à l'exception des tissus neuraux où l'on retrouve l'exon C (Keirsebilck et al. 1998).

Finalement, des protéines orthologues à p120ctn chez les invertébrés *Drosophila melanogaster* (Dmp120ctn) (Myster et al. 2003) et *Caenorhabditis elegans* (JAC-1) (Klompstra et al. 2015) ont été identifiés.

2.4.1.2 Fonctions

En utilisant le modèle murin, plusieurs groupes ont montré que la délétion de cette protéine entraîne des défauts de développement et un décès embryonnaire rapide (Davis and Reynolds 2006; Oas et al. 2010; Smalley-Freed et al. 2010). De même, en diminuant l'expression des protéines orthologues de p120ctn chez les invertébrés *Drosophila melanogaster* et *Caenorhabditis elegans*, des études ont démontrées que cette dernière est importante dans le développement morphologique des embryons (Magie, Pinto-Santini, and Parkhurst 2002; Pettitt et al. 2003). Ces différentes études suggèrent donc que la protéine p120ctn remplit des fonctions cellulaires qui semblent primordiales à la survie des organismes. Ainsi, différentes équipes de recherche s'attardent encore aujourd'hui à déterminer l'implication exacte de la protéine p120ctn dans le fonctionnement des cellules.

2.4.1.2.1 Régulation des cadhérines

Une des fonctions principales de p120ctn est la régulation des cadhérines. Cette dernière s'exerce à différents niveaux, notamment lors de la biogénèse des cadhérines mais aussi lors de leur stabilisation à la membrane ou leur endocytose. Tout d'abord, p120ctn joue un rôle lors de la biogénèse de certains types de cadhérines classiques en interagissant avec la protéine PTP1B (Protein tyrosine phosphatase 1B) et le précurseur des cadhérines au niveau du réticulum endoplasmique pour favoriser sa translocation vers l'appareil de

Golgi (Hernandez, Wehrendt, and Arregui 2010; Wehrendt et al. 2016). Cependant, ce mécanisme ne semble pas concerner la protéine E-cadherin puisque p120ctn apparaît couplée à cette cadhérine uniquement aux jonctions cellulaires (Miranda et al. 2003; Davis, Ireton, and Reynolds 2003). De plus, p120ctn se lie avec les protéines kinésines et favorise le transport des cadhérines le long des microtubules jusqu'aux jonctions adhérentes (Mary et al. 2002; Chen et al. 2003; Yanagisawa et al. 2004).

Une fois aux jonctions adhérentes, p120ctn joue un rôle important dans la stabilisation des cadhérines. En effet, le domaine JMD des cadhérines classiques interagit avec le domaine Armadillo de p120ctn, les répétitions Armadillo 1 à 5 étant les plus essentielles pour cette interaction (Ishiyama et al. 2010). Des mutations sur certains résidus au sein de ce domaine supprime l'interaction entre p120ctn et les cadhérines et réduisent ainsi l'adhésion intercellulaire (Thoreson et al. 2000). Par ailleurs, une déplétion de p120ctn dans les cellules de mammifères entraîne une baisse du niveau de différentes cadhérines, dont E-cadherin, N-cadherin, P-cadherin (Placental cadherin), et VE-cadherin (Xiao et al. 2003; Dohn, Brown, and Reynolds 2009; Kumper and Ridley 2010; Pieters et al. 2016; Garrett et al. 2017). En effet, en absence de p120ctn, ces différentes cadhérines sont internalisées par endocytose et finalement dégradées. De même, p120ctn stabilise les cadhérines *in vivo*, puisque la baisse de l'expression de p120ctn dans des embryons de *Xenopus laevis* réduit les niveaux de cadhérines classiques (Fang et al. 2004; Ciesiolka et al. 2004). Chez la souris, la délétion de p120ctn dans certains tissus diminue aussi le niveau de plusieurs cadhérines tels que E-cadherin, N-cadherin, mais aussi VE-cadherin (Davis and Reynolds 2006; Oas et al. 2010; Bartlett et al. 2010). Ainsi, p120ctn régule la stabilisation des cadhérines au niveau de la membrane cellulaire à la fois *in vitro* et *in vivo*.

À la surface cellulaire, les cadhérines peuvent être internalisées par différentes voies, notamment par endocytose dépendante de la clathrine, par endocytose médiée par les cavéoles ou par endocytose médiée par les lipides et la pinocytose (Kowalczyk and Nanes 2012). Le processus d'endocytose semble spécifique à chaque type de cellules, mais dépend également du microenvironnement. Ainsi, la protéine p120ctn contrôle en partie la stabilisation des cadhérines à la membrane plasmique en prévenant leur endocytose. Bien que le mécanisme ne soit pas encore totalement connu, plusieurs études ont montré certaines spécificités. En effet, p120ctn est en compétition avec les protéines PS-1

(presenilin-1) et Hakai pour interagir avec le domaine JMD des cadhérines classiques. La protéine PS-1 favorise la dégradation des cadhérines par clivage protéolytique de leur queue cytoplasmique (Georgakopoulos et al. 1999; Baki et al. 2001; Marambaud et al. 2002). La protéine Hakai, qui est une ubiquitine ligase E3, entraîne l'ubiquitination et l'endocytose de la E-cadherin (Fujita et al. 2002; Pece and Gutkind 2002). Par ailleurs, un motif dileucine sur la queue cytoplasmique de la E-cadherin proche du domaine JMD semble responsable de l'internalisation de cette dernière. Ainsi, en masquant ce motif lors de son interaction avec E-cadherin, p120ctn empêche l'internalisation en inhibant son interaction avec les protéines nécessaires à l'endocytose médiée par la clathrine (Miyashita and Ozawa 2007a, 2007b; Nanes et al. 2012). Finalement, un autre mécanisme de dégradation des cadhérines est facilité par la protéine NUMB (Protein numb homolog), qui peut se lier avec la région C-terminale de p120ctn (Sato, Watanabe, et al. 2011). Cette interaction entraîne une stimulation de l'endocytose des cadhérines dépendante de la clathrine. Ainsi, la protéine p120ctn occupe un rôle central dans la formation et le maintien des jonctions adhérentes en assurant entre autres, la stabilité des cadhérines.

2.4.1.2.2 Régulation de l'activité des Rho GTPases

Les petites GTPases Rho, dont les protéines RhoA (Ras homolog gene family member A), Rac1 (Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1) et Cdc42 (Cell division control protein 42 homolog) en sont les principaux membres, sont des régulateurs importants de la dynamique du cytosquelette d'actine. Leur activité est nécessaire pour établir la polarité cellulaire, mais aussi promouvoir la migration des cellules ou encore la formation et la mise en place des jonctions adhérentes (Jaffe and Hall 2005). Au cours des années, plusieurs observations ont montré que p120ctn régule l'activité de la petite GTPase RhoA (Figure 10). Tout d'abord, la surexpression de p120ctn dans différents types cellulaires entraîne l'inhibition de RhoA (Anastasiadis et al. 2000; Noren et al. 2000; Grosheva et al. 2001). Au contraire, une baisse drastique de l'expression de la protéine p120ctn dans des cellules permet une augmentation de l'activité de RhoA et accroît la formation de fibres de stress (Yanagisawa and Anastasiadis 2006; Yanagisawa et al. 2008; Dohn, Brown, and Reynolds 2009). De plus, la modulation de l'activité de RhoA par p120ctn est également observée *in vivo*, l'ablation génétique de p120ctn dans la peau et le cerveau de souris entraînant une activation accrue de RhoA (Elia et al. 2006; Perez-Moreno

et al. 2006). Plusieurs mécanismes responsables de la régulation de RhoA par p120ctn ont été rapportés dans la littérature. Tout d'abord, l'interaction entre p190RhoGAP (Rho GTPase-activating protein 35), une protéine GAP pour RhoA, et p120ctn, entraîne l'inhibition locale de l'activité de RhoA et déstabilise donc les filaments d'actine (Wildenberg et al. 2006; Molina-Ortiz et al. 2009). Par ailleurs, une étude suggère aussi que p120ctn interagit directement avec RhoA pour inhiber son activité (Castano et al. 2007). De même, cette interaction a été observée chez l'invertébré *Drosophila melanogaster* avec les protéines orthologues de p120ctn (Dmp120ctn) et RhoA (Rho1) (Magie, Pinto-Santini, and Parkhurst 2002). Ainsi, d'après ces évidences il a été suggéré qu'en s'associant avec RhoA, la protéine p120ctn agirait comme une Rho GDI (GDP dissociation inhibitor of Rho protein) et empêcherait la dissociation du GDP de RhoA pour la maintenir sous sa forme inactive (Anastasiadis and Reynolds 2001).

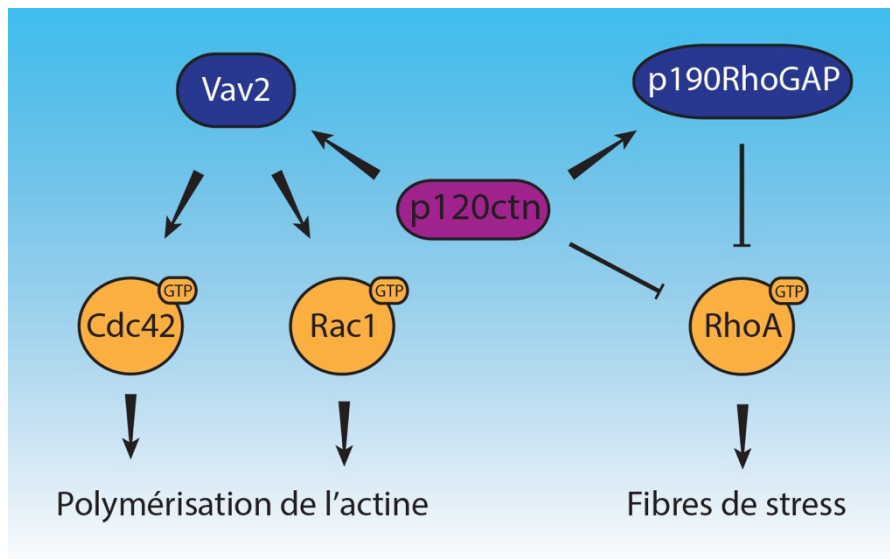


Figure 10 : Régulation des petites GTPases Rho par p120ctn

La protéine p120ctn régule négativement la petite GTPase RhoA en interagissant directement avec celle-ci pour inhiber son activité mais aussi en se liant à la protéine GAP pour RhoA, p190RhoGAP. En parallèle, p120ctn active les petites GTPases Rac1 et Cdc42 en interagissant avec la protéine GEF pour ces GTPases, Vav2.

Finalement, p120ctn modifie l'activité des petites GTPases Rho en régulant aussi les deux autres principaux membres de cette famille, Rac1 et Cdc42. En effet, des études montrent que la liaison entre p120ctn et la protéine GEF Vav2 (vav guanine nucleotide exchange factor 2) de Rac1 et Cdc42, entraîne l'activation de ces deux petites GTPases et la polymérisation des filaments d'actine (Noren et al. 2000; Chauvet et al. 2003; Valls et al. 2012). Enfin, p120ctn peut également interagir avec des effecteurs des Rho-GTPases, tels que le N-WASP (neuronal Wiskott–Aldrich Syndrome protein) (Rajput et al. 2013) ou cortactin (cortical actin binding protein) (Boguslavsky et al. 2007), deux activateurs de la polymérisation des filaments d'actine. La liaison de p120ctn avec la protéine cortactin aux abords de la membrane cellulaire favorise l'accumulation locale de Rac1 pour mener à la formation de lamellipodes et à la migration cellulaire. Ainsi, en régulant de manière directe ou en interagissant avec des effecteurs des petites GTPases Rho, la protéine p120ctn est fortement impliquée dans le contrôle du cytosquelette d'actine et la morphologie cellulaire.

2.4.1.2.3 Activité transcriptionnelle

En plus de ses rôles associés aux cadhérines et à des partenaires cellulaires cytoplasmiques, des études révèlent une implication de la protéine p120ctn dans la régulation de l'activité transcriptionnelle. En effet, dans plusieurs lignées cellulaires déficientes pour la protéine E-cadhérine, p120ctn est fréquemment observée à la fois dans le cytoplasme et mais aussi dans le noyau. Ainsi, la localisation nucléaire de p120ctn semble déterminée à la fois par le biais de ces deux NLS et de son NES (van Hengel et al. 1999; Kelly et al. 2004), mais semble surtout dépendante de son interaction avec les cadhérines par son domaine à répétitions Armadillo (Roczniak-Ferguson and Reynolds 2003). Cependant, les mécanismes exacts du transport de la protéine p120ctn entre le cytoplasme et le noyau sont encore inconnus à ce jour. Une étude suggère que l'interaction avec la protéine Glis2 (Neuronal Krueppel-like protein) permettrait à p120ctn d'être transportée au noyau (Hosking et al. 2007). Finalement, l'activité de plusieurs kinases, dont PKC (Protein kinase C) et CK1 ϵ (Casein kinase 1 epsilon), favoriserait un changement de localisation de p120ctn de la membrane cellulaire au noyau (van Hengel et al. 1999; Casagolda et al. 2010)

La protéine p120ctn module l'expression des gènes par son interaction directe avec le répresseur de la transcription Kaiso (Figure 11) (Zinc finger and BTB domain-containing protein 33) (Daniel 2007). La protéine Kaiso est un membre de la famille des facteurs de transcription BTB/POZ-ZF (Broad complex, Tramtrack, Bric à brac/poxvirus and zinc finger) qui peut se lier à l'ADN méthylé ou à une séquence de liaison à l'ADN spécifique (*TCCTGCNA*) (Daniel et al. 2002; Kelly and Daniel 2006). Ainsi, la liaison de la protéine p120ctn sur le répresseur Kaiso semble inhiber la liaison à l'ADN de ce dernier et inhiber la répression de la transcription de ses gènes cibles tels que *Siamois*, *c-Fos*, *Myc* et *Ccnd1* (Park et al. 2005), mais aussi *xWnt11* (Kim et al. 2004), et *Mmp7* (Spring et al. 2005). Plus récemment, une étude menée dans des cellules souches embryonnaires de souris montre que p120ctn régule aussi l'activité des répresseurs de la transcription REST (RE1-silencing transcription factor) and CoREST (REST corepressor 1) en interagissant avec eux (Lee et al. 2014). De même que pour Kaiso, la liaison de p120ctn empêche ces deux protéines d'interagir avec l'ADN et permet ainsi l'expression de gènes cibles comme *Oct4*, *Nanog* and *Sox2*. Ainsi, la protéine p120ctn semble être un élément important du contrôle de l'expression des gènes en s'associant à plusieurs répresseurs de la transcription.

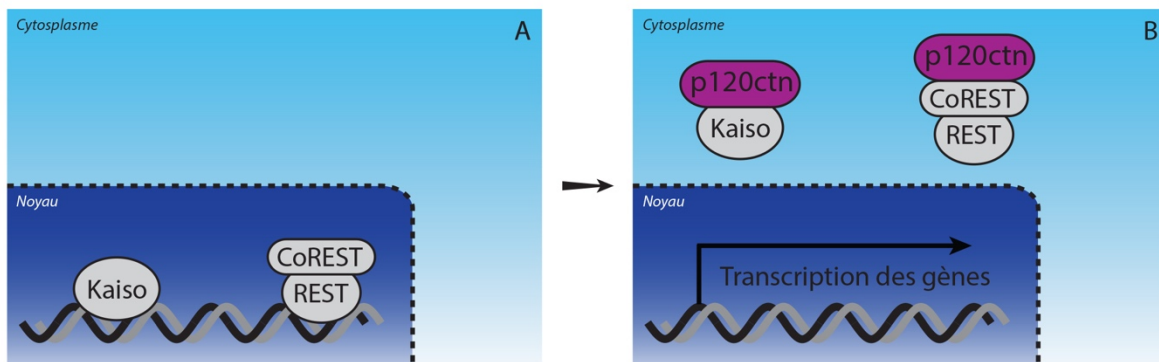


Figure 11 : Régulation de l'activité transcriptionnelle par p120ctn

La protéine p120ctn régule la transcription de plusieurs gènes en interagissant avec les protéines Kaiso et REST/CoREST, des répresseurs de la transcription. En absence de p120ctn (A), les protéines Kaiso et REST/CoREST lient l'ADN et empêche la transcription de gènes. En présence de p120ctn (B), cette dernière se lie aux répresseurs de la transcription et stoppe ainsi l'inhibition de la transcription.

2.4.1.3 Régulation de p120ctn par des phosphorylations

Bien qu'à l'origine la protéine p120ctn fût identifiée comme un substrat de la kinase Src, plusieurs autres de ses résidus se sont révélés phosphorylés. Ainsi, la phosphorylation de p120ctn semble être régulée par différentes kinases (Alema and Salvatore 2007). La majorité des résidus phosphorylés de la protéine p120ctn identifiés à ce jour se trouvent dans le domaine RD. Les différents sites phosphorylés caractérisés dans la littérature actuelle ainsi que les kinases responsables sont répertoriés dans le tableau 1. Plusieurs de ces phosphorylations semblent réguler les interactions de p120ctn avec d'autres protéines comme le répresseur de la transcription Kaiso (del Valle-Perez et al. 2016) ou la petite GTPase RhoA (Castano et al. 2007). Il est intéressant de noter aussi que l'état de phosphorylation de p120ctn semble réguler l'assemblage des jonctions adhérentes, notamment en contrôlant la dynamique des cadhérines au niveau de la membrane plasmique (Fukumoto et al. 2008; Peglion, Llense, and Etienne-Manneville 2014). De plus, bien que la régulation négative ou la modification de la localisation de p120ctn ait été démontrée dans de nombreux cancers, plusieurs études suggèrent que la phosphorylation de p120ctn sur plusieurs résidus est requise pour son impact dans le développement des cellules cancéreuses (Ma et al. 2012; Kourtidis et al. 2015).

	Résidus phosphorylés	Kinases	Effets fonctionnels	Références
Sérines/Thréonines	S6/S8 S11/S15	CK1 α GSK3 β	Le remplacement de ces 4 sérines par une alanine non phosphorylable entraîne la dégradation de p120ctn.	(Hong et al. 2010)
	T47	Dyrk1A	La phosphorylation de ce résidu semble stabiliser p120ctn.	(Hong et al. 2012)
	T310	GSK3 β	Lors de la migration collective d'astrocytes, la phosphorylation entraîne une dissociation entre p120ctn et N-cadherin.	(Peglion, Llense, and Etienne-Manneville 2014)
	S268 S269	CK1 ϵ	La phosphorylation des deux sérines réduit l'interaction entre p120ctn et E-cadherin et augmente l'interaction entre Kaiso et p120ctn.	(Casagolda et al. 2010) (del Valle-Perez et al. 2016)
	S288	Pak4/5	La localisation de p120ctn semble affectée.	(Wong et al. 2010)
		PKC	L'invasion de cellules cancéreuses de poumons semble affectée par la phosphorylation de cette sérine.	(Zhang et al. 2011)
S879	PKC α	La phosphorylation inhibe l'interaction entre p120ctn et VE-cadherin et déstabilise les jonctions adhérentes.	(Brown et al. 2009) (Vandenbroucke St Amant et al. 2012)	
Tyrosines	Y96/Y112 Y228/Y257 Y280/Y291 Y296/Y302	Src	Caractérisation de 8 résidus phosphorylés par Src. Leur phosphorylation inhibe l'interaction entre p120ctn et SHP-1.	(Mariner et al. 2001)
	Y112	Fyn	La phosphorylation inhibe l'interaction entre p120ctn et RhoA.	(Castano et al. 2007)
	Y112 Y217	Src Fyn	La phosphorylation de ces deux tyrosines inhibe l'interaction de p120ctn avec Vav2.	(Valls et al. 2012)
	Y217 Y228	Src	Les deux résidus phosphorylés augmentent l'interaction entre p120ctn et RhoA et inhibent l'activité de RhoA.	(Castano et al. 2007)
	Y228	Src EGFR	Fonction non déterminée mais phosphorylation augmentée dans de nombreuses lignées cellulaires de carcinomes.	(Mariner, Davis, and Reynolds 2004)

Tableau 1 : Sites de phosphorylation identifiés sur la protéine p120ctn et leurs effets spécifiques associés

2.4.1.4 Implications de p120ctn dans le cancer

Comme mentionné précédemment, la perte de l'expression de E-cadherin est une caractéristique établie de la progression du cancer (Hanahan and Weinberg 2011). La protéine p120ctn contrôlant la stabilité et le renouvellement des cadhérines, mais aussi l'activité des GTPases Rho et la répression transcriptionnelle dépendante de Kaiso, elle fait donc l'objet d'une attention croissante dans le développement du cancer.

2.4.1.4.1 Fonctions oncogéniques

La suppression de la protéine E-cadherin entraîne une localisation au cytoplasme de p120ctn dans les tumeurs du côlon, du sein, de la vessie, du poumon, du pancréas, de la prostate et de l'estomac (Thoreson and Reynolds 2002). Des études additionnelles sur le cancer du sein et du côlon ont révélé que la fraction cytoplasmique de p120ctn contrôle le phénotype invasif des cellules tumorales déficientes pour la protéine E-cadherin (Sarrío et al. 2004; Shibata et al. 2004; Bellovin et al. 2005). Un groupe de recherche montre aussi que dans des cellules cancéreuses du sein qui n'expriment pas E-cadherin, la protéine p120ctn induit une augmentation de la croissance tumorale *in vivo* (Soto et al. 2008). Par ailleurs, le passage de l'expression de E-cadherin à P-cadherin, associée à un comportement plus invasif dans des lignées de cellules cancéreuses ovariennes et pancréatiques, entraîne la translocation de p120ctn vers le cytoplasme, ce qui induit la migration cellulaire en activant les petites GTPases Rac1 et Cdc42 (Taniuchi et al. 2005; Cheung, Leung, and Wong 2010). Dans le cancer du pancréas, la localisation cytoplasmique de p120ctn est ainsi fréquemment corrélée à une diminution de la survie des patients (Chetty, Jain, and Serra 2008). De plus, plusieurs expériences réalisées dans les cellules pancréatiques cancéreuses PaTu8889 et PANC-1 ont montré que la protéine p120ctn induit une prolifération, une invasion et un comportement migratoire dans ces cellules (Mayerle et al. 2003; Cheng et al. 2012), ce qui suggère que la protéine p120ctn fonctionne ici comme un proto-oncogène.

Enfin, comme expliqué auparavant, p120ctn contrôle la transcription de plusieurs gènes en se liant avec la protéine Kaiso. Des études, examinant la localisation de Kaiso par rapport à p120ctn, ont démontré que la localisation nucléaire de Kaiso est diminuée lorsque p120ctn se situe dans le cytoplasme (Soubry et al. 2005; Zhang et al. 2011; Vermeulen et al. 2012). Ainsi, la protéine Kaiso régulant l'expression de gènes directement liés au cancer

tels que *Ccnd1*, *xWnt11* et *Mmp7*, une localisation cytoplasmique de p120ctn dans plusieurs cancers favoriserait son interaction avec Kaiso et permettrait donc l'expression de ces gènes (van Roy and McCrea 2005).

2.4.1.4.2 Rôle de suppresseur de tumeurs

Bien qu'elle soit localisée dans le cytoplasme de nombreuses cellules cancéreuses, la protéine p120ctn est aussi retrouvée sous-exprimée dans différents types de tumeurs. Ainsi, la perte de p120ctn dans les cellules entraîne une diminution du niveau de E-cadherin et donc une transition de ces dernières vers un état cancéreux (Berx and van Roy 2009). Dans ce cas, la protéine p120ctn agit comme un potentiel suppresseur de tumeurs puisque sa présence inhibe le développement des cellules cancéreuses. L'absence d'expression de p120ctn dans les tumeurs ne semble pas être seulement due à des aberrations génétiques du gène *CTNND1* codant pour p120ctn, seules quelques mutations ont été rapportées dans le cancer du sein (Wood et al. 2007; Stephens et al. 2012), et dans la lignée cellulaire du carcinome du colon SW48 (Ireton et al. 2002). Les mécanismes responsables de la baisse de l'expression de p120ctn dans les tumeurs sont donc encore très peu connus à ce jour. Une étude suggère tout de même que l'expression de p120ctn est régulée au niveau transcriptionnel par la protéine FOXC2 (Forkhead box protein C2) dans les cellules cancéreuses du poumon (Mortazavi et al. 2010). Ce facteur de transcription se lie au promoteur de p120ctn et réduit ainsi son activité.

Une baisse de l'expression de p120ctn est observée dans de nombreux types de cancers (van Hengel and van Roy 2007). On retrouve notamment une expression réduite de p120ctn dans les tumeurs cutanées (Ishizaki et al. 2004). Dans le modèle murin, la délétion de p120ctn dans les kératinocytes entraîne une prolifération incontrôlée et des anomalies mitotiques (Perez-Moreno et al. 2006; Perez-Moreno et al. 2008). De plus, des groupes de recherches ont observé une diminution et même une perte complète de l'expression de p120ctn dans des tumeurs colorectales (Skoudy et al. 1996; Gold, Reynolds, and Rimm 1998). Dans ces études, la perte de p120ctn est associée à une faible survie, une augmentation de la taille des tumeurs et à une induction de métastases. Par ailleurs, la délétion de p120ctn de la cavité buccale, de l'œsophage et de l'estomac de souris entraîne pour la plupart d'entre elles des lésions précancéreuses après 4 à 6 mois (Stairs et al. 2011). À l'âge de 12 mois, 70% des souris ont développé des tumeurs.

3 Fonctions biologiques régulées par des protéines adaptatrices

Formées de domaines et de motifs spécifiques qui interviennent dans des interactions moléculaires, les protéines adaptatrices peuvent créer des liaisons entre plusieurs partenaires cellulaires tels que des récepteurs activés à la membrane plasmique avec des effecteurs cytoplasmiques (Wilkinson, Wang, and Rudd 2004). Dans ces cas-ci, les protéines adaptatrices ont pour la plupart à la fois un domaine qui reconnaît un récepteur activé mais aussi un ou plusieurs domaines recrutant des protéines cytoplasmiques, comme l'adaptateur Grb2 avec ses domaines SH2/SH3. Comme expliqué précédemment, en se liant à un récepteur tyrosine kinase activé avec son domaine SH2, la protéine adaptatrice Grb2 interagit aussi avec la protéine SOS1 par le biais de ses deux domaines SH3 (Rozakis-Adcock et al. 1993). Après quoi, une cascade d'activation sous-jacente entraîne la mise en action de la voie de signalisation Ras/MAPK. Cependant, l'association de protéines adaptatrices avec leurs partenaires cellulaires peut être située à plusieurs endroits de la cellule et promouvoir des effets et des fonctions biologiques plus complexes qu'une simple liaison entre un récepteur et une cible cellulaire. En effet, l'adaptateur MDC1 (Mediator of DNA damage checkpoint protein 1) est une protéine qui se lie aux histones pour réguler la réponse cellulaire suite à des dommages à l'ADN (Stewart et al. 2003; Stucki et al. 2005). De plus, la protéine adaptatrice NOS1AP (Carboxyl-terminal PDZ ligand of neuronal nitric oxide synthase protein), en interagissant avec son partenaire cellulaire NOS1 (Nitric oxide synthase 1), contrôle entre autres la production d'oxyde nitrique dans le système nerveux (Wang et al. 2016).

Ainsi, les protéines adaptatrices sont des pièces maîtresses dans l'organisation de processus biologiques en permettant la transmission de signaux de la membrane plasmique aux composants cytoplasmiques associés, mais aussi en régulant directement l'activité de protéines impliquées dans diverses fonctions cellulaires (Pawson 2007). Les liaisons entre les protéines adaptatrices et leurs partenaires cellulaires sont orchestrées par les différents domaines protéiques les composant. Une multitude de domaines protéiques spécifiques ont été identifiés à ce jour (Bagowski, Bruins, and Te Velthuis 2010). Parmi eux, on retrouve les domaines PDZ, des domaines d'interaction protéique parmi les plus conservés dans les organismes.

3.1 Les protéines adaptatrices à domaines PDZ

À l'origine, les domaines PDZ ont été définis au début des années 1990 comme étant des domaines protéiques d'environ 90 acides aminés identifiés dans les trois protéines PSD-95 (postsynaptic density-95), Dlg-1 (discs large 1) et ZO-1 (Cho, Hunt, and Kennedy 1992; Kennedy 1995). Plusieurs études ont ensuite suivi et ont permis de démontrer que les protéines à domaines PDZ sont retrouvées chez de nombreux organismes, des bactéries aux vertébrés (Ponting 1997), soulignant la conservation et la fonctionnalité de ces domaines au cours de l'évolution (Bilder 2001; Kim et al. 2012). Chez l'humain, on compte environ 250 domaines PDZ répartis dans plus de 150 protéines distinctes (Wang, Pan, et al. 2010; Belotti et al. 2013). Les interactions protéiques dépendantes des domaines PDZ sont impliquées dans de nombreux processus biologiques, notamment le regroupement et le transport des récepteurs à la membrane plasmique (Kim et al. 1995), mais aussi la signalisation cellulaire et le maintien de l'architecture des cellules (Roh and Margolis 2003; Lee et al. 2007). L'importance des interactions protéiques dépendantes des domaines PDZ dans le maintien de l'homéostasie cellulaire est démontrée par les nombreux défauts observés lorsque ces interactions sont perturbées par des problèmes pathologiques tels que des maladies infectieuses ou des cancers (Subbaiah et al. 2011). De plus, certains domaines PDZ sont ciblés par plusieurs classes de virus qui perturbent ainsi leurs fonctions cellulaires, menant par ailleurs à la propagation du virus et à la transformation cellulaire (Spanos et al. 2008; James and Roberts 2016).

3.1.1 Caractéristiques structurales des domaines PDZ

Les domaines PDZ comportent tous certains éléments structurels déterminants : six feuillets β (βA – βF) et deux hélices α , une courte (αA) et une longue (αB). Ces structures, qui peuvent varier suivant les protéines, forment un repli parallèle entre les feuillets βB et βC , qui lui est hautement conservé (Doyle et al. 1996; Morais Cabral et al. 1996). Cette conformation permet ainsi de créer une boucle de liaison appelée le motif GLGF (Figure 12). Ce motif comporte les résidus formant la poche hydrophobe qui assure l'activité de liaison des domaines PDZ et est constitué des acides aminés Arg/Lys-Xaa₃-Gly- ϕ -Gly- ϕ (où Xaa est un résidu quelconque, ϕ un résidu hydrophobe, Arg une arginine, Lys une lysine et Gly une glycine). Cependant, mis à part le second résidu glycine toujours

conservé, il semblerait que les autres résidus exacts formant le motif GLGF peuvent varier de manière très significative et contribuer ainsi à la spécificité de liaison (Lee and Zheng 2010).

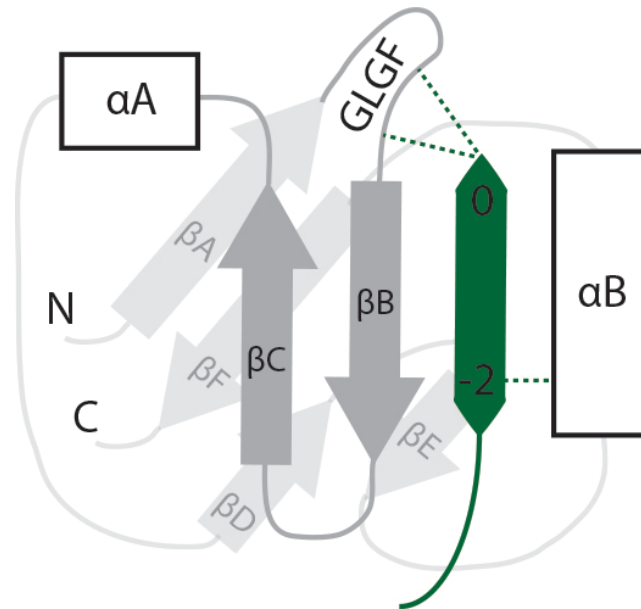


Figure 12 : Représentation schématique d'un domaine PDZ

Les domaines PDZ comportent six feuillets β (βA – βF) et deux hélices α , une courte (αA) et une longue (αB). Ils adoptent une conformation spécifique formant une boucle de liaison GLGF. Un ligand, ici l'extrémité C-terminale d'une protéine (en vert) interagit avec les acides aminés de cette boucle de liaison pour se lier au domaine PDZ.

Par ailleurs, on retrouve souvent plusieurs domaines PDZ sur une même protéine. De ce fait, certains domaines PDZ fonctionnent ainsi en tandem, se stabilisant structurellement, comme les domaines PDZ 4 et 5 de la protéine GRIP1 (Glutamate receptor-interacting protein 1) (Feng et al. 2003), ou les domaines PDZ 1 et 2 de PSD95 (Long et al. 2003). Dans ces cas-ci, une dérégulation d'un des deux domaines PDZ entraîne un défaut de liaison de ces domaines avec leurs ligands. Enfin, certains domaines PDZ de protéines différentes peuvent former un dimère. En effet, le domaine d'une protéine se lie au domaine d'une autre dans une conformation de type « dos à dos », permettant d'une part

la stabilisation des domaines PDZ et d'autre part la liaison de deux ligands simultanément et à proximité. On retrouve de tels dimères entre les domaines PDZ de nombreuses protéines (Chang et al. 2011), notamment entre les protéines PSD95 et NOS1 (Brenman et al. 1996).

3.1.2 Interactions avec les domaines PDZ

De nombreuses structures de domaines PDZ en complexe avec des ligands spécifiques ont été décrites et identifiés à ce jour, permettant ainsi de déterminer les multiples possibilités d'interaction entre les protéines à domaines PDZ et leurs partenaires cellulaires (Figure 13) (Ivarsson 2012).

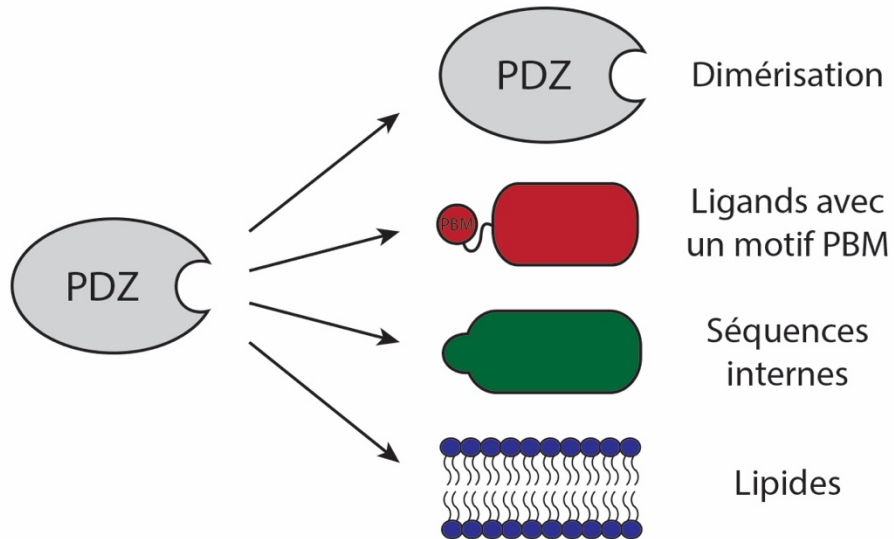


Figure 13 : Les différents modes d'interactions avec les domaines PDZ

Les domaines PDZ peuvent dimériser entre eux ou interagir avec des ligands ayant un motif PBM, une séquence interne de protéine ou bien avec les lipides.

3.1.2.1 Les différentes interactions des domaines PDZ

Bien que les domaines PDZ puissent dimériser entre eux comme expliqué précédemment, les principales interactions de ces domaines se font avec l'extrémité C-terminale d'autres protéines. En effet, les premiers groupes étudiant ces interactions ont déterminé que les quatre derniers acides aminés des protéines interagissant avec les domaines PDZ sont impliqués dans la liaison avec le motif GLGF (Nourry, Grant, and

Borg 2003). Trois sous-classes de motif C-terminal PBM (PDZ binding-motif) caractéristiques apparaissent donc : les motifs de classe I Xaa-Ser/Thr-Xaa- ϕ , de classe II Xaa- ϕ -Xaa- ϕ et de classe III Xaa-Asp/Glu-Xaa- ϕ (où Xaa est un résidu quelconque, ϕ un résidu hydrophobe, Ser une sérine, Thr une thréonine, Asp un acide aspartique et Glu un acide glutamique). Cependant, des études ont montré par la suite que la boucle de liaison contenant le motif GLGF peut interagir avec un maximum de sept résidus appartenant à l'extrémité C-terminale de protéines, permettant ainsi une plus grande différenciation potentielle entre les ligands (Zhang et al. 2006). Ainsi, en prenant en compte ce dernier critère, environ 90% des motifs PBM appartiennent à seize classes spécifiques, le reste présentant des spécificités uniques (Tonikian et al. 2008).

Par ailleurs, on retrouve aussi mais plus rarement des interactions entre les domaines PDZ et les lipides PIP₂ (phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate) de la membrane plasmique comme pour les protéines syntenin (Zimmermann et al. 2002), et Par-3 (Partitioning defective 3 homolog) (Wu et al. 2007). Enfin, certains domaines PDZ peuvent interagir dans quelques cas avec des séquences internes de protéines (Hillier et al. 1999; Penkert, DiVittorio, and Prehoda 2004).

3.1.2.2 Régulation des interactions

Plusieurs modifications rencontrées sur les domaines PDZ ou leurs différents ligands se révèlent importantes dans la régulation de leurs interactions. Par exemple, la phosphorylation d'une sérine, une thréonine ou une tyrosine sur le motif PBM d'un ligand peut moduler les interactions de ce dernier avec des domaines PDZ. Une équipe de recherche a ainsi montré que la phosphorylation du motif PBM de la protéine stargazin (Voltage-dependent calcium channel gamma-2 subunit) par la kinase PKA, annule sa liaison au domaine PDZ1 de PSD-95 et régule ainsi le fonctionnement du récepteur à l'AMPA (α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid) au niveau des synapses (Chetkovich et al. 2002; Choi et al. 2002). De même, la phosphorylation du motif PBM de la protéine LRP4 (LDL Receptor Related Protein 4) par la kinase CaMKII inhibe aussi son interaction avec PSD-95 (Tian et al. 2006). Par ailleurs, une phosphorylation sur un domaine PDZ peut elle aussi réguler une interaction. En effet, la phosphorylation à l'intérieur du domaine PDZ1 de la protéine NHERF-1 (Sodium-hydrogen antiporter 3

regulator 1) par la kinase PKC atténue son interaction avec le récepteur β_2 -adrénergique (Voltz et al. 2007). Finalement, plusieurs régulations des interactions avec les protéines à domaines PDZ sont dues à une auto-inhibition de ces dernières. Certaines protéines contenant un domaine PDZ ont aussi un motif PBM au niveau de leur queue C-terminale. Ainsi, la poche de liaison du domaine PDZ de ces protéines peut être occupée par leurs propres motifs PBM, inhibant ainsi toutes autres liaisons possibles. On observe ce phénomène avec les protéines NHERF-1 (Morales et al. 2007), X11 α (Amyloid-beta A4 precursor protein-binding family A member 1) (Long et al. 2005), mais aussi Tamalin (Sugi et al. 2007).

3.1.3 La protéine à domaines PDZ Scribble

De nombreuses protéines possédant plusieurs domaines PDZ occupent des rôles biologiques spécifiques dans la cellule, régulés notamment par leurs nombreuses interactions. Parmi elles, on retrouve la protéine Scribble.

3.1.3.1 Structure

La protéine humaine Scribble (Protein scribble homolog), est constituée de plusieurs domaines nécessaires à son rôle de protéine adaptatrice et appartient à la famille de protéines LAP (LRR and PDZ) (Figure 13) (Santoni et al. 2002). Les protéines LAP sont plutôt bien conservées à travers les organismes et on retrouve ainsi des orthologues de Scribble chez *Caenorhabditis elegans* (*let-413*) (Legouis et al. 2000) et *Drosophila melanogaster* (*scrib*) (Bilder and Perrimon 2000). La protéine humaine Scribble contient seize micro-domaines riches en leucine (LRR), et quatre domaines PDZ (Figure 14). Ces domaines sont à la fois primordiaux pour la localisation de Scribble à la membrane cellulaire (Zeitler et al. 2004), mais aussi importants pour ses liaisons avec de nombreuses protéines (Stephens et al. 2018).

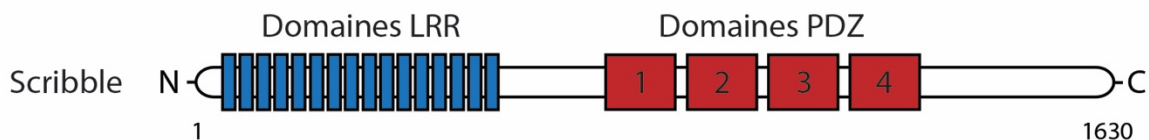


Figure 14 : Structure de la protéine Scribble

La protéine Scribble est composée de 1630 résidus. Elle contient 16 seize micro-domaines riches en leucine (LRR) (en bleu), et quatre domaines PDZ (en rouge).

3.1.3.2 Fonctions

La protéine Scribble, étudiée depuis plusieurs années maintenant, est décrite dans la littérature pour contrôler l'architecture cellulaire, en régulant notamment les jonctions ou la polarité des cellules. Exprimée dans la quasi-totalité des organes et cellules chez les mammifères, elle est de plus impliquée dans la régulation de voies de signalisation et occupe un rôle d'adaptateur pour de nombreuses autres protéines.

3.1.3.2.1 Architecture cellulaire

De nombreuses études démontrent le rôle de Scribble dans le maintien de l'organisation cellulaire en régulant à la fois les jonctions entre les différentes cellules mais aussi la polarité cellulaire en s'associant notamment aux protéines Dlg et Lgl (Lethal-2-giant larvae) (Su et al. 2012). En effet, des mutations de *scrib* chez *Drosophila melanogaster* ont conduit à obtenir des embryons présentant une surface cuticulaire ondulée et trouée contrairement à la cuticule normale des embryons de type sauvage (Bilder and Perrimon 2000). Des observations additionnelles chez *Drosophila melanogaster* ont permis de déterminer que la protéine *scrib* est localisée dans la partie basale des cellules épithéliales au niveau des jonctions septées. Dans les cellules épithéliales embryonnaires de *Caenorhabditis elegans*, *let-413* se situe également dans la région basolatérale et participe à la bonne localisation des différents composants nécessaires à la mise en place des jonctions adhérentes (Legouis et al. 2000; McMahon et al. 2001). Dans les cellules de mammifères, la protéine Scribble est localisée à la membrane plasmique (Hendrick et al. 2016). Enrichie au niveau des jonctions cellulaires, Scribble semble nécessaire pour maintenir les cadhérines à ce compartiment de la cellule et ainsi assurer une bonne adhésion cellulaire (Qin et al. 2005; Navarro et al. 2005). En effet, en absence de Scribble, on note une baisse de la présence des cadhérines au niveau des jonctions cellulaires. De plus, une étude démontre que la délétion de Scribble dans des cellules de glandes mammaires humaines MCF10A entraîne une baisse de la migration et des défauts de polarité cellulaire (Dow et al. 2007). En absence de Scribble, les cellules semblent incapables de recruter les petites GTPases Cdc42 et Rac1 au niveau du front de migration, ce qui réduit ainsi leur potentiel de migration et la formation de lamellipodes. Toujours dans ce même type de cellules épithéliales, un groupe de recherche a démontré

que l'absence de Scribble cause aussi une perturbation de l'organisation tridimensionnelle des cellules en culture en inhibant la mise en place de la polarité apico-basale (Zhan et al. 2008). Finalement, la protéine Scribble semble aussi être impliquée dans l'embryogénèse chez la souris (Murdoch et al. 2003; Zarbalis et al. 2004).

3.1.3.2.2 Scribble, une protéine adaptatrice

En plus de son rôle dans le maintien de l'architecture cellulaire, la protéine Scribble se lie avec de nombreuses protéines pour réguler leur fonction, notamment par le biais de ses domaines PDZ (Stephens et al. 2018). Ainsi, Scribble est une protéine adaptatrice qui se trouve impliquée dans plusieurs processus biologiques. Au niveau des neurones, Scribble interagit avec la protéine NOS1AP pour promouvoir la formation de dendrites (Richier et al. 2010). En se liant au complexe protéique AP-2 (adaptor protein complex 2), Scribble régule l'endocytose et le recyclage des récepteurs à glutamate NMDA (N-méthyl-D-aspartate) (Piguel et al. 2014). La protéine Scribble semble aussi responsable de l'internalisation du récepteur à la TSH (thyroid-stimulating hormone) (Lahuna et al. 2005), et du récepteur Tkv (bone morphogenetic protein-type I receptor Thickveins) (Gui, Huang, and Shimmi 2016), en interagissant avec ces derniers. De plus, la liaison entre les protéines Scribble et PHLPP1 (PH domain leucine-rich-repeats protein phosphatase) permet à cette phosphatase d'être localisée à la membrane cellulaire (Li et al. 2011). Enfin, Scribble joue un rôle dans la migration cellulaire en se liant à la protéine MCC (Mutated in Colorectal Cancer) (Arnaud et al. 2009), et à la kinase PAK (Nola et al. 2008).

3.1.3.2.3 Régulation de la voie Ras/MAPK

Plusieurs groupes de recherche rapportent que la voie de signalisation Ras/MAPK et Scribble semblent étroitement liées. En effet, dans ces études, il est démontré que cette protéine régule négativement l'activation de la voie de signalisation dans différents modèles biologiques, à la fois *in vitro* mais aussi *in vivo* (Rives-Quinto et al. 2017; Dow et al. 2008). Par exemple, en utilisant l'organisme *Drosophila melanogaster*, des chercheurs ont montré que la délétion de *scrib* entraîne l'activation de la signalisation Ras/MAPK dans les tissus épithéliaux (Rives-Quinto et al. 2017). La même observation a été faite avec la baisse de l'expression de Scribble dans des cellules humaines en culture (Dow et al. 2008). À l'inverse, la surexpression de cette protéine diminue significativement le niveau

d'activité des protéines effectrices de la voie de signalisation Ras/MAPK telles que ERK1/2 (Elsum, Martin, and Humbert 2013). À ce jour, les mécanismes moléculaires impliqués dans la régulation de cette voie par la protéine Scribble ne sont pas clairement établis. Cependant, en montrant que Scribble se lie avec le module ERK1/2, des données suggèrent que cette interaction serait responsable de la régulation négative de la voie de signalisation Ras/MAPK par Scribble. En effet, la liaison entre Scribble et ERK1/2 semble empêcher la phosphorylation et donc l'activation complète des kinases ERK1/2 (Nagasaka, Pim, et al. 2010; Nagasaka, Massimi, et al. 2010). Par ailleurs, en s'associant au complexe protéique SHOC2/MRAS (Leucine-rich repeat protein SHOC-2/Ras-related protein M-Ras), Scribble semble aussi inhiber l'activité du module ERK1/2 par ce moyen (Young et al. 2013). Enfin, la protéine Scribble affecte également la signalisation Ras/MAPK de manière indirecte en interagissant avec le complexe β -Pix/GIT1 (Rho guanine nucleotide exchange factor 7/ARF GTPase-activating protein GIT1) (Audebert et al. 2004; Wigerius et al. 2013), deux protéines d'échafaudage qui se lient aux kinases MEK1/2 (Yin et al. 2004), mais aussi ERK1/2 (Yin et al. 2005), pour augmenter leur activation. En interagissant avec ce complexe, Scribble serait en compétition avec ces kinases et diminuerait ainsi leur potentiel d'activation.

3.1.3.1 La protéine Scribble dans le cancer

Plusieurs études démontrent que la perte de fonction des mutants de Scribble ou la délétion de cette protéine perturbent la polarité apicale-basale, mais aussi coopèrent avec des signaux oncogéniques pour améliorer la migration, l'invasion et la survie des cellules tumorales (Dow et al. 2008; Zhan et al. 2008; Wu, Pastor-Pareja, and Xu 2010). Ainsi, ces données suggèrent que Scribble peut avoir une fonction positive dans l'inhibition du développement tumoral. Cependant, son rôle exact dans les différents cancers humains fait encore l'objet de plusieurs incertitudes. En effet, bien que les preuves initiales semblent montrer que l'expression de Scribble est diminuée durant la tumorigenèse, des études ont mis en évidence que les niveaux protéiques de Scribble sont augmentés dans les cellules cancéreuses (Kamei et al. 2007; Vaira et al. 2011). Par ailleurs, il semble que la protéine Scribble ne soit plus localisée au niveau des jonctions cellulaires dans plusieurs types de cancers, dont le cancer du sein (Feigin et al. 2014), de la prostate (Pearson et al. 2011), et du colon (Gardioli et al. 2006). Dans le cancer de la prostate, la mauvaise localisation de

Scribble est même corrélée à une faible survie du patient. Une mutation ponctuelle spécifique a été identifiée au sein du treizième domaine LRR de Scribble (une proline en leucine) et semble capable d'abroger sa localisation membranaire (Audebert et al. 2004). Un changement de localisation d'autres protéines de polarité, dont Lgl et Dlg, a également été associée à la progression du cancer (Huang and Muthuswamy 2010). Cependant, on ne sait pas aujourd'hui si la mauvaise localisation de Scribble dans les cellules cancéreuses est une raison ou une conséquence de la tumorigenèse.

4 Objectifs de la thèse

Comme longuement détaillé précédemment, les kinases RSK sont impliquées dans plusieurs processus biologiques primordiaux pour les cellules. Cependant, jusqu'à maintenant, seuls des partenaires cellulaires ou des substrats pour les isoformes RSK1 et RSK2 ont été identifiés. Les protéines RSK3 et RSK4 n'ont, quant à elles, aucun substrat connu à ce jour, et leurs fonctions restent donc à déterminer. Par ailleurs, bien que les kinases RSK soient abondamment étudiées ces dernières années notamment dans le développement des cellules cancéreuses, très peu d'études détaillent et établissent les mécanismes moléculaires sous-jacents de chacune des isoformes.

Ainsi, l'objectif général de ma thèse est d'identifier de nouveaux partenaires cellulaires pour les protéines RSK1-4 et de déterminer la pertinence de ces interactions dans la fonction de ces kinases, en particulier dans le développement des cellules cancéreuses. Pour répondre à cet objectif, ma thèse a été partagée suivant trois axes de recherches : 1. Mise en place et optimisation de méthodes à grande échelle pour l'identification de nouveaux partenaires cellulaires des protéines RSK, 2. Confirmation et caractérisation des nouveaux partenaires cellulaires des kinases RSK parmi les protéines identifiées, 3. Étude de l'impact biologique des interactions nouvellement caractérisées.

Cet objectif général nous a ainsi amené à déterminer l'interactome *in vivo* des kinases RSK1-4 dans une première étude. Nous avons par ailleurs caractérisé la protéine p120ctn comme un nouveau substrat des kinases RSK et nous avons démontré l'importance de ces kinases dans la régulation des jonctions intercellulaires de mélanomes.

Dans une deuxième étude, nous avons identifié les partenaires cellulaires dépendant du PBM des kinases RSK. Nous avons ainsi pu démontrer que la protéine Scribble inhibe l'activation de l'isoforme RSK2 par les kinases ERK1/2.

Chapitre 2 : RSK promotes p120-catenin phosphorylation and regulates cell-cell adhesion in melanoma

Antoine Méant¹, Beichen Gao¹, Flora Jung¹, Geneviève Lavoie¹, Joseph Tcherkezian¹, Sami Nourreddine¹, Anne-Claude Gingras^{2,3}, Philippe P. Roux^{1,4}.

¹Institute for Research in Immunology and Cancer (IRIC), Université de Montréal, Montréal, Québec H3C 3J7, Canada.

²Lunenfeld-Tanenbaum Research Institute, Sinai Health System, Toronto, Canada.

³Department of Molecular Genetics, University of Toronto, Toronto, Canada.

⁴Pathology and Cell Biology, Faculty of Medicine, Université de Montréal, Montréal, Québec H3C 3J7, Canada.

Keywords: p90RSK; p120ctn; melanoma; cell junctions; BioID; MAPK

Article in revision.

Mise en Contexte

Notre laboratoire a publié il y a quelques années maintenant une étude décrivant le phosphoprotéome des kinases RSK ainsi que le motif minimum nécessaire pour une phosphorylation par ces kinases (Galan et al. 2014). Dans ce projet, les travaux ont été orientés sur l'activité globale des kinases RSK en utilisant des inhibiteurs non spécifiques à une isoforme en particulier. Par ailleurs, cette étude est centrée uniquement sur la découverte de substrats et non pas de partenaires cellulaires. Ainsi, nous avons établi un projet dans l'optique de déterminer les partenaires cellulaires des kinases RSK spécifiques à chaque isoforme.

Les isoformes RSK1 mais surtout RSK3 se retrouvant dans la fraction insoluble lors d'une lyse de cellules, nous avons donc opté pour l'utilisation de la technique de BioID plutôt qu'une approche de capture par affinité traditionnelle suivie d'une identification en protéomique pour pallier ce problème. En utilisant cette méthode nous avons ainsi déterminé les partenaires cellulaires spécifiques des kinases RSK. En recoupant nos données avec l'étude du phosphoprotéome nous avons pu trouver des protéines identifiées dans les deux études, dont p120ctn. Après avoir caractérisé cette dernière comme étant un nouveau substrat des kinases RSK, nous avons testé son implication dans l'adhésion intercellulaire de lignées de mélanomes. Par ailleurs, nous avons aussi voulu étudier le rôle des kinases RSK dans l'intégrité des jonctions intercellulaires et la fonction de la phosphorylation de p120ctn par ces kinases.

Ainsi, en plus d'établir des connaissances additionnelles sur l'interactome des kinases RSK, notre étude démontre de nouveaux rôles cellulaires pour ces kinases.

Abstract

The Ras/MAPK signaling pathway regulates various biological functions, including cell proliferation. This pathway is frequently deregulated in several types of cancer, including many cases of melanoma. RSK (p90 ribosomal S6 kinase) is a MAPK-activated protein kinase required for melanoma proliferation, but relatively little is known about its exact function and the nature of its cellular partners. In this study, we used a proximity-based labeling approach (BioID) to identify RSK binding partners in cells. We identified many potential cellular interactors for the RSK kinases and among them, the member of the Armadillo-repeat proteins family p120ctn. After confirming the impact of p120ctn on cell-cell junctions in melanomas, we demonstrated that RSK kinase activity is required for intercellular junctions' integrity. We finally identified p120ctn as RSK phosphorylation substrate and established that this phosphorylation reorganizes p120ctn cellular partners. Thus, our results indicate that RSK directly modulates p120ctn function and suggests that the Ras/MAPK pathway regulates cell-cell adhesion by modulating the integrity of adherens junction.

Introduction

The Ras/MAPK signaling cascade plays a key role in transducing extracellular signals to intracellular targets involved in a wide range of cellular functions, including cell growth, proliferation and survival (Murphy and Blenis 2006; Ballif and Blenis 2001). Inappropriate regulation of this pathway leads to a variety of disorders and diseases, including many types of cancers (Schubbert, Shannon, and Bollag 2007; Lawrence et al. 2008). In this pathway, in response to mutational activation or upon activation by the small GTPase Ras, the Ser/Thr kinases Raf are activated (Lavoie and Therrien 2015). Raf isoforms are frequently mutated in cancers and one major example is melanoma, which harbors activating B-Raf mutations (V600E) in a majority of cases (Michaloglou et al. 2008). Activated Raf phosphorylates and activates MEK1/2, which themselves phosphorylate and activate in turn the MAPKs ERK1/2 (Cargnello and Roux 2011). Once activated, the Ser/Thr kinases ERK1/2 are capable of phosphorylating many substrates, including essential members of the p90 ribosomal S6 kinase (RSK) family of proteins (Roux and Blenis 2004; Rubinfeld and Seger 2005).

The RSK family includes four Ser/Thr kinases RSK(1-4), where RSK1/2 are the most abundant and are ubiquitously expressed, whereas RSK3/4 are weakly expressed in a few tissues (Carriere, Ray, et al. 2008). All four RSK isoforms belong to the AGC family of basophilic protein kinases and share 73–80% sequence identity, suggesting that RSK could potentially phosphorylate similar substrates and interact with common cellular partners (Romeo, Zhang, and Roux 2012). However, while a number of phosphorylation substrates have been identified for RSK1 and RSK2, the exact functions of RSK3 and RSK4 remain elusive. Consistent with this, RSK1/2 isoforms have been shown to regulate a number of substrates involved in several cellular processes such as cell growth, cell survival, proliferation and motility (Roux et al. 2007; Roux et al. 2004; Anjum et al. 2005; Sulzmaier and Ramos 2013). Moreover, RSK1 and RSK2 were shown to be overexpressed and/or hyperactivated in many types of cancers including breast cancer (Cuesta and Holz 2016), prostate cancer (Clark et al. 2005), head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) (Kang et al. 2010) and melanoma (Galan et al. 2014). Accordingly, inhibition of their activity reduces the proliferation of several cancer cell lines (Houles et al. 2018; Romeo et al. 2013). Interestingly, in contrast to RSK1 and RSK2, reduced expression of

RSK3 and/or RSK4 has been observed in different cancer types (Bignone et al. 2007; Cai et al. 2014). Nevertheless, the mechanisms by which RSK3 and RSK4 may inhibit cell proliferation are unknown at the moment. Together, these results indicate that further studies will be required to completely understand the role of the different RSK isoforms in various biological process as well as associated molecular mechanisms of action.

Loss of cell-cell adhesion is frequently observed in many disorders upon dysfunction of cadherins, the major component of Adherens Junction (AJ) (Schneider and Kolligs 2015). Cadherins constitute a family of transmembrane cell-cell adhesion proteins involved in morphogenesis, development and cancer (Halbleib and Nelson 2006; Jeanes, Gottardi, and Yap 2008). Classical cadherins are the gatekeepers of AJ maintenance by linking their extracellular interactions to internal cellular elements through α -catenin, β -catenin and p120-catenin (p120ctn) (Gumbiner 2005). While α - and β -catenin mainly modulate functional interactions with actin cytoskeleton, p120ctn maintains cell-cell adhesion integrity by controlling the stability of cadherins at the cell membrane (Rimm et al. 1995; Valenta, Hausmann, and Basler 2012; Davis, Ireton, and Reynolds 2003). p120ctn is a member of the Armadillo-repeat (ARM) proteins family and was originally identified as a Src tyrosine kinase substrate (Carnahan et al. 2010; Reynolds et al. 1989). To date, several other p120ctn residues have been shown to be phosphorylated, suggesting the regulation of p120ctn phosphorylation by other kinases (Alema and Salvatore 2007). Interestingly, the phosphorylation status of p120ctn seems to regulate AJ assembly, especially by controlling cadherins dynamics at the plasma membrane (Fukumoto et al. 2008; Peglion, Llense, and Etienne-Manneville 2014). Finally, although the downregulation or change in localization of p120ctn has been demonstrated in many cancers, several cases suggest that p120ctn phosphorylation is required for its pro-tumorigenic potential (van Hengel and van Roy 2007; Ma et al. 2012; Kourtidis et al. 2015). Thus, the molecular mechanisms responsible for p120ctn phosphorylation remains to be clearly defined.

In this study, we used a proximity-based labeling approach (BioID) to identify binding partners of RSK(1-4) isoforms in order to characterize the respective functions of the RSK kinases. This proteomic approach resulted in the identification of many potential proximity cellular partners for the RSK kinases. Among them, we identified and

characterized p120ctn as RSK a phosphorylation substrate. After demonstrating the direct impact of p120ctn on cell-cell junctions in melanomas, we found that RSK kinase activity is involved in AJ integrity. Finally, we established that the phosphorylation of p120ctn by RSK at serine 320 reorganized p120ctn cellular partners. Therefore, these results will help understand the specific role of the RSK kinases, particularly with respect to their described functions in cancer.

Results

Global analysis of the RSK-dependent interactome.

During the last decade, studies on kinases of the Ras/MAPK signaling pathway and in particular RSK have been extensively performed to decipher their biological functions. However, while our laboratory defined the phosphoproteome of RSK few years ago (Galan et al. 2014), no study has determined the complete interactome of these kinases. In HeLa cells expressing GFP-tagged RSK(1-4) in serum containing conditions, we found that RSK2 and RSK4 were localized throughout the cell whereas RSK3 appeared enriched at the cell's plasma membrane and RSK1 in the cytoplasm (Fig. 1A), suggesting that these kinases may have different and specific cellular partners through the cell. Moreover, HEK293 cells transfected with HA-tagged RSK(1-4) were lysed using non-ionic detergent (Fig. 1B) and interestingly, while RSK2 and RSK4 isoforms were found mostly in soluble fraction, RSK1 and RSK3 were enriched in non-soluble fraction. This result indicates that some isoforms are poorly solubilized by the lysis conditions used for traditional affinity purification mass spectrometry method (AP-MS). To overcome this limitation and in order to identify the cellular partners of RSK kinases we used the BioID approach. We created stable HEK293 Flp-In T-Rex cell lines expressing RSK(1-4) bait proteins that comprised Flag-BirA* fused in-frame at their N-terminal end (Fig. 1C). BirA* harbors the R118G mutation and its expression leads to the promiscuous biotinylation of surrounding proteins within a radius of 10-20 nm (Roux et al. 2012). HEK293 Flp-In T-Rex cells were lysed using stringent lysis solution and biotinylated proteins were isolated using streptavidin affinity purification. The resultant mixture was determined by mass spectrometry (MS) and we analyzed data from three independent biological replicates with SAINTexpress (Significance Analysis of INTeractome) (Choi et al. 2011; Teo et al. 2014) using three different controls (No BirA*, BirA* alone or GFP-tagged BirA*). All baits appeared to be expressed to similar levels and to the appropriate cellular compartments (Fig. 1D and S1). Furthermore, the cell lines displayed extensive protein biotinylation, suggesting the identification of proximity cellular partners.

Using this approach, we identified 156 prey proteins as potential RSK interacting partners (Fig. 2A, Dataset S1). Most proteins were identified with RSK1 and RSK3 as baits, likely due to their localization to specific intracellular compartments (Fig. 1A-B, S1).

To characterize the global signature of identified proximity interactors, we used the Ingenuity Pathway Analysis platform (IPA). When analyzed together, we found that RSK proximity partners were enriched in specific cellular compartments, including cell junction ($p = 2.44 \times 10^{-9}$), anchoring junction ($p = 1.12 \times 10^{-8}$) and plasma membrane ($p = 5.92 \times 10^{-7}$) (Fig. 2B-C). Interestingly, this method identified previously known RSK substrates, such as ARHGEF12 (Shi et al. 2018) and EPHA2 (Zhou et al. 2015), suggesting that the RSK proximity interactome may also contain uncharacterized RSK substrates. Consistent with this possibility, we compared these data with a list of potential RSK substrates identified in a recent phosphoproteomic study (Galan et al. 2014), and found that at least 10 proximity partners were previously tagged as potential RSK substrates (Fig. 1D), including p120-catenin (p120ctn or CTNND1).

Identification of p120ctn as a substrate of the RSK kinases.

RSK is a basophilic protein kinase that operates downstream of the RAS/MAPK pathway (Romeo, Zhang, and Roux 2012). To test its potential involvement in the regulation of p120ctn phosphorylation, we first confirmed that p120ctn phosphorylation was regulated by RSK using an antibody that recognizes the consensus motif RXXpS/T (where X is any amino acid), which is phosphorylated by AGC family kinases including RSK (Moritz et al. 2010). HEK293 cells transfected with Myc-tagged human p120ctn were stimulated with phorbol 13-myristate 12-acetate (PMA), and immunoprecipitated p120ctn was analyzed for phosphorylation (Fig. 3A). Using this method, we found that acute PMA treatment strongly stimulated p120ctn phosphorylation on RXXpS/T consensus sites, which was prevented by treatments with either MEK1/2 (PD184352) or RSK (BI-D1870) inhibitors, suggesting that RSK activity is required for p120ctn phosphorylation in cells. To identify the exact phosphorylation site(s) regulated by RSK, we used MS-based approach. As before, HEK293 cells were transfected with Myc-tagged p120ctn, serum starved overnight, and pretreated with vehicle, MEK1/2 or RSK inhibitors prior to being stimulated with PMA. Immunoprecipitated p120ctn was isolated via SDS-PAGE and digested in-gel with trypsin. Samples were then analyzed by liquid chromatography-assisted tandem MS, and the relative abundances of all identified phosphopeptides were measured across experimental conditions. Using this approach, we found that one

phosphopeptide containing basic consensus sequence showed significant changes between the non-activated (vehicle), the activated (PMA) and inactivated (PD184352 or BI-D1870) conditions (Fig. 3B). This phosphopeptide was found to contain Ser320, and identification of this residue as being phosphorylated was obtained by MS/MS sequencing, as depicted by the annotated MS/MS spectra. In order to confirm that the phosphorylation on Ser320 identified by mass spectrometry is RSK-dependent, we generated a non-phosphorylatable p120ctn mutant (S320A). Importantly, we found that mutation of the Ser320 completely abrogated p120ctn phosphorylation at basic consensus motifs in response to PMA (Fig. 3C) and EGF (Fig. 3D) stimulation in HEK293 cells transfected with Myc-tagged p120ctn WT or mutant form. We also performed *in vitro* kinase assays with purified proteins. Recombinant active RSK2 was incubated in a kinase reaction buffer with immunoprecipitated p120ctn WT or the S320A mutant (Fig. 3E). We found that activated RSK2 robustly increased phosphorylation of immunoprecipitated p120ctn WT, but not in p120ctn S320A mutant. Taken together, these results indicate that Ser320 is the predominant RSK-dependent phosphorylation site in p120ctn. Interestingly, Ser320 is located within the regulatory domain of p120ctn (Fig. 3F) which is already known to be phosphorylated on different residues by other kinases and important for the regulation of p120ctn function (Alema and Salvatore 2007), suggesting that Ser320 phosphorylation may modulate p120ctn role in cells. Moreover, Ser320 phosphorylation site is evolutionarily conserved among species along with the basic residues forming the consensus motif for RSK phosphorylation (Fig. 3G), suggesting that this phosphorylation play important functions.

RSK is required and sufficient to promote p120ctn phosphorylation *in vivo*.

To evaluate whether only the Ras/MAPK pathway is responsible for p120ctn phosphorylation, we used a phosphospecific antibody specifically directed against Ser320, the RSK target site. As expected, we found that potent agonists of the Ras/MAPK pathway including PMA and EGF, robustly stimulated p120ctn phosphorylation at Ser320 in HEK293 cells (Fig. 4A). However, activation of Akt, a basophilic kinase of the AGC family which share common substrates with RSK (Moritz et al. 2010), by serum or insulin did not promote Ser320 phosphorylation (Fig. 4A). We also treated cells with increasing

concentrations of insulin, but despite high Akt phosphorylation levels, we did not observe a regulation of p120ctn phosphorylation at Ser320 (Fig. 4B), suggesting that Akt does not regulate this phosphorylation site. In comparison, a time course stimulation using PMA or EGF in HEK293 cells leads to a strong phosphorylation at Ser320 (Fig. 4C), showing the involvement of the Ras/MAPK in this phosphorylation. This was further confirmed using pharmacologic inhibitors in HEK293 cells. We found that MEK1/2 inhibition using PD184352 decreased Ser320 phosphorylation induced by PMA or EGF stimulation (Fig. 4D), whereas mTOR inhibitors (Ku-0063794, rapamycin) or a dual PI3K/mTOR inhibitor (PI-103) did not affect p120ctn phosphorylation, indicating that kinase of the AGC family from the PI3K/mTOR pathway as Akt or S6K are not involved in p120ctn phosphorylation. In order to confirm that the phosphorylation on Ser320 is RSK-dependent *in vivo*, we used small interfering RNA (siRNA)-mediated RNAi to specifically reduce RSK1 and RSK2 expression, the predominant isoforms expressed in HEK293 cells. We found that knockdown of RSK1 and RSK2 significantly reduced p120ctn phosphorylation in response to PMA or EGF stimulation (Fig. 4E). Knockdown of both RSK1 and RSK2 further reduce Ser320 phosphorylation compared with knockdown of RSK1 or RSK2 alone, suggesting that both isoforms may be responsible for p120ctn phosphorylation. As expected from the siRNA data, we confirmed that RSK is required for the phosphorylation of endogenous p120ctn in HEK293 cells, where RSK inhibitors (BI-D1870, LJH685) were found to reduce Ser320 phosphorylation after PMA or EGF stimulation (Fig. 4F). Taken together, these results confirm that RSK is both required and sufficient for p120ctn phosphorylation at Ser320 in response to agonists of the RAS/MAPK pathway.

p120ctn is phosphorylated at Ser320 and maintains cell-cell adhesion integrity in BRAF-mutated melanoma cells.

Melanomas are characterized by the hyperactivation of the Ras/MAPK pathway (Michaloglou et al. 2008; Dhomen and Marais 2007) and RSK activity was shown to be high in cells derived from this cancer subtype (Romeo et al. 2013; Houles et al. 2018). In order to determine whether p120ctn phosphorylation is modulated by RSK in melanomas, we examined the effects of specific enzyme inhibitors in two human melanoma cell lines harbouring gain-of-function mutations in *BRAF* (Colo829 and A375). Consistent with a

predominant role for the RAS/MAPK pathway previously observed in HEK293 cells, we found that p120ctn phosphorylation was affected by MEK1/2 inhibition using PD184352 in A375 and Colo829 melanoma cells (Fig. 5A). Accordingly, mTOR inhibitors (Ku-0063794, rapamycin) or a dual PI3K/mTOR inhibitor (PI-103) still did not affect p120ctn phosphorylation, suggesting that Ser320 phosphorylation is mainly regulated by the RAS/MAPK pathway in melanoma cells. In addition to this, we found that treatment of A375 and Colo829 cells with RSK inhibitors (BI-D1870, LJM685, SL0101) abrogated p120ctn phosphorylation at Ser320 (Fig. 5B), indicating that RSK is the major kinase regulating p120ctn in BRAF-mutant melanoma cells. Next, we used a knockdown approach with lentiviral shRNAs targeted against two different target sequences in both *RSK1* and *RSK2* mRNA. Compared with a control shRNA (shNT) or shRNA against *RSK1* (shRSK1.1, shRSK1.2), we found that depletion of *RSK2* (shRSK2.1, shRSK2.2) resulted in a significant decrease of Ser320 phosphorylation in serum-growing Colo829, demonstrating that *RSK2* is the predominant isoform regulating p120ctn phosphorylation in melanoma cells (Fig. 5C). Finally, we investigated whether p120ctn is phosphorylated in human melanomas and found by immunohistochemistry that Ser320 phosphorylation was increased in melanomas compared with adjacent normal skin (Fig. 5D), suggesting that this phosphorylation may have important functions in melanoma development.

While the implication of p120ctn in many cancer formation has been studied (van Hengel and van Roy 2007), the role of p120ctn in melanoma is poorly understood. To determine the importance of p120ctn in melanoma, we used a knockdown method with lentiviral shRNAs. Depletion of p120ctn using two different shRNAs (p120ctn1, p120ctn2) reduced significantly N-cadherin proteins level (Fig. 5E). We next assessed the localization of endogenous N-cadherin in A375 cells depleted for p120ctn and found that N-cadherin had a decreased cell membrane localization and an enriched cytoplasm localization comparing to A375 cells expressing p120ctn (Fig. 5F). Together, these results confirm that p120ctn maintains the stability of cadherins at the cell membrane in melanoma cells, as previously described in different other cell types (Davis, Ireton, and Reynolds 2003). We then hypothesized that downregulated N-cadherin could affect intercellular adhesion strength in melanoma. To examine this hypothesis, we implemented a dispase assay, extensively used by other laboratories to evaluate intercellular adhesion strength (Sato,

Coombs, et al. 2011; Hariharan et al. 2014). A375 cells subjected to p120ctn knockdown were lifted using dispase and tissue fragmentation calculated following mechanical stress (number of single cells/total cell number). We showed that loss of p120ctn resulted in an augmented cells fragmentation comparing to cells expressing endogenous p120ctn (shNT) (Fig. 5G). Thus, this result indicates that p120ctn is required for cell-cell adhesion in melanoma by regulating the integrity of cellular junctions.

RSK activity is involved in cell junctions' integrity.

Although many studies have characterized the implication of Ras/MAPK pathway in specific biological process, few concerns the regulation of cellular junction's integrity. However, several studies suggest that RSK may have a role in the regulation of a cellular program that induces transition from multicellular epithelium to single cell phenotype (Doehn et al. 2009; Caslavsky, Klimova, and Vomastek 2013). In order to confirm these data, we performed a dispase assay as previously used. We first found that knockdown of both RSK1 and RSK2 (shRSK1/2) significantly reduce cells fragmentation in A375 (Fig. 6A). We also performed a dispase assay in A375 melanoma cells pretreated with either vehicle (DMSO), MEK1/2 (PD184352) or RSK (LJH685) inhibitors (Fig. 6B and C). Consistent with the results obtained in RSK1/2 knockdown A375, cell fragmentation was reduced by the inhibition of RSK activity using inhibitors. Taken together, these results confirm that RSK activity inhibition promotes the maintenance of intercellular junctions.

According to our data, p120ctn is required for cell-cell adhesion in melanoma by regulating the integrity of cellular junctions and phosphorylated by RSK at Ser320. As RSK is also involved in intercellular junction's regulation, we assessed the role of p120ctn phosphorylation by RSK in this cellular process. We observed that Ser320 phosphorylation was decreased in all dispase assays after RSK1/2 knockdown or RSK activity inhibition (Fig. 6A, B and C), suggesting that this phosphorylation may have a role in cell-cell adhesion by regulating p120ctn function. To better characterize Ser320 phosphorylation biological impact, we next evaluated the localization of endogenous p120ctn and N-cadherin in A375 cells pretreated with either vehicle (DMSO), MEK1/2 (PD184352) or RSK (LJH685) inhibitors (Fig. 6D). We found that both p120ctn and N-cadherin did not change localization after RSK activity inhibition and were colocalized at cell junctions,

indicating that RSK do not regulate p120ctn localization. To determine whether RSK activity was required for p120ctn and N-cadherin interaction, we used MEK1/2 (PD184352) and RSK (LJH685) inhibitors and found that both treatments did not disrupt N-cadherin binding to immunoprecipitated p120ctn in A375 cells (Fig. 6E). This result confirms that RSK does not regulate p120ctn and N-cadherin interaction. Finally, we generated stable A375 cell lines expressing either GFP, p120ctn-WT, the non-phosphorylatable p120ctn-S320A mutant or the phosphomimetic p120ctn-S320D mutant. The stable cell lines were also depleted for endogenous p120ctn using specific shRNA targeting the 3'UTR region of endogenous p120ctn mRNA. N-cadherin protein level was decreased after endogenous p120ctn knockdown but not in cells expressing p120ctn-WT, S320A or S320D, suggesting that exogenous p120ctn-WT or mutants are able to rescue N-cadherin levels (Fig. 6F). To better evaluate the impact of p120ctn mutants we next performed a disperse assay with the A375 stable cell lines. Consistent with the results obtained before, cell fragmentation was significantly increase in cells knockdown for endogenous p120ctn. However, cell fragmentation level was in part rescued with the expression of exogenous p120ctn-WT, S320A and S320D mutants in endogenous p120ctn knockdown cells. Cell fragmentation level was not significantly different between A375 cell lines stably expressing p120ctn-WT, S320A or S320D mutants, confirming that Ser320 phosphorylation does not affect p120ctn function in intercellular junctions.

Phosphorylation at Ser320 regulates p120ctn proximity cellular partners.

In order to investigate more precisely the function of p120ctn phosphorylation by RSK at Ser320, we used the BioID approach. We generated stable HEK293 Flp-In T-Rex cell lines expressing p120ctn-WT, or the S320A and S320D mutants fused in-frame with promiscuous mutant biotin ligase (BirA-R118G) Flag-tagged. These stable cell lines expressed the recombinant proteins at similar levels and exhibited a consistent protein biotinylation pattern, suggesting the identification of proximity cellular partners (Fig. 7A). Thus, using this technique (SAINT score > 0.5 and FDR < 0.1), we found 98 different proteins as potential proximity cellular partners of p120ctn-WT, 107 for p120ctn-S320A mutant and 76 for the p120ctn-S320D mutant (Dataset S2). While approximately 25% of the proteins identified were common for the three different baits, potentially specific

cellular partners were found for each one (Fig. 7B). We analyzed the proteins identified for p120ctn-S320A and S320D mutant by comparing the total spectral count obtained for each prey from three independent biological replicates (Fig. 7C). Several proteins already known to be p120ctn proximity interactors (CDH2, CTNNA1, CTNNB1 and PLEKHA7) were identified at the same level between the two p120ctn mutant baits. This result confirms the accuracy of BioID technique to identify specific p120ctn cellular partners but also confirms, in agreement with our previous results, that the phosphorylation of p120ctn at Ser320 does not change its interaction with N-cadherin (CDH2). We next hypothesized that the identification of specific preys identified for p120ctn-S320A or S320D baits could describe the impact of Ser320 phosphorylation on p120ctn functions. Interestingly, three members (MYCBP2, FBXO45 and SKP1) of a ubiquitin ligase complex (U.L.C) were found as exclusive proximity cellular partners of p120ctn-S320D mutant, suggesting that the phosphorylation of Ser320 may link p120ctn to this complex (Fig. 7D). Moreover, several proteins localized in p-bodies as LSM14A, EIF4ENIF1 or AGO2 were identified principally as p120ctn-S320D preys, suggesting that S320 phosphorylation may target p120ctn to this compartment. To test this, A375 cells were treated with arsenite, which increases the number and size of P-bodies through oxidative stress (Kedersha et al. 2005). Using immunofluorescence, we found an accumulation of p120ctn to P-bodies that was associated with its removal from the plasma membrane (Fig. S2). Finally, more than 20 proteins involved in microtubule cytoskeleton regulation were found to be p120ctn-S320A proximity cellular partners. This number was reduced for p120ctn-S320D and only a few preys at low relative abundance were found for this mutant, suggesting that non-phosphorylated p120ctn might have a role in microtubule regulation. Thus, phosphorylation at Ser320 by RSK leads to reorganize p120ctn proximity cellular partners.

Discussion

In this study, we describe, to our knowledge, the first global *in vivo* interactome of the four RSK kinases (Fig. 1 and 2). Using this method, we identified several potential cellular partners including the member of the Armadillo-repeat proteins family p120ctn. We characterized p120ctn has a new RSK substrate (Fig. 3, 4 and 5), and we found that phosphorylation at Ser320 modifies p120ctn proximity cellular partners (Fig. 7). Notably, we revealed that phosphorylated p120ctn is relocated to p-bodies and interact with proteins of this cellular component (Fig. 7 and S2). Importantly, after demonstrating the direct impact of p120ctn on cell-cell junctions in melanomas (Fig. 5), we also determined that RSK activity is involved in AJ integrity (Fig. 6).

The *in vivo* proteomic approach that we used in this study allowed us to identify many novel RSK cellular partners. While the BioID system is not specific to direct interactors, this technique helped us to determine cellular partners close to RSK kinases (10-20 nm) (Roux et al. 2012). Thus, we provide information about the localization of RSK in cells, but we also determine the cellular compartments where RSK is potentially active. Most of the proteins identified are localized to the cellular membrane and have a role related to this cell compartment (Fig. 2). This result is quite surprising because the majority of RSK substrates or cellular partners identified so far are not localized to the cell membrane (Romeo, Zhang, and Roux 2012). However, these data support several studies that report a potential role for RSK at the cell membrane, including the phosphorylation of filamin A involved in the stabilization of actin cortex (Woo et al. 2004; Gawecka et al. 2012). Also, the majority of membrane proteins identified are found with BirA*-RSK3 (Dataset S1), suggesting a specific role for this isoform. In addition to its cellular partners defined, we clearly show that this kinase is localized to the cell membrane (Fig. 1A and S1). Thus, further studies on each RSK isoform will be required to establish their own cellular functions.

By controlling the stability of cadherins at the cell membrane, p120ctn protein maintains cell-cell adhesion (Rimm et al. 1995; Valenta, Hausmann, and Basler 2012; Davis, Ireton, and Reynolds 2003). Negative regulation and mis-localization of p120ctn have been reported in many cancers, leading most of the time to the emergence of the epithelial–mesenchymal transition (EMT) process (van Hengel and van Roy 2007). In our

study we prove the importance of p120ctn in maintaining intercellular junctions of melanoma cells (Fig. 5). Our results show that p120ctn maintains the stability of cadherins at the cell membrane and thus regulates the integrity of cellular junctions. In addition to this, we provide additional knowledge regarding p120ctn. According to the literature, p120ctn protein has been shown to be phosphorylated on several residues (Alema and Salvatore 2007). Nevertheless, the exact functions of most of them remain unknown. In this study, we identified the Ser320 as a new phosphorylation site and demonstrated that it is RSK-dependent (Fig. 3 and 4). This phosphorylation leads to a change in p120ctn interactome (Fig. 7). Once phosphorylated by RSK, p120ctn protein appears relocated to p-bodies (Fig. S2) and interacts with components of this cell compartment (Fig. 7D), leaving many perspectives on its exact functions. Finally, we show that Ser320 phosphorylation is increased in patients' melanomas (Fig. 5D), suggesting that this phosphorylation could be used as a biological marker for melanoma development. This corroborates several studies showing that phosphorylated p120ctn expression has predictive value for cancer progression (Ma et al. 2012; Kourtidis et al. 2015).

The cell fragmentation technique allowed us to show that RSK activity inhibition promotes the maintenance of intercellular junctions (Fig. 6A-C). Thus, in melanoma cells where RSK is overactivated, cells have weaker intercellular junctions and will tend to spread more easily, as mentioned by another group (Doehn et al. 2009). However, although RSK activity is required for AJ integrity, the phenotype observed is not mediated by p120ctn phosphorylation on Ser320 (Fig. 6D-F). Since p120ctn protein is phosphorylated by several kinases (Alema and Salvatore 2007), multiple phosphorylation sites could have an effect on the intercellular junctions. Moreover, RSK kinases have many interactors located at the cell membrane (Fig. 2), and several could be involved in maintaining adherens junctions. Finally, additional studies will be required to establish the underlying molecular mechanisms of RSK involvement in the integrity of intercellular junctions.

In conclusion, our study reveals the robust and comprehensive power of our proteomic approach to identify novel RSK substrates and cellular partners. Our results implicating RSK in the regulation of p120ctn and cell-cell adhesion support the possibility that RSK may be a valuable therapeutic target against cancer. Our proteomics findings also suggest that RSK isoforms play different biological functions downstream of the

Ras/MAPK pathway, and that many more RSK cellular partners remain to be characterized.

Materials and Methods

Antibodies.

Antibody targeted against Arg-X-X-pSer/Thr motif, phospho-p120ctn (S320), Akt and phospho-Akt (S473), ERK1/2 and phospho-ERK1/2 (T202/Y204), S6K and phospho-S6K (T389), RPS6 and phospho-RPS6 (S235/236) were purchased from Cell Signaling Technologies (Beverly, MA). RSK1, RSK2 and p120ctn antibodies were purchased from Santa Cruz Biotechnologies (Santa Cruz, CA). The N-cadherin antibody was purchased from BD Biosciences (San Jose, CA). Anti-Myc, anti-Tubulin, anti-flag and anti-HA monoclonal antibodies were purchased from Sigma-Aldrich (Oakville, Ontario, Canada).

DNA constructs.

The original plasmid encoding full-length, untagged p120ctn was kindly provided by Albert Reynolds (Vanderbilt University, Nashville, USA) in a pENTR-gateway plasmid backbone (pENTR-p120ctn-1AB). This DNA construct was used as template for generating 6Myc-tagged p120ctn in the pcDNA3.1 backbone. Both p120ctn mutants (S320A and S320D) were generated using the QuikChange methodology (Stratagene, La Jolla, CA). The original plasmid pcDNA5-FRT/TO-FLAG-BirA_{R118G} encoding flag-tagged BirA_{R118G} was provided by Anne-Claude Gingras (University of Toronto, Toronto, Canada). The plasmid pLenti-CMV-GFP-puro was obtained from Addgene (#17448, Cambridge, MA, USA).

Cell culture and transfection.

HEK293, A375 and Colo829 cells were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC). HEK293 and A375 cells were maintained at 37°C in Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) with 4.5 g/L glucose supplemented with 5% (v/v) FBS, 100 IU/mL penicillin, and 100 µg/mL streptomycin. Colo829 cells were grown in RPMI-1640 medium with similar supplements. Cells were regularly PCR tested to exclude mycoplasma contamination and used within 2 months after thawing. HEK293 cells were transfected by calcium phosphate 24h after being plated. Cells were grown for 24h after transfection and serum-starved overnight using serum-free DMEM where indicated. Starved cells were pretreated with PD184352 (10 µM; Cerdalane, ON, Canada), LJH685

(10 μ M), BI-D1870 (10 μ M; Selleckchem, TX, USA), SL0101 (50 μ M; Toronto Research Chemicals, ON, Canada), PI-103 (1 μ M; Calbiochem, CA, USA), rapamycin (25 nM; Calbiochem, CA, USA) or Ku-0063794 (10 μ M; Selleckchem, TX, USA) where indicated and stimulated with phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA; 100 ng/mL; Fisher Scientific, ON, Canada), EGF (25 ng/mL; Invitrogen, CA, USA), FBS (10%; Invitrogen, CA, USA) or insulin (50-200nM; Peprotech, NJ, USA) before being harvested. Arsenite treatment was performed as previously described (Cargnello et al. 2012).

RNA interference (RNAi) and viral infections.

Short hairpin RNA (shRNA)–mediated knockdown was achieved using lentiviruses produced with vectors from the Mission TRC shRNA library (p120ctn, TRCN122984, TRCN122987; RSK1, TRCN470; RSK2, TRCN537). Cells were infected in the presence of 4 μ g/mL polybrene, and 3 days after viral infection, A375 and Colo829 cells were treated and selected with 2 μ g/mL puromycin. Lentiviruses were produced in the HEK293T cell line using the pLenti-CMV-GFP-puro vector to overexpress ectopic GFP, p120ctn WT, S320A, or S320D mutants. Two days after infection, cells were selected with 2 μ g/mL puromycin.

Immunoprecipitations, kinase assay and immunoblotting.

Cells were washed three times with ice-cold phosphate-buffered saline (PBS) and lysed in BLB (10 mM K_3PO_4 , 1 mM EDTA, 5 mM EGTA, 10 mM $MgCl_2$, 50 mM β -glycerophosphate, 0.5% Nonidet P-40, 0.1% Brij 35, 0.1% deoxycholic acid, 1 mM sodium orthovanadate [Na_3VO_4], 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, and a complete protease inhibitor cocktail tablet [Roche]). For immunoprecipitations, cell lysates were incubated with the indicated antibodies for 2 h, followed by 1 h of incubation with protein A–Sepharose CL-4B beads (GE Healthcare). Immunoprecipitates were washed three times in lysis buffer, and beads were eluted and boiled in 2X reducing sample buffer (5X buffer is 60 mM Tris-HCl [pH 6.8], 25% glycerol, 2% SDS, 14.4 mM 2-mercaptoethanol, and 0.1% bromophenol blue). For kinase assay, immunoprecipitates were washed three times in lysis buffer followed by one wash in kinase buffer (25 mM Tris-HCl (pH 7.4), 10 mM $MgCl_2$, and 5 mM β -glycerophosphate). Then, recombinant activated RSK2 purchased from

SignalChem (Richmond, BC) was used with immunoprecipitated p120ctn as substrate (WT and S320A) under linear assay conditions. Assay was performed for 10 min at 30°C in kinase buffer and then stopped by adding 2X reducing sample buffer. Eluates and total cell lysates were subjected to 10% SDS-PAGE, and resolved proteins were transferred onto polyvinylidene difluoride membranes for immunoblotting.

Immunofluorescence Microscopy.

For immunofluorescence analysis, cells were seeded in 12-well plates containing coverslips. Seventy-two hours later, cells were washed twice in PBS and fixed in 3.7% formaldehyde for 10 min at room temperature. Cells were washed twice in PBS, permeabilized for 5 min in PBS containing 0.3% Triton X-100 and blocked with PBS containing 1% bovine serum albumin (BSA) for 30 min. Cells were incubated for 2h with primary antibodies, washed twice with PBS, and incubated for 1h with secondary Alexa Fluor 488-conjugated goat anti-rabbit and Alexa Fluor 555-conjugated goat anti-mouse antibodies (Invitrogen), Texas Red-phalloidin, and DAPI (4,6-diamidino-2-phenylindole) diluted in PBS. Images were acquired on a Zeiss Axio Imager Z1 wide-field fluorescence microscope using a 40X oil-immersion objective or a Deltavision microscope (Applied Precision, Issaquah, WA) using a 60X oil-immersion objective.

Tissue microarray (TMA).

Immunohistochemical staining against p120ctn phospho-S320 was carried out on paraffin-embedded formalin-fixed samples using the automated Bond RX staining platform from Leica Biosystems. Sections were deparaffinized inside immunostainer. Antigen recovery was conducted using heat retrieval (Heat-Induced Epitope Retrieval) with ER1 (Leica Biosystems proprietary Epitope Retrieval using a low pH buffer) for 20 minutes. Sections were then incubated with 150 µL of anti-p120ctn phospho-S320 antibody for 30 min at room temperature. Detection of specific signal was acquired by using Bond Intense R detection kit (#DS9263; Leica Biosystems) according to the provider's recommendations. Slides were counterstained automatically with hematoxylin included in the Polymer DAB Kit. Stained slides were scanned using the Hamamatsu's Nano Zoomer Digital Pathology system 2HT. Virtual slides were then imported in

Visiopharm Integrator System (3.4.1.0). Scanned tissue microarray was processed by using the array imager module. Then each core was classified using Visiomorph's K-Means clustering method. CMN biomarker scoring algorithm was applied. $VS = (MI \times Area)_{LOW} + (MI \times Area)_{MED} + (MI \times Area)_{STRONG} / \text{Total Area of ROI}$. vs (Global visiomorph score) is range between 0 and + 255, MI (average intensity).

Mechanical strength (Dispase) assay.

A375 cells were plated in 60mm cell culture plates to reach confluency in 72 hours. To isolate the monolayers from the plates, cells were washed twice with PBS and then incubated for 90 minutes at 37°C with media containing Dispase (2.4U/mL, Roche). After detachment, PBS was added slowly to fully release the monolayer and the suspended cells were then centrifuged at 1000 RPM for 5 min. Each monolayer was then subject to disruption by pipetting up and down 20 times in 1 mL PBS. Immediately after disruption, single cells were counted using a haemocytometer. Percentage fragmentation was calculated by determining the ratio of single cell compared to the total number of cells present in a 60mm cell culture plate for each condition. In experiments requiring inhibitors, cells were treated with medium containing PD184352 (10µM), LJH685 (10µM) or DMSO (solvent control) 24h prior to performing the assay.

Generation of stable inducible cell pools and BioID labeling.

Stable cell lines were generated in parental HEK293 Flp-In T-Rex cells expressing bait proteins of interest as described (Kean, Couzens, and Gingras 2012). Stable cell lines were selectively grown in the presence of 200 µg/mL hygromycin up to 80% confluence before expression was induced using 1 µg/mL tetracycline for 24 hours. For the BioID experiments, 50 µM biotin was added at the time of induction. Two 150-mm plates were induced with tetracycline and treated with biotin for 24 hours before harvesting. Cells were pelleted at low speed, washed with ice-cold PBS and frozen at -80°C until purification. Cell pellets were thawed in 1.5 mL ice cold RIPA buffer containing 20 mM Tris-HCl (pH 8), 137 mM NaCl, 1% NP-40, 0.1% SDS and 0.5% sodium deoxycholate. 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 1 mM dithiothreitol and a complete protease inhibitor cocktail tablet (Roche, Bâle, Switzerland) was added immediately before use,

supplemented with 250U of benzonase. The lysates were sonicated using three 10s bursts with 10s rest in between on ice at 20% amplitude. Lysates were centrifuged for 20 min and cleared supernatants were transferred to 2-ml microcentrifuge tubes, and a 60 μ l bed volume of prewashed streptavidin-agarose beads (GE Healthcare, #17-5113-01) was added to each sample. Affinity purification was performed at 4°C on a nutator for 3 hours, and the beads were washed twice in RIPA buffer, and three times in 50 mM ammonium bicarbonate (ABC; pH 8.0). After affinity purification and removal of all washing buffer, beads were resuspended in 100 μ l of 50 mM ABC (pH 8) with 1 μ g of trypsin (Sigma, no. T6567) added and incubated at 37°C overnight with agitation. The next day, an additional 1 μ g of trypsin was added to each sample, and the samples were incubated for 4 hours at 37°C. Beads were pelleted and the supernatant was transferred to a fresh 1.5-ml tube. The beads were then rinsed two times with 100 μ l of MS-grade H₂O, and these rinses were combined with the original supernatant. The pooled fractions were centrifuged, and the supernatant was transferred to a new 1.5-ml tube and dried in a vacuum centrifuge. Tryptic peptides were resuspended in 10 μ l of 5% formic acid.

Mass Spectrometry acquisition and data analysis.

Samples were reconstituted in formic acid 0.2% and loaded and separated on a homemade reversed-phase column (150 μ m i.d. x 150 mm) with a 56-min gradient from 0–40% acetonitrile (0.2% FA) and a 600 nl/min flow rate on an Easy-nLC II (Thermo Fisher Scientific), connected to an Orbitrap Fusion Tribrid mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific). Each full MS spectrum acquired with a 60,000 resolution was followed by 20 MS/MS spectra, where the 12 most abundant multiply charged ions were selected for MS/MS sequencing. Samples analyzed were converted to mzXML using ProteoWizard 3.0.4468 (Kessner et al. 2008) and analyzed using the iProphet pipeline (Shteynberg et al. 2011) implemented within ProHits (Liu et al. 2010). The database consisted of the human and adenovirus sequences in the RefSeq protein database (version 57) supplemented with “common contaminants” from the Max Planck Institute (<http://maxquant.org/downloads.htm>) and the Global Proteome Machine (GPM; <http://www.thegpm.org/crap/index.html>). The sequence database consisted of forward and reversed sequences. The search engines were Mascot (2.3.02; Matrix Science) and Comet

(2012.01 rev.3 (Eng, Jahan, and Hoopmann 2013)), with trypsin specificity and two missed cleavage sites allowed. Methionine oxidation and asparagine/glutamine deamidation were set as variable modifications. The fragment mass tolerance was 0.01 Da and the mass window for the precursor was ± 10 ppm. The resulting Comet and Mascot results were individually processed by PeptideProphet (Keller et al. 2002) and combined into a final iProphet output using the Trans-Proteomic Pipeline (TPP; Linux version, v0.0 Development trunk rev 0, Build 201303061711). TPP options were as follows. General options were -p0.05 -x20 -PPM -d"DECOY", iProphet options were pPRIME and PeptideProphet options were pP. All proteins with a minimal iProphet protein probability of 0.05 were parsed to the relational module of ProHits. Note that for analysis with SAINTexpress, only proteins with at least two peptides identify and with iProphet protein probability ≥ 0.95 are considered. This corresponds to an estimated protein level FDR of $\sim 0.5\%$.

Digestion, phosphorylation site identification and quantification.

Following SDS-PAGE separation with Coomassie staining, bands corresponding to p120ctn were excised and digested in gel with trypsin as previously described (Shevchenko et al. 1996). The tryptic peptides were analysed as described above. Database searches were performed using Mascot (2.3.02; Matrix Science). The fragment mass tolerance was 0.01 Da and the mass window for the precursor was ± 10 ppm. Assignment of phosphorylation sites were validated through manual inspection of relevant MS/MS spectra. Individual sites were quantified on the basis of the summed reporter ion intensities for all matching peptides. Non-phosphorylated peptides matching p120ctn were combined to estimate unmodified protein abundance.

Statistical analysis.

Statistical analyses were performed using a two-sample unequal-variance Student *t* test. Data are presented as the mean \pm SEM, and *P* values < 0.05 were considered to be statistically significant. Data are representative of results from at least three independent experiments.

Acknowledgments

We thank all members of the PPR and ACG laboratories for their insightful discussions and comments. We also thank Julie Hinsinger for technical support and important advice at the Histology platform of IRIC. This work was supported by grants from the Canadian Institutes for Health Research and the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada. PPR is scholar of the Fonds de la recherche du Québec - Santé (FRQS). PPR holds the Canada Research Chair in Signal Transduction and Proteomics. ACG is the Canada Research Chair (Tier 1) in Functional Proteomics and was supported by a Canadian Institutes of Health Research (CIHR) Foundation Grant (FDN 143301). IRIC core facilities are supported in part by the Fonds de la recherche du Québec - Santé (FRQS).

References

- Alema, S., and A. M. Salvatore. 2007. 'p120 catenin and phosphorylation: Mechanisms and traits of an unresolved issue', *Biochim Biophys Acta*, 1773: 47-58.
- Anjum, R., P. P. Roux, B. A. Ballif, S. P. Gygi, and J. Blenis. 2005. 'The tumor suppressor DAP kinase is a target of RSK-mediated survival signaling', *Curr Biol*, 15: 1762-7.
- Ballif, B. A., and J. Blenis. 2001. 'Molecular mechanisms mediating mammalian mitogen-activated protein kinase (MAPK) kinase (MEK)-MAPK cell survival signals', *Cell Growth Differ*, 12: 397-408.
- Bignone, P. A., K. Y. Lee, Y. Liu, G. Emilion, J. Finch, A. E. Soosay, F. M. Charnock, S. Beck, I. Dunham, A. J. Mungall, and T. S. Ganesan. 2007. 'RPS6KA2, a putative tumour suppressor gene at 6q27 in sporadic epithelial ovarian cancer', *Oncogene*, 26: 683-700.
- Cai, J., H. Ma, F. Huang, D. Zhu, L. Zhao, Y. Yang, J. Bi, and T. Zhang. 2014. 'Low expression of RSK4 predicts poor prognosis in patients with colorectal cancer', *Int J Clin Exp Pathol*, 7: 4959-70.
- Cargnello, M., and P. P. Roux. 2011. 'Activation and function of the MAPKs and their substrates, the MAPK-activated protein kinases', *Microbiol Mol Biol Rev*, 75: 50-83.
- Cargnello, M., J. Tcherkezian, J. F. Dorn, E. L. Huttlin, P. S. Maddox, S. P. Gygi, and P. P. Roux. 2012. 'Phosphorylation of the eukaryotic translation initiation factor 4E-transporter (4E-T) by c-Jun N-terminal kinase promotes stress-dependent P-body assembly', *Mol Cell Biol*, 32: 4572-84.
- Carnahan, R. H., A. Rokas, E. A. Gaucher, and A. B. Reynolds. 2010. 'The molecular evolution of the p120-catenin subfamily and its functional associations', *PLoS One*, 5: e15747.
- Carriere, A., H. Ray, J. Blenis, and P. P. Roux. 2008. 'The RSK factors of activating the Ras/MAPK signaling cascade', *Front Biosci*, 13: 4258-75.
- Caslavsky, J., Z. Klimova, and T. Vomastek. 2013. 'ERK and RSK regulate distinct steps of a cellular program that induces transition from multicellular epithelium to single cell phenotype', *Cell Signal*, 25: 2743-51.
- Choi, H., B. Larsen, Z. Y. Lin, A. Breitkreutz, D. Mellacheruvu, D. Fermin, Z. S. Qin, M. Tyers, A. C. Gingras, and A. I. Nesvizhskii. 2011. 'SAINT: probabilistic scoring of affinity purification-mass spectrometry data', *Nat Methods*, 8: 70-3.
- Clark, D. E., T. M. Errington, J. A. Smith, H. F. Frierson, Jr., M. J. Weber, and D. A. Lannigan. 2005. 'The serine/threonine protein kinase, p90 ribosomal S6 kinase, is an important regulator of prostate cancer cell proliferation', *Cancer Res*, 65: 3108-16.

- Cuesta, R., and M. K. Holz. 2016. 'RSK-mediated down-regulation of PDCD4 is required for proliferation, survival, and migration in a model of triple-negative breast cancer', *Oncotarget*, 7: 27567-83.
- Davis, M. A., R. C. Ireton, and A. B. Reynolds. 2003. 'A core function for p120-catenin in cadherin turnover', *J Cell Biol*, 163: 525-34.
- Dhomen, N., and R. Marais. 2007. 'New insight into BRAF mutations in cancer', *Curr Opin Genet Dev*, 17: 31-9.
- Doehn, U., C. Hauge, S. R. Frank, C. J. Jensen, K. Duda, J. V. Nielsen, M. S. Cohen, J. V. Johansen, B. R. Winther, L. R. Lund, O. Winther, J. Taunton, S. H. Hansen, and M. Frodin. 2009. 'RSK is a principal effector of the RAS-ERK pathway for eliciting a coordinate promotile/invasive gene program and phenotype in epithelial cells', *Mol Cell*, 35: 511-22.
- Eng, J. K., T. A. Jahan, and M. R. Hoopmann. 2013. 'Comet: an open-source MS/MS sequence database search tool', *Proteomics*, 13: 22-4.
- Fukumoto, Y., Y. Shintani, A. B. Reynolds, K. R. Johnson, and M. J. Wheelock. 2008. 'The regulatory or phosphorylation domain of p120 catenin controls E-cadherin dynamics at the plasma membrane', *Exp Cell Res*, 314: 52-67.
- Galan, J. A., K. M. Geraghty, G. Lavoie, E. Kanshin, J. Tcherkezian, V. Calabrese, G. R. Jeschke, B. E. Turk, B. A. Ballif, J. Blenis, P. Thibault, and P. P. Roux. 2014. 'Phosphoproteomic analysis identifies the tumor suppressor PDCD4 as a RSK substrate negatively regulated by 14-3-3', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 111: E2918-27.
- Gawecka, J. E., S. S. Young-Robbins, F. J. Sulzmaier, M. J. Caliva, M. M. Heikkila, M. L. Matter, and J. W. Ramos. 2012. 'RSK2 protein suppresses integrin activation and fibronectin matrix assembly and promotes cell migration', *J Biol Chem*, 287: 43424-37.
- Gumbiner, B. M. 2005. 'Regulation of cadherin-mediated adhesion in morphogenesis', *Nat Rev Mol Cell Biol*, 6: 622-34.
- Halbleib, J. M., and W. J. Nelson. 2006. 'Cadherins in development: cell adhesion, sorting, and tissue morphogenesis', *Genes Dev*, 20: 3199-214.
- Hariharan, V., A. Asimaki, J. E. Michaelson, E. Plovie, C. A. MacRae, J. E. Saffitz, and H. Huang. 2014. 'Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy mutations alter shear response without changes in cell-cell adhesion', *Cardiovasc Res*, 104: 280-9.
- Houles, T., S. P. Gravel, G. Lavoie, S. Shin, M. Savall, A. Meant, B. Grondin, L. Gaboury, S. O. Yoon, J. St-Pierre, and P. P. Roux. 2018. 'RSK Regulates PFK-2 Activity to Promote Metabolic Rewiring in Melanoma', *Cancer Res*, 78: 2191-204.

- Jeanes, A., C. J. Gottardi, and A. S. Yap. 2008. 'Cadherins and cancer: how does cadherin dysfunction promote tumor progression?', *Oncogene*, 27: 6920-9.
- Kang, S., S. Elf, K. Lythgoe, T. Hitosugi, J. Taunton, W. Zhou, L. Xiong, D. Wang, S. Muller, S. Fan, S. Y. Sun, A. I. Marcus, T. L. Gu, R. D. Polakiewicz, Z. G. Chen, F. R. Khuri, D. M. Shin, and J. Chen. 2010. 'p90 ribosomal S6 kinase 2 promotes invasion and metastasis of human head and neck squamous cell carcinoma cells', *J Clin Invest*, 120: 1165-77.
- Kean, M. J., A. L. Couzens, and A. C. Gingras. 2012. 'Mass spectrometry approaches to study mammalian kinase and phosphatase associated proteins', *Methods*, 57: 400-8.
- Kedersha, N., G. Stoecklin, M. Ayodele, P. Yacono, J. Lykke-Andersen, M. J. Fritzler, D. Scheuner, R. J. Kaufman, D. E. Golan, and P. Anderson. 2005. 'Stress granules and processing bodies are dynamically linked sites of mRNP remodeling', *J Cell Biol*, 169: 871-84.
- Keller, A., A. I. Nesvizhskii, E. Kolker, and R. Aebersold. 2002. 'Empirical statistical model to estimate the accuracy of peptide identifications made by MS/MS and database search', *Anal Chem*, 74: 5383-92.
- Kessner, D., M. Chambers, R. Burke, D. Agus, and P. Mallick. 2008. 'ProteoWizard: open source software for rapid proteomics tools development', *Bioinformatics*, 24: 2534-6.
- Kourtidis, A., M. Yanagisawa, D. Huvelde, J. A. Copland, and P. Z. Anastasiadis. 2015. 'Pro-Tumorigenic Phosphorylation of p120 Catenin in Renal and Breast Cancer', *PLoS One*, 10: e0129964.
- Lavoie, H., and M. Therrien. 2015. 'Regulation of RAF protein kinases in ERK signalling', *Nat Rev Mol Cell Biol*, 16: 281-98.
- Lawrence, M. C., A. Jivan, C. Shao, L. Duan, D. Goad, E. Zaganjor, J. Osborne, K. McGlynn, S. Stippec, S. Earnest, W. Chen, and M. H. Cobb. 2008. 'The roles of MAPKs in disease', *Cell Res*, 18: 436-42.
- Liu, G., J. Zhang, B. Larsen, C. Stark, A. Breitkreutz, Z. Y. Lin, B. J. Breitkreutz, Y. Ding, K. Colwill, A. Pasculescu, T. Pawson, J. L. Wrana, A. I. Nesvizhskii, B. Raught, M. Tyers, and A. C. Gingras. 2010. 'ProHits: integrated software for mass spectrometry-based interaction proteomics', *Nat Biotechnol*, 28: 1015-7.
- Ma, L. W., Z. T. Zhou, Q. B. He, and W. W. Jiang. 2012. 'Phosphorylated p120-catenin expression has predictive value for oral cancer progression', *J Clin Pathol*, 65: 315-9.
- Michaloglou, C., L. C. Vredeveld, W. J. Mooi, and D. S. Peeper. 2008. 'BRAF(E600) in benign and malignant human tumours', *Oncogene*, 27: 877-95.

- Moritz, A., Y. Li, A. Guo, J. Villen, Y. Wang, J. MacNeill, J. Kornhauser, K. Sprott, J. Zhou, A. Possemato, J. M. Ren, P. Hornbeck, L. C. Cantley, S. P. Gygi, J. Rush, and M. J. Comb. 2010. 'Akt-RSK-S6 kinase signaling networks activated by oncogenic receptor tyrosine kinases', *Sci Signal*, 3: ra64.
- Murphy, L. O., and J. Blenis. 2006. 'MAPK signal specificity: the right place at the right time', *Trends Biochem Sci*, 31: 268-75.
- Peglion, F., F. Llense, and S. Etienne-Manneville. 2014. 'Adherens junction treadmill during collective migration', *Nat Cell Biol*, 16: 639-51.
- Reynolds, A. B., D. J. Roesel, S. B. Kanner, and J. T. Parsons. 1989. 'Transformation-specific tyrosine phosphorylation of a novel cellular protein in chicken cells expressing oncogenic variants of the avian cellular src gene', *Mol Cell Biol*, 9: 629-38.
- Rimm, D. L., E. R. Koslov, P. Kebriaei, C. D. Cianci, and J. S. Morrow. 1995. 'Alpha 1(E)-catenin is an actin-binding and -bundling protein mediating the attachment of F-actin to the membrane adhesion complex', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92: 8813-7.
- Romeo, Y., J. Moreau, P. J. Zindy, M. Saba-El-Leil, G. Lavoie, F. Dandachi, M. Baptissart, K. L. B. Borden, S. Meloche, and P. P. Roux. 2013. 'RSK regulates activated BRAF signalling to mTORC1 and promotes melanoma growth', *Oncogene*, 32: 2917-26.
- Romeo, Y., X. Zhang, and P. P. Roux. 2012. 'Regulation and function of the RSK family of protein kinases', *Biochem J*, 441: 553-69.
- Roux, K. J., D. I. Kim, M. Raida, and B. Burke. 2012. 'A promiscuous biotin ligase fusion protein identifies proximal and interacting proteins in mammalian cells', *J Cell Biol*, 196: 801-10.
- Roux, P. P., B. A. Ballif, R. Anjum, S. P. Gygi, and J. Blenis. 2004. 'Tumor-promoting phorbol esters and activated Ras inactivate the tuberous sclerosis tumor suppressor complex via p90 ribosomal S6 kinase', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101: 13489-94.
- Roux, P. P., and J. Blenis. 2004. 'ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions', *Microbiol Mol Biol Rev*, 68: 320-44.
- Roux, P. P., D. Shahbazian, H. Vu, M. K. Holz, M. S. Cohen, J. Taunton, N. Sonenberg, and J. Blenis. 2007. 'RAS/ERK signaling promotes site-specific ribosomal protein S6 phosphorylation via RSK and stimulates cap-dependent translation', *J Biol Chem*, 282: 14056-64.
- Rubinfeld, H., and R. Seger. 2005. 'The ERK cascade: a prototype of MAPK signaling', *Mol Biotechnol*, 31: 151-74.

- Sato, P. Y., W. Coombs, X. Lin, O. Nekrasova, K. J. Green, L. L. Isom, S. M. Taffet, and M. Delmar. 2011. 'Interactions between ankyrin-G, Plakophilin-2, and Connexin43 at the cardiac intercalated disc', *Circ Res*, 109: 193-201.
- Schneider, M. R., and F. T. Kolligs. 2015. 'E-cadherin's role in development, tissue homeostasis and disease: Insights from mouse models: Tissue-specific inactivation of the adhesion protein E-cadherin in mice reveals its functions in health and disease', *Bioessays*, 37: 294-304.
- Schubbert, S., K. Shannon, and G. Bollag. 2007. 'Hyperactive Ras in developmental disorders and cancer', *Nat Rev Cancer*, 7: 295-308.
- Shevchenko, A., M. Wilm, O. Vorm, and M. Mann. 1996. 'Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels', *Anal Chem*, 68: 850-8.
- Shi, G. X., W. S. Yang, L. Jin, M. L. Matter, and J. W. Ramos. 2018. 'RSK2 drives cell motility by serine phosphorylation of LARG and activation of Rho GTPases', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 115: E190-E99.
- Shteynberg, D., E. W. Deutsch, H. Lam, J. K. Eng, Z. Sun, N. Tasman, L. Mendoza, R. L. Moritz, R. Aebersold, and A. I. Nesvizhskii. 2011. 'iProphet: multi-level integrative analysis of shotgun proteomic data improves peptide and protein identification rates and error estimates', *Mol Cell Proteomics*, 10: M111 007690.
- Sulzmaier, F. J., and J. W. Ramos. 2013. 'RSK isoforms in cancer cell invasion and metastasis', *Cancer Res*, 73: 6099-105.
- Teo, G., G. Liu, J. Zhang, A. I. Nesvizhskii, A. C. Gingras, and H. Choi. 2014. 'SAINTexpress: improvements and additional features in Significance Analysis of INTeractome software', *J Proteomics*, 100: 37-43.
- Valenta, T., G. Hausmann, and K. Basler. 2012. 'The many faces and functions of beta-catenin', *EMBO J*, 31: 2714-36.
- van Hengel, J., and F. van Roy. 2007. 'Diverse functions of p120ctn in tumors', *Biochim Biophys Acta*, 1773: 78-88.
- Vik, T. A., and J. W. Ryder. 1997. 'Identification of serine 380 as the major site of autophosphorylation of Xenopus pp90rsk', *Biochem Biophys Res Commun*, 235: 398-402.
- Woo, M. S., Y. Ohta, I. Rabinovitz, T. P. Stossel, and J. Blenis. 2004. 'Ribosomal S6 kinase (RSK) regulates phosphorylation of filamin A on an important regulatory site', *Mol Cell Biol*, 24: 3025-35.
- Zhou, Y., N. Yamada, T. Tanaka, T. Hori, S. Yokoyama, Y. Hayakawa, S. Yano, J. Fukuoka, K. Koizumi, I. Saiki, and H. Sakurai. 2015. 'Crucial roles of RSK in cell motility by catalysing serine phosphorylation of EphA2', *Nat Commun*, 6: 7679.

Figures

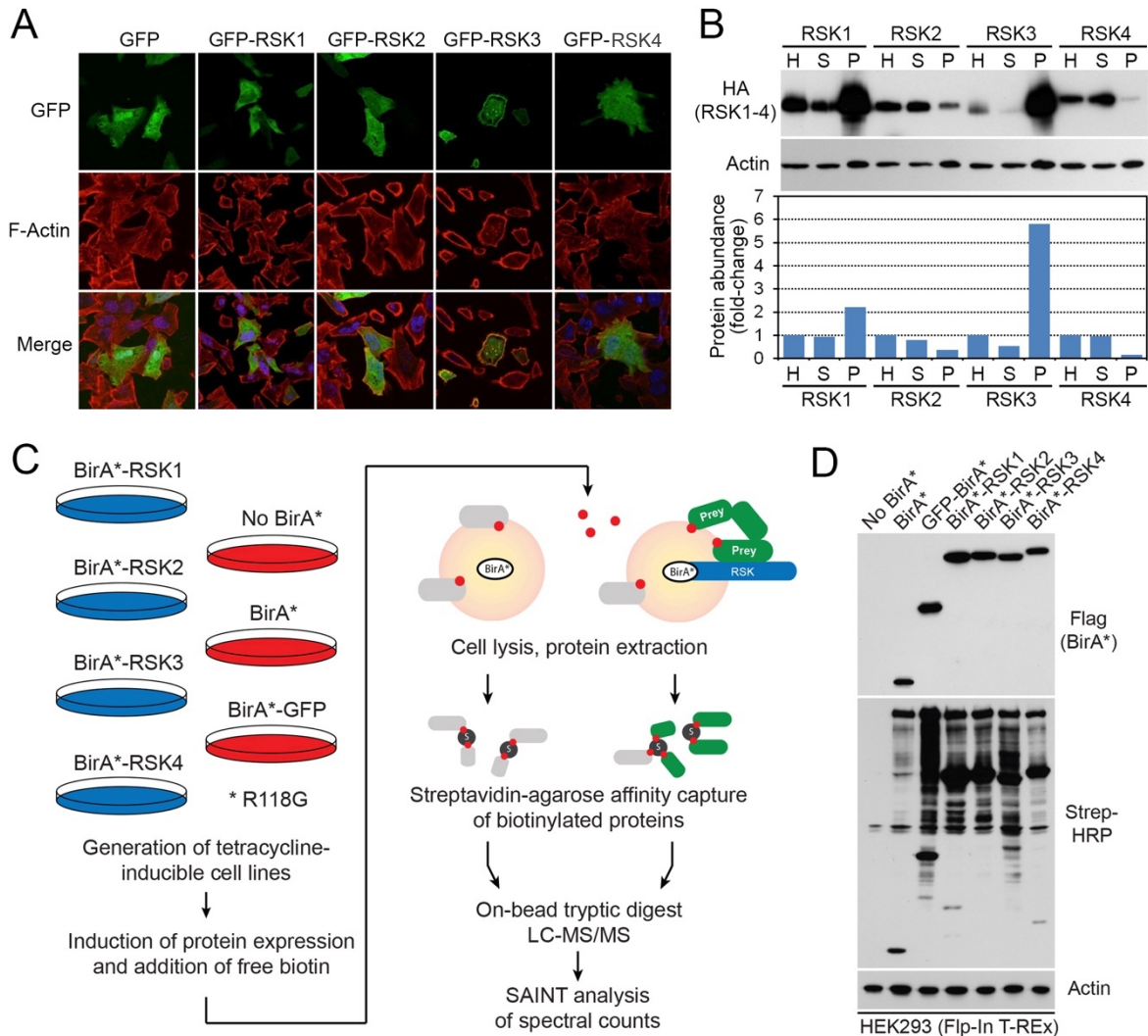


Figure 1. Proteomic strategy to identify RSK(1-4) proximity cellular partners

(A) HeLa cells expressing GFP-tagged RSK(1-4) were imaged using immunofluorescence microscopy. Cells were stained with phalloidin to visualize the actin cytoskeleton and DAPI to visualize nuclei. **(B)** HEK293 cells transfected with HA-tagged RSK(1-4) were lysed using non-ionic detergent. Homogenate cell lysates were divided in three different fractions (H: Homogenate, S: Soluble and P: Pellet). Bands of the Western Blot were quantified for intensity using MultiGauge software. **(C)** Schematic representation of the different conditions analyzed using BioID. Each RSK isoforms was fused to a N-terminal

tag consisting of the FLAG epitope and the mutant E. coli biotin conjugating protein BirA-R118G (BirA*) in a tetracycline inducible system. In presence of tetracycline and biotin, the expressed baits were able to biotinylate proximity cellular components on lysine residues. Following cell lysis under stringent buffer conditions, biotinylated proteins were affinity purified using streptavidin beads. Streptavidin-bound proteins were washed and subjected to trypsin proteolysis, and the peptides were identified using LC-MS/MS. **(D)** HEK293 Flp-In T-REx stable cell lines were treated with tetracycline in the presence of biotin for 24 hrs to induce baits expression and proximity biotinylation. Baits expression and biotinylation pattern were monitored using flag antibody and Streptavidin-HRP, respectively.

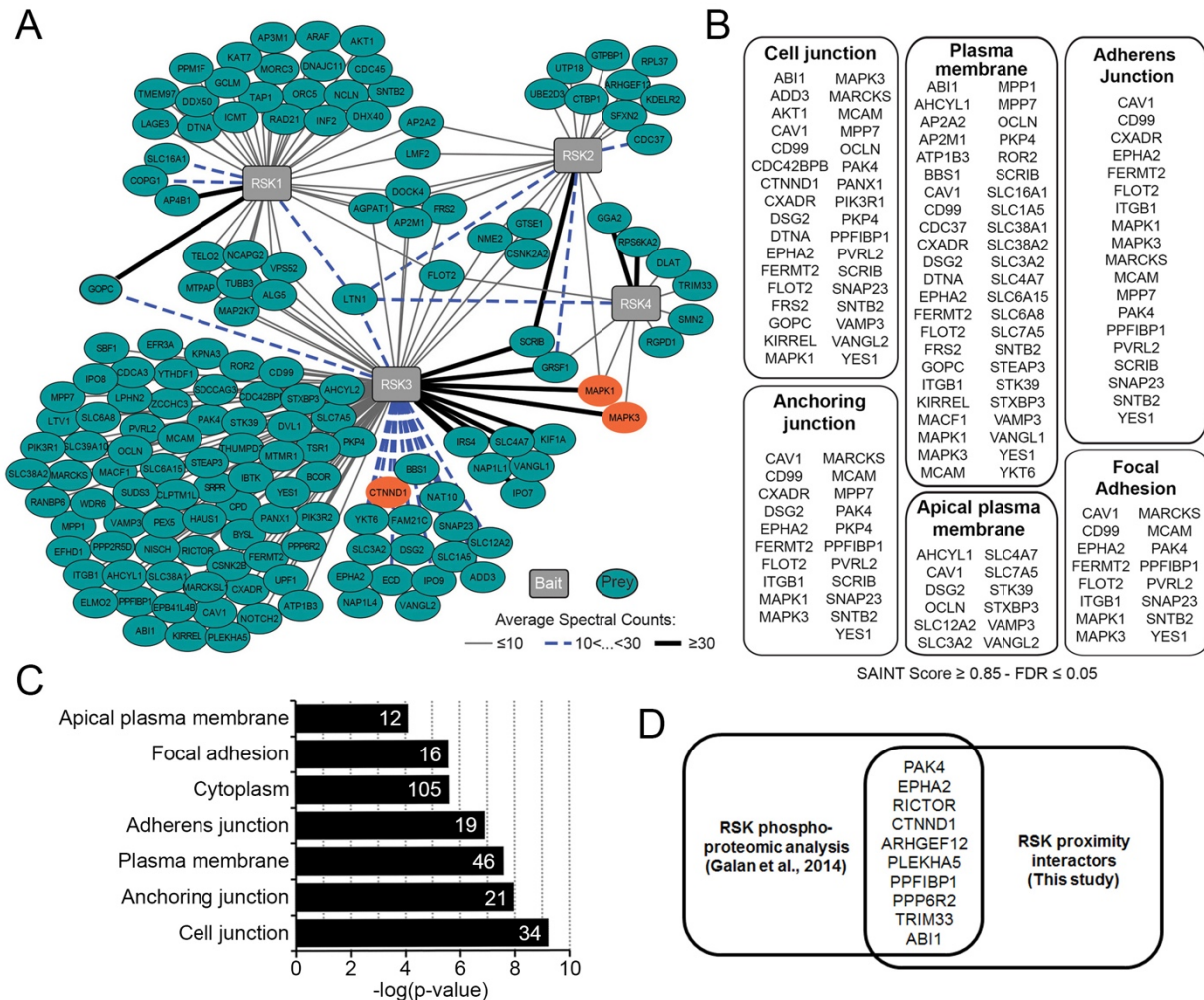


Figure 2. *In vivo* characterization of RSK kinases interactome

(A) Detailed interactions for all preys identified by BioID. Interactors are organized with respect to associated baits, and relative levels are shown using normalized spectral counts. Upstream protein kinases ERK1 (MAPK1) and ERK2 (MAPK3) are shown in orange, as well as the interactor analyzed in this study (CTNND1, p120ctn). (B) Protein identified for specific cellular components from (A). (C) Gene ontology (GO) enrichments for cellular components and molecular functions. (D) Venn diagram showing the overlap of protein identified with the BioID experiment and a previous RSK phosphoproteomic study (Galan et al. 2014).

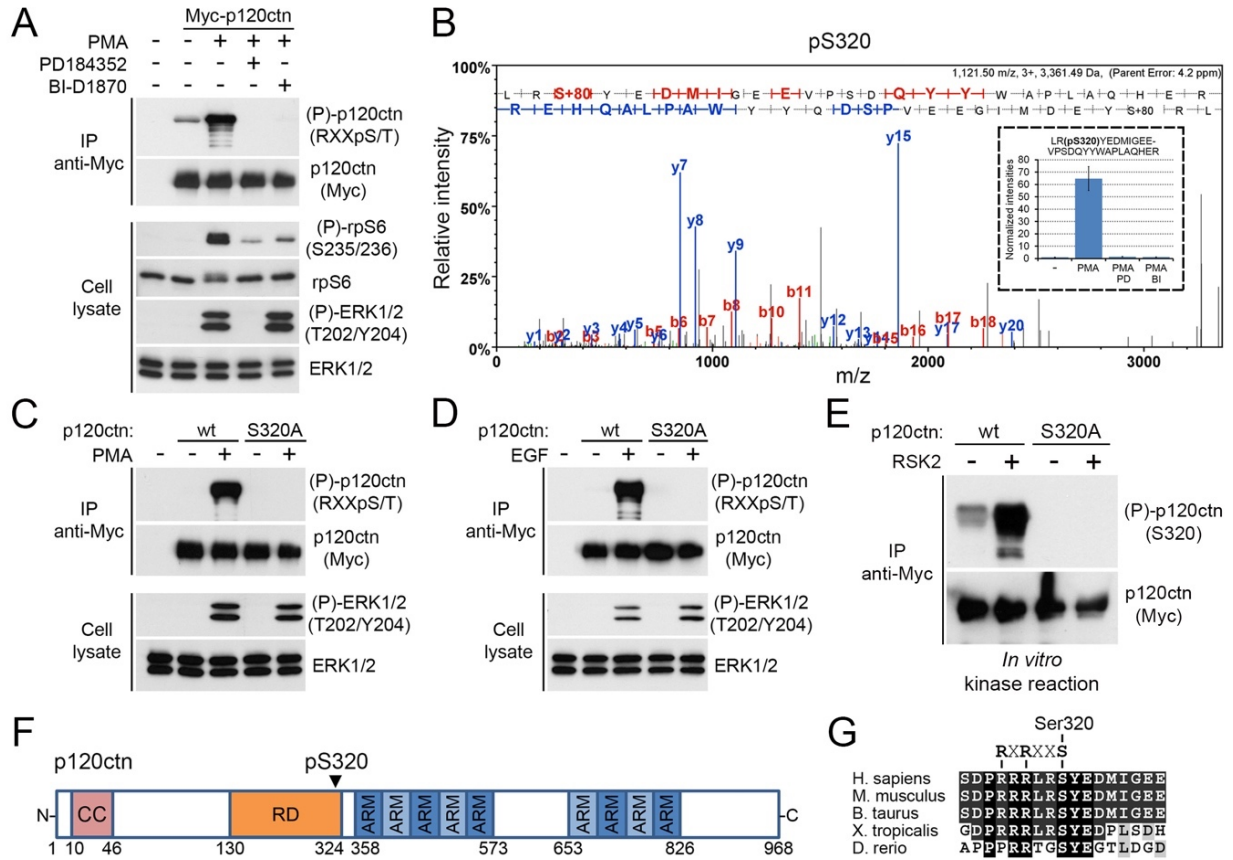


Figure 3. RSK phosphorylates p120ctn at Ser320

(A) HEK293 cells were transfected with an empty vector or Myc-tagged p120ctn, serum-starved overnight and pretreated with PD184352 (10 μ M) or LJM685 (10 μ M) for 30 min before PMA (100 ng/mL) stimulation. Immunoprecipitated (IP) Myc-p120ctn was then assayed for phosphorylation with phosphomotif antibody that recognize the RXXpS/T consensus motif. Protein lysates were resolved by SDS-PAGE and analyzed by immunoblotting with the indicated antibodies. (B) Phosphorylation of human p120ctn was confirmed via high-resolution MS/MS sequencing using immunoprecipitated p120ctn under the same conditions as in (A). After subsequent SDS-PAGE separation, bands corresponding to p120ctn were excised and proteins were digested in gel with trypsin for relative quantification. (Inset) Relative abundance of phosphorylated S320 across the four conditions normalized with respect to overall p120ctn abundance. (C, D) HEK293 cells were transfected with Wt p120ctn or potential RSK phosphorylation site mutant (S320A),

serum starved overnight, and stimulated with PMA (100 ng/mL) or EGF (25 ng/mL). Immunoprecipitated (IP) Myc-p120ctn and protein lysates were analyzed as in (A). **(E)** Recombinant-activated RSK2 was incubated with immunoprecipitated p120ctn Wt or the non-phosphorylatable mutant S320A in a kinase reaction. Immunoprecipitated proteins were resolved by SDS-PAGE and analyzed by immunoblotting with the indicated antibodies. **(F)** Schematic representation of p120ctn. (CC: Coiled Coil, RD: Regulatory Domain, ARM: Armadillo-Repeats). **(G)** Sequence surrounding Ser320 in p120ctn from various species were aligned to show the evolutionary conservation of the S320 residue within an RSK consensus motif RXRXXS, where X is any amino acid.

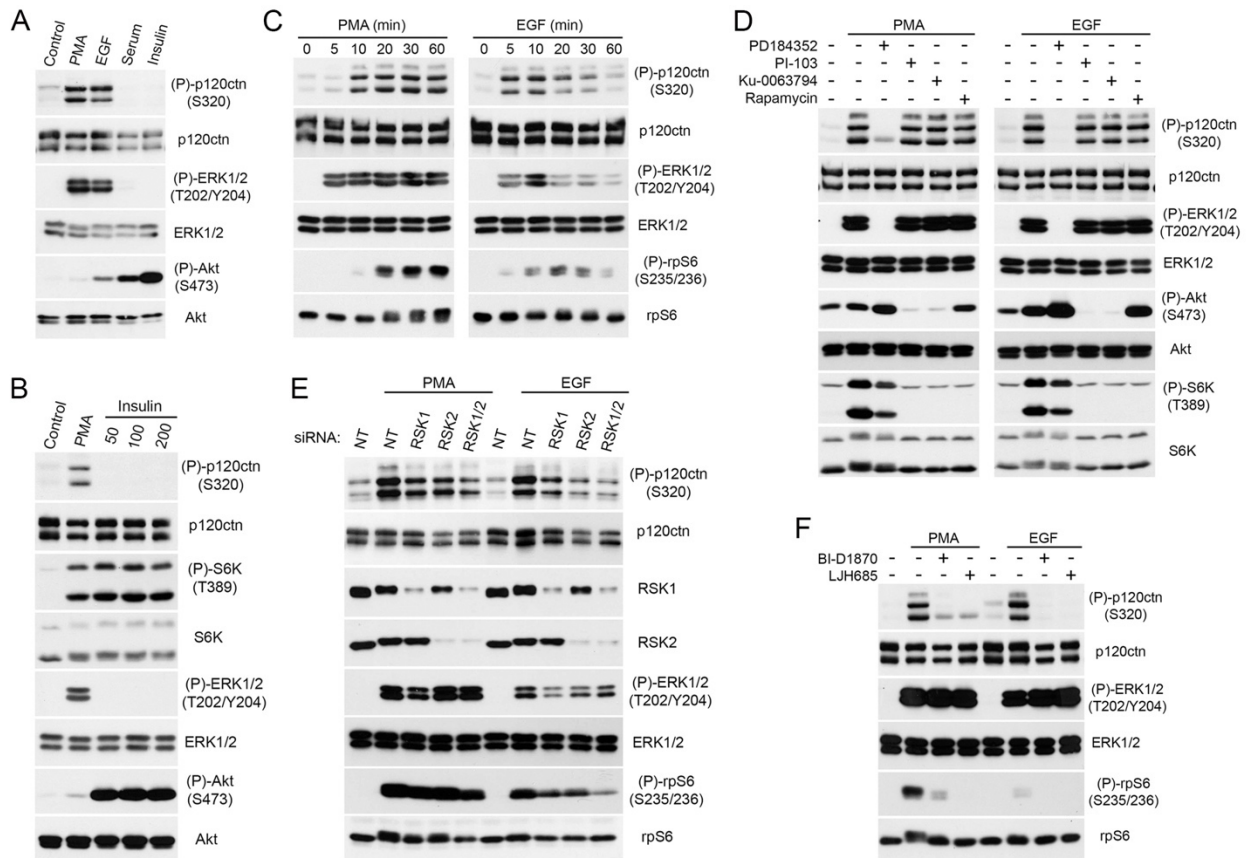


Figure 4. The Ras/MAPK pathway mediated Ser320 phosphorylation on p120ctn is RSK-dependent

(A) HEK293 cells were serum-starved overnight before stimulation for 10-30 min with agonists of the Ras/MAPK and PI3K/Akt pathways. Protein lysates were resolved by SDS-PAGE and analyzed by immunoblotting with the indicated antibodies. (B) HEK293 cells were serum-starved overnight before PMA (100 ng/mL) or insulin stimulation at increasing concentrations ranging from 50 to 200 nM. Protein lysates were analyzed as in (A). (C) HEK293 cells were serum-starved overnight before a time course of PMA (100 ng/mL) or EGF (25 ng/mL) stimulation. Extracts were prepared at the indicated times and analyzed as in (A). (D) HEK293 cells were serum-starved overnight and pretreated with PD184352 (10 μ M), PI-103 (1 μ M), Ku-0063794 (10 μ M) or rapamycin (25 nM) for 30 min before PMA (100 ng/mL) or EGF (25 ng/mL) stimulation. Protein lysates were analyzed as in (A). (E) HEK293 cells were transfected with siRNA targeted against a scrambled sequence (NT), RSK1, RSK2 or both, serum-starved and stimulated either with PMA (100 ng/mL)

or EGF (25 ng/mL). Protein lysates were analyzed as in (A). **(F)** HEK293 cells were serum-starved and pretreated with BI-D1870 (10 μ M) or LJM685 (10 μ M) for 30 min before PMA (100 ng/mL) or EGF (25 ng/mL) stimulation. Protein lysates were analyzed as in (A).

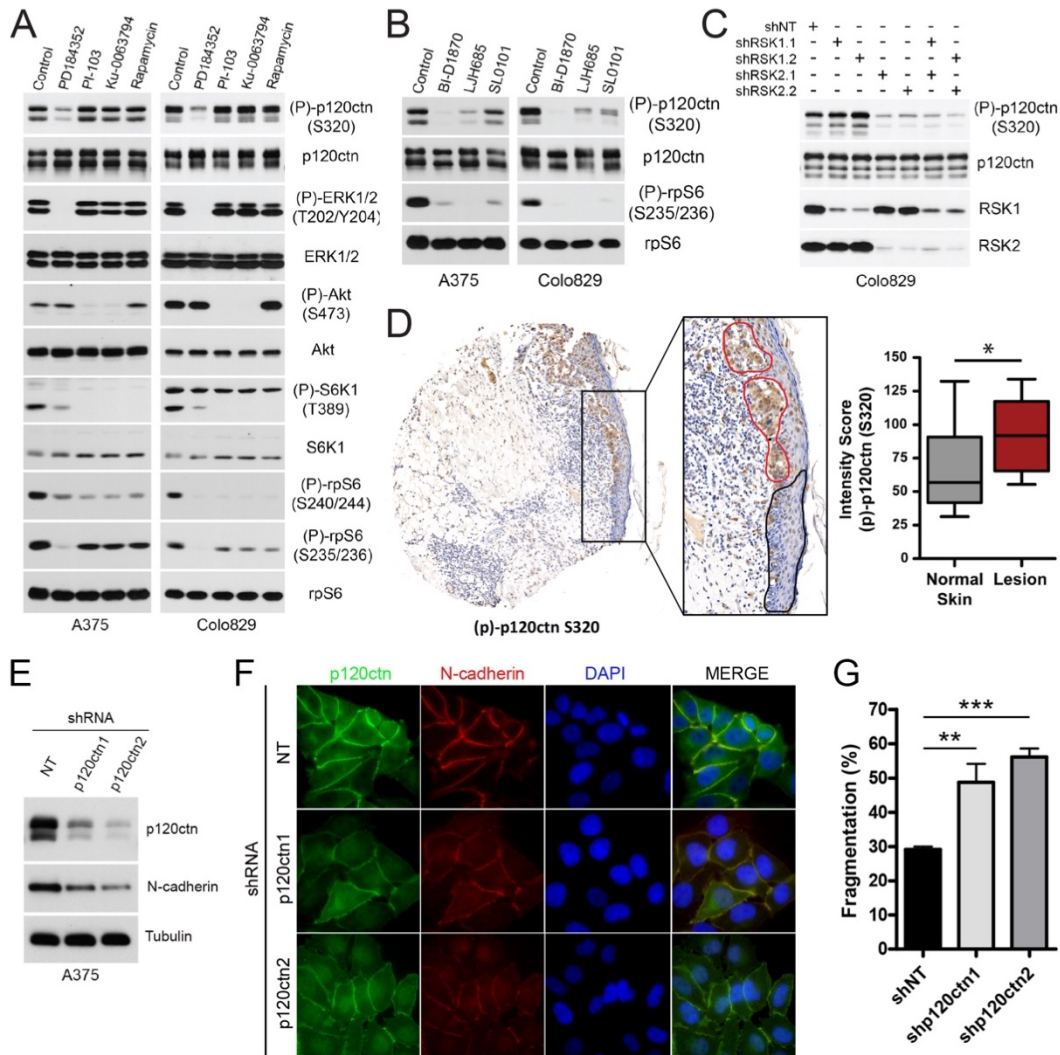


Figure 5. p120ctn is phosphorylated on Ser320 and maintains cell-cell adhesion integrity in BRAF-mutated melanoma cells

(A) A375 and Colo829 cells were serum-starved overnight and pretreated with PD184352 (10 μ M), PI-103 (1 μ M), Ku-0063794 (10 μ M) or rapamycin (25 nM) for 30 min. Endogenous p120ctn phosphorylation was assessed by immunoblotting. (B) Same as (A), except that A375 and Colo829 cells were treated with LJH685 (10 μ M), BI-D1870 (10 μ M) or SL0101 (50 μ M) for 30 min. (C) RNAi was performed in Colo829 cells infected with shRNA against RSK1 (shRSK1.1 or shRSK1.2) or RSK2 (shRSK2.1 or shRSK2.2) or both to generate stable knockdowns of RSK1 and RSK2. shRNA efficiency and p120ctn phosphorylation was then evaluated through immunoblotting with the indicated antibodies. (D) IHC analysis of p120ctn phospho-S320 in human melanoma tissue microarrays. A

representative image of normal skin and melanoma tissues label showing increased labeling with phospho-S320 antibody. p120ctn phospho-S320 was quantified in normal skin (black) and lesion tissues (red) in the same IHC for each case. Values represent the quantification of p120ctn phospho-S320 (9 patients). **(E)** A375 cells were knocked down for p120ctn using two different shRNA constructs (shp120ctn1/2). shRNA efficiency was assessed by immunoblotting with the anti-p120ctn antibody. **(F)** Immunofluorescence images of growing A375 cells stably expressing a control shRNA (shNT) or shRNAs against p120ctn (shp120ctn1/2). Cells were stained with anti-p120ctn to monitor p120ctn expression, with anti-N-cadherin to monitor N-cadherin expression and DAPI to visualize nuclei. **(G)** Dispase treatment caused separation of the monolayer in all cells treated. Mechanical stress following dispase treatment led to the breakdown of A375 cells stably expressing a control shRNA (shNT) or shRNAs against p120ctn (shp120ctn1/2). Bar graph showing the average number of single cells recorded under the three conditions tested. N=3 for all conditions. (Fragmentation: ratio of single cell/total cell number per plate).

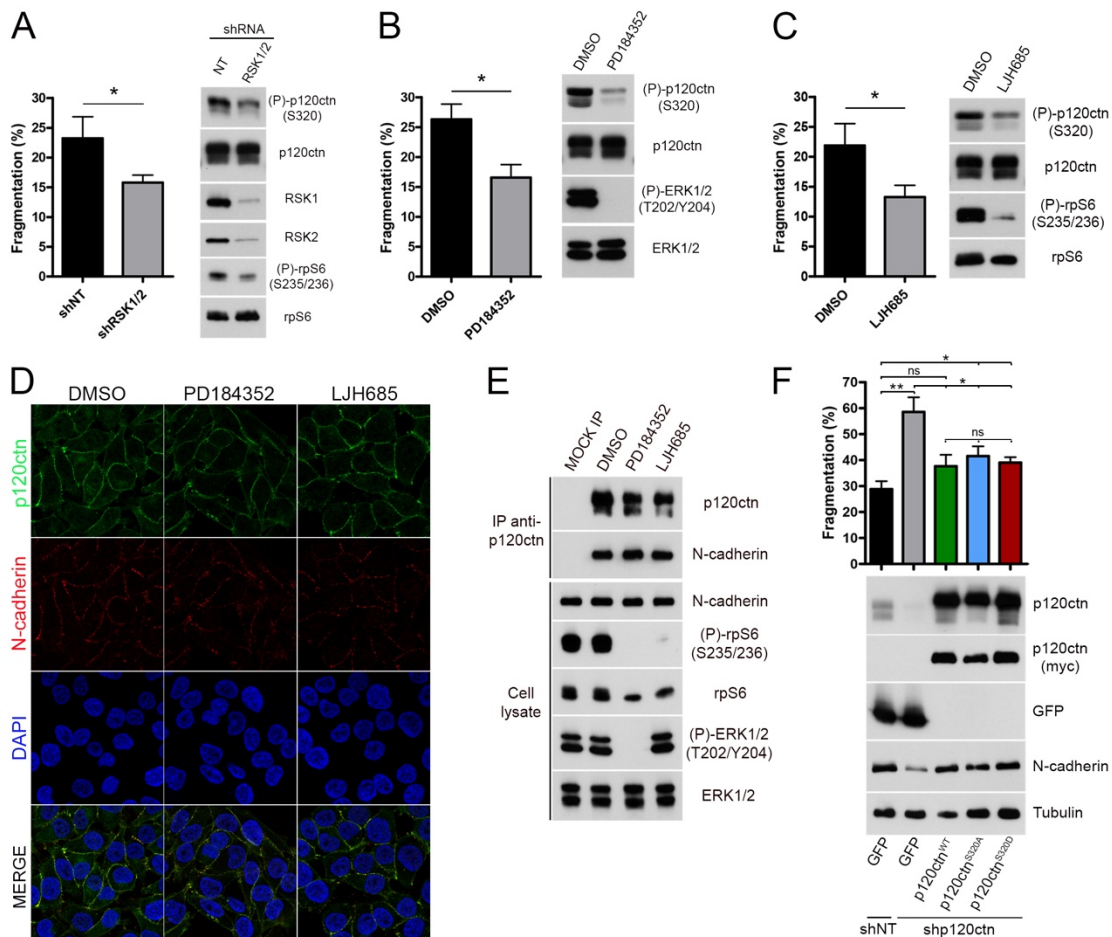
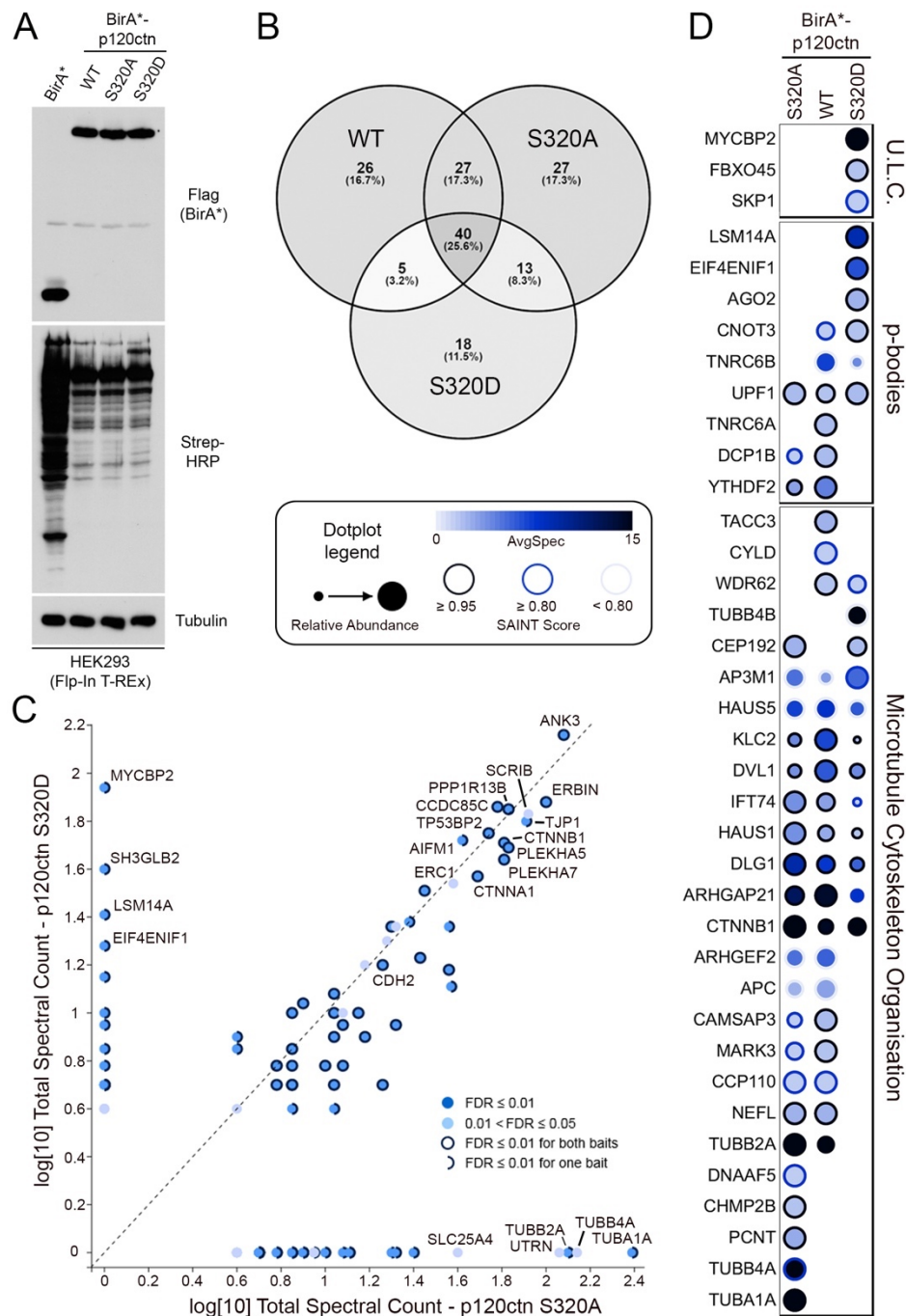


Figure 6. RSK activity is involved in intercellular adhesion strength

(A) Disperse treatment caused separation of the monolayer in all cells treated. Mechanical stress following disperse led to the breakdown of A375 cells stably expressing a control shRNA (shNT) or shRNA against RSK1/2 (shRSK1/2). Bar graph showing the average number of single cells recorded under the three conditions tested. N=3 for all conditions. (Fragmentation: ratio of single cell/total cell number per plate). Protein lysates from each condition were analyzed by immunoblotting with the indicated antibodies. (B, C) As in (A), except that A375 cells were pretreated during 24 hrs with PD184352 (10 μ M) or LJM685 (10 μ M) before disperse treatment. (D) A375 were imaged using immunofluorescence microscopy after a treatment with PD184352 (10 μ M) or LJM685 (10 μ M) for 24 hrs. Cells were stained with anti-p120ctn to monitor p120ctn expression, with anti-N-cadherin to monitor N-cadherin expression and DAPI to visualize nuclei. (E) A375

cells were treated with PD184352 (10 μ M) or LJH685 (10 μ M) for 24 hrs. p120ctn was immunoprecipitated with anti-p120ctn antibody, and immunoblotting was performed on immunoprecipitates and cell lysates using indicated antibodies. **(F)** As in (A), except that A375 cells were stably expressing a control shRNA (shNT) and GFP protein or shRNA against endogenous p120ctn and GFP protein or exogenous form of p120ctn (p120ctnWT, p120ctnS320A or p120ctnS320D) before disperse treatment. Bottom part shows protein lysates from each condition analyzed by immunoblotting with the indicated antibodies. Depletion or expression of endogenous/exogenous p120ctn in each condition was assessed using p120ctn antibody.



and biotinylation pattern were monitored using flag antibody and Streptavidin-HRP, respectively. **(B)** Venn diagram showing the overlap of proximity interactors identified by BioID with the three different baits. Only the preys with a SAINT Score > 0.5 were taken in account. **(C)** Scatterplots display the \log_{10} total spectral counts of preys identified for the BirA*-p120ctnS320D and BirA*-p120ctnS320A baits. Notable preys are indicated and filled in different colors, with details in the legend inset. The diagonal dot line maps to equal spectral count across the two baits. **(D)** Dotplot of selected interaction partners identified by BioID. Node color represents the average spectral count sum ($n=3$), the node edge color corresponds to the SAINT Score and the node size displays the relative abundance of a given prey across the three conditions compared.

Supplemental Figures

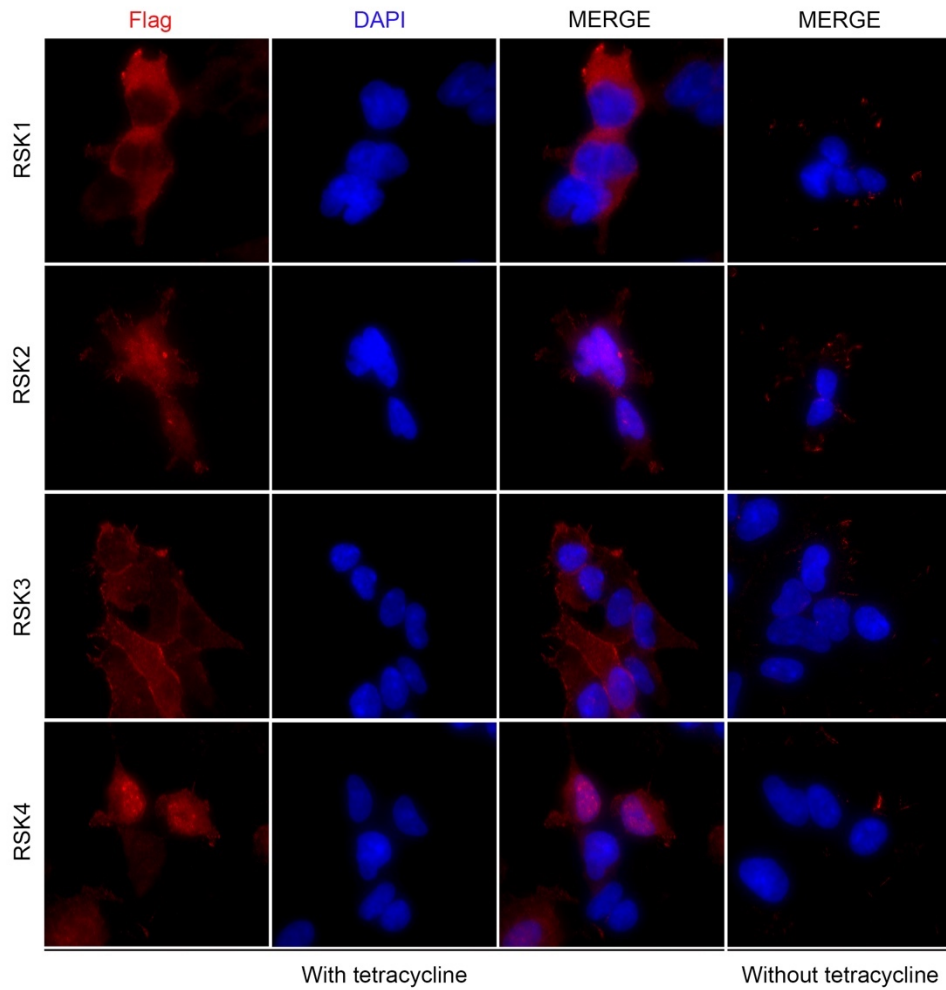


Figure S1. Baits expression are sensitive to tetracycline treatment

HEK293 Flp-In T-REx stable cell lines were treated with tetracycline to induce baits expression. Cells were stained with flag antibody (red) to visualize baits expression and DAPI to visualize nuclei.

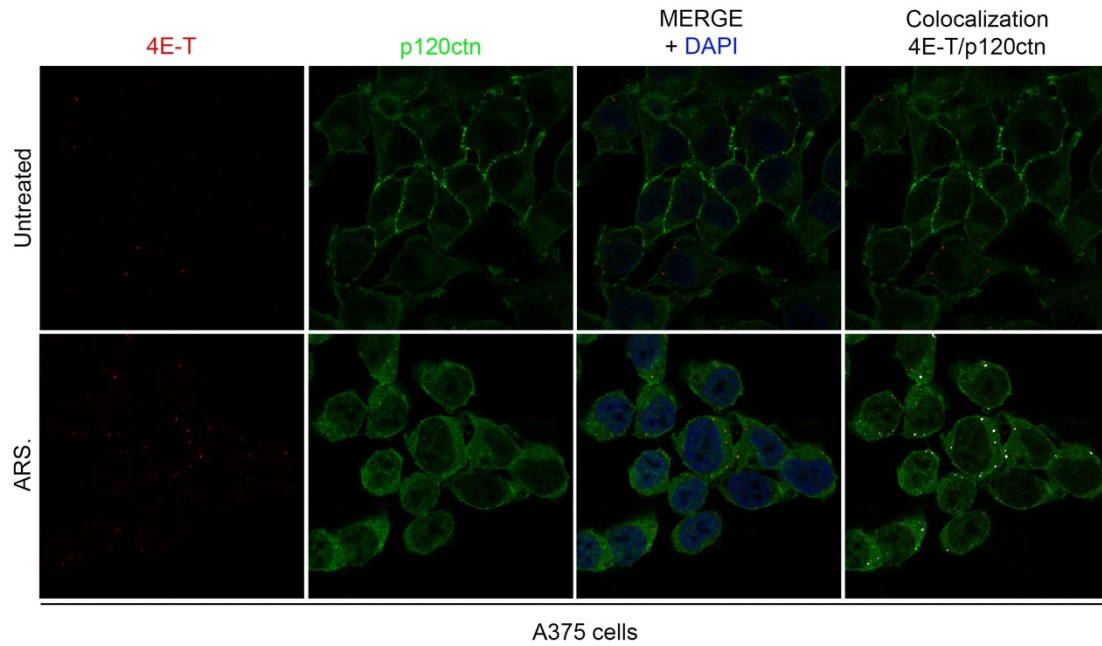


Figure S2. p120ctn is enriched in p-bodies in response to oxidative stress

A375 cells were grown in presence of serum and treated for 45 min with arsenite (0.5 mM). Endogenous p120ctn (green) and 4E-T (stress granule component, red) were analysed by immunofluorescence.

Contribution des auteurs

Antoine Méant a participé à la conception du projet et à la génération et l'analyse des résultats (Fig. 1, 2, 3, 5, 6, 7 et S1), a réalisé les analyses de spectrométrie de masse (Fig. 1, 2 et 7), ainsi que la conception des figures et la rédaction du manuscrit.

Beichen Gao, Flora Jung et Geneviève Lavoie ont participé à la génération des résultats (Fig. 4 et 5).

Joseph Tcherkezian a participé à la génération des résultats (Fig. 1).

Sami Nourreddine a participé à la génération des résultats (Fig. S2).

Anne-Claude Gingras a participé à la mise au point de l'approche protéomique.

Philippe P. Roux a participé à la conception du projet et des figures, ainsi qu'à la rédaction du manuscrit.

Chapitre 3 : The cell polarity protein Scribble is a regulator of RSK2 kinase activation

Antoine Méant¹, Julie Moreau¹, Jacob A. Galan¹, Maxym Wilk¹, Joseph Tcherkezian¹, Geneviève Lavoie¹, Yasaman Nouhi¹, Philippe P. Roux^{1,2}.

¹Institute for Research in Immunology and Cancer (IRIC), Université de Montréal, Montréal, Québec H3C 3J7, Canada.

²Pathology and Cell Biology, Faculty of Medicine, Université de Montréal, Montréal, Québec H3C 3J7, Canada.

Keywords: p90RSK; Scribble; PDZ; MAPK

Article in preparation.

Mise en Contexte

En parallèle de notre étude pour déterminer les partenaires cellulaires de proximité des kinases RSK avec la technique de BioID, nous avons voulu accentuer nos recherches sur la découverte d'interactions spécifiques au domaine PBM de chacune des quatre isoformes de RSK. Au démarrage de nos travaux, seulement une interaction dépendante du domaine PBM des RSK a été démontré dans la littérature. En effet, une étude a mis en avant la liaison entre l'isoforme RSK2 et Shank3, une protéine d'échafaudage retrouvée au niveau des synapses (Thomas et al. 2005). Les connaissances sur les interactions dépendantes du domaine PBM des RSK sont donc pauvres et nécessitent ainsi une étude plus approfondie.

Bien que la technique de BioID nous permette aussi d'identifier des partenaires cellulaires dépendants du domaine PBM, nous avons mis au point une deuxième approche de capture par affinité. En utilisant cette technique couplée à une analyse protéomique, nous avons été capable de déterminer plusieurs partenaires potentiels se liant spécifiquement au domaine PBM de chaque RSK. Nous avons alors trouvé que l'isoforme RSK2 se lie à la protéine Scribble, venant ainsi confirmer des données préliminaires déjà établies dans le laboratoire du Dr. Philippe Roux avant mon arrivée. Finalement, le domaine de liaison de ERK1/2 sur RSK2 étant limitrophe avec le domaine PBM, nos travaux nous ont poussé à étudier l'impact de cette liaison sur l'interaction entre RSK2 et ERK1/2, peu d'études montrant aujourd'hui une régulation de la liaison de ERK1/2 sur les kinases RSK (Roux, Richards, and Blenis 2003).

Ainsi, en déterminant le rôle de la liaison de Scribble sur RSK2, nous avons montré que cette interaction réduit l'activation de RSK2 par les kinases ERK1/2. Ces travaux ont donc permis d'une part d'identifier les partenaires cellulaires spécifiques au domaine PBM de chaque RSK, mais aussi de déterminer un nouveau mécanisme régulateur de l'activité des kinases RSK et donc de la voie de signalisation Ras/MAPK.

Abstract

Loss of expression or mislocalization of the cell polarity regulator Scribble is a frequent event in cancer development. Although little is known about the exact involvement of Scribble in this process, recent studies suggest a role in the regulation of the Ras/MAPK signalling pathway. Herein, we provide a direct mechanism for Scribble regulation of Ras/MAPK activity. We used an affinity-based purification approach to identify specific binding partners of the four RSK (p90 ribosomal S6 kinase) isoforms depending on their PBM (PDZ-binding motif). This proteomic approach resulted in the identification of Scribble as RSK2 specific binding partner. After demonstrating that RSK2 interacts with the PDZ domain 3 of Scribble, we found that this interaction inhibits RSK2 association with ERK1/2. Finally, we established that Scribble interaction with RSK2 reduces the activation of RSK2 kinase by ERK1/2. Together, these results indicate that Scribble association with RSK2 plays a key role in the control of Ras/MAPK signaling pathway activity.

Introduction

The Ras/MAPK pathway has a central role in transducing extracellular signals to cellular target proteins involved in several biological functions, such as cell growth and proliferation (Molina and Adjei 2006). This pathway is frequently deregulated, which leads to a variety of disorders and diseases, including many types of cancers (Kim and Choi 2010). Upon activation of the small GTPase Ras, this pathway activates Raf isoforms, which are Ser/Thr kinases frequently mutated in human cancers, such as melanoma (Michaloglou et al. 2008). Activated Raf phosphorylates MEK1/2, which themselves phosphorylate and activate the MAPKs ERK1/2 (Cargnello and Roux 2011). In turn, ERK1/2 phosphorylate several substrates including members of the p90 ribosomal S6 kinase (RSK) family of protein kinases (Romeo, Zhang, and Roux 2012).

The RSK family is comprised of four Ser/Thr kinases (RSK1–4) that belong to the AGC family of basophilic protein kinases and share 73–80% sequence identity (Houles and Roux 2018). These kinases also have a PDZ-binding motif (PBM) at their C-terminus, which is specific to each isoform and can potentially interact with PDZ domain-containing proteins. The RSK kinases have been shown to regulate a number of substrates involved in primary cellular functions, and accordingly, inhibition of their activity reduces the growth and proliferation of several cancer cell lines (Romeo et al. 2013; Houles et al. 2018). Consistent with this, RSK1 and RSK2 were shown to be overexpressed in breast and prostate cancers (Cuesta and Holz 2016; Clark et al. 2005), and hyperactivated in melanoma (Galan et al. 2014). Nevertheless, although RSK1/2 play an important role in cancer progression, little is known about the regulation of their activity after Ras/MAPK pathway activation.

Scribble protein is a component of the Scribble/Discs large-1 (Dlg)/Lethal-2-giant larvae (Lgl) polarity complex, localized at the basolateral side of the epithelial cell membrane (Su et al. 2012). In *Drosophila melanogaster* (Bilder and Perrimon 2000), and later extended to mammalian cells (Dow et al. 2007), experimental evidence implicates Scribble as a general regulator of directional cell motility and cell polarity, especially by the assembly of multiprotein complexes and the activation of small GTPase signaling at the leading edge of migrating cells (Nola et al. 2008; Osmani et al. 2006). Accordingly, loss-of-function Scribble mutants or depletion of Scribble has disrupted apical-basal

polarity and cooperated with oncogenic signals to enhance tumor cell migration, invasion, and survival (Wu, Pastor-Pareja, and Xu 2010; Feigin et al. 2014). Moreover, other studies have shown that Scribble can also affect cell signaling cascades. Human Scribble was shown to be able to inhibit the Ras/MAPK signalling pathway (Elsam, Martin, and Humbert 2013), with loss of Scribble enhancing Ras-induced cell invasion (Dow et al. 2008). However, the molecular mechanisms responsible for these regulations remain to be determined.

In this study, we used an affinity-based purification approach to identify specific binding partners of RSK isoforms depending on their PBM. This proteomic approach resulted in the identification of many potential cellular partners for the RSK kinases. Among them, we identified and characterized Scribble as RSK2 specific binding partners. After demonstrating RSK2 interacts with the PDZ domain 3 of Scribble, we found that this interaction inhibits RSK2 association with ERK1/2. Finally, we established that Scribble interaction with RSK2 reduces the activation of RSK2 kinase by ERK1/2. Therefore, these results will help understand the regulation of RSK kinase activity and provide a direct mechanism for Scribble regulation of Ras/MAPK.

Results

Global assessment of proteins that associate with the PDZ-binding motif of RSK.

To characterize the RSK interactome in cells dependent of their PBM, we devised an affinity-based approach. Each RSK isoform possess a PBM that differs from a single amino acid at position -1 from the C-terminus (Fig. 1A). Although this amino acid is not a major residue involved in the interaction between a PDZ domain and a PBM compared to amino acids at position 0 and -2 (Fig. 1B), we hypothesized that this residue could define interactors specific to the PBM of each RSK isoform. To specifically identify RSK-PBM interactors, we fused to glutathione S-transferase (GST) tag the last 30 amino acid of each RSK C-terminal tail with (RSK-CT) or without the PBM (RSK-CT Δ PBM) (Fig. 1C). As a source of client proteins, we used grinded and homogenized mouse brain tissue known to express many PDZ domain-containing proteins (Kim and Sheng 2004), which was subjected to RSK affinity purification with both full-length C-terminal tail and Δ PBM constructs. The GST-tag alone was used as subtractive fractionation step in which nonspecific interactions were removed. Following washes in lysis buffer, associated proteins were eluted and resolved by SDS-PAGE (Fig. 1D). Then, the proteins were in-gel digested with trypsin, and peptides were analyzed by liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS).

Using affinity-based approach, we found 78 different proteins as potential RSK-CT cellular partners with a SAINT score > 0.85 and FDR < 0.05 as statistical cutoff (Fig. 2). While some proteins identified were common for several RSK isoforms, potential specific cellular partners were found for each of them. According to our results, ERK1/2 were identified with the four RSK-CT isoforms, confirming the accuracy of our approach to find cell partners specific to the C-terminal tail of RSK (Gavin and Nebreda 1999). Moreover, several proteins have been identified with both RSK-CT and RSK-CT Δ PBM, whereas some are only found with the RSK-CT form. This result suggests that some identified preys interact specifically with the PBM of RSK kinases. Among these potential interactors, we found several proteins with at least one PDZ domain (Fig. 2, green). Interestingly, we identified the protein Scribble as a specific interactor of RSK2 isoform, reinforcing our data on a potential interaction between these two proteins (P.P.Roux, unpublished work).

Scribble is a specific binding partner of RSK2 isoform.

To confirm that Scribble is a binding partner of RSK2 isoform, we performed an immunoprecipitation. HEK293 cells were co-transfected with Myc-tagged Scribble and the four HA-tagged RSK isoforms, and immunoprecipitated RSK were analyzed for Scribble binding (Fig. 3A). Using this method, we found that Scribble is a cellular binding partner specific to RSK2 isoform. We also confirmed that endogenous Scribble interacts with immunoprecipitated HA-tagged RSK2 (Fig. 3B). Because another study has shown that Scribble is a binding partner of ERK1/2 kinases (Nagasaka, Pim, et al. 2010; Nagasaka, Massimi, et al. 2010), we wanted to confirm this interaction. As before, HEK293 cells were co-transfected with Myc-tagged Scribble and HA-tagged ERK1 or RSK2 and immunoprecipitated HA-tagged proteins were analyzed for Scribble binding. While we confirmed that Scribble interacts with RSK2, we did not see evidence for a clear interaction between Scribble and ERK1 (Fig. 3C). Moreover, we confirmed that Scribble did not interact with Akt or S6K1 proteins (Fig. 3D), two main members of the AGC family of basophilic protein kinases known to share common substrates and functions with RSK (Pearce, Komander, and Alessi 2010). Finally, to evaluate whether the Ras/MAPK pathway activation is responsible for Scribble and RSK2 interaction, we treated cells with different agonists. We found that potent agonists of the Ras/MAPK pathway including PMA and EGF did not alter the interaction between RSK2 and Scribble (Fig. 3E). In addition to this, in serum starved cells we observed that Scribble still binds RSK2 kinase, suggesting a constitutive interaction between these two proteins (Fig. 3F). Taken together, these results confirm that Scribble is a specific and constitutive binding partner of RSK2.

To better characterize the interaction between Scribble and RSK2 isoform, we performed additional experiments. HEK293 cells were co-transfected with Myc-tagged Scribble and HA-tagged wt-RSK2 or RSK2-L740A mutant, a construct comprising a modification on the last amino acid of RSK2. Immunoprecipitated RSK2 was analyzed for Scribble binding and we found that Scribble does not interact with RSK2 when there is a mutation in the PBM (Fig. 4A). Moreover, in order to identify the specific region of Scribble involved in the interaction with RSK2, we performed an immunoprecipitation

with specific isoforms of Scribble. HEK293 cells were co-transfected with HA-tagged wt-RSK2 or RSK2-L740A mutant and Myc-tagged Scribble full length (FL), Scribble without the N-terminal part before the PDZ1 (Δ Nt) or Scribble without the C-terminal part after the PDZ4 (Δ Ct) (Fig. 4B and C). We observed that all the different isoforms of Scribble interact with wt-RSK2 but not the L740A mutant, confirming that Scribble binds the PBM of RSK2 using a PDZ domain. Because these domains possess many similarities, we fused to a GST tag each PDZ domain of Scribble in order to perform a pulldown assay. As a source of client proteins, we used HEK293 cells transfected with HA-tagged wt-RSK2 or RSK2-L740A mutant. Following washes in lysis buffer, associated proteins were eluted and analyzed for RSK2 binding (Fig. 4D). Using this method, we identified that wt-RSK2 interact with the PDZ3 of Scribble.

Scribble inhibits RSK2 association with ERK1/2 and reduce RSK2 activation.

To activate the RSK kinases, ERK1/2 proteins bind to the KIM motif and phosphorylate the residue Thr573 (RSK1) in the activation loop of the C-terminal kinase domain (Sutherland, Campbell, and Cohen 1993). Since the KIM motif is close to the PBM (Fig. 1A), we hypothesized that the binding of Scribble to the PBM of RSK2 could affect the interaction between RSK2 and the ERK1/2 proteins. To examine this hypothesis, we transfected HEK293 cells with an increasing quantity of Myc-tagged Scribble and HA-tagged wt-RSK2. Immunoprecipitated RSK were analyzed for ERK1/2 binding and we found that the presence of Scribble protein reduces the interaction between RSK2 and ERK1/2, in serum-free and complete medium conditions (Fig. 5A. and B). Moreover, in HEK293 cells co-transfected with Scribble and wt-RSK2 or RSK2-L740A mutant, we observed that for the RSK2-L740A mutant the presence of Scribble does not modify the interaction with ERK1/2. These results suggest that the inhibition of the binding between ERK1/2 and RSK2 is due to the binding of Scribble on RSK2. In addition to this, we determined whether Scribble protein reduces the activation of RSK2 by ERK1/2. In HEK293 cells co-transfected with wt-RSK2 and an increasing quantity of Scribble, we found that the presence of Scribble protein reduces the phosphorylation of RSK2 on Thr573 residue (Fig. 5D), suggesting a decrease of RSK2 activation. Finally, this was further confirmed using a potent agonist of the Ras/MAPK pathway in HEK293 cells (Fig. 5E). A

time course stimulation using EGF lead to a strong phosphorylation of wt-RSK2 and RSK2-L740 at Thr573, whereas the phosphorylation was reduced for wt-RSK2 when co-transfected with Scribble. Together, our results bring new insights into the mechanisms by which Scribble interaction with RSK2 isoform reduces the activation of RSK2 by ERK1/2 and attenuates Ras/MAPK signaling in cells (Fig. 6).

Discussion

In this study, we established the first interactome of the C-terminal extremities of the RSK kinases. Using an affinity-based purification approach, we identified several potential cellular partners including the cell polarity regulator Scribble (Fig. 1 and 2). We characterized Scribble protein as a specific binding partner of RSK2 isoform (Fig. 3) and we found that this interaction occurs between Scribble PDZ domain 3 and the PBM of RSK2 (Fig. 4). Moreover, we revealed that this interaction inhibits the binding of ERK1/2 kinases on RSK2 (Fig.5). Finally, we established that Scribble interaction with RSK2 reduces the activation of RSK2 kinase by ERK1/2 (Fig. 5 and 6).

In the literature, only few interactions depending on the PBM of RSK kinases have been previously described. Indeed, one study highlighted the binding between the isoform RSK2 and Shank3, a scaffolding protein enriched at synapses (Thomas et al. 2005). Another study demonstrated the interaction between RSK1 and NHERF-1, an adaptor protein located at the cell membrane (Lim and Jou 2016). Thus, our study provides new insights into PBM-dependent interactions. Most of the identified RSK-PBM-related proteins have a PDZ domain (Fig. 2), suggesting a special relationship between RSK and the proteins containing these domains. Although RSK does not need a specific domain to bind its substrates (Romeo, Zhang, and Roux 2012), an interaction between RSK and a PDZ domain-containing protein through the PBM could facilitate its phosphorylation. Additionally, a majority of PDZ domain-containing proteins are scaffold proteins (Nourry, Grant, and Borg 2003), suggesting that by interacting with them, RSK kinases could be localized or sent to specific cell compartments. Thus, further studies on each interaction between RSK and a PDZ domain-containing protein will be required to establish their associated cellular functions.

We confirmed in this study the evidence of a direct control by the protein Scribble on the Ras/MAPK pathway activation. Although a previous study showed a potential interaction between Scribble and ERK1/2 kinases to regulate this signaling pathway (Nagasaka, Pim, et al. 2010), we prove here that is done through the interaction with RSK2 (Fig. 5 and 6). Several groups demonstrated that Scribble deletion disrupted apical-basal polarity, but also cooperated with oncogenic signals to enhance tumor cell migration, invasion, and survival (Zhan et al. 2008; Dow et al. 2008). Thus, a deletion of Scribble

protein in cells could lead to a decrease in the interaction with RSK2 kinase and therefore an increase in its activation by ERK1/2. Since RSK2 isoform is involved in many cellular processes required for the growth and proliferation of cancer cells (Houles and Roux 2018), a decrease in Scribble expression associated with increased RSK2 activity might lead to cancer development.

In conclusion, we have identified a novel regulatory mechanism by which the protein Scribble can control the activation of the Ras/MAPK signalling pathway through a direct protein interaction with RSK2 kinase. This study also suggests that loss of Scribble expression, which is observed in many tumours, can directly affect cell proliferation and survival by increasing RSK2 activation.

Materials and Methods

Antibodies.

Antibodies targeted against ERK1/2, phospho-ERK1/2 (T202/Y204), phospho-RPS6 (S235/236), phospho-RSK (T573) and Scribble were purchased from Cell Signaling Technologies (Beverly, MA). RSK2 antibody was purchased from Santa Cruz Biotechnologies (Santa Cruz, CA). Anti-Myc and anti-HA monoclonal antibodies were purchased from Sigma-Aldrich (Oakville, Ontario, Canada). GFP antibody was purchased from Invitrogen (Carlsbad, CA).

DNA constructs.

The plasmids encoding full-length myc-tagged Scribble, full-length and Δ N/C-terminal GFP-tagged Scribble and GST-tagged Scribble PDZ(1-4) were kindly provided by James P. Fawcett (Dalhousie University, Halifax, Canada). The vectors encoding HA-tagged human RSK1, murine RSK2, human RSK3 and human RSK4 were described previously (Roux, Richards, and Blenis 2003). These DNA constructs were used as template for generating GST-RSK(1-4)-CT and GST-RSK(1-4)- Δ PBM in the pGEX-2T backbone. The RSK(1-4)-CT correspond to the last thirty amino acids of RSK proteins fused to a GST tag. The GST-RSK(1-4)- Δ PBM are the same constructs minus the last four amino acids of RSK(1-4) kinases. The RSK2 mutant (L740A) was generated using the QuikChange methodology (Stratagene, La Jolla, CA).

Cell culture and transfection.

HEK293 cells were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC). HEK293 cells were maintained at 37°C in Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) with 4.5 g/L glucose supplemented with 5% (v/v) FBS, 100 IU/mL penicillin, and 100 μ g/mL streptomycin. Cells were regularly PCR tested to exclude mycoplasma contamination and used within 2 months after thawing. HEK293 cells were transfected by calcium phosphate 24h after being plated. Cells were grown for 24h after transfection and serum-starved overnight using serum-free DMEM where indicated. Starved cells were stimulated with phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA; 100 ng/mL; Fisher Scientific, ON,

Canada), EGF (25 ng/mL; Invitrogen, CA, USA), FBS (10%; Invitrogen, CA, USA) or insulin (50-200nM; Peprotech, NJ, USA) before being harvested.

Immunoprecipitations and immunoblotting.

Cells were washed three times with ice-cold phosphate-buffered saline (PBS) and lysed in BLB (10 mM K₃PO₄, 1 mM EDTA, 5 mM EGTA, 10 mM MgCl₂, 50 mM β-glycerophosphate, 0.5% Nonidet P-40, 0.1% Brij 35, 0.1% deoxycholic acid, 1 mM sodium orthovanadate [Na₃VO₄], 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, and a complete protease inhibitor cocktail tablet [Roche]). For immunoprecipitations, cell lysates were incubated with the indicated antibodies for 2 h, followed by 1 h of incubation with protein A–Sepharose CL-4B beads (GE Healthcare). Immunoprecipitates were washed three times in lysis buffer, and beads were eluted and boiled in 2X reducing sample buffer (5X buffer is 60 mM Tris-HCl [pH 6.8], 25% glycerol, 2% SDS, 14.4 mM 2-mercaptoethanol, and 0.1% bromophenol blue). Eluates and total cell lysates were subjected to 10% SDS-PAGE gel, and resolved proteins were transferred onto polyvinylidene difluoride membranes for immunoblotting.

Purification of GST fusion proteins and pulldown assays.

An overnight culture (25 mL) of *Escherichia coli* BL21 transformed with pGEX-2T-RSK(1-4)-CT and ΔPBM were diluted to 500 ml and induced with 1 mM IPTG (isopropyl-β-d-thiogalactopyranoside) overnight at 25°C. Cells were pelleted and resuspended in 30 ml of bacterial lysis buffer (PBS 1X, 10 mM EDTA, 0.1% Triton-X, 1 mM PMSF, 1× protease inhibitor cocktail). Extracts were placed in 50 mL conical tubes on ice and sonicated using a probe sonicator five times for 10 seconds each, with 30 seconds delays between blasts. After sonication, the extracts were centrifuged at 13,000 rpm for 10 min and aliquoted into 1 mL tubes to be stored at –80°C until further use. The same method was used with pGEX-2T-Scribble-PDZ(1-4) constructs. Extracts were then mixed with glutathione-Sepharose beads (GE/Amersham/Pharmacia, Piscataway, NJ) overnight at 4°C and purified proteins quantities were monitored with 10% SDS-PAGE gel and Coomassie treatment. Beads bounded with the different purified proteins were incubated with grinded and homogenized mouse brain tissue or with HEK293 cell lysates

transfected with RSK2 WT, L740A mutant or empty vector for 2 hours at 4°C. Immunoprecipitates were washed three times in lysis buffer, and beads were eluted and boiled in 2X reducing sample buffer (5X buffer is 60 mM Tris-HCl [pH 6.8], 25% glycerol, 2% SDS, 14.4 mM 2-mercaptoethanol, and 0.1% bromophenol blue).

Mass Spectrometry acquisition and data analysis.

Following SDS-PAGE separation with Coomassie staining, bands were excised and digested in gel with trypsin as previously described (Shevchenko et al. 1996). Samples were reconstituted in formic acid 0.2% and loaded and separated on a homemade reversed-phase column (150 μ m i.d. x 150 mm) with a 56-min gradient from 0–40% acetonitrile (0.2% FA) and a 600 nl/min flow rate on an Easy-nLC II (Thermo Fisher Scientific), connected to an Orbitrap Fusion Tribrid mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific). Each full MS spectrum acquired with a 60,000 resolution was followed by 20 MS/MS spectra, where the 12 most abundant multiply charged ions were selected for MS/MS sequencing. Samples analyzed were converted to mzXML using ProteoWizard 3.0.4468 (Kessner et al. 2008) and analyzed using the iProphet pipeline (Shteynberg et al. 2011) implemented within ProHits (Liu et al. 2010). The search engines were Mascot (2.3.02; Matrix Science) and Comet (2012.01 rev.3 (Eng, Jahan, and Hoopmann 2013)), with trypsin specificity and two missed cleavage sites allowed. Methionine oxidation and asparagine/glutamine deamidation were set as variable modifications. The fragment mass tolerance was 0.6 Da and the mass window for the precursor was \pm 40 ppm. The resulting Comet and Mascot results were individually processed by PeptideProphet (Keller et al. 2002) and combined into a final iProphet output using the Trans-Proteomic Pipeline (TPP; Linux version, v0.0 Development trunk rev 0, Build 201303061711). TPP options were as follows. General options were -p0.05 -x20 -PPM -d"DECOY", iProphet options were pPRIME and PeptideProphet options were pP. All proteins with a minimal iProphet protein probability of 0.05 were parsed to the relational module of ProHits. Note that for analysis with SAINTexpress, only proteins with at least two peptides identify and with iProphet protein probability \geq 0.95 are considered. This corresponds to an estimated protein level FDR of \sim 0.5%.

Acknowledgments

We thank all members of the laboratory for their insightful discussions and comments. This work was supported by grants from the Canadian Institutes for Health Research and the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada. PPR is scholar of the Fonds de la recherche du Québec - Santé (FRQS). PPR holds the Canada Research Chair in Signal Transduction and Proteomics. JAG held a postdoctoral fellowship from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR). IRIC core facilities are supported in part by the Fonds de la recherche du Québec - Santé (FRQS).

References

- Bilder, D., and N. Perrimon. 2000. 'Localization of apical epithelial determinants by the basolateral PDZ protein Scribble', *Nature*, 403: 676-80.
- Cargnello, M., and P. P. Roux. 2011. 'Activation and function of the MAPKs and their substrates, the MAPK-activated protein kinases', *Microbiol Mol Biol Rev*, 75: 50-83.
- Clark, D. E., T. M. Errington, J. A. Smith, H. F. Frierson, Jr., M. J. Weber, and D. A. Lannigan. 2005. 'The serine/threonine protein kinase, p90 ribosomal S6 kinase, is an important regulator of prostate cancer cell proliferation', *Cancer Res*, 65: 3108-16.
- Cuesta, R., and M. K. Holz. 2016. 'RSK-mediated down-regulation of PDCD4 is required for proliferation, survival, and migration in a model of triple-negative breast cancer', *Oncotarget*, 7: 27567-83.
- Dow, L. E., I. A. Elsum, C. L. King, K. M. Kinross, H. E. Richardson, and P. O. Humbert. 2008. 'Loss of human Scribble cooperates with H-Ras to promote cell invasion through deregulation of MAPK signalling', *Oncogene*, 27: 5988-6001.
- Dow, L. E., J. S. Kauffman, J. Caddy, K. Zarbalis, A. S. Peterson, S. M. Jane, S. M. Russell, and P. O. Humbert. 2007. 'The tumour-suppressor Scribble dictates cell polarity during directed epithelial migration: regulation of Rho GTPase recruitment to the leading edge', *Oncogene*, 26: 2272-82.
- Elsum, I. A., C. Martin, and P. O. Humbert. 2013. 'Scribble regulates an EMT polarity pathway through modulation of MAPK-ERK signaling to mediate junction formation', *J Cell Sci*, 126: 3990-9.
- Eng, J. K., T. A. Jahan, and M. R. Hoopmann. 2013. 'Comet: an open-source MS/MS sequence database search tool', *Proteomics*, 13: 22-4.
- Feigin, M. E., S. D. Akshinthala, K. Araki, A. Z. Rosenberg, L. B. Muthuswamy, B. Martin, B. D. Lehmann, H. K. Berman, J. A. Pietenpol, R. D. Cardiff, and S. K. Muthuswamy. 2014. 'Mislocalization of the cell polarity protein scribble promotes mammary tumorigenesis and is associated with basal breast cancer', *Cancer Res*, 74: 3180-94.
- Galan, J. A., K. M. Geraghty, G. Lavoie, E. Kanshin, J. Tcherkezian, V. Calabrese, G. R. Jeschke, B. E. Turk, B. A. Ballif, J. Blenis, P. Thibault, and P. P. Roux. 2014. 'Phosphoproteomic analysis identifies the tumor suppressor PDCD4 as a RSK substrate negatively regulated by 14-3-3', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 111: E2918-27.
- Gavin, A. C., and A. R. Nebreda. 1999. 'A MAP kinase docking site is required for phosphorylation and activation of p90(rsk)/MAPKAP kinase-1', *Curr Biol*, 9: 281-4.

- Houles, T., S. P. Gravel, G. Lavoie, S. Shin, M. Savall, A. Meant, B. Grondin, L. Gaboury, S. O. Yoon, J. St-Pierre, and P. P. Roux. 2018. 'RSK Regulates PFK-2 Activity to Promote Metabolic Rewiring in Melanoma', *Cancer Res*, 78: 2191-204.
- Houles, T., and P. P. Roux. 2018. 'Defining the role of the RSK isoforms in cancer', *Semin Cancer Biol*, 48: 53-61.
- Keller, A., A. I. Nesvizhskii, E. Kolker, and R. Aebersold. 2002. 'Empirical statistical model to estimate the accuracy of peptide identifications made by MS/MS and database search', *Anal Chem*, 74: 5383-92.
- Kessner, D., M. Chambers, R. Burke, D. Agus, and P. Mallick. 2008. 'ProteoWizard: open source software for rapid proteomics tools development', *Bioinformatics*, 24: 2534-6.
- Kim, E. K., and E. J. Choi. 2010. 'Pathological roles of MAPK signaling pathways in human diseases', *Biochim Biophys Acta*, 1802: 396-405.
- Kim, E., and M. Sheng. 2004. 'PDZ domain proteins of synapses', *Nat Rev Neurosci*, 5: 771-81.
- Lim, H. C., and T. S. Jou. 2016. 'Ras-activated RSK1 phosphorylates EBP50 to regulate its nuclear localization and promote cell proliferation', *Oncotarget*, 7: 10283-96.
- Liu, G., J. Zhang, B. Larsen, C. Stark, A. Breitkreutz, Z. Y. Lin, B. J. Breitkreutz, Y. Ding, K. Colwill, A. Pasculescu, T. Pawson, J. L. Wrana, A. I. Nesvizhskii, B. Raught, M. Tyers, and A. C. Gingras. 2010. 'ProHits: integrated software for mass spectrometry-based interaction proteomics', *Nat Biotechnol*, 28: 1015-7.
- Michaloglou, C., L. C. Vredeveld, W. J. Mooi, and D. S. Peeper. 2008. 'BRAF(E600) in benign and malignant human tumours', *Oncogene*, 27: 877-95.
- Molina, J. R., and A. A. Adjei. 2006. 'The Ras/Raf/MAPK pathway', *J Thorac Oncol*, 1: 7-9.
- Nagasaka, K., P. Massimi, D. Pim, V. K. Subbaiah, C. Kranjec, S. Nakagawa, T. Yano, Y. Taketani, and L. Banks. 2010. 'The mechanism and implications of hScrib regulation of ERK', *Small GTPases*, 1: 108-12.
- Nagasaka, K., D. Pim, P. Massimi, M. Thomas, V. Tomaic, V. K. Subbaiah, C. Kranjec, S. Nakagawa, T. Yano, Y. Taketani, M. Myers, and L. Banks. 2010. 'The cell polarity regulator hScrib controls ERK activation through a KIM site-dependent interaction', *Oncogene*, 29: 5311-21.
- Nola, S., M. Sebbagh, S. Marchetto, N. Osmani, C. Nourry, S. Audebert, C. Navarro, R. Rachel, M. Montcouquiol, N. Sans, S. Etienne-Manneville, J. P. Borg, and M. J. Santoni. 2008. 'Scrib regulates PAK activity during the cell migration process', *Hum Mol Genet*, 17: 3552-65.

- Nourry, C., S. G. Grant, and J. P. Borg. 2003. 'PDZ domain proteins: plug and play!', *Sci STKE*, 2003: RE7.
- Osmani, N., N. Vitale, J. P. Borg, and S. Etienne-Manneville. 2006. 'Scrib controls Cdc42 localization and activity to promote cell polarization during astrocyte migration', *Curr Biol*, 16: 2395-405.
- Pearce, L. R., D. Komander, and D. R. Alessi. 2010. 'The nuts and bolts of AGC protein kinases', *Nat Rev Mol Cell Biol*, 11: 9-22.
- Romeo, Y., J. Moreau, P. J. Zindy, M. Saba-El-Leil, G. Lavoie, F. Dandachi, M. Baptissart, K. L. B. Borden, S. Meloche, and P. P. Roux. 2013. 'RSK regulates activated BRAF signalling to mTORC1 and promotes melanoma growth', *Oncogene*, 32: 2917-26.
- Romeo, Y., X. Zhang, and P. P. Roux. 2012. 'Regulation and function of the RSK family of protein kinases', *Biochem J*, 441: 553-69.
- Roux, P. P., S. A. Richards, and J. Blenis. 2003. 'Phosphorylation of p90 ribosomal S6 kinase (RSK) regulates extracellular signal-regulated kinase docking and RSK activity', *Mol Cell Biol*, 23: 4796-804.
- Shevchenko, A., M. Wilm, O. Vorm, and M. Mann. 1996. 'Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels', *Anal Chem*, 68: 850-8.
- Shteynberg, D., E. W. Deutsch, H. Lam, J. K. Eng, Z. Sun, N. Tasman, L. Mendoza, R. L. Moritz, R. Aebersold, and A. I. Nesvizhskii. 2011. 'iProphet: multi-level integrative analysis of shotgun proteomic data improves peptide and protein identification rates and error estimates', *Mol Cell Proteomics*, 10: M111 007690.
- Su, W. H., D. D. Mruk, E. W. Wong, W. Y. Lui, and C. Y. Cheng. 2012. 'Polarity protein complex Scribble/Lgl/Dlg and epithelial cell barriers', *Adv Exp Med Biol*, 763: 149-70.
- Sutherland, C., D. G. Campbell, and P. Cohen. 1993. 'Identification of insulin-stimulated protein kinase-1 as the rabbit equivalent of rskmo-2. Identification of two threonines phosphorylated during activation by mitogen-activated protein kinase', *Eur J Biochem*, 212: 581-8.
- Thomas, G. M., G. R. Rumbaugh, D. B. Harrar, and R. L. Huganir. 2005. 'Ribosomal S6 kinase 2 interacts with and phosphorylates PDZ domain-containing proteins and regulates AMPA receptor transmission', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102: 15006-11.
- Wu, M., J. C. Pastor-Pareja, and T. Xu. 2010. 'Interaction between Ras(V12) and scribbled clones induces tumour growth and invasion', *Nature*, 463: 545-8.
- Zhan, L., A. Rosenberg, K. C. Bergami, M. Yu, Z. Xuan, A. B. Jaffe, C. Allred, and S. K. Muthuswamy. 2008. 'Deregulation of scribble promotes mammary tumorigenesis and reveals a role for cell polarity in carcinoma', *Cell*, 135: 865-78.

Figures

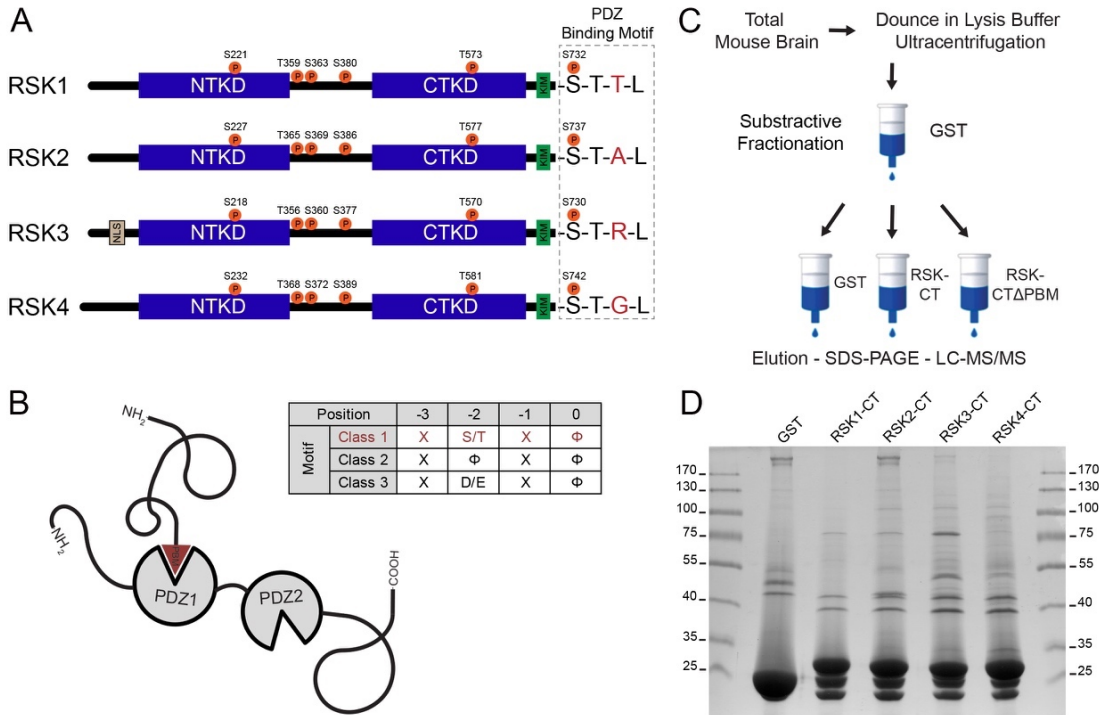


Figure 1. Proteomic strategy to identify specific RSK-PBM binding partners

(A) Schematic representation of the four RSK isoforms with known tyrosine and serine phosphorylation sites and domains, including the PDZ binding motif (PBM). NTKD: N-terminal Kinase Domain, CTKD: C-terminal Kinase Domain, NLS: Nuclear Localisation Signal. KIM: Erk1/2 binding site. (B) Schematic representation of a PDZ domain-containing protein interacting with a protein *via* a PDZ-PBM interaction. The table shows the amino acid sequence of the three PBM motif classes, where X can be any amino acid and Φ a hydrophobic residue. (C) Schematic representation depicting the pull-down assay and the subtractive fractionation strategy used to enrich RSK-PBM binding proteins. (D) Following the protocol shown in panel (C), GST and RSK-CT eluates were resolved by SDS-PAGE and gels were stained with Coomassie blue. The numbers correspond to the molecular weight marker.

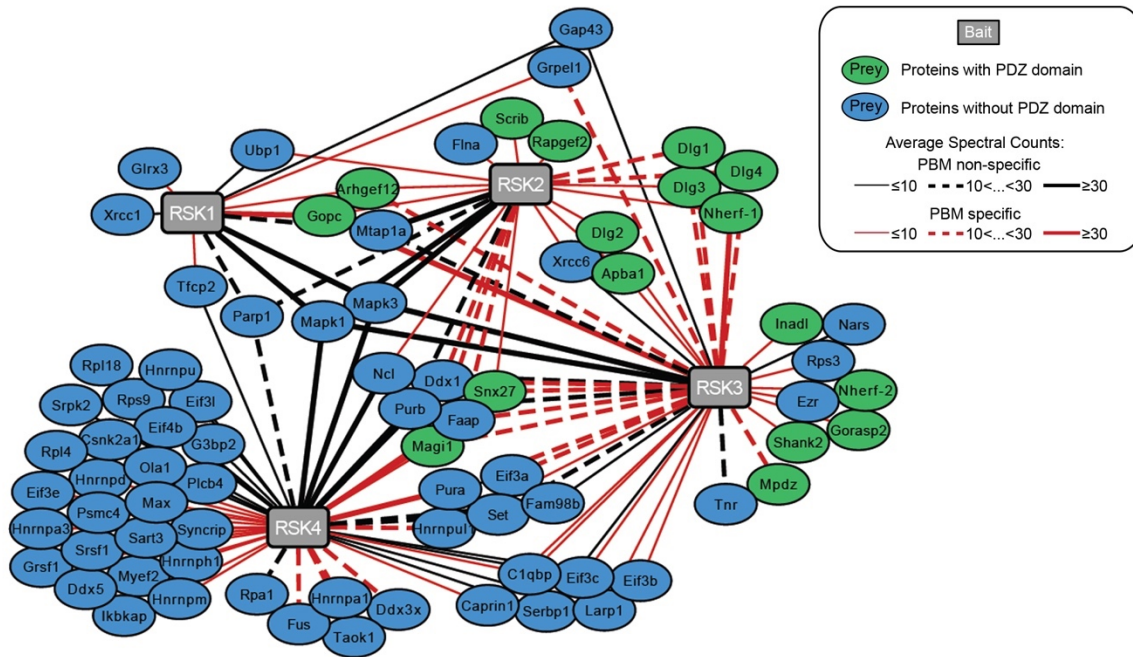


Figure 2. Characterization of the RSK-PBM-dependent interactome

High-confidence bait-prey proximity interaction network discovered by GST pulldown. The network is restricted to prey with an average spectral count > 2 and a SAINT score > 0.85 . Legend inset applies to the network.

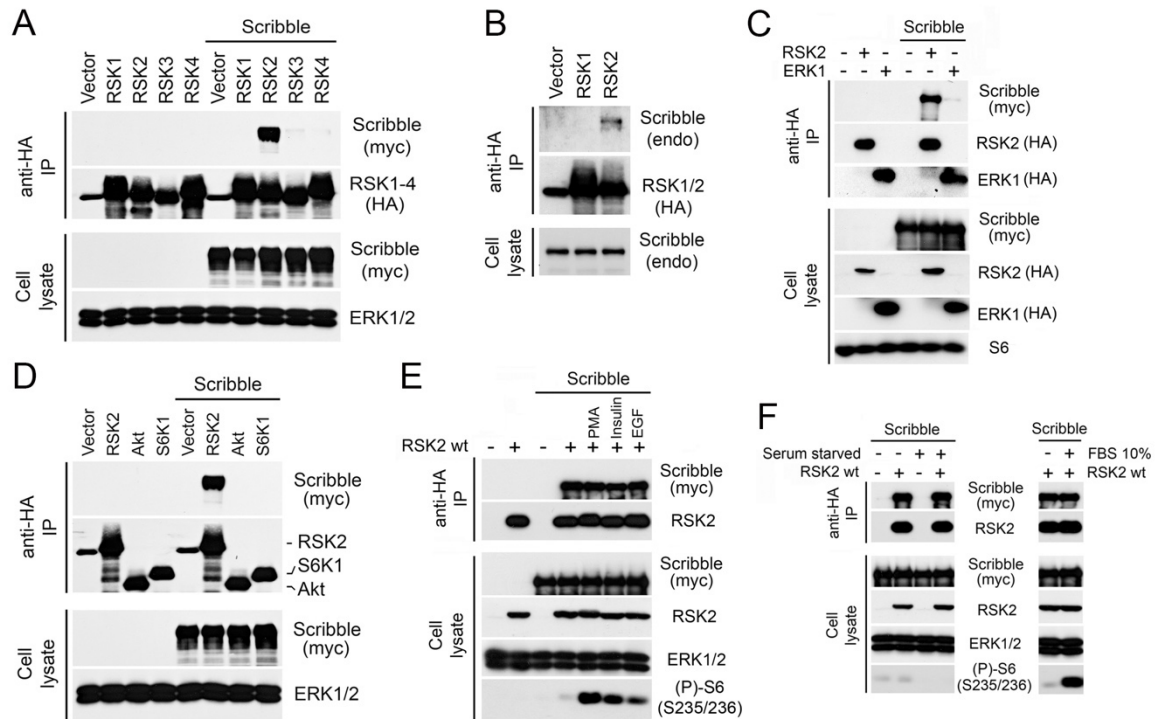


Figure 3. Scribble is a binding partner of RSK2 kinase

(A) HEK293 cells were co-transfected with HA-tagged RSK1-4, and an empty vector or Myc-tagged Scribble. Associated Myc-tagged Scribble within HA-RSK1-4 immunoprecipitates (IP) was assayed by immunoblotting. Total forms of Scribble were assayed by immunoblotting on total cell lysates. (B) HEK293 cells were transfected with HA-tagged RSK1/2 and associated endogenous Scribble within HA-tagged IP was assayed by immunoblotting. (C) HEK293 cells were co-transfected with Myc-tagged Scribble, and HA-tagged RSK2 or HA-tagged ERK1. Associated Myc-tagged Scribble within HA-tagged IP was assayed by immunoblotting. (D) HEK293 cells were co-transfected with Myc-tagged Scribble, and an empty vector, HA-tagged RSK2, HA-tagged Akt or HA-tagged S6K1. Associated Myc-tagged Scribble within HA-tagged IP was assayed by immunoblotting. (E) HEK293 cells were co-transfected with Myc-tagged Scribble and wt HA-tagged RSK2, serum-starved overnight and stimulated with PMA (100 ng/mL), EGF (25 ng/mL) or insulin (50 nM). Associated Myc-tagged Scribble within HA-tagged IP was assayed by immunoblotting. (F) HEK293 cells were co-transfected as in (E) and serum-starved overnight or complemented with 10%FBS. Myc-tagged Scribble and protein lysates were analyzed as in (A).

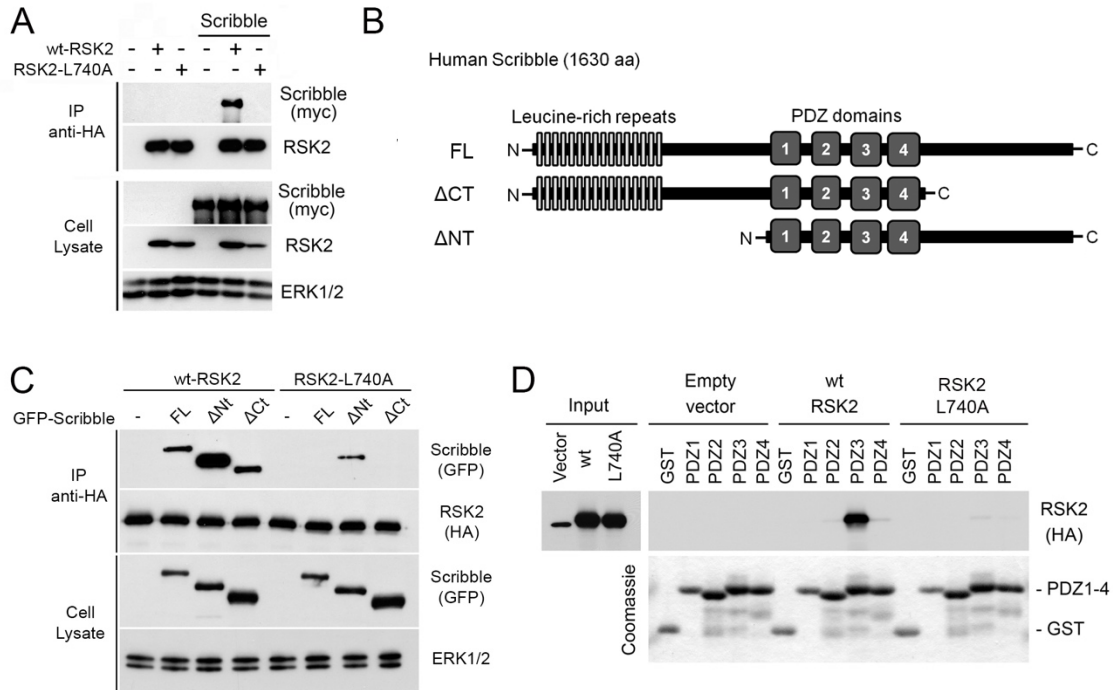


Figure 4. RSK2 interacts with the PDZ of Scribble

(A) HEK293 cells were co-transfected with Myc-tagged Scribble and HA-tagged wt RSK2 or RSK2-L740A mutant. Associated Myc-tagged Scribble within HA-tagged IP was assayed by immunoblotting. Total forms of Scribble and RSK2 were assayed by immunoblotting on total cell lysates. (B) Schematic representation of the human Scribble protein. (C) HEK293 cells were co-transfected with GFP-tagged Scribble full length (FL), Scribble Δ Nt or Scribble Δ Ct, and HA-tagged wt RSK2 or RSK2-L740A mutant. Associated GFP-tagged Scribble within HA-tagged IP was assayed by immunoblotting. (D) HEK293 cells were transfected with empty vector, HA-tagged wt RSK2 or RSK2-L740A mutant. Cell lysates were then used for GST pull-down assay with Scribble PDZ1-4 as baits. Eluates were resolved by SDS-PAGE and gels were stained with Coomassie blue or subjected to immunoblotting using HA antibody.

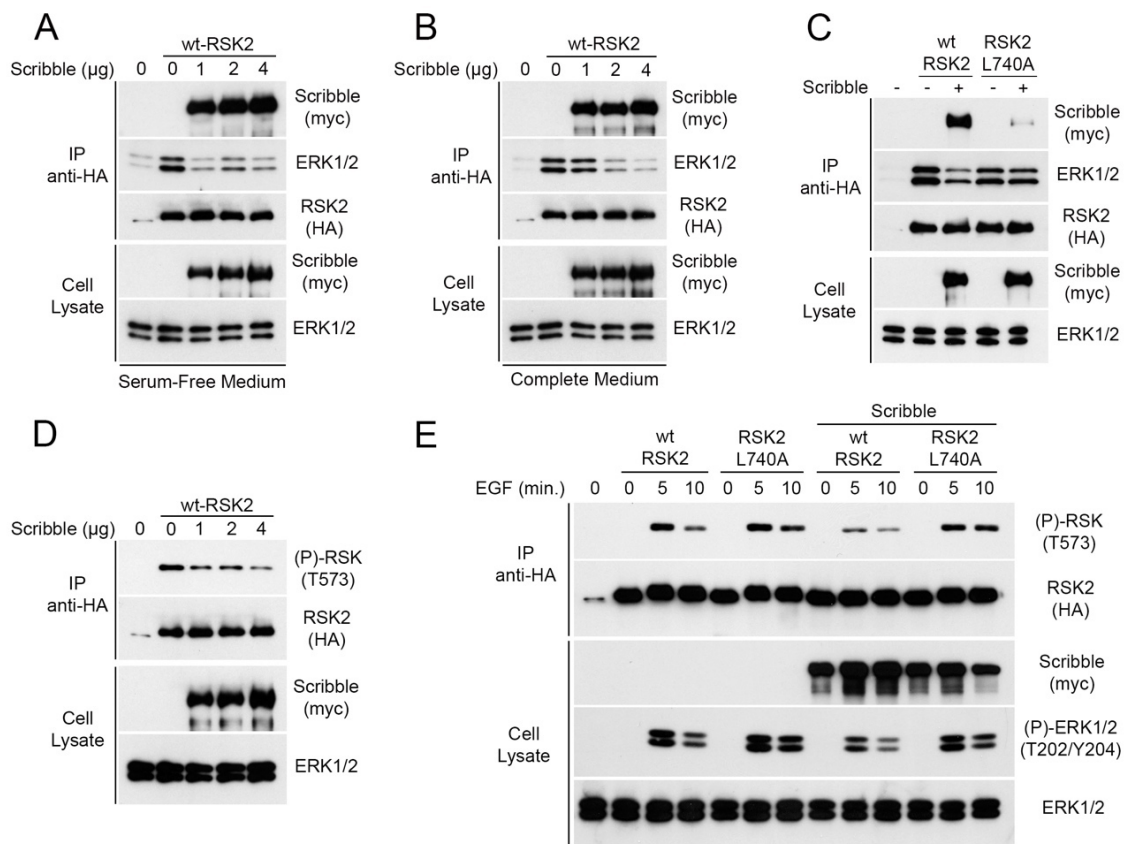


Figure 5. Scribble interaction with RSK2 inhibits ERK1/2 binding and RSK2 activation

(A, B) HEK293 cells were co-transfected with an increasing quantity of Myc-tagged Scribble and HA-tagged wt RSK2 in serum starved condition or complete cell culture medium. Associated Myc-tagged Scribble and endogenous ERK1/2 within HA-tagged IP were assayed by immunoblotting. Total forms of proteins were assayed by immunoblotting on total cell lysates. (C) HEK293 cells were co-transfected with Myc-tagged Scribble and HA-tagged wt RSK2 or RSK2-L740A mutant. Associated proteins within HA-tagged IP were assayed as in (A). (D) HEK293 cells were co-transfected with an increasing quantity of Myc-tagged Scribble and HA-tagged wt RSK2. Immunoprecipitated wt HA-RSK2 was then assayed for phosphorylation with phospho-specific antibody recognizing a threonine residue phosphorylated by ERK1/2 kinases. (E) HEK293 cells were co-transfected with HA-tagged wt RSK2 or RSK2-L740A mutant and Myc-tagged Scribble or an empty vector. Cells were serum starved overnight and stimulated with a time course of EGF (25 ng/mL).

Immunoprecipitated HA-RSK2 wt or mutant were then assayed for phosphorylation as in (D).

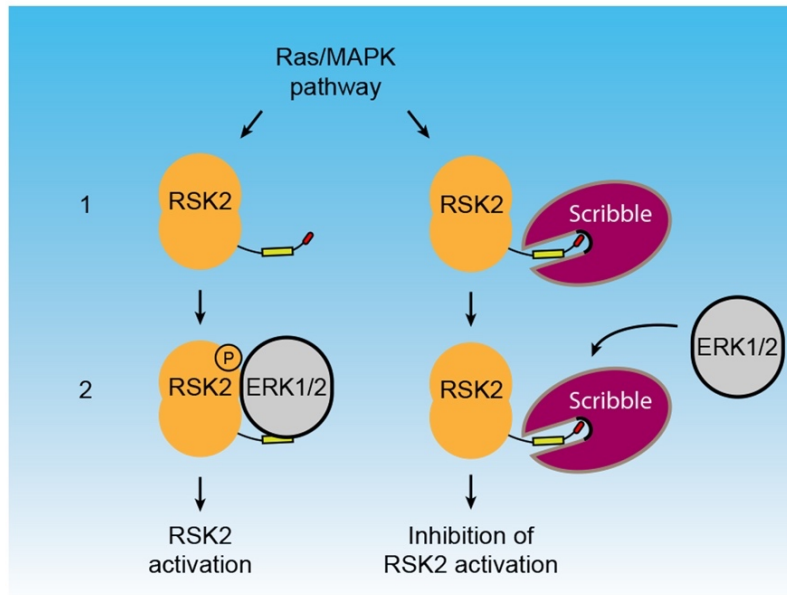


Figure 6. Schematic representation of the role of Scribble in the regulation of RSK2 activation

Proposed model whereby Scribble binding to RSK2 by its PBM inhibits ERK1/2-RSK2 association and reduces RSK2 activation.

Contribution des auteurs

Antoine Méant a participé à la conception du projet et à la génération et l'analyse des résultats (Fig. 1, 2, 4 et 5), a réalisé les analyses de spectrométrie de masse (Fig. 1 et 2), ainsi que la conception des figures et la rédaction du manuscrit.

Julie Moreau, Maxym Wilk et Yasaman Nouhi ont participé à la génération des résultats (Fig. 3 et 4).

Jacob A. Galan a participé à la mise au point de l'approche protéomique et à l'analyse des résultats de protéomique (Fig. 1 et 2).

Joseph Tcherkezian a participé à la mise au point de l'approche protéomique (Fig. 1).

Geneviève Lavoie a participé à la préparation des différentes constructions de plasmides.

Philippe P. Roux a participé à la conception du projet et a supervisé le projet.

Chapitre 4 : Discussion

1. Caractérisation de l'interactome des kinases RSK : des nouvelles données

En réalisant nos deux études à grand échelle, nous avons ainsi pu déterminer l'interactome des quatre isoformes de RSK dans la cellule. Notre première étude *in vivo* a permis d'identifier leurs partenaires cellulaires de proximité, tandis que la deuxième a apporté de nouvelles connaissances sur les liaisons spécifiques au domaine PBM. Ces travaux permettent donc d'accroître considérablement les connaissances fondamentales sur les kinases RSK. Après avoir décrit le phosphoprotéome de ces kinases ainsi que le motif minimum nécessaire pour une phosphorylation par ces kinases sur un substrat (Galan et al. 2014), nos études sur les partenaires cellulaires viennent ainsi compléter les données du laboratoire déjà publiées. Les kinases RSK étant impliquées dans plusieurs fonctions biologiques mais aussi dans le développement des cellules cancéreuses (Romeo, Zhang, and Roux 2012; Houles and Roux 2018), ces études combinées forment finalement une ressource importante pour étudier les mécanismes moléculaires sous-jacents des protéines RSK.

Utilisation de deux techniques complémentaires

Dans notre première étude, nous avons utilisé la technique de BioID permettant de déterminer les protéines à proximité (10-20 nm) des kinases RSK dans la cellule (Roux et al. 2012; Lambert et al. 2015). La biotinylation des protéines de proximité étant très efficace, cette technique permet donc de révéler de nombreux partenaires potentiels de nos protéines étudiées mais aussi un fort taux de partenaires non spécifiques. Nous avons réduit et éliminé ces derniers en utilisant des logiciels informatiques appropriés pour analyser nos expériences de protéomique de la manière la plus rigoureuse possible sans affecter la véracité de nos résultats. Nos données brutes ont été téléchargées et stockées sur l'interface ProHits (Liu et al. 2010), puis transformées en données analysables en utilisant ProteoWizard (version 3.0.4468) (Kessner et al. 2008). Après quoi, l'analyse a été effectuée successivement par trois logiciels différents : Mascot (2.3.02; Matrix Science), Comet (2012.01 rev.3) (Eng, Jahan, and Hoopmann 2013) et PeptideProphet (Shteynberg et al. 2011). Enfin, nous avons utilisé les peptides reconnus de manière significative par

ces trois interfaces pour analyser l'abondance de chaque protéine identifiée dans nos expériences avec le logiciel SAINTexpress (Teo et al. 2014). Ainsi, on peut dire que la majorité des protéines identifiées après nos analyses sont de véritables partenaires même s'ils doivent être confirmés à l'aide d'expériences additionnelles. Dans le BioID des kinases RSK (Chapitre 2, Figure 2A), nous retrouvons plusieurs protéines déjà identifiées dans la littérature comme des partenaires cellulaires ou des substrats directs tels que ARHGEF12 (Rho guanine nucleotide exchange factor 12) (Shi et al. 2018) ou EPHA2 (Ephrin type-A receptor 2) (Zhou et al. 2015), confirmant que notre technique identifie de réels interacteurs. Nous pouvons faire le même constat avec le BioID de p120ctn (Chapitre 2, Figure 7), où l'on retrouve plusieurs partenaires cellulaires de p120ctn déjà connus comme N-cadherin, α -catenin, β -catenin et PLEKHA7 (Pieters, van Roy, and van Hengel 2012). Par ailleurs, nous retrouvons des éléments communs entre notre précédente étude de phosphoprotéomique et le BioID des kinases RSK (Chapitre 2, Figure 2D). De même, six protéines sont identifiées à la fois avec la technique de BioID et l'approche de capture par affinité de notre deuxième étude : ERK1, ERK2, ARHGEF12, GOPC (Golgi-associated PDZ and coiled-coil motif-containing protein), SCRIBBLE et GRSF1 (G-rich sequence factor 1). Ainsi, nous pouvons conclure que nos approches sont complémentaires pour l'identification de nouveaux partenaires cellulaires des kinases RSK, puisqu'on identifie à la fois des nouvelles cibles potentielles avec chaque étude tout en confirmant certaines protéines trouvées en recoupant les données de nos différents projets. Finalement, la technique de BioID est une bonne alternative à la technique traditionnelle de capture par affinité car cette dernière n'est pas optimale pour l'étude des protéines insolubles, dont l'isoforme RSK3.

Une affinité particulière avec les protéines à domaine PDZ ?

Notre deuxième projet a porté sur l'étude des partenaires cellulaires des kinases RSK dépendants du PBM. Cette étude est la première à établir ce type d'interactome pour chacune des isoformes. Dans la littérature, plusieurs protéines interagissant avec les RSK par le biais de leur PBM ont été identifiées. Parmi elles, on retrouve SHANK2 (SH3 and multiple ankyrin repeat domains 3) (Thomas et al. 2005), NHERF-1 (Lim and Jou 2016) et MAGI-1 (Gogl et al. 2018), trois protéines aussi trouvées comme des potentiels

partenaires cellulaires avec notre approche de capture par affinité. Ceci prouve que notre méthode peut donc déterminer de véritables interacteurs. Dans notre étude, nous avons identifié et confirmé que la protéine Scribble est un partenaire spécifique de l'isoforme RSK2 (Chapitre 3, Figure 3). Par ailleurs, nous avons montré que Scribble interagit avec le PBM de RSK2 par son domaine PDZ3 (Chapitre 3, Figure 4). Ces résultats sont intéressants car ils amènent deux idées. Premièrement, les kinases RSK semblent avoir des partenaires spécifiques à chaque isoforme. Deuxièmement, on sait que le PBM des RSK ne diffère que d'un acide aminé, celui-ci n'étant pas primordial pour l'interaction avec un domaine PDZ (Chapitre 3, Figure 1A et B). Cependant, on constate ici que cet acide aminé semble entraîner des préférences dans les associations avec des domaines PDZ. Par exemple, on pourrait se demander si on échange le résidu en -1 (arginine) du PBM de RSK3 par une alanine pour avoir un PBM identique à RSK2, est-ce que la protéine Scribble interagirait aussi avec RSK3 après cette modification ?

Dix-sept protéines identifiées se liant aux kinases RSK par le PBM sont des protéines contenant au moins un domaine PDZ. Ces données montrent donc que les RSK ont une affinité et un potentiel d'interaction élevé avec ce type de protéines. Des liaisons de ce type pourraient aboutir à plusieurs observations. Tout d'abord, beaucoup de protéines à domaines PDZ ont un rôle d'échafaudage et se lient à de nombreuses autres protéines dans la cellule, à la fois pour les situer à des compartiments spécifiques de la cellule mais aussi pour faciliter leurs fonctions dans différents processus biologiques (Chapitre 1, Partie 3.1). Par exemple, la protéine GOPC, retrouvée dans notre étude se lie à plusieurs protéines au niveau de l'appareil de golgi et permet leur transit à la membrane plasmique (Koliwer et al. 2015). On peut donc penser que les kinases RSK, en se liant aux protéines à domaine PDZ, soient localisées à des compartiments spécifiques de la cellule pour promouvoir leurs différentes fonctions et phosphoryler des substrats. Une autre possibilité serait que les kinases RSK utilisent leur PBM pour se lier à des protéines et les phosphoryler directement. Cette idée est appuyée par les données du groupe ayant étudié l'interaction entre RSK et NHERF-1 (Lim and Jou 2016). En interagissant avec cette dernière, RSK1 semble phosphoryler NHERF-1 d'après ces chercheurs. Des études préliminaires de notre laboratoire vont dans ce sens. Une expérience suggère que RSK2 phosphoryle la protéine Scribble (Figure 1). Ainsi, des études plus approfondies sur chaque interaction entre les

kinases RSK et des protéines contenant un domaine PDZ seront nécessaires pour établir leurs véritables fonctions cellulaires associées.

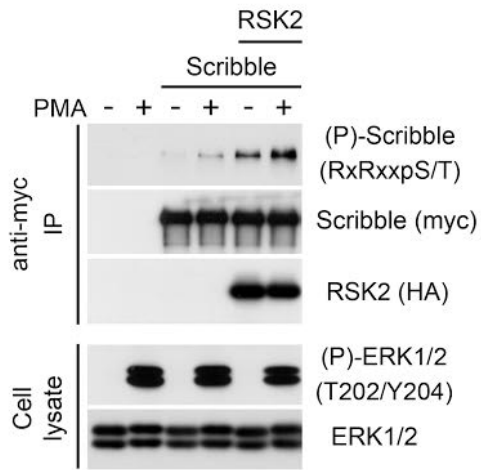


Figure 1 : RSK2 stimule la phosphorylation de la protéine Scribble

Des cellules HEK293 ont été transfectées avec RSK2 et Scribble, puis privées de sérum pendant une nuit et ensuite traitées avec une stimulation au PMA (100 ng/ml) durant 30 minutes. Scribble immunoprécipité (IP) a été testé pour la phosphorylation avec un anticorps phosphomotif qui reconnaît le motif consensus RXXpS/T.

Un rôle spécifique aux jonctions intercellulaires ?

Nos résultats de BioID pour les kinases RSK sont à la fois étonnants mais aussi très intéressants. En effet, on peut voir que la plupart des partenaires potentiels identifiés sont des protéines localisées au niveau de la membrane plasmique ou dans un compartiment cellulaire associé comme les jonctions intercellulaires (Chapitre 2, Figure 2B et C). Certes, bien que la plupart de ces protéines aient été trouvées avec l'expérience de BioID de l'isoforme RSK3 car celle-ci est enrichie à la membrane cellulaire quand elle est surexprimée dans une cellule (Chapitre 2, Figure 1A et S1), certaines protéines membranaires identifiées le sont aussi avec d'autres isoformes, comme la protéine Scribble avec RSK2. Ce dernier résultat est d'ailleurs confirmé par la suite dans notre étude du chapitre 3. Ainsi, la localisation spécifique des partenaires cellulaires potentiels des kinases RSK laisse penser que ces dernières ont un rôle prépondérant dans ce compartiment cellulaire. Cependant, jusqu'à maintenant, peu de substrats ou partenaires des kinases RSK sont associés à cette partie de la cellule (Romeo, Zhang, and Roux 2012), suggérant l'identification de nouvelles découvertes sur les kinases RSK.

En parallèle des partenaires cellulaires identifiés avec le BioID au niveau de la membrane plasmique, nous montrons que RSK a un rôle précis au niveau des jonctions

intercellulaires. En effet, en utilisant un essai spécifique pour tester et mesurer la force des jonctions entre les cellules, nous avons pu constater qu'une fois l'activité des kinases RSK inhibée, les jonctions intercellulaires sont plus fortes et les cellules ont donc tendance à être plus compactes entre elles (Chapitre 2, Figure 6A-C). En démontrant cet effet sur l'intégrité des jonctions intercellulaires dans des lignées de mélanomes, nous confirmons des observations déjà établies par deux groupes différents (Doehn et al. 2009; Caslavsky, Klimova, and Vomastek 2013). Ces résultats, en accord avec des études connexes démontrant le rôle de RSK dans la motilité des cellules (Sulzmaier and Ramos 2013), suggèrent donc que l'activité des kinases RSK serait importante pour tout d'abord diminuer l'intégrité des jonctions cellulaires, puis dans un deuxième temps favoriser leur migration. Les kinases RSK (notamment les deux isoformes RSK1 et RSK2) sont activées et même surexprimées dans de nombreux cancers (Chapitre 1, Partie 1.5.8), on peut donc penser qu'en régulant ces deux processus biologiques ces protéines favorisent la dissémination et l'invasion des cellules cancéreuses. Ces observations sur les kinases RSK corroborent aussi avec le rôle connu de plusieurs membres de la voie de signalisation Ras/MAPK dans l'adhésion cellulaire, la migration et l'invasion des cellules cancéreuses (Campbell and Der 2004; Tanimura and Takeda 2017). Ainsi, les kinases RSK sont de véritables effecteurs de la voie de signalisation Ras/MAPK pour réguler des fonctions biologiques nécessaires au développement des cellules, dont l'adhésion intercellulaire.

Finalement, depuis quelques années, notre laboratoire a aussi démontré le rôle des isoformes RSK1 et RSK2 dans la prolifération et la survie des cellules cancéreuses (Romeo et al. 2013; Houles et al. 2018). Ces données, associées à nos travaux sur les jonctions intercellulaires dans les lignées de mélanomes, fournissent les éléments nécessaires pour établir les kinases RSK1/2 comme des cibles importantes à inhiber pour limiter la croissance des cellules cancéreuses. Cependant, des expériences *in vitro* d'invasion cellulaire permettrait d'enrichir les connaissances sur le comportement des cellules en présence ou non des kinases RSK1/2 actives. De même en utilisant le modèle murin, par exemple des souris « nude », des essais de métastases *in vivo* pourraient être menés en injectant dans ces animaux des cellules cancéreuses exprimant ou non les kinases RSK1/2 actives. Ces données seraient intéressantes pour étudier et documenter le rôle de ces kinases dans l'invasion et la dissémination des cellules cancéreuses.

2. La protéine p120ctn, un nouveau substrat des kinases RSK

Dans notre premier projet, nous avons identifié la protéine p120ctn comme un nouveau substrat des kinases RSK (Chapitre 2, Figure 3). Par ailleurs, nous montrons que ces kinases semblent responsables de la phosphorylation en sérine 320, d'autres membres de la famille des kinases AGC comme Akt ou S6K ne phosphorylant pas p120ctn sur ce résidu (Chapitre 2, Figure 4). De plus, nous confirmons que les kinases RSK phosphorylent p120ctn dans des lignées de mélanomes (Chapitre 2, Figure 5A-C), suggérant que cette phosphorylation est présente dans plusieurs types cellulaires notamment dans les cellules cancéreuses. Finalement, nous montrons aussi l'importance de la protéine p120ctn dans le maintien des jonctions intercellulaires dans les lignées de mélanomes (Chapitre 2, Figure 5E-G), confirmant donc les éléments déjà connus sur cette fonction de p120ctn (Chapitre 1, Partie 2.4.1.2.1).

En utilisant les expériences appropriées, nous montrons aussi que l'état de la phosphorylation en Ser320 n'affecte pas le rôle de p120ctn dans le maintien des jonctions intercellulaires (Chapitre 2, Figure 6D-F), malgré l'implication de l'activité des kinases RSK dans la fragilisation de ces jonctions (Chapitre 2, Figure 6A-C). Plusieurs hypothèses sont possibles à la vue de ce résultat. Tout d'abord, même si les kinases RSK ont un rôle au niveau des jonctions intercellulaires, il se peut très bien que ceci ne se fasse tout simplement pas par le biais de la phosphorylation de p120ctn. D'autre part, on sait que p120ctn est une protéine abondamment phosphorylée (Chapitre 1, Partie 2.4.1.3). Ainsi, on peut penser que la phosphorylation seule de p120ctn en Ser320 n'est pas suffisante pour modifier la fonction de p120ctn dans le maintien des jonctions intercellulaires. Ceci ne serait pas surprenant car une étude a montré un impact de p120ctn sur l'intégrité des jonctions entre cellules en mutant plusieurs résidus phosphorylés à la fois (Maiden, Petrova, and Gumbiner 2016). Finalement, une troisième hypothèse serait que d'autres partenaires cellulaires des kinases RSK jouent un rôle. En effet, en inhibant l'activité des kinases RSK, nous voyons que les jonctions intercellulaires sont affectées (Chapitre 2, Figure 6A-C), mais nous ne sommes pas capables d'observer ce phénotype en mutant la sérine 320 phosphorylée de p120ctn (Chapitre 2, Figure 6D-F). Comme nous montrons que les kinases RSK ont de nombreux interacteurs et potentiels substrats à la membrane cellulaire mais aussi aux jonctions intercellulaires (Chapitre 2, Figure 2A et B), ces derniers

peuvent donc être aussi impliqués dans le maintien de l'adhésion entre les cellules en même temps que p120ctn. Ils compenseraient donc l'impact de la mutation en sérine 320 de p120ctn et rétabliraient ainsi l'intégrité de l'adhésion entre les cellules. Des études additionnelles sont donc nécessaires pour identifier les mécanismes moléculaires sous-jacents des kinases RSK dans la régulation des jonctions intercellulaires.

Une phosphorylation comme marqueur des cellules cancéreuses ?

Nous montrons aussi que la phosphorylation de la sérine 320 de la protéine p120ctn est augmentée dans les mélanomes de patients (Chapitre 2, Figure 5D). Ce résultat suggère que cette phosphorylation pourrait être utilisée comme un potentiel marqueur biologique du développement du mélanome. Ceci corrobore avec plusieurs études montrant que le statut de phosphorylation de la protéine p120ctn est une valeur prédictive du développement des cellules cancéreuses (Ma et al. 2012; Kourtidis et al. 2015). De plus, une autre étude du laboratoire montre que la phosphorylation de la protéine PFKFB2 par les kinases RSK est aussi significativement augmentée dans les mélanomes de patients (Houles et al. 2018). Ensemble, ces résultats suggèrent donc que plusieurs substrats phosphorylés par ces kinases peuvent être utilisés comme des marqueurs biologiques des mélanomes.

Une fonction exacte qui reste à déterminer

L'étude pour déterminer le rôle de la phosphorylation de p120ctn nous a amené à utiliser la technique de BioID et caractériser les partenaires cellulaires de la protéine p120ctn dépendamment de son statut de phosphorylation à la sérine 320 (Chapitre 2, Figure 7). Ainsi, bien que 25% des interacteurs potentiels identifiés ne sont pas affecté par la phosphorylation en sérine 320 et sont retrouvés dans nos trois conditions, certains semblent spécifiques (Chapitre 2, Figure 7B-D). Trois membres d'un complexe ubiquitine ligase (U.L.C) ont été trouvés comme partenaires cellulaires de proximité exclusifs du mutant p120ctn-S320D, suggérant que la phosphorylation de la sérine 320 pourrait lier p120ctn à ce complexe. De plus, plusieurs protéines localisées dans les p-bodies ont été identifiées principalement comme des interacteurs potentiels de p120ctn-S320D, indiquant que ce mutant est potentiellement enrichi dans ce compartiment cellulaire. Nous avons confirmé cet enrichissement de la protéine p120ctn phosphorylée par immunofluorescence dans des

lignées cellulaires de mélanomes, où les kinases RSK sont abondamment activées (Chapitre 2, Figure S2). Enfin, plus d'une vingtaine de protéines impliquées dans la régulation des microtubules se sont avérées être des partenaires cellulaires potentiels de la forme p120ctn-S320A. Ce nombre est réduit pour p120ctn-S320D et seules quelques protéines en faible abondance ont été trouvées pour ce mutant, ce qui suggère que p120ctn non phosphorylée pourrait jouer un rôle dans la régulation des microtubules. Ainsi, la phosphorylation de la sérine 320 par les kinases RSK conduit à réorganiser les partenaires cellulaires de proximité de p120ctn et pourrait jouer un rôle dans de nombreuses fonctions de p120ctn encore inconnues.

Finalement, ce résultat nous amène à penser que la phosphorylation par RSK de certains substrats peut entraîner un changement dans les interactions protéiques de ce substrat. L'utilisation du BioID peut donc être une bonne initiative pour la caractérisation du rôle de ces phosphorylations dans de futures études sur les substrats des kinases RSK.

3. Scribble, un régulateur de la voie de signalisation Ras/MAPK

Au cours de notre deuxième projet, nous constatons qu'il y a une compétition entre Scribble et le module ERK1/2 pour s'accrocher à l'extrémité C-terminale de RSK2 (Chapitre 3, Figure 5A-C). Ainsi, en présence de Scribble, l'isoforme RSK2 interagit moins avec ERK1/2 et est donc moins activée (Chapitre 3, Figure 5D et E). Nous avons donc identifié un nouveau mécanisme de régulation grâce auquel la protéine Scribble peut contrôler l'activation de la voie de signalisation Ras/MAPK par le biais d'une interaction protéique directe avec la kinase RSK2. Bien qu'ils contredisent un groupe de recherche qui avait identifié une interaction entre Scribble et les kinases ERK1/2 (Nagasaka, Pim, et al. 2010; Nagasaka, Massimi, et al. 2010), nos résultats s'inscrivent dans la continuité de plusieurs études décrivant l'impact de Scribble sur l'activité de la voie de signalisation Ras/MAPK (Chapitre 1, Partie 3.1.2.3),

Pour mieux caractériser le rôle de Scribble sur l'activation de RSK2, des données supplémentaires seront cependant nécessaires dans le futur pour finaliser ce projet. En effet, nous avons montré l'impact de l'expression de Scribble sur l'interaction de RSK2 et ERK1/2 ainsi que sur l'activation de RSK2. Il serait intéressant d'observer l'activation de RSK2 en absence de Scribble dans les cellules. Est-ce qu'on obtiendrait l'effet opposé ? En répondant à cette question, des résultats additionnels pourraient voir le jour. En effet,

plusieurs études montrent que la protéine Scribble est moins exprimée ou mal localisée dans différents types de cellules cancéreuses (Gardiol et al. 2006; Feigin et al. 2014). Ainsi, en absence de Scribble dans les cellules cancéreuses, ou en présence de la protéine Scribble mal localisée et donc potentiellement non fonctionnelle, l'isoforme RSK2 serait donc grandement activée et plus à même d'effectuer ses fonctions déjà évoquées dans le développement des cellules cancéreuses. Ces résultats pourraient compléter des observations déjà émises par d'autres groupes montrant qu'une délétion de Scribble additionnée à une sur-activation de la voie de signalisation Ras/MAPK entraînent la prolifération et la survie des cellules cancéreuses (Dow et al. 2008; Wu, Pastor-Pareja, and Xu 2010).

De plus, les résultats sur l'impact de l'interaction entre RSK2 et Scribble suggèrent une autre hypothèse. En effet, nous avons plus tôt évoqué l'affinité des kinases RSK pour les protéines avec des domaines PDZ. Ainsi, on peut se demander si des interactions avec d'autres protéines de ce type mèneraient aussi à une compétition pour se lier à l'extrémité C-terminale des kinases RSK et donc réduire leur activation par les protéines ERK1/2. Des mutations ou une sous-expression de protéines à domaines PDZ se liant aux kinases RSK dans les cellules cancéreuses entraîneraient ainsi une activation aberrante de ces dernières.

Chapitre 5 : Conclusion

La voie de signalisation Ras/MAPK régule de nombreuses fonctions biologiques tout en étant responsable de plusieurs maladies et syndromes génétiques, dont le développement des cellules cancéreuses. Ainsi, une meilleure compréhension du rôle respectif des effecteurs de cette voie a une importance majeure dans la recherche sur le cancer ainsi que dans le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques. Parmi ces effecteurs, nous retrouvons les protéines kinases de la famille RSK qui, malgré leurs implications décrites dans la croissance des cellules cancéreuses, restent peu caractérisées.

Nos travaux se sont donc concentrés sur l'étude des kinases RSK et grâce à l'utilisation de différentes approches de spectrométrie de masse nous avons identifié de nouveaux partenaires cellulaires des protéines RSK mais aussi leurs fonctions biologiques associées. Tout d'abord, nous avons déterminé pour la première fois l'interactome *in vivo* de chacune des isoformes de RSK, permettant d'apporter des connaissances sur leurs rôles respectifs. De plus, nous avons montré dans la même étude que la voie de signalisation Ras/MAPK par le biais des kinases RSK phosphoryle la protéine p120ctn dans les mélanomes. Après avoir identifié l'implication des kinases RSK dans l'adhésion intercellulaire, nous démontrons aussi que la phosphorylation de p120ctn par ces kinases induit une réorganisation de ses partenaires cellulaires suggérant un changement de ses fonctions biologiques. Par ailleurs, nous identifions dans notre seconde étude la protéine Scribble comme un partenaire spécifique de l'isoforme RSK2. Cette interaction limite la liaison entre RSK2 et les kinases ERK1/2 entraînant ainsi une baisse de l'activation de l'isoforme RSK2. Nous décrivons ainsi un nouveau mécanisme direct régulant l'activité de la voie de signalisation Ras/MAPK.

L'ensemble de nos travaux effectués dans cette thèse démontre donc l'importance de l'étude de la voie de signalisation Ras/MAPK et de ses effecteurs tels que les kinases de la famille RSK. Nos études viennent ainsi s'inscrire dans une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires régulés par les kinases RSK, notamment pour identifier leur implication dans le développement du cancer.

Bibliographie

- Abdulrahman, N., M. Jaballah, N. Poomakkoth, S. Riaz, S. Abdelaziz, A. Issa, and F. Mraiche. 2016. 'Inhibition of p90 ribosomal S6 kinase attenuates cell migration and proliferation of the human lung adenocarcinoma through phospho-GSK-3beta and osteopontin', *Mol Cell Biochem*, 418: 21-9.
- Abe, K., and M. Takeichi. 2008. 'EPLIN mediates linkage of the cadherin catenin complex to F-actin and stabilizes the circumferential actin belt', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105: 13-9.
- Aberle, H., S. Butz, J. Stappert, H. Weissig, R. Kemler, and H. Hoschuetzky. 1994. 'Assembly of the cadherin-catenin complex in vitro with recombinant proteins', *J Cell Sci*, 107 (Pt 12): 3655-63.
- Ahearn, I. M., K. Haigis, D. Bar-Sagi, and M. R. Philips. 2011. 'Regulating the regulator: post-translational modification of RAS', *Nat Rev Mol Cell Biol*, 13: 39-51.
- Aho, S., L. Levansuo, O. Montonen, C. Kari, U. Rodeck, and J. Uitto. 2002. 'Specific sequences in p120ctn determine subcellular distribution of its multiple isoforms involved in cellular adhesion of normal and malignant epithelial cells', *J Cell Sci*, 115: 1391-402.
- Aho, S., K. Rothenberger, and J. Uitto. 1999. 'Human p120ctn catenin: tissue-specific expression of isoforms and molecular interactions with BP180/type XVII collagen', *J Cell Biochem*, 73: 390-9.
- Alcorta, D. A., C. M. Crews, L. J. Sweet, L. Bankston, S. W. Jones, and R. L. Erikson. 1989. 'Sequence and expression of chicken and mouse rsk: homologs of *Xenopus laevis* ribosomal S6 kinase', *Mol Cell Biol*, 9: 3850-9.
- Alema, S., and A. M. Salvatore. 2007. 'p120 catenin and phosphorylation: Mechanisms and traits of an unresolved issue', *Biochim Biophys Acta*, 1773: 47-58.
- Anastasiadis, P. Z., S. Y. Moon, M. A. Thoreson, D. J. Mariner, H. C. Crawford, Y. Zheng, and A. B. Reynolds. 2000. 'Inhibition of RhoA by p120 catenin', *Nat Cell Biol*, 2: 637-44.
- Anastasiadis, P. Z., and A. B. Reynolds. 2001. 'Regulation of Rho GTPases by p120-catenin', *Curr Opin Cell Biol*, 13: 604-10.
- Andrae, J., R. Gallini, and C. Betsholtz. 2008. 'Role of platelet-derived growth factors in physiology and medicine', *Genes Dev*, 22: 1276-312.
- Angenstein, F., W. T. Greenough, and I. J. Weiler. 1998. 'Metabotropic glutamate receptor-initiated translocation of protein kinase p90rsk to polyribosomes: a possible

- factor regulating synaptic protein synthesis', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95: 15078-83.
- Anjum, R., P. P. Roux, B. A. Ballif, S. P. Gygi, and J. Blenis. 2005. 'The tumor suppressor DAP kinase is a target of RSK-mediated survival signaling', *Curr Biol*, 15: 1762-7.
- Arany, I., J. K. Megyesi, J. E. Reusch, and R. L. Saffirstein. 2005. 'CREB mediates ERK-induced survival of mouse renal tubular cells after oxidant stress', *Kidney Int*, 68: 1573-82.
- Arnaud, C., M. Sebbagh, S. Nola, S. Audebert, G. Bidaut, A. Hermant, O. Gayet, N. J. Dusetti, V. Ollendorff, M. J. Santoni, J. P. Borg, and P. Lecine. 2009. 'MCC, a new interacting protein for Scrib, is required for cell migration in epithelial cells', *FEBS Lett*, 583: 2326-32.
- Aronchik, I., B. A. Appleton, S. E. Basham, K. Crawford, M. Del Rosario, L. V. Doyle, W. F. Estacio, J. Lan, M. K. Lindvall, C. A. Luu, E. Ornelas, E. Venetsanakos, C. M. Shafer, and A. B. Jefferson. 2014. 'Novel potent and selective inhibitors of p90 ribosomal S6 kinase reveal the heterogeneity of RSK function in MAPK-driven cancers', *Mol Cancer Res*, 12: 803-12.
- Audebert, S., C. Navarro, C. Nourry, S. Chasserot-Golaz, P. Lecine, Y. Bellaiche, J. L. Dupont, R. T. Premont, C. Sempere, J. M. Strub, A. Van Dorselaer, N. Vitale, and J. P. Borg. 2004. 'Mammalian Scribble forms a tight complex with the betaPIX exchange factor', *Curr Biol*, 14: 987-95.
- Bagowski, C. P., W. Bruins, and A. J. Te Velthuis. 2010. 'The nature of protein domain evolution: shaping the interaction network', *Curr Genomics*, 11: 368-76.
- Bahrami, S., and F. Drablos. 2016. 'Gene regulation in the immediate-early response process', *Adv Biol Regul*, 62: 37-49.
- Bain, J., L. Plater, M. Elliott, N. Shpiro, C. J. Hastie, H. McLauchlan, I. Klevernic, J. S. Arthur, D. R. Alessi, and P. Cohen. 2007. 'The selectivity of protein kinase inhibitors: a further update', *Biochem J*, 408: 297-315.
- Baki, L., P. Marambaud, S. Efthimiopoulos, A. Georgakopoulos, P. Wen, W. Cui, J. Shioi, E. Koo, M. Ozawa, V. L. Friedrich, Jr., and N. K. Robakis. 2001. 'Presenilin-1 binds cytoplasmic epithelial cadherin, inhibits cadherin/p120 association, and regulates stability and function of the cadherin/catenin adhesion complex', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98: 2381-6.
- Bakiri, L., M. O. Reschke, H. A. Gefroh, M. H. Idarraga, K. Polzer, R. Zenz, G. Schett, and E. F. Wagner. 2011. 'Functions of Fos phosphorylation in bone homeostasis, cytokine response and tumorigenesis', *Oncogene*, 30: 1506-17.

- Ballif, B. A., and J. Blenis. 2001. 'Molecular mechanisms mediating mammalian mitogen-activated protein kinase (MAPK) kinase (MEK)-MAPK cell survival signals', *Cell Growth Differ*, 12: 397-408.
- Bartlett, J. D., J. M. Dobeck, C. E. Tye, M. Perez-Moreno, N. Stokes, A. B. Reynolds, E. Fuchs, and Z. Skobe. 2010. 'Targeted p120-catenin ablation disrupts dental enamel development', *PLoS One*, 5.
- Bazzi, H., and A. M. Christiano. 2007. 'Broken hearts, woolly hair, and tattered skin: when desmosomal adhesion goes awry', *Curr Opin Cell Biol*, 19: 515-20.
- Bellovin, D. I., R. C. Bates, A. Muzikansky, D. L. Rimm, and A. M. Mercurio. 2005. 'Altered localization of p120 catenin during epithelial to mesenchymal transition of colon carcinoma is prognostic for aggressive disease', *Cancer Res*, 65: 10938-45.
- Belotti, E., J. Polanowska, A. M. Daulat, S. Audebert, V. Thome, J. C. Lissitzky, F. Lembo, K. Blibek, S. Omi, N. Lenfant, A. Gangar, M. Montcouquiol, M. J. Santoni, M. Sebbagh, M. Aurrand-Lions, S. Angers, L. Kodjabachian, J. Reboul, and J. P. Borg. 2013. 'The human PDZome: a gateway to PSD95-Disc large-zonula occludens (PDZ)-mediated functions', *Mol Cell Proteomics*, 12: 2587-603.
- Berns, K., E. M. Hijmans, J. Mullenders, T. R. Brummelkamp, A. Velds, M. Heimerikx, R. M. Kerkhoven, M. Madiredjo, W. Nijkamp, B. Weigelt, R. Agami, W. Ge, G. Cavet, P. S. Linsley, R. L. Beijersbergen, and R. Bernards. 2004. 'A large-scale RNAi screen in human cells identifies new components of the p53 pathway', *Nature*, 428: 431-7.
- Berx, G., and F. van Roy. 2009. 'Involvement of members of the cadherin superfamily in cancer', *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 1: a003129.
- Bignone, P. A., K. Y. Lee, Y. Liu, G. Emilion, J. Finch, A. E. Soosay, F. M. Charnock, S. Beck, I. Dunham, A. J. Mungall, and T. S. Ganesan. 2007. 'RPS6KA2, a putative tumour suppressor gene at 6q27 in sporadic epithelial ovarian cancer', *Oncogene*, 26: 683-700.
- Bilder, D. 2001. 'PDZ proteins and polarity: functions from the fly', *Trends Genet*, 17: 511-9.
- Bilder, D., and N. Perrimon. 2000. 'Localization of apical epithelial determinants by the basolateral PDZ protein Scribble', *Nature*, 403: 676-80.
- Bjorbaek, C., Y. Zhao, and D. E. Moller. 1995. 'Divergent functional roles for p90rsk kinase domains', *J Biol Chem*, 270: 18848-52.
- Blenis, J., and R. L. Erikson. 1984. 'Phosphorylation of the ribosomal protein S6 is elevated in cells transformed by a variety of tumor viruses', *J Virol*, 50: 966-9.

- Boguslavsky, S., I. Grosheva, E. Landau, M. Shtutman, M. Cohen, K. Arnold, E. Feinstein, B. Geiger, and A. Bershadsky. 2007. 'p120 catenin regulates lamellipodial dynamics and cell adhesion in cooperation with cortactin', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104: 10882-7.
- Bohuslav, J., L. F. Chen, H. Kwon, Y. Mu, and W. C. Greene. 2004. 'p53 induces NF-kappaB activation by an IkappaB kinase-independent mechanism involving phosphorylation of p65 by ribosomal S6 kinase 1', *J Biol Chem*, 279: 26115-25.
- Bonni, A., A. Brunet, A. E. West, S. R. Datta, M. A. Takasu, and M. E. Greenberg. 1999. 'Cell survival promoted by the Ras-MAPK signaling pathway by transcription-dependent and -independent mechanisms', *Science*, 286: 1358-62.
- Boyer, S. J., J. Burke, X. Guo, T. M. Kirrane, R. J. Snow, Y. Zhang, C. Sarko, L. Soleymanzadeh, A. Swinamer, J. Westbrook, F. Dicapua, A. Padyana, D. Cogan, A. Gao, Z. Xiong, J. B. Madwed, M. Kashem, S. Kugler, and M. M. O'Neill. 2012. 'Indole RSK inhibitors. Part 1: discovery and initial SAR', *Bioorg Med Chem Lett*, 22: 733-7.
- Brenman, J. E., D. S. Chao, S. H. Gee, A. W. McGee, S. E. Craven, D. R. Santillano, Z. Wu, F. Huang, H. Xia, M. F. Peters, S. C. Froehner, and D. S. Bredt. 1996. 'Interaction of nitric oxide synthase with the postsynaptic density protein PSD-95 and alpha1-syntrophin mediated by PDZ domains', *Cell*, 84: 757-67.
- Broussard, J. A., S. Getsios, and K. J. Green. 2015. 'Desmosome regulation and signaling in disease', *Cell Tissue Res*, 360: 501-12.
- Brown, J. R., E. Nigh, R. J. Lee, H. Ye, M. A. Thompson, F. Saudou, R. G. Pestell, and M. E. Greenberg. 1998. 'Fos family members induce cell cycle entry by activating cyclin D1', *Mol Cell Biol*, 18: 5609-19.
- Brown, M. V., P. E. Burnett, M. F. Denning, and A. B. Reynolds. 2009. 'PDGF receptor activation induces p120-catenin phosphorylation at serine 879 via a PKCalpha-dependent pathway', *Exp Cell Res*, 315: 39-49.
- Bruning, J. C., J. A. Gillette, Y. Zhao, C. Bjorbaeck, J. Kotzka, B. Knebel, H. Avci, B. Hanstein, P. Lingohr, D. E. Moller, W. Krone, C. R. Kahn, and D. Muller-Wieland. 2000. 'Ribosomal subunit kinase-2 is required for growth factor-stimulated transcription of the c-Fos gene', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97: 2462-7.
- Buck, M., V. Poli, T. Hunter, and M. Chojkier. 2001. 'C/EBPbeta phosphorylation by RSK creates a functional XEXD caspase inhibitory box critical for cell survival', *Mol Cell*, 8: 807-16.

- Cai, J., H. Ma, F. Huang, D. Zhu, L. Zhao, Y. Yang, J. Bi, and T. Zhang. 2014. 'Low expression of RSK4 predicts poor prognosis in patients with colorectal cancer', *Int J Clin Exp Pathol*, 7: 4959-70.
- Campbell, P. M., and C. J. Der. 2004. 'Oncogenic Ras and its role in tumor cell invasion and metastasis', *Semin Cancer Biol*, 14: 105-14.
- Cargnello, M., and P. P. Roux. 2011. 'Activation and function of the MAPKs and their substrates, the MAPK-activated protein kinases', *Microbiol Mol Biol Rev*, 75: 50-83.
- Cargnello, M., J. Tcherkezian, J. F. Dorn, E. L. Huttlin, P. S. Maddox, S. P. Gygi, and P. P. Roux. 2012. 'Phosphorylation of the eukaryotic translation initiation factor 4E-transporter (4E-T) by c-Jun N-terminal kinase promotes stress-dependent P-body assembly', *Mol Cell Biol*, 32: 4572-84.
- Carnahan, R. H., A. Rokas, E. A. Gaucher, and A. B. Reynolds. 2010. 'The molecular evolution of the p120-catenin subfamily and its functional associations', *PLoS One*, 5: e15747.
- Carriere, A., M. Cargnello, L. A. Julien, H. Gao, E. Bonneil, P. Thibault, and P. P. Roux. 2008. 'Oncogenic MAPK signaling stimulates mTORC1 activity by promoting RSK-mediated raptor phosphorylation', *Curr Biol*, 18: 1269-77.
- Carriere, A., H. Ray, J. Blenis, and P. P. Roux. 2008. 'The RSK factors of activating the Ras/MAPK signaling cascade', *Front Biosci*, 13: 4258-75.
- Casagolda, D., B. Del Valle-Perez, G. Valls, E. Lugalde, M. Vinyoles, J. Casado-Vela, G. Solanas, E. Batlle, A. B. Reynolds, J. I. Casal, A. G. de Herreros, and M. Dunach. 2010. 'A p120-catenin-CK1epsilon complex regulates Wnt signaling', *J Cell Sci*, 123: 2621-31.
- Caslavsky, J., Z. Klimova, and T. Vomastek. 2013. 'ERK and RSK regulate distinct steps of a cellular program that induces transition from multicellular epithelium to single cell phenotype', *Cell Signal*, 25: 2743-51.
- Caspar, D. L., D. A. Goodenough, L. Makowski, and W. C. Phillips. 1977. 'Gap junction structures. I. Correlated electron microscopy and x-ray diffraction', *J Cell Biol*, 74: 605-28.
- Castano, J., G. Solanas, D. Casagolda, I. Raurell, P. Villagrasa, X. R. Bustelo, A. Garcia de Herreros, and M. Dunach. 2007. 'Specific phosphorylation of p120-catenin regulatory domain differently modulates its binding to RhoA', *Mol Cell Biol*, 27: 1745-57.
- Castellano, E., and J. Downward. 2011. 'RAS Interaction with PI3K: More Than Just Another Effector Pathway', *Genes Cancer*, 2: 261-74.

- Castillon, C., S. Lunion, N. Desvignes, A. Hanauer, S. Laroche, and R. Poirier. 2018. 'Selective alteration of adult hippocampal neurogenesis and impaired spatial pattern separation performance in the RSK2-deficient mouse model of Coffin-Lowry syndrome', *Neurobiol Dis*, 115: 69-81.
- Cereijido, M., R. G. Contreras, and L. Shoshani. 2004. 'Cell adhesion, polarity, and epithelia in the dawn of metazoans', *Physiol Rev*, 84: 1229-62.
- Chang, B. H., T. S. Gujral, E. S. Karp, R. BuKhalid, V. P. Grantcharova, and G. MacBeath. 2011. 'A systematic family-wide investigation reveals that ~30% of mammalian PDZ domains engage in PDZ-PDZ interactions', *Chem Biol*, 18: 1143-52.
- Chang, F., L. S. Steelman, J. T. Lee, J. G. Shelton, P. M. Navolanic, W. L. Blalock, R. A. Franklin, and J. A. McCubrey. 2003. 'Signal transduction mediated by the Ras/Raf/MEK/ERK pathway from cytokine receptors to transcription factors: potential targeting for therapeutic intervention', *Leukemia*, 17: 1263-93.
- Chauvet, N., M. Prieto, C. Fabre, N. K. Noren, and A. Privat. 2003. 'Distribution of p120 catenin during rat brain development: potential role in regulation of cadherin-mediated adhesion and actin cytoskeleton organization', *Mol Cell Neurosci*, 22: 467-86.
- Chen, C., L. Zhang, N. J. Huang, B. Huang, and S. Kornbluth. 2013. 'Suppression of DNA-damage checkpoint signaling by Rsk-mediated phosphorylation of Mre11', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110: 20605-10.
- Chen, R. H., C. Abate, and J. Blenis. 1993. 'Phosphorylation of the c-Fos transrepression domain by mitogen-activated protein kinase and 90-kDa ribosomal S6 kinase', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90: 10952-6.
- Chen, R. H., C. Sarnecki, and J. Blenis. 1992. 'Nuclear localization and regulation of erk- and rsk-encoded protein kinases', *Mol Cell Biol*, 12: 915-27.
- Chen, S., and C. Mackintosh. 2009. 'Differential regulation of NHE1 phosphorylation and glucose uptake by inhibitors of the ERK pathway and p90RSK in 3T3-L1 adipocytes', *Cell Signal*, 21: 1984-93.
- Chen, X., S. Kojima, G. G. Borisy, and K. J. Green. 2003. 'p120 catenin associates with kinesin and facilitates the transport of cadherin-catenin complexes to intercellular junctions', *J Cell Biol*, 163: 547-57.
- Cheng, Z., V. Assfalg, X. Shi, S. Lin, J. Xia, P. Yang, N. Huser, and F. Shen. 2012. 'Effect of p120 catenin silencing on biological behaviors of PANC-1 cells', *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci*, 32: 707-12.

- Chetkovich, D. M., L. Chen, T. J. Stocker, R. A. Nicoll, and D. S. Bredt. 2002. 'Phosphorylation of the postsynaptic density-95 (PSD-95)/discs large/zona occludens-1 binding site of stargazin regulates binding to PSD-95 and synaptic targeting of AMPA receptors', *J Neurosci*, 22: 5791-6.
- Chetty, R., D. Jain, and S. Serra. 2008. 'p120 catenin reduction and cytoplasmic relocalization leads to dysregulation of E-cadherin in solid pseudopapillary tumors of the pancreas', *Am J Clin Pathol*, 130: 71-6.
- Cheung, L. W., P. C. Leung, and A. S. Wong. 2010. 'Cadherin switching and activation of p120 catenin signaling are mediators of gonadotropin-releasing hormone to promote tumor cell migration and invasion in ovarian cancer', *Oncogene*, 29: 2427-40.
- Cho, K. O., C. A. Hunt, and M. B. Kennedy. 1992. 'The rat brain postsynaptic density fraction contains a homolog of the Drosophila discs-large tumor suppressor protein', *Neuron*, 9: 929-42.
- Cho, Y. Y., K. Yao, H. G. Kim, B. S. Kang, D. Zheng, A. M. Bode, and Z. Dong. 2007. 'Ribosomal S6 kinase 2 is a key regulator in tumor promoter induced cell transformation', *Cancer Res*, 67: 8104-12.
- Choi, H. J., and W. I. Weis. 2005. 'Structure of the armadillo repeat domain of plakophilin 1', *J Mol Biol*, 346: 367-76.
- Choi, H., B. Larsen, Z. Y. Lin, A. Breitkreutz, D. Mellacheruvu, D. Fermin, Z. S. Qin, M. Tyers, A. C. Gingras, and A. I. Nesvizhskii. 2011. 'SAINT: probabilistic scoring of affinity purification-mass spectrometry data', *Nat Methods*, 8: 70-3.
- Choi, J., J. Ko, E. Park, J. R. Lee, J. Yoon, S. Lim, and E. Kim. 2002. 'Phosphorylation of stargazin by protein kinase A regulates its interaction with PSD-95', *J Biol Chem*, 277: 12359-63.
- Chrestensen, C. A., and T. W. Sturgill. 2002. 'Characterization of the p90 ribosomal S6 kinase 2 carboxyl-terminal domain as a protein kinase', *J Biol Chem*, 277: 27733-41.
- Chung, J., E. Uchida, T. C. Grammer, and J. Blenis. 1997. 'STAT3 serine phosphorylation by ERK-dependent and -independent pathways negatively modulates its tyrosine phosphorylation', *Mol Cell Biol*, 17: 6508-16.
- Ciesiolka, M., M. Delvaeye, G. Van Imschoot, V. Verschuere, P. McCrea, F. van Roy, and K. Vleminckx. 2004. 'p120 catenin is required for morphogenetic movements involved in the formation of the eyes and the craniofacial skeleton in *Xenopus*', *J Cell Sci*, 117: 4325-39.

- Clark, D. E., T. M. Errington, J. A. Smith, H. F. Frierson, Jr., M. J. Weber, and D. A. Lannigan. 2005. 'The serine/threonine protein kinase, p90 ribosomal S6 kinase, is an important regulator of prostate cancer cell proliferation', *Cancer Res*, 65: 3108-16.
- Claude, P., and D. A. Goodenough. 1973. 'Fracture faces of zonulae occludentes from "tight" and "leaky" epithelia', *J Cell Biol*, 58: 390-400.
- Cohen, M. S., H. Hadjivassiliou, and J. Taunton. 2007. 'A clickable inhibitor reveals context-dependent autoactivation of p90 RSK', *Nat Chem Biol*, 3: 156-60.
- Cohen, M. S., C. Zhang, K. M. Shokat, and J. Taunton. 2005. 'Structural bioinformatics-based design of selective, irreversible kinase inhibitors', *Science*, 308: 1318-21.
- Cooper, J. A., D. F. Bowen-Pope, E. Raines, R. Ross, and T. Hunter. 1982. 'Similar effects of platelet-derived growth factor and epidermal growth factor on the phosphorylation of tyrosine in cellular proteins', *Cell*, 31: 263-73.
- Cox, B. J., M. Vollmer, O. Tamplin, M. Lu, S. Biechele, M. Gertsenstein, C. van Campenhout, T. Floss, R. Kuhn, W. Wurst, H. Lickert, and J. Rossant. 2010. 'Phenotypic annotation of the mouse X chromosome', *Genome Res*, 20: 1154-64.
- Cuadrado, A., and A. R. Nebreda. 2010. 'Mechanisms and functions of p38 MAPK signalling', *Biochem J*, 429: 403-17.
- Cuesta, R., and M. K. Holz. 2016. 'RSK-mediated down-regulation of PDCD4 is required for proliferation, survival, and migration in a model of triple-negative breast cancer', *Oncotarget*, 7: 27567-83.
- Czaplinska, D., L. Turczyk, A. Grudowska, M. Mieszkowska, A. D. Lipinska, A. C. Skladanowski, A. J. Zaczek, H. M. Romanska, and R. Sadej. 2014. 'Phosphorylation of RSK2 at Tyr529 by FGFR2-p38 enhances human mammary epithelial cells migration', *Biochim Biophys Acta*, 1843: 2461-70.
- Dalby, K. N., N. Morrice, F. B. Caudwell, J. Avruch, and P. Cohen. 1998. 'Identification of regulatory phosphorylation sites in mitogen-activated protein kinase (MAPK)-activated protein kinase-1a/p90rsk that are inducible by MAPK', *J Biol Chem*, 273: 1496-505.
- Daniel, J. M. 2007. 'Dancing in and out of the nucleus: p120(ctn) and the transcription factor Kaiso', *Biochim Biophys Acta*, 1773: 59-68.
- Daniel, J. M., C. M. Spring, H. C. Crawford, A. B. Reynolds, and A. Baig. 2002. 'The p120(ctn)-binding partner Kaiso is a bi-modal DNA-binding protein that

recognizes both a sequence-specific consensus and methylated CpG dinucleotides', *Nucleic Acids Res*, 30: 2911-9.

- David, J. P., D. Mehic, L. Bakiri, A. F. Schilling, V. Mandic, M. Priemel, M. H. Idarraga, M. O. Reschke, O. Hoffmann, M. Amling, and E. F. Wagner. 2005. 'Essential role of RSK2 in c-Fos-dependent osteosarcoma development', *J Clin Invest*, 115: 664-72.
- Davies, H., G. R. Bignell, C. Cox, P. Stephens, S. Edkins, S. Clegg, J. Teague, H. Woffendin, M. J. Garnett, W. Bottomley, N. Davis, E. Dicks, R. Ewing, Y. Floyd, K. Gray, S. Hall, R. Hawes, J. Hughes, V. Kosmidou, A. Menzies, C. Mould, A. Parker, C. Stevens, S. Watt, S. Hooper, R. Wilson, H. Jayatilake, B. A. Gusterson, C. Cooper, J. Shipley, D. Hargrave, K. Pritchard-Jones, N. Maitland, G. Chenevix-Trench, G. J. Riggins, D. D. Bigner, G. Palmieri, A. Cossu, A. Flanagan, A. Nicholson, J. W. Ho, S. Y. Leung, S. T. Yuen, B. L. Weber, H. F. Seigler, T. L. Darrow, H. Paterson, R. Marais, C. J. Marshall, R. Wooster, M. R. Stratton, and P. A. Futreal. 2002. 'Mutations of the BRAF gene in human cancer', *Nature*, 417: 949-54.
- Davis, I. J., T. G. Hazel, R. H. Chen, J. Blenis, and L. F. Lau. 1993. 'Functional domains and phosphorylation of the orphan receptor Nur77', *Mol Endocrinol*, 7: 953-64.
- Davis, M. A., R. C. Ireton, and A. B. Reynolds. 2003. 'A core function for p120-catenin in cadherin turnover', *J Cell Biol*, 163: 525-34.
- Davis, M. A., and A. B. Reynolds. 2006. 'Blocked acinar development, E-cadherin reduction, and intraepithelial neoplasia upon ablation of p120-catenin in the mouse salivary gland', *Dev Cell*, 10: 21-31.
- De Cesare, D., S. Jacquot, A. Hanauer, and P. Sassone-Corsi. 1998. 'Rsk-2 activity is necessary for epidermal growth factor-induced phosphorylation of CREB protein and transcription of c-fos gene', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95: 12202-7.
- del Valle-Perez, B., D. Casagolda, E. Lugalde, G. Valls, M. Codina, N. Dave, A. Garcia de Herreros, and M. Dunach. 2016. 'Wnt controls the transcriptional activity of Kaiso through CK1epsilon-dependent phosphorylation of p120-catenin', *J Cell Sci*, 129: 873.
- Della Rocca, G. J., T. van Biesen, Y. Daaka, D. K. Luttrell, L. M. Luttrell, and R. J. Lefkowitz. 1997. 'Ras-dependent mitogen-activated protein kinase activation by G protein-coupled receptors. Convergence of Gi- and Gq-mediated pathways on calcium/calmodulin, Pyk2, and Src kinase', *J Biol Chem*, 272: 19125-32.
- Dhomen, N., and R. Marais. 2007. 'New insight into BRAF mutations in cancer', *Curr Opin Genet Dev*, 17: 31-9.

- Diehl, J. A., M. Cheng, M. F. Roussel, and C. J. Sherr. 1998. 'Glycogen synthase kinase-3beta regulates cyclin D1 proteolysis and subcellular localization', *Genes Dev*, 12: 3499-511.
- Doehn, U., C. Hauge, S. R. Frank, C. J. Jensen, K. Duda, J. V. Nielsen, M. S. Cohen, J. V. Johansen, B. R. Winther, L. R. Lund, O. Winther, J. Taunton, S. H. Hansen, and M. Frodin. 2009. 'RSK is a principal effector of the RAS-ERK pathway for eliciting a coordinate promotile/invasive gene program and phenotype in epithelial cells', *Mol Cell*, 35: 511-22.
- Dohn, M. R., M. V. Brown, and A. B. Reynolds. 2009. 'An essential role for p120-catenin in Src- and Rac1-mediated anchorage-independent cell growth', *J Cell Biol*, 184: 437-50.
- Douville, E., and J. Downward. 1997. 'EGF induced SOS phosphorylation in PC12 cells involves P90 RSK-2', *Oncogene*, 15: 373-83.
- Dow, L. E., I. A. Elsum, C. L. King, K. M. Kinross, H. E. Richardson, and P. O. Humbert. 2008. 'Loss of human Scribble cooperates with H-Ras to promote cell invasion through deregulation of MAPK signalling', *Oncogene*, 27: 5988-6001.
- Dow, L. E., J. S. Kauffman, J. Caddy, K. Zarbalis, A. S. Peterson, S. M. Jane, S. M. Russell, and P. O. Humbert. 2007. 'The tumour-suppressor Scribble dictates cell polarity during directed epithelial migration: regulation of Rho GTPase recruitment to the leading edge', *Oncogene*, 26: 2272-82.
- Doyle, D. A., A. Lee, J. Lewis, E. Kim, M. Sheng, and R. MacKinnon. 1996. 'Crystal structures of a complexed and peptide-free membrane protein-binding domain: molecular basis of peptide recognition by PDZ', *Cell*, 85: 1067-76.
- Du, Z., and C. M. Lovly. 2018. 'Mechanisms of receptor tyrosine kinase activation in cancer', *Mol Cancer*, 17: 58.
- Dufresne, S. D., C. BJORBAEK, K. El-Haschimi, Y. Zhao, W. G. Aschenbach, D. E. Moller, and L. J. Goodyear. 2001. 'Altered extracellular signal-regulated kinase signaling and glycogen metabolism in skeletal muscle from p90 ribosomal S6 kinase 2 knockout mice', *Mol Cell Biol*, 21: 81-7.
- Dugani, C. B., A. Paquin, D. R. Kaplan, and F. D. Miller. 2010. 'Coffin-Lowry syndrome: a role for RSK2 in mammalian neurogenesis', *Dev Biol*, 347: 348-59.
- Dummler, B. A., C. Hauge, J. Silber, H. G. Yntema, L. S. Kruse, B. Kofoed, B. A. Hemmings, D. R. Alessi, and M. Frodin. 2005. 'Functional characterization of human RSK4, a new 90-kDa ribosomal S6 kinase, reveals constitutive activation in most cell types', *J Biol Chem*, 280: 13304-14.

- Eisinger-Mathason, T. S., J. Andrade, A. L. Groehler, D. E. Clark, T. L. Muratore-Schroeder, L. Pasic, J. A. Smith, J. Shabanowitz, D. F. Hunt, I. G. Macara, and D. A. Lannigan. 2008. 'Codependent functions of RSK2 and the apoptosis-promoting factor TIA-1 in stress granule assembly and cell survival', *Mol Cell*, 31: 722-36.
- Elf, S., D. Blevins, L. Jin, T. W. Chung, I. R. Williams, B. H. Lee, J. X. Lin, W. J. Leonard, J. Taunton, H. J. Houry, and S. Kang. 2011. 'p90RSK2 is essential for FLT3-ITD- but dispensable for BCR-ABL-induced myeloid leukemia', *Blood*, 117: 6885-94.
- Elia, L. P., M. Yamamoto, K. Zang, and L. F. Reichardt. 2006. 'p120 catenin regulates dendritic spine and synapse development through Rho-family GTPases and cadherins', *Neuron*, 51: 43-56.
- Elsam, I. A., C. Martin, and P. O. Humbert. 2013. 'Scribble regulates an EMT polarity pathway through modulation of MAPK-ERK signaling to mediate junction formation', *J Cell Sci*, 126: 3990-9.
- Eng, J. K., T. A. Jahan, and M. R. Hoopmann. 2013. 'Comet: an open-source MS/MS sequence database search tool', *Proteomics*, 13: 22-4.
- Erikson, E., and J. L. Maller. 1985. 'A protein kinase from *Xenopus* eggs specific for ribosomal protein S6', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 82: 742-6.
- Fang, X., H. Ji, S. W. Kim, J. I. Park, T. G. Vaught, P. Z. Anastasiadis, M. Ciesiolka, and P. D. McCrea. 2004. 'Vertebrate development requires ARVCF and p120 catenins and their interplay with RhoA and Rac', *J Cell Biol*, 165: 87-98.
- Feigin, M. E., S. D. Akshinthala, K. Araki, A. Z. Rosenberg, L. B. Muthuswamy, B. Martin, B. D. Lehmann, H. K. Berman, J. A. Pietenpol, R. D. Cardiff, and S. K. Muthuswamy. 2014. 'Mislocalization of the cell polarity protein scribble promotes mammary tumorigenesis and is associated with basal breast cancer', *Cancer Res*, 74: 3180-94.
- Feng, W., Y. Shi, M. Li, and M. Zhang. 2003. 'Tandem PDZ repeats in glutamate receptor-interacting proteins have a novel mode of PDZ domain-mediated target binding', *Nat Struct Biol*, 10: 972-8.
- Fisher, T. L., and J. Blenis. 1996. 'Evidence for two catalytically active kinase domains in pp90rsk', *Mol Cell Biol*, 16: 1212-9.
- Franz, C. M., and A. J. Ridley. 2004. 'p120 catenin associates with microtubules: inverse relationship between microtubule binding and Rho GTPase regulation', *J Biol Chem*, 279: 6588-94.
- Froding, M., T. L. Antal, B. A. Dummmler, C. J. Jensen, M. Deak, S. Gammeltoft, and R. M. Biondi. 2002. 'A phosphoserine/threonine-binding pocket in AGC kinases

and PDK1 mediates activation by hydrophobic motif phosphorylation', *EMBO J*, 21: 5396-407.

- Frodin, M., C. J. Jensen, K. Merienne, and S. Gammeltoft. 2000. 'A phosphoserine-regulated docking site in the protein kinase RSK2 that recruits and activates PDK1', *EMBO J*, 19: 2924-34.
- Fryer, R. M., A. Muthukumarana, R. R. Chen, J. D. Smith, S. N. Mazurek, K. E. Harrington, R. M. Dinallo, J. Burke, F. M. DiCapua, X. Guo, T. M. Kirrane, R. J. Snow, Y. Zhang, F. Soleymanzadeh, J. B. Madwed, M. A. Kashem, S. Z. Kugler, M. M. O'Neill, P. C. Harrison, G. A. Reinhart, and S. J. Boyer. 2012. 'Mitigation of off-target adrenergic binding and effects on cardiovascular function in the discovery of novel ribosomal S6 kinase 2 inhibitors', *J Pharmacol Exp Ther*, 340: 492-500.
- Fujita, N., S. Sato, and T. Tsuruo. 2003. 'Phosphorylation of p27Kip1 at threonine 198 by p90 ribosomal protein S6 kinases promotes its binding to 14-3-3 and cytoplasmic localization', *J Biol Chem*, 278: 49254-60.
- Fujita, Y., G. Krause, M. Scheffner, D. Zechner, H. E. Leddy, J. Behrens, T. Sommer, and W. Birchmeier. 2002. 'Hakai, a c-Cbl-like protein, ubiquitinates and induces endocytosis of the E-cadherin complex', *Nat Cell Biol*, 4: 222-31.
- Fukumoto, Y., Y. Shintani, A. B. Reynolds, K. R. Johnson, and M. J. Wheelock. 2008. 'The regulatory or phosphorylation domain of p120 catenin controls E-cadherin dynamics at the plasma membrane', *Exp Cell Res*, 314: 52-67.
- Gagliardi, P. A., A. Puliafito, and L. Primo. 2018. 'PDK1: At the crossroad of cancer signaling pathways', *Semin Cancer Biol*, 48: 27-35.
- Galan, J. A., K. M. Geraghty, G. Lavoie, E. Kanshin, J. Tcherkezian, V. Calabrese, G. R. Jeschke, B. E. Turk, B. A. Ballif, J. Blenis, P. Thibault, and P. P. Roux. 2014. 'Phosphoproteomic analysis identifies the tumor suppressor PDCD4 as a RSK substrate negatively regulated by 14-3-3', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 111: E2918-27.
- Gao, X., D. Chaturvedi, and T. B. Patel. 2012. 'Localization and retention of p90 ribosomal S6 kinase 1 in the nucleus: implications for its function', *Mol Biol Cell*, 23: 503-15.
- Gardioli, D., A. Zacchi, F. Petrera, G. Stanta, and L. Banks. 2006. 'Human discs large and scrib are localized at the same regions in colon mucosa and changes in their expression patterns are correlated with loss of tissue architecture during malignant progression', *Int J Cancer*, 119: 1285-90.
- Garrett, J. P., A. M. Lowery, A. P. Adam, A. P. Kowalczyk, and P. A. Vincent. 2017. 'Regulation of endothelial barrier function by p120-catenin/VE-cadherin interaction', *Mol Biol Cell*, 28: 85-97.

- Gavin, A. C., and A. R. Nebreda. 1999. 'A MAP kinase docking site is required for phosphorylation and activation of p90(rsk)/MAPKAP kinase-1', *Curr Biol*, 9: 281-4.
- Gawecka, J. E., S. S. Young-Robbins, F. J. Sulzmaier, M. J. Caliva, M. M. Heikkila, M. L. Matter, and J. W. Ramos. 2012. 'RSK2 protein suppresses integrin activation and fibronectin matrix assembly and promotes cell migration', *J Biol Chem*, 287: 43424-37.
- Georgakopoulos, A., P. Marambaud, S. Efthimiopoulos, J. Shioi, W. Cui, H. C. Li, M. Schutte, R. Gordon, G. R. Holstein, G. Martinelli, P. Mehta, V. L. Friedrich, Jr., and N. K. Robakis. 1999. 'Presenilin-1 forms complexes with the cadherin/catenin cell-cell adhesion system and is recruited to intercellular and synaptic contacts', *Mol Cell*, 4: 893-902.
- Geraghty, K. M., S. Chen, J. E. Harthill, A. F. Ibrahim, R. Toth, N. A. Morrice, F. Vandermoere, G. B. Moorhead, D. G. Hardie, and C. MacKintosh. 2007. 'Regulation of multisite phosphorylation and 14-3-3 binding of AS160 in response to IGF-1, EGF, PMA and AICAR', *Biochem J*, 407: 231-41.
- Ghoda, L., X. Lin, and W. C. Greene. 1997. 'The 90-kDa ribosomal S6 kinase (pp90rsk) phosphorylates the N-terminal regulatory domain of IkappaBalpha and stimulates its degradation in vitro', *J Biol Chem*, 272: 21281-8.
- Gogl, G., B. Biri-Kovacs, A. L. Poti, H. Vadaszi, B. Szeder, A. Bodor, G. Schlosser, A. Acs, L. Turiak, L. Buday, A. Alexa, L. Nyitray, and A. Remenyi. 2018. 'Dynamic control of RSK complexes by phosphoswitch-based regulation', *FEBS J*, 285: 46-71.
- Gold, J. S., A. B. Reynolds, and D. L. Rimm. 1998. 'Loss of p120ctn in human colorectal cancer predicts metastasis and poor survival', *Cancer Lett*, 132: 193-201.
- Goodenough, D. A. 1974. 'Bulk isolation of mouse hepatocyte gap junctions. Characterization of the principal protein, connexin', *J Cell Biol*, 61: 557-63.
- Graff, J. R., E. Gabrielson, H. Fujii, S. B. Baylin, and J. G. Herman. 2000. 'Methylation patterns of the E-cadherin 5' CpG island are unstable and reflect the dynamic, heterogeneous loss of E-cadherin expression during metastatic progression', *J Biol Chem*, 275: 2727-32.
- Gressner, A. M., and I. G. Wool. 1974. 'The phosphorylation of liver ribosomal proteins in vivo. Evidence that only a single small subunit protein (S6) is phosphorylated', *J Biol Chem*, 249: 6917-25.
- Grosheva, I., M. Shtutman, M. Elbaum, and A. D. Bershadsky. 2001. 'p120 catenin affects cell motility via modulation of activity of Rho-family GTPases: a link between cell-cell contact formation and regulation of cell locomotion', *J Cell Sci*, 114: 695-707.

- Gubbay, O., M. T. Rae, A. S. McNeilly, F. X. Donadeu, A. J. Zeleznik, and S. G. Hillier. 2006. 'cAMP response element-binding (CREB) signalling and ovarian surface epithelial cell survival', *J Endocrinol*, 191: 275-85.
- Gui, J., Y. Huang, and O. Shimmi. 2016. 'Scribbled Optimizes BMP Signaling through Its Receptor Internalization to the Rab5 Endosome and Promote Robust Epithelial Morphogenesis', *PLoS Genet*, 12: e1006424.
- Gumbiner, B. M. 2005. 'Regulation of cadherin-mediated adhesion in morphogenesis', *Nat Rev Mol Cell Biol*, 6: 622-34.
- Halbleib, J. M., and W. J. Nelson. 2006. 'Cadherins in development: cell adhesion, sorting, and tissue morphogenesis', *Genes Dev*, 20: 3199-214.
- Hanahan, D., and R. A. Weinberg. 2011. 'Hallmarks of cancer: the next generation', *Cell*, 144: 646-74.
- Hanauer, A., and I. D. Young. 2002. 'Coffin-Lowry syndrome: clinical and molecular features', *J Med Genet*, 39: 705-13.
- Harigopal, M., S. J. Shin, M. P. Murray, S. K. Tickoo, E. Brogi, and P. P. Rosen. 2005. 'Aberrant E-cadherin staining patterns in invasive mammary carcinoma', *World J Surg Oncol*, 3: 73.
- Hariharan, V., A. Asimaki, J. E. Michaelson, E. Plovie, C. A. MacRae, J. E. Saffitz, and H. Huang. 2014. 'Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy mutations alter shear response without changes in cell-cell adhesion', *Cardiovasc Res*, 104: 280-9.
- Harris, A. L. 2007. 'Connexin channel permeability to cytoplasmic molecules', *Prog Biophys Mol Biol*, 94: 120-43.
- Harris, T. J. 2012. 'Adherens junction assembly and function in the Drosophila embryo', *Int Rev Cell Mol Biol*, 293: 45-83.
- Harrison, O. J., J. Brasch, G. Lasso, P. S. Katsamba, G. Ahlsen, B. Honig, and L. Shapiro. 2016. 'Structural basis of adhesive binding by desmocollins and desmogleins', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 113: 7160-5.
- Hendrick, J., M. Franz-Wachtel, Y. Moeller, S. Schmid, B. Macek, and M. A. Olayioye. 2016. 'The polarity protein Scribble positions DLC3 at adherens junctions to regulate Rho signaling', *J Cell Sci*, 129: 3583-96.
- Hennig, A., R. Markwart, M. A. Esparza-Franco, G. Ladds, and I. Rubio. 2015. 'Ras activation revisited: role of GEF and GAP systems', *Biol Chem*, 396: 831-48.

- Hernandez, M. V., D. P. Wehrendt, and C. O. Arregui. 2010. 'The protein tyrosine phosphatase PTP1B is required for efficient delivery of N-cadherin to the cell surface', *Mol Biol Cell*, 21: 1387-97.
- Hilinski, M. K., R. M. Mrozowski, D. E. Clark, and D. A. Lannigan. 2012. 'Analogues of the RSK inhibitor SL0101: optimization of in vitro biological stability', *Bioorg Med Chem Lett*, 22: 3244-7.
- Hillier, B. J., K. S. Christopherson, K. E. Prehoda, D. S. Brett, and W. A. Lim. 1999. 'Unexpected modes of PDZ domain scaffolding revealed by structure of nNOS-syntrophin complex', *Science*, 284: 812-5.
- Hong, J. Y., J. I. Park, K. Cho, D. Gu, H. Ji, S. E. Artandi, and P. D. McCrea. 2010. 'Shared molecular mechanisms regulate multiple catenin proteins: canonical Wnt signals and components modulate p120-catenin isoform-1 and additional p120 subfamily members', *J Cell Sci*, 123: 4351-65.
- Hong, J. Y., J. I. Park, M. Lee, W. A. Munoz, R. K. Miller, H. Ji, D. Gu, J. Egan, S. Y. Sokol, and P. D. McCrea. 2012. 'Down's-syndrome-related kinase Dyrk1A modulates the p120-catenin-Kaiso trajectory of the Wnt signaling pathway', *J Cell Sci*, 125: 561-9.
- Hosking, C. R., F. Ulloa, C. Hogan, E. C. Ferber, A. Figueroa, K. Gevaert, W. Birchmeier, J. Briscoe, and Y. Fujita. 2007. 'The transcriptional repressor Glis2 is a novel binding partner for p120 catenin', *Mol Biol Cell*, 18: 1918-27.
- Houles, T., S. P. Gravel, G. Lavoie, S. Shin, M. Savall, A. Meant, B. Grondin, L. Gaboury, S. O. Yoon, J. St-Pierre, and P. P. Roux. 2018. 'RSK Regulates PFK-2 Activity to Promote Metabolic Rewiring in Melanoma', *Cancer Res*, 78: 2191-204.
- Houles, T., and P. P. Roux. 2018. 'Defining the role of the RSK isoforms in cancer', *Semin Cancer Biol*, 48: 53-61.
- Huang, L., and S. K. Muthuswamy. 2010. 'Polarity protein alterations in carcinoma: a focus on emerging roles for polarity regulators', *Curr Opin Genet Dev*, 20: 41-50.
- Ikuta, M., M. Kornienko, N. Byrne, J. C. Reid, S. Mizuarai, H. Kotani, and S. K. Munshi. 2007. 'Crystal structures of the N-terminal kinase domain of human RSK1 bound to three different ligands: Implications for the design of RSK1 specific inhibitors', *Protein Sci*, 16: 2626-35.
- Inoki, K., H. Ouyang, T. Zhu, C. Lindvall, Y. Wang, X. Zhang, Q. Yang, C. Bennett, Y. Harada, K. Stankunas, C. Y. Wang, X. He, O. A. MacDougald, M. You, B. O. Williams, and K. L. Guan. 2006. 'TSC2 integrates Wnt and energy signals via a coordinated phosphorylation by AMPK and GSK3 to regulate cell growth', *Cell*, 126: 955-68.

- Ireton, R. C., M. A. Davis, J. van Hengel, D. J. Mariner, K. Barnes, M. A. Thoreson, P. Z. Anastasiadis, L. Matrisian, L. M. Bundy, L. Sealy, B. Gilbert, F. van Roy, and A. B. Reynolds. 2002. 'A novel role for p120 catenin in E-cadherin function', *J Cell Biol*, 159: 465-76.
- Ishiyama, N., S. H. Lee, S. Liu, G. Y. Li, M. J. Smith, L. F. Reichardt, and M. Ikura. 2010. 'Dynamic and static interactions between p120 catenin and E-cadherin regulate the stability of cell-cell adhesion', *Cell*, 141: 117-28.
- Ishizaki, Y., Y. Omori, M. Momiyama, Y. Nishikawa, T. Tokairin, M. Manabe, and K. Enomoto. 2004. 'Reduced expression and aberrant localization of p120catenin in human squamous cell carcinoma of the skin', *J Dermatol Sci*, 34: 99-108.
- Ivarsson, Y. 2012. 'Plasticity of PDZ domains in ligand recognition and signaling', *FEBS Lett*, 586: 2638-47.
- Jaffe, A. B., and A. Hall. 2005. 'Rho GTPases: biochemistry and biology', *Annu Rev Cell Dev Biol*, 21: 247-69.
- James, C. D., and S. Roberts. 2016. 'Viral Interactions with PDZ Domain-Containing Proteins-An Oncogenic Trait?', *Pathogens*, 5.
- Jeanes, A., C. J. Gottardi, and A. S. Yap. 2008. 'Cadherins and cancer: how does cadherin dysfunction promote tumor progression?', *Oncogene*, 27: 6920-9.
- Jensen, C. J., M. B. Buch, T. O. Krag, B. A. Hemmings, S. Gammeltoft, and M. Frodin. 1999. '90-kDa ribosomal S6 kinase is phosphorylated and activated by 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1', *J Biol Chem*, 274: 27168-76.
- Joel, P. B., J. Smith, T. W. Sturgill, T. L. Fisher, J. Blenis, and D. A. Lannigan. 1998. 'pp90rsk1 regulates estrogen receptor-mediated transcription through phosphorylation of Ser-167', *Mol Cell Biol*, 18: 1978-84.
- Johnson, G. L., and K. Nakamura. 2007. 'The c-jun kinase/stress-activated pathway: regulation, function and role in human disease', *Biochim Biophys Acta*, 1773: 1341-8.
- Johnson, J. L., N. A. Najor, and K. J. Green. 2014. 'Desmosomes: regulators of cellular signaling and adhesion in epidermal health and disease', *Cold Spring Harb Perspect Med*, 4: a015297.
- Jones, S. W., E. Erikson, J. Blenis, J. L. Maller, and R. L. Erikson. 1988. 'A Xenopus ribosomal protein S6 kinase has two apparent kinase domains that are each similar to distinct protein kinases', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 85: 3377-81.
- Jope, R. S., C. J. Yuskaitis, and E. Beurel. 2007. 'Glycogen synthase kinase-3 (GSK3): inflammation, diseases, and therapeutics', *Neurochem Res*, 32: 577-95.

- Joshi, S., and L. C. Platanias. 2014. 'Mnk kinase pathway: Cellular functions and biological outcomes', *World J Biol Chem*, 5: 321-33.
- Jou, T. S., D. B. Stewart, J. Stappert, W. J. Nelson, and J. A. Marrs. 1995. 'Genetic and biochemical dissection of protein linkages in the cadherin-catenin complex', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92: 5067-71.
- Kamei, Y., K. Kito, T. Takeuchi, Y. Imai, R. Murase, N. Ueda, N. Kobayashi, and Y. Abe. 2007. 'Human scribble accumulates in colorectal neoplasia in association with an altered distribution of beta-catenin', *Hum Pathol*, 38: 1273-81.
- Kang, S., S. Dong, T. L. Gu, A. Guo, M. S. Cohen, S. Lonial, H. J. Khoury, D. Fabbro, D. G. Gilliland, P. L. Bergsagel, J. Taunton, R. D. Polakiewicz, and J. Chen. 2007. 'FGFR3 activates RSK2 to mediate hematopoietic transformation through tyrosine phosphorylation of RSK2 and activation of the MEK/ERK pathway', *Cancer Cell*, 12: 201-14.
- Kang, S., S. Dong, A. Guo, H. Ruan, S. Lonial, H. J. Khoury, T. L. Gu, and J. Chen. 2008. 'Epidermal growth factor stimulates RSK2 activation through activation of the MEK/ERK pathway and src-dependent tyrosine phosphorylation of RSK2 at Tyr-529', *J Biol Chem*, 283: 4652-7.
- Kang, S., S. Elf, K. Lythgoe, T. Hitosugi, J. Taunton, W. Zhou, L. Xiong, D. Wang, S. Muller, S. Fan, S. Y. Sun, A. I. Marcus, T. L. Gu, R. D. Polakiewicz, Z. G. Chen, F. R. Khuri, D. M. Shin, and J. Chen. 2010. 'p90 ribosomal S6 kinase 2 promotes invasion and metastasis of human head and neck squamous cell carcinoma cells', *J Clin Invest*, 120: 1165-77.
- Kean, M. J., A. L. Couzens, and A. C. Gingras. 2012. 'Mass spectrometry approaches to study mammalian kinase and phosphatase associated proteins', *Methods*, 57: 400-8.
- Kedersha, N., G. Stoecklin, M. Ayodele, P. Yacono, J. Lykke-Andersen, M. J. Fritzler, D. Scheuner, R. J. Kaufman, D. E. Golan, and P. Anderson. 2005. 'Stress granules and processing bodies are dynamically linked sites of mRNP remodeling', *J Cell Biol*, 169: 871-84.
- Keirsebilck, A., S. Bonne, K. Staes, J. van Hengel, F. Nollet, A. Reynolds, and F. van Roy. 1998. 'Molecular cloning of the human p120ctn catenin gene (CTNND1): expression of multiple alternatively spliced isoforms', *Genomics*, 50: 129-46.
- Keller, A., A. I. Nesvizhskii, E. Kolker, and R. Aebersold. 2002. 'Empirical statistical model to estimate the accuracy of peptide identifications made by MS/MS and database search', *Anal Chem*, 74: 5383-92.
- Kelly, K. F., and J. M. Daniel. 2006. 'POZ for effect--POZ-ZF transcription factors in cancer and development', *Trends Cell Biol*, 16: 578-87.

- Kelly, K. F., C. M. Spring, A. A. Otchere, and J. M. Daniel. 2004. 'NLS-dependent nuclear localization of p120ctn is necessary to relieve Kaiso-mediated transcriptional repression', *J Cell Sci*, 117: 2675-86.
- Kennedy, M. B. 1995. 'Origin of PDZ (DHR, GLGF) domains', *Trends Biochem Sci*, 20: 350.
- Kesler, S. R., R. J. Simensen, K. Voeller, F. Abidi, R. E. Stevenson, C. E. Schwartz, and A. L. Reiss. 2007. 'Altered neurodevelopment associated with mutations of RSK2: a morphometric MRI study of Coffin-Lowry syndrome', *Neurogenetics*, 8: 143-7.
- Kessner, D., M. Chambers, R. Burke, D. Agus, and P. Mallick. 2008. 'ProteoWizard: open source software for rapid proteomics tools development', *Bioinformatics*, 24: 2534-6.
- Kim, E. K., and E. J. Choi. 2010. 'Pathological roles of MAPK signaling pathways in human diseases', *Biochim Biophys Acta*, 1802: 396-405.
- Kim, E., M. Niethammer, A. Rothschild, Y. N. Jan, and M. Sheng. 1995. 'Clustering of Shaker-type K⁺ channels by interaction with a family of membrane-associated guanylate kinases', *Nature*, 378: 85-8.
- Kim, E., and M. Sheng. 2004. 'PDZ domain proteins of synapses', *Nat Rev Neurosci*, 5: 771-81.
- Kim, J., I. Kim, J. S. Yang, Y. E. Shin, J. Hwang, S. Park, Y. S. Choi, and S. Kim. 2012. 'Rewiring of PDZ domain-ligand interaction network contributed to eukaryotic evolution', *PLoS Genet*, 8: e1002510.
- Kim, M., J. H. Lee, H. Koh, S. Y. Lee, C. Jang, C. J. Chung, J. H. Sung, J. Blenis, and J. Chung. 2006. 'Inhibition of ERK-MAP kinase signaling by RSK during Drosophila development', *EMBO J*, 25: 3056-67.
- Kim, S. A., C. Y. Tai, L. P. Mok, E. A. Mosser, and E. M. Schuman. 2011. 'Calcium-dependent dynamics of cadherin interactions at cell-cell junctions', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108: 9857-62.
- Kim, S. W., J. I. Park, C. M. Spring, A. K. Sater, H. Ji, A. A. Otchere, J. M. Daniel, and P. D. McCrea. 2004. 'Non-canonical Wnt signals are modulated by the Kaiso transcriptional repressor and p120-catenin', *Nat Cell Biol*, 6: 1212-20.
- Kirrane, T. M., S. J. Boyer, J. Burke, X. Guo, R. J. Snow, L. Soleymanzadeh, A. Swinamer, Y. Zhang, J. B. Madwed, M. Kashem, S. Kugler, and M. M. O'Neill. 2012. 'Indole RSK inhibitors. Part 2: optimization of cell potency and kinase selectivity', *Bioorg Med Chem Lett*, 22: 738-42.

- Klompstra, D., D. C. Anderson, J. Y. Yeh, Y. Zilberman, and J. Nance. 2015. 'An instructive role for *C. elegans* E-cadherin in translating cell contact cues into cortical polarity', *Nat Cell Biol*, 17: 726-35.
- Kobielak, A., H. A. Pasolli, and E. Fuchs. 2004. 'Mammalian formin-1 participates in adherens junctions and polymerization of linear actin cables', *Nat Cell Biol*, 6: 21-30.
- Kohler, K., and A. Zahraoui. 2005. 'Tight junction: a co-ordinator of cell signalling and membrane trafficking', *Biol Cell*, 97: 659-65.
- Kohn, M., H. Hameister, M. Vogel, and H. Kehrer-Sawatzki. 2003. 'Expression pattern of the Rsk2, Rsk4 and Pdk1 genes during murine embryogenesis', *Gene Expr Patterns*, 3: 173-7.
- Koliwer, J., M. Park, C. Bauch, M. von Zastrow, and H. J. Kreienkamp. 2015. 'The golgi-associated PDZ domain protein PIST/GOPC stabilizes the beta1-adrenergic receptor in intracellular compartments after internalization', *J Biol Chem*, 290: 6120-9.
- Kotliarova, S., S. Pastorino, L. C. Kovell, Y. Kotliarov, H. Song, W. Zhang, R. Bailey, D. Maric, J. C. Zenklusen, J. Lee, and H. A. Fine. 2008. 'Glycogen synthase kinase-3 inhibition induces glioma cell death through c-MYC, nuclear factor-kappaB, and glucose regulation', *Cancer Res*, 68: 6643-51.
- Kouklis, P. D., E. Hutton, and E. Fuchs. 1994. 'Making a connection: direct binding between keratin intermediate filaments and desmosomal proteins', *J Cell Biol*, 127: 1049-60.
- Kourtidis, A., M. Yanagisawa, D. Huvelde, J. A. Copland, and P. Z. Anastasiadis. 2015. 'Pro-Tumorigenic Phosphorylation of p120 Catenin in Renal and Breast Cancer', *PLoS One*, 10: e0129964.
- Kowalczyk, A. P., E. A. Bornslaeger, J. E. Borgwardt, H. L. Palka, A. S. Dhaliwal, C. M. Corcoran, M. F. Denning, and K. J. Green. 1997. 'The amino-terminal domain of desmoplakin binds to plakoglobin and clusters desmosomal cadherin-plakoglobin complexes', *J Cell Biol*, 139: 773-84.
- Kowalczyk, A. P., M. Hatzfeld, E. A. Bornslaeger, D. S. Kopp, J. E. Borgwardt, C. M. Corcoran, A. Settler, and K. J. Green. 1999. 'The head domain of plakophilin-1 binds to desmoplakin and enhances its recruitment to desmosomes. Implications for cutaneous disease', *J Biol Chem*, 274: 18145-8.
- Kowalczyk, A. P., and B. A. Nanes. 2012. 'Adherens junction turnover: regulating adhesion through cadherin endocytosis, degradation, and recycling', *Subcell Biochem*, 60: 197-222.

- Ku, H., and K. E. Meier. 2000. 'Phosphorylation of paxillin via the ERK mitogen-activated protein kinase cascade in EL4 thymoma cells', *J Biol Chem*, 275: 11333-40.
- Kumper, S., and A. J. Ridley. 2010. 'p120ctn and P-cadherin but not E-cadherin regulate cell motility and invasion of DU145 prostate cancer cells', *PLoS One*, 5: e11801.
- Kwon, E. M., M. A. Raines, J. Blenis, and K. M. Sakamoto. 2000. 'Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor stimulation results in phosphorylation of cAMP response element-binding protein through activation of pp90RSK', *Blood*, 95: 2552-8.
- Kyriakis, J. M., H. App, X. F. Zhang, P. Banerjee, D. L. Brautigan, U. R. Rapp, and J. Avruch. 1992. 'Raf-1 activates MAP kinase-kinase', *Nature*, 358: 417-21.
- Lahuna, O., M. Quellari, C. Achard, S. Nola, G. Meduri, C. Navarro, N. Vitale, J. P. Borg, and M. Misrahi. 2005. 'Thyrotropin receptor trafficking relies on the hScrib-betaPIX-GIT1-ARF6 pathway', *EMBO J*, 24: 1364-74.
- Lambert, J. P., M. Tucholska, C. Go, J. D. Knight, and A. C. Gingras. 2015. 'Proximity biotinylation and affinity purification are complementary approaches for the interactome mapping of chromatin-associated protein complexes', *J Proteomics*, 118: 81-94.
- Lange, I. R., P. Stone, and S. Aftimos. 2010. 'The Coffin-Lowry syndrome: a case report and review of the literature', *J Obstet Gynaecol Can*, 32: 691-4.
- Larrea, M. D., F. Hong, S. A. Wander, T. G. da Silva, D. Helfman, D. Lannigan, J. A. Smith, and J. M. Slingerland. 2009. 'RSK1 drives p27Kip1 phosphorylation at T198 to promote RhoA inhibition and increase cell motility', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106: 9268-73.
- Laugel-Haushalter, V., M. Paschaki, P. Marangoni, C. Pilgram, A. Langer, T. Kuntz, J. Demassue, S. Morkmued, P. Choquet, A. Constantinesco, F. Bornert, M. Schmittbuhl, S. Pannetier, L. Viriot, A. Hanauer, P. Dolle, and A. Bloch-Zupan. 2014. 'RSK2 is a modulator of craniofacial development', *PLoS One*, 9: e84343.
- Lavoie, H., and M. Therrien. 2015. 'Regulation of RAF protein kinases in ERK signalling', *Nat Rev Mol Cell Biol*, 16: 281-98.
- Lawrence, M. C., A. Jivan, C. Shao, L. Duan, D. Goad, E. Zaganjor, J. Osborne, K. McGlynn, S. Stippec, S. Earnest, W. Chen, and M. H. Cobb. 2008. 'The roles of MAPKs in disease', *Cell Res*, 18: 436-42.
- Lee, H. J., and J. J. Zheng. 2010. 'PDZ domains and their binding partners: structure, specificity, and modification', *Cell Commun Signal*, 8: 8.

- Lee, J. H., W. Richter, W. Namkung, K. H. Kim, E. Kim, M. Conti, and M. G. Lee. 2007. 'Dynamic regulation of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator by competitive interactions of molecular adaptors', *J Biol Chem*, 282: 10414-22.
- Lee, M., H. Ji, Y. Furuta, J. I. Park, and P. D. McCrea. 2014. 'p120-catenin regulates REST and CoREST, and modulates mouse embryonic stem cell differentiation', *J Cell Sci*, 127: 4037-51.
- Leevers, S. J., H. F. Paterson, and C. J. Marshall. 1994. 'Requirement for Ras in Raf activation is overcome by targeting Raf to the plasma membrane', *Nature*, 369: 411-4.
- Legouis, R., A. Gansmuller, S. Sookhareea, J. M. Boshier, D. L. Baillie, and M. Labouesse. 2000. 'LET-413 is a basolateral protein required for the assembly of adherens junctions in *Caenorhabditis elegans*', *Nat Cell Biol*, 2: 415-22.
- Leighton, I. A., K. N. Dalby, F. B. Caudwell, P. T. Cohen, and P. Cohen. 1995. 'Comparison of the specificities of p70 S6 kinase and MAPKAP kinase-1 identifies a relatively specific substrate for p70 S6 kinase: the N-terminal kinase domain of MAPKAP kinase-1 is essential for peptide phosphorylation', *FEBS Lett*, 375: 289-93.
- Lemmon, M. A., and J. Schlessinger. 2010. 'Cell signaling by receptor tyrosine kinases', *Cell*, 141: 1117-34.
- Li, J., M. D. Kritzer, J. J. Michel, A. Le, H. Thakur, M. Gayanilo, C. L. Passariello, A. Negro, J. B. Danial, B. Oskouei, M. Sanders, J. M. Hare, A. Hanauer, K. Dodge-Kafka, and M. S. Kapiloff. 2013. 'Anchored p90 ribosomal S6 kinase 3 is required for cardiac myocyte hypertrophy', *Circ Res*, 112: 128-39.
- Li, M., J. Liu, and C. Zhang. 2011. 'Evolutionary history of the vertebrate mitogen activated protein kinases family', *PLoS One*, 6: e26999.
- Li, Q., Y. Jiang, W. Wei, Y. Ji, H. Gao, and J. Liu. 2014. 'Frequent epigenetic inactivation of RSK4 by promoter methylation in cancerous and non-cancerous tissues of breast cancer', *Med Oncol*, 31: 793.
- Li, X., H. Yang, J. Liu, M. D. Schmidt, and T. Gao. 2011. 'Scribble-mediated membrane targeting of PHLPP1 is required for its negative regulation of Akt', *EMBO Rep*, 12: 818-24.
- Lim, H. C., and T. S. Jou. 2016. 'Ras-activated RSK1 phosphorylates EBP50 to regulate its nuclear localization and promote cell proliferation', *Oncotarget*, 7: 10283-96.

- Lin, Y., T. R. Hupp, and C. Stevens. 2010. 'Death-associated protein kinase (DAPK) and signal transduction: additional roles beyond cell death', *FEBS J*, 277: 48-57.
- Liu, G., J. Zhang, B. Larsen, C. Stark, A. Breitkreutz, Z. Y. Lin, B. J. Breitkreutz, Y. Ding, K. Colwill, A. Pasculescu, T. Pawson, J. L. Wrana, A. I. Nesvizhskii, B. Raught, M. Tyers, and A. C. Gingras. 2010. 'ProHits: integrated software for mass spectrometry-based interaction proteomics', *Nat Biotechnol*, 28: 1015-7.
- Long, J. F., W. Feng, R. Wang, L. N. Chan, F. C. Ip, J. Xia, N. Y. Ip, and M. Zhang. 2005. 'Autoinhibition of X11/Mint scaffold proteins revealed by the closed conformation of the PDZ tandem', *Nat Struct Mol Biol*, 12: 722-8.
- Long, J. F., H. Tochio, P. Wang, J. S. Fan, C. Sala, M. Niethammer, M. Sheng, and M. Zhang. 2003. 'Supramodular structure and synergistic target binding of the N-terminal tandem PDZ domains of PSD-95', *J Mol Biol*, 327: 203-14.
- Lopez-Vicente, L., G. Armengol, B. Pons, L. Coch, E. Argelaguet, M. Lleonat, J. Hernandez-Losa, I. de Torres, and S. Ramon y Cajal. 2009. 'Regulation of replicative and stress-induced senescence by RSK4, which is down-regulated in human tumors', *Clin Cancer Res*, 15: 4546-53.
- Ludwik, K. A., J. P. Campbell, M. Li, Y. Li, Z. M. Sandusky, L. Pasic, M. E. Sowder, D. R. Brenin, J. A. Pietenpol, G. A. O'Doherty, and D. A. Lannigan. 2016. 'Development of a RSK Inhibitor as a Novel Therapy for Triple-Negative Breast Cancer', *Mol Cancer Ther*, 15: 2598-608.
- Ludwik, K. A., and D. A. Lannigan. 2016. 'Ribosomal S6 kinase (RSK) modulators: a patent review', *Expert Opin Ther Pat*, 26: 1061-78.
- Luo, J., D. B. Kintner, G. E. Shull, and D. Sun. 2007. 'ERK1/2-p90RSK-mediated phosphorylation of Na⁺/H⁺ exchanger isoform 1. A role in ischemic neuronal death', *J Biol Chem*, 282: 28274-84.
- Luo, J. L., H. Kamata, and M. Karin. 2005. 'IKK/NF-kappaB signaling: balancing life and death--a new approach to cancer therapy', *J Clin Invest*, 115: 2625-32.
- Luo, Z., G. Tzivion, P. J. Belshaw, D. Vavvas, M. Marshall, and J. Avruch. 1996. 'Oligomerization activates c-Raf-1 through a Ras-dependent mechanism', *Nature*, 383: 181-5.
- Ma, L. W., Z. T. Zhou, Q. B. He, and W. W. Jiang. 2012. 'Phosphorylated p120-catenin expression has predictive value for oral cancer progression', *J Clin Pathol*, 65: 315-9.
- Madara, J. L. 1987. 'Intestinal absorptive cell tight junctions are linked to cytoskeleton', *Am J Physiol*, 253: C171-5.

- Magie, C. R., D. Pinto-Santini, and S. M. Parkhurst. 2002. 'Rho1 interacts with p120ctn and alpha-catenin, and regulates cadherin-based adherens junction components in Drosophila', *Development*, 129: 3771-82.
- Maiden, S. L., Y. I. Petrova, and B. M. Gumbiner. 2016. 'Microtubules Inhibit E-Cadherin Adhesive Activity by Maintaining Phosphorylated p120-Catenin in a Colon Carcinoma Cell Model', *PLoS One*, 11: e0148574.
- Makowski, L., D. L. Caspar, W. C. Phillips, and D. A. Goodenough. 1977. 'Gap junction structures. II. Analysis of the x-ray diffraction data', *J Cell Biol*, 74: 629-45.
- Malakhova, M., I. Kurinov, K. Liu, D. Zheng, I. D'Angelo, J. H. Shim, V. Steinman, A. M. Bode, and Z. Dong. 2009. 'Structural diversity of the active N-terminal kinase domain of p90 ribosomal S6 kinase 2', *PLoS One*, 4: e8044.
- Marambaud, P., J. Shioi, G. Serban, A. Georgakopoulos, S. Sarnier, V. Nagy, L. Baki, P. Wen, S. Efthimiopoulos, Z. Shao, T. Wisniewski, and N. K. Robakis. 2002. 'A presenilin-1/gamma-secretase cleavage releases the E-cadherin intracellular domain and regulates disassembly of adherens junctions', *EMBO J*, 21: 1948-56.
- Mariner, D. J., P. Anastasiadis, H. Keilhack, F. D. Bohmer, J. Wang, and A. B. Reynolds. 2001. 'Identification of Src phosphorylation sites in the catenin p120ctn', *J Biol Chem*, 276: 28006-13.
- Mariner, D. J., M. A. Davis, and A. B. Reynolds. 2004. 'EGFR signaling to p120-catenin through phosphorylation at Y228', *J Cell Sci*, 117: 1339-50.
- Martinez, E. C., C. L. Passariello, J. Li, C. J. Matheson, K. Dodge-Kafka, P. Reigan, and M. S. Kapiloff. 2015. 'RSK3: A regulator of pathological cardiac remodeling', *IUBMB Life*, 67: 331-7.
- Mary, S., S. Charrasse, M. Meriane, F. Comunale, P. Travo, A. Blangy, and C. Gauthier-Rouviere. 2002. 'Biogenesis of N-cadherin-dependent cell-cell contacts in living fibroblasts is a microtubule-dependent kinesin-driven mechanism', *Mol Biol Cell*, 13: 285-301.
- Mayerle, J., H. Friess, M. W. Buchler, J. Schnekenburger, F. U. Weiss, K. P. Zimmer, W. Domschke, and M. M. Lerch. 2003. 'Up-regulation, nuclear import, and tumor growth stimulation of the adhesion protein p120 in pancreatic cancer', *Gastroenterology*, 124: 949-60.
- McEwen, A. E., D. E. Escobar, and C. J. Gottardi. 2012. 'Signaling from the adherens junction', *Subcell Biochem*, 60: 171-96.
- McMahon, L., R. Legouis, J. L. Vonesch, and M. Labouesse. 2001. 'Assembly of C. elegans apical junctions involves positioning and compaction by LET-413

- and protein aggregation by the MAGUK protein DLG-1', *J Cell Sci*, 114: 2265-77.
- Meng, W., Y. Mushika, T. Ichii, and M. Takeichi. 2008. 'Anchorage of microtubule minus ends to adherens junctions regulates epithelial cell-cell contacts', *Cell*, 135: 948-59.
- Meng, W., and M. Takeichi. 2009. 'Adherens junction: molecular architecture and regulation', *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 1: a002899.
- Mese, G., G. Richard, and T. W. White. 2007. 'Gap junctions: basic structure and function', *J Invest Dermatol*, 127: 2516-24.
- Meyuhas, O. 2008. 'Physiological roles of ribosomal protein S6: one of its kind', *Int Rev Cell Mol Biol*, 268: 1-37.
- . 2015. 'Ribosomal Protein S6 Phosphorylation: Four Decades of Research', *Int Rev Cell Mol Biol*, 320: 41-73.
- Michaloglou, C., L. C. Vredeveld, W. J. Mooi, and D. S. Peeper. 2008. 'BRAF(E600) in benign and malignant human tumours', *Oncogene*, 27: 877-95.
- Michel, J. J., I. K. Townley, K. L. Dodge-Kafka, F. Zhang, M. S. Kapiloff, and J. D. Scott. 2005. 'Spatial restriction of PDK1 activation cascades by anchoring to mAKAPalpha', *Mol Cell*, 20: 661-72.
- Miranda, K. C., S. R. Joseph, A. S. Yap, R. D. Teasdale, and J. L. Stow. 2003. 'Contextual binding of p120ctn to E-cadherin at the basolateral plasma membrane in polarized epithelia', *J Biol Chem*, 278: 43480-8.
- Miyashita, Y., and M. Ozawa. 2007a. 'A dileucine motif in its cytoplasmic domain directs beta-catenin-uncoupled E-cadherin to the lysosome', *J Cell Sci*, 120: 4395-406.
- . 2007b. 'Increased internalization of p120-uncoupled E-cadherin and a requirement for a dileucine motif in the cytoplasmic domain for endocytosis of the protein', *J Biol Chem*, 282: 11540-8.
- Molina, J. R., and A. A. Adjei. 2006. 'The Ras/Raf/MAPK pathway', *J Thorac Oncol*, 1: 7-9.
- Molina-Ortiz, I., R. A. Bartolome, P. Hernandez-Varas, G. P. Colo, and J. Teixido. 2009. 'Overexpression of E-cadherin on melanoma cells inhibits chemokine-promoted invasion involving p190RhoGAP/p120ctn-dependent inactivation of RhoA', *J Biol Chem*, 284: 15147-57.

- Moller, D. E., C. H. Xia, W. Tang, A. X. Zhu, and M. Jakubowski. 1994. 'Human rsk isoforms: cloning and characterization of tissue-specific expression', *Am J Physiol*, 266: C351-9.
- Montesano, R., D. S. Friend, A. Perrelet, and L. Orci. 1975. 'In vivo assembly of tight junctions in fetal rat liver', *J Cell Biol*, 67: 310-9.
- Montonen, O., M. Aho, J. Uitto, and S. Aho. 2001. 'Tissue distribution and cell type-specific expression of p120ctn isoforms', *J Histochem Cytochem*, 49: 1487-96.
- Morais Cabral, J. H., C. Petosa, M. J. Sutcliffe, S. Raza, O. Byron, F. Poy, S. M. Marfatia, A. H. Chishti, and R. C. Liddington. 1996. 'Crystal structure of a PDZ domain', *Nature*, 382: 649-52.
- Morales, F. C., Y. Takahashi, S. Momin, H. Adams, X. Chen, and M. M. Georgescu. 2007. 'NHERF1/EBP50 head-to-tail intramolecular interaction masks association with PDZ domain ligands', *Mol Cell Biol*, 27: 2527-37.
- Moritz, A., Y. Li, A. Guo, J. Villen, Y. Wang, J. MacNeill, J. Kornhauser, K. Sprott, J. Zhou, A. Possemato, J. M. Ren, P. Hornbeck, L. C. Cantley, S. P. Gygi, J. Rush, and M. J. Comb. 2010. 'Akt-RSK-S6 kinase signaling networks activated by oncogenic receptor tyrosine kinases', *Sci Signal*, 3: ra64.
- Mortazavi, F., J. An, S. Dubinett, and M. Rettig. 2010. 'p120-catenin is transcriptionally downregulated by FOXC2 in non-small cell lung cancer cells', *Mol Cancer Res*, 8: 762-74.
- Murdoch, J. N., D. J. Henderson, K. Doudney, C. Gaston-Massuet, H. M. Phillips, C. Paternotte, R. Arkell, P. Stanier, and A. J. Copp. 2003. 'Disruption of scribble (Scrb1) causes severe neural tube defects in the circletail mouse', *Hum Mol Genet*, 12: 87-98.
- Murphy, L. O., and J. Blenis. 2006. 'MAPK signal specificity: the right place at the right time', *Trends Biochem Sci*, 31: 268-75.
- Myers, A. P., L. B. Corson, J. Rossant, and J. C. Baker. 2004. 'Characterization of mouse Rsk4 as an inhibitor of fibroblast growth factor-RAS-extracellular signal-regulated kinase signaling', *Mol Cell Biol*, 24: 4255-66.
- Myster, S. H., R. Cavallo, C. T. Anderson, D. T. Fox, and M. Peifer. 2003. 'Drosophila p120catenin plays a supporting role in cell adhesion but is not an essential adherens junction component', *J Cell Biol*, 160: 433-49.
- Nagafuchi, A., and M. Takeichi. 1989. 'Transmembrane control of cadherin-mediated cell adhesion: a 94 kDa protein functionally associated with a specific region of the cytoplasmic domain of E-cadherin', *Cell Regul*, 1: 37-44.

- Nagasaka, K., P. Massimi, D. Pim, V. K. Subbaiah, C. Kranjec, S. Nakagawa, T. Yano, Y. Taketani, and L. Banks. 2010. 'The mechanism and implications of hScrib regulation of ERK', *Small GTPases*, 1: 108-12.
- Nagasaka, K., D. Pim, P. Massimi, M. Thomas, V. Tomaic, V. K. Subbaiah, C. Kranjec, S. Nakagawa, T. Yano, Y. Taketani, M. Myers, and L. Banks. 2010. 'The cell polarity regulator hScrib controls ERK activation through a KIM site-dependent interaction', *Oncogene*, 29: 5311-21.
- Nanes, B. A., C. Chiasson-MacKenzie, A. M. Lowery, N. Ishiyama, V. Faundez, M. Ikura, P. A. Vincent, and A. P. Kowalczyk. 2012. 'p120-catenin binding masks an endocytic signal conserved in classical cadherins', *J Cell Biol*, 199: 365-80.
- Navarro, C., S. Nola, S. Audebert, M. J. Santoni, J. P. Arsanto, C. Ginestier, S. Marchetto, J. Jacquemier, D. Isnardon, A. Le Bivic, D. Birnbaum, and J. P. Borg. 2005. 'Junctional recruitment of mammalian Scribble relies on E-cadherin engagement', *Oncogene*, 24: 4330-9.
- Nelson, W. J. 2008. 'Regulation of cell-cell adhesion by the cadherin-catenin complex', *Biochem Soc Trans*, 36: 149-55.
- Nguyen, T. L. 2008. 'Targeting RSK: an overview of small molecule inhibitors', *Anticancer Agents Med Chem*, 8: 710-6.
- Nielsen, P. J., G. Thomas, and J. L. Maller. 1982. 'Increased phosphorylation of ribosomal protein S6 during meiotic maturation of *Xenopus* oocytes', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 79: 2937-41.
- Nola, S., M. Sebbagh, S. Marchetto, N. Osmani, C. Nourry, S. Audebert, C. Navarro, R. Rachel, M. Montcouquiol, N. Sans, S. Etienne-Manneville, J. P. Borg, and M. J. Santoni. 2008. 'Scrib regulates PAK activity during the cell migration process', *Hum Mol Genet*, 17: 3552-65.
- Nollet, F., P. Kools, and F. van Roy. 2000. 'Phylogenetic analysis of the cadherin superfamily allows identification of six major subfamilies besides several solitary members', *J Mol Biol*, 299: 551-72.
- Noren, N. K., B. P. Liu, K. BurrIDGE, and B. Kreft. 2000. 'p120 catenin regulates the actin cytoskeleton via Rho family GTPases', *J Cell Biol*, 150: 567-80.
- Nourry, C., S. G. Grant, and J. P. Borg. 2003. 'PDZ domain proteins: plug and play!', *Sci STKE*, 2003: RE7.
- Oas, R. G., K. Xiao, S. Summers, K. B. Wittich, C. M. Chiasson, W. D. Martin, H. E. Grossniklaus, P. A. Vincent, A. B. Reynolds, and A. P. Kowalczyk. 2010. 'p120-Catenin is required for mouse vascular development', *Circ Res*, 106: 941-51.

- Okuyama, T., H. Inoue, S. Ookuma, T. Satoh, K. Kano, S. Honjoh, N. Hisamoto, K. Matsumoto, and E. Nishida. 2010. 'The ERK-MAPK pathway regulates longevity through SKN-1 and insulin-like signaling in *Caenorhabditis elegans*', *J Biol Chem*, 285: 30274-81.
- Osmani, N., N. Vitale, J. P. Borg, and S. Etienne-Manneville. 2006. 'Scrib controls Cdc42 localization and activity to promote cell polarization during astrocyte migration', *Curr Biol*, 16: 2395-405.
- Park, J. I., S. W. Kim, J. P. Lyons, H. Ji, T. T. Nguyen, K. Cho, M. C. Barton, T. Deroo, K. Vleminckx, R. T. Moon, and P. D. McCrea. 2005. 'Kaiso/p120-catenin and TCF/beta-catenin complexes coordinately regulate canonical Wnt gene targets', *Dev Cell*, 8: 843-54.
- Passariello, C. L., M. Gayanilo, M. D. Kritzer, H. Thakur, Z. Cozacov, F. Rusconi, D. Wieczorek, M. Sanders, J. Li, and M. S. Kapiloff. 2013. 'p90 ribosomal S6 kinase 3 contributes to cardiac insufficiency in alpha-tropomyosin Glu180Gly transgenic mice', *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 305: H1010-9.
- Passariello, C. L., E. C. Martinez, H. Thakur, M. Cesareo, J. Li, and M. S. Kapiloff. 2016. 'RSK3 is required for concentric myocyte hypertrophy in an activated Raf1 model for Noonan syndrome', *J Mol Cell Cardiol*, 93: 98-105.
- Patel, S. D., C. Ciatto, C. P. Chen, F. Bahna, M. Rajebhosale, N. Arkus, I. Schieren, T. M. Jessell, B. Honig, S. R. Price, and L. Shapiro. 2006. 'Type II cadherin ectodomain structures: implications for classical cadherin specificity', *Cell*, 124: 1255-68.
- Pawson, T. 2007. 'Dynamic control of signaling by modular adaptor proteins', *Curr Opin Cell Biol*, 19: 112-6.
- Pearce, L. R., D. Komander, and D. R. Alessi. 2010. 'The nuts and bolts of AGC protein kinases', *Nat Rev Mol Cell Biol*, 11: 9-22.
- Pearson, H. B., P. A. Perez-Mancera, L. E. Dow, A. Ryan, P. Tennstedt, D. Bogani, I. Elsum, A. Greenfield, D. A. Tuveson, R. Simon, and P. O. Humbert. 2011. 'SCRIB expression is deregulated in human prostate cancer, and its deficiency in mice promotes prostate neoplasia', *J Clin Invest*, 121: 4257-67.
- Pece, S., and J. S. Gutkind. 2002. 'E-cadherin and Hakai: signalling, remodeling or destruction?', *Nat Cell Biol*, 4: E72-4.
- Peglion, F., F. Llense, and S. Etienne-Manneville. 2014. 'Adherens junction treadmill during collective migration', *Nat Cell Biol*, 16: 639-51.

- Pende, M., S. H. Um, V. Mieulet, M. Sticker, V. L. Goss, J. Mestan, M. Mueller, S. Fumagalli, S. C. Kozma, and G. Thomas. 2004. 'S6K1(-)/S6K2(-) mice exhibit perinatal lethality and rapamycin-sensitive 5'-terminal oligopyrimidine mRNA translation and reveal a mitogen-activated protein kinase-dependent S6 kinase pathway', *Mol Cell Biol*, 24: 3112-24.
- Penkert, R. R., H. M. DiVittorio, and K. E. Prehoda. 2004. 'Internal recognition through PDZ domain plasticity in the Par-6-Pals1 complex', *Nat Struct Mol Biol*, 11: 1122-7.
- Perander, M., S. M. Keyse, and O. M. Seternes. 2008. 'Does MK5 reconcile classical and atypical MAP kinases?', *Front Biosci*, 13: 4617-24.
- Pereira, P. M., A. Schneider, S. Pannetier, D. Heron, and A. Hanauer. 2010. 'Coffin-Lowry syndrome', *Eur J Hum Genet*, 18: 627-33.
- Perez-Moreno, M., M. A. Davis, E. Wong, H. A. Pasolli, A. B. Reynolds, and E. Fuchs. 2006. 'p120-catenin mediates inflammatory responses in the skin', *Cell*, 124: 631-44.
- Perez-Moreno, M., W. Song, H. A. Pasolli, S. E. Williams, and E. Fuchs. 2008. 'Loss of p120 catenin and links to mitotic alterations, inflammation, and skin cancer', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105: 15399-404.
- Perkins, G., D. Goodenough, and G. Sosinsky. 1997. 'Three-dimensional structure of the gap junction connexon', *Biophys J*, 72: 533-44.
- Petrova, Y. I., L. Schecterson, and B. M. Gumbiner. 2016. 'Roles for E-cadherin cell surface regulation in cancer', *Mol Biol Cell*, 27: 3233-44.
- Pettitt, J., E. A. Cox, I. D. Broadbent, A. Flett, and J. Hardin. 2003. 'The *Caenorhabditis elegans* p120 catenin homologue, JAC-1, modulates cadherin-catenin function during epidermal morphogenesis', *J Cell Biol*, 162: 15-22.
- Pieters, T., S. Goossens, L. Haenebalcke, V. Andries, A. Stryjewska, R. De Rycke, K. Lemeire, T. Hochepped, D. Huylebroeck, G. Berx, M. P. Stemmler, D. Wirth, J. J. Haigh, J. van Hengel, and F. van Roy. 2016. 'p120 Catenin-Mediated Stabilization of E-Cadherin Is Essential for Primitive Endoderm Specification', *PLoS Genet*, 12: e1006243.
- Pieters, T., F. van Roy, and J. van Hengel. 2012. 'Functions of p120ctn isoforms in cell-cell adhesion and intracellular signaling', *Front Biosci (Landmark Ed)*, 17: 1669-94.
- Piguel, N. H., S. Fievre, J. M. Blanc, M. Carta, M. M. Moreau, E. Moutin, V. L. Pinheiro, C. Medina, J. Ezan, L. Lasvaux, F. Loll, C. M. Durand, K. Chang, R. S. Petralia, R. J. Wenthold, F. A. Stephenson, L. Vuillard, H. Darbon, J. Perroy, C. Mulle, M. Montcouquiol, C. Racca, and N. Sans. 2014.

'Scribble1/AP2 complex coordinates NMDA receptor endocytic recycling', *Cell Rep*, 9: 712-27.

- Poirier, R., S. Jacquot, C. Vaillend, A. A. Southiphong, M. Libbey, S. Davis, S. Laroche, A. Hanauer, H. Welzl, H. P. Lipp, and D. P. Wolfer. 2007. 'Deletion of the Coffin-Lowry syndrome gene *Rsk2* in mice is associated with impaired spatial learning and reduced control of exploratory behavior', *Behav Genet*, 37: 31-50.
- Pokutta, S., K. Herrenknecht, R. Kemler, and J. Engel. 1994. 'Conformational changes of the recombinant extracellular domain of E-cadherin upon calcium binding', *Eur J Biochem*, 223: 1019-26.
- Ponting, C. P. 1997. 'Evidence for PDZ domains in bacteria, yeast, and plants', *Protein Sci*, 6: 464-8.
- Poomakkoth, N., A. Issa, N. Abdulrahman, S. G. Abdelaziz, and F. Mraiche. 2016. 'p90 ribosomal S6 kinase: a potential therapeutic target in lung cancer', *J Transl Med*, 14: 14.
- Posy, S., L. Shapiro, and B. Honig. 2008. 'Sequence and structural determinants of strand swapping in cadherin domains: do all cadherins bind through the same adhesive interface?', *J Mol Biol*, 378: 954-68.
- Powell, D. W. 1981. 'Barrier function of epithelia', *Am J Physiol*, 241: G275-88.
- Prior, I. A., P. D. Lewis, and C. Mattos. 2012. 'A comprehensive survey of Ras mutations in cancer', *Cancer Res*, 72: 2457-67.
- Putz, G., F. Bertolucci, T. Raabe, T. Zars, and M. Heisenberg. 2004. 'The *S6KII* (*rsk*) gene of *Drosophila melanogaster* differentially affects an operant and a classical learning task', *J Neurosci*, 24: 9745-51.
- Qin, Y., C. Capaldo, B. M. Gumbiner, and I. G. Macara. 2005. 'The mammalian Scribble polarity protein regulates epithelial cell adhesion and migration through E-cadherin', *J Cell Biol*, 171: 1061-71.
- Rafiee, M., M. R. Keramati, H. Ayatollahi, M. H. Sadeghian, M. Barzegar, A. Asgharzadeh, and M. Alinejad. 2016. 'Down-Regulation of Ribosomal S6 kinase RPS6KA6 in Acute Myeloid Leukemia Patients', *Cell J*, 18: 159-64.
- Rahman, M. A., A. Salajegheh, R. A. Smith, and A. K. Lam. 2013. 'B-Raf mutation: a key player in molecular biology of cancer', *Exp Mol Pathol*, 95: 336-42.
- Rajput, C., V. Kini, M. Smith, P. Yazbeck, A. Chavez, T. Schmidt, W. Zhang, N. Knezevic, Y. Komarova, and D. Mehta. 2013. 'Neural Wiskott-Aldrich syndrome protein (N-WASP)-mediated p120-catenin interaction with Arp2-Actin

- complex stabilizes endothelial adherens junctions', *J Biol Chem*, 288: 4241-50.
- Ray-David, H., Y. Romeo, G. Lavoie, P. Deleris, J. Tcherkezian, J. A. Galan, and P. P. Roux. 2013. 'RSK promotes G2 DNA damage checkpoint silencing and participates in melanoma chemoresistance', *Oncogene*, 32: 4480-9.
- Reynolds, A. B., D. J. Roesel, S. B. Kanner, and J. T. Parsons. 1989. 'Transformation-specific tyrosine phosphorylation of a novel cellular protein in chicken cells expressing oncogenic variants of the avian cellular src gene', *Mol Cell Biol*, 9: 629-38.
- Reyskens, K. M., and J. S. Arthur. 2016. 'Emerging Roles of the Mitogen and Stress Activated Kinases MSK1 and MSK2', *Front Cell Dev Biol*, 4: 56.
- Richards, S. A., V. C. Dreisbach, L. O. Murphy, and J. Blenis. 2001. 'Characterization of regulatory events associated with membrane targeting of p90 ribosomal S6 kinase 1', *Mol Cell Biol*, 21: 7470-80.
- Richards, S. A., J. Fu, A. Romanelli, A. Shimamura, and J. Blenis. 1999. 'Ribosomal S6 kinase 1 (RSK1) activation requires signals dependent on and independent of the MAP kinase ERK', *Curr Biol*, 9: 810-20.
- Richier, L., K. Williton, L. Clattenburg, K. Colwill, M. O'Brien, C. Tsang, A. Kolar, N. Zinck, P. Metalnikov, W. S. Trimble, S. R. Krueger, T. Pawson, and J. P. Fawcett. 2010. 'NOS1AP associates with Scribble and regulates dendritic spine development', *J Neurosci*, 30: 4796-805.
- Rimm, D. L., E. R. Koslov, P. Kebriaei, C. D. Cianci, and J. S. Morrow. 1995. 'Alpha 1(E)-catenin is an actin-binding and -bundling protein mediating the attachment of F-actin to the membrane adhesion complex', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92: 8813-7.
- Rivera, V. M., C. K. Miranti, R. P. Misra, D. D. Ginty, R. H. Chen, J. Blenis, and M. E. Greenberg. 1993. 'A growth factor-induced kinase phosphorylates the serum response factor at a site that regulates its DNA-binding activity', *Mol Cell Biol*, 13: 6260-73.
- Rives-Quinto, N., M. Franco, A. de Torres-Jurado, and A. Carmena. 2017. 'Synergism between canoe and scribble mutations causes tumor-like overgrowth via Ras activation in neural stem cells and epithelia', *Development*, 144: 2570-83.
- Robbins, D. J., E. Zhen, H. Owaki, C. A. Vanderbilt, D. Ebert, T. D. Geppert, and M. H. Cobb. 1993. 'Regulation and properties of extracellular signal-regulated protein kinases 1 and 2 in vitro', *J Biol Chem*, 268: 5097-106.

- Roczniak-Ferguson, A., and A. B. Reynolds. 2003. 'Regulation of p120-catenin nucleocytoplasmic shuttling activity', *J Cell Sci*, 116: 4201-12.
- Rodriguez, M. C., M. Petersen, and J. Mundy. 2010. 'Mitogen-activated protein kinase signaling in plants', *Annu Rev Plant Biol*, 61: 621-49.
- Roffe, M., F. C. Lupinacci, L. C. Soares, G. N. Hajj, and V. R. Martins. 2015. 'Two widely used RSK inhibitors, BI-D1870 and SL0101, alter mTORC1 signaling in a RSK-independent manner', *Cell Signal*, 27: 1630-42.
- Roh, M. H., and B. Margolis. 2003. 'Composition and function of PDZ protein complexes during cell polarization', *Am J Physiol Renal Physiol*, 285: F377-87.
- Rolfe, M., L. E. McLeod, P. F. Pratt, and C. G. Proud. 2005. 'Activation of protein synthesis in cardiomyocytes by the hypertrophic agent phenylephrine requires the activation of ERK and involves phosphorylation of tuberous sclerosis complex 2 (TSC2)', *Biochem J*, 388: 973-84.
- Romeo, Y., J. Moreau, P. J. Zindy, M. Saba-El-Leil, G. Lavoie, F. Dandachi, M. Baptissart, K. L. B. Borden, S. Meloche, and P. P. Roux. 2013. 'RSK regulates activated BRAF signalling to mTORC1 and promotes melanoma growth', *Oncogene*, 32: 2917-26.
- Romeo, Y., X. Zhang, and P. P. Roux. 2012. 'Regulation and function of the RSK family of protein kinases', *Biochem J*, 441: 553-69.
- Ronkina, N., A. Kotlyarov, and M. Gaestel. 2008. 'MK2 and MK3--a pair of isoenzymes?', *Front Biosci*, 13: 5511-21.
- Roskoski, R., Jr. 2012a. 'ERK1/2 MAP kinases: structure, function, and regulation', *Pharmacol Res*, 66: 105-43.
- . 2012b. 'MEK1/2 dual-specificity protein kinases: structure and regulation', *Biochem Biophys Res Commun*, 417: 5-10.
- Roux, K. J., D. I. Kim, M. Raida, and B. Burke. 2012. 'A promiscuous biotin ligase fusion protein identifies proximal and interacting proteins in mammalian cells', *J Cell Biol*, 196: 801-10.
- Roux, P. P., B. A. Ballif, R. Anjum, S. P. Gygi, and J. Blenis. 2004. 'Tumor-promoting phorbol esters and activated Ras inactivate the tuberous sclerosis tumor suppressor complex via p90 ribosomal S6 kinase', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101: 13489-94.
- Roux, P. P., and J. Blenis. 2004. 'ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions', *Microbiol Mol Biol Rev*, 68: 320-44.

- Roux, P. P., S. A. Richards, and J. Blenis. 2003. 'Phosphorylation of p90 ribosomal S6 kinase (RSK) regulates extracellular signal-regulated kinase docking and RSK activity', *Mol Cell Biol*, 23: 4796-804.
- Roux, P. P., D. Shahbazian, H. Vu, M. K. Holz, M. S. Cohen, J. Taunton, N. Sonenberg, and J. Blenis. 2007. 'RAS/ERK signaling promotes site-specific ribosomal protein S6 phosphorylation via RSK and stimulates cap-dependent translation', *J Biol Chem*, 282: 14056-64.
- Rozakis-Adcock, M., R. Fernley, J. Wade, T. Pawson, and D. Bowtell. 1993. 'The SH2 and SH3 domains of mammalian Grb2 couple the EGF receptor to the Ras activator mSos1', *Nature*, 363: 83-5.
- Rubinfeld, H., and R. Seger. 2005. 'The ERK cascade: a prototype of MAPK signaling', *Mol Biotechnol*, 31: 151-74.
- Rushworth, L. K., A. D. Hindley, E. O'Neill, and W. Kolch. 2006. 'Regulation and role of Raf-1/B-Raf heterodimerization', *Mol Cell Biol*, 26: 2262-72.
- Saha, M., A. Carriere, M. Cheerathodi, X. Zhang, G. Lavoie, J. Rush, P. P. Roux, and B. A. Ballif. 2012. 'RSK phosphorylates SOS1 creating 14-3-3-docking sites and negatively regulating MAPK activation', *Biochem J*, 447: 159-66.
- Santoni, M. J., P. Pontarotti, D. Birnbaum, and J. P. Borg. 2002. 'The LAP family: a phylogenetic point of view', *Trends Genet*, 18: 494-7.
- Sapkota, G. P., L. Cummings, F. S. Newell, C. Armstrong, J. Bain, M. Frodin, M. Grauert, M. Hoffmann, G. Schnapp, M. Steegmaier, P. Cohen, and D. R. Alessi. 2007. 'BI-D1870 is a specific inhibitor of the p90 RSK (ribosomal S6 kinase) isoforms in vitro and in vivo', *Biochem J*, 401: 29-38.
- Sarrio, D., B. Perez-Mies, D. Hardisson, G. Moreno-Bueno, A. Suarez, A. Cano, J. Martin-Perez, C. Gamallo, and J. Palacios. 2004. 'Cytoplasmic localization of p120ctn and E-cadherin loss characterize lobular breast carcinoma from preinvasive to metastatic lesions', *Oncogene*, 23: 3272-83.
- Sato, K., T. Watanabe, S. Wang, M. Kakeno, K. Matsuzawa, T. Matsui, K. Yokoi, K. Murase, I. Sugiyama, M. Ozawa, and K. Kaibuchi. 2011. 'Numb controls E-cadherin endocytosis through p120 catenin with aPKC', *Mol Biol Cell*, 22: 3103-19.
- Sato, P. Y., W. Coombs, X. Lin, O. Nekrasova, K. J. Green, L. L. Isom, S. M. Taffet, and M. Delmar. 2011. 'Interactions between ankyrin-G, Plakophilin-2, and Connexin43 at the cardiac intercalated disc', *Circ Res*, 109: 193-201.
- Sawada, N. 2013. 'Tight junction-related human diseases', *Pathol Int*, 63: 1-12.

- Schneider, M. R., and F. T. Kolligs. 2015. 'E-cadherin's role in development, tissue homeostasis and disease: Insights from mouse models: Tissue-specific inactivation of the adhesion protein E-cadherin in mice reveals its functions in health and disease', *Bioessays*, 37: 294-304.
- Schouten, G. J., A. C. Vertegaal, S. T. Whiteside, A. Israel, M. Toebes, J. C. Dorsman, A. J. van der Eb, and A. Zantema. 1997. 'IkappaB alpha is a target for the mitogen-activated 90 kDa ribosomal S6 kinase', *EMBO J*, 16: 3133-44.
- Schubbert, S., K. Shannon, and G. Bollag. 2007. 'Hyperactive Ras in developmental disorders and cancer', *Nat Rev Cancer*, 7: 295-308.
- Serra, V., P. J. Eichhorn, C. Garcia-Garcia, Y. H. Ibrahim, L. Prudkin, G. Sanchez, O. Rodriguez, P. Anton, J. L. Parra, S. Marlow, M. Scaltriti, J. Perez-Garcia, A. Prat, J. Arribas, W. C. Hahn, S. Y. Kim, and J. Baselga. 2013. 'RSK3/4 mediate resistance to PI3K pathway inhibitors in breast cancer', *J Clin Invest*, 123: 2551-63.
- Shahbazian, D., P. P. Roux, V. Mieulet, M. S. Cohen, B. Raught, J. Taunton, J. W. Hershey, J. Blenis, M. Pende, and N. Sonenberg. 2006. 'The mTOR/PI3K and MAPK pathways converge on eIF4B to control its phosphorylation and activity', *EMBO J*, 25: 2781-91.
- Shaw, R. J., N. Bardeesy, B. D. Manning, L. Lopez, M. Kosmatka, R. A. DePinho, and L. C. Cantley. 2004. 'The LKB1 tumor suppressor negatively regulates mTOR signaling', *Cancer Cell*, 6: 91-9.
- Shevchenko, A., M. Wilm, O. Vorm, and M. Mann. 1996. 'Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels', *Anal Chem*, 68: 850-8.
- Shi, G. X., W. S. Yang, L. Jin, M. L. Matter, and J. W. Ramos. 2018. 'RSK2 drives cell motility by serine phosphorylation of LARG and activation of Rho GTPases', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 115: E190-E99.
- Shi, X., M. M. O'Neill, S. MacDonnell, P. S. Brookes, C. Yan, and B. C. Berk. 2016. 'The RSK Inhibitor BIX02565 Limits Cardiac Ischemia/Reperfusion Injury', *J Cardiovasc Pharmacol Ther*, 21: 177-86.
- Shibata, T., A. Kokubu, S. Sekine, Y. Kanai, and S. Hirohashi. 2004. 'Cytoplasmic p120ctn regulates the invasive phenotypes of E-cadherin-deficient breast cancer', *Am J Pathol*, 164: 2269-78.
- Shimamura, A., B. A. Ballif, S. A. Richards, and J. Blenis. 2000. 'Rsk1 mediates a MEK-MAP kinase cell survival signal', *Curr Biol*, 10: 127-35.
- Shteynberg, D., E. W. Deutsch, H. Lam, J. K. Eng, Z. Sun, N. Tasman, L. Mendoza, R. L. Moritz, R. Aebersold, and A. I. Nesvizhskii. 2011. 'iProphet: multi-level integrative analysis of shotgun proteomic data improves peptide and protein

- identification rates and error estimates', *Mol Cell Proteomics*, 10: M111007690.
- Skoudy, A., S. Gomez, M. Fabre, and A. Garcia de Herreros. 1996. 'p120-catenin expression in human colorectal cancer', *Int J Cancer*, 68: 14-20.
- Smadja-Lamere, N., M. Shum, P. Deleris, P. P. Roux, J. Abe, and A. Marette. 2013. 'Insulin activates RSK (p90 ribosomal S6 kinase) to trigger a new negative feedback loop that regulates insulin signaling for glucose metabolism', *J Biol Chem*, 288: 31165-76.
- Smalley-Freed, W. G., A. Efimov, P. E. Burnett, S. P. Short, M. A. Davis, D. L. Gumucio, M. K. Washington, R. J. Coffey, and A. B. Reynolds. 2010. 'p120-catenin is essential for maintenance of barrier function and intestinal homeostasis in mice', *J Clin Invest*, 120: 1824-35.
- Smith, J. A., C. E. Poteet-Smith, K. Malarkey, and T. W. Sturgill. 1999. 'Identification of an extracellular signal-regulated kinase (ERK) docking site in ribosomal S6 kinase, a sequence critical for activation by ERK in vivo', *J Biol Chem*, 274: 2893-8.
- Smith, J. A., C. E. Poteet-Smith, Y. Xu, T. M. Errington, S. M. Hecht, and D. A. Lannigan. 2005. 'Identification of the first specific inhibitor of p90 ribosomal S6 kinase (RSK) reveals an unexpected role for RSK in cancer cell proliferation', *Cancer Res*, 65: 1027-34.
- Smolen, G. A., J. Zhang, M. J. Zubrowski, E. J. Edelman, B. Luo, M. Yu, L. W. Ng, C. M. Scherber, B. J. Schott, S. Ramaswamy, D. Irimia, D. E. Root, and D. A. Haber. 2010. 'A genome-wide RNAi screen identifies multiple RSK-dependent regulators of cell migration', *Genes Dev*, 24: 2654-65.
- Soto, E., M. Yanagisawa, L. A. Marlow, J. A. Copland, E. A. Perez, and P. Z. Anastasiadis. 2008. 'p120 catenin induces opposing effects on tumor cell growth depending on E-cadherin expression', *J Cell Biol*, 183: 737-49.
- Soubry, A., J. van Hengel, E. Parthoens, C. Colpaert, E. Van Marck, D. Waltregny, A. B. Reynolds, and F. van Roy. 2005. 'Expression and nuclear location of the transcriptional repressor Kaiso is regulated by the tumor microenvironment', *Cancer Res*, 65: 2224-33.
- Spanos, W. C., A. Hoover, G. F. Harris, S. Wu, G. L. Strand, M. E. Anderson, A. J. Klingelutz, W. Hendriks, A. D. Bossler, and J. H. Lee. 2008. 'The PDZ binding motif of human papillomavirus type 16 E6 induces PTPN13 loss, which allows anchorage-independent growth and synergizes with ras for invasive growth', *J Virol*, 82: 2493-500.

- Spring, C. M., K. F. Kelly, I. O'Kelly, M. Graham, H. C. Crawford, and J. M. Daniel. 2005. 'The catenin p120^{ctn} inhibits Kaiso-mediated transcriptional repression of the beta-catenin/TCF target gene matrilysin', *Exp Cell Res*, 305: 253-65.
- Srinivas, M., V. K. Verselis, and T. W. White. 2018. 'Human diseases associated with connexin mutations', *Biochim Biophys Acta*, 1860: 192-201.
- Stahelin, L. A., T. M. Mukherjee, and A. W. Williams. 1969. 'Freeze-etch appearance of the tight junctions in the epithelium of small and large intestine of mice', *Protoplasma*, 67: 165-84.
- Stairs, D. B., L. J. Bayne, B. Rhoades, M. E. Vega, T. J. Waldron, J. Kalabis, A. Klein-Szanto, J. S. Lee, J. P. Katz, J. A. Diehl, A. B. Reynolds, R. H. Vonderheide, and A. K. Rustgi. 2011. 'Deletion of p120-catenin results in a tumor microenvironment with inflammation and cancer that establishes it as a tumor suppressor gene', *Cancer Cell*, 19: 470-83.
- Stephens, P. J., P. S. Tarpey, H. Davies, P. Van Loo, C. Greenman, D. C. Wedge, S. Nik-Zainal, S. Martin, I. Varela, G. R. Bignell, L. R. Yates, E. Papaemmanuil, D. Beare, A. Butler, A. Cheverton, J. Gamble, J. Hinton, M. Jia, A. Jayakumar, D. Jones, C. Latimer, K. W. Lau, S. McLaren, D. J. McBride, A. Menzies, L. Mudie, K. Raine, R. Rad, M. S. Chapman, J. Teague, D. Easton, A. Langerod, Consortium Oslo Breast Cancer, M. T. Lee, C. Y. Shen, B. T. Tee, B. W. Huimin, A. Broeks, A. C. Vargas, G. Turashvili, J. Martens, A. Fatima, P. Miron, S. F. Chin, G. Thomas, S. Boyault, O. Mariani, S. R. Lakhani, M. van de Vijver, L. van 't Veer, J. Foekens, C. Desmedt, C. Sotiriou, A. Tutt, C. Caldas, J. S. Reis-Filho, S. A. Aparicio, A. V. Salomon, A. L. Borresen-Dale, A. L. Richardson, P. J. Campbell, P. A. Futreal, and M. R. Stratton. 2012. 'The landscape of cancer genes and mutational processes in breast cancer', *Nature*, 486: 400-4.
- Stephens, R., K. Lim, M. Portela, M. Kivansakul, P. O. Humbert, and H. E. Richardson. 2018. 'The Scribble Cell Polarity Module in the Regulation of Cell Signaling in Tissue Development and Tumorigenesis', *J Mol Biol*, 430: 3585-612.
- Stevenson, B. R., J. D. Siliciano, M. S. Mooseker, and D. A. Goodenough. 1986. 'Identification of ZO-1: a high molecular weight polypeptide associated with the tight junction (zonula occludens) in a variety of epithelia', *J Cell Biol*, 103: 755-66.
- Stewart, G. S., B. Wang, C. R. Bignell, A. M. Taylor, and S. J. Elledge. 2003. 'MDC1 is a mediator of the mammalian DNA damage checkpoint', *Nature*, 421: 961-6.
- Stokoe, D., S. G. Macdonald, K. Cadwallader, M. Symons, and J. F. Hancock. 1994. 'Activation of Raf as a result of recruitment to the plasma membrane', *Science*, 264: 1463-7.

- Stratford, A. L., C. J. Fry, C. Desilets, A. H. Davies, Y. Y. Cho, Y. Li, Z. Dong, I. M. Berquin, P. P. Roux, and S. E. Dunn. 2008. 'Y-box binding protein-1 serine 102 is a downstream target of p90 ribosomal S6 kinase in basal-like breast cancer cells', *Breast Cancer Res*, 10: R99.
- Stucki, M., J. A. Clapperton, D. Mohammad, M. B. Yaffe, S. J. Smerdon, and S. P. Jackson. 2005. 'MDC1 directly binds phosphorylated histone H2AX to regulate cellular responses to DNA double-strand breaks', *Cell*, 123: 1213-26.
- Sturgill, T. W., L. B. Ray, E. Erikson, and J. L. Maller. 1988. 'Insulin-stimulated MAP-2 kinase phosphorylates and activates ribosomal protein S6 kinase II', *Nature*, 334: 715-8.
- Su, W. H., D. D. Mruk, E. W. Wong, W. Y. Lui, and C. Y. Cheng. 2012. 'Polarity protein complex Scribble/Lgl/Dlg and epithelial cell barriers', *Adv Exp Med Biol*, 763: 149-70.
- Subbaiah, V. K., C. Kranjec, M. Thomas, and L. Banks. 2011. 'PDZ domains: the building blocks regulating tumorigenesis', *Biochem J*, 439: 195-205.
- Sugi, T., T. Oyama, T. Muto, S. Nakanishi, K. Morikawa, and H. Jingami. 2007. 'Crystal structures of autoinhibitory PDZ domain of Tamalin: implications for metabotropic glutamate receptor trafficking regulation', *EMBO J*, 26: 2192-205.
- Sulzmaier, F. J., and J. W. Ramos. 2013. 'RSK isoforms in cancer cell invasion and metastasis', *Cancer Res*, 73: 6099-105.
- Sulzmaier, F. J., S. Young-Robbins, P. Jiang, D. Geerts, A. M. Prechtel, M. L. Matter, S. Kesari, and J. W. Ramos. 2016. 'RSK2 activity mediates glioblastoma invasiveness and is a potential target for new therapeutics', *Oncotarget*, 7: 79869-84.
- Sutherland, C., D. G. Campbell, and P. Cohen. 1993. 'Identification of insulin-stimulated protein kinase-1 as the rabbit equivalent of rskmo-2. Identification of two threonines phosphorylated during activation by mitogen-activated protein kinase', *Eur J Biochem*, 212: 581-8.
- Sutherland, C., I. A. Leighton, and P. Cohen. 1993. 'Inactivation of glycogen synthase kinase-3 beta by phosphorylation: new kinase connections in insulin and growth-factor signalling', *Biochem J*, 296 (Pt 1): 15-9.
- Swulius, M. T., and M. N. Waxham. 2008. 'Ca(2+)/calmodulin-dependent protein kinases', *Cell Mol Life Sci*, 65: 2637-57.
- Takahashi, E., J. Abe, B. Gallis, R. Aebersold, D. J. Spring, E. G. Krebs, and B. C. Berk. 1999. 'p90(RSK) is a serum-stimulated Na⁺/H⁺ exchanger isoform-1

- kinase. Regulatory phosphorylation of serine 703 of Na⁺/H⁺ exchanger isoform-1', *J Biol Chem*, 274: 20206-14.
- Tanimura, S., J. Hashizume, Y. Kurosaki, K. Sei, A. Gotoh, R. Ohtake, M. Kawano, K. Watanabe, and M. Kohno. 2011. 'SH3P2 is a negative regulator of cell motility whose function is inhibited by ribosomal S6 kinase-mediated phosphorylation', *Genes Cells*, 16: 514-26.
- Tanimura, S., and K. Takeda. 2017. 'ERK signalling as a regulator of cell motility', *J Biochem*, 162: 145-54.
- Taniuchi, K., H. Nakagawa, M. Hosokawa, T. Nakamura, H. Eguchi, H. Ohigashi, O. Ishikawa, T. Katagiri, and Y. Nakamura. 2005. 'Overexpressed P-cadherin/CDH3 promotes motility of pancreatic cancer cells by interacting with p120ctn and activating rho-family GTPases', *Cancer Res*, 65: 3092-9.
- Teo, G., G. Liu, J. Zhang, A. I. Nesvizhskii, A. C. Gingras, and H. Choi. 2014. 'SAINTexpress: improvements and additional features in Significance Analysis of INTeractome software', *J Proteomics*, 100: 37-43.
- Thakur, A., Y. Sun, A. Bollig, J. Wu, H. Biliran, S. Banerjee, F. H. Sarkar, and D. J. Liao. 2008. 'Anti-invasive and antimetastatic activities of ribosomal protein S6 kinase 4 in breast cancer cells', *Clin Cancer Res*, 14: 4427-36.
- Thomas, G. M., G. R. Rumbaugh, D. B. Harrar, and R. L. Huganir. 2005. 'Ribosomal S6 kinase 2 interacts with and phosphorylates PDZ domain-containing proteins and regulates AMPA receptor transmission', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102: 15006-11.
- Thoreson, M. A., P. Z. Anastasiadis, J. M. Daniel, R. C. Ireton, M. J. Wheelock, K. R. Johnson, D. K. Hummingbird, and A. B. Reynolds. 2000. 'Selective uncoupling of p120(ctn) from E-cadherin disrupts strong adhesion', *J Cell Biol*, 148: 189-202.
- Thoreson, M. A., and A. B. Reynolds. 2002. 'Altered expression of the catenin p120 in human cancer: implications for tumor progression', *Differentiation*, 70: 583-9.
- Tian, Q. B., T. Suzuki, T. Yamauchi, H. Sakagami, Y. Yoshimura, S. Miyazawa, K. Nakayama, F. Saitoh, J. P. Zhang, Y. Lu, H. Kondo, and S. Endo. 2006. 'Interaction of LDL receptor-related protein 4 (LRP4) with postsynaptic scaffold proteins via its C-terminal PDZ domain-binding motif, and its regulation by Ca/calmodulin-dependent protein kinase II', *Eur J Neurosci*, 23: 2864-76.
- Tiwari, A., S. Rebholz, E. Maier, M. Dehghan Harati, D. Zips, C. Sers, H. P. Rodemann, and M. Toulany. 2018. 'Stress-Induced Phosphorylation of Nuclear YB-1

Depends on Nuclear Trafficking of p90 Ribosomal S6 Kinase', *Int J Mol Sci*, 19.

- Tonikian, R., Y. Zhang, S. L. Sazinsky, B. Currell, J. H. Yeh, B. Reva, H. A. Held, B. A. Appleton, M. Evangelista, Y. Wu, X. Xin, A. C. Chan, S. Seshagiri, L. A. Lasky, C. Sander, C. Boone, G. D. Bader, and S. S. Sidhu. 2008. 'A specificity map for the PDZ domain family', *PLoS Biol*, 6: e239.
- Trivier, E., D. De Cesare, S. Jacquot, S. Pannetier, E. Zackai, I. Young, J. L. Mandel, P. Sassone-Corsi, and A. Hanauer. 1996. 'Mutations in the kinase Rsk-2 associated with Coffin-Lowry syndrome', *Nature*, 384: 567-70.
- Troyanovsky, S. M., R. B. Troyanovsky, L. G. Eshkind, V. A. Krutovskikh, R. E. Leube, and W. W. Franke. 1994. 'Identification of the plakoglobin-binding domain in desmoglein and its role in plaque assembly and intermediate filament anchorage', *J Cell Biol*, 127: 151-60.
- Unwin, P. N., and G. Zampighi. 1980. 'Structure of the junction between communicating cells', *Nature*, 283: 545-9.
- Utebergenov, D., U. Derewenda, N. Olekhovich, G. Szukalska, B. Banerjee, M. K. Hilinski, D. A. Lannigan, P. T. Stukenberg, and Z. S. Derewenda. 2012. 'Insights into the inhibition of the p90 ribosomal S6 kinase (RSK) by the flavonol glycoside SL0101 from the 1.5 Å crystal structure of the N-terminal domain of RSK2 with bound inhibitor', *Biochemistry*, 51: 6499-510.
- Vaidyanathan, H., and J. W. Ramos. 2003. 'RSK2 activity is regulated by its interaction with PEA-15', *J Biol Chem*, 278: 32367-72.
- Vaira, V., A. Favarsani, T. Dohi, M. Maggioni, M. Nosotti, D. Tosi, D. C. Altieri, and S. Bosari. 2011. 'Aberrant overexpression of the cell polarity module scribble in human cancer', *Am J Pathol*, 178: 2478-83.
- Valenta, T., G. Hausmann, and K. Basler. 2012. 'The many faces and functions of beta-catenin', *EMBO J*, 31: 2714-36.
- Valiunas, V., Y. Y. Polosina, H. Miller, I. A. Potapova, L. Valiuniene, S. Doronin, R. T. Mathias, R. B. Robinson, M. R. Rosen, I. S. Cohen, and P. R. Brink. 2005. 'Connexin-specific cell-to-cell transfer of short interfering RNA by gap junctions', *J Physiol*, 568: 459-68.
- Valls, G., M. Codina, R. K. Miller, B. Del Valle-Perez, M. Vinyoles, C. Caelles, P. D. McCrea, A. Garcia de Herreros, and M. Dunach. 2012. 'Upon Wnt stimulation, Rac1 activation requires Rac1 and Vav2 binding to p120-catenin', *J Cell Sci*, 125: 5288-301.

- van Hengel, J., and F. van Roy. 2007. 'Diverse functions of p120ctn in tumors', *Biochim Biophys Acta*, 1773: 78-88.
- van Hengel, J., P. Vanhoenacker, K. Staes, and F. van Roy. 1999. 'Nuclear localization of the p120(ctn) Armadillo-like catenin is counteracted by a nuclear export signal and by E-cadherin expression', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96: 7980-5.
- Van Itallie, C. M., and J. M. Anderson. 2006. 'Claudins and epithelial paracellular transport', *Annu Rev Physiol*, 68: 403-29.
- . 2014. 'Architecture of tight junctions and principles of molecular composition', *Semin Cell Dev Biol*, 36: 157-65.
- Van Linden, A. A., V. Cottin, C. Leu, and D. W. Riches. 2000. 'Phosphorylation of the membrane proximal region of tumor necrosis factor receptor CD120a (p55) at ERK consensus sites', *J Biol Chem*, 275: 6996-7003.
- van Roy, F. M., and P. D. McCrea. 2005. 'A role for Kaiso-p120ctn complexes in cancer?', *Nat Rev Cancer*, 5: 956-64.
- Vandenbroucke St Amant, E., M. Tauseef, S. M. Vogel, X. P. Gao, D. Mehta, Y. A. Komarova, and A. B. Malik. 2012. 'PKCalpha activation of p120-catenin serine 879 phospho-switch disassembles VE-cadherin junctions and disrupts vascular integrity', *Circ Res*, 111: 739-49.
- Vermeulen, J. F., R. A. van de Ven, C. Ercan, P. van der Groep, E. van der Wall, P. Bult, M. Christgen, U. Lehmann, J. Daniel, P. J. van Diest, and P. W. Derksen. 2012. 'Nuclear Kaiso expression is associated with high grade and triple-negative invasive breast cancer', *PLoS One*, 7: e37864.
- Vik, T. A., and J. W. Ryder. 1997. 'Identification of serine 380 as the major site of autophosphorylation of Xenopus pp90rsk', *Biochem Biophys Res Commun*, 235: 398-402.
- Voltz, J. W., M. Brush, S. Sikes, D. Steplock, E. J. Weinman, and S. Shenolikar. 2007. 'Phosphorylation of PDZ1 domain attenuates NHERF-1 binding to cellular targets', *J Biol Chem*, 282: 33879-87.
- Vos, C. B., A. M. Cleton-Jansen, G. Berx, W. J. de Leeuw, N. T. ter Haar, F. van Roy, C. J. Cornelisse, J. L. Peterse, and M. J. van de Vijver. 1997. 'E-cadherin inactivation in lobular carcinoma in situ of the breast: an early event in tumorigenesis', *Br J Cancer*, 76: 1131-3.
- Walton, M., A. M. Woodgate, A. Muravlev, R. Xu, M. J. During, and M. Dragunow. 1999. 'CREB phosphorylation promotes nerve cell survival', *J Neurochem*, 73: 1836-42.

- Wang, C. K., L. Pan, J. Chen, and M. Zhang. 2010. 'Extensions of PDZ domains as important structural and functional elements', *Protein Cell*, 1: 737-51.
- Wang, J., L. Jin, Y. Zhu, X. Zhou, R. Yu, and S. Gao. 2016. 'Research progress in NOS1AP in neurological and psychiatric diseases', *Brain Res Bull*, 125: 99-105.
- Wang, R., S. Y. Jung, C. F. Wu, J. Qin, R. Kobayashi, G. E. Gallick, and J. Kuang. 2010. 'Direct roles of the signaling kinase RSK2 in Cdc25C activation during *Xenopus* oocyte maturation', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107: 19885-90.
- Wang, X., M. Janmaat, A. Beugnet, F. E. Paulin, and C. G. Proud. 2002. 'Evidence that the dephosphorylation of Ser(535) in the epsilon-subunit of eukaryotic initiation factor (eIF) 2B is insufficient for the activation of eIF2B by insulin', *Biochem J*, 367: 475-81.
- Wang, X., W. Li, M. Williams, N. Terada, D. R. Alessi, and C. G. Proud. 2001. 'Regulation of elongation factor 2 kinase by p90(RSK1) and p70 S6 kinase', *EMBO J*, 20: 4370-9.
- Watabe-Uchida, M., N. Uchida, Y. Imamura, A. Nagafuchi, K. Fujimoto, T. Uemura, S. Vermeulen, F. van Roy, E. D. Adamson, and M. Takeichi. 1998. 'alpha-Catenin-vinculin interaction functions to organize the apical junctional complex in epithelial cells', *J Cell Biol*, 142: 847-57.
- Weber, C. K., J. R. Slupsky, H. A. Kalmes, and U. R. Rapp. 2001. 'Active Ras induces heterodimerization of cRaf and BRaf', *Cancer Res*, 61: 3595-8.
- Wee, P., and Z. Wang. 2017. 'Epidermal Growth Factor Receptor Cell Proliferation Signaling Pathways', *Cancers (Basel)*, 9.
- Wehrendt, D. P., F. Carmona, A. E. Gonzalez Wusener, A. Gonzalez, J. M. Martinez, and C. O. Arregui. 2016. 'P120-Catenin Regulates Early Trafficking Stages of the N-Cadherin Precursor Complex', *PLoS One*, 11: e0156758.
- Wigerius, M., N. Asghar, W. Melik, and M. Johansson. 2013. 'Scribble controls NGF-mediated neurite outgrowth in PC12 cells', *Eur J Cell Biol*, 92: 213-21.
- Wildenberg, G. A., M. R. Dohn, R. H. Carnahan, M. A. Davis, N. A. Lobdell, J. Settleman, and A. B. Reynolds. 2006. 'p120-catenin and p190RhoGAP regulate cell-cell adhesion by coordinating antagonism between Rac and Rho', *Cell*, 127: 1027-39.
- Wilkinson, B., H. Wang, and C. E. Rudd. 2004. 'Positive and negative adaptors in T-cell signalling', *Immunology*, 111: 368-74.
- Willard, F. S., and M. F. Crouch. 2001. 'MEK, ERK, and p90RSK are present on mitotic tubulin in Swiss 3T3 cells: a role for the MAP kinase pathway in regulating mitotic exit', *Cell Signal*, 13: 653-64.

- Williams, M. R., J. S. Arthur, A. Balendran, J. van der Kaay, V. Poli, P. Cohen, and D. R. Alessi. 2000. 'The role of 3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1 in activating AGC kinases defined in embryonic stem cells', *Curr Biol*, 10: 439-48.
- Wingate, A. D., D. G. Campbell, M. Peggie, and J. S. Arthur. 2006. 'Nur77 is phosphorylated in cells by RSK in response to mitogenic stimulation', *Biochem J*, 393: 715-24.
- Wong, L. E., A. B. Reynolds, N. T. Dissanayaka, and A. Minden. 2010. 'p120-catenin is a binding partner and substrate for Group B Pak kinases', *J Cell Biochem*, 110: 1244-54.
- Woo, M. S., Y. Ohta, I. Rabinovitz, T. P. Stossel, and J. Blenis. 2004. 'Ribosomal S6 kinase (RSK) regulates phosphorylation of filamin A on an important regulatory site', *Mol Cell Biol*, 24: 3025-35.
- Wood, L. D., D. W. Parsons, S. Jones, J. Lin, T. Sjoblom, R. J. Leary, D. Shen, S. M. Boca, T. Barber, J. Ptak, N. Silliman, S. Szabo, Z. Dezso, V. Ustyansky, T. Nikolskaya, Y. Nikolsky, R. Karchin, P. A. Wilson, J. S. Kaminker, Z. Zhang, R. Croshaw, J. Willis, D. Dawson, M. Shipitsin, J. K. Willson, S. Sukumar, K. Polyak, B. H. Park, C. L. Pethiyagoda, P. V. Pant, D. G. Ballinger, A. B. Sparks, J. Hartigan, D. R. Smith, E. Suh, N. Papadopoulos, P. Buckhaults, S. D. Markowitz, G. Parmigiani, K. W. Kinzler, V. E. Velculescu, and B. Vogelstein. 2007. 'The genomic landscapes of human breast and colorectal cancers', *Science*, 318: 1108-13.
- Wu, H., W. Feng, J. Chen, L. N. Chan, S. Huang, and M. Zhang. 2007. 'PDZ domains of Par-3 as potential phosphoinositide signaling integrators', *Mol Cell*, 28: 886-98.
- Wu, M., T. J. Hemesath, C. M. Takemoto, M. A. Horstmann, A. G. Wells, E. R. Price, D. Z. Fisher, and D. E. Fisher. 2000. 'c-Kit triggers dual phosphorylations, which couple activation and degradation of the essential melanocyte factor Mi', *Genes Dev*, 14: 301-12.
- Wu, M., J. C. Pastor-Pareja, and T. Xu. 2010. 'Interaction between Ras(V12) and scribbled clones induces tumour growth and invasion', *Nature*, 463: 545-8.
- Xiao, K., D. F. Allison, K. M. Buckley, M. D. Kottke, P. A. Vincent, V. Faundez, and A. P. Kowalczyk. 2003. 'Cellular levels of p120 catenin function as a set point for cadherin expression levels in microvascular endothelial cells', *J Cell Biol*, 163: 535-45.
- Xing, J., D. D. Ginty, and M. E. Greenberg. 1996. 'Coupling of the RAS-MAPK pathway to gene activation by RSK2, a growth factor-regulated CREB kinase', *Science*, 273: 959-63.

- Xu, C., R. Liu, Q. Zhang, X. Chen, Y. Qian, and W. Fang. 2017. 'The Diversification of Evolutionarily Conserved MAPK Cascades Correlates with the Evolution of Fungal Species and Development of Lifestyles', *Genome Biol Evol*, 9: 311-22.
- Xu, S., H. Bayat, X. Hou, and B. Jiang. 2006. 'Ribosomal S6 kinase-1 modulates interleukin-1beta-induced persistent activation of NF-kappaB through phosphorylation of IkappaBbeta', *Am J Physiol Cell Physiol*, 291: C1336-45.
- Yamnik, R. L., and M. K. Holz. 2010. 'mTOR/S6K1 and MAPK/RSK signaling pathways coordinately regulate estrogen receptor alpha serine 167 phosphorylation', *FEBS Lett*, 584: 124-8.
- Yanagisawa, M., and P. Z. Anastasiadis. 2006. 'p120 catenin is essential for mesenchymal cadherin-mediated regulation of cell motility and invasiveness', *J Cell Biol*, 174: 1087-96.
- Yanagisawa, M., D. Huvelde, P. Kreinest, C. M. Lohse, J. C. Cheville, A. S. Parker, J. A. Copland, and P. Z. Anastasiadis. 2008. 'A p120 catenin isoform switch affects Rho activity, induces tumor cell invasion, and predicts metastatic disease', *J Biol Chem*, 283: 18344-54.
- Yanagisawa, M., I. N. Kaverina, A. Wang, Y. Fujita, A. B. Reynolds, and P. Z. Anastasiadis. 2004. 'A novel interaction between kinesin and p120 modulates p120 localization and function', *J Biol Chem*, 279: 9512-21.
- Yano, T., T. Matsui, A. Tamura, M. Uji, and S. Tsukita. 2013. 'The association of microtubules with tight junctions is promoted by cingulin phosphorylation by AMPK', *J Cell Biol*, 203: 605-14.
- Yap, A. S., C. M. Niessen, and B. M. Gumbiner. 1998. 'The juxtamembrane region of the cadherin cytoplasmic tail supports lateral clustering, adhesive strengthening, and interaction with p120ctn', *J Cell Biol*, 141: 779-89.
- Yee, K. L., V. M. Weaver, and D. A. Hammer. 2008. 'Integrin-mediated signalling through the MAP-kinase pathway', *IET Syst Biol*, 2: 8-15.
- Yin, G., J. Haendeler, C. Yan, and B. C. Berk. 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: 875-85.
- Yin, G., Q. Zheng, C. Yan, and B. C. Berk. 2005. 'GIT1 is a scaffold for ERK1/2 activation in focal adhesions', *J Biol Chem*, 280: 27705-12.
- Yntema, H. G., B. van den Helm, J. Kissing, G. van Duijnhoven, F. Poppelaars, J. Chelly, C. Moraine, J. P. Fryns, B. C. Hamel, H. Heilbronner, H. J. Pander, H. G. Brunner, H. H. Ropers, F. P. Cremers, and H. van Bokhoven. 1999. 'A novel

ribosomal S6-kinase (RSK4; RPS6KA6) is commonly deleted in patients with complex X-linked mental retardation', *Genomics*, 62: 332-43.

- Yonemura, S. 2011. 'Cadherin-actin interactions at adherens junctions', *Curr Opin Cell Biol*, 23: 515-22.
- Young, L. C., N. Hartig, M. Munoz-Alegre, J. A. Osés-Prieto, S. Durdu, S. Bender, V. Vijayakumar, M. Vietri Rudan, C. Gewinner, S. Henderson, A. P. Jathoul, R. Ghatrora, M. F. Lythgoe, A. L. Burlingame, and P. Rodriguez-Viciana. 2013. 'An MRAS, SHOC2, and SCRIB complex coordinates ERK pathway activation with polarity and tumorigenic growth', *Mol Cell*, 52: 679-92.
- Yu, G., Y. C. Lee, C. J. Cheng, C. F. Wu, J. H. Song, G. E. Gallick, L. Y. Yu-Lee, J. Kuang, and S. H. Lin. 2015. 'RSK promotes prostate cancer progression in bone through ING3, CKAP2, and PTK6-mediated cell survival', *Mol Cancer Res*, 13: 348-57.
- Zarbalis, K., S. R. May, Y. Shen, M. Ekker, J. L. Rubenstein, and A. S. Peterson. 2004. 'A focused and efficient genetic screening strategy in the mouse: identification of mutations that disrupt cortical development', *PLoS Biol*, 2: E219.
- Zaru, R., A. J. Edgar, A. Hanauer, and C. Watts. 2015. 'Structural and functional basis for p38-MK2-activated Rsk signaling in toll-like receptor-stimulated dendritic cells', *Mol Cell Biol*, 35: 132-40.
- Zaru, R., N. Ronkina, M. Gaestel, J. S. Arthur, and C. Watts. 2007. 'The MAPK-activated kinase Rsk controls an acute Toll-like receptor signaling response in dendritic cells and is activated through two distinct pathways', *Nat Immunol*, 8: 1227-35.
- Zeitler, J., C. P. Hsu, H. Dionne, and D. Bilder. 2004. 'Domains controlling cell polarity and proliferation in the Drosophila tumor suppressor Scribble', *J Cell Biol*, 167: 1137-46.
- Zeniou, M., T. Ding, E. Trivier, and A. Hanauer. 2002. 'Expression analysis of RSK gene family members: the RSK2 gene, mutated in Coffin-Lowry syndrome, is prominently expressed in brain structures essential for cognitive function and learning', *Hum Mol Genet*, 11: 2929-40.
- Zhan, L., A. Rosenberg, K. C. Bergami, M. Yu, Z. Xuan, A. B. Jaffe, C. Allred, and S. K. Muthuswamy. 2008. 'Deregulation of scribble promotes mammary tumorigenesis and reveals a role for cell polarity in carcinoma', *Cell*, 135: 865-78.
- Zhang, L., J. Cheng, Y. Ma, W. Thomas, J. Zhang, and J. Du. 2005. 'Dual pathways for nuclear factor kappaB activation by angiotensin II in vascular smooth muscle: phosphorylation of p65 by IkappaB kinase and ribosomal kinase', *Circ Res*, 97: 975-82.

- Zhang, L., Y. Ma, J. Zhang, J. Cheng, and J. Du. 2005. 'A new cellular signaling mechanism for angiotensin II activation of NF-kappaB: An IkappaB-independent, RSK-mediated phosphorylation of p65', *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 25: 1148-53.
- Zhang, P. X., Y. Wang, Y. Liu, G. Y. Jiang, Q. C. Li, and E. H. Wang. 2011. 'p120-catenin isoform 3 regulates subcellular localization of Kaiso and promotes invasion in lung cancer cells via a phosphorylation-dependent mechanism', *Int J Oncol*, 38: 1625-35.
- Zhang, Y., S. Yeh, B. A. Appleton, H. A. Held, P. J. Kausalya, D. C. Phua, W. L. Wong, L. A. Lasky, C. Wiesmann, W. Hunziker, and S. S. Sidhu. 2006. 'Convergent and divergent ligand specificity among PDZ domains of the LAP and zonula occludens (ZO) families', *J Biol Chem*, 281: 22299-311.
- Zhao, Y., C. Bjorbaek, S. Weremowicz, C. C. Morton, and D. E. Moller. 1995. 'RSK3 encodes a novel pp90rsk isoform with a unique N-terminal sequence: growth factor-stimulated kinase function and nuclear translocation', *Mol Cell Biol*, 15: 4353-63.
- Zheng, B., J. H. Jeong, J. M. Asara, Y. Y. Yuan, S. R. Granter, L. Chin, and L. C. Cantley. 2009. 'Oncogenic B-RAF negatively regulates the tumor suppressor LKB1 to promote melanoma cell proliferation', *Mol Cell*, 33: 237-47.
- Zhou, Y., N. Yamada, T. Tanaka, T. Hori, S. Yokoyama, Y. Hayakawa, S. Yano, J. Fukuoka, K. Koizumi, I. Saiki, and H. Sakurai. 2015. 'Crucial roles of RSK in cell motility by catalysing serine phosphorylation of EphA2', *Nat Commun*, 6: 7679.
- Zhu, J., J. Blenis, and J. Yuan. 2008. 'Activation of PI3K/Akt and MAPK pathways regulates Myc-mediated transcription by phosphorylating and promoting the degradation of Mad1', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105: 6584-9.
- Zhu, J., Q. Y. Li, J. L. Liu, W. Wei, H. W. Yang, and W. Tang. 2015. 'RSK4 knockdown promotes proliferation, migration and metastasis of human breast adenocarcinoma cells', *Oncol Rep*, 34: 3156-62.
- Zihni, C., C. Mills, K. Matter, and M. S. Balda. 2016. 'Tight junctions: from simple barriers to multifunctional molecular gates', *Nat Rev Mol Cell Biol*, 17: 564-80.
- Zimmermann, P., K. Meerschaert, G. Reekmans, I. Leenaerts, J. V. Small, J. Vandekerckhove, G. David, and J. Gettemans. 2002. 'PIP(2)-PDZ domain binding controls the association of syntenin with the plasma membrane', *Mol Cell*, 9: 1215-25.
- Zong, L., Y. Zhu, R. Liang, and H. B. Zhao. 2016. 'Gap junction mediated miRNA intercellular transfer and gene regulation: A novel mechanism for intercellular genetic communication', *Sci Rep*, 6: 19884.

Annexes

Dataset S1. BioID dataset from stable HEK293 Flp-In T-Rex cell lines expressing BirA*-RSK(1-4)

Bait	PreyGene	Spectral counts	Spectral Counts Sum (n=3)	Avg Spec Counts	Controls Spectral Counts	Avg(P) - SAINT Score	BFDR
RSK1	GOPC	35 94 51	180	60	0 0 0 0 0 0 0 0	1	0
RSK1	COPG1	18 18 18	54	18	4 3 3 3 4 3 3 2 2	1	0
RSK1	LTN1	18 12 11	41	13,67	2 0 2 3 0 0 0 0 0	1	0
RSK1	AP2A2	7 4 8	19	6,33	0 0 0 0 0 0 0 0 0	1	0
RSK1	AP2M1	11 3 5	19	6,33	0 0 0 0 0 0 0 0 0	1	0
RSK1	TAP1	9 9 0	18	6	0 0 0 0 0 0 0 0 0	1	0
RSK1	ARAF	4 4 6	14	4,67	0 0 0 0 0 0 0 0 0	1	0
RSK1	SNTB2	8 6 0	14	4,67	0 0 0 0 0 0 0 0 0	1	0
RSK1	DDX50	5 5 3	13	4,33	0 0 0 0 0 0 0 0 0	1	0
RSK1	AKT1	4 4 0	8	2,67	0 0 0 0 0 0 0 0 0	1	0
RSK1	DTNA	0 4 4	8	2,67	0 0 0 0 0 0 0 0 0	1	0
RSK1	FLOT2	3 4 3	10	3,33	0 0 0 0 0 0 0 0 0	0,99	0
RSK1	DOCK4	0 3 4	7	2,33	0 0 0 0 0 0 0 0 0	0,99	0
RSK1	GCLM	3 3 3	9	3	0 0 0 0 0 0 0 0 0	0,98	0
RSK1	TELO2	3 3 2	8	2,67	0 0 0 0 0 0 0 0 0	0,98	0
RSK1	TMEM97	3 3 2	8	2,67	0 0 0 0 0 0 0 0 0	0,98	0
RSK1	NCAPG2	3 3 0	6	2	0 0 0 0 0 0 0 0 0	0,98	0
RSK1	RAD21	3 3 0	6	2	0 0 0 0 0 0 0 0 0	0,98	0
RSK1	CDC45	5 0 2	7	2,33	0 0 0 0 0 0 0 0 0	0,93	0,01
RSK1	VPS52	5 2 0	7	2,33	0 0 0 0 0 0 0 0 0	0,93	0,01
RSK1	INF2	2 0 4	6	2	0 0 0 0 0 0 0 0 0	0,93	0,01
RSK1	MAP2K7	2 4 0	6	2	0 0 0 0 0 0 0 0 0	0,93	0,01
RSK1	MTPAP	2 4 0	6	2	0 0 0 0 0 0 0 0 0	0,93	0,01
RSK1	NCLN	4 0 2	6	2	0 0 0 0 0 0 0 0 0	0,93	0,01
RSK1	TUBB3	4 2 0	6	2	0 0 0 0 0 0 0 0 0	0,93	0,01
RSK1	AGPAT1	2 2 3	7	2,33	0 0 0 0 0 0 0 0 0	0,92	0,02
RSK1	DHX40	2 2 3	7	2,33	0 0 0 0 0 0 0 0 0	0,92	0,02
RSK1	ALG5	2 0 3	5	1,67	0 0 0 0 0 0 0 0 0	0,92	0,02
RSK1	FRS2	3 2 0	5	1,67	0 0 0 0 0 0 0 0 0	0,92	0,02
RSK1	LMF2	3 2 0	5	1,67	0 0 0 0 0 0 0 0 0	0,92	0,02
RSK1	MORC3	2 0 3	5	1,67	0 0 0 0 0 0 0 0 0	0,92	0,02
RSK1	PPM1F	7 6 7	20	6,67	2 0 0 0 0 0 0 0 0	0,91	0,03
RSK1	DNAJC11	7 2 7	16	5,33	2 0 0 0 0 0 0 0 0	0,91	0,03
RSK1	SLC16A1	16 12 5	33	11	6 3 0 2 0 2 0 0 0	0,9	0,03
RSK1	AP3M1	8 2 6	16	5,33	2 0 0 0 0 0 0 0 0	0,89	0,03
RSK1	ICMT	2 2 0	4	1,33	0 0 0 0 0 0 0 0 0	0,86	0,03

RSK1	KAT7	0 2 2	4	1,33	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	0,86	0,03
RSK1	LAGE3	2 0 2	4	1,33	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	0,86	0,03
RSK1	ORC5	2 0 2	4	1,33	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	0,86	0,03
RSK1	AP4B1	0 97 80	177	59	0 0 49 0 0 0 0 0 0 0	0,85	0,04
RSK2	GRSF1	16 11 14	41	13,67	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	1	0
RSK2	AP2A2	7 3 5	15	5	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	1	0
RSK2	MAPK1	6 6 0	12	4	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	1	0
RSK2	GTSE1	0 4 5	9	3	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	1	0
RSK2	LTN1	13 11 8	32	10,67	2 0 2 3 0 0 0 0 0 0	0,99	0
RSK2	DOCK4	3 2 5	10	3,33	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	0,99	0
RSK2	NME2	0 3 7	10	3,33	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	0,99	0
RSK2	CDC37	13 16 16	45	15	0 0 0 0 0 0 4 0 0 0	0,96	0
RSK2	SCRIB	60 28 35	123	41	14 0 2 3 0 3 0 0 0 0	0,95	0,01
RSK2	AP2M1	7 2 2	11	3,67	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	0,93	0,01
RSK2	CSNK2A2	5 0 2	7	2,33	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	0,93	0,01
RSK2	ARHGEF12	2 0 4	6	2	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	0,93	0,01
RSK2	FRS2	4 0 2	6	2	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	0,93	0,01
RSK2	KDEL2	2 4 0	6	2	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	0,93	0,01
RSK2	RPL37	0 2 4	6	2	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	0,93	0,01
RSK2	UTP18	0 2 4	6	2	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	0,93	0,01
RSK2	AGPAT1	3 0 2	5	1,67	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	0,92	0,02
RSK2	GTPBP1	3 0 2	5	1,67	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	0,92	0,02
RSK2	LMF2	2 0 3	5	1,67	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	0,92	0,02
RSK2	CTBP1	2 2 0	4	1,33	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	0,86	0,03
RSK2	GGA2	0 2 2	4	1,33	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	0,86	0,03
RSK2	SFXN2	0 2 2	4	1,33	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	0,86	0,03
RSK2	UBE2D3	2 2 0	4	1,33	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	0,86	0,03
RSK3	IRS4	148 194 251	593	197,67	42 26 12 24 34 25 13 20 21	1	0
RSK3	GRSF1	201 164 193	558	186	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	1	0
RSK3	MAPK1	49 49 51	149	49,67	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	1	0
RSK3	KIF1A	53 37 32	122	40,67	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	1	0
RSK3	NAP1L1	40 40 33	113	37,67	10 10 6 10 5 10 8 0 0	1	0
RSK3	VANGL1	33 36 36	105	35	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	1	0
RSK3	SLC4A7	29 29 39	97	32,33	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	1	0
RSK3	IPO7	37 34 23	94	31,33	6 3 5 2 2 2 4 0 0	1	0
RSK3	MAPK3	30 27 33	90	30	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	1	0
RSK3	SLC3A2	28 32 24	84	28	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	1	0
RSK3	DSG2	31 18 28	77	25,67	6 0 2 3 0 2 0 0 0 0	1	0
RSK3	EPHA2	26 21 26	73	24,33	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	1	0
RSK3	SLC1A5	13 23 25	61	20,33	3 0 0 0 0 0 3 0 0 0	1	0

RSK3	SLC12A2	17 22 21	60	20	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	1	0
RSK3	YKT6	15 19 24	58	19,33	0 2 0 0 0 0 0 0 0 0	1	0
RSK3	BBS1	41 15 0	56	18,67	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	1	0
RSK3	NAP1L4	18 20 18	56	18,67	0 3 0 0 2 4 0 0 0 0	1	0
RSK3	CTNND1	21 17 12	50	16,67	2 0 0 0 0 0 0 0 0 0	1	0
RSK3	VANGL2	12 13 15	40	13,33	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	1	0
RSK3	SNAP23	10 18 11	39	13	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	1	0
RSK3	IPO9	9 18 8	35	11,67	2 2 0 0 0 0 0 0 0 0	1	0
RSK3	GOPC	12 13 7	32	10,67	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	1	0
RSK3	FAM21C	11 8 11	30	10	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	1	0
RSK3	AHCYL1	6 8 14	28	9,33	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	1	0
RSK3	CXADR	13 7 7	27	9	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	1	0
RSK3	ITGB1	9 10 8	27	9	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	1	0
RSK3	SBF1	13 3 10	26	8,67	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	1	0
RSK3	PPP2R5D	13 4 7	24	8	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	1	0
RSK3	NME2	10 6 7	23	7,67	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	1	0
RSK3	CPD	11 7 4	22	7,33	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	1	0
RSK3	PKP4	3 7 12	22	7,33	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	1	0
RSK3	SLC6A8	10 7 5	22	7,33	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	1	0
RSK3	WDR6	12 5 5	22	7,33	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	1	0
RSK3	YES1	9 5 8	22	7,33	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	1	0
RSK3	NOTCH2	8 3 10	21	7	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	1	0
RSK3	FLOT2	6 7 7	20	6,67	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	1	0
RSK3	STEAP3	7 9 4	20	6,67	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	1	0
RSK3	DOCK4	9 4 6	19	6,33	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	1	0
RSK3	IPO8	10 3 6	19	6,33	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	1	0
RSK3	THUMPD3	12 4 3	19	6,33	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	1	0
RSK3	SLC38A2	7 7 4	18	6	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	1	0
RSK3	MCAM	8 2 7	17	5,67	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	1	0
RSK3	FERMT2	6 7 3	16	5,33	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	1	0
RSK3	PIK3R1	6 5 5	16	5,33	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	1	0
RSK3	SLC38A1	4 8 4	16	5,33	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	1	0
RSK3	SLC6A15	7 4 5	16	5,33	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	1	0
RSK3	PEX5	8 0 7	15	5	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	1	0
RSK3	DVL1	6 3 5	14	4,67	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	1	0
RSK3	NISCH	5 6 3	14	4,67	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	1	0
RSK3	OCLN	7 4 3	14	4,67	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	1	0
RSK3	AHCYL2	7 6 0	13	4,33	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	1	0
RSK3	VAMP3	6 4 3	13	4,33	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	1	0
RSK3	BYSL	5 4 3	12	4	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	1	0

RSK3	RICTOR	2 6 4	12	4	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	1	0
RSK3	LTV1	5 0 4	9	3	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	1	0
RSK3	MARCKSL1	0 4 5	9	3	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	1	0
RSK3	ROR2	4 0 4	8	2,67	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	1	0
RSK3	YTHDF1	4 0 4	8	2,67	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	1	0
RSK3	NAT10	23 10 19	52	17,33	6 6 4 0 3 3 2 0 0 0	0,99	0
RSK3	ADD3	14 14 10	38	12,67	2 4 0 4 0 2 0 0 0 0	0,99	0
RSK3	LTN1	17 11 6	34	11,33	2 0 2 3 0 0 0 0 0 0	0,99	0
RSK3	AP2M1	5 3 2	10	3,33	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	0,99	0
RSK3	GTSE1	2 5 3	10	3,33	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	0,99	0
RSK3	ZCCHC3	2 3 5	10	3,33	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	0,99	0
RSK3	CAV1	2 3 4	9	3	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	0,99	0
RSK3	EFR3A	4 0 3	7	2,33	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	0,99	0
RSK3	MPP7	3 0 4	7	2,33	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	0,99	0
RSK3	MTPAP	3 4 0	7	2,33	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	0,99	0
RSK3	PIK3R2	3 4 0	7	2,33	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	0,99	0
RSK3	PPP6R2	0 3 4	7	2,33	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	0,99	0
RSK3	TSR1	4 0 3	7	2,33	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	0,99	0
RSK3	ECD	26 16 24	66	22	7 8 8 0 2 5 0 0 0 0	0,98	0
RSK3	FRS2	3 0 3	6	2	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	0,98	0
RSK3	NCAPG2	3 0 3	6	2	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	0,98	0
RSK3	MARCKS	8 6 12	26	8,67	0 0 0 0 0 0 2 0 0 0	0,97	0
RSK3	KIRREL	7 0 2	9	3	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	0,93	0,01
RSK3	MACF1	2 4 2	8	2,67	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	0,93	0,01
RSK3	PPFIBP1	4 2 2	8	2,67	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	0,93	0,01
RSK3	SRPR	2 2 4	8	2,67	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	0,93	0,01
RSK3	ATP1B3	5 0 2	7	2,33	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	0,93	0,01
RSK3	CSNK2A2	5 0 2	7	2,33	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	0,93	0,01
RSK3	IBTK	2 5 0	7	2,33	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	0,93	0,01
RSK3	LPHN2	5 0 2	7	2,33	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	0,93	0,01
RSK3	MPP1	5 0 2	7	2,33	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	0,93	0,01
RSK3	ABI1	4 0 2	6	2	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	0,93	0,01
RSK3	MTMR1	4 0 2	6	2	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	0,93	0,01
RSK3	PAK4	0 2 4	6	2	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	0,93	0,01
RSK3	PANX1	4 2 0	6	2	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	0,93	0,01
RSK3	UPF1	4 2 0	6	2	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	0,93	0,01
RSK3	PVRL2	2 3 2	7	2,33	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	0,92	0,02
RSK3	CD99	2 0 3	5	1,67	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	0,92	0,02
RSK3	CDC42BPB	2 0 3	5	1,67	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	0,92	0,02
RSK3	CDCA3	3 0 2	5	1,67	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	0,92	0,02

RSK3	CSNK2B	2 0 3	5	1,67	0 0 0 0 0 0 0 0 0	0,92	0,02
RSK3	PLEKHA5	2 0 3	5	1,67	0 0 0 0 0 0 0 0 0	0,92	0,02
RSK3	SDCCAG3	3 0 2	5	1,67	0 0 0 0 0 0 0 0 0	0,92	0,02
RSK3	SLC39A10	2 3 0	5	1,67	0 0 0 0 0 0 0 0 0	0,92	0,02
RSK3	STXBP3	0 2 3	5	1,67	0 0 0 0 0 0 0 0 0	0,92	0,02
RSK3	VPS52	2 3 0	5	1,67	0 0 0 0 0 0 0 0 0	0,92	0,02
RSK3	SCRIB	42 22 30	94	31,33	14 0 2 3 0 3 0 0 0	0,88	0,03
RSK3	RANBP6	2 2 2	6	2	0 0 0 0 0 0 0 0 0	0,86	0,03
RSK3	TELO2	2 2 2	6	2	0 0 0 0 0 0 0 0 0	0,86	0,03
RSK3	AGPAT1	2 0 2	4	1,33	0 0 0 0 0 0 0 0 0	0,86	0,03
RSK3	ALG5	0 2 2	4	1,33	0 0 0 0 0 0 0 0 0	0,86	0,03
RSK3	BCOR	2 0 2	4	1,33	0 0 0 0 0 0 0 0 0	0,86	0,03
RSK3	CLPTM1L	2 0 2	4	1,33	0 0 0 0 0 0 0 0 0	0,86	0,03
RSK3	EFHD1	0 2 2	4	1,33	0 0 0 0 0 0 0 0 0	0,86	0,03
RSK3	ELMO2	2 0 2	4	1,33	0 0 0 0 0 0 0 0 0	0,86	0,03
RSK3	EPB41L4B	2 0 2	4	1,33	0 0 0 0 0 0 0 0 0	0,86	0,03
RSK3	HAUS1	0 2 2	4	1,33	0 0 0 0 0 0 0 0 0	0,86	0,03
RSK3	KPNA3	2 2 0	4	1,33	0 0 0 0 0 0 0 0 0	0,86	0,03
RSK3	MAP2K7	0 2 2	4	1,33	0 0 0 0 0 0 0 0 0	0,86	0,03
RSK3	SLC7A5	2 2 0	4	1,33	0 0 0 0 0 0 0 0 0	0,86	0,03
RSK3	STK39	2 2 0	4	1,33	0 0 0 0 0 0 0 0 0	0,86	0,03
RSK3	SUDS3	2 2 0	4	1,33	0 0 0 0 0 0 0 0 0	0,86	0,03
RSK3	TUBB3	2 2 0	4	1,33	0 0 0 0 0 0 0 0 0	0,86	0,03
RSK4	GGA2	34 26 33	93	31	0 0 0 0 0 0 0 0 0	1	0
RSK4	LTN1	33 24 13	70	23,33	2 0 2 3 0 0 0 0 0	1	0
RSK4	MAPK1	13 0 4	17	5,67	0 0 0 0 0 0 0 0 0	1	0
RSK4	MAPK3	7 3 5	15	5	0 0 0 0 0 0 0 0 0	1	0
RSK4	GRSF1	4 2 6	12	4	0 0 0 0 0 0 0 0 0	1	0
RSK4	FLOT2	3 4 0	7	2,33	0 0 0 0 0 0 0 0 0	0,99	0
RSK4	RGPD1	3 0 2	5	1,67	0 0 0 0 0 0 0 0 0	0,92	0,02
RSK4	DLAT	2 2 0	4	1,33	0 0 0 0 0 0 0 0 0	0,86	0,03
RSK4	SMN2	2 2 0	4	1,33	0 0 0 0 0 0 0 0 0	0,86	0,03
RSK4	TRIM33	2 0 2	4	1,33	0 0 0 0 0 0 0 0 0	0,86	0,03

p120CtnWT	RRM2	2 3 3	8	2,67	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	0,98	0
p120CtnWT	SIPA1L1	0 3 3	6	2	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	0,98	0
p120CtnWT	USP6NL	0 3 3	6	2	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	0,98	0
p120CtnWT	PARD3	9 11 14	34	11,33	3 0 0 0 0 0 0 0 0 0	0,97	0
p120CtnWT	ALMS1	0 2 7	9	3	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	0,95	0
p120CtnWT	CAMSAP3	2 0 4	6	2	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	0,95	0,01
p120CtnWT	CCDC88C	0 4 2	6	2	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	0,95	0,01
p120CtnWT	DCP1B	0 4 2	6	2	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	0,95	0,01
p120CtnWT	EPHA2	2 3 2	7	2,33	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	0,95	0,01
p120CtnWT	HSPA4L	2 0 5	7	2,33	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	0,95	0,01
p120CtnWT	IRS2	2 5 2	9	3	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	0,95	0,01
p120CtnWT	LZTS2	2 0 4	6	2	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	0,95	0,01
p120CtnWT	MAGI1	2 3 0	5	1,67	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	0,95	0,01
p120CtnWT	MARK3	0 2 3	5	1,67	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	0,95	0,01
p120CtnWT	PAK4	2 0 5	7	2,33	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	0,95	0,01
p120CtnWT	PDZD11	2 2 4	8	2,67	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	0,95	0,01
p120CtnWT	RASSF8	2 0 3	5	1,67	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	0,95	0,01
p120CtnWT	RUFY1	2 0 4	6	2	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	0,95	0,01
p120CtnWT	SNAP23	3 2 2	7	2,33	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	0,95	0,01
p120CtnWT	SOGA1	3 0 2	5	1,67	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	0,95	0,01
p120CtnWT	TACC3	2 2 3	7	2,33	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	0,95	0,01
p120CtnWT	TANC1	2 0 3	5	1,67	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	0,95	0,01
p120CtnWT	TNRC6A	2 0 4	6	2	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	0,95	0,01
p120CtnWT	UPF1	2 3 0	5	1,67	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	0,95	0,01
p120CtnWT	WDR62	3 2 0	5	1,67	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	0,95	0,01
p120CtnWT	ABLIM1	2 0 2	4	1,33	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	0,91	0,02
p120CtnWT	CCP110	2 2 0	4	1,33	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	0,91	0,02
p120CtnWT	CNOT3	2 0 2	4	1,33	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	0,91	0,02
p120CtnWT	CYLD	0 2 2	4	1,33	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	0,91	0,02
p120CtnWT	FXR2	0 2 2	4	1,33	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	0,91	0,02
p120CtnWT	KDELRL2	2 2 2	6	2	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	0,91	0,02
p120CtnWT	NUMB	2 0 2	4	1,33	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	0,91	0,02
p120CtnWT	NUP88	2 2 0	4	1,33	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	0,91	0,02
p120CtnWT	PDLIM7	2 0 2	4	1,33	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	0,91	0,02
p120CtnWT	PEAK1	0 2 2	4	1,33	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	0,91	0,02
p120CtnWT	PFDN6	2 2 0	4	1,33	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	0,91	0,02
p120CtnWT	PIK3C3	2 2 0	4	1,33	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	0,91	0,02
p120CtnWT	SRPRA	0 2 2	4	1,33	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	0,91	0,02
p120CtnWT	STRN4	2 0 2	4	1,33	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	0,91	0,02
p120CtnWT	TXLNA	2 2 2	6	2	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	0,91	0,02

p120CtnWT	BUB1B	5 4 10	19	6,33	0 0 2 0 2 0 0 0 0	0,84	0,04
p120CtnWT	AP3M1	5 5 0	10	3,33	2 0 0 0 0 0 0 0 0	0,79	0,04
p120CtnWT	ANKHD1	5 5 8	18	6	0 0 0 0 3 0 0 0 0	0,71	0,05
p120CtnWT	SCRIB	26 15 24	65	21,67	14 0 2 2 0 0 0 0 0	0,71	0,05
p120CtnWT	TNIP1	4 5 4	13	4,33	0 0 0 0 2 0 0 0 0	0,71	0,04
p120CtnWT	TNRC6B	0 5 16	21	7	0 4 0 0 0 0 0 0 0	0,71	0,04
p120CtnWT	HAUS5	10 5 8	23	7,67	5 0 0 0 0 0 0 0 0	0,7	0,05
p120CtnWT	KIAA1671	0 5 7	12	4	3 0 0 0 0 0 0 0 0	0,68	0,05
p120CtnWT	LRRC49	6 0 3	9	3	2 0 0 0 0 0 0 0 0	0,67	0,05
p120CtnWT	ESYT2	4 4 4	12	4	2 0 0 0 0 0 0 0 0	0,64	0,05
p120CtnWT	SPTAN1	8 5 3	16	5,33	2 0 0 0 0 0 3 0 0	0,6	0,06
p120CtnWT	GEMIN4	4 6 3	13	4,33	0 0 0 0 0 0 3 0 0	0,57	0,07
p120CtnWT	ARHGEF2	5 7 5	17	5,67	4 0 0 0 0 0 0 0 0	0,56	0,07
p120CtnWT	SLC25A4	14 13 14	41	13,67	0 2 0 9 0 0 0 0 0	0,56	0,08
p120CtnWT	APC	3 2 4	9	3	2 0 0 0 0 0 0 0 0	0,54	0,08
p120CtnWT	ATXN2	3 4 3	10	3,33	0 0 0 0 2 0 0 0 0	0,54	0,08
p120CtnWT	CNOT10	3 3 4	10	3,33	2 0 0 0 0 0 0 0 0	0,54	0,08
p120CtnWT	FXR1	3 0 4	7	2,33	0 0 0 2 0 0 0 0 0	0,54	0,08
p120CtnWT	LSM12	3 3 4	10	3,33	0 0 2 0 0 0 0 0 0	0,54	0,08
p120CtnWT	AIFM1	11 28 11	50	16,67	7 0 0 2 5 0 2 0 0	0,52	0,09
p120CtnWT	KANK2	2 0 5	7	2,33	2 0 0 0 0 0 0 0 0	0,52	0,09
p120CtnWT	MARCKS	2 5 0	7	2,33	0 0 0 0 0 0 2 0 0	0,52	0,09
p120CtnS320A	ACTA1	13 15 0	28	9,33	0 0 0 0 0 0 0 0 0	1	0
p120CtnS320A	ANK3	41 42 36	119	39,67	3 0 0 0 0 0 0 0 0	1	0
p120CtnS320A	ARHGAP21	15 10 11	36	12	2 0 0 2 2 0 0 0 0	1	0
p120CtnS320A	CCDC85C	19 22 19	60	20	0 0 0 3 0 0 0 0 0	1	0
p120CtnS320A	CDH2	7 7 4	18	6	0 0 0 0 0 0 0 0 0	1	0
p120CtnS320A	CTNNA1	19 10 20	49	16,33	0 0 0 0 0 0 0 0 0	1	0
p120CtnS320A	CTNNA2	7 5 8	20	6,67	0 0 0 0 0 0 0 0 0	1	0
p120CtnS320A	CTNNB1	25 20 20	65	21,67	0 0 0 0 0 0 0 0 0	1	0
p120CtnS320A	DDX20	5 5 5	15	5	0 0 0 0 0 0 0 0 0	1	0
p120CtnS320A	DLG1	13 5 9	27	9	0 0 0 2 2 0 0 0 0	1	0
p120CtnS320A	DLG5	6 5 10	21	7	0 0 0 0 0 0 0 0 0	1	0
p120CtnS320A	DVL1	6 0 5	11	3,67	0 0 0 0 0 0 0 0 0	1	0
p120CtnS320A	EPHA2	5 6 7	18	6	0 0 0 0 0 0 0 0 0	1	0
p120CtnS320A	ERBIN	41 25 35	101	33,67	4 9 5 0 0 0 0 0 0	1	0
p120CtnS320A	FLOT2	6 5 3	14	4,67	0 0 0 0 0 0 0 0 0	1	0
p120CtnS320A	GPRIN1	7 6 8	21	7	0 0 0 0 0 0 0 0 0	1	0
p120CtnS320A	HAUS1	3 4 4	11	3,67	0 0 0 0 0 0 0 0 0	1	0
p120CtnS320A	HIST2H2AA4	8 12 0	20	6,67	0 0 0 0 0 0 0 0 0	1	0

p120CtnS320A	IFT74	4 4 3	11	3,67	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	1	0
p120CtnS320A	KIAA1217	16 13 7	36	12	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	1	0
p120CtnS320A	KLC2	5 4 3	12	4	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	1	0
p120CtnS320A	LPP	5 4 2	11	3,67	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	1	0
p120CtnS320A	PDZD11	4 3 4	11	3,67	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	1	0
p120CtnS320A	PLEKHA5	27 21 20	68	22,67	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	1	0
p120CtnS320A	PLEKHA7	28 17 19	64	21,33	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	1	0
p120CtnS320A	PPP1R13B	23 19 26	68	22,67	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	1	0
p120CtnS320A	RASSF8	4 2 4	10	3,33	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	1	0
p120CtnS320A	SPTBN1	6 7 0	13	4,33	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	1	0
p120CtnS320A	TJP1	34 26 22	82	27,33	4 9 7 5 0 0 0 0 0 0	1	0
p120CtnS320A	TP53BP2	22 20 13	55	18,33	0 2 0 0 0 0 0 0 0 0	1	0
p120CtnS320A	TUBA1A	118 130 0	248	82,67	20 11 7 32 0 0 0 22 16	1	0
p120CtnS320A	TUBB2A	0 81 46	127	42,33	0 0 3 0 0 2 0 0 0 0	1	0
p120CtnS320A	YTHDF1	4 3 5	12	4	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	1	0
p120CtnS320A	YWHAH	5 3 5	13	4,33	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	1	0
p120CtnS320A	ALMS1	4 0 3	7	2,33	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	0,99	0
p120CtnS320A	CEP192	4 0 3	7	2,33	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	0,99	0
p120CtnS320A	LRRC49	5 9 10	24	8	2 0 0 0 0 0 0 0 0 0	0,99	0
p120CtnS320A	NEFL	4 0 3	7	2,33	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	0,99	0
p120CtnS320A	PKP4	3 3 4	10	3,33	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	0,99	0
p120CtnS320A	SIPA1L3	6 3 3	12	4	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	0,99	0
p120CtnS320A	SORBS1	5 3 0	8	2,67	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	0,99	0
p120CtnS320A	FHL3	2 3 3	8	2,67	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	0,98	0
p120CtnS320A	YTHDF2	3 3 3	9	3	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	0,98	0
p120CtnS320A	NCKAP1	9 6 10	25	8,33	3 0 0 0 0 0 0 0 0 2	0,97	0
p120CtnS320A	PARD3	9 10 18	37	12,33	3 0 0 0 0 0 0 0 0 0	0,96	0
p120CtnS320A	AFG3L2	5 2 0	7	2,33	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	0,95	0,01
p120CtnS320A	CHMP2B	2 0 3	5	1,67	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	0,95	0,01
p120CtnS320A	COQ8A	2 4 0	6	2	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	0,95	0,01
p120CtnS320A	FXR2	2 0 3	5	1,67	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	0,95	0,01
p120CtnS320A	IDH3B	2 3 0	5	1,67	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	0,95	0,01
p120CtnS320A	IRS2	2 2 3	7	2,33	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	0,95	0,01
p120CtnS320A	JCAD	2 0 4	6	2	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	0,95	0,01
p120CtnS320A	MCU	3 0 2	5	1,67	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	0,95	0,01
p120CtnS320A	NUMB	2 2 3	7	2,33	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	0,95	0,01
p120CtnS320A	PCNT	4 2 2	8	2,67	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	0,95	0,01
p120CtnS320A	PDCD6	2 3 0	5	1,67	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	0,95	0,01
p120CtnS320A	PLCH1	5 0 2	7	2,33	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	0,95	0,01
p120CtnS320A	RPL35	2 4 0	6	2	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	0,95	0,01

p120CtnS320A	SNAP23	2 2 3	7	2,33	0 0 0 0 0 0 0 0 0	0,95	0,01
p120CtnS320A	TRIOBP	0 2 3	5	1,67	0 0 0 0 0 0 0 0 0	0,95	0,01
p120CtnS320A	UPF1	2 4 0	6	2	0 0 0 0 0 0 0 0 0	0,95	0,01
p120CtnS320A	VANGL1	2 5 0	7	2,33	0 0 0 0 0 0 0 0 0	0,95	0,01
p120CtnS320A	ERC1	13 12 13	38	12,67	5 3 0 2 3 0 0 0 0	0,94	0,02
p120CtnS320A	ANAPC7	0 2 2	4	1,33	0 0 0 0 0 0 0 0 0	0,91	0,02
p120CtnS320A	BOLA2	2 0 2	4	1,33	0 0 0 0 0 0 0 0 0	0,91	0,02
p120CtnS320A	CAMSAP3	2 2 0	4	1,33	0 0 0 0 0 0 0 0 0	0,91	0,02
p120CtnS320A	CCP110	0 2 2	4	1,33	0 0 0 0 0 0 0 0 0	0,91	0,02
p120CtnS320A	DCP1B	0 2 2	4	1,33	0 0 0 0 0 0 0 0 0	0,91	0,02
p120CtnS320A	DDX56	0 2 2	4	1,33	0 0 0 0 0 0 0 0 0	0,91	0,02
p120CtnS320A	DNAAF5	2 2 0	4	1,33	0 0 0 0 0 0 0 0 0	0,91	0,02
p120CtnS320A	HAX1	2 2 0	4	1,33	0 0 0 0 0 0 0 0 0	0,91	0,02
p120CtnS320A	LUZP1	2 0 2	4	1,33	0 0 0 0 0 0 0 0 0	0,91	0,02
p120CtnS320A	MARK3	2 0 2	4	1,33	0 0 0 0 0 0 0 0 0	0,91	0,02
p120CtnS320A	NUP88	2 0 2	4	1,33	0 0 0 0 0 0 0 0 0	0,91	0,02
p120CtnS320A	PLEKHA6	2 2 0	4	1,33	0 0 0 0 0 0 0 0 0	0,91	0,02
p120CtnS320A	RRM2	2 2 0	4	1,33	0 0 0 0 0 0 0 0 0	0,91	0,02
p120CtnS320A	SHKBP1	2 0 2	4	1,33	0 0 0 0 0 0 0 0 0	0,91	0,02
p120CtnS320A	SNTB2	0 2 2	4	1,33	0 0 0 0 0 0 0 0 0	0,91	0,02
p120CtnS320A	SPC24	2 2 0	4	1,33	0 0 0 0 0 0 0 0 0	0,91	0,02
p120CtnS320A	SRPRA	2 2 0	4	1,33	0 0 0 0 0 0 0 0 0	0,91	0,02
p120CtnS320A	USP6NL	0 2 2	4	1,33	0 0 0 0 0 0 0 0 0	0,91	0,02
p120CtnS320A	TUBB4A	62 77 0	139	46,33	9 4 6 0 0 0 29 0 0	0,9	0,03
p120CtnS320A	SLC25A4	20 0 20	40	13,33	0 2 0 9 0 0 0 0 0	0,84	0,04
p120CtnS320A	SCRIB	33 24 26	83	27,67	14 0 2 2 0 0 0 0 0	0,83	0,04
p120CtnS320A	AP3M1	4 4 7	15	5	2 0 0 0 0 0 0 0 0	0,79	0,04
p120CtnS320A	ESYT2	5 2 5	12	4	2 0 0 0 0 0 0 0 0	0,79	0,04
p120CtnS320A	UTRN	50 33 32	115	38,33	19 4 3 2 0 0 0 0 0	0,75	0,04
p120CtnS320A	ANKHD1	6 7 6	19	6,33	0 0 0 0 3 0 0 0 0	0,74	0,04
p120CtnS320A	INA	5 4 0	9	3	0 0 2 0 0 0 0 0 0	0,71	0,04
p120CtnS320A	ARHGEF2	6 7 2	15	5	4 0 0 0 0 0 0 0 0	0,62	0,06
p120CtnS320A	GEMIN4	4 3 7	14	4,67	0 0 0 0 0 0 3 0 0	0,62	0,06
p120CtnS320A	PCNA	3 5 3	11	3,67	0 0 0 2 0 0 0 0 0	0,62	0,06
p120CtnS320A	HAUS5	5 6 10	21	7	5 0 0 0 0 0 0 0 0	0,61	0,06
p120CtnS320A	MARCKS	2 7 0	9	3	0 0 0 0 0 0 2 0 0	0,6	0,06
p120CtnS320A	ANK2	11 10 0	21	7	6 0 0 0 2 0 0 0 0	0,59	0,07
p120CtnS320A	SMC3	24 17 9	50	16,67	9 6 0 5 4 0 0 5 0	0,58	0,07
p120CtnS320A	AIFM1	19 11 12	42	14	7 0 0 2 5 0 2 0 0	0,57	0,07
p120CtnS320A	XPO7	2 6 0	8	2,67	2 0 0 0 0 0 0 0 0	0,57	0,07

p120CtnS320A	APC	3 4 0	7	2,33	2 0 0 0 0 0 0 0 0	0,54	0,08
p120CtnS320A	KANK2	4 2 3	9	3	2 0 0 0 0 0 0 0 0	0,54	0,08
p120CtnS320A	LSM12	4 3 3	10	3,33	0 0 2 0 0 0 0 0 0	0,54	0,08
p120CtnS320A	TMEM33	2 3 4	9	3	2 0 0 0 0 0 0 0 0	0,54	0,08
p120CtnS320A	TNIP1	4 3 3	10	3,33	0 0 0 0 2 0 0 0 0	0,54	0,08
p120CtnS320A	VDAC2	6 9 4	19	6,33	2 0 0 0 0 0 4 0 0	0,53	0,09
p120CtnS320A	COG7	0 2 5	7	2,33	2 0 0 0 0 0 0 0 0	0,52	0,09
p120CtnS320A	KIAA1671	4 2 5	11	3,67	3 0 0 0 0 0 0 0 0	0,52	0,1
p120CtnS320A	EIF3C	7 6 6	19	6,33	0 0 0 0 5 0 0 0 0	0,51	0,1
p120ctnS320D	ACTA1	14 9 9	32	10,67	0 0 0 0 0 0 0 0 0	1	0
p120ctnS320D	AIFM1	20 19 13	52	17,33	7 0 0 2 5 0 2 0 0	1	0
p120ctnS320D	ANK3	52 47 47	146	48,67	3 0 0 0 0 0 0 0 0	1	0
p120ctnS320D	CCDC85C	25 22 25	72	24	0 0 0 3 0 0 0 0 0	1	0
p120ctnS320D	CDH2	8 3 5	16	5,33	0 0 0 0 0 0 0 0 0	1	0
p120ctnS320D	CTNNA1	14 7 16	37	12,33	0 0 0 0 0 0 0 0 0	1	0
p120ctnS320D	CTNNB1	22 11 18	51	17	0 0 0 0 0 0 0 0 0	1	0
p120ctnS320D	DDX20	4 0 4	8	2,67	0 0 0 0 0 0 0 0 0	1	0
p120ctnS320D	DVL1	3 4 5	12	4	0 0 0 0 0 0 0 0 0	1	0
p120ctnS320D	EIF4ENIF1	2 7 10	19	6,33	0 0 0 0 0 0 0 0 0	1	0
p120ctnS320D	ERBIN	26 17 33	76	25,33	4 9 5 0 0 0 0 0 0	1	0
p120ctnS320D	FLOT2	5 5 0	10	3,33	0 0 0 0 0 0 0 0 0	1	0
p120ctnS320D	HIST2H2AA4	8 9 6	23	7,67	0 0 0 0 0 0 0 0 0	1	0
p120ctnS320D	MYCBP2	12 23 53	88	29,33	0 0 0 0 0 0 0 0 0	1	0
p120ctnS320D	PLEKHA5	20 12 17	49	16,33	0 0 0 0 0 0 0 0 0	1	0
p120ctnS320D	PLEKHA7	17 9 18	44	14,67	0 0 0 0 0 0 0 0 0	1	0
p120ctnS320D	PPP1R13B	27 16 28	71	23,67	0 0 0 0 0 0 0 0 0	1	0
p120ctnS320D	SORBS1	7 4 0	11	3,67	0 0 0 0 0 0 0 0 0	1	0
p120ctnS320D	TP53BP2	22 16 18	56	18,67	0 2 0 0 0 0 0 0 0	1	0
p120ctnS320D	AGO2	0 3 4	7	2,33	0 0 0 0 0 0 0 0 0	0,99	0
p120ctnS320D	ALMS1	3 2 5	10	3,33	0 0 0 0 0 0 0 0 0	0,99	0
p120ctnS320D	GPRIN1	3 2 4	9	3	0 0 0 0 0 0 0 0 0	0,99	0
p120ctnS320D	KIAA1217	10 2 3	15	5	0 0 0 0 0 0 0 0 0	0,99	0
p120ctnS320D	NKRF	2 3 4	9	3	0 0 0 0 0 0 0 0 0	0,99	0
p120ctnS320D	PDZD11	3 0 7	10	3,33	0 0 0 0 0 0 0 0 0	0,99	0
p120ctnS320D	RPL26L1	2 3 5	10	3,33	0 0 0 0 0 0 0 0 0	0,99	0
p120ctnS320D	SH3GLB2	9 14 17	40	13,33	0 0 0 0 3 0 0 0 0	0,99	0
p120ctnS320D	SIPA1L3	4 2 3	9	3	0 0 0 0 0 0 0 0 0	0,99	0
p120ctnS320D	CEP192	3 0 3	6	2	0 0 0 0 0 0 0 0 0	0,98	0
p120ctnS320D	LPP	3 2 3	8	2,67	0 0 0 0 0 0 0 0 0	0,98	0
p120ctnS320D	NUP188	7 7 0	14	4,67	2 2 0 0 0 0 0 0 0	0,98	0

p120ctnS320D	UPF1	0 3 3	6	2	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	0,98	0
p120ctnS320D	LSM14A	6 6 14	26	8,67	0 2 0 0 2 0 0 0 0 0	0,96	0
p120ctnS320D	AFG3L2	3 2 0	5	1,67	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	0,95	0,01
p120ctnS320D	AKT2	0 3 2	5	1,67	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	0,95	0,01
p120ctnS320D	CNOT3	0 3 2	5	1,67	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	0,95	0,01
p120ctnS320D	COQ8A	0 3 2	5	1,67	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	0,95	0,01
p120ctnS320D	DLG1	6 4 7	17	5,67	0 0 0 2 2 0 0 0 0 0	0,95	0,01
p120ctnS320D	EPHA2	3 2 0	5	1,67	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	0,95	0,01
p120ctnS320D	FBXO45	0 2 3	5	1,67	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	0,95	0,01
p120ctnS320D	FYTTD1	0 3 2	5	1,67	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	0,95	0,01
p120ctnS320D	HAUS1	2 3 0	5	1,67	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	0,95	0,01
p120ctnS320D	IRS2	3 2 2	7	2,33	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	0,95	0,01
p120ctnS320D	KLC2	4 0 2	6	2	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	0,95	0,01
p120ctnS320D	NXF1	0 2 3	5	1,67	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	0,95	0,01
p120ctnS320D	PKP4	4 2 0	6	2	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	0,95	0,01
p120ctnS320D	PLCH1	2 0 3	5	1,67	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	0,95	0,01
p120ctnS320D	RRM2	2 2 3	7	2,33	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	0,95	0,01
p120ctnS320D	SHKBP1	2 2 4	8	2,67	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	0,95	0,01
p120ctnS320D	SIPA1L1	2 0 4	6	2	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	0,95	0,01
p120ctnS320D	TCHP	0 2 3	5	1,67	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	0,95	0,01
p120ctnS320D	UFL1	2 3 0	5	1,67	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	0,95	0,01
p120ctnS320D	LRRC49	5 6 13	24	8	2 0 0 0 0 0 0 0 0 0	0,94	0,02
p120ctnS320D	AHCYL2	2 0 2	4	1,33	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	0,91	0,02
p120ctnS320D	ARAF	0 2 2	4	1,33	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	0,91	0,02
p120ctnS320D	IFT74	0 2 2	4	1,33	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	0,91	0,02
p120ctnS320D	KDEL2	0 2 2	4	1,33	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	0,91	0,02
p120ctnS320D	SKP1	0 2 2	4	1,33	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	0,91	0,02
p120ctnS320D	SPC24	2 2 0	4	1,33	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	0,91	0,02
p120ctnS320D	VANGL1	2 2 0	4	1,33	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	0,91	0,02
p120ctnS320D	WDR62	2 0 2	4	1,33	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	0,91	0,02
p120ctnS320D	AP3M1	3 5 8	16	5,33	2 0 0 0 0 0 0 0 0 0	0,88	0,03
p120ctnS320D	ERC1	12 10 13	35	11,67	5 3 0 2 3 0 0 0 0 0	0,88	0,03
p120ctnS320D	ARHGAP21	7 8 8	23	7,67	2 0 0 2 2 0 0 0 0 0	0,86	0,03
p120ctnS320D	ANKHD1	9 4 7	20	6,67	0 0 0 0 3 0 0 0 0 0	0,84	0,04
p120ctnS320D	ESYT2	0 5 5	10	3,33	2 0 0 0 0 0 0 0 0 0	0,79	0,04
p120ctnS320D	TJP1	27 17 19	63	21	4 9 7 5 0 0 0 0 0 0	0,72	0,04
p120ctnS320D	ANK2	0 10 13	23	7,67	6 0 0 0 2 0 0 0 0 0	0,66	0,05
p120ctnS320D	SCRIB	24 19 24	67	22,33	14 0 2 2 0 0 0 0 0 0	0,65	0,05
p120ctnS320D	KANK2	3 2 5	10	3,33	2 0 0 0 0 0 0 0 0 0	0,62	0,06
p120ctnS320D	EIF3C	8 6 7	21	7	0 0 0 0 5 0 0 0 0 0	0,6	0,06

p120ctnS320D	PARD3	3 5 5	13	4,33	3 0 0 0 0 0 0 0 0	0,58	0,07
p120ctnS320D	TNRC6B	5 0 7	12	4	0 4 0 0 0 0 0 0 0	0,56	0,07
p120ctnS320D	TMEM33	0 2 5	7	2,33	2 0 0 0 0 0 0 0 0	0,52	0,09
p120ctnS320D	TUBB4B	108 93 47	248	82,67	5 7 6 27 41 0 0 17 16	0,52	0,1
p120ctnS320D	HAUS5	6 5 7	18	6	5 0 0 0 0 0 0 0 0	0,51	0,1