



Université de Montréal

**Implication de la voie ERK3/4-MK5 dans la phase  
G2/M du cycle cellulaire**

par

Pierre-Luc Tanguay

Département de biologie moléculaire

Faculté de Médecine

Thèse présentée à la Faculté de Médecine  
en vue de l'obtention du grade de Philosophiae Doctor  
en biologie moléculaire

Décembre, 2010

© Pierre-Luc Tanguay, 2010

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée :

**Implication de la voie ERK3/4-MK5 dans la phase G2/M du cycle cellulaire**

présentée par :

Pierre-Luc Tanguay

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Muriel Aubry, Ph.D.  
président-rapporteur

Sylvain Meloche, Ph.D.  
directeur de recherche

Elliot A. Drobetsky, Ph.D.  
membre du jury

Jacques Huot, Ph.D.  
examineur externe

Stéphane Roy, Ph.D.  
représentant du doyen de la FES

## Résumé

La division cellulaire est influencée par les différents stimuli provenant de l'extérieur ou de l'intérieur de la cellule. Plusieurs réseaux enzymatiques élaborés au cours de l'évolution relayent l'information générée par ces signaux. Les modules MAP kinases sont extrêmement importants au sein de la cellule. Chez l'humain, 14 MAP kinases sont regroupées en sept voies distinctes intervenant dans le contrôle d'une myriade de processus cellulaires. ERK3/4 sont des homologues de ERK1/2 pour lesquelles on ne connaît que très peu de choses concernant leurs fonctions et régulation. Ces MAP kinases sont dites atypiques puisqu'elles ont des particularités structurales et des modes de régulation qui diffèrent des autres MAP kinases classiques. Ainsi, notre laboratoire a démontré que l'activité de ERK3 est régulée par le système ubiquitine-protéasome et qu'elle pourrait avoir un rôle à jouer dans le contrôle de la différenciation et la prolifération cellulaire.

La première étude présentée décrit la régulation de ERK3 au cours du cycle cellulaire. Nous avons observé que ERK3 est hyperphosphorylée et s'accumule spécifiquement au cours de la mitose. Des analyses de spectrométrie de masse ont mené à l'identification de quatre sites de phosphorylation situés à l'extrémité du domaine C-terminal. Nous avons pu démontrer que la kinase mitotique CDK1/cycline B phosphoryle ces sites et que les phosphatases CDC14A et CDC14B les déphosphorylent. Finalement, nous démontrons que la phosphorylation mitotique de ERK3 a pour effet de la stabiliser.

Au début de mes études doctorales, la kinase MK5 fut identifiée comme premier partenaire et substrat de ERK3. MK5 a très peu de fonctions connues. Des données dans la littérature suggèrent qu'elle peut moduler le cycle cellulaire dans certaines conditions. Par exemple, MK5 a récemment été identifié comme inducteur de la sénescence induite par l'oncogène Ras. Dans la deuxième étude, nous décrivons une nouvelle fonction de MK5 dans le contrôle du cycle cellulaire. Nous démontrons par des expériences de gain et perte de fonction que MK5 ralentit l'entrée en mitose suite à un arrêt de la réplication. Cette fonction est dépendante de l'activité enzymatique de MK5 qui régule indirectement l'activité de CDK1/cycline B.



Finalement, nous avons identifié Cdc25A comme un nouveau substrat *in vitro* de MK5 dont la surexpression supprime l'effet de MK5 sur l'entrée en mitose.

En conclusion, nos résultats décrivent un nouveau mécanisme de régulation de ERK3 au cours de la mitose, ainsi qu'une nouvelle fonction pour MK5 dans le contrôle de l'entrée en mitose en réponse à des stress de la réplication. Ces résultats démontrent pour la première fois l'implication de ces protéines au cours de la transition G2/M. Nos travaux établissent de nouvelles pistes d'études pour mieux comprendre les rôles encore peu définis des kinases ERK3/4-MK5.

**Mots-clés** : Phosphorylation, MAP kinases, Cycle cellulaire, Mitose, Kinases dépendantes des cyclines, Stabilité, Phosphatases, Arrêt de la réplication, ERK3, MK5

## Abstract

The process of cell division is largely influenced by extracellular and intracellular cues. Many enzymatic pathways refined during evolution propagate the information generated by those cues. MAP kinase modules are extremely important within the cells. Human genome encodes 14 MAP kinases genes grouped into seven distinct pathways involved in the control of many cellular processes. ERK3/4 are kinases homologous to ERK1/2. Very little is known about their regulation and molecular functions. These MAP kinases are described as being atypical based on their unique structural characteristics and mode of regulation. Our laboratory was the first to demonstrate that the activity of ERK3 is mainly regulated by the ubiquitin-proteasome system in proliferating cells. In addition, several lines of evidence suggest a role for ERK3 in the control of cell differentiation and proliferation.

The first study presented herein documents the regulation of ERK3 during the cell cycle. We observed that ERK3 is hyperphosphorylated and accumulated specifically during mitosis. Mass spectrometry analyses led to the identification of four phosphorylation sites located in the C-terminal domain. We demonstrate that mitotic kinase CDK1/cyclin B phosphorylates these sites which are dephosphorylated by Cdc14A and Cdc14B phosphatases. Finally, we show that mitotic phosphorylation of ERK3 controls its stability.

At the beginning of my Ph.D. training, the kinase MK5 was the first identified binding partner and substrate of ERK3. MK5 is implicated in very few cellular functions. Data suggest that under certain conditions it modulates cell cycle progression. For example, MK5 was recently identified as a tumor suppressor gene essential for ras-induced senescence. In the second study of this thesis, we describe a novel function of MK5 in cell cycle progression. Gain and loss of function experiments demonstrate that MK5 delays G2/M transition following replicative stress. This function depends on its catalytic activity to indirectly regulates CDK1/cyclin B. Finally, we identified Cdc25A as a good *in vitro* substrate for MK5. Interestingly, Cdc25A expression inhibits MK5-induced delay of entry into mitosis.

In conclusion, our results described a novel mechanism of regulation of ERK3 during mitosis and a novel function of MK5 in the control of G2/M transition after replicative stress. These data demonstrate for the first time the relation between these kinases and the G2/M transition. Our work should contribute to a better understanding of the roles of ERK3/4-MK5 kinases.

**Keywords** : Phosphorylation, MAP kinases, Cell cycle, Mitosis, Cyclin-dependant kinases, Stability, Phosphatases, Replicative arrest, ERK3, MK5

## Table des matières

Résumé .....	iii
Abstract .....	v
Table des matières .....	vii
Liste des tableaux .....	xiv
Liste des figures.....	xv
Liste des sigles et abréviations .....	xvii
Remerciements .....	xxii

## CHAPITRE 1 .....

### INTRODUCTION .....

#### 1.1 Le cycle cellulaire .....

##### 1.1.1 Les phases G0/G1 et S.....

##### 1.1.2 Les phases G2/M.....

##### 1.1.2.1 Les événements de la mitose.....

##### 1.1.3 La machinerie du cycle cellulaire.....

##### 1.1.3.1 Les kinases dépendantes des cyclines .....

##### 1.1.3.2 Les cyclines .....

##### 1.1.3.3 Les Cks.....

##### 1.1.3.4 Les inhibiteurs de CDKs .....

##### 1.1.3.5 L'activité des complexes CDK/cyclines .....

##### 1.1.3.6 La dégradation des protéines par le système ubiquitine-protéasome : SCF et APC/C .....

##### 1.1.3.6.1 Structure du SCF.....

##### 1.1.3.6.2 Structure de l'APC/C.....

##### 1.1.3.6.3 Régulation et fonctions des complexes SCF et APC dans le cycle cellulaire.....

##### 1.1.3.6.3.1 La progression dans la phase G1 et la préparation à la réplication .....

##### 1.1.3.6.3.2 L'entrée en phase S.....

1.1.3.6.3.3	La progression en mitose .....	24
1.1.3.6.3.4	Le point de contrôle des fuseaux mitotiques .....	25
1.1.3.6.3.5	La sortie de mitose .....	27
1.2	L'entrée en mitose repose sur CDK1/cycline B .....	27
1.2.1	Contrôle de l'activité CDK1/cycline B .....	28
1.2.1.1	Expression et dégradation de la cycline B .....	28
1.2.1.2	Localisation du complexe .....	29
1.2.1.3	Contrôle de l'état de phosphorylation de CDK1 .....	30
1.2.1.3.1	Phosphorylation de la boucle d'activation .....	31
1.2.1.3.2	Phosphorylation inhibitrice .....	33
1.2.1.3.2.1	Wee1 et Myt1 .....	34
1.2.1.3.2.2	Les phosphatases Cdc25 .....	35
1.2.2	Les boucles de rétroaction positive .....	40
1.2.2.1	Plk1 et l'activation de CDK1 .....	41
1.2.2.2	Aurora A et Bora .....	42
1.3	Les phosphatases en sortie de mitose .....	43
1.3.1	Cdc14 .....	43
1.3.2	PP1 et PP2 .....	47
1.3.2.1	Structures .....	48
1.3.2.2	Rôle en sortie de mitose .....	49
1.3.2.3	La kinase Greatwall régule PP2A .....	50
1.4	Les points de contrôles en G2/M .....	52
1.4.1	Les voies ATM et ATR .....	533
1.4.1.1	Activation de la kinase ATM .....	53
1.4.1.2	Activation de la kinase ATR .....	56
1.4.1.3	L'amplification du signal généré par ATM et ATR .....	57
1.4.1.4	Les substrats de ATM et ATR .....	58
1.4.1.4.1	Les kinases Chk1 et Chk2 .....	58
1.4.1.4.1.1	L'arrêt du cycle cellulaire par les kinases Chk1 et Chk2 ...	59
1.5	Les rôles des MAP kinases dans le cycle cellulaire .....	60
1.5.1	La voie Ras-RAF-MEK-ERK .....	61

1.5.1.1	Les fonctions de la voie ERK1/2.....	62
1.5.1.1.1	Contrôle de la transition G1/S .....	64
1.5.1.1.2	La maturation des ovocytes .....	66
1.5.1.1.3	Raf-MEK-ERK : être ou ne pas être activées en G2/M?.....	67
1.5.1.1.4	Rôle lors de l'entrée en mitose .....	68
1.5.1.1.5	Rôle dans le point de contrôle en G2/M.....	69
1.5.1.1.6	Fragmentation du Golgi.....	70
1.5.2	La voie p38/MK2 .....	70
1.5.2.1	Rôles physiologiques de la voie p38 .....	72
1.5.2.2	Rôles dans les points de contrôles en G2/M.....	73
1.5.2.2.1	Comment p38 est-elle activée en réponse aux dommages à l'ADN et comment agit-elle pour provoquer l'arrêt en G2? .....	74
1.5.2.2.1.1	Les MAPKAP kinases en G2 .....	75
1.5.3	La voie JNK.....	76
1.5.3.1	La progression dans la phase G1 .....	77
1.5.3.2	Le contrôle de la mitose .....	78
1.5.4	La voie ERK5.....	80
1.5.4.1	Fonctions de la voie MEK5-ERK5 .....	81
1.5.4.1.1	Rôle au cours du développement.....	82
1.5.4.1.2	Rôle dans la prolifération et la survie cellulaire.....	82
1.5.4.1.3	Rôle lors de la mitose .....	83
1.6	L'émergence d'une nouvelle voie : ERK3/4-MK5 .....	84
1.6.1	Les MAP kinases atypiques ERK3/ERK4 .....	84
1.6.1.1	Identification et structure.....	85
1.6.1.2	Régulation de l'expression de ERK3/4 .....	87
1.6.1.3	Contrôle de ERK3 par le système ubiquitine-protéasome .....	88
1.6.1.4	Les fonctions de ERK3.....	89
1.6.1.4.1	Rôle dans le développement et la différenciation cellulaire.....	89
1.6.1.4.2	Rôle dans la sécrétion d'insuline .....	90
1.6.1.4.3	Rôle dans la prolifération.....	90
1.6.2	La MAPKAP kinase 5.....	92

1.6.2.1	Identification, structure et expression .....	92
1.6.2.2	Régulation de l'activité kinase de MK5 par différents partenaires ..	94
1.6.2.2.1	p38 $\alpha$ et p38 $\beta$ : Des kinases de MK5?.....	94
1.6.2.2.2	La sous-unité catalytique C $\alpha$ de la PKA .....	95
1.6.2.2.3	14-3-3 $\epsilon$ inhibe MK5 .....	95
1.6.2.2.4	La relation complexe avec ERK3/4.....	97
1.6.2.3	Fonctions de MK5 .....	99
1.6.2.3.1	Rôle physiologique chez la souris .....	99
1.6.2.3.2	Rôle dans le contrôle de la prolifération et de la sénescence ..	100
1.6.2.3.3	Rôle dans la migration et la polymérisation de l'actine .....	100
1.6.2.3.4	Anxiété et locomotion.....	101
1.7	Hypothèse.....	101
<b>CHAPITRE 2</b>	.....	<b>103</b>
<b>Article 1: C-TERMINAL DOMAIN PHOSPHORYLATION OF ERK3</b>	.....	.....
<b>CONTROLLED BY CDK1 AND CDC14 REGULATES ITS STABILITY</b>	.....	.....
<b>IN MITOSIS</b> .....	.....	<b>103</b>
2.1	Mise en situation .....	104
2.2	Abstract .....	106
2.3	Introduction .....	107
2.4	Materials and methods.....	109
2.4.1	Reagents and antibodies .....	109
2.4.2	Plasmid constructs and mutagenesis .....	109
2.4.3	Purification of recombinant proteins and <i>in vitro</i> translation.....	110
2.4.4	Cell culture, transfections and cell synchronization.....	110
2.4.5	<i>In vitro</i> phosphorylation analysis .....	110
2.4.6	Mass spectrometry (MS) analysis .....	111
2.4.7	Immunoblot analysis, immunoprecipitation and kinase assays.....	111
2.4.8	Flow cytometry.....	112
2.5	Results .....	113
2.5.1	ERK3 is hyperphosphorylated and accumulates in mitosis .....	113

2.5.2	ERK3 is specifically phosphorylated in the C-terminal extension .....	
	in mitosis .....	116
2.5.3	Identification of cyclin B-Cdk1 as a candidate for the ..... C-terminal phosphorylation of ERK3 in mitosis .....	121
2.5.4	Cdc14A and Cdc14B dephosphorylate ERK3 at mitosis exit .....	124
2.5.5	ERK3 stability is regulated by phosphorylation in mitosis .....	126
2.6	Discussion .....	128
2.7	Author's contributions .....	131
2.8	Acknowledgments .....	131
2.9	Funding .....	131
2.10	References .....	132
<b>CHAPITRE 3</b> .....		136
<b>Article 2: INHIBITION OF CDK1/CYCLIN B ACTIVITY BY MK5</b> .....		
DELAYS ENTRY INTO MITOSIS AFTER REPLICATIVE STRESS .....		136
3.1	Mise en situation .....	137
3.2	Abstract .....	139
3.3	Introduction .....	140
3.4	Materials and Methods .....	143
3.4.1	Reagents and Antibodies .....	143
3.4.2	Plasmid Constructs and siRNA .....	143
3.4.3	Cell Culture, Transfections and Cell Synchronization .....	144
3.4.4	Expression and purification of recombinant proteins .....	144
3.4.5	Immunoblot Analysis and Kinase Assays .....	144
3.4.6	Flow Cytometry .....	145
3.5	Results .....	147
3.5.1	Overexpression of MK5 delays mitotic entry .....	147
3.5.2	Mitotic entry after a replicative arrest is accelerated in absence of ..... MK5 .....	150
3.5.3	p38- and ERK3/4-independent function of MK5 in mitotic entry .....	154



3.5.4	MK5 kinase activity is required to inhibit mitotic entry .....	156
3.5.5	MK5 modulates CDK1/cyclinB kinase activity.....	158
3.5.6	Cdc25A rescue MK5-dependent G2 delay.....	160
3.6	Discussion .....	162
3.7	Aknowledgments.....	165
3.8	References .....	165
<b>CHAPITRE 4.....</b>		<b>170</b>
<b>DISCUSSION.....</b>		<b>170</b>
4.1	La Régulation de ERK3 .....	171
4.1.1	L'étude de ERK3.....	171
4.1.2	ERK3, une kinase associée à la différenciation et la prolifération cellulaire.....	172
4.1.3	Identifier les phospho-protéines en mitose.....	173
4.1.4	Est-ce que ERK3 est phosphorylée par plusieurs kinases lors de la mitose?.....	175
4.1.4.1	Plk1.....	176
4.1.4.2	Les kinases de la famille Aurora et NIMA .....	178
4.1.5	Quel est le rôle de la phosphorylation en mitose?.....	180
4.1.6	L'ubiquitination de ERK3 .....	181
4.1.6.1	La E3 ligase de ERK3.....	183
4.1.6.2	Les enzymes de déubiquitination .....	184
4.1.7	ERK3 se retrouve aux centrosomes.....	185
4.1.8	Un rôle en méiose.....	189
4.2	MK5, un inhibiteur du cycle cellulaire.....	191
4.2.1	Les voies qui activent MK5.....	191
4.2.2	L'identification de substrats et de la séquence consensus de phosphorylation par MK5 .....	193
4.2.3	Les fonctions cellulaires de MK5.....	195
4.2.3.1	Un frein pour l'entrée en mitose.....	196
4.2.4	MK5, ERK3 et les dommages à l'ADN .....	198

<b>Conclusion</b> .....	201
<b>BIBLIOGRAPHIE</b> .....	202
<b>Annexe I</b> Activation Loop Phosphorylation of the Atypical MAP Kinases ERK3 and ERK4 is Required for Binding, Activation and Cytoplasmic Relocalization of MK5.....	xxv
<b>Annexe II</b> Activation loop phosphorylation of the atypical MAP kinases ERK3/ERK4 by group I PAKs defines a novel PAK-ERK3/4-MK5 signaling pathway .....	lxiii
<b>Annexe III</b> .....	lxxxvi

## Liste des tableaux

### CHAPITRE 1

Tableau I Les CDK, les cyclines, les inhibiteurs et leurs substrats.....14

Tableau II Les co-activateurs des complexes SCF et APC,  
leurs substrats et les phases du cycle.....21

### CHAPITRE 4

Tableau III Les substrats de MK5.....194

## Liste des figures

### CHAPITRE 1

Figure 1.1 Le cycle cellulaire.....	3
Figure 1.2 Les étapes de la mitose.....	6
Figure 1.3 Changements structuraux d'activation ou d'inhibition des complexes CDK/cyclines.....	11
Figure 1.4 Les CDK/cyclines activées dans les différentes phases du cycle cellulaire .....	12
Figure 1.5 Les complexes SCF et APC .....	19
Figure 1.6 Le point de contrôle du fuseau mitotique. ....	26
Figure 1.7 Contrôle de l'expression de la cycline B lors du cycle cellulaire .....	29
Figure 1.8 Régulation de l'état de phosphorylation de CDK1/cycline B.....	31
Figure 1.9 Effets structuraux de la phosphorylation de la Thr 160 de CDK2.....	32
Figure 1.10 Structures et régulation des phosphatases Cdc25.....	36
Figure 1.11 Structure et localisation de Plk1 .....	41
Figure 1.12 Structure des Cdc14.....	45
Figure 1.13 Structure des complexes PP1 et PP2A .....	48
Figure 1.14 Relation CDK1-Greatwall-PP2A dans le contrôle de la mitose.....	52
Figure 1.15 Voies de signalisation activées en réponse aux dommages à l'ADN.....	544
Figure 1.16 Organisation des modules de MAP kinases chez l'humain.....	61
Figure 1.17 Activation de la voie de signalisation Ras-RAF-MEK-ERK.....	63
Figure 1.18 Voie de signalisation de ERK5.....	81
Figure 1.19 La voie MEK5-ERK5-RSK2 dans le contrôle d'entrée en mitose.....	84
Figure 1.20 Structure primaire des MAPKs retrouvées chez les mammifères .....	86
Figure 1.21 Membres de la famille des MAKAP kinases.....	93
Figure 1.22 Fonctions et partenaires de MK5 .....	96
Figure 1.23 Modèle d'interaction et de phosphorylation entre ERK3/4 et MK5.....	98

### CHAPITRE 2

Figure 2.1 ERK3 is hyperphosphorylated in mitosis .....	114
---	-----

Figure 2.2 <i>In vitro</i> phosphorylation of the C-terminal extension of ERK3 by mitotic extracts .....	117
Figure 2.3 ERK3 is phosphorylated on Thr698 in mitosis .....	119
Figure 2.S1 Mass spectra for phosphorylation sites identified on ERK3.....	121
Figure 2.4 Cyclin B-Cdk1 phosphorylates ERK3 <i>in vitro</i> and <i>in vivo</i> .....	123
Figure 2.5 Cdc14A and Cdc14B interact with and dephosphorylate ERK3 <i>in vivo</i> .....	125
Figure 2.6 Phosphorylation of the C-terminus stabilizes ERK3 in mitosis.....	127

### CHAPITRE 3

Figure 3.1 Overexpression of MK5 delays mitotic entry in HeLa cells.....	148
Figure 3.S1 Expression of MK5 induces a partial G2/M block.....	149
Figure 3.2 Depletion of MK5 accelerates mitotic entry .....	151
Figure 3.3 MK5 does not regulate G2/M transition of proliferating cells .....	153
Figure 3.4 p38 and Erk3/4 inactivation does not affect entry into mitosis .....	155
Figure 3.S2 p38 activity is regulated in a cell cycle-dependent manner.....	156
Figure 3.5 MK5 activity is necessary to inhibit mitotic entry .....	157
Figure 3.6 MK5 inhibits CDK1/cyclin B1 activity .....	159
Figure 3.7 Cdc25A rescue MK5-dependant G2 delay .....	161

### CHAPITRE 4

Figure 4.1 Plk1 phosphoryle <i>in vitro</i> et interagit avec ERK3.....	177
Figure 4.2 Modèle de régulation de ERK3 au cours du cycle cellulaire .....	182
Figure 4.3 ERK3 peut être retrouvée aux centrosomes.....	187

## Liste des sigles et abréviations

aa	Acides aminés
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	ADN complémentaire
AML1	<i>Acute myeloid leukemia 1 protein</i>
AP-1	<i>Activator protein-1</i>
APC/C	<i>Anaphase-promoting complex/Cyclosome</i>
ARNm	Acide ribonucléique messenger
ASK1	<i>Apoptosis signal-regulating kinase 1</i>
ATF	<i>Activating transcription factor-2</i>
ATM	<i>Ataxia telangiectasia mutated</i>
ATP	Adénosine 5'-triphosphate
ATR	<i>ATM and Rad3-related</i>
$\beta$ -TrCP	<i><math>\beta</math>-transducin repeats-containing proteins</i>
Bad	<i>Bcl2 antagonist of cell death</i>
Bim	<i>B-cell lymphoma 2 interacting mediator of cell death</i>
BMK1	<i>Big MAP Kinase 1</i>
BRCA1	<i>Breast cancer susceptibility protein-1</i>
Bub1	<i>Budding uninhibited by benzimidazoles 1</i>
BubR1	<i>Bub1-related kinase 1</i>
CAK	<i>Cdk-activating kinase</i>
CaMK	<i>Calcium/calmodulin-dependent protein kinase</i>
CCAN	<i>Constitutive centromere associated network</i>
CD	<i>Common docking</i>
Cdc	<i>Cell division control</i>
CDK	<i>Cyclin-dependent kinase</i>
Cdt1	<i>Chromatin licensing and DNA replication factor 1</i>
CENP A/B	<i>Centromere protein A/B</i>
Cfi1	<i>Cdc14 inhibitor 1</i>
CHK1/2	<i>Checkpoint kinase 1/2</i>
Chfr	<i>Checkpoint with forkhead and ring finger domains</i>
CK1-2	<i>Casein kinase 1-2</i>
CKI	<i>CDK inhibitor</i>
Cks	<i>Cyclin-dependent kinase subunit 1</i>
Crm1	<i>Chromosome region maintenance 1</i>
CREB	<i>cAMP responsive element-binding protein</i>
CRS	<i>Cytoplasmic retention sequence</i>
CSF	<i>Cytostatic factor</i>
C-Tak1	<i>Cdc twenty-five C associated protein kinase 1</i>
DMBA	<i>Dimethylbenzanthracene</i>
Doc1	<i>Destruction of cyclin B 1</i>
DTT	<i>Dithiothreitol</i>
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i>

Elk-1	<i>ETS-like 1</i>
Emi1	<i>Early mitotic inhibitor 1</i>
ERGIC	<i>Endoplasmic reticulum golgi intermediate compartment</i>
ERK	<i>Extracellular-signal regulated kinase</i>
FBP	<i>F-box proteins</i>
FEAR	<i>Cdc fourteen early anaphase release</i>
FHA	<i>Forkhead associated domain</i>
GAP	<i>GTPase-activating protein</i>
GAPDH	<i>Glycéraldéhyde 3-phosphate déhydrogénase</i>
GEF	<i>Guanine nucleotide exchange factor</i>
GDP	<i>Guanosine diphosphate</i>
GFP	<i>Green fluorescent protein</i>
GRASP	<i>Golgi reassembly stacking protein</i>
GRB2	<i>Growth factor receptor bound-protein 2</i>
GSK3	<i>Glycogen synthase kinase</i>
GST	<i>Glutathione S-transférase</i>
GTP	<i>Guanosine triphosphate</i>
HECT	<i>Homologous to E6-AP carboxy terminus</i>
HEK	<i>Human embryonic kidney</i>
Hog1	<i>High-osmolarity glycerol 1</i>
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i>
INK4	<i><u>In</u>hibitors of <u>Cdk4</u></i>
IR	<i>Radiation ionisante</i>
JNK	<i>c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal kinase</i>
kDa	<i>Kilo dalton</i>
KO	<i>Knock-Out</i>
LC	<i>Liquid chromatography</i>
Mad2	<i>Mitotic arrest deficient 2</i>
MAP	<i>Microtubule associated protein</i>
MAPK	<i>Mitogen Activated Protein Kinase</i>
MAPKAPK	<i>MAPK-Activated Protein Kinase</i>
MAPKK	<i>MAPK Kinase</i>
MAPKKK	<i>MAPKK Kinase</i>
MAST-L	<i>Microtubule-associated serine/threonine kinase-like protein</i>
Mat1	<i>Ménage-à-trois 1</i>
MBP	<i>Myelin binding protein</i>
Mcl-1	<i>Myeloid cell leukemia sequence 1</i>
MCM2-7	<i>Minichromosome maintenance complex component 2-7</i>
MDC1	<i>Mediator of DNA damage checkpoint protein-1</i>
MEF	<i>Mouse embryonic fibroblasts</i>
MEF2C	<i>Myocyte-specific enhancer factor 2C ou MADS box transcription enhancer factor 2, polypeptide C</i>
MEK	<i>MAP kinase/ERK kinase</i>

MEKK 3/4	<i>MAPK/ERK kinase kinase 3/4</i>
MEN	<i>Mitotic exit network</i>
Mik1	<i>Mitotic inhibitor kinase 1</i>
MK	<i>MAPK-Activated Protein Kinase</i>
Mkp1/2	<i>MAPKAP kinase Schizosaccharomyces pombe 1/2</i>
mL	Millilitre
mM	Millimolaire
MMS	Méthyl methane sulfonate
MNK	<i>MAPK-interacting kinase</i>
MPF	<i>Maturation-promoting factor</i>
Mre11	<i>Meiotic recombination 11</i>
MS	Spectrométrie de masse
MSK	<i>Mitogen- and stress- activated protein kinase</i>
MTOC	<i>Microtubule-organizing center</i>
Myt1	<i>Membrane-associated tyrosine- and threonine-specific cdc2-inhibitory kinase 1</i>
Nbs1	<i>Nijmegen breakage syndrome 1</i>
NDR	<i>N-terminal degradation region</i>
NEBD	<i>Nuclear envelope breakdown</i>
NEDD8	<i>Neural precursor cell expressed developmentally down-regulated protein 8</i>
NEK	<i>NIMA-related kinase 2A</i>
NES	<i>Nuclear export signal</i>
Net1	<i>Nucleolar silencing establishing factor and telophase regulator</i>
NIMA	<i>Never in mitosis gene a</i>
NLS	<i>Nuclear localisation signal</i>
nm	Nanomètre
ORC	<i>Origin recognition complex</i>
PCM	<i>Pericentriolar matrix</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PIN1	<i>Protein interacting with NIMA1</i>
Plk	<i>Polo-like kinase</i>
PPI	<i>Protein phosphatase inhibitors</i>
PRAK	<i>p38-regulated/activated protein kinase</i>
Raf	<i>Rapidly growing fibrosarcoma</i>
Ras	<i>Rat sarcoma</i>
Rck	<i>Radiation sensitivity complementing kinase</i>
RING	<i>Really interesting new gene</i>
RNF8	<i>RING-finger-containing nuclear factors 8</i>
ROS	<i>Reactive oxygen species</i>
RPA	<i>Replication protein A</i>
RSK	<i>Ribosomal S6 kinase</i>
SAC	<i>Spindle assembly checkpoint</i>
SAPK	<i>Stress activated protein kinase</i>
SCD	<i>SQ/TQ cluster domain</i>



SCF	<i>Skp1-Cullin-F-box protein</i>
SDS	Sodium dodécyl sulfate
SGK	<i>Serum and glucocorticoid-inducible kinase</i>
SIAH-1	<i>Seven in absentia from human 1</i>
Skp	<i>S-phase kinase-associated protein</i>
SMC	<i>Structural maintenance of chromosomes</i>
SOS	<i>Son of sevenless</i>
TAK1	<i>TGF <math>\beta</math>-activated kinase 1</i>
TAO1/2	<i>Thousand-and-one amino acid 1/2</i>
TAP	<i>Tandem affinity purification</i>
TGF- $\beta$	<i>Transforming growth factor <math>\beta</math></i>
TK	<i>Tyrosine kinase</i>
TOBP1	<i>Topoisomerase-binding protein-1</i>
UbcH	<i>Human ubiquitin-conjugating enzyme</i>
UV	Ultra violet
Wee	Terme gaélique, signifiant petit
$\mu$ L	microLitre
$\mu$ M	microMolaire
WIP1	<i>Wild-type p53-induced phosphatase 1</i>
53BP1	<i>p53 binding protein-1</i>

*En recherche, il faut vraiment aimer son travail  
et être déterminé, car les choses se présentent  
plus souvent mal que bien. Mais lorsque cela  
réussit, il n'y a rien de plus gratifiant.*

*Michael Smith, Prix nobel de chimie, 1993.*

## Remerciements

Bien que le diplôme de doctorat qui est remis pour cette thèse ne porte que mon nom, je n'aurais pu l'obtenir sans l'appui et les encouragements de nombreuses personnes durant toutes ces années. Ainsi, j'utilise les prochaines lignes pour remercier ceux et celles qui m'ont aidé à parcourir ce long trajet sinueux.

Je voudrais tout d'abord remercier Dr Sylvain Meloche, mon directeur de recherche pour son soutien constant et la confiance qu'il m'a démontrés au cours de mon doctorat. Sylvain m'a toujours donné son aval afin que je teste chacune de mes idées, bonnes ou moins bonnes. Travailler sur ERK3/MK5 n'est pas une chose facile, et il a toujours fait preuve de beaucoup de patience alors que les découvertes n'étaient pas au rendez-vous. Au sein de son laboratoire, j'ai retrouvé un environnement me permettant d'acquérir l'esprit scientifique et critique nécessaire pour devenir un chercheur autonome. J'y ai également côtoyé des personnes et des amis exceptionnels avec qui j'ai tant aimé partager mon quotidien.

Lorsque j'ai été embauché au laboratoire à titre d'agent de recherche, j'ai eu le privilège de côtoyer deux scientifiques exceptionnels. Les conversations que j'ai eues avec Philippe et Geneviève ont grandement contribué à mon regain de passion et de motivation. À ce moment-là, ils m'ont redonné goût à la science. Je les remercie donc pour leur aide, leur grande disponibilité et leurs judicieux conseils. Merci à mes amis et collègues avec qui j'ai eu des échanges scientifiques stimulants et qui m'ont si patiemment écouté et encouragé lors des trop nombreuses périodes plus difficiles. Bien souvent, la gang au labo était en soi une bonne raison pour s'y rendre. Je pense ici à Paul, Mathieu, Benjamin, Justine, Catherine, Christophe, Christel, Sylvia, Marc, Laure, Édith, Benoît, Sonia, Stéphanie, Daniel, Simon, Kim et Yipeng.

Un merci spécial à Paul, Mathieu et Justine pour leur amitié et leurs encouragements nourris dans les derniers milles essoufflants. Merci également à Benoît et encore Paul et Mathieu qui ont généreusement pris de leur temps de lire des sections de ma thèse.

Je tiens également à remercier Dre Muriel Aubry et Drs Damien D'amours, Benoît Coulombe et Alain Nepveu qui ont participé aux différents comités durant ma thèse.

Je remercie les Instituts de Recherche en Santé du Canada (IRSC) ainsi que la Faculté des Études Supérieures et les Programmes de biologie moléculaire de l'Université de Montréal pour leur support financier lors de mon doctorat.

Je remercie Danièle Gagné, Christian Charbonneau et Dr Éric Bonneil qui sont respectivement responsables des plateformes de cytométrie, de microscopie et de protéomique, pour m'avoir aidé à réaliser différentes expériences, mais surtout pour avoir répondu à mes centaines de questions.

Merci sincère à ma famille et mes amis. À ma mère et mon père, qui m'ont transmis de riches valeurs, ainsi que mon frère, ma sœur et mes beaux-parents, qui ont tous, à leur façon, été des sources inépuisables d'encouragements et de soutien, pendant ces longues années. Leur présence et leur amour m'ont grandement aidé à me rendre jusqu'au bout de ce projet, qui n'a pas toujours été facile et qui m'a souvent rendu anxieux. Je veux particulièrement exprimer à ma mère toute l'admiration que j'ai pour elle. Trop souvent et malgré elle, elle me rappelle l'importance et l'impact qu'a la recherche sur la vie des gens. Merci à mes amis Steve, Jean-François et Miguel qui sont là quand j'ai besoin de me changer les idées.

Finalement, je veux exprimer mes plus grands remerciements à Julie, mon amour. Au début de notre relation, tu ne savais certainement pas qu'en tombant amoureuse d'un étudiant scientifique, tu aurais de nombreux sacrifices à faire. Pour te rassurer immédiatement, cette thèse est la seule que j'écrirai. Tout au long de mes études universitaires, tu as accepté que j'investisse d'innombrables heures à étudier, à lire des articles scientifiques et à faire mes manips. C'est avec une patience inégalée que tu as passé plusieurs soirées et dimanches en solitaire. Tu as fait plus que l'impossible pour faciliter mon quotidien, je ne saurai jamais comment te remercier suffisamment. Au moment de la rédaction, tu as volontairement corrigé mon texte, améliorant sa qualité et le rendant plus facile à lire. Sans toi, je n'aurais jamais pu réaliser cet ouvrage.

C'est avec toi que je vis les plus grandes joies de la vie. Comme celle d'être parent. Tu nous as donné Raphaël, qui chaque jour m'émerveille et me fait réaliser la chance que j'ai d'être le père d'un aussi beau petit garçon. Durant la dernière année, il y a eu notre fille Léanne, qui a été dans nos vies le temps de nous faire rêver...et qu'on ne pourra jamais oublier. Mes amours, merci de tout cœur d'être dans ma vie.

# **CHAPITRE 1**

## **INTRODUCTION**

## 1.1 Le cycle cellulaire

Les cellules sont constamment confrontées à différentes options quant à leur destin : migrer, se différencier, se diviser ou mourir sont quelques possibilités qui s'offrent à elles et qui permettent à un organisme de bien se former. Pour ce faire, un large éventail de récepteurs membranaires sonde continuellement les signaux provenant du milieu extracellulaire dans lequel les cellules se trouvent. De plus, une multitude de protéines vérifie les conditions intracellulaires. La présence de nutriments à l'extérieur est-elle suffisante? Le volume cellulaire est-il assez grand pour se diviser? Le matériel génétique est-il bien répliqué et la cellule est-elle réellement prête à former deux cellules filles? Les réponses à ces questions et plusieurs autres permettent à une cellule de se diviser correctement et de transmettre aux générations futures tout le matériel nécessaire pour perpétuer la vie.

Tous les organismes multicellulaires et toutes les colonies d'organismes unicellulaires sont issus d'une seule cellule. Le procédé qui conduit une cellule à se reproduire elle-même est appelé cycle cellulaire. Chez les cellules eucaryotes, on peut généralement le diviser en quatre étapes : la phase G1, la phase S, la phase G2 et la mitose (phase M) (Figure 1.1). Ces étapes complexes sont parfaitement contrôlées par une machinerie qui s'est adaptée et raffinée au cours de l'évolution [1].

Néanmoins, il arrive parfois que cette machinerie commette des erreurs ou que la cellule soit endommagée lors de l'accomplissement du cycle cellulaire. Dans ce cas, des signaux permettront à la cellule de corriger ces erreurs et de continuer le cycle normalement ou de mourir par apoptose. Dans le pire des scénarios, le défaut sera transmis aux prochaines générations et pourrait contribuer au développement du cancer [2, 3].

### 1.1.1 Les phases G0/G1 et S

La phase G1 (Gap 1) est la première phase d'un cycle cellulaire et représente la période qui se situe entre la mitose et la phase S. Au cours de cette phase, la cellule sera amenée à poursuivre sa progression dans le cycle ou à en sortir. Une cellule

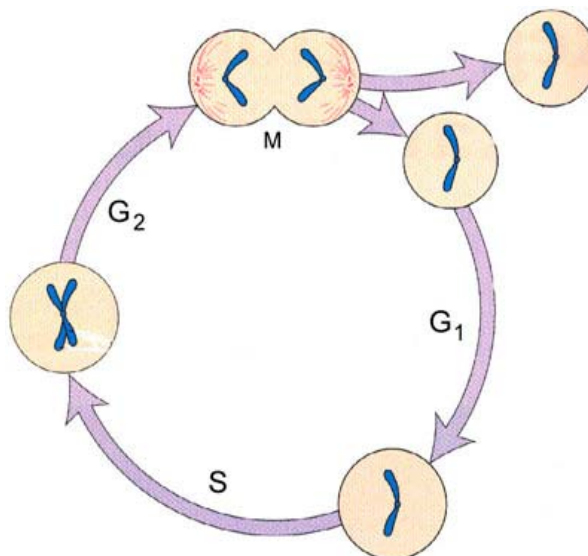


Figure 1.1 **Le cycle cellulaire**

Illustration des phases du cycle cellulaire. Les chromosomes présents en une seule copie lors de la phase G<sub>1</sub> sont dupliqués au cours de la phase S. Durant la mitose, le matériel génétique est distribué dans les deux cellules filles. Issu du site internet <http://themedicalbiochemistrypage.org>.

arrête de se diviser lorsqu'il manque de nutriments ou qu'une cellule voisine l'en empêche. Elle marque alors une pause, dont la durée varie selon les circonstances, dans la phase G<sub>1</sub> ou entre dans la phase G<sub>0</sub> si elle ne peut plus se diviser du tout. Ainsi, on dit des cellules différenciées qu'elles sont en permanence dans la phase G<sub>0</sub>. Lorsque les conditions extracellulaires sont favorables à la croissance, les signaux sont transmis à l'intérieur de la cellule et permettent de franchir le point de restriction et de préparer la cellule à la réplication de son génome au cours de la phase S (phase de synthèse de l'ADN). Bien que la majorité du contenu cytoplasmique (protéines, ARN, mitochondries, organelles) soit produit tout au long du cycle, l'ADN doit être synthétisé au même moment pour conserver exactement le même nombre de chromosomes à chacune des générations [4]. La réplication de l'ADN est initiée simultanément à plusieurs origines de réplication sur les chromosomes pour être effectuée rapidement. Au cours de la phase G<sub>1</sub>, les pré-RC (*pre-Replicative complex*) sont formés aux origines de réplication et attendent le début de la phase S [5]. Les pré-RC sont composés par l'assemblage séquentiel des protéines ORC, Cdc6, Cdt1 et



des protéines MCM2-7. L'initiation de la réplication de l'ADN, tout comme la formation des pré-RC, est un processus qui implique une machinerie et des mécanismes de régulation conservés au cours de l'évolution [6]. Les pré-RC recrutent des hélicases qui « déroulent » l'hélice d'ADN et des réplisomes, composés principalement de polymérase, associées à plusieurs facteurs de régulation pour effectuer la réplication de l'ADN. Il est essentiel pour la cellule d'identifier les paires de chromatides aussitôt qu'elles sont répliquées, afin qu'elles soient distribuées parfaitement lors de la mitose. Pour ce faire, elles sont maintenues ensemble jusqu'à l'anaphase par des complexes protéiques de cohésines [7]. Ceux-ci ont la forme de « V » qui encercle les brins d'ADN et sont composés d'hétérodimères SMC1/3 (*Structural maintenance of chromosome 1/3*) reliés par la protéine Rad21/Scc1. Leurs cycles d'interaction/dissociation de l'ADN sont finement régulés et ce sont ces événements qui détermineront les périodes de cohésion entre les chromatides sœurs.

C'est également au cours de la phase S que le centrosome, ou MTOC (*microtubule-organizing center*), est répliqué. Deux centrosomes sont nécessaires à l'organisation du réseau de microtubules essentiels à la ségrégation des chromosomes au cours de la mitose [8]. Le centrosome est composé de deux centrioles légèrement différents, eux-mêmes formés de neuf triplets de microtubules. Les centrioles sont entourés par le matériel péricentriolaire, un environnement riche en protéines. Durant la phase G1, les centrioles sont reliés ensemble de façon plus ou moins rigide, afin de faciliter leur préparation à la duplication. Par contre, au sein des centrosomes nouvellement formés, les centrioles sont attachés très fermement entre eux. Dans la phase G2, les centrosomes deviennent complètement matures et les centrioles d'origine se séparent l'un de l'autre. Des centrosomes présents en surnombres induisent des aberrations chromosomiques pouvant conduire à l'aneuploïdie [9]. Dans le but de prévenir la présence d'un nombre anormal de centrosomes, il est extrêmement important que la synthèse de l'ADN et du nouveau centrosome soit intimement liée. Ainsi, l'arrêt de la réplication entraîne également l'arrêt de la duplication du centrosome. De même, lorsque la cellule contient deux centrosomes, elle doit stopper leur néo-synthèse. Comme pour la réplication de l'ADN, il semble qu'il existe des mécanismes ne permettant qu'un seul cycle de synthèse par cycle

cellulaire [10]. Les centrosomes sont également impliqués dans plusieurs autres fonctions cellulaires, dont le contrôle de la motilité cellulaire, de la polarité et de l'adhésion [11].

### **1.1.2 Les phases G2/M**

La phase G2 (*Gap 2*) débute lorsque l'ADN est complètement répliqué et se termine avant que la mitose ne débute. Au cours de cette phase, la cellule continue d'augmenter son volume et s'assure d'être bien préparée pour l'étape suivante. Comme nous le verrons à la Section 1.4, il existe des points de contrôle au cours de la phase G2 afin de prévenir l'entrée en mitose lorsque l'ADN est endommagé. La mitose est une phase cruciale, car c'est à ce moment précis que la cellule subit une multitude de changements architecturaux qui permettent de donner naissance à deux cellules filles identiques. L'étude des changements morphologiques et de la formation des cellules filles est relativement simple, puisque l'on peut clairement les voir au microscope. Bien qu'il reste encore plusieurs acteurs et mécanismes à découvrir, nous avons aujourd'hui une bonne connaissance des régulateurs clés et des événements moléculaires qui régissent la mitose.

#### **1.1.2.1 Les événements de la mitose**

La mitose est une étape fascinante, puisque la cellule subit une réorganisation entière de son architecture afin de séparer adéquatement les chromosomes répliqués. Certains processus biochimiques sont également perturbés au cours de la mitose. C'est le cas notamment de la traduction cap-dépendante, très active en interphase, mais qui est grandement inhibée au cours de la mitose [12, 13]. Plusieurs facteurs d'initiation et d'élongation de la traduction 5' cap-dépendante sont inhibés par phosphorylation ou déphosphorylation au cours de la mitose (eIF4E, 4E-BP1, eEF1/2). D'un autre côté, la traduction cap-indépendante est stimulée au cours de la mitose. De même, au cours de cette phase du cycle, le réseau des microtubules est complètement réorganisé. En interphase, l'architecture de l'appareil de Golgi et le trafic vésiculaire dépendent de l'intégrité des microtubules. Ainsi, lorsque les microtubules sont restructurés dans une cellule en mitose, le Golgi est fragmenté en

petites vésicules, ce qui permet une dispersion égale des composantes dans les deux cellules filles (Section 1.5.1.1.6 et [14]).

La mitose est divisée en six étapes distinctes selon l'arrangement et la distribution des chromosomes (Figure 1.2) [15]. Il est reconnu que la mitose débute avec la **prophase**, qui correspond au moment où les chromosomes se condensent. Ce processus de compaction sévère nécessite la participation des condensines, des complexes multiprotéiques possédant une activité ATPase [16]. À l'image des complexes de cohésines, les complexes condensines adoptent une structure en « V »

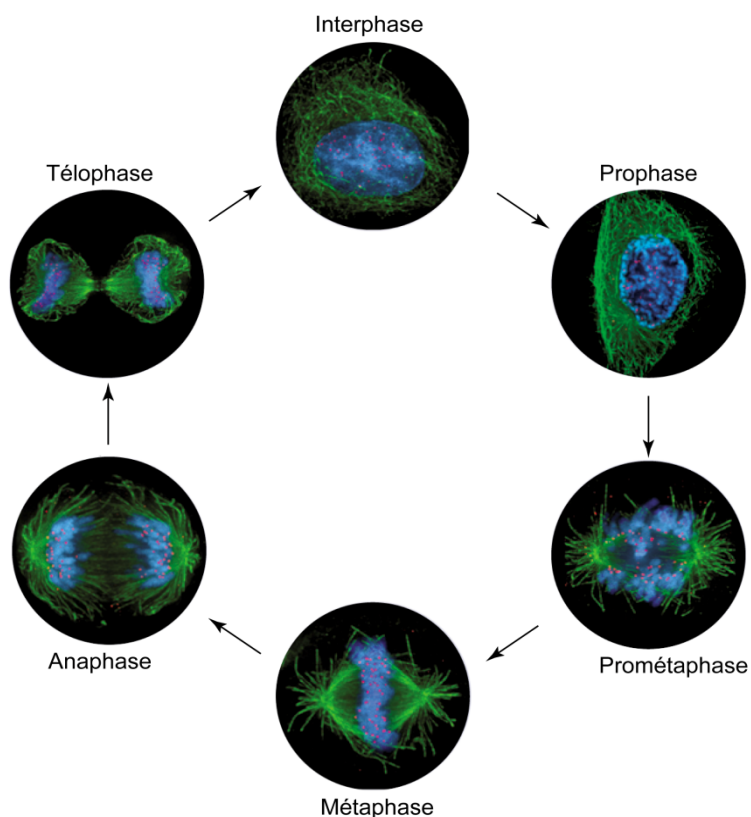


Figure 1.2 **Les étapes de la mitose**

La mitose est divisée en six étapes, selon l'organisation et la position des chromosomes. Sur cette figure, on peut voir la distribution de l'ADN (en bleu) et des microtubules (en vert) à chacune des étapes par microscopie à immunofluorescence. La cytokinèse, qui n'est pas illustrée ici, survient immédiatement après la téléphase. Les kinétochores sont en rouge. Figure adaptée de [17].

formée par les protéines SMC2-SMC4 et trois protéines non-SMC. La topoisomérase II, une autre enzyme à activité ATPase, participe également à la compaction des chromosomes [18]. Il y a deux complexes différents de condensines qui s'assemblent de façon séquentielle sur les chromosomes durant la prophase (condensine I), et après le démantèlement de l'enveloppe nucléaire (condensine II). De plus, parallèlement à la condensation des chromosomes lors de la prophase, les histones responsables de la formation des nucléosomes sont fortement phosphorylées [19]. Par exemple, l'histone H3 devient phosphorylée sur la sérine 10. Cependant, encore aujourd'hui, il n'est pas bien compris si les modifications post-traductionnelles que subissent les histones lors de la mitose affectent directement le niveau de compaction des chromosomes. Enfin, lorsque l'enveloppe nucléaire est dissociée (NEBD, *nuclear envelope breakdown*), la prophase se termine et la **prométaphase** débute.

À l'intérieur des cellules eucaryotes, le noyau est séparé du cytoplasme par un vaste réseau membranaire formant le réticulum endoplasmique et l'enveloppe nucléaire, elle-même composée d'une membrane interne et externe [20]. Les cellules de mammifères produisent ce qui est appelé une mitose « ouverte », c'est-à-dire que le contenu du noyau et du cytoplasme n'est plus séparé par une barrière. Par contre, chez la levure, on observe plutôt une mitose « fermée », au cours de laquelle le noyau reste intact et est scindé en deux seulement lors de la cytokinèse. Dissocier et reformer un réseau membranaire aussi élaboré au bon moment (avant et après la ségrégation des chromatides sœurs) et au bon endroit (autour des chromatides) représente un défi de taille pour la cellule. C'est pour cette raison que le processus est extrêmement bien régulé. Les kinases mitotiques, particulièrement le complexe CDK1/cycline B (Section 1.2), jouent des rôles importants dans toutes les étapes du désassemblage de l'enveloppe nucléaire. Le démantèlement des complexes des pores nucléaires, suivi par la dépolymérisation de la lamine nucléaire et de la dissociation des protéines de la membrane interne contribuent largement à rompre la structure nucléaire [20, 21].

En prométaphase, un phénomène remarquable se produit : la capture des chromosomes par les microtubules via les kinétochores. C'est ce processus qui est à

la base de la distribution parfaite du matériel génétique [22]. Lors de la mitose, les microtubules nucléés à partir des centrosomes sont très dynamiques. Formées d'hétérodimères de tubuline  $\alpha$  et  $\beta$ , ces fibres polarisées de 25 nm de diamètre sont constamment polymérisées et dépolymérisées grâce à l'hydrolyse du GTP en GDP par la  $\beta$ -tubuline. Lorsqu'un microtubule a trouvé un kinétochore, sa stabilité est en partie contrôlée par diverses protéines localisées au kinétochore.

Les kinétochores sont des structures protéiques très dynamiques jouant des rôles déterminants dans l'interaction avec les microtubules et dans la ségrégation des chromosomes. Leur assemblage se fait au niveau des centromères, des régions denses d'hétérochromatine [17]. Un kinétochore est constitué de trois régions distinctes : le kinétochore intérieur qui est associé à la chromatide, le kinétochore central et le kinétochore extérieur qui interagit avec le microtubule. Plus de 80 protéines composent les kinétochores à un moment ou à un autre de la mitose. Cependant, quelques protéines y sont retrouvées en tout temps, dont les protéines CENP-A/B et CCAN. Les kinétochores sont responsables du recrutement de protéines qui signalent à la cellule qu'elle doit arrêter sa progression en mitose lorsqu'il y a un ou plusieurs kinétochores qui ne sont pas attachés, processus nommé point de contrôle du fuseau mitotique (Section 1.1.3.6.3.4) [23].

Le moment précis auquel les chromosomes sont alignés sur la plaque équatoriale est appelé **métaphase**. La durée de la transition entre la prométaphase et la métaphase dépend du temps nécessaire pour que les kinétochores sœurs soient parfaitement attachés (bi-orientés) par des microtubules provenant des pôles opposés. Avant d'y parvenir, il y aura des kinétochores sœurs reliés au même pôle (mono-orientés), certains kinétochores seront difficilement trouvés par les microtubules, ou encore y seront mal attachés [17]. Pendant tout ce temps, la machinerie du point de contrôle du fuseau mitotique empêche la cellule de progresser dans la mitose. Lorsque les conditions de la métaphase sont bien remplies, on assiste au début de l'**anaphase**.

Pour permettre aux chromosomes de se diriger vers les pôles de la cellule, il doit y avoir dissolution des complexes de cohésines qui maintenaient jusqu'à ce stade

les chromatides sœurs reliées entre elles. Cette étape est assurée par le clivage de la sous-unité Scc1 de la cohésine par la Séparase [24]. Cette protéase est inhibée jusqu'à cette étape par la Sécurine, qui est dégradée par le protéasome suite à l'ubiquitination par l'APC<sup>Cdc20</sup>, et par phosphorylation par CDK1/cycline B [25]. Les forces générées par la dépolymérisation des microtubules au niveau des kinétochores et au niveau des centrosomes entraînent les chromosomes vers les pôles de la cellule. Pour les éloigner encore davantage vers les pôles, les centrosomes s'y dirigent également [1].

La mitose se termine par la **télophase**, étape au cours de laquelle le fuseau mitotique se défait complètement et que le noyau commence à se reformer autour des chromosomes ségrégués de chaque côté de la cellule. En télophase, la cellule entame la dernière étape en choisissant le site où aura lieu le clivage et en organisant l'anneau de contraction. La cytokinèse survient lorsque l'anneau de contraction sépare physiquement (processus nommé *abscission*) les deux cellules générées par l'accomplissement d'un cycle cellulaire [26]. L'anneau de contraction est formé de filaments d'actine, de myosine II, de formine, de profiline et de coffiline. La contraction ainsi que son contrôle nécessitent la participation de quelque 130 gènes, faisant de la cytokinèse un événement cellulaire très élaboré [26]. L'assemblage de l'anneau requiert notamment la participation de la GTPase RhoA, de même que plusieurs GAP (*GTPase-activating protein*) et GEF (*Guanine nucleotide exchange factor*). La réalisation des différentes étapes de la cytokinèse fait intervenir les kinases de la famille Aurora et *Polo-like kinase*, qui contrôlent l'activité de certains acteurs clés [27]. Lorsqu'il y a contraction de l'anneau, tout le réarrangement de la membrane plasmique ainsi généré provoque la formation du sillon de clivage [28].

### 1.1.3 La machinerie du cycle cellulaire

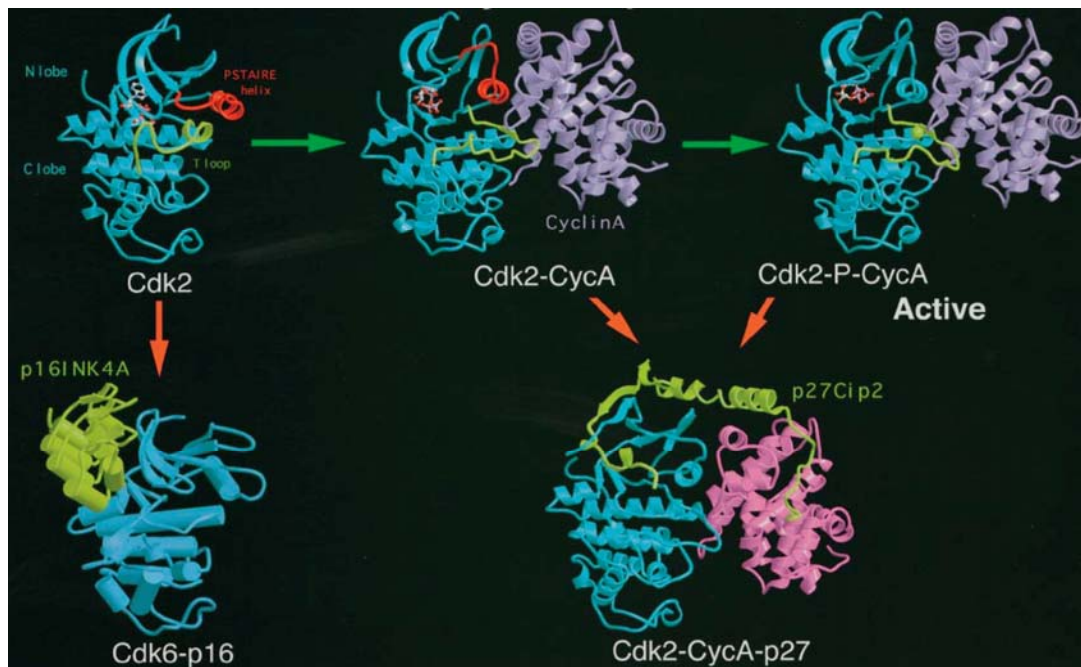
Les différentes phases et étapes décrites dans la Section précédente sont exécutées de manière ordonnée et unidirectionnelle, c'est-à-dire qu'une fois que le cycle de division est engagé, la cellule ne peut revenir en arrière. L'avancée dans chacune des phases est contrôlée par phosphorylation des différents effecteurs du cycle cellulaire par les complexes de kinases CDK/cyclines. La régulation de ces dernières est très complexe et repose principalement sur : 1) la disponibilité des sous-

unités régulatrices, les cyclines, 2) l'action des inhibiteurs de CDKs (*cyclin-dependent kinase inhibitors*, CKI) et 3) l'état de phosphorylation des CDKs. En 2001, L. Hartwell, P. Nurse et T. Hunt ont reçu le *Prix Nobel en Médecine ou Physiologie* afin de souligner l'importance de leurs travaux sur ces « régulateurs clés du cycle cellulaire ».

La progression du cycle cellulaire dans un seul sens est assurée par la dégradation par le protéasome 26S de plusieurs protéines qui exécutent sa progression. Interdire à la cellule de revenir en arrière est fondamental afin d'empêcher qu'il y ait deux rondes de répllication de l'ADN et pour ne pas perturber la ségrégation des chromosomes au cours d'un même cycle. Pour ce faire, deux complexes multiprotéiques de E3 ubiquitine ligases (E3 ligases), SCF et APC, ubiquitinent les différents régulateurs/effecteurs et ainsi induisent leur dégradation par le protéasome. Il existe des relations très élaborées entre les CDK/cyclines et les E3 ligases de même qu'entre les complexes SCF et APC.

### 1.1.3.1 Les kinases dépendantes des cyclines

Les kinases dépendantes des cyclines (*Cyclin-dependent kinases*, CDKs) catalysent le transfert du phosphate en position  $\gamma$  de l'ATP sur le groupement hydroxyle d'une sérine ou d'une thréonine de leurs substrats lorsque ces résidus sont suivis d'une proline (*proline-directed kinases*). Elles sont composées d'une sous-unité catalytique CDK et d'une sous-unité régulatrice cycline [29]. Leur structure est organisée de telle sorte qu'on retrouve un petit lobe N-terminal constitué d'un feuillet  $\beta$  et de l'hélice PSTAIRE (motif unique d'interaction avec les cyclines) et un plus gros lobe C-terminal composé principalement d'hélices  $\alpha$  (Figure 1.3) [30]. Le génome humain contient 21 gènes de CDKs et cinq *CDK-like*, qui n'ont cependant pas toutes un partenaire cycline d'identifié et qui sont, pour la majorité, très peu caractérisées [31, 32]. Les CDKs ont des rôles à jouer dans la transcription, les fonctions neuronales, la différenciation et le cycle cellulaire. Chez les mammifères, il y a quatre différentes CDKs responsables de l'entrée et de la progression dans les phases du cycle : CDK2/4/6 en interphase et CDK1 en mitose (Figure 1.4 et Tableau I



**Figure 1.3 Changements structuraux d'activation ou d'inhibition des complexes CDK/cyclines**

CDK2 est représentée en bleu, sa boucle d'activation en jaune, la cycline A en mauve ou rose et les CKI p16 et p27 en jaune. Les structures des protéines sont représentées en modèles de rubans [33]. Sur ces modèles, on voit bien le changement de conformation imposé à la boucle d'activation de CDK2 suite à l'interaction avec la cycline A et après sa phosphorylation.

p.12 et 14) [29]. CDK7 est un autre membre de la famille des CDKs qui joue un rôle dans la transcription au sein du complexe général TFIID et qui intervient indirectement dans le cycle en phosphorylant la boucle d'activation des autres CDKs (Section 1.2.1.3.1) et [34].

### 1.1.3.2 Les cyclines

Les CDKs doivent se lier à leurs sous-unités régulatrices, les cyclines, pour être activées. C'est le groupe de T. Hunt, en 1983, qui a observé pour la première fois chez les embryons d'oursins de mer qu'une protéine, nommée cycline, est rapidement dégradée à la fin de chaque division cellulaire [35]. Les changements d'expression d'ARNm et la dégradation de la protéine via le protéasome font varier l'abondance



des cyclines au cours du cycle cellulaire [36]. Ce n'est qu'en 1989, qu'on a découvert, suite à la purification du *maturation-promoting factor* (MPF), que les cyclines sont associées aux CDKs [37, 38]. On retrouve 29 protéines qui possèdent un domaine « boîte cycline » chez les mammifères [32]. Parmi celles-ci, cinq familles sont impliquées dans le cycle, cycline A (1 et 2), B (1-3), D (1-3), E et H ( Figure 1.4 et Tableau I, p.14). La structure primaire des cyclines varie beaucoup. Leur seule caractéristique commune est la présence de la boîte cycline, une séquence de 100 acides aminés (aa) requise pour l'interaction avec les CDKs [39, 40]. La boîte cycline présente environ 30-50 % d'homologie entre les cyclines A, B, D et E. Malgré leur divergence de séquence, toutes les cyclines ont une structure tridimensionnelle

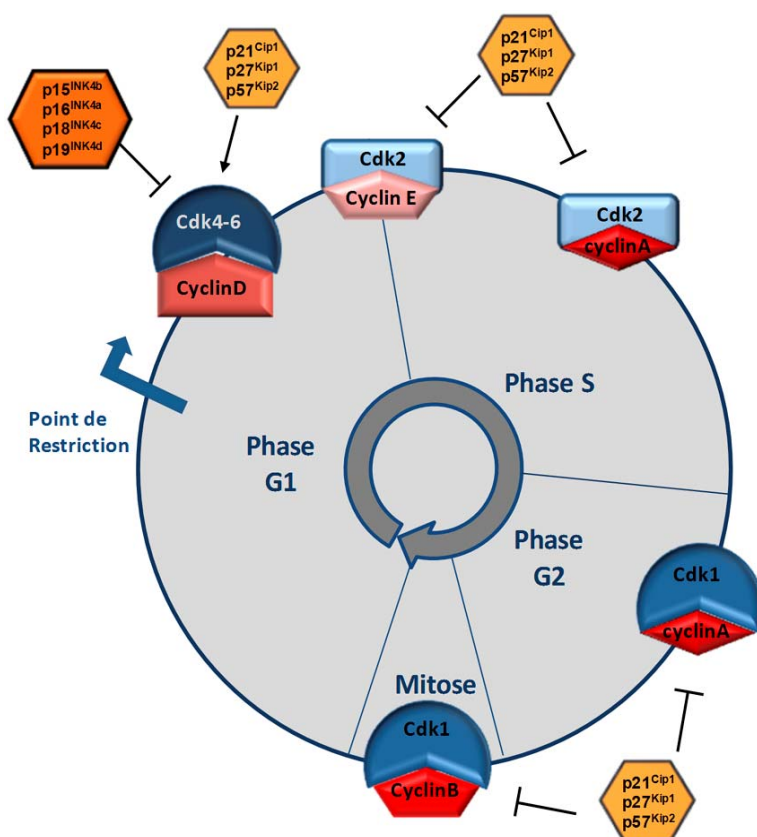


Figure 1.4 Les CDK/cyclines activées dans les différentes phases du cycle cellulaire

Les CDKs sont représentées en bleu, les cyclines en rouge et les CKI en orange.

semblable dans laquelle on retrouve le *cyclin fold* : deux domaines ayant chacun cinq hélices  $\alpha$  rapprochés l'un de l'autre (Figure 1.3, p.11) [41]. La liaison des cyclines aux CDKs a pour effet de modifier le site actif des kinases. Les changements les plus remarquables sont la conversion de l'hélice L12 en feuillet  $\beta$ , qui repositionne la boucle d'activation. Ceci a pour effet de rendre le site actif plus accessible et de modifier positivement le site de liaison de l'ATP. Alors qu'elle affecte la structure des kinases, l'interaction entre une cycline et une CDK ne modifie pas la structure rigide de la cycline [1]. Chacune des cyclines participe de façon bien précise à la progression dans le cycle via trois mécanismes : 1) leurs fonctions sont limitées au cours de phases pendant lesquelles leur expression est maximale, 2) elles contribuent directement à la reconnaissance des substrats et 3) elles permettent la localisation des CDKs aux bons endroits subcellulaires [1, 42].

### 1.1.3.3 Les Cks

En plus d'interagir avec les cyclines, les CDKs lient les protéines Cks. Cks1 (*Cyclin-dependent kinase subunit 1*) a d'abord été identifiée chez les levures *S. pombe* et *S. cerevisiae*, puis deux gènes ont été clonés chez l'humain [43]. Les expériences biochimiques et génétiques ont révélé que Cks1 interagit avec les CDKs, agissant comme un adaptateur. Les Cks (aussi nommées Suc chez *S. pombe* et Xe-p9 chez *X. laevis*) sont de très petites protéines dont la masse moléculaire varie entre 9 et 13 kDa [29]. La résolution de la structure du complexe CDK2/Cks1 a permis de mieux comprendre le rôle de Cks1 [44]. Celle-ci lie le lobe C-terminal du domaine kinase de CDK, sans toutefois modifier l'architecture du site actif ou l'affinité entre la CDK et la cycline. Le modèle cristallographique suggère plutôt que Cks1 augmente la surface d'interaction entre le complexe CDK/cycline et les substrats ou favorise l'interaction entre les CDKs et des substrats préalablement phosphorylés [1, 44]. Des expériences biochimiques chez la grenouille ont démontré que Xe-p9 favorise l'entrée en mitose en permettant l'activation de CDK1 et entraîne la sortie de mitose en facilitant la dégradation de la cycline B [45]. Par contre, l'inactivation du gène *Cks1* chez la souris révèle principalement un rôle qui est indépendant de son interaction avec les CDKs, mais qui relève plutôt de sa capacité à promouvoir

**Tableau I Les CDKs, les cyclines, les inhibiteurs et leurs substrats**

CDKs	Cyclines	CKI	Substrats	Phases
CDK1 (cdc2)	A1, A2, B1, B2	p21 <sup>Cip/Waf1</sup> , p27 <sup>Kip1</sup> , p57 <sup>Kip2</sup>	APC, Cdc7, Cdc20, Cdc25A/C, Cdh1, EGFR, GM130, GRASP65, Lamines A-C, MCM2/4, NPC, Orc1, p53, Séparase, Survivin, vimentine	S et M
CDK2	A1, A2, E1, E2	p21 <sup>Cip/Waf1</sup> , p27 <sup>Kip1</sup> , p57 <sup>Kip2</sup>	B-Myb, CBP/p300, Cdc6, Cdt1, MCM2/4, p107, p21 <sup>Cip1</sup> , p27 <sup>Kip1</sup> , p53, Rb,	S(A) et G1/S (E)
CDK4	D1, D2, D3	p15 <sup>INK4b</sup> , p16 <sup>INK4a</sup> , p18 <sup>INK4c</sup> , p19 <sup>INK4d</sup>	p107, p130, Rb	G1/S
CDK6	D1, D2, D3	p15 <sup>INK4b</sup> , p16 <sup>INK4a</sup> , p18 <sup>INK4c</sup> , p19 <sup>INK4d</sup>	p107, p130, Rb	G1/S
CDK7	H		CDK1/2/4/6, RNA Polymérase II	G1, S, G2 et M

Inspiré de [1, 32, 36, 46].

l'interaction entre le complexe SFC<sup>Skp2</sup> et l'inhibiteur p27 [47]. En fait, les souris *Cks1<sup>-/-</sup>* sont très petites et les cellules isolées de ces souris prolifèrent très peu en culture. Ces phénotypes sont attribuables au fait que l'expression de l'inhibiteur p27 est augmentée, puisque son ubiquitination par le complexe SCF<sup>Skp2</sup> est compromise (Section 1.1.3.6.3.2.) et [47, 48]. Ce rôle dans l'ubiquitination n'est pas partagé par *Cks2* qui agit principalement pour faciliter la phosphorylation par les CDKs. Ainsi, la délétion génétique de *Cks2* chez la souris est viable, mais les souris sont stériles dû à un arrêt des gamètes à la métaphase de la méiose I [49]. La viabilité des souris simples KO des *Cks* peut s'expliquer par la redondance fonctionnelle entre les deux gènes. Abondant dans ce sens, les souris *Cks1<sup>-/-</sup>Cks2<sup>-/-</sup>* meurent avant l'implantation au stade morula après deux à quatre divisions cellulaires, démontrant leur rôle essentiel dans le contrôle de la prolifération [50].

### 1.1.3.4 Les inhibiteurs de CDKs

L'activité des CDKs est modulée positivement par leur association avec les cyclines. Toutefois, les CDKs qui contrôlent la progression en G1 et l'entrée en phase S peuvent être régulées négativement par deux classes d'inhibiteurs (*CDK inhibitors*, CKI). Le premier groupe est composé des membres de la famille des INK4 (*inhibitors of CDK4*) : p15<sup>INK4b</sup>, p16<sup>INK4a</sup>, p18<sup>INK4c</sup> et p19<sup>INK4d</sup> (Tableau I) [46]. Les premières évidences de l'existence des membres de cette famille ont été obtenues en analysant la composition des complexes CDKs suite à la transformation des cellules par le virus SV40 [51]. Les membres de cette famille inhibent la progression dans le cycle, en se liant de manière spécifique à CDK4/6, les empêchant de former des complexes avec les cyclines D (Figure 1.4, p.12) [42, 46]. Le deuxième groupe d'inhibiteurs des CDKs est défini par les trois membres de la famille Cip/Kip : p21<sup>Cip/Waf1</sup>, p27<sup>Kip1</sup> et p57<sup>Kip2</sup> (Tableau I) [46, 52]. Ces petites protéines ont la capacité de lier à la fois les CDKs et les cyclines. p21 peut aussi interagir avec PCNA (*Proliferating cell nuclear antigen*) via son domaine C-terminal, ce qui a pour effet d'arrêter la réplication lorsqu'il y a des dommages à l'ADN [53]. Des analyses structurales du complexe p27-CDK2-cycline A ont révélé que l'interaction de p27 prévient la liaison de la molécule d'ATP en plus de restructurer le lobe N-terminal de la kinase (Figure 1.3, p.11) [33]. Bien qu'initialement on croyait que ces protéines inhibaient seulement les complexes CDK2/cycline E-A [46], maintenant il y a des évidences qui suggèrent qu'elles contrôlent aussi l'entrée en mitose en se liant à CDK2/cycline A et CDK1/cycline B (Section 1.2) et [54-59].

Les protéines Cip/Kip ont également la particularité intéressante de favoriser l'assemblage des complexes CDK4-6/cyclines D, ce qui fait de ces molécules à la fois des inhibiteurs et des activateurs du cycle. Il a été démontré, *in vitro*, que les Cip/Kip permettent d'augmenter l'affinité entre CDK4/6 et les cyclines D [60]. Cette association est compromise *in vivo* dans les MEFs (*Mouse embryonic fibroblasts*) p21<sup>-/-</sup> ou p27<sup>-/-</sup> [61]. De plus, il semble que les complexes CDK4-6/cycline D contrôlent la disponibilité de p21 et p27. Par exemple, puisque la quasi-totalité de p21 et p27 est séquestrée par CDK4-6/cyclines D dans des cellules en prolifération,

CDK2 y est plus active [46]. Cependant, lorsque les cellules sont soumises à des signaux antiprolifératifs, tel le TGF- $\beta$ , il y a induction et stabilisation de la protéine p15<sup>INK4a</sup> qui s'associe avec CDK4/6, libérant alors p21 et p27 [62, 63]. Les Cip/Kip peuvent à ce moment inhiber l'activité catalytique de CDK2.

### 1.1.3.5 L'activité des complexes CDK/cyclines

Lorsque les récepteurs membranaires de la cellule perçoivent la présence d'une quantité suffisante de facteurs de croissance dans le milieu extracellulaire, leur activation a pour effet de provoquer la synthèse et l'accumulation de cycline D. Celle-ci entraîne le transport au noyau et l'activation de CDK4 et CDK6 [32]. L'impact de ces complexes de kinases sur la progression en phase G1 provient de leur capacité à phosphoryler la protéine pRb sur plusieurs sites. pRb est un membre de la famille des *pocket proteins* qui inclut également p107 et p130 [64]. pRB inhibe la progression dans le cycle en se liant aux facteurs de transcription de la famille E2F, responsables de la transcription de gènes requis pour l'exécution de la phase S, aux histones déacétylases et aux facteurs de remodelage de la chromatine [65, 66]. La cellule devient irrémédiablement engagée pour un autre cycle cellulaire lorsque pRb ne peut plus exercer son effet inhibiteur. Cette protéine est donc « l'interrupteur » qu'il faut éteindre pour franchir le point de restriction et engager la cellule dans le processus de division. pRb est hypophosphorylée en phase G0/G1, mais son état de phosphorylation augmente au cours de la phase G1 due à l'activité CDK4-6/cycline D et reste élevé jusqu'à la fin de la mitose [67]. La forme hyperphosphorylée de pRb n'a plus la capacité de s'associer aux facteurs de transcription E2F. Il a été démontré qu'en l'absence de pRb, la progression dans la phase G1 se produit malgré l'inhibition de l'activité du complexe CDK4-6/cycline D [68-71]. Ces résultats suggèrent que CDK4-6/cycline D ne sont pas essentielles au déroulement du cycle cellulaire en soi. Ils permettent plutôt d'intégrer les signaux provenant du milieu extracellulaire à la mise en marche du cycle. D'ailleurs, le groupe de M. Barbacid a généré des souris *Cdk2<sup>-/-</sup>-Cdk3<sup>-/-</sup>-Cdk4<sup>-/-</sup>-Cdk6<sup>-/-</sup>* qui se développent normalement jusqu'au milieu de la gestation, après l'organogénèse, indiquant que les cellules peuvent se diviser sans ces CDKs [72]. Par contre, les embryons *Cdk1<sup>-/-</sup>* ne peuvent se

développer jusqu'aux stades plus primitifs de morula et blastocytes. Ces résultats d'analyse génétique chez la souris révèlent que même si les vertébrés ont plusieurs CDKs, le cycle cellulaire n'a une dépendance stricte que pour CDK1. D'ailleurs, la levure *S. pombe* ne possède qu'une seule CDK dans son génome, qui est l'orthologue de CDK1 [73].

L'activation des facteurs de transcription de la famille E2F, en association avec les membres de la famille DP (*Dimerization partner*), entraîne la synthèse de la cycline E en fin de G1. Plusieurs expériences ont démontré que le contrôle de la transcription de la cycline E, qui permet l'activation de CDK2, est la principale fonction de pRb (revue dans [74]). Le complexe CDK2/cycline E activé va alors complètement phosphoryler et inhiber pRb, constituant ainsi une boucle de rétroaction positive [75, 76]. Les autres cibles importantes du complexe CDK2/cycline E sont les facteurs d'initiation de la réplication de l'ADN tels que les protéines MCM, Cdt1 et Cdc6, l'inhibiteur p27 et sa E3 ligase Skp2, l'histone acétyltransférase CBP/p300 et le facteur de transcription NPAT (impliqué dans la transcription des gènes d'histones) [74]. Lorsque la synthèse de l'ADN est entamée, il doit y avoir inactivation rapide de CDK2/cycline E afin de prévenir une deuxième ronde de réplication de l'ADN. Ceci est accompli suite à la dégradation de la cycline E par le protéasome (Section 1.1.3.5.3.1).

Parmi les autres cibles transcriptionnelles de E2F, on retrouve la cycline A. L'expression de celle-ci commence au début de la phase S et est maintenue jusqu'en prométaphase. La cycline A possède la particularité de pouvoir contrôler des événements en phase S et en mitose, en s'associant à CDK2 et CDK1 [77-79]. Le complexe CDK2/cycline A phosphoryle plusieurs protéines de la machinerie de réplication de l'ADN [80]. Une boucle à rétroaction négative est créée lorsque l'activité transcriptionnelle de E2F est inhibée suite à sa phosphorylation par le complexe CDK2/cycline A [81-83].

Le complexe CDK2/cycline A de même que le complexe CDK1/cycline A sont actifs au début de la mitose, jusqu'à ce que la cycline A soit dégradée par le protéasome en prométaphase [77, 84]. Par la suite, CDK1 en association avec la

cycline B est la principale kinase responsable des changements cellulaires en mitose. La Section 1.2 est consacrée à la régulation de ce complexe et aux différents mécanismes qui permettent l'entrée en mitose. La division cellulaire se termine au moment où l'activité CDK est complètement réduite, suite à la dégradation de la cycline B par le protéasome.

### **1.1.3.6 La dégradation des protéines par le système ubiquitine-protéasome : SCF et APC/C**

La progression dans le cycle est en grande partie attribuable à l'action des CDKs. Cependant, la dégradation de certains régulateurs importants par le protéasome 26S rend le processus irréversible et maintient à des niveaux très bas des protéines impliquées dans l'exécution de phases futures. Les complexes multiprotéiques SCF et APC/C sont très bien conservés au cours de l'évolution [85, 86]. Ils sont membres de la famille des E3 ubiquitine ligases à domaine RING (*Really interesting new gene*). Le génome humain contient environ 600 gènes de E3 à domaine RING. Il n'est donc pas surprenant que des protéines à domaine RING soient impliquées dans presque tous les processus cellulaires, dont le contrôle de la prolifération. Contrairement aux E3 ubiquitine ligases à domaine HECT (*Homologous to E6-AP carboxy terminus*) qui catalysent elles-mêmes la formation de chaînes de polyubiquitines sur leurs substrats, les E3 à domaine RING servent plutôt de plateforme pour permettre le transfert de l'ubiquitine de la E2 aux substrats [87].

#### **1.1.3.6.1 Structure du SCF**

Les E3 ligases de la famille SCF (*Skp1-Cullin-F-box protein*) forment des complexes à quatre sous-unités (Figure 1.5 A) [85]. La protéine Culline 1 (Cul1) agit comme protéine d'échafaudage. Son domaine C-terminal lie la protéine Rbx, qui possède un domaine RING, et une E2 [88]. Skp1 (*S-phase kinase-associated protein 1*), quant à elle, interagit avec le N-terminal de Cul1 et sert d'adaptateur pour les protéines à boîte F (FBP, *F-box proteins*). Cul1 est soumise à la néddylation, une modification post-traductionnelle importante pour l'activité enzymatique du complexe [89]. Suite à une réaction enzymatique à trois étapes, semblable à celle

responsable de l'activation de l'ubiquitine, NEDD8 (*Neural precursor cell expressed developmentally down-regulated protein 8*) est liée à ses substrats. L'ajout d'une molécule NEDD8 induit un changement de conformation majeur au domaine inhibiteur en C-terminal de Cul1. Ceci favorise le recrutement de la E2 et facilite le transfert des molécules d'ubiquitines en permettant à Rbx1-E2 de se rapprocher du substrat [90, 91].

Ce sont les FBPs qui interagissent avec les substrats et qui confèrent la spécificité aux réactions d'ubiquitination effectuées par les complexes SCF [92]. Les 68 FBPs humaines sont classées selon le type de domaine d'interaction protéine-protéine qu'elles possèdent : FBXW (*F-box* à domaine *WD40 repeats*), FBXL (*F-box* à répétitions riche en leucines) et FBXO (*F-box* avec d'autres domaines d'interaction). Trois FBPs dont les substrats sont bien caractérisés jouent des rôles bien définis dans le contrôle du cycle cellulaire, soit Skp2/FBXL1,  $\beta$ -TrCP/FBXW1 ( *$\beta$ -transducin repeats-containing proteins*) et Fbw7/ FBXW7. Emi1/FBXO5 (*Early mitotic inhibitor 1*) est également impliqué dans le contrôle du cycle cellulaire en tant qu'inhibiteur de l'APC/C (Section 1.1.3.5.2), mais aucun substrat ne lui est connu à ce jour [85]. Il est généralement accepté que les complexes SCF impliqués dans le cycle cellulaire reconnaissent leurs substrats lorsque ceux-ci sont phosphorylés. Par

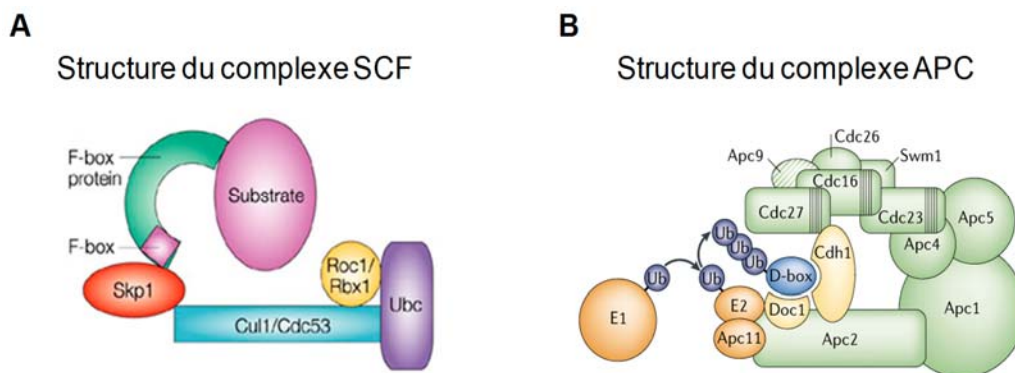


Figure 1.5 **Les complexes SCF et APC**

A) Représentation schématique du complexe SCF. Culline 1 est en bleu, Skp1 est en rouge, la FBP est en rose et vert, Rbx est en jaune. D'après [93]. B) Représentation de la structure du complexe APC<sup>Cdh1</sup> en présence d'une E2 et d'un substrat (D-box) [94]. Inspiré du modèle obtenu en microscopie en cryo-électron [95].



exemple,  $\beta$ -TrCP se lie au phosphodégron  $\text{DpS(X)}_{2+n}\text{pS}$ , où X est n'importe quel aa [96].

#### 1.1.3.6.2 Structure de l'APC/C

L'APC/C (*Anaphase-promoting complex/Cyclosome*) est formée par l'assemblage de 12 sous-unités (Figure 1.5 B) [94, 97]. À l'image des complexes SCF, l'organisation de l'APC repose sur une protéine d'échafaudage centrale *cullin-like*, APC2, qui interagit avec APC11, une petite protéine à domaine RING. Cette dernière permet le recrutement d'une E2 (UbcH5, UbcH10 ou E2-25K chez l'humain) pour catalyser la réaction d'ubiquitination [97]. On ne comprend pas encore exactement la raison pour laquelle l'APC est constituée d'autant de sous-unités et quel est le rôle précis de chacune. Ces interrogations proviennent entre autres du fait qu'une réaction d'ubiquitination peut être reconstituée *in vitro* en présence de l'APC11 et d'une E2 seulement [98, 99]. *In vivo*, l'APC nécessite la participation des co-activateurs Cdh1 et Cdc20 qui possèdent des domaines d'interactions protéine-protéine WD40 dans leur domaine C-terminal [94]. Ceux-ci interagissent avec différents motifs présents sur leurs substrats : les boîtes D, les boîtes KEN et les boîtes A [100-102]. Il a été démontré que la reconnaissance et l'interaction de Cdh1 et Cdc20 avec leurs substrats est facilitée par la protéine Doc1 (*Destruction of cyclin B 1*) [103, 104].

Alors que la phosphorylation des substrats du SCF établit le moment où ils sont ubiquitinés, l'état de phosphorylation de l'APC et de ses co-activateurs détermine leur niveau d'activation. Au cours de la mitose, l'interaction entre Cdc20 et l'APC est induite par leur phosphorylation sur plusieurs sites [94, 105, 106]. En fait, presque toutes les sous-unités de l'APC sont phosphorylées en mitose [106]. À l'opposé, la phosphorylation de Cdh1 au cours de la mitose inhibe son interaction avec l'APC [107]. En sortie de mitose, lorsque Cdh1 est déphosphorylé, il peut interagir à nouveau avec l'APC. Ces différents modes d'activation permettent à la cellule d'utiliser Cdc20 pour dégrader la cycline B et initier la sortie de mitose lorsque les niveaux d'activités CDK sont encore très élevés. De l'autre côté, la cellule utilise plutôt Cdh1 pour maintenir l'activité CDK cellulaire à des niveaux très faibles

et pour préparer la réplication de l'ADN. En plus de la phosphorylation, le point de contrôle du fuseau mitotique et l'abondance de la protéine Emi1 sont d'autres facteurs qui affectent l'activité catalytique de l'APC (revue dans [108, 109]).

Toutefois, quelques études ont démontré que l'ubiquitination de certains substrats de l'APC est également modulée suite à leur phosphorylation, ce qui vient quelque peu modifier le dogme. C'est le cas notamment des substrats de l'APC<sup>Cdh1</sup> Aurora A, Pds1 (l'homologue de la Sécurine chez la levure), Cdc6 et Skp2, qui sont protégés de l'ubiquitination lorsqu'ils sont phosphorylés [102, 110-112]. La phosphorylation du facteur de transcription AML1 (*Acute myeloid leukemia 1 protein*) et de la protéine anti-apoptotique Mcl-1 (*Myeloid cell leukemia sequence 1*), quant à elle, favorise leur dégradation par l'APC<sup>Cdc20</sup> [113, 114].

**Tableau II Les co-activateurs des complexes SCF et APC, leurs substrats et les phases du cycle.**

E3 ligase	Activateurs	Substrats	Phases du cycle
APC	Cdh1	Cdc6	G0
		Cdc25A, Cycline A/B, Skp2, Tome-1, Cdc6	G1
		Géminine(?)	Métaphase-Anaphase
		Plk1, Cycline A/B, Aurora A/B, Tpx2, Cdc20, Anillin, Shugoshin	Fin de Mitose
Cdc20		Nek2A, Cycline A, p21	prophase/prométaphase
		Sécurine, Cycline B1, Géminine(?)	Métaphase-Anaphase
SCF	Skp2	p21, p27, p57, p130, c-Myc	G1
		Cdt1, Orc1, c-Myc, Cycline E	S
		Cycline A/D	G2
	β-TrCP	Cdc25A Claspine, Wee1, REST Emi1, Bora	S G2 Mitose
FBw7		c-Myc, c-Jun, Cyclin E	Tout le cycle

Réalisé à partir de [115-118].

### 1.1.3.6.3 Régulation et fonctions des complexes SCF et APC dans le cycle cellulaire

#### 1.1.3.6.3.1 La progression dans la phase G1 et la préparation à la réplication

La formation des complexes pré-RC est un événement rigoureusement contrôlé afin que la réplication de l'ADN n'ait lieu qu'une seule fois par cycle cellulaire. L'APC<sup>Cdh1</sup> est un régulateur important de l'étiquetage des origines de réplication. Par exemple, la cycline A et la géminine, une protéine inhibitrice de l'assemblage des complexes pré-RC, sont dégradées en mitose et en G1 suite à leur ubiquitination par Cdh1 [119, 120]. L'expression de la géminine est élevée en phase S, G2 et début de mitose lorsque l'APC<sup>Cdh1</sup> est inhibé et qu'une seconde réplication du génome doit être prévenue. D'un autre côté, l'APC<sup>Cdh1</sup> ubiquitine le facteur Cdc6 responsable de l'assemblage des complexes pré-RC lorsque les cellules sont en quiescence [110, 121]. Comment la formation des complexes de pré-RC est-elle possible alors que Cdh1 ubiquitine autant des inhibiteurs que des composantes de ces complexes? Une partie de la réponse est venue du groupe de J Diffley. Tandis qu'il est accepté que l'activité CDK intracellulaire élevée prévient la formation de nouveaux complexes de réplication, il a démontré que les CDKs peuvent également la favoriser en phosphorylant Cdc6 [110]. Cette phosphorylation inhibe l'interaction entre Cdc6 et Cdh1 et stabilise ainsi Cdc6. Ceci permet d'expliquer le comportement de Cdh1 envers ses différents substrats pour permettre la formation des complexes pré-RC.

L'APC<sup>Cdh1</sup> contrôle également l'entrée en phase S en ubiquitinant Skp2 durant la phase G1 [111, 122, 123]. Les niveaux de Skp2 sont très faibles au début de la phase G1, augmentent à partir de la transition G1/S et demeurent élevés jusqu'en sortie de mitose. Notre laboratoire a réalisé une étude, dans laquelle il a été démontré que la dégradation de Skp2 est bloquée de la mi-G1 à la fin de la mitose suite à la phosphorylation de sa sérine 64 par CDK2/cycline E [111]. Cette phosphorylation prévient l'interaction avec Cdh1, comme c'est le cas pour Cdc6. En sortie de mitose et au début de la phase G1, Skp2 est ubiquitinée après avoir été déphosphorylée par la phosphatase Cdc14B.

### 1.1.3.6.3.2 L'entrée en phase S

Lorsque le complexe CDK2/cycline E est activé à la transition G1/S, il phosphoryle l'inhibiteur du cycle cellulaire p27 sur la thréonine 187 [124, 125]. Cette phosphorylation provoque l'interaction entre p27 et le complexe SCF<sup>Skp2</sup> [126, 127]. p27 est alors ubiquitiné, ce qui entraîne sa dégradation et, par le fait même, l'activation encore plus soutenue des complexes CDK2. Bien que Skp2 puisse promouvoir la dégradation de plusieurs protéines (voir Tableau II, p.21), les expériences génétiques suggèrent que p27 est son principal substrat. En fait, dans les MEFs *Skp2*<sup>-/-</sup>, il y a une forte accumulation de p27 [128]. Les souris *Skp2*<sup>-/-</sup> ont également un phénotype cellulaire complexe : les cellules ont des noyaux plus gros, sont polyploïdes, ont des centrosomes surnuméraires et prolifèrent moins rapidement que les cellules de type sauvage. Tous ces phénotypes sont atténués lorsque p27 est inactivé simultanément à Skp2 [59, 129]. En plus de réguler la transition G1/S, il a été démontré que Skp2, toujours via l'ubiquitination et la dégradation de p27, peut également réguler l'entrée en mitose [59]. Effectivement, dans les cellules *Skp2*<sup>-/-</sup>, l'activité de CDK1 est moins élevée que dans les cellules contrôles, ce qui retarde l'entrée en mitose. p27 agit donc à la fois comme inhibiteur de l'entrée en phase S et de l'entrée en mitose.

Au cours de la phase S, l'activité du complexe CDK2/cycline E diminue radicalement, lorsque la cycline E est dégradée par SCF<sup>Skp2</sup> indépendamment de sa phosphorylation et par SCF<sup>Fbw7</sup> lorsque la Thr 380 est phosphorylée par CDK2 ou GSK3 [128, 130, 131]. La progression en phase S est assurée en partie par les complexes CDK2/cycline A. L'accumulation de la cycline A en fin de G1 survient lorsque l'APC<sup>Cdh1</sup> est inactivée [132]. Ceci est effectué par trois mécanismes principaux. Tout d'abord, l'augmentation de l'activité CDK en fin de G1 et au début de la phase S permet la phosphorylation et l'inhibition de l'APC<sup>Cdh1</sup> [133-135]. Ensuite, il a été proposé que l'ubiquitination de la E2 UbcH10 par l'APC<sup>Cdh1</sup> en fin de phase G1 constituerait un autre mécanisme inhibiteur [136]. Étant encore un sujet de controverse, le groupe de J. Pines suggère plutôt que UbcH10 serait limitant dans l'activité de l'APC<sup>Cdh1</sup> en G1, mais que sa dégradation ne représenterait pas un

mécanisme autonome d'inhibition [137]. Finalement, les facteurs de transcription E2F permettent la synthèse de Emi1 au début de la phase S [138]. Emi1 est un inhibiteur qui lie à la fois l'APC et Cdh1, ce qui bloque leur accès aux substrats [139]. Emi1 agit comme un pseudo-substrat grâce à sa boîte D reconnue par Cdh1. L'inhibition de l'APC en fin de G1 permet donc à la cellule d'accumuler les cyclines qui lui sont essentielles pour le déroulement de la phase S et de la mitose.

### 1.1.3.6.3.3 La progression en mitose

Les premiers substrats de l'APC à être dégradés en mitose le sont dès la prométaphase, bien avant que tous les kinétochores ne soient attachés correctement aux microtubules. L'activation de l'APC en début de mitose est déclenchée suite à la dégradation par le protéasome de l'inhibiteur Emi1 [140]. En mitose, les kinases CDK1/cycline B et Plk1 (*Polo-like kinase 1*) phosphorylent Emi1 [141, 142]. Ceci a pour effet de créer un site d'interaction avec SCF <sup>$\beta$ -TrCP</sup> qui peut ainsi l'ubiquitiner. Le complexe SCF <sup>$\beta$ -TrCP</sup> est également impliqué dans l'entrée en mitose et dans le point de contrôle en G2 en entraînant la dégradation de Wee1 et Cdc25A (Sections 1.2.1.3.2.1 et 1.2.1.3.2.2) et [115].

La cycline A et la kinase Nek2A (*NIMA (Never in mitosis gene a)-related kinase 2A*) sont dégradées rapidement au début de la mitose. Des expériences avec Nek2A ont démontré que l'APC n'a pas besoin de coactivateurs pour l'ubiquitiner [143, 144]. Ces observations expliquent comment l'ubiquitination de substrats par l'APC est possible alors qu'il est reconnu que l'APC<sup>Cdc20</sup> est maintenu inactif par la machinerie du point de contrôle des fuseaux mitotiques. Cependant, l'inhibiteur du cycle cellulaire p21 est, quant à lui, ubiquitiné par Cdc20 dès la prométaphase [145]. Il semble donc que la régulation de l'activité de l'APC soit très complexe et dépende du substrat à dégrader. Des expériences biochimiques effectuées par le groupe de M. Kirshner suggèrent que l'APC a des substrats « processifs » qui sont polyubiquitinés suite à une seule interaction avec l'APC ainsi que des substrats « distributifs » qui requièrent plusieurs cycles d'interaction pour être polyubiquitinés [146]. Cette classification des substrats de l'APC aide à comprendre comment celui-ci parvient

à ubiquitiner ses substrats dans le « bon ordre ».

#### 1.1.3.6.3.4 Le point de contrôle des fuseaux mitotiques

La principale fonction de l'APC<sup>Cdc20</sup> est d'amorcer la sortie de mitose en permettant la séparation des chromatides sœurs. Pour ce faire, il ubiquitine la cycline B et la Sécurine, un inhibiteur de la Séparase (Figure 1.6) (Section 1.2.1.1) et [94]. En plus de l'inhibition par la Sécurine, l'activité de la Séparase est contrôlée négativement par phosphorylation via les CDKs. Lorsque les niveaux de cycline B diminuent à la transition métaphase-anaphase, cette inhibition est levée, rendant la Séparase encore plus active [147]. Lors de la métaphase, il est essentiel que les kinétochores soient attachés aux microtubules qui émanent des deux pôles. Dans le cas contraire, le manque de tension habituellement générée par l'ancrage des kinétochores aux microtubules active le SAC (*Spindle assembly checkpoint*) (Figure 1.6) [148]. De par son rôle déterminant dans la séparation des chromosomes, le co-activateur Cdc20 représente une cible de choix pour bloquer la mitose lorsque les conditions pour exécuter la ségrégation complète des chromosomes ne sont pas parfaitement remplies. Trois mécanismes, découverts autant chez la levure que chez les mammifères, bloquent Cdc20 lors de l'activation du SAC. Premièrement, l'interaction entre Mad2 (*Mitotic arrest deficient 2*), BubR1 (*Bub1-related kinase*) et Cdc20 inhibe l'APC [149, 150]. Il est intéressant de noter que l'expression de Mad2 augmente en G2 lorsque son répresseur transcriptionnel REST (*Repressor-element-1-silencing transcription factor*) est dégradé par le complexe SCF<sup>B-TrCP</sup> [151]. Deuxièmement, le SAC augmente l'activité catalytique de la kinase Bub1 (*Budding uninhibited by benzimidazoles 1*) qui phosphoryle et inhibe Cdc20 [152]. Troisièmement, chez la levure, la liaison de Mad2 et Mad3 à Cdc20 entraîne l'auto-ubiquitination et la diminution des niveaux protéiques du co-activateur de l'APC [153]. Un tel mécanisme n'a pas encore été démontré chez les mammifères. Comment alors une cellule peut-elle inactiver le SAC lorsque tous les chromosomes sont correctement attachés aux deux pôles? Il semble que la multi-ubiquitination de Cdc20 par l'APC engendre la dissociation de Mad2 et BubR1 de Cdc20 [154], un processus largement contrôlé par l'activité de la E2 UbcH10 et de la dé-ubiquitinase

Usp44 [154]. La balance entre l'activité d'ubiquitination et de dé-ubiquitination est un mécanisme permettant à la cellule de rester alerte et d'inactiver rapidement le SAC pour l'exécution de l'anaphase.

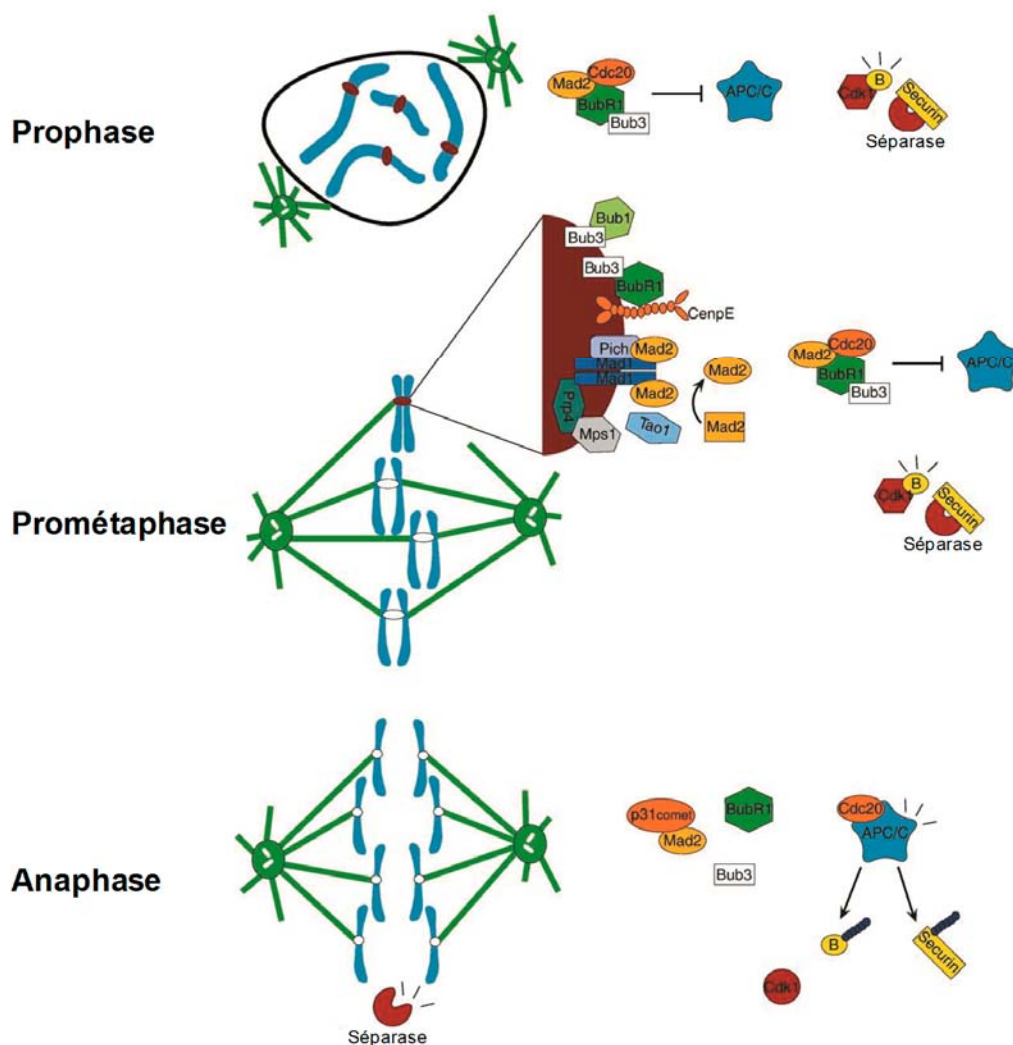


Figure 1.6 **Le point de contrôle du fuseau mitotique.**

En interphase, le complexe Mad2/Bub3/BubR1 prévient l'activation de l'APC en séquestrant et inhibant Cdc20. En prométaphase, lorsqu'un kinétochore n'est pas bien attaché aux microtubules, la machinerie du SAC, concentrée au kinétochore, est fortement activée par phosphorylation ou changement de conformation. Lorsque tous les chromosomes attachés, le SAC est éteint et l'activation de l'APC engendre la progression en anaphase. Voir le texte pour plus de détails. Figure adaptée de [155].

### 1.1.3.6.3.5 La sortie de mitose

Pour que les dernières étapes de la mitose soient complétées, l'activité CDK doit être très faible. La dégradation de la cycline B, principale cycline de la mitose, d'abord par l'APC<sup>Cdc20</sup> et ensuite par l'APC<sup>Cdh1</sup> abaisse l'activité CDK rapidement.

L'APC<sup>Cdh1</sup> est la principale E3 ligase active en fin de mitose, alors que Cdh1 est activé par la phosphatase Cdc14 (Section 1.3.1) et [115]. Elle permet la sortie de mitose en ubiquitinant plusieurs substrats, dont les kinases mitotiques Plk1 et Aurora A, la cycline B et Cdc20.

## 1.2 L'entrée en mitose repose sur CDK1/cycline B

Les mécanismes qui contrôlent l'entrée en mitose intéressent les chercheurs depuis bien longtemps. Les premières études sur le sujet visaient à élucider le processus de transition entre un arrêt en phase G2 et la mitose chez les ovocytes matures de grenouilles, suite à une stimulation hormonale ou à la fertilisation [1]. Ainsi, les expériences réalisées à l'époque ont permis d'observer une activité intracellulaire qui promeut cette transition et qui a été nommée MPF, pour *Maturation-promoting factor* [156]. L'utilisation des ovocytes d'organismes marins (oursins de mer, grenouilles et étoiles de mer) a fourni plusieurs détails concernant les modifications biochimiques nécessaires pour l'entrée en mitose : augmentation remarquable de l'activité du MPF, apparition massive de phosphorylation et nécessité de néo-synthèse de protéines. En sortie de mitose, les observations faites suggéraient que l'activité du MPF diminue radicalement et qu'il doit y avoir dégradation protéique pour inhiber une kinase dont l'activité oscille au cours de la division. Ce n'est que suite à sa purification biochimique, qu'on a constaté que le MPF est un complexe à deux sous-unités de 45 et 32 kDa possédant une activité kinase [157]. La protéine de 32 kDa du complexe est l'orthologue de la kinase Cdc2 essentielle pour la division cellulaire. Celle-ci a été identifiée chez la levure *S. pombe* dans un crible visant à trouver des régulateurs de l'entrée en mitose [158, 159]. Le séquençage de la sous-unité de 45 kDa a révélé qu'il s'agissait de la cycline B [38]. À ce moment, il était déjà connu que la cycline B est essentielle pour l'entrée en mitose, que son



expression varie au cours du cycle cellulaire et qu'elle doit être dégradée pour permettre la sortie de mitose [35, 160, 161]. Ainsi, l'activité MPF observée chez les organismes modèles est le complexe CDK1/cycline B dont la composition et la fonction sont conservées au cours de l'évolution [156]. Les expériences d'immunodéplétion, d'inactivation génétique ou d'inhibition pharmacologique du complexe affectent significativement la prolifération cellulaire et l'entrée en mitose, faisant de ce complexe le grand chef d'orchestre de la mitose [27]. Puisque son rôle est primordial, plusieurs mécanismes contrôlant son activité ont été mis en place au cours de l'évolution.

## **1.2.1 Contrôle de l'activité CDK1/cycline B**

### **1.2.1.1 Expression et dégradation de la cycline B**

La présence d'une région de régulation négative reconnue par E2F4, et d'une région CHR (*Cell cycle genes homology region*) est à l'origine de la répression de l'expression de l'ARNm de la cycline B (B1 et B2) lors de la phase G1 [162-164]. L'expression du messager de la cycline B débute en phase S et est maintenue jusqu'en mitose. En effet, il a été démontré que le promoteur de la cycline B maintient une configuration ouverte lors de la mitose lui permettant d'être occupé par des facteurs de transcription [165]. C'est la stimulation de la transcription de l'ARNm plutôt que de la traduction qui permet une forte expression de la protéine alors que la cellule progresse vers la mitose. La transcription est effectuée par différents facteurs dont, NF-Y, B-MYB, E2F et FOXM1 (Figure 1.7) [162, 163, 166]. Le facteur NF-Y, en collaboration avec le co-activateur p300, reconnaît la boîte CCAAT du promoteur de cycline B [162]. Quant au facteur de transcription B-MYB, son expression augmente au début de la phase S lorsque les facteurs E2F sont actifs [167]. Dans le but de bien synchroniser l'expression de la cycline B avec la progression dans le cycle cellulaire, tous les facteurs de transcription responsable de son expression sont activés par phosphorylation par le complexe CDK2/cycline A [168-171].

Tel que mentionné à la Section 1.1.3.5.3.5, la cycline B est polyubiquitinée d'abord par l'APC<sup>Cdc20</sup> à la transition métaphase-anaphase, puis par l'ADC<sup>Cdh1</sup> en fin

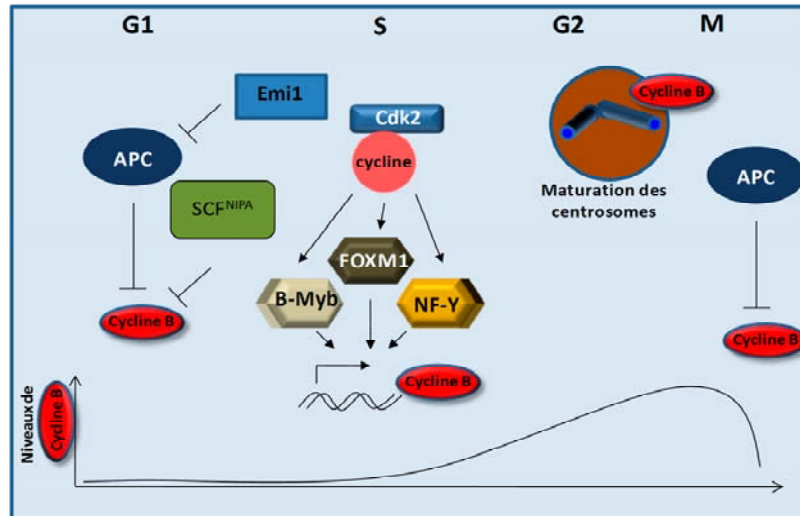


Figure 1.7 **Contrôle de l'expression de la cycline B lors du cycle cellulaire**

Illustration des différents mécanismes moléculaires impliqués dans la régulation de la cycline B. Au cours de la phase G1, les niveaux protéiques de cycline B sont maintenus bas suite à l'ubiquitination par l'APC<sup>Cdh1</sup> et SCF<sup>NIP<sup>A</sup></sup>. Au cours de la phase S, différents facteurs de transcription stimulent l'expression de la cycline B. Les premières formes activées du complexe CDK1/cycline B apparaissent en fin de G2 au centrosome où une quantité locale critique du complexe entraîne l'activation de la kinase. En fin de mitose, la cycline B est rapidement dégradée par l'APC<sup>Cdc20</sup>. Figure inspirée de [172].

de mitose et en phase G1 [173]. Ceci a pour effet d'inhiber l'activité du complexe CDK1/cycline B et engendrer la sortie de mitose. La cycline B est également polyubiquitinée en interphase par le complexe SCF<sup>NIP<sup>A</sup></sup> (*Nuclear interaction partner of ALK*) [174]. L'activité de NIP<sup>A</sup> supprime l'expression de la cycline B au noyau, où cette dernière est requise pour l'entrée en mitose (Section 1.2.1.2). Le complexe SCF<sup>NIP<sup>A</sup></sup> semble être inhibé en mitose par phosphorylation via une kinase qui demeure inconnue, ce qui empêche NIP<sup>A</sup> de lier Skp1. CDK1/cycline B amplifie l'inhibition de NIP<sup>A</sup> en la phosphorylant également, ce qui crée une boucle de rétroaction positive servant à augmenter l'activité CDK au noyau [175].

### 1.2.1.2 Localisation du complexe

Durant les phases S et G2, la cycline B est majoritairement localisée dans le cytoplasme grâce à un signal d'export nucléaire (NES) en N-terminal, nommé

*cytoplasmic retention signal* (CRS) [176, 177]. En fait, lorsque la cellule est en interphase, cycline B1 transite constamment entre le noyau et le cytoplasme, mais l'export nucléaire est plus important que l'import [178-180]. La localisation cytoplasmique de la cycline B est provoquée par l'interaction entre sa séquence CRS et le facteur d'export nucléaire Crm1 (*Chromosome region maintenance 1*) [180]. Il a été démontré par immunofluorescence, à l'aide d'anticorps phospho-spécifiques, que les formes autoactivées de CDK1/cycline B apparaissent d'abord sur les centrosomes durant la prophase [181]. Bien avant que l'enveloppe nucléaire ne soit dissociée, le complexe CDK1/cycline B doit être transporté au noyau pour induire convenablement l'entrée en mitose [176]. Par contre, les mécanismes moléculaires expliquant cet import sont quelque peu controversés, mais il semble néanmoins que l'activité de CDK1/cycline B soit requise [182]. Il a été suggéré que la phosphorylation des sérines 133 et 147 dans le NES de cycline B par la Plk1 est importante pour l'import nucléaire [183-185]. Cependant, la surexpression de la Plk1 ou son inhibition n'affectent pas la localisation de la cycline B [181, 182]. Un changement dans la vitesse d'import semble être responsable de l'accumulation nucléaire observée. Ce changement est probablement dû à une modification de l'activité de la machinerie de transport nucléaire plutôt qu'à un rôle direct de la modification de la cycline B. Le fait que le complexe soit d'abord activé dans le cytoplasme sur les centrosomes permettrait de synchroniser des changements structurels dans le cytoplasme avec les modifications nucléaires qui surviennent lorsque le complexe est importé au noyau tôt en début de mitose [182].

### **1.2.1.3 Contrôle de l'état de phosphorylation de CDK1**

Pour être pleinement activée, CDK1 doit non seulement être liée à la cycline B (ou A) mais elle doit également être dans le bon état de phosphorylation. Dans les années 80 et 90, après que le groupe de P. Nurse ait identifié et établi l'importance

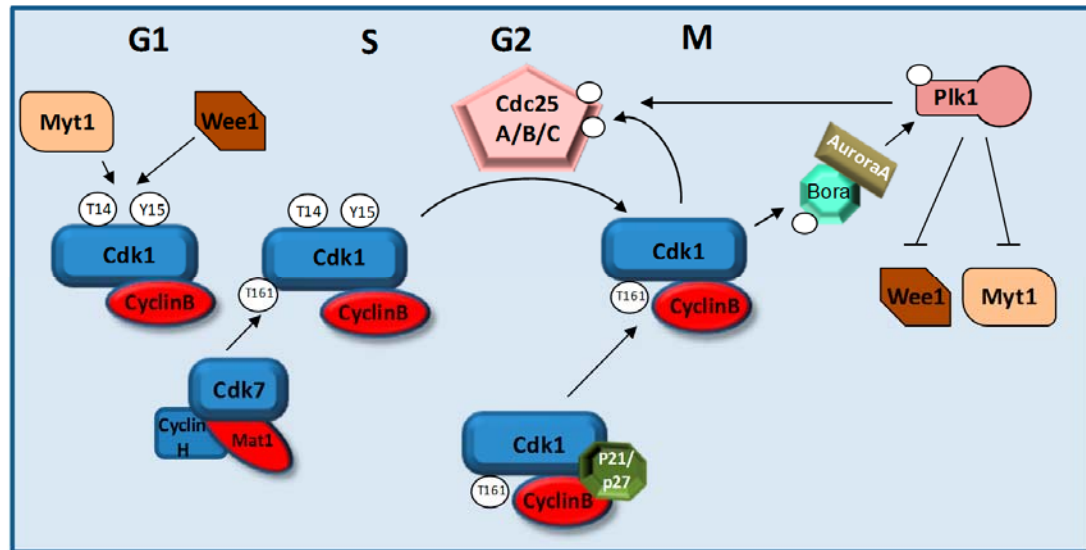


Figure 1.8 **Régulation de l'état de phosphorylation de CDK1/cycline B**

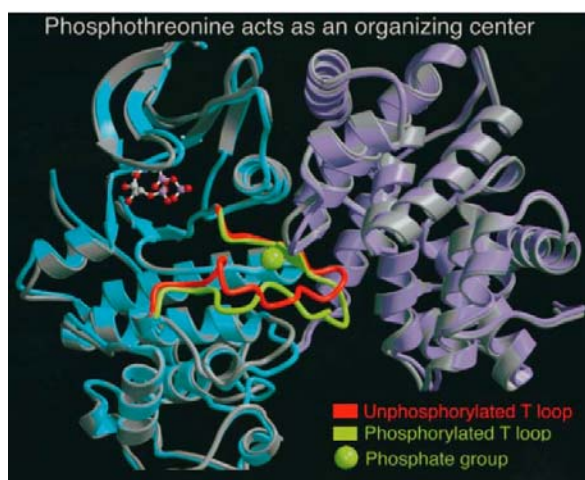
La boucle d'activation de CDK1 est phosphorylée par le complexe CAK (CDK7/cycline H/Mat1). CDK1 est inhibée par phosphorylation sur les sites Thr 14 et Tyr 15 par Wee1 et Myt1. Pour activer CDK1 et entreprendre la mitose, les phosphatases Cdc25A/B/C la déphosphorylent. CDK1 initie des boucles à rétroaction positive en activant davantage Cdc25 et en créant des cascades de phosphorylation pour inhiber Wee1 et Myt1. Voir le texte des prochaines sections pour plus de détails. Adapté à partir de [172].

cellulaire de l'enzyme Cdc2 (p34/CDK1), plusieurs groupes ont eu pour objectif de comprendre la régulation de l'activité de cette enzyme clé [158, 186-189]. Les analyses de cartes phospho-peptidiques chez les levures, les mammifères et la grenouille ont permis de constater que CDK1 est phosphorylée sur trois résidus (deux chez les levures) : une phosphorylation activatrice sur la thréonine 161 de la boucle d'activation et deux phosphorylations inhibitrices sur la Thr 14 et la Tyr 15 (Figure 1.8) [190-194].

### 1.2.1.3.1 Phosphorylation de la boucle d'activation

Plusieurs kinases doivent être phosphorylées sur leur boucle d'activation pour être pleinement actives [195]. C'est le cas notamment des CDK qui interviennent dans le contrôle de la progression du cycle cellulaire. Le phosphate de la boucle d'activation agit comme un centre d'organisation permettant de libérer le site de

liaison aux substrats et d'augmenter les contacts entre la CDK et la cycline (Figure 1.9) [196]. Puisque cette phosphorylation augmente l'activité enzymatique des complexes CDK/cycline, l'identification de la kinase responsable de cette phosphorylation a été le sujet d'intenses recherches. La kinase p40<sup>MO15</sup> est responsable de la phosphorylation de la Thr161/Thr160 de CDK1 et CDK2 [197, 198]. Considérant que la séquence de MO15 présente 40% d'homologie à celle de CDK1 et que son activité nécessite l'interaction avec la cycline H, elle a été renommée CDK7 [199, 200]. Des expériences biochimiques ont par la suite révélé que le complexe CAK (*CDK-activating kinase*) était non seulement formé d'une CDK et d'une cycline, mais également d'une protéine contenant un domaine *RING finger* : Mat1 (Ménage-à-trois 1) [201]. Le rôle de Mat1 au sein du complexe est de stabiliser l'interaction entre CDK7 et la cycline H. Puisque l'abondance des différentes sous-unités, l'activité enzymatique, la phosphorylation de la boucle d'activation de CDK7 elle-même, l'assemblage du complexe et la localisation nucléaire de CAK ne changent pas au cours du cycle cellulaire, la phosphorylation de la boucle d'activation de CDK1 ne constitue pas un réel élément de régulation de son



**Figure 1.9 Effets structuraux de la phosphorylation de la Thr 160 de CDK2**

Structure cristallographique en modèle hélices et rubans du complexe CDK2/cycline A. La CDK est en bleu et la cycline est en mauve. La boucle d'activation est représentée par deux couleurs : en jaune, la forme phosphorylée, et en rouge, la forme non phosphorylée. Le phosphate est illustré par le cercle jaune. Issu de [33].

activité [34]. Bien que la phosphorylation de la Thr 161 survienne après l'interaction entre la CDK et la cycline, du moins chez les mammifères, c'est la formation du complexe CDK/cycline qui constitue l'étape réelle de régulation. En plus de son rôle dans le cycle cellulaire, CAK possède une fonction importante dans le contrôle de la transcription, puisqu'elle phosphoryle le domaine en C-terminal de la RNA polymérase II (revue dans [34, 201]).

### 1.2.1.3.2 Phosphorylation inhibitrice

Le complexe CDK1/cycline B est maintenu dans un état inactif par la phosphorylation de CDK1. Chez tous les organismes, CDK1 est phosphorylée sur la Tyr 15 et chez les mammifères, la Thr 14 voisine l'est également [29]. Il a été initialement démontré que la mutation de la Tyr 15 en Phe provoque une entrée prématurée des levures *S. pombe* en mitose, suggérant que le contrôle de l'état de phosphorylation est important pour la fonction de Cdc2 [192]. Chez les mammifères, la Thr 14 et la Tyr 15 doivent être simultanément mutées pour provoquer l'entrée prématurée des cellules en mitose [202]. Les deux résidus Thr 14 et Tyr 15 sont situés dans la poche de liaison à l'ATP et leur phosphorylation perturbe l'orientation des phosphates de l'ATP, ce qui inhibe l'activité catalytique de CDK1/cycline B [1]. Ces aa ne sont pas exposés à la surface de la protéine dans la forme monomérique de CDK1, par contre ils le deviennent lorsque le complexe CDK/cycline est formé. Ceci est en accord avec le fait que la phosphorylation de ces sites est dépendante de l'interaction avec les cyclines [203]. L'activation du complexe CDK1/cycline B en fin de phase G2 et au début de la mitose est donc le résultat d'un changement d'équilibre entre la phosphorylation et la déphosphorylation de ces sites inhibiteurs. Récemment, il a été montré que l'expression d'un mutant non phosphorylable de CDK1 (CDK1 TYAF) dans les cellules HeLa compromet le déroulement du cycle cellulaire [204]. En fait, ce mutant provoque l'accumulation et la destruction rapide de la cycline B, génère des états semblables à la mitose (mais sans cytokinèse), et réduit considérablement la durée de la phase G1. Des phénotypes similaires sont obtenus suite à l'inhibition de l'expression de la kinase Wee1. Ces résultats suggèrent que la phosphorylation inhibitrice de CDK1 est importante pour le déroulement

normal du cycle cellulaire. Il n'est pas surprenant que des mécanismes complexes pour contrôler les kinases et les phosphatases de ces sites lorsque la cellule n'est pas tout à fait prête à entrer en mitose aient été élaborés (Section 1.4) et [205].

#### 1.2.1.3.2.1 Wee1 et Myt1

Wee1 a été identifiée chez la levure *S. pombe* lors du crible génétique qui a permis d'isoler Cdc2/CDK1 [186, 187]. Tandis que l'inactivation de Wee1 réduit la durée de la phase G2, sa surexpression la prolonge [206]. Ainsi, Wee1 coordonne la division cellulaire avec le moment où la taille cellulaire est suffisamment grande. Wee1 est la principale kinase responsable de la phosphorylation de la Tyr 15 de CDK1. Wee1 phosphoryle plus efficacement CDK1 lorsque celle-ci est en complexe avec la cycline B [207]. Chez la levure, la kinase Mik1 (*Mitotic inhibitor kinase 1*) participe également à cette phosphorylation [205]. Même si Wee1 et Mik1 phosphorylent le même site, leur activité est régulée de façon différente. Mik1 est la cible des points de contrôle alors que Wee1 est plutôt impliquée dans le contrôle de la croissance [205].

Des orthologues de Wee1 pouvant phosphoryler la Tyr 15 de CDK1 sont présents chez tous les organismes [208]. Il est intéressant de mentionner que la kinase Wee1 de mammifère phosphoryle exclusivement la Tyr 15, contrairement à celle retrouvée chez la levure qui phosphoryle également la Thr 14 [208, 209]. Chez les mammifères, la kinase Myt1 (*Membrane-associated tyrosine- and threonine-specific cdc2-inhibitory kinase 1*), homologue de Wee1, a la capacité de phosphoryler les deux résidus de CDK1 [210]. En plus de la différence de spécificité entre Wee1 et Myt1, ces deux kinases sont localisées à des endroits subcellulaires différents. Wee1 est principalement localisée au noyau en interphase, mais est également retrouvée aux centrosomes, alors que Myt1 est associée à des structures membranaires dans le cytoplasme [210-212]. De plus, Myt1 se distingue de Wee1 par sa capacité à interagir avec CDK1 via son domaine C-terminal et inhibe cette dernière de manière indépendante de son activité kinase en la séquestrant des centrosomes et du noyau, où l'activité CDK est requise pour initier la mitose [213, 214].

L'activité de Wee1 et Myt1 varie au cours du cycle cellulaire. Par exemple, les niveaux protéiques ainsi que l'activité enzymatique de Wee1 augmentent au cours de la phase S et G2 [215]. Au cours de la mitose, les deux kinases sont fortement inhibées par phosphorylation, suggérant que leur perte d'activité fait partie du processus d'activation du complexe CDK1/cycline B [215-217]. Bien qu'un tel mécanisme n'ait pas encore été clairement démontré chez les mammifères, la kinase Nim1 phosphoryle le domaine N-terminal Wee1 ce qui l'inhibe et favorise l'entrée des cellules en mitose [218, 219]. De plus, CDK1/cycline B phosphoryle Wee1 sur la Ser 123 favorisant ainsi la phosphorylation des Ser 53 et Ser 121 par les kinases Plk1 et CK2 (*Casein kinase 2*) respectivement [220]. Ces phosphorylations provoquent l'interaction entre Wee1 et SCF<sup>β-TrCP</sup> et entraînent la dégradation de Wee1 au cours de la mitose [221]. Wee1 est aussi ubiquitinée par le complexe SCF<sup>Tome-1</sup>, mais la régulation de cette interaction n'est pas bien comprise [222]. Néanmoins, l'expression d'un mutant non dégradé de Tome-1 provoque une entrée prématurée des cellules en mitose, alors que l'immuno-déplétion de Tome-1 retarde l'activation de CDK1 dû à une plus grande quantité de Wee1. De son côté, l'hyperphosphorylation de Myt1 par CDK1/cycline B et ensuite par Plk1 (sur quatre sites) inhibe son activité enzymatique [217, 223].

Ainsi, Wee1 et Myt1 sont deux kinases inhibitrices de l'entrée en mitose qui contribuent à l'accumulation en G2 d'un pool de complexes CDK1/cycline B qui attend d'être activé par les phosphatases Cdc25.

#### 1.2.1.3.2.2 Les phosphatases Cdc25

Cdc25 a été identifiée chez la levure par le groupe de P. Nurse, qui cherchait des régulateurs de l'entrée en mitose [224]. Ainsi, la surexpression de Cdc25 annule l'effet inhibiteur de Wee1, et son activité enzymatique accélère l'entrée en mitose. Lors d'un crible de complémentation du phénotype des levures mutantes pour le gène *cdc25* par des gènes humains, le même groupe a constaté que la protéine Cdc25 est une tyrosine phosphatase, dont l'activité catalytique a été confirmée peu de temps après sa découverte [225, 226]. En fait, les Cdc25 sont des protéines tyrosine phosphatase à cystéine de classe III qui ont une spécificité envers les tyrosines et les



thréonines [227]. Des orthologues de Cdc25 sont présents chez tous les eucaryotes [228]. Chez l'humain, le génome contient trois isoformes de Cdc25 (A, B et C), chacune soumise à l'épissage alternatif (revue dans [229]). Le domaine catalytique en C-terminal de la protéine présente environ 60% d'homologie entre les différentes isoformes (Figure 1.10) [230]. Ce domaine contient le motif caractéristique CX<sub>5</sub>R essentiel pour la catalyse des tyrosines phosphatases. Le domaine en N-terminal de la protéine varie beaucoup plus d'une isoforme à l'autre et ne présente qu'environ 20-25 % d'homologie [228, 231]. C'est dans ce domaine de régulation qu'on retrouve les sites de phosphorylation, les motifs d'interaction avec la protéine 14-3-3, les séquences d'import et export nucléaire ainsi que les sites d'ubiquitination (Figure 1.10) [230]. Les phosphatases Cdc25 étant très importantes pour le contrôle de la prolifération, la régulation de leur activité est très complexe et doit être exécutée parfaitement. En fait, même si aucune mutation ayant comme conséquence la

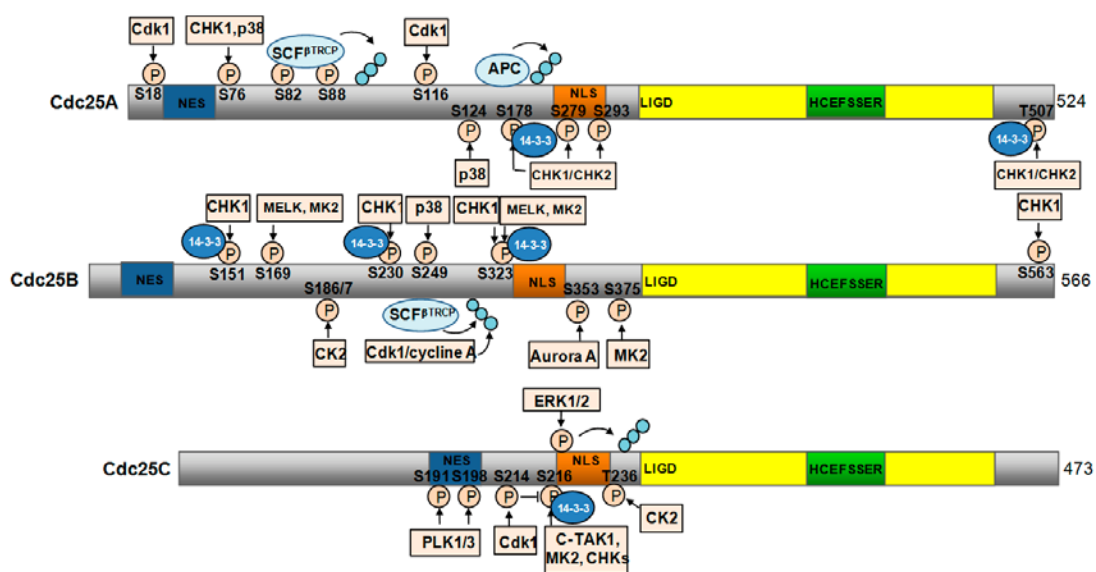


Figure 1.10 Structures et régulation des phosphatases Cdc25

Le domaine phosphatase est en jaune et les résidus hautement conservés du site actif sont indiqués dans la boîte verte. Le NES et le NLS sont représentés par les boîtes bleues et orange respectivement. Les kinases et les sites de phosphorylation sont identifiés en beige. La protéine 14-3-3 est représentée par une ellipse bleue située aux sites provoquant sont interaction. Les cercles turquoise représentent l'ubiquitination. Figure adaptée de [228, 232].

suractivation de Cdc25 n'a été identifiée, leur surexpression est observée dans plusieurs types de cancer et est associée à des formes agressives pour lesquelles le pronostic est mauvais [228].

À ce jour, CDK1 et CDK2 sont les seuls substrats connus des phosphatases à double spécificité Cdc25 [233, 234]. De par leur activité enzymatique, les Cdc25 ont la capacité de contrôler les transitions des phases G1-S et G2-M. À l'origine, Cdc25A a été plus associée à l'activation des complexes CDK2/cycline E et CDK2/cycline A, ce qui en faisait un principal régulateur de la transition G1-S [235-237]. D'un autre côté, Cdc25B et C sont reconnues pour promouvoir l'entrée en mitose en activant CDK1/cycline B [238-240]. En effet, l'utilisation de mutants inactifs ou la micro-injection d'anticorps dirigés contre Cdc25B et C arrêtent les cellules en phase G2. Toutefois, d'autres études ont forcé la reconsidération de ces dogmes. Ainsi, l'utilisation d'ARN antisens a révélé que Cdc25B et C favorisaient l'entrée en phase S [241, 242]. De plus, d'autres études similaires ont détaillé que Cdc25A contrôle l'entrée en mitose en rendant CDK1/cycline B pleinement active [243]. L'ensemble de ces études démontre donc que les trois isoformes de Cdc25 interviennent toutes dans le contrôle de chacune des transitions de phases.

Ainsi, l'analyse des rôles physiologiques chez la souris suggère également qu'il y a un certain niveau de redondance dans les fonctions de chacune des Cdc25. En effet, les souris *Cdc25C*<sup>-/-</sup> n'ont aucun phénotype particulier et les cellules obtenues de ces souris prolifèrent et entrent en mitose normalement [244]. Les souris *Cdc25B*<sup>-/-</sup>, quant à elles, sont normales, mis à part la stérilité des femelles [245]. Ce problème de stérilité résulte d'un arrêt permanent des ovocytes en prophase lors de la méiose. Par contre, les MEFs *Cdc25B*<sup>-/-</sup> prolifèrent normalement. Les souris *Cdc25A*<sup>-/-</sup>, générées plus récemment, meurent aux jours E5-7, suggérant un rôle unique pour cette phosphatase lors du développement [246]. Il avait déjà été rapporté que l'inactivation simultanée de Cdc25B et Cdc25C chez la souris n'affecte pas le développement embryonnaire, la viabilité des souris et la prolifération des cellules isolées de celle-ci, suggérant que Cdc25A ou une autre phosphatase peut parfaitement compenser les fonctions de Cdc25B et C [247]. À la lumière de tous ces résultats, il

semble que Cdc25A soit la seule à avoir des fonctions indispensables chez la souris. Cependant, on ne peut exclure que Cdc25A présente un profil d'expression unique et plus abondant.

La régulation des Cdc25 est effectuée différemment selon la forme et implique des changements de localisation, d'abondance et d'activité enzymatique. Tout d'abord, les Cdc25 possèdent un NES et un NLS fonctionnels et oscillent entre le noyau et le cytoplasme au cours du cycle cellulaire (Figure 1.10, p.36) [229]. L'interaction régulée par phosphorylation avec la protéine 14-3-3 joue un rôle primordial dans le contrôle de la localisation de chacune des isoformes [248, 249]. Par exemple, Cdc25A a longtemps été considérée comme une phosphatase majoritairement nucléaire [235]. Par contre, dans une étude récente sur la localisation de la chimère YFP-Cdc25A, on a observé que celle-ci voyage constamment entre le cytoplasme et le noyau [250]. Son export nucléaire n'est encore pas bien compris, mais on sait qu'il n'est pas affecté par un traitement des cellules à la leptomycine B, un inhibiteur de l'exportine Crm1, excluant un rôle pour cette dernière dans ce processus. De plus, la phosphorylation de Cdc25A sur les Ser 178 et Thr 507 par Chk1 (*Checkpoint kinase 1*) crée des sites de liaison pour la protéine 14-3-3 qui la séquestre ainsi dans le cytoplasme (Section 1.4.1.4.2) [251]. Cdc25C est phosphorylée par les kinases C-Tak1 (*Cdc twenty-five C associated protein kinase 1*) et Chk1 sur la Ser 216, ce qui la maintient dans le cytoplasme via une interaction avec 14-3-3 dans les cellules en interphase [252-255]. Une fraction du pool de Cdc25C est également localisée aux centrosomes de la phase S à la mitose [256, 257]. Au début de la mitose, Cdc25C est phosphorylée sur les sites Ser 191/Ser 198 du NES par les Plk3 et 1 respectivement [258, 259]. Ces événements de phosphorylation ont pour conséquence de déplacer Cdc25C vers le noyau, où elle peut activer CDK1/cycline B. L'endroit subcellulaire exact où est située Cdc25B à chacune des phases du cycle cellulaire est controversé [229]. Cependant, tout comme ses deux consœurs, Cdc25B est retrouvée au noyau et au cytoplasme au cours du cycle grâce à ses signaux d'import et d'export nucléaire, de même qu'à l'interaction avec 14-3-3 [260, 261]. La phosphorylation de Cdc25B sur la Ser 323 est essentielle pour son interaction avec la protéine 14-3-3 et sa rétention cytoplasmique. De plus, tout

comme Cdc25C, une fraction de Cdc25B est localisée au niveau des centrosomes [262]. De manière intéressante, l'expression de Cdc25B avec un NES mutant diminue sa capacité à induire l'entrée en mitose, ce qui suggère que l'activité de cette phosphatase est requise pour activer un pool de CDK1 cytoplasmique [260].

L'abondance protéique des Cdc25 contribue également à la régulation de leur activité. On sait depuis longtemps que Cdc25C est une protéine dont l'expression ne varie pas au cours du cycle cellulaire [263]. Cependant, il en va autrement pour Cdc25A et B. Cdc25A est exprimée dès le milieu de la phase G1 jusqu'en fin de mitose, au moment où elle est dégradée par le protéasome [236, 264]. La dégradation en sortie de mitose se fait suite à l'ubiquitination par l'APC<sup>Cdh1</sup>, alors qu'au cours des phases S et G2, ou après un dommage à l'ADN, c'est le complexe SCF <sup>$\beta$ -TrCP</sup> qui l'ubiquitine [264, 265]. L'ubiquitination de Cdc25A par le complexe SCF <sup>$\beta$ -TrCP</sup> se produit lorsqu'elle est phosphorylée par les kinases Chk1/2 [265]. En début de mitose, CDK1/cycline B phosphoryle Cdc25A sur ses Ser17/115, ce qui accroît sa stabilité, possiblement en prévenant l'interaction avec  $\beta$ -TrCP [243]. Cdc25B est exprimée à partir de la phase S et ce, jusqu'en prophase, au cours de laquelle son expression atteint son niveau le plus élevé [238, 260]. Cdc25B est dégradée par le système ubiquitine-protéasome, mais les mécanismes qui en sont responsables ne sont pas encore parfaitement bien compris. Tandis que la phosphorylation de Cdc25B par CDK1/cycline A favorise sa dégradation par une E3 ligase inconnue, le complexe SCF <sup>$\beta$ -TrCP</sup> l'ubiquitine suite à son interaction via un motif de destruction phospho-indépendant [266, 267].

De plus, l'activité catalytique de Cdc25 B et C est directement affectée par leur phosphorylation par différentes kinases. En début de mitose, Cdc25B est hyperphosphorylée sur sa région régulatrice en N-terminal, ce qui augmente son affinité pour son substrat CDK1/cycline B [268, 269]. La kinase mitotique Aurora A phosphoryle Cdc25B localisée au centrosome sur la Ser 353 [262]. L'entrée en mitose induite par Cdc25B est favorisée par cette phosphorylation, mais on ne connaît pas quel est l'impact biochimique de celle-ci. La kinase CK2 stimule l'activité enzymatique de Cdc25B *in vitro* et *in vivo* après l'avoir phosphorylé sur les

Ser 186 et 187 [270]. D'un autre côté, la phosphorylation de Cdc25B par la kinase pEg3 sur les Ser 169 et Ser 323 inhibe son activité enzymatique [271, 272]. Pour sa part, l'hyperphosphorylation de Cdc25C par CDK1/cyclin B (sur la Ser 214 entre autres) au début de la mitose active Cdc25C et forme une boucle de rétroaction positive dans laquelle CDK1 enclenche l'augmentation de sa propre activité [273].

Finalement, l'ensemble des études réalisées à ce jour permet de proposer un modèle dans lequel intervient chacune des Cdc25 dans le contrôle de l'entrée en mitose. Cdc25B semble être la première à initier l'activation de CDK1/cycline B aux centrosomes [228, 274]. Cette activité CDK, qui se déplace ensuite vers le noyau, stimule Cdc25C, augmentant davantage l'activité CDK1/cycline B cellulaire qui est aussi favorisée et maintenue par Cdc25A. Cette dernière a un rôle important à jouer dans l'activation de CDK1 nucléaire et dans la condensation des chromosomes [274].

### **1.2.2 Les boucles de rétroaction positive**

L'expression de la cycline B, la localisation du complexe CDK1/cycline B, la phosphorylation de la boucle d'activation ainsi que la balance d'activités entre les kinases Wee1 et Myt1 et les phosphatases Cdc25 sont tous des mécanismes qui contrôlent l'activité de CDK1/cycline B. Des expériences d'inhibition par siRNA ont démontré que l'entrée en mitose s'exécute malgré une faible activité CDK1 [275]. Cependant, dans ce cas, la phosphorylation de régulateurs de la mitose est compromise et les cellules prennent énormément de temps à atteindre l'anaphase. Ainsi, il semble important que l'activité CDK1 continue à augmenter après l'entrée en mitose. Mais comment le plein potentiel d'activité CDK1 requise pour phosphoryler toutes les protéines et provoquer tous les changements cellulaires est-il atteint au début et pendant la mitose? Tel que décrit dans les sections précédentes, CDK1/cycline B stimule sa propre activation en phosphorylant et en influençant l'activité de ses régulateurs Wee1, Myt1 et Cdc25. Ces boucles de rétroaction positive provoquent une transition rapide en mitose. Cet effet autoactivateur de CDK1 est en outre soutenu et solidifié par Plk1, une kinase très importante pour le déroulement de la mitose (Figure 1.8, p.31) et [276].

### 1.2.2.1 Plk1 et l'activation de CDK1

La kinase Polo a initialement été identifiée chez la drosophile [277, 278]. Les cellules mutantes pour le gène *polo* ont des défauts de fuseaux mitotiques qui causent la formation de cellules polyploïdes. Puisque Plk1 est recrutée à plusieurs structures cellulaires lors de la progression en mitose, elle peut exercer plusieurs fonctions différentes (Figure 1.11 B) et (revue dans [276]). Ainsi, elle exerce des fonctions dans : 1) la formation et la maturation des centrioles et centrosomes en phases S et G2, 2) dans la ségrégation des chromosomes à la transition métaphase-anaphase au niveau des kinétochores puis du fuseau mitotique et 3) dans la stimulation de la contraction de l'anneau d'actine-myosine au site de clivage, lors de la cytokinèse.

En début de mitose, Plk1 contribue à l'activation de CDK1 aux centrosomes. Un des aspects importants qui permet cette relation entre les deux kinases est la particularité qu'a Plk1 à lier plusieurs de ses substrats lorsque ceux-ci ont été préalablement phosphorylés par CDK1 [279]. En effet, le domaine C-terminal de Plk1 comprend deux boîtes Polo (PBD, *Polo-box domain*) qui reconnaissent

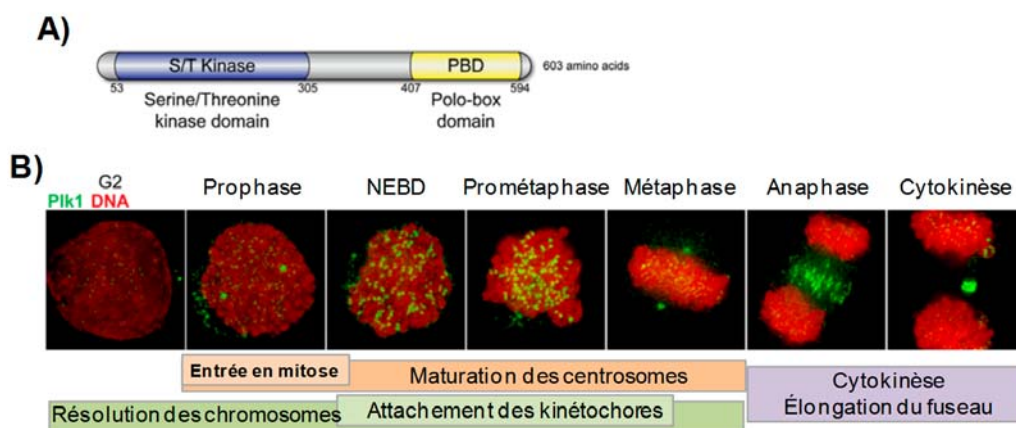


Figure 1.11 **Structure et localisation de Plk1**

A) Le domaine kinase en N-terminal est en bleu et le domaine contenant les deux boîtes Polo (PBD) en C-terminal est en jaune. B) Images d'immunofluorescence illustrant la localisation de la Plk1 aux différentes phases de la mitose. Le signal de la Plk1 est en vert et celui de l'ADN est en rouge. Adaptée d'après [280].

principalement des motifs Ser-pSer/pThr-Pro phosphorylés par CDK1 en mitose (Figure 1.11 A) [281].

Dans le but de stimuler l'activité de CDK1, Plk1 phosphoryle l'inhibiteur Wee1, provoquant son ubiquitination par le complexe SCF<sup>β-TrCP</sup> et sa dégradation (Section 1.2.1.3.2.1) et [221]. Plk1 phosphoryle également les activateurs Cdc25B et C, après que celles-ci aient été phosphorylées par CDK1, entraînant leur transport vers le noyau (voir Section 1.2.1.3.2.2) [282, 283]. Toutefois, la surexpression d'un mutant n'exprimant que le PBD qui déluge Plk1 endogène des centrosomes, ou l'inhibition de Plk1 par siRNA ne préviennent pas l'entrée en mitose [284]. Le développement d'un inhibiteur pharmacologique puissant et spécifique à Plk1, le BI2536, suggère que l'activité enzymatique de celle-ci n'est pas absolument essentielle pour que les cellules entrent en mitose [285]. Par contre, les cellules traitées avec le BI 2536 demeurent en prophase pendant de longues heures, avant que le complexe CDK1/cycline B entre au noyau et que les cellules progressent en prométaphase. Ces résultats, de même que ceux obtenus suite à l'inhibition de Plk1 par shRNA (*short hairpin RNA*), suggèrent que l'activité de Plk1 est requise pour que la transition G2/M et la progression en mitose se déroulent dans un intervalle de temps normal [286].

### 1.2.2.2 Aurora A et Bora

L'activation de Plk1 résulte de la phosphorylation de la Thr 210 de sa boucle d'activation, un événement qui a récemment été attribué à la kinase Aurora A [287, 288]. Dans ce processus, cette dernière nécessite la participation de son cofacteur Bora pour phosphoryler efficacement Plk1 [287-289]. En accord avec leur rôle important dans la promotion de l'entrée en mitose, la déplétion de Aurora A et Bora retarde grandement l'entrée en mitose [287, 290]. L'expression de Bora augmente rapidement de la phase G2 à la mitose, alors que CDK1 phosphoryle Bora pour créer un site d'interaction avec le PBD de Plk1 [287, 289, 291]. Cette interaction contrôlée entre Bora et la Plk1 initie une boucle de rétroaction positive qui active CDK1. Lorsqu'elle devient suffisamment active, Plk1 phosphoryle Bora, ce qui conduit à son

ubiquitination par SCF <sup>$\beta$ -TrCP</sup>. La dégradation de Bora libère Plk1 qui interagit alors avec un plus grand nombre de substrats différents pour accomplir ses fonctions mitotiques [172, 292]. Un mécanisme additionnel pour amplifier l'activité CDK1 fait intervenir le facteur de transcription FoxM1. La phosphorylation de ce dernier par CDK1 crée un site de liaison pour Plk1 qui peut alors le phosphoryler sur des sites additionnels [293]. Ainsi activé à la transition G2/M, FoxM1 contribue davantage à l'expression de plusieurs régulateurs positifs de la mitose, dont Plk1 et cycline B, venant participer à la boucle de rétroaction positive conduisant à l'entrée et la progression en mitose.

### 1.3 Les phosphatases en sortie de mitose

L'activation de kinases et la phosphorylation d'une multitude de protéines sont requises pour l'entrée et la progression en mitose. Cependant, en sortie de mitose, ces événements doivent être renversés. L'anaphase marque le début de la sortie de mitose. Durant l'anaphase, les chromosomes alignés sur la plaque équatoriale commencent à s'éloigner les uns des autres. Les événements qui suivent nécessitent l'inactivation de CDK1/cycline B, l'ubiquitination de protéines régulatrices par l'APC (dont la cycline B) (Sections 1.1.3.5.3.4/5) et la déphosphorylation des substrats de CDK1 par les phosphatases. Démontrant l'importance de l'inactivation de CDK1 pour exécuter la sortie de mitose, l'expression d'une forme mutante non dégradable de cycline B empêche les cellules d'entrer dans la phase G1 suivante [294]. Par contre, l'inhibition de l'activité CDK1 n'est pas suffisante en soi pour provoquer la sortie de mitose. En fait, si les phosphatases mitotiques sont inhibées au même moment que l'est CDK1, la mitose peut durer plusieurs heures [295]. À ce jour, deux familles de phosphatases sont reconnues pour permettre la sortie de mitose : Cdc14 et PP1/2.

#### 1.3.1 Cdc14

Le rôle de Cdc14 comme régulateur clé de la sortie de mitose est clairement établi chez la levure *S. cerevisiae* (revue dans [296]). La majorité de nos



connaissances sur les fonctions et la régulation de cette phosphatase proviennent d'ailleurs d'études réalisées chez cet organisme modèle. Tout d'abord, lorsque *cdc14* est muté, cela provoque un arrêt de la progression en mitose tardivement en anaphase [297]. À l'inverse, la surexpression de Cdc14, quant à elle, conduit à l'inactivation précoce de CDK1 [297]. L'ensemble de ces résultats suggère donc un rôle essentiel pour cette protéine dans l'exécution de la sortie de mitose.

L'activité de Cdc14 est très bien régulée. Le mécanisme le plus important est le contrôle de sa localisation cellulaire. En fait, en interphase et jusqu'à la métaphase, Cdc14 interagit avec l'inhibiteur Cfi1/Net1 (*Cdc14 inhibitor 1/Nucleolar silencing establishing factor and telophase regulator*), une protéine résidente du nucléole [298, 299]. En anaphase, Cdc14 se dissocie de Cfi1/Net1 et est relâchée dans l'ensemble de la cellule, où elle peut déphosphoryler ses substrats. Deux réseaux de signalisation permettent de relâcher Cdc14 du nucléole : tôt au début de l'anaphase, le FEAR (*Cdc fourteen early anaphase release*) intervient pour amorcer la délocalisation de Cdc14 et plus tard en anaphase, le MEN (*Mitotic exit network*) maintient Cdc14 à l'extérieur du nucléole (revue dans [296, 300, 301]). Ces deux voies de signalisation n'ont pas exactement le même impact sur la sortie de mitose. En fait, lorsque les composantes du MEN sont mutées chez les levures, celles-ci sont bloquées en fin de mitose, avec une activité CDK élevée. D'un autre côté, des mutations dans les composantes du FEAR ne font que retarder la sortie de mitose [296]. Ainsi, différentes fonctions sont assignées à Cdc14 activée par le MEN ou le FEAR. Le MEN permet la sortie de mitose et la cytokinèse grâce à l'inhibition de CDK1 par deux mécanismes : 1) en facilitant l'activation de Cdh1, et par conséquent la dégradation de cycline B, et 2) en déphosphorylant et en activant l'inhibiteur des CDK Sic1. Le FEAR, quant à lui, participe à l'exécution de la sortie de mitose au moment opportun, stabilise le fuseau mitotique, positionne le noyau adéquatement par rapport au site de clivage et permet la ségrégation des télomères et des régions d'ADNr [300]. À ce jour, aucune voie de signalisation similaire au MEN et au FEAR conduisant à la délocalisation de Cdc14 n'a été identifiée chez les vertébrés.

Le génome humain contient deux gènes homologues à Cdc14 de levures, Cdc14A et B, identifiés par homologie de séquence [302]. Récemment, il a été découvert que chez les hominoïdes, il existe un troisième gène, hCdc14C (aussi nommé hCdc14Bretro), obtenu suite à un évènement de rétroduplication de Cdc14B [303]. En fait, la séquence de Cdc14B et Cdc14C ne diffère qu'au niveau du C-terminal. Les Cdc14 sont composées d'un domaine central d'environ 350 aa, dans lequel on retrouve le motif HCX<sub>5</sub>R(S/T) présent chez les phosphatases à double spécificité (Figure 1.12) [303]. Ce domaine possède environ 40 % d'homologie entre Cdc14 de levures et Cdc14A/B et environ 65% d'homologie entre Cdc14A et Cdc14B. La région en C-terminal, de longueur variable, est moins bien conservée entre les différents orthologues et paralogues. Unique à celle-ci, Cdc14B possède une séquence en N-terminal, responsable de sa localisation nucléolaire. Contribuant à la compréhension de leur mécanisme d'action, des études cristallographiques de Cdc14B ont révélé qu'elle a une nette préférence pour les motifs pSer/pThr-Pro, faisant des Cdc14 des *proline-directed phosphatases* [304].

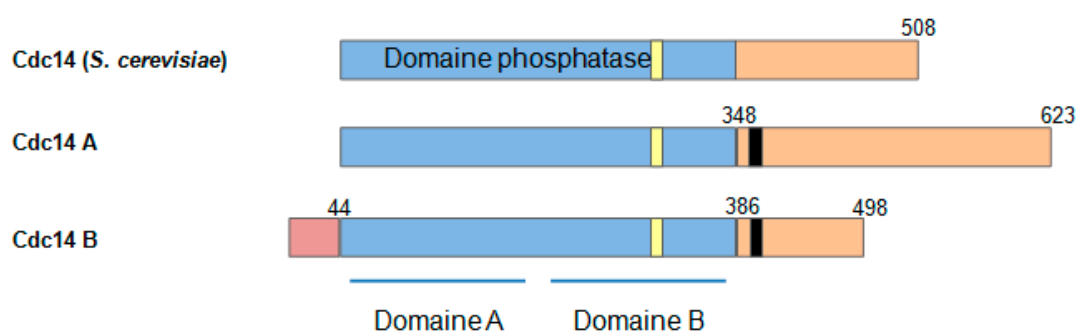


Figure 1.12 **Structure des Cdc14**

Structure primaire des Cdc14. Le domaine phosphatase conservé est en bleu et la région en C-terminal est en beige. Les boîtes noires représentent le NES et les boîtes jaunes, le motif caractéristique des protéines tyrosines phosphatases. Cdc14B possède une région de localisation nucléolaire à l'extrémité N-terminale schématisée par la boîte rose. La structure tridimensionnelle de Cd14B démontre que le domaine phosphatase est constitué de deux domaines. Le domaine A contribue à la spécificité des substrats, mais n'a pas d'activité catalytique. Cette dernière est retrouvée dans le domaine B. Figure inspirée de [304].

Cdc14A et Cdc14B sont comparables à plusieurs niveaux. En effet, *in vitro*, elles ne déphosphorylent que des substrats des CDK, et leur abondance et activité ne varie pas au cours du cycle cellulaire [305]. Cependant, elles diffèrent l'une de l'autre de par leur localisation subcellulaire. En fait, Cdc14A est située au centrosome et dans le cytoplasme en interphase et se retrouve presque exclusivement dans le cytoplasme lors de la mitose [305-307]. De son côté, Cdc14B est localisée au nucléole en interphase et à différentes structures (zone centrale du fuseau mitotique en anaphase et pont intracellulaire en cytokinèse) lors de la mitose [308, 309]. Finalement, Cdc14C, dont l'expression est restreinte au cerveau et aux testicules, semble être associée aux microtubules et au réticulum endoplasmique [303]. Toutefois, les rôles de Cdc14C ne sont pas encore définis.

Au moment de leur identification, on croyait que les fonctions de Cdc14A et B étaient possiblement conservées au cours de l'évolution, puisqu'elles peuvent parfaitement compléter les phénotypes associés aux gènes *cdc14* de levures [302, 310]. De plus, de manière semblable à son homologue chez la levure, Cdc14A déphosphoryle et active Cdh1 *in vitro* [305, 307]. Toutefois, il existe des différences notables au niveau des fonctions accomplies par les Cdc14 chez les mammifères. Les premières études de gain et perte de fonction de Cdc14A chez les mammifères ont démontré un rôle important pour celle-ci lors de la séparation des centrosomes, de la ségrégation des chromosomes et dans l'exécution de la cytokinèse [305, 306]. D'un autre côté, la surexpression de Cdc14B a démontré que celle-ci peut lier les microtubules, les empaqueter (*bundle*) et les stabiliser de manière indépendante de son activité catalytique [308]. De plus, l'activité phosphatase de Cdc14B inhibe la duplication des centrosomes [311]. Ces résultats suggèrent donc que Cdc14A et B jouent chacun un rôle dans le cycle des centrosomes, Cdc14A contrôlant leur séparation et Cdc14B leur nombre. D'autres fonctions cellulaires ont également été assignées récemment aux Cdc14. En effet, le laboratoire du Dr Meloche a démontré que Cdc14B augmente la durée de la phase G1 en antagonisant la phosphorylation de la protéine Skp2 par les CDKs (Section 1.1.3.5.3.1) et [111]. Ceci a pour effet d'induire la dégradation de Skp2 par le protéasome et de provoquer l'augmentation de l'expression de l'inhibiteur p27. Cdc14B a également été impliquée dans la

réponse aux dommages à l'ADN [309]. Suite à un stress, Cdc14B est relâchée du nucléole pour aller au cytoplasme, où elle déphosphoryle et active Cdh1. Ainsi activée, Cdh1 ubiquitine Plk1 et prévient l'entrée des cellules en mitose. Le rôle réel de Cdc14B dans ce processus n'est cependant pas tout à fait clair. En effet, lors d'une étude faisant usage de cellules somatiques possédant une délétion génomique de Cdc14B, il a été démontré que la réponse aux dommages à l'ADN était normale en absence de Cdc14B (et Cdc14A) [312]. Par contre, en absence de Cdc14A et B, la réparation de l'ADN endommagé s'effectue de façon moins efficace.

Les études démontrent des rôles pour Cdc14 A et B dans le contrôle du cycle cellulaire, mais quant est-il du rôle dans la sortie de mitose, comme c'est le cas pour Cdc14 de levure? Une réponse à cette question est venue d'une équipe qui a généré des cellules humaines possédant une délétion homozygote du locus de Cdc14B, la phosphatase nucléolaire [313]. Contrairement à ce qui est observé chez la levure, les cellules *Cdc14B*<sup>-/-</sup> progressent en anaphase, n'ont aucun défaut du fuseau mitotique et accomplissent la cytokinèse normalement. Ces résultats permettent de conclure que la sortie de mitose est contrôlée de manière différente chez l'humain, puisqu'une phosphatase située au nucléole n'est pas essentielle. Il est possible qu'une autre phosphatase localisée à cet endroit, mais qui est encore inconnue, accomplisse ces fonctions. Toutefois, il est connu que les phosphatases PP1 et PP2A ont des rôles essentiels en sortie de mitose chez les mammifères.

### 1.3.2 PP1 et PP2

Lorsque CDK1 est inhibée par la roscovitine (un inhibiteur sélectif des CDKs) durant la mitose, la majorité de ses substrats sont déphosphorylés et les cellules sortent prématurément de la mitose [295, 314]. Par contre, lorsque les cellules sont traitées à la fois avec la roscovitine et l'acide okadaïque ou calyculine A, deux inhibiteurs sélectifs des phosphatases PP1 et PP2A, elles ne peuvent terminer la mitose, probablement parce que les substrats de CDK1 demeurent phosphorylés [295]. Ces résultats suggèrent que ces phosphatases jouent un rôle essentiel dans la déphosphorylation des protéines en sortie de mitose.

### 1.3.2.1 Structures

PP1 et PP2 sont des sérines/thréonines phosphatases à plusieurs sous-unités. PP1 est composée d'une sous-unité catalytique (PP1c) qui interagit avec une cinquantaine de régulateurs différents, afin de former une holo-enzyme multimérique (Figure 1.13) [315, 316]. Ces régulateurs dirigent PP1c à différents endroits dans la cellule, confèrent la spécificité envers les substrats ou inhibent son activité. L'abondance protéique et les modifications post-traductionnelles des sous-unités régulatrices constituent les principaux mécanismes de régulation de PP1c en réponse aux signaux extracellulaires et intracellulaires, bien qu'une fraction de PP1c soit elle-même directement soumise au contrôle par phosphorylation.

De manière intéressante, PP2A est également constituée de différentes sous-unités. En fait, le noyau central de PP2A est composé d'une sous-unité catalytique, PP2Ac, et d'échafaudage, PP2Aa/PR65 (Figure 1.13) [317]. À ce dimère, se lie une quinzaine de sous-unités régulatrices B regroupées en trois familles (B : PR55/B55, B' : PR61/B56, B'' : PR72), pour former des complexes holo-enzymes hétérotrimériques [318]. Chez l'humain, 70 holo-enzymes PP2A ayant différentes fonctions, localisations et spécificités peuvent être formées suite à l'assemblage des PP2Ac, PP2Aa et sous-unités B.

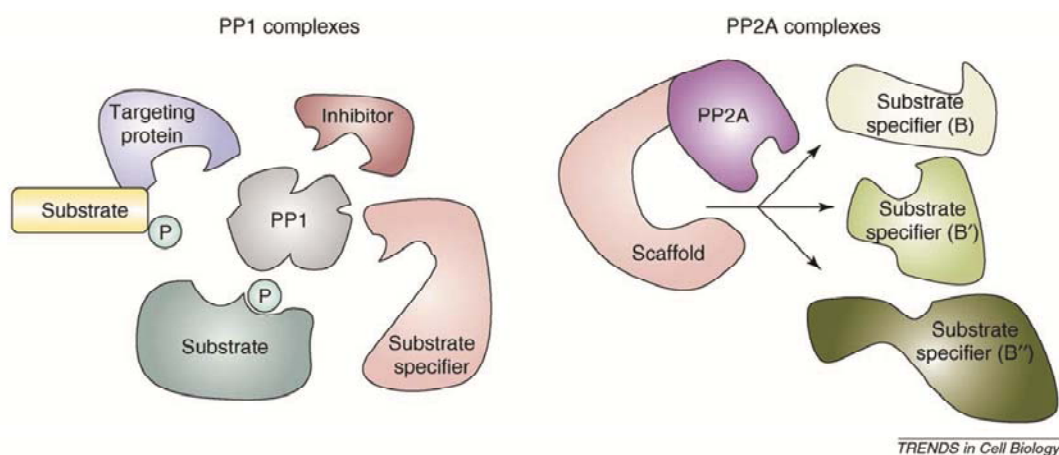


Figure 1.13 **Structure des complexes PP1 et PP2A**  
 Figure issue de [318].

### 1.3.2.2 Rôle en sortie de mitose

Ces phosphatases sont impliquées dans de nombreux processus cellulaires. Par exemple, PP1 et PP2A interviennent dans le contrôle de l'épissage des ARN, la transcription, la traduction, le métabolisme du glycogène, la réorganisation des filaments d'actine, le contrôle des récepteurs et pompes membranaires et dans le cycle cellulaire (revue dans [315, 317]). Les études chez la levure et la mouche suggèrent que PP1 est importante pour la progression en mitose [315, 319]. De même, lors de la mitose, PP1 est localisée sur les chromosomes, aux centrosomes et sur le fuseau mitotique, suggérant qu'elle y exerce des fonctions variées [315]. Chez les cellules de mammifères, différents phénotypes mitotiques sont obtenus suite à l'inhibition de PP1. Alors que l'utilisation d'anticorps neutralisants PP1 bloque les cellules en métaphase, sa suppression par oligonucléotides antisens inhibe la cytokinèse [320, 321]. Inversement, la surexpression de PP1 dans les cellules en anaphase accélère la sortie de mitose [321]. Récemment, une étude a révélé que l'immunodéplétion de PP1 inhibe la majorité de la déphosphorylation observée en sortie de mitose [322].

Pour assurer que PP1 n'est active qu'au bon moment, celle-ci est régulée lors de la mitose. Ainsi, l'activité de PP1 est inhibée suite à la phosphorylation par CDK1 de sa Thr 320 et sa séquestration par l'Inhibiteur 1 [322, 323]. Lorsque l'activité kinase de CDK1 diminue en fin de mitose, PP1 s'autoactive et inhibe l'Inhibiteur 1 en le déphosphorylant, ce qui permet d'atteindre un niveau élevé d'activité phosphatase PP1 [322]. Ainsi, CDK1 phosphoryle ses substrats au cours de la mitose et s'assure qu'ils sont maintenus dans cet état en inhibant une phosphatase responsable de leur déphosphorylation. Un tel mécanisme est présent également chez la levure *S. pombe*, où l'inhibition de PP1 par Cdc2 doit être levée pour que les cellules progressent au-delà de la métaphase [324]. Malgré son rôle spécifique en sortie de mitose, très peu de substrats ont été caractérisés pour l'instant. Le premier substrat identifié de PP1 en mitose fût la lamine nucléaire. Celle-ci est phosphorylée par CDK1/cycline B en début de mitose pour engendrer le NEB et sa déphosphorylation est requise pour la formation du noyau après la télophase [325].

De son côté, PP2A semble également jouer un rôle significatif dans le déroulement de la mitose. Récemment, une étude à grande échelle visant à identifier des phosphatases importantes pour la sortie de mitose a mené à l'observation que PP2A:B55 $\alpha$  remplit différentes fonctions, en collaboration avec l'importine  $\beta$ 1, à ce stade du cycle cellulaire [326]. En effet, PP2A est importante pour le désassemblage du fuseau mitotique, la reformation de l'enveloppe nucléaire et de l'appareil de Golgi ainsi que pour la décondensation des chromosomes. Lors de la mitose, PP2A:B55 $\alpha$  est inhibée par phosphorylation et redevient active lorsque CDK1 est inactivée. La suppression de PP2A:B55 $\alpha$  ne provoque pas de délai dans la sortie de mitose, contrairement à ce qui a été démontré pour PP2A:B56 $\delta$  [327, 328]. Le rôle de celle-ci à ce stade du cycle est en partie attribuable au fait que PP2A:B56 $\delta$  déphosphoryle la Thr 130 de Cdc25C, ce qui l'inactive, ainsi que CDK1. En fait, il a été rapporté que durant le processus d'inactivation de CDK1 en sortie de mitose, celle-ci est phosphorylée de façon transitoire sur sa Tyr 15 inhibitrice, un peu avant la dégradation de la cycline B [329]. Ce mécanisme survient alors que l'activité des phosphatases Cdc25 est normalement faible et contribue à l'inactivation rapide de CDK1. Chez la grenouille, le rôle de PP2A:B55 $\delta$  semble être légèrement différent de celui observé chez les mammifères. L'immunodéplétion de PP2A:B55 $\delta$  d'œufs de grenouille en interphase accélère leur entrée en mitose et les maintient dans cet état pour une très longue période [327]. Par contre, lorsque PP2A:B55 $\delta$  est retirée des œufs déjà en mitose, ceux-ci peuvent en sortir normalement, suggérant qu'une autre phosphatase peut déphosphoryler les substrats de CDK1. L'activité de PP2A:B55 $\delta$  est très élevée en interphase et très faible lors de la mitose. Le contrôle de l'activité PP2A au cours de la mitose est assuré par la kinase Greatwall.

### **1.3.2.3 La kinase Greatwall régule PP2A**

La kinase Greatwall a été identifiée chez la drosophile et son activité est importante pour permettre la condensation des chromosomes et la progression des neuroblastes de larves en métaphase [330]. Peu de temps après sa découverte, il a été démontré que l'activité de Greatwall, obtenue après phosphorylation par

CDK1/cycline B, est essentielle pour établir une boucle de rétroaction positive d'activation de CDK1 [330, 331]. Le groupe de M. Goldberg a observé que l'expression d'un mutant constitutivement actif de CDK1 (mutant T14A/Y15F) rend non-essentielle l'activité enzymatique de Greatwall, suggérant que celle-ci est requise pour contrôler la phosphorylation inhibitrice de CDK1. Par la suite, il fût démontré que Greatwall contrôle négativement une phosphatase responsable de l'activation de Cdc25 [332]. En fait, aujourd'hui il est établi que Greatwall ne fait pas que contrôler l'activité de CDK1. L'inactivation de Greatwall déclenche le processus de sortie de mitose en provoquant la déphosphorylation des substrats de CDK1/cycline B, même si l'activité kinase de ce complexe est élevée [333, 334]. En effet, il a été démontré que Greatwall interagit avec PP2A:B55δ et inhibe son activité phosphatase. L'inactivation simultanée de Greatwall et PP2A prévient la sortie prématurée de mitose.

Greatwall est conservée au cours de l'évolution et son orthologue fonctionnel chez l'humain est la kinase MAST-L (*Microtubule-associated serine/threonine kinase-like protein*) [335]. Tout comme chez la grenouille, l'inhibition de celle-ci conduit à la déphosphorylation précoce des substrats de CDK1, l'inactivation du point de contrôle du fuseau mitotique et la sortie de mitose associée à des défauts majeurs de ségrégation des chromosomes. Tous ces phénotypes sont renversés lorsque PP2A est également inactivée.

Ainsi, ces travaux permettent de proposer un modèle pour expliquer la relation importante qui existe entre CDK1, Greatwall et PP2A lors de l'entrée, la progression et la sortie de mitose (Figure 1.14). À la transition G2/M, l'activité PP2A conduit à l'inhibition de Wee1 et l'activation de Cdc25. Lorsque CDK1/cycline B commence à être activé, elle phosphoryle et active Greatwall. Cette dernière inhibe alors PP2A provoquant l'accumulation de protéines phosphorylées par CDK1 pendant la mitose. En sortie de mitose, par un mécanisme qui n'est pas compris pour l'instant, Greatwall est inhibée, ce qui entraîne l'activation de PP2A et la déphosphorylation des substrats de CDK1.



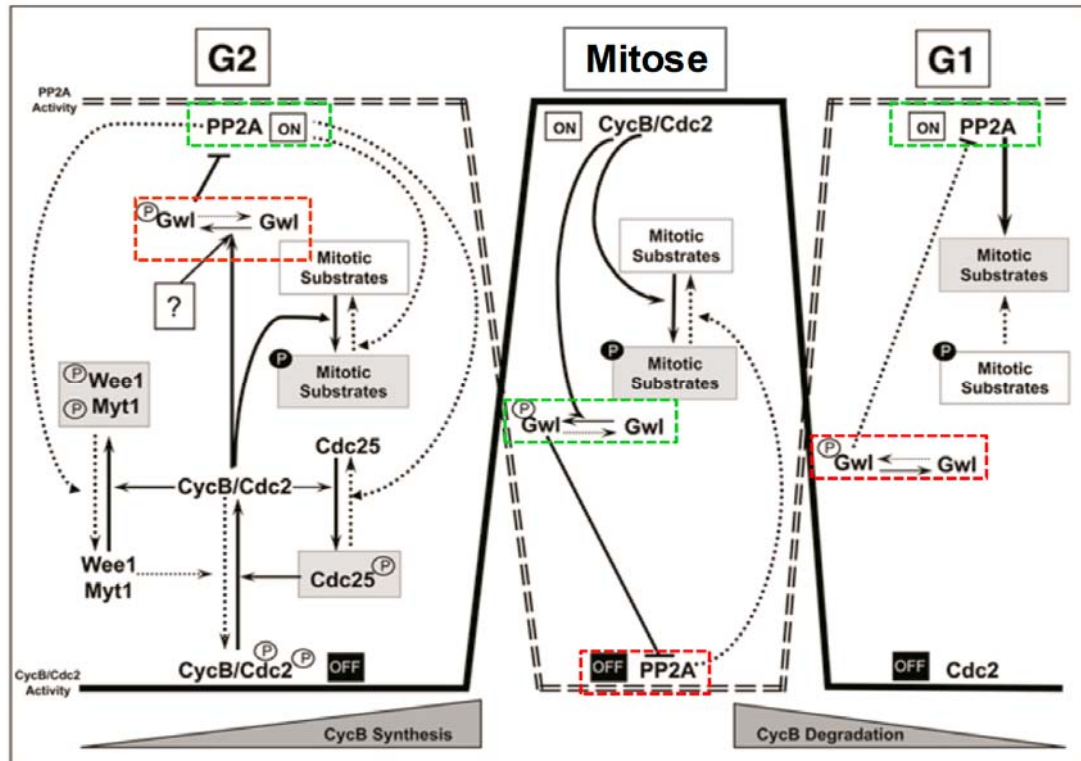


Figure 1.14 **Relation CDK1-Greatwall-PP2A dans le contrôle de la mitose**  
 Modèle illustrant le contrôle de Greatwall (Gwl) sur PP2A lors de l'entrée et la sortie de mitose. Les encadrés rouges indiquent que la protéine est inactive alors que ceux en vert signifient que la protéine est active. Voir le texte pour plus de détails. Figure modifiée à partir de [335].

#### 1.4 Les points de contrôles en G2/M

Les mécanismes décrits jusqu'à présent illustrent les moyens utilisés par la machinerie du cycle cellulaire pour effectuer l'entrée et la sortie de mitose. Cependant, l'ensemble des effecteurs et régulateurs de la phase S et de la mitose n'étant pas suffisamment efficaces, ceux-ci ne peuvent fonctionner seuls pour assurer que les chromosomes transmis aux cellules filles soit dépourvu d'erreurs. En effet, celles-ci peuvent survenir lors de la réplication (ex. : arrêt de la progression des fourches de réplication) ou suite à l'exposition des cellules à des agents intracellulaires et extracellulaires (rayons UV, radiations ionisantes, agents

chimiothérapeutiques, radicaux libres) qui compromettent l'intégrité de l'ADN. Ces erreurs se présentent sous différentes formes, soit des cassures d'un seul ou des deux brins, soit des changements de conformation de l'ADN (ex. : dimère de thymines). Pour se protéger contre le transfert d'ADN endommagé ou modifié, les cellules font appel à une machinerie qui vérifie la présence d'erreurs, arrête la progression dans le cycle, répare l'ADN et entraîne la mort de la cellule s'il est impossible de le réparer [337, 338]. Lorsqu'une cellule entre en mitose, elle a préalablement effectué des points de contrôle à la transition G1/S, au cours de la phase S ainsi qu'à la transition G2/M. Trois voies de signalisation principales sont activées en réponse aux dommages à l'ADN : la voie ATM et la voie ATR qui conduisent à l'activation des kinases Chk1 et Chk2 et de la voie p38/MAPKAPK 2 (Figure 1.15).

Dans les prochaines sections, les principaux mécanismes caractérisant les voies ATM et ATR seront décrits. Bien qu'elle est maintenant reconnue dans la littérature pour avoir un rôle important dans la réponse au dommage à l'ADN, je discuterai de la voie p38/MAPKAPK 2 à la section 1.5.2 (p.70), qui traite des voies de signalisation des MAP kinases. Malgré qu'elles agissent à tout moment du cycle, l'accent sera mis sur leur mode d'action pour contrôler l'entrée en mitose.

#### **1.4.1 Les voies ATM et ATR**

##### **1.4.1.1 Activation de la kinase ATM**

Lorsque des cassures doubles brins sont provoquées dans l'ADN (ex : par des radiations  $\gamma$ ), le complexe MRN (Mre11-Rad50-Nbs1) est très rapidement recruté aux sites de dommages [339]. Ce complexe conservé au cours de l'évolution est important pour engager le processus de réparation de l'ADN et activer la signalisation via la kinase ATM (*Ataxia telangiectasia mutated*) [340, 341]. Le complexe Mre11 (Meiotic recombination 11)/Rad50, sous forme de tétramère, relie les deux extrémités du brin d'ADN clivé afin de les maintenir à proximité l'un de l'autre lors de la réparation de l'ADN. La protéine Mre11 s'associe directement à l'ADN, alors que Rad50 fait le pont entre les molécules d'ADN via Mre11 [340]. Dispensable pour l'interaction du complexe MRN aux endroits endommagés, la protéine

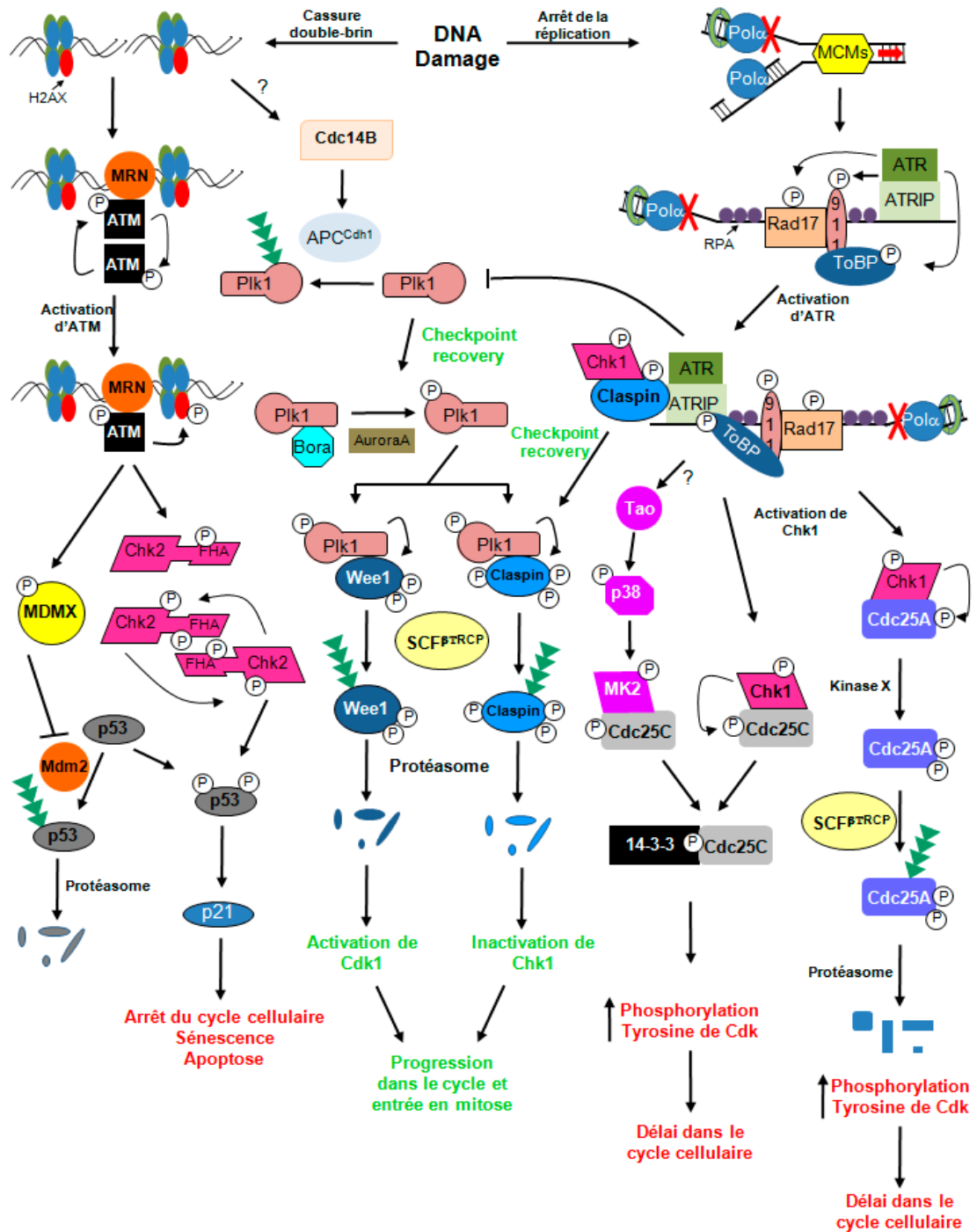


Figure 1.15 Voies de signalisation activées en réponse aux dommages à l'ADN  
 Voir le texte pour les détails. Modifiée d'après [336]

Nbs1 (*Nijmegen breakage syndrome 1*) lie la protéine Mre11 via son domaine en N-terminal et recrute ATM via son domaine C-terminal [342-344]. Avant d'être recrutée directement aux sites endommagés, ATM est associée et activée aux régions d'ADN voisines des sites de lésions [345, 346]. Les cassures doubles brins induisent le démantèlement des nucléosomes et ces changements de structure dans la chromatine suffisent au titrage et à l'activation initiale de ATM [346].

Membre de la famille des kinases *PI3-kinase-like*, cette très grosse kinase de 350 kDa est mutée chez les patients atteints d'ataxie télangiectasie (AT), un trouble caractérisé par la dégénérescence neuronale, l'immunodéficience, la sensibilité aux radiations, une prédisposition au cancer et une instabilité chromosomique [347-349]. L'autophosphorylation de ATM représente un mécanisme de contrôle primordial dans l'atteinte d'un niveau d'activité enzymatique optimal [350]. Initialement, il a été décrit que ATM existe sous forme de dimère lorsqu'elle est inactive et son autophosphorylation sur la Ser 1981 provoque la formation de monomères actifs [351]. Cette phosphorylation semble être une conséquence et non pas un événement nécessaire à son activation, puisque les souris transgéniques *Atm*<sup>S1987A</sup> (S1981 chez l'humain) suppriment le phénotype des souris *Atm*<sup>-/-</sup> et la kinase mutée est activée à des niveaux comparables et avec la même cinétique que la protéine sauvage [352]. Peu après ces observations, deux autres sites d'autophosphorylation, les Ser 367 et Ser 1893, ont été identifiés [353]. La caractérisation de ces sites a révélé que, du moins *in vitro* et dans des cellules humaines en culture, la phosphorylation des Ser 367-1893 et 1981 est importante pour l'activation de ATM et pour corriger les défauts de point de contrôle, de stabilité génomique et de radiosensibilité des cellules de patients atteints de la maladie AT [353]. D'autres études sont toutefois nécessaires pour expliquer les différents résultats obtenus dans les études chez la souris et dans les cellules humaines.

Dans le but de prévenir l'autophosphorylation précoce de ATM lorsqu'il n'y a pas de stress cellulaires, celle-ci est associée aux phosphatases PP2A, WIP1 (*Wild-type p53-induced phosphatase 1*) et PP5 [341]. En plus de l'importance du contrôle

de son état de phosphorylation, l'acétylation de ATM est impliquée dans la régulation de son activité et dans la réponse aux dommages à l'ADN (revue dans [341]).

#### 1.4.1.2 Activation de la kinase ATR

ATR (*ATM and RAD3-related*), un autre membre de la famille des kinases *PI3-kinase-like*, fût clonée par homologie de séquence à ATM et au gène *rad3* de la levure *S. pombe* [354]. Contrairement à la kinase ATM, dont la mutation cause la maladie AT retrouvée dans 0,5 -1 % de la population, ATR n'est que très rarement mutée chez l'humain. En fait, sa mutation provoque l'apparition du syndrome de Seckel, une maladie récessive présentant des caractéristiques communes à l'ataxie télangiectasie [355]. L'étude du rôle physiologique de ATR chez la souris a démontré que la délétion de ce gène provoque la létalité embryonnaire avant le jour E7.5, possiblement à cause d'une perte de l'intégrité génomique [356, 357]. Ceci est différent de la délétion génétique de *Atm* qui conduit à un retard de croissance, à l'infertilité et à des défauts du système immunitaire [358, 359]. Traditionnellement, il est reconnu que ATM est surtout activée suite à des cassures doubles brins, et que l'activité enzymatique de ATR est augmentée suite aux lésions dans un seul brin. Ainsi, les stress réplicatifs (ex. : arrêt de la progression des fourches de réplication) et les rayons UV activent ATR. Cependant, de plus en plus d'évidences suggèrent que ATM et ATR collaborent pour générer une réponse adéquate autant suite aux dommages doubles brins que simple brin [360]. Il a par ailleurs été démontré que ATR est activée à chacun des cycles cellulaires pour contrôler la réplication et ralentir l'entrée en mitose [361].

Lorsque la réplication est interrompue, la protéine RPA (*Replication protein A*), qui lie l'ADN simple brin, vient recouvrir le site « endommagé » et recrute ATRIP (*ATR-interacting protein*) aux sites de lésion (Figure 1.15, p54) et [362, 363]. Cette dernière interagit avec et est nécessaire à l'activation de ATR. Il est intéressant de mentionner que la déplétion de ATR ou de ATRIP provoque des phénotypes cellulaires identiques et que chacune des deux protéines contrôle l'expression de l'autre [364]. La formation du complexe RPA-ATRIP-ATR n'est cependant pas suffisante pour entraîner l'activation de ATR. Le complexe hétérotrimérique

circulaire 9-1-1 (composé des sous-unités Rad9–Rad1–Hus1) reconnaît les extrémités de brins d'ADN garnis de protéines RPA et est important dans la séquence d'événements menant à l'activation de ATR [361]. Une des fonctions importantes du complexe 9-1-1 est de permettre l'interaction entre ATR et TOBP1 (*Topoisomerase-binding protein-1*) d'une manière phospho-dépendante via le domaine BRCT (*Breast cancer-1 (BRCA1) C-terminal*) de cette dernière [365]. *In vitro*, TOBP1 active directement ATR et dans les extraits protéiques de grenouille, TOBP1 est requise pour induire la réponse aux dommages à l'ADN [366]. Contrairement à ATM qui nécessite des modifications post-traductionnelles pour être activée, il n'y a pas de telles évidences concernant ATR. La difficulté à obtenir une forme purifiée active de ATR suggère plutôt que c'est l'interaction continue avec TOBP1 qui est nécessaire pour son activation [361, 367].

#### 1.4.1.3 L'amplification du signal généré par ATM et ATR

L'histone H2AX est un élément précoce et central dans l'organisation des complexes protéiques qui amplifient le signal émis par l'activité des kinases ATM/ATR aux sites de lésions [368]. La phosphorylation de la Ser 139 de H2AX (ainsi nommée  $\gamma$ H2AX) par ATM/ATR, entraîne la liaison à MDC1 (*Mediator of DNA damage checkpoint protein-1*), qui, comme son nom l'indique, est un médiateur important de la réponse aux dommages à l'ADN, via son domaine BRCT [369, 370]. MDC1 est également phosphorylée par ATM, permettant ainsi son association avec la E3 ubiquitine ligase RNF8 (*RING-finger-containing nuclear factors 8*) [371]. L'ubiquitination de  $\gamma$ H2AX par RNF8 facilite l'accumulation des protéines BRCA1 (*Breast cancer susceptibility protein-1*) et 53BP1 (*p53 binding protein-1*), toutes deux impliquées dans la réparation de l'ADN et également phosphorylées par ATM [341]. Finalement, lorsque MDC1 est phosphorylé par la CK2 sur son domaine N-terminal, elle s'associe avec Nbs1, membre du complexe MRN ce qui solidifie l'association de cette dernière aux sites de dommages à l'ADN [372, 373].

#### 1.4.1.4 Les substrats de ATM et ATR

Après avoir été activées par les différents agents, ATM et ATR phosphorylent un très grand nombre de substrats. Des études de mutagenèse de p53, un substrat de ATM et ATR, et l'utilisation d'une banque de peptides ont permis d'établir que le motif S/T-Q représente la séquence minimale phosphorylée par ATM et ATR [374, 375]. Récemment, des études à grande échelle combinant l'immunoprécipitation à l'aide d'anticorps phospho-spécifiques pS/pT-Q à l'analyse par spectrométrie de masse quantitative (technologie SILAC) ont identifié entre 450 et 700 substrats phosphorylés par ATM et ATR suite à l'exposition aux radiations  $\gamma$  ou aux UV [376, 377]. Ces substrats sont généralement regroupés en trois familles selon leurs fonctions : 1) les médiateurs qui relient ATM et ATR aux autres cibles (ex. : Mdc1, 53BP1, le complexe MRN, claspine, Brit1/Mcph1 et H2AX), 2) les transducteurs du signal qui sont activés par ATM et ATR et qui propagent le signal en phosphorylant à leur tour d'autres substrats (ex. : les kinases Chk1/2) et 3) les effecteurs des points de contrôle impliqués dans la réparation et la réplication de l'ADN ou l'arrêt du cycle cellulaire (ex. : protéines MCMs, ORC, RFC, GINS, TopBP1, DNA polymérase, FANCD2, BRCA1, p53) [336]. Dans les prochaines sections, nous nous intéresserons particulièrement aux kinases Chk1 et Chk2.

##### 1.4.1.4.1 Les kinases Chk1 et Chk2

Les gènes *Chk1* et *Chk2* humains ont été identifiés par homologie de séquence aux protéines scChk1/spChk1 et scRad53/spCds1 [255, 378]. Ces deux kinases deviennent rapidement et fortement activées en réponse aux dommages à l'ADN, après avoir été phosphorylées par ATM et ATR [255, 378]. Bien qu'on sache aujourd'hui qu'il existe des inter-connections entre les différentes cascades de phosphorylation, historiquement, Chk1 est décrite comme étant activée en réponse aux lésions simples brin par ATR alors que Chk2 se trouve en aval de ATM lorsqu'il y a des cassures doubles brins [336]. L'activation de Chk1 nécessite la phosphorylation des Ser 317 et 345 situées à l'extérieur de son domaine kinase [379]. Afin d'être pleinement phosphorylée par ATR, Chk1 doit interagir avec la protéine claspine, une protéine adaptatrice qui facilite le rapprochement entre ATR et Chk1

[380, 381]. De son côté, l'activation de Chk2 par ATM ou ATR est très différente de celle de Chk1 et semble faire intervenir son homo-dimérisation [382]. Tout d'abord, la phosphorylation de Chk2 monomérique sur la Thr 68 située dans le domaine SCD (*SQ/TQ cluster domain*), une région riche en sites S/T-Q, provoque l'association via le domaine FHA (*Forkhead associated domain*) d'une autre molécule Chk2 [382]. Suite à cette dimérisation, Chk2 s'auto-phosphoryle sur les Thr 383 et 387 de la boucle d'activation permettant à Chk2 d'obtenir une activité enzymatique maximale [383]. Il semble que ces deux sites ne soient pas les seuls à intervenir dans l'activation de Chk2 puisque d'autres résidus en N-terminal de la protéine ainsi que dans le domaine kinase ont également été caractérisés (revue dans [382, 384]).

Bien qu'elles présentent un certain niveau de chevauchement quant aux signaux qui les activent, Chk1 et Chk2 possèdent des rôles physiologiques différents. Ainsi, l'inactivation génique de *Chk1* chez la souris est létale au stade embryonnaire [385, 386]. Tandis que les souris *Chk2*<sup>-/-</sup> sont viables, leurs cellules sont moins aptes à maintenir un arrêt en G2 ou à induire l'apoptose suite à l'exposition aux rayons  $\gamma$  [387].

#### **1.4.1.4.1.1 L'arrêt du cycle cellulaire par les kinases Chk1 et Chk2**

Tel qu'il vient d'être décrit, les voies ATM/Chk2 et ATR/Chk1 sont activées lorsque l'ADN est endommagé. En plus de démarrer un programme de réparation de l'ADN, ces voies ont pour objectif de freiner la progression dans le cycle cellulaire. Les points de contrôle ainsi activés en G1/S ou G2/M préviennent la réplication et empêchent l'entrée des cellules en phase S ou en mitose lorsque l'ADN n'est pas parfaitement intact [336]. Différents substrats bien caractérisés de Chk1 et 2 ont des fonctions importantes dans le contrôle du cycle cellulaire. Par exemple, Chk1 et Chk2 phosphorylent p53 sur la Ser 20, ce qui diminue son affinité pour la E3 ubiquitine ligase Mdm2 et la stabilise [382]. L'accumulation de p53 provoque un arrêt du cycle cellulaire puisqu'elle est un activateur transcriptionnel de l'inhibiteur p21. Chk1 et Chk2 phosphorylent également le facteur de transcription E2F-1, ce qui augmente son activité transcriptionnelle et conduit à l'apoptose [388]. Une autre des stratégies importantes utilisées par ces voies et qui fût d'abord identifiée chez la levure est



l'inactivation des phosphatases Cdc25 (Section 1.2.1.3.2.2) [389, 390]. En réponse au rayonnement  $\gamma$ , Cdc25A est rapidement dégradée par le système ubiquitine-protéasome [391, 392]. Cette dégradation survient suite à la phosphorylation de Cdc25A par Chk1/2 sur les Ser 76 et 123, qui permet la reconnaissance par le SCF <sup>$\beta$ -TrCP</sup> [384, 393]. Ces kinases sont également responsables de la séquestration dans le cytoplasme par la protéine 14-3-3 [389]. En fait, Chk1 et Chk2 phosphorylent Cdc25B et C sur les Ser 309 et 216 respectivement et retardent du même coup leur transition dans le noyau où elles agissent pour promouvoir la progression dans le cycle cellulaire [252, 255]. Finalement, Chk1 contrôle l'activation de CDK1 via la kinase Wee1. En effet, suite à la phosphorylation de Wee1 par Chk1 sur la Ser 549 chez le xénope ou Ser 642 chez l'humain, l'activité kinase de Wee1 est stimulée grâce à son interaction avec la protéine 14-3-3 [394, 395].

Très importantes dans le contrôle du cycle cellulaire au niveau des points de contrôles, les kinases Chk1 et Chk2 représentent des cibles thérapeutiques présentement à l'étude. Le UCN-01, un dérivé de l'inhibiteur de kinases staurosporine, fait l'objet d'essais cliniques dans les traitements de plusieurs types de tumeurs. En effet, il semble que le UCN-01 augmente la cytotoxicité en combinaison avec les traitements de chimiothérapie ou de radiothérapie conventionnels [396]. Il a été montré que le UCN-01 inhibe Chk1 avec un IC<sub>50</sub> environ 1000 fois plus petit que pour Chk2, conduisant à la proposition que cette kinase représente une cible de choix pour le traitement des tumeurs [397]. Ceci suggère également qu'interférer avec le fonctionnement de points de contrôles pourrait s'avérer une approche thérapeutique viable.

## **1.5 Les rôles des MAP kinases dans le cycle cellulaire**

La progression du cycle cellulaire est parfaitement contrôlée par une machinerie complexe qui s'assure d'effectuer chacune des étapes adéquatement (Section 1.1). Pour s'adapter rapidement aux différents signaux auxquels elles sont soumises, les cellules font appel à un vaste réseau de cascades enzymatiques qui relayent l'information provenant de l'extérieur de la cellule ou de l'intérieur (lorsque

l'intégrité de certaines composantes intracellulaires est altérée, ex. : dommage à l'ADN) afin d'apporter les ajustements qui s'imposent. Les modules de MAP kinases figurent parmi les principales voies de signalisation activées en réponse à de nombreux stimuli. Dans le génome humain, on retrouve 14 MAP kinases regroupées en sept familles distinctes, elles-mêmes classées en deux groupes : les MAP kinases classiques et les MAP kinases atypiques (Figure 1.16) [398]. Puisque les MAP kinases sont impliquées dans un très grand nombre de processus cellulaires et biochimiques, la littérature déborde d'articles à leur sujet. Nous verrons dans les prochaines sections une brève description des MAP kinases pour lesquelles des rôles dans l'entrée et/ou la progression en mitose ont été proposées.

### 1.5.1 La voie Ras-RAF-MEK-ERK

La voie de signalisation Ras-RAF-MEK-ERK fait partie des voies les mieux caractérisées et comprises. Étant bien conservée de la levure à l'homme, les études génétiques et biochimiques réalisées chez les différents organismes modèles ont facilité la dissection des rôles et mécanismes d'action des composantes de la voie.

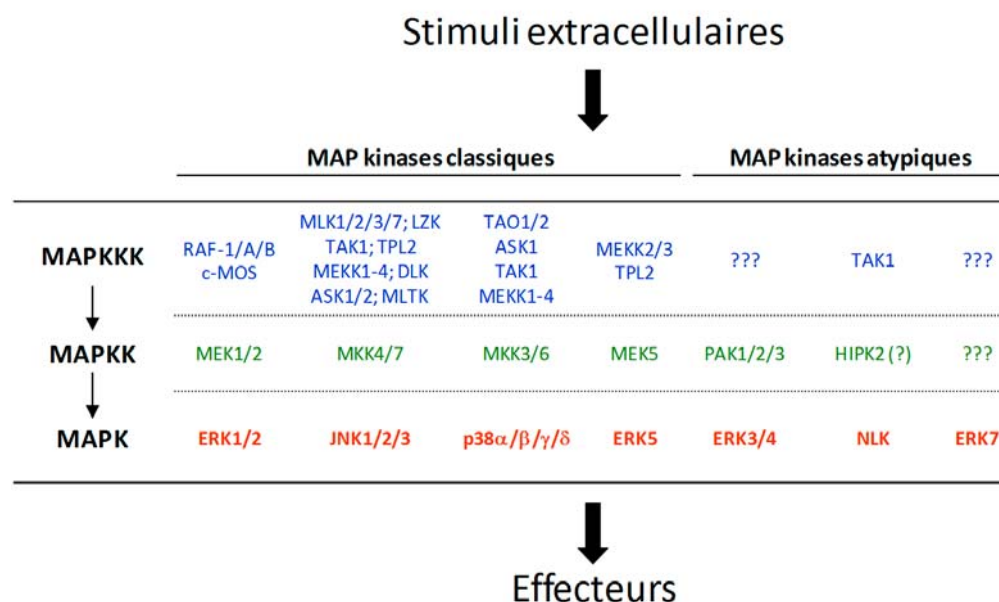


Figure 1.16 **Organisation des modules de MAP kinases chez l'humain**  
Adapté de [398].

Cette cascade de signalisation est un paradigme pour expliquer la séquence d'événements par lesquels un facteur extracellulaire entraîne une réponse intracellulaire (voir Figure 1.17). Lorsqu'il y a liaison d'un ligand (un facteur mitogénique, une cytokine ou un facteur de différenciation) au récepteur transmembranaire à activité tyrosine kinase, celui-ci homo-dimérise. La dimérisation du récepteur stimule son autophosphorylation sur plusieurs tyrosines du domaine intracellulaire [399]. Le changement de conformation du récepteur généré par la phosphorylation permet une interaction avec le domaine d'interaction aux tyrosines phosphorylées SH2 de la protéine GRB2 (*Growth factor receptor bound-protein 2*) [400]. Associée au récepteur, GRB2 recrute SOS (*Son of sevenless*), un facteur d'échange de nucléotides guanines (GEF) [401, 402]. SOS catalyse l'échange du GDP pour un GTP sur son substrat Ras. La forme Ras-GTP étant active, elle recrute la MAPK kinase kinase (MAPKKK) Raf à la membrane et l'active à son tour [403, 404]. Raf phosphoryle ensuite ses substrats MEK1/2 (*MAP kinase/ERK kinase 1/2*, MAPK kinase) sur les sérines de leur boucle d'activation, leur conférant alors une activité enzymatique maximale [405-407]. Finalement, MEK1/2 phosphorylent ERK1/2, leurs uniques substrats connus, sur les deux résidus phospho-accepteurs du motif Thr-Xxx-Tyr de la boucle d'activation [408-410]. ERK1/2 phosphorylent des résidus Ser/Thr suivis d'une proline (*proline-directed kinase*). À ce jour, près de 200 substrats de ces MAP kinases ont été identifiés [411]. Ceux-ci, dont la majorité est constituée de facteurs de transcription, sont distribués dans tous les compartiments intracellulaires et sont responsables de générer la réponse dictée par la nature du ligand extracellulaire, l'intensité et la durée du signal, ainsi que le type cellulaire. Au cours des dernières années, des dizaines de régulateurs positifs et négatifs de la voie ont été identifiés, notamment des protéines d'échafaudage, des phosphatases et des protéines affectant la localisation de ERK1/2 (revue dans [412-414]).

### 1.5.1.1 Les fonctions de la voie ERK1/2

La voie de signalisation ERK1/2 est impliquée dans plusieurs processus tels l'embryogenèse, le développement, la différenciation, la prolifération, la survie et la

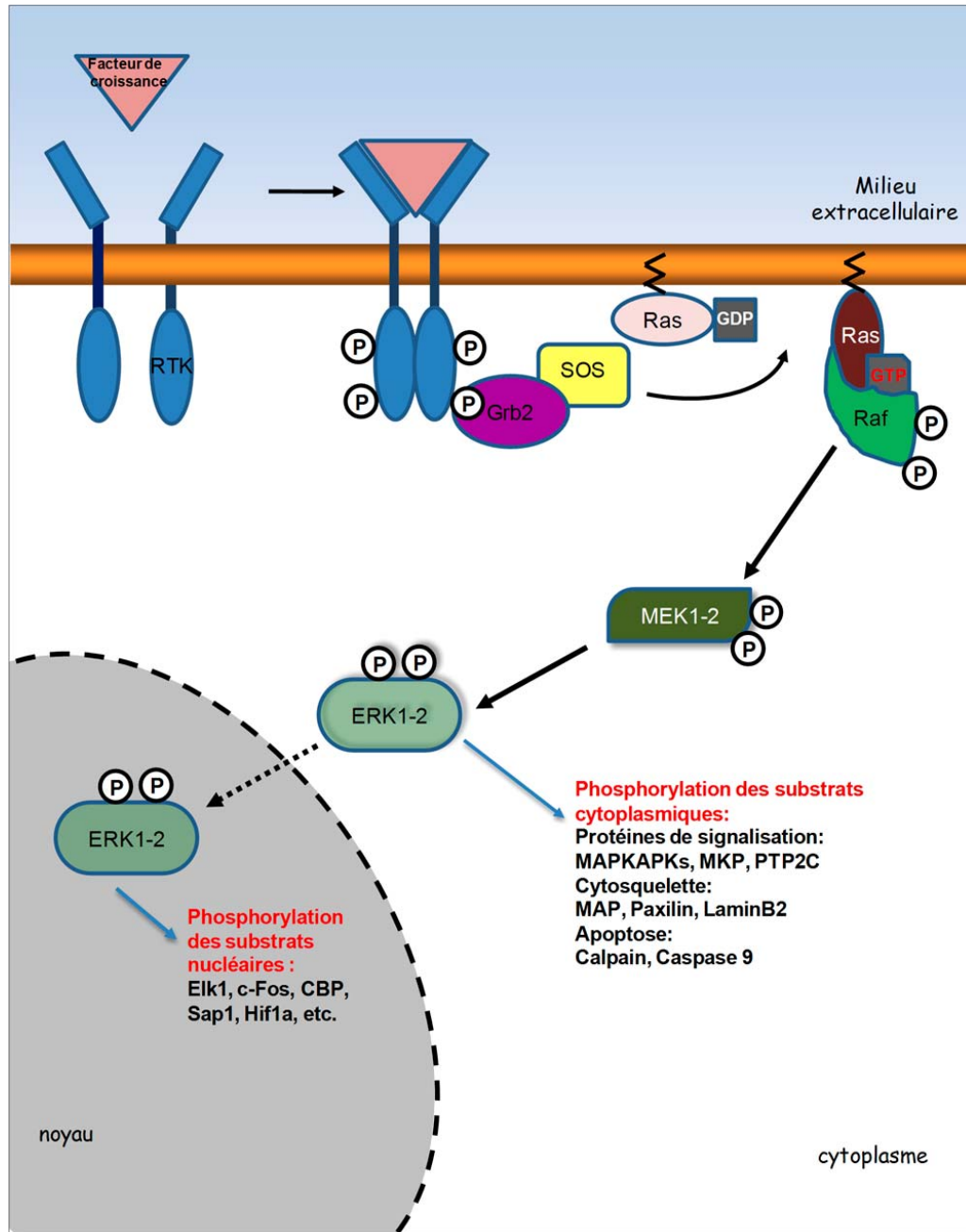


Figure 1.17 Activation de la voie de signalisation Ras-RAF-MEK-ERK  
 Voir le texte pour les détails.

mort cellulaire (revue dans [415, 416]). Les rôles physiologiques de ERK1 et ERK2 ont été principalement révélés suite aux études des souris avec invalidité des gènes *Erk1* et *Erk2*. Les souris *Erk1*<sup>-/-</sup> sont viables, fertiles et de taille normale [417].

Cependant, la maturation des thymocytes issus de ces souris est légèrement compromise et ils prolifèrent également plus lentement après stimulation des récepteurs des cellules T (*T-cell receptors*). De plus, il a été rapporté que les souris *Erk1* KO sont hyperactives et ont une meilleure mémoire à long terme, suggérant une implication dans des processus neurologiques [418]. Par contre, les souris qui possèdent une délétion génétique de *Erk2* présentent des phénotypes totalement différents. En effet, les souris *Erk2*<sup>-/-</sup> meurent *in utero*, au stade embryonnaire E6.5, suite à un problème de développement du trophoblaste, une structure qui donne naissance au placenta [419-421]. Des études de chimères ont confirmé que ce défaut est autonome à la cellule et provient de problèmes de formation du cône ectoplacentaire et de l'ectoderme extra-embryonnaire [419].

Ces phénotypes observés chez les souris mutantes sont très intéressants parce qu'ils suggèrent l'existence possible de rôles spécifiques de ERK1 et ERK2. Ces deux MAP kinases présentent une homologie de séquence de 85%, leur activation semble être parfaitement identique et aucun substrat n'est connu pour être phosphorylé seulement par une seule des deux kinases (Figure 1.20, p. 86) [411, 415, 422]. En fait, ces résultats suggèrent que ERK1 est dispensable pour le développement, alors que ERK2 est essentielle. Cependant, on ne sait pas si ces différents phénotypes sont dus au fait que ERK1 et ERK2 ont des patrons d'expression uniques ou si c'est parce qu'elles ont des substrats ou des partenaires d'interaction qui leur sont exclusifs. Des expériences de « *knock in* », dans lesquelles le gène *Erk1* est inséré au locus de *Erk2*, permettraient de répondre à ces questions.

#### 1.5.1.1.1 Contrôle de la transition G1/S

ERK1/2 ont été identifiées comme étant des protéines de 42-44 kDa rapidement phosphorylées en tyrosine en réponse à plusieurs facteurs mitogéniques [423-425]. Ces observations initiales ont suggéré que ERK1/2 pouvaient exercer un contrôle sur la prolifération cellulaire. Lorsque les cellules quiescentes sont stimulées par différents facteurs mitogéniques, ERK1/2 sont rapidement et fortement activées en 5-10 minutes [415, 426]. Par la suite, on observe une deuxième activation plus faible mais maintenue tout au long de la phase G1. C'est en 1993, que le groupe de J.

Pouyssegur a démontré pour la première fois que la surexpression d'un mutant inactif de ERK1 ou que l'inhibition de l'expression de ERK1/2 avec des ARN antisens ralentit fortement la prolifération de fibroblastes de hamster [427]. Récemment, dans le but de déterminer si ERK1 ou ERK2 accomplissent des fonctions spécifiques dans le contrôle de la prolifération des fibroblastes, des études génétiques (utilisation de siRNA spécifiques et analyse de MEFs primaires isolées de souris mutantes) ont été réalisées [428, 429]. Ces études ont permis de conclure que ERK1 et ERK2 possèdent des fonctions redondantes au niveau du contrôle de la progression dans le cycle cellulaire, que l'ablation génétique simultanée de ERK1/2 prévient complètement la prolifération et que leur contribution est directement reliée à leur niveau d'expression respectif (ERK2 étant plus exprimée que ERK1). De plus, tout comme ces deux MAPKs, la majorité des composantes de la voie ont des rôles clairement établis dans la prolifération cellulaire [415, 430]. Un fait important à souligner est que Ras et Raf, des activateurs en amont de ERK1/2, sont des oncogènes fréquemment mutés en formes actives dans plusieurs cancers (environ 25% de tous les cancers dans le cas de Ras) [3, 431].

Comment ERK1/2 influencent-elles la phase G1? Principalement en permettant l'induction de l'expression de la cycline D1 (revue dans [415, 430]). Tel que mentionné à la Section 1.1.3.4, les complexes CDK4-6/cycline D sont importants pour activer les facteurs de transcription de la famille E2F requis pour lancer le programme de la phase S. Il a été noté que l'expression de formes actives de MEK1 augmente l'expression de la cycline D1, alors qu'à l'inverse, l'expression de dominants inactifs de MEK1/2 inhibe l'expression de cette cycline [432]. Lorsqu'elles sont activées, ERK1/2 phosphorylent le facteur de transcription Elk1, responsable de l'expression de c-Fos, un facteur de transcription qui hétérodimérise avec c-Jun pour former le complexe transcriptionnel AP-1 [433]. c-Fos est également stabilisé suite à sa phosphorylation par Erk1/2 sur deux Ser en C-terminal [434]. L'activation du complexe AP-1 contribue à augmenter l'expression de la cycline D1 puisque le promoteur de celle-ci contient une région reconnue et liée par AP-1 [435]. La phosphorylation par ERK1/2 de la Ser 62 du facteur de transcription c-Myc, qui a

pour effet d'augmenter sa stabilité, est un autre mécanisme permettant l'expression de la cycline D1 en réponse aux facteurs mitogènes [436, 437].

En plus de ce rôle très bien étayé dans la progression en G1, des données dans la littérature suggèrent que la voie de signalisation ERK1/2 est impliquée dans différents aspects du contrôle de la méiose et de la mitose.

#### **1.5.1.1.2 La maturation des ovocytes**

Chez tous les animaux, les ovocytes immatures sont arrêtés à la transition G2/M, en attente des signaux de maturation qui leur permettront de devenir fertilisables. Bien qu'il y ait des différences dans la nature des signaux et que la maturation des ovocytes soit quelque peu différente d'une espèce à l'autre, les principes généraux sont très bien conservés. Les études à l'aide de la grenouille africaine *Xenopus laevis* ont largement contribué à notre compréhension des événements biochimiques qui se produisent lors de ce processus [438, 439]. Ainsi, la voie MAPK semble y exercer un rôle déterminant pour l'activation du complexe CDK1/cycline B.

La maturation ovocytaire est déclenchée par la progestérone, une hormone stéroïdienne. Le premier effet de la progestérone observé est l'inhibition de la PKA provoquée par une baisse importante des niveaux d'AMPc. Suite à cela, la synthèse protéique à partir des ARNm maternels est déclenchée et la protéine c-Mos est alors exprimée. Mos, identifié comme proto-oncogène chez les cellules transformées, est une MAPKKK qui phosphoryle MEK [440]. L'expression de Mos est suffisante pour activer la voie ERK dans les ovocytes [441-443]. Ainsi activée, MAPK phosphoryle et active la MAPKAP kinase p90<sup>RSK</sup> [444]. La voie Mos-MEK-MAPK-RSK active et maintient l'activité CDK1/cycline B pendant le processus de maturation des ovocytes, et ce, dès la transition G2/Méiose I. Il a été démontré que p90<sup>RSK</sup> inhibe par phosphorylation directe la kinase Myt1, un inhibiteur de CDK1 (Section 1.2.1.3.2.1) [445].

### 1.5.1.1.3 Raf-MEK-ERK : être ou ne pas être activées en G2/M?

De nombreuses études ont montré que la voie Raf-MEK-ERK est activée au cours de la mitose dans les cellules somatiques. Cependant, autant d'articles rapportent que la voie n'est ni activée pendant la mitose, ni requise pour son bon déroulement.

C'est en 1992 que Tamemoto *et al.* ont rapporté pour la première fois une activation biphasique de ERK1/2 au cours du cycle cellulaire avec des pics d'activation au cours de la phase G1 et de la transition G2/M [446]. Par la suite, plusieurs groupes ont également observé, par des essais d'activité kinase ou à l'aide d'anticorps phospho-spécifiques, que ERK1/2 sont activées en mitose dans des cellules HeLa et NIH 3T3 synchronisées [446-449]. Des expériences d'immunofluorescence, à l'aide d'anticorps phospho-spécifiques, ont permis de détecter la présence de MEK et ERK actives durant la mitose aux centrosomes, aux kinétochores, aux pôles du fuseau mitotique et au *midbody* [450-453]. Cependant, puisque l'anticorps phospho-spécifique dirigé contre les formes actives de MEK reconnaît également la protéine nucléophosmine/B23 qui est phosphorylée lors de la mitose, la localisation de MEK activée aux centrosomes pourrait être un artéfact expérimental [454, 455]. Il a également été rapporté que la MAPKKK Raf est active dans des cellules arrêtées en mitose [456, 457]. Cette activation est accompagnée d'un retard de migration sur gel provoqué par l'hyperphosphorylation du domaine C-terminal de la protéine.

D'un autre côté, plusieurs groupes n'ont pu détecter de formes activées de ERK1/2 dans des cellules arrêtées en prométaphase suite au traitement avec le nocodazole [446, 458-460] ou dans des cellules qui atteignent la mitose après un arrêt à la transition G1/S [461]. D'autres ont rapporté que MEK1, mais non MEK2, est fortement activée pendant la mitose, sans toutefois conduire à l'activation de son substrat ERK1 [461]. Le clivage protéolytique ainsi que la phosphorylation de la Thr 286 dépendants de CDK1 empêche l'interaction entre la forme clivée de MEK1 et ERK. L'activation de MEK, et non celle de ERK tel qu'observée dans ces conditions expérimentales, soulève la possibilité que MEK ait d'autres substrats que ERK, ce qui



n'a encore jamais été rapporté. De même, selon certaines équipes, l'activation de Raf-1 en mitose n'est pas stimulée par la protéine Ras et ne conduit pas à l'activation de MEK et ERK [462, 463]. Le mode d'activation de Raf et les effets engendrés par celle-ci seraient donc différents de ce qui est observé suite à une stimulation mitogénique.

À la lumière de toutes ces publications, il est difficile d'affirmer ou d'infirmer avec certitude que ERK est active durant la mitose. Dans ce cas, comment se déroule la mitose lorsqu'on affecte l'activité de cette voie de signalisation?

#### **1.5.1.1.4 Rôle lors de l'entrée en mitose**

L'utilisation de mutants dominants négatifs, d'inhibiteurs pharmacologiques de MEK et de siRNA dirigés contre les différents membres de la voie démontre que d'interférer avec celle-ci retarde l'entrée en mitose en prolongeant la durée de la phase G2 et augmente le temps requis pour progresser de la métaphase à l'anaphase [448, 449, 453, 460, 464]. De plus, le facteur de transcription FOXM1c, responsable de l'expression de la cycline B, est phosphorylé et activé par ERK1/2 [465]. Il semble donc que ERK1/2 aient la capacité de réguler l'entrée en mitose en permettant l'expression de gènes spécifiques à celle-ci.

Des études réalisées sur *X. laevis* ont apporté quelques précisions sur les mécanismes impliquant ERK lors de l'entrée en mitose. Par exemple, ERK phosphoryle la cycline B1 sur deux sérines situées dans sa séquence de rétention cytoplasmique (CRS) [466, 467]. Ces sites phosphorylés sont importants pour favoriser l'import nucléaire essentiel pour promouvoir l'entrée en mitose (Section 1.2.1.2). Également, tel que décrit plus haut, RSK, qui est phosphorylée par ERK, active CDK1 en inhibant la kinase Myt1 [445]. De plus, il a été démontré que ERK phosphoryle Cdc25 chez le xénope [468]. La phosphorylation sur deux thréonines et une sérine stimule son activité phosphatase, ce qui facilite l'entrée en mitose. Les auteurs de cette dernière étude ont rapporté les mêmes observations dans des cellules de mammifères, suggérant que l'activation de Cdc25C par ERK est un mécanisme conservé au cours de l'évolution.

Récemment, un groupe a publié une étude faisant appel à la vidéo-microscopie en temps réel pour tenter de résoudre l'épineuse question du rôle de ERK1/2 dans l'entrée des cellules de mammifères en mitose [469]. En bloquant la voie de signalisation MEK1/2-ERK1/2 avec des inhibiteurs pharmacologiques de MEK lorsque des cellules normales ou transformées se trouvaient bien engagées en phase G2, les auteurs ont pu démontrer que l'activité ERK1/2 n'est pas requise en fin de G2 pour l'entrée en mitose, la transition métaphase-anaphase et l'activation du point de contrôle des fuseaux mitotiques. Cependant, si la voie est inhibée au début de la phase G2, l'entrée en mitose est quant à elle retardée. Ces résultats suggèrent donc que la voie ERK est requise à un moment précis pour le déroulement de l'entrée en mitose.

#### **1.5.1.1.5 Rôle dans le point de contrôle en G2/M**

Il est bien connu que la voie ERK est activée suite à la liaison de facteurs de croissance à leurs récepteurs membranaires. Il semble également que la voie peut être sollicitée par des stress cellulaires, dont les radiations ionisantes (IR) [470-473]. Tel que décrit précédemment, il est nécessaire pour une cellule de bloquer l'entrée en mitose lorsqu'elle est soumise à des stress qui induisent des dommages à l'ADN. Ainsi, l'expression d'un mutant dominant négatif de MEK empêche les cellules de se remettre d'un arrêt en G2 provoqué par les IR [474]. De plus, dans ces conditions, l'inhibition pharmacologique de la voie prévient partiellement l'arrêt des cellules en G2/M [475, 476]. De manière similaire à l'exposition à des stress, la surexpression de la protéine BRCA1 induit un arrêt des cellules en G2 [477]. Cet arrêt est en partie exécuté suite à l'activation de ERK qui, dans ce cas, augmente l'activité des kinases Wee1 et Chk1. Ceci a pour conséquence d'entraîner la dégradation par le protéasome de la phosphatase Cdc25C [478]. Finalement, bien que la présence de facteurs de croissance conduise généralement les cellules dans la phase S, un traitement des cellules en phase G2 par différents agents mitogéniques entraîne un arrêt du cycle cellulaire, qui est dépendant de l'activité MEK-ERK-RSK [479]. Un des mécanismes impliqués dans cet arrêt de la progression dans le cycle, est la diminution de la stabilité de Cdc25B [480].

### 1.5.1.1.6 Fragmentation du Golgi

Durant la mitose, la structure dynamique et organisée de l'appareil de Golgi est démantelée pour être dispersée dans le cytoplasme. Lorsque les deux cellules filles sont formées, elles ont théoriquement reçu la même quantité de matériel pour reformer un nouveau réseau de saccules golgiennes. Plusieurs études, principalement des expériences de reconstitutions *in vitro*, ont décrit le rôle de la voie MEK/ERK dans la fragmentation du Golgi à ce stade du cycle, ce qui permet de proposer un modèle. Il est intéressant de mentionner que cette fonction de la voie MEK/ERK est limitée à certains isoformes spécifiques des composantes. Ainsi, lors de la mitose, RAF-1 active l'isoforme MEK1b, et non pas MEK2 [481-484]. Dans ce processus, c'est ERK1c, un isoforme de ERK1 obtenue par épissage alternatif et dont l'activité augmente au cours de la mitose, qui agit comme effecteur de la voie de signalisation à l'appareil de Golgi [485]. Pour l'instant, très peu de substrats de ERK permettant d'expliquer comment elle agit lors de la fragmentation du Golgi ont été identifiés. La protéine GRASP 55 a été démontrée comme étant un substrat de ERK2, mais on ne sait pas si cet événement de phosphorylation est suffisant pour induire la fragmentation, ni si ERK1c peut phosphoryler cette protéine [486]. L'identification de substrats est requise pour bien comprendre le rôle de la voie ERK dans cet événement mitotique. De plus, des expériences supplémentaires sont requises pour évaluer le rôle réel de ERK1 dans la fragmentation du golgi puisque les MEFs *Erk1*<sup>-/-</sup> prolifèrent, quoique légèrement plus lentement que les MEFs *Erk1*<sup>+/+</sup>, et que des données suggèrent que certains types cellulaires prolifèrent normalement sans l'activité de ERK1 et ERK2 ([429] et M. Saba-El-Leil et S. Meloche, résultats non publiés).

### 1.5.2 La voie p38/MK2

La voie de signalisation p38 représente une des quatre cascades de MAP kinases classiques retrouvées chez les mammifères (Figure 1.16, p.61). Cette voie et celle des JNK (Section 1.5.3) sont activées en réponse aux stress cellulaires et inflammatoires, contrairement à la voie ERK qui est principalement activée en réponse aux facteurs mitogènes (Section 1.5.1) [487]. La kinase p38 a été identifiée

par quatre groupes différents comme étant 1) phosphorylée sur un (des) résidu(s) Tyr en réponse au LPS et au stress osmotique [488], 2) la cible d'inhibiteurs pyridinyl-imidazole qui préviennent la production de cytokines pro-inflammatoires [489] et 3) la kinase conduisant à l'activation de MAPKAPK2 en réponse à un stress thermique, à l'arsénite ou à l'interleukine-1 [490, 491]. L'analyse de la séquence de p38 a indiqué qu'elle est l'orthologue de la kinase Hog1 (*High-osmolarity glycerol 1*) de la levure *S. cerevisiae* qui est requise pour l'adaptation à des variations d'osmolarité dans le milieu extracellulaire [492].

Chez les mammifères, il existe quatre membres de la famille p38 : p38 $\alpha$  est exprimée de façon ubiquitaire, p38 $\beta$  est exprimée majoritairement dans le cœur et le cerveau, p38 $\gamma$  est retrouvée dans les muscles squelettiques et p38 $\delta$  est présente principalement dans certaines glandes endocrines [384, 493]. L'activation de p38 requiert la double phosphorylation de la boucle d'activation sur le motif Thr-Gly-Tyr par des membres de la famille MAPKK. MKK3 phosphoryle p38 $\alpha/\gamma/\delta$ , tandis que MKK6 active les quatre p38 [493]. Contrairement à MKK3/6 qui sont spécifiques aux p38, MKK4 peut phosphoryler p38 et les JNK. L'activation de MKK3/6 est obtenue suite à la phosphorylation de leur boucle d'activation, qui peut être effectuée par plusieurs membres de la famille des MAPKKK : ASK1 (*Apoptosis signal-regulating kinase 1*), TAK1 (*TGF  $\beta$ -activated kinase 1*), TAO 1/2 (*Thousand-and-one amino acid 1/2*) et MEKK 3/4 (*MAPK/ERK kinase kinase 3/4*) (Figure 1.16, p.61).

Lorsqu'elle est activée, cette cascade enzymatique génère diverses réponses cellulaires qui dépendent de la nature du stimulus, de son intensité et de sa durée ainsi que du type cellulaire. Les multiples réponses sont obtenues suite à l'activation ou l'inhibition des différents substrats phosphorylés par p38. Les membres de la famille p38 ont généralement la capacité de phosphoryler les mêmes substrats, bien que quelques substrats soient apparemment restreints à une ou deux formes. Les études réalisées *in vitro* et *in vivo* avec l'inhibiteur pharmacologique SB203580 spécifique à p38  $\alpha$  et  $\beta$  ont permis l'identification de plus d'une centaine de substrats. Parmi ceux-ci, on retrouve des protéines nucléaires, dont des facteurs de transcription et des régulateurs de la chromatine, des kinases de la grande famille des MAPKAPK

(MSK1/2, MNK1/2 et MK2/3/5), ainsi que plusieurs protéines cytoplasmiques contrôlant la transcription, la traduction, l'apoptose, le remodelage du cytosquelette, la migration cellulaire, la différenciation et la prolifération (revue dans [487, 493]).

### 1.5.2.1 Rôles physiologiques de la voie p38

Les études génétiques chez la souris ont grandement contribué à notre compréhension des rôles physiologiques de la voie p38, dont les membres exercent certaines fonctions redondantes [493]. Ainsi, la délétion ciblée du gène *Mapk14* (*p38α*) provoque des défauts du développement du placenta conduisant à la mort embryonnaire, suggérant des fonctions uniques et spécifiques à celle-ci [494-496]. Par contre, lorsque le gène *p38α* est spécifiquement inactivé dans les embryons (qui se développent normalement jusqu'à la naissance puis meurent quelques heures après) ou les souris adultes, on constate que p38α agit principalement au niveau de l'homéostasie du système pulmonaire [497, 498]. En fait, p38α inhibe la prolifération des cellules normales (et cancéreuses) et provoque la différenciation des cellules souches pulmonaires. En plus d'affecter la prolifération des cellules pulmonaires, p38 contrôle également celle des cellules hématopoïétiques, hépatiques et cardiaques [498]. p38α limite la prolifération des cellules en inhibant la voie JNK/c-Jun (Section 1.5.2.1) et en contrôlant la transcription et la stabilité protéique de la cycline D1 [432, 497-499]. À l'image des souris *p38α<sup>-/-</sup>*, les souris *Mkk3<sup>-/-</sup>Mkk6<sup>-/-</sup>* ont également des défauts de formation du placenta qui empêchent les embryons de se développer au-delà du jour E11-E11.5 [500]. Les souris simples mutantes *Mkk3<sup>-/-</sup>* ou *Mkk6<sup>-/-</sup>* sont viables, mais présentent des défauts de production de cytokines et d'apoptose des cellules T [501, 502]. En accord avec l'idée qu'il existe de la redondance entre les fonctions des différentes p38, les souris mutantes homozygotes pour les gènes *p38β*, *p38γ* et *p38δ* sont viables et n'ont pas de défaut apparent, indiquant que seule *p38α* est essentielle [493, 503].

### 1.5.2.2 Rôles dans les points de contrôles en G2/M

La voie p38 est impliquée principalement dans l'adaptation cellulaire suite à des variations d'osmolarité, à la production de cytokines pro-inflammatoires et, comme il vient d'être décrit, au contrôle de la prolifération et de la différenciation (revue dans [487]). En plus de ces fonctions, des rôles de p38 lors de l'entrée et la progression en mitose ont récemment été décrits. En effet, p38 est activée lorsque les cellules sont bloquées en prométaphase après l'activation du point de contrôle du fuseau mitotique [458]. L'activité de cette MAPK est importante pour activer le SAC et arrêter les cellules à ce stade du cycle. Le mécanisme exact par lequel p38 participe au SAC n'est pas bien connu. Toutefois, il a été démontré récemment que l'activité p38 conduit à la dégradation de Cdc20 lorsque le SAC est sollicité suite au traitement des cellules au cadmium [504]. De plus, dans ces conditions, l'inhibition de p38 interfère avec la formation du complexe Mad2-Cdc20-APC3.

En plus de ce rôle dans le SAC, plusieurs évidences expérimentales suggèrent que la voie de signalisation p38 bloque la progression des cellules dans la phase G2 dans certaines conditions. Ainsi, il est maintenant bien accepté que la voie p38 définit une voie de signalisation importante pour le point de contrôle en G2 (Figure 1.15, p.54) [384]. Il est connu depuis très longtemps que les rayons UV activent la voie de signalisation p38 et que, d'un autre côté, ceux-ci provoquent des dommages à l'ADN qui bloquent la prolifération des cellules [336, 487]. Le groupe de A. Fornace a donc inactivé p38 $\alpha/\beta$ , dans le but de démontrer leurs contributions importantes dans l'arrêt des cellules en G2 exposées aux rayons UV [505]. Depuis, il a été confirmé dans plusieurs lignées cellulaires que différents agents qui génèrent des dommages plus spécifiques à l'ADN (inhibiteurs de topoisomérase II et d'histones déacétylases, agent méthylant témozolomide, cisplatine et doxorubicine) arrêtent les cellules en G2 après avoir activé la voie p38 [506, 507]. Celle-ci agit également comme régulateur de l'entrée en mitose en absence de dommage à l'ADN, dans des conditions normales, du moins dans certaines lignées cellulaires [508]. De plus, le groupe de J. Pines a proposé que p38 participe au point de contrôle lors de l'antéphase [509]. Cette dernière a été décrite, lors d'un « essai littéraire scientifique » original, pour

définir la période où l'on aperçoit les premières étapes de la condensation des chromosomes en fin de phase G2 [15]. Elle représente une étape qui est réversible d'un point de vue de la préparation à la mitose. Ainsi, le point de contrôle de l'antéphase permet à une cellule en début ou milieu de prophase qui subit certains types de stress, tels un traitement au fluorure, l'hypothermie ou un démantèlement des chromosomes, de procéder à la décondensation des chromosomes, la déphosphorylation des protéines nucléaires phosphorylées et à l'arrêt du cycle cellulaire [15]. Ce point de contrôle est différent de celui en G2, lorsqu'il y a des dommages à l'ADN. La compréhension des détails moléculaires du point de contrôle de l'antéphase est très limitée. Cependant, il semble que la E3 ubiquitine ligase Chfr (*Checkpoint with forkhead and ring finger domains*), qui agit en amont de p38, soit requise pour bloquer l'entrée en mitose [509, 510].

#### **1.5.2.2.1 Comment p38 est-elle activée en réponse aux dommages à l'ADN et comment agit-elle pour provoquer l'arrêt en G2?**

Tout d'abord, il a été décrit que les kinases TAO 1/2 sont activées par des stress cellulaires et qu'elles conduisent à la phosphorylation de la boucle d'activation de p38 via MKK3/6 [511]. Dans des cellules déficientes pour ATM, les kinases TAO sont moins fortement activées, suggérant que ATM agit en amont des TAO. De plus, l'inhibition de TAO compromet partiellement l'arrêt en G2 imposé par l'exposition aux rayons UV, aux IR ou à l'hydroxyurée. Récemment, TAO1 a été identifiée dans un crible à grande échelle visant à caractériser de nouvelles kinases/phosphatases importantes pour le déroulement de la mitose [512]. En fait, en absence de TAO1, les chromosomes sont mal ségrégés et l'activation du SAC est moins soutenue, accélérant ainsi le passage en anaphase. De plus, selon le groupe de M. Yaffe, la kinase ATR est également impliquée dans l'activation de p38 et MK2 [513]. Un autre mécanisme qui permet l'activation de p38 (ainsi que des autres MAP kinases classiques ERK1/2 et JNK) est dépendant des récepteurs à activité tyrosine kinase (RTKs) mais est indépendant des dommages à l'ADN et des ligands (revue dans [514]). Dans ce contexte, il a été proposé que les radiations UV induisent l'inhibition

de protéine-tyrosine phosphatases, entraînant ainsi l'activation soutenue des RTKs [515, 516].

Lorsqu'elle est activée, p38 inhibe la progression en mitose, principalement via les phosphatases Cdc25 et p53. Tout d'abord, p38 phosphoryle Cdc25B localisée aux centrosomes [505, 508]. Cette phosphorylation a comme conséquence d'augmenter l'interaction entre l'ancre cytoplasmique 14-3-3 et Cdc25B, l'éloignant des centrosomes, où elle est requise pour activer CDK1. Toutefois, la démonstration de la phosphorylation directe de Cdc25 par p38 n'est pas tout à fait claire et est un sujet de controverse. Il est plus probable que l'activité kinase présente dans l'immuno-précipitat provienne de MK2, qui s'associe fortement à p38 *in vivo* et qui représente un substrat majeur de cette voie MAPK [517, 518]. En effet, MK2 phosphoryle Cdc25B/C *in vitro* sur la sérine 309/216, alors que p38 ne phosphoryle que la Ser 249 de Cdc25B *in vitro* [519, 520]. *In vivo*, MK2 est requise pour arrêter les cellules en phase G2 suite à une exposition aux rayons UV et pour prévenir la mort en mitose due à l'accumulation de dommages à l'ADN [519]. De manière semblable à ce qui a été rapporté pour l'activation des kinases TAO, l'activation de p38/MK2 en réponse à des agents chimiques qui induisent des dommages à l'ADN nécessite l'activité des kinases ATM/ATR [513]. Le module p38/MK2 est nécessaire pour le point de contrôle en G2 et la survie cellulaire seulement lorsque p53 n'est pas fonctionnel, mais est dispensable lorsque p53 est actif [513]. Toutefois, il semble que p38, tout comme les autres MAP kinases, puisse phosphoryler p53 sur les Ser 33 et Ser 37, et sur la Ser 15 (ce qui est effectué également par ERK), contribuant ainsi à la régulation de l'activité et de la stabilité de p53 [521, 522]. Dans un contexte où p53 est absent, il a été rapporté que l'absence de MK2 accélère légèrement la croissance de tumeurs, faisant de MK2 un suppresseur de tumeurs [513].

#### **1.5.2.2.1.1 Les MAPKAP kinases en G2**

Les MAPKAP kinases MK2, MK3 et MK5 ne sont retrouvées que chez les vertébrés et les insectes. Cependant, les levures *S. pombe* et *S. cerevisiae* expriment des kinases ayant des fonctions similaires et qui possèdent des caractéristiques structurales retrouvées dans le domaine kinase des membres de la grande famille des



CaMK (*Calcium/calmodulin-dependent protein kinase*), dont font partie les MKs [518]. Ainsi, la surexpression des kinases de *S. cerevisiae* Rck1/2 (*Radiation sensitivity complementing kinase 1/2*) arrête la progression en phase G2 des levures *S. pombe* déficientes en point de contrôle du cycle cellulaire [523]. La surexpression de ces deux kinases provoque une élongation des levures et un ralentissement de la croissance. Chez *S. cerevisiae* les gènes *rck1* et *rck2* ne sont pas essentiels à la viabilité, mais la délétion de *rck2* augmente la sensibilité aux rayons UV [524, 525]. Chez *S. pombe* Mkp1/2 (*MAPKAP kinase Schizosaccharomyces pombe 1/2*) sont aussi impliquées dans le contrôle d'entrée en mitose. Or, la surexpression de Mkp1 cause l'arrêt des cellules en phase G2, tandis que sa délétion cause une entrée prématurée en mitose [526]. Mkp1 est activée à chacun des cycles et contrôle l'entrée en mitose en absence de dommage à l'ADN. Le rôle de Mkp1 dans l'arrêt en phase G2 repose également sur la phosphorylation de Cdc25 ce qui provoque sa liaison à Rad23, l'homologue de 14-3-3, et sa séquestration dans le cytoplasme [526].

### 1.5.3 La voie JNK

Une troisième cascade de signalisation MAP kinase présente chez les mammifères est la voie JNK (*c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal kinase*) (voir Figure 1.16, p.61). Chez les humains, on retrouve trois JNK (JNK1/2/3) présentant 85% d'homologie entre elles. Tout comme les autres MAP kinases classiques, elles sont activées suite à la phosphorylation des deux sites phospho-accepteurs du motif Thr-Pro-Tyr de la boucle d'activation par les MAPKK MKK4/7 [527]. Les JNK (ou SAPK, *Stress-activated protein kinase*) sont activées par une multitude de signaux extracellulaires et de stress cellulaires : les cytokines (TNF $\alpha$ , IL-1), stimulation des récepteurs des cellules T, les rayons UV, les radiations  $\gamma$ , les chocs thermiques, les changements d'osmolarité et les stress oxydatifs (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).

Initialement, JNK a été identifiée comme étant responsable de la phosphorylation du domaine d'activation en N-terminal du facteur de transcription c-Jun, en réponse aux rayons UV [528, 529]. Bien que le facteur de transcription hétérodimérique AP-1 (constitué des membres des familles Jun, Fos, ATF et MAF)

reste une des cibles principales de JNK, cette MAPK est aujourd'hui reconnue pour phosphoryler plusieurs autres facteurs de transcription tels que ATF-2, Elk-1, p53 et c-Myc, de même que les protéines Bcl-2, Bcl-xL, Bax, paxillin, 14-3-3 et plusieurs autres [527, 530, 531].

En examinant la longue liste de stimuli conduisant à l'activation de JNK, il n'est pas surprenant que les études biochimiques et génétiques chez la souris et chez les organismes modèles *D. melanogaster* et *C. elegans* aient impliqué les différents membres de la voie dans de nombreuses fonctions développementales et cellulaires. Ainsi, la signalisation via JNK est importante durant le développement embryonnaire, la signalisation de l'insuline, le vieillissement, la réponse immunitaire, la formation et le développement de tumeurs, la différenciation, la migration, la structure du cytosquelette, la prolifération, la survie cellulaire et l'apoptose (revue dans [531-534]). JNK contrôle également la prolifération cellulaire et exerce des fonctions lors de l'entrée et la progression en mitose.

### 1.5.3.1 La progression dans la phase G1

À l'image des voies ERK et p38, la voie JNK exerce un contrôle de la prolifération cellulaire. Cependant, les premières études de prolifération ont assigné des rôles opposés à JNK1 et JNK2 dans la prolifération. En effet, les MEFs *Jnk1*<sup>-/-</sup> prolifèrent moins que les MEFs sauvages, tandis que les MEFs *Jnk2*<sup>-/-</sup> prolifèrent légèrement plus rapidement, puisque leur phase G1 est plus courte [535, 536]. Quant aux MEFs *Jnk1*<sup>-/-</sup>*Jnk2*<sup>-/-</sup>, elles ont un désavantage de prolifération comparativement aux cellules normales et sont résistantes aux stress qui induisent l'apoptose. Plus récemment, une étude élégante faisant appel à des MEFs KI (*Knock-in*) homozygotes de *Jnk2*<sup>M108G</sup>, un mutant qui peut être inactivé spécifiquement par un inhibiteur pharmacologique, a démontré que JNK2 est un régulateur positif de la prolifération, tout comme JNK1. Cette différence de résultats de prolifération entre les MEFs dans lesquelles JNK2 est inhibée de manière constitutive ou conditionnelle s'explique par le fait que l'expression de JNK1 est augmentée dans les MEFs *Jnk2*<sup>-/-</sup>, compensant pour la perte de JNK2 [537]. Ce rôle des JNK dans la prolifération est principalement dû à l'activité du facteur de transcription c-Jun, un régulateur de la transition G1-S et

un substrat important des JNK [530]. Celle-ci lie et phosphoryle les Ser 63 et Ser 73 dans le domaine d'activation de c-Jun [538]. En fait, l'activité de c-Jun est régulée par phosphorylation et ces deux résidus, de même que les Thr 91 et Thr 93, doivent être phosphorylés pour obtenir l'activité transcriptionnelle maximale de c-Jun [539]. Selon la nature du stimulus extracellulaire, l'activité des JNK est suffisante et nécessaire pour la phosphorylation de ces quatre sites [540]. Par contre, dans les MEFs, ERK1/2 sont également impliquées dans la phosphorylation des Ser 63 et 73, mais de façon beaucoup plus modeste que JNK.

Les études génétiques ayant l'objectif d'identifier le rôle physiologique de c-Jun ont démontré qu'en absence de ce gène, les souris meurent entre les jours E12.5 et E14.5, faisant de *c-Jun* un gène essentiel au développement [541]. Les fibroblastes *c-Jun*<sup>-/-</sup> ne prolifèrent plus, puisque l'activité des CDK2/4/6 est sévèrement compromise et que l'expression de p53 et p21 est fortement augmentée [542, 543]. De plus, ces cellules sont plus susceptibles que les cellules sauvages de mourir par apoptose après une exposition aux rayons UV. Pour bien comprendre l'impact fonctionnel de la phosphorylation des Ser63 et 73, des sites majeurs de JNK, des souris mutantes *Jun*<sup>S63A/S73A</sup> ont été créées [544]. Ces souris sont viables et fertiles, mais plus petites que les souris contrôles. De plus, les MEFs *Jun*<sup>S63A/S73A</sup> KI ont moins d'activité transcriptionnelle AP1 et présentent des défauts de prolifération, quoique moins sévères que ce qui est observé dans les MEFs *c-Jun*<sup>-/-</sup>, puisque la cycline D1 est moins exprimée. Ces données sont en accord avec le fait que c-Jun soit le principal substrat de JNK dans le contrôle de la prolifération. Par contre, on ne connaît pas la conséquence physiologique de la phosphorylation des Thr 91 et 93. L'ensemble de ces études génétiques démontre que les JNK sont importantes pour la progression des cellules en G1. Des études suggèrent qu'en plus de son rôle dans la progression des cellules en G1, la voie de signalisation JNK a également un rôle à jouer dans le contrôle de la mitose.

### 1.5.3.2 Le contrôle de la mitose

Deux équipes ont observé que JNK1 phosphoryle la protéine BCL-2 suite à un arrêt des cellules en mitose par l'utilisation d'inhibiteurs des microtubules [545,

546]. Cette phosphorylation inactive BCL-2 et augmente la sensibilité des cellules mitotiques aux signaux entraînant la mort par apoptose [545]. Ces observations ont démontré pour la première fois un rôle spécifique pour JNK au cours de la mitose, malgré qu'il fût déjà connu que les agents inhibant la formation des microtubules activent JNK [547]. Par la suite, les protéines Tau et Sp1 ont également été décrites comme étant des substrats de JNK au cours de la mitose [548, 549].

L'inhibition de JNK dans les cellules de mammifères provoque l'accumulation de cellules avec un contenu en ADN de 4N [550-552]. L'inhibition prolongée de JNK entraîne l'apparition de cellules polyploïdes. Ce résultat semble être provoqué par des défauts lors de la formation du fuseau mitotique, de la ségrégation des chromosomes au cours de l'anaphase et de la cytokinèse [552]. Tandis que JNK2 joue un rôle plus important que JNK1 dans la progression des cellules en mitose, JNK1 provoquerait et JNK2 préviendrait l'apoptose induite par des stress. Ces résultats supportent fortement un rôle pour les membres de la famille des JNK lors de la mitose. En accord avec cette idée, il a été démontré que JNK2 est ubiquitinée par l'APC<sup>Cdh1</sup> en sortie de mitose [553]. La surexpression d'un mutant non dégradable de JNK2 arrête les cellules dans un état semblable à la prométaphase et perturbe la dynamique du fuseau mitotique. De plus, Cdh1 est phosphorylé par JNK2, ce qui diminue sa capacité à activer l'APC et provoque la relocalisation d'une fraction du pool de Cdh1 du noyau vers le cytoplasme.

Décrite comme étant localisée au cytoplasme et dans le noyau, une petite fraction de JNK a été détectée aux centrosomes tout au long du cycle cellulaire [554]. Par contre, la forme active ne semble être présente à la matrice péricentriolaire (PCM, *pericentriolar matrix*) que de la phase S à l'anaphase. Toutefois, le rôle de JNK à cette structure demeure inconnu. Certaines données permettent d'émettre l'hypothèse que JNK au centrosome participe à l'activation de CDK1 via Cdc25 [555, 556].

Suite à un traitement à l'anisomycine, un antibiotique qui inhibe la synthèse protéique et qui active les voies JNK et p38, les cellules arrêtent de se diviser et le complexe CDK1/cycline B devient inactif [555]. Cette baisse d'activité de CDK1 est due à l'inhibition de la phosphatase Cdc25C. En fait, JNK phosphoryle la Thr 168 de

Cdc25C au cours de la phase G2, ce qui bloque son activité enzymatique et cause un ralentissement de l'entrée en mitose [555, 556]. Ce mécanisme est important également pour l'arrêt des cellules en G2, suite à des dommages à l'ADN engendrés par les UV.

La caractérisation des fibroblastes de souris *Mkk7<sup>-/-</sup>*, une MAPKK de JNK, a permis la description d'un autre mécanisme reliant la voie JNK à l'activité CDK1 [557]. En plus d'avoir des défauts de prolifération et d'entrer prématurément en sénescence, les MEFs *Mkk7<sup>-/-</sup>* arrêtent en G2/M. Ce blocage en G2/M s'explique par le fait qu'il y a moins d'activité CDK1, car l'expression de celle-ci est diminuée. Les auteurs de l'étude ont pu démontrer que le facteur de transcription c-Jun, dont l'activité est contrôlée par JNK, régule directement la transcription de CDK1 en se liant à son promoteur.

Ainsi, il semble que la voie de signalisation JNK ait la capacité de promouvoir ou d'inhiber l'entrée et la progression en mitose, selon le type cellulaire, le contexte génétique et la nature du signal qui permet son activation.

#### **1.5.4 La voie ERK5**

La voie de signalisation MEK5-ERK5 est l'une des dernières cascades de MAP kinases à avoir été identifiée. Elle se distingue des autres modules MAP kinases du fait qu'elle n'est constituée que d'une seule MAPKK, MEK5 qui n'active qu'une seule MAPK, ERK5 (aussi nommée BMK1, *Big MAP Kinase 1*) (Figure 1.18) [558]. En amont de MEK5, on retrouve les MAPKKK MEKK2 et MEKK3, également impliquées dans l'activation de p38 et JNK de par leur capacité à phosphoryler MKK3/6 et MKK4/7 [559]. De nombreux stimuli mitogéniques (EGF, NGF, sérum) ou stress cellulaires et oxydatifs activent la voie de différentes façons [560-562]. Par exemple, les mitogènes mènent à l'activation de ERK5 en engageant des cascades de signalisation qui dépendent ou non de Ras [558]. Comme toutes les autres MAP kinases classiques, ERK5 requiert la double phosphorylation de sa boucle d'activation dans le motif Thr-Glu-Tyr. ERK5 est une protéine de 816 aa dont la masse moléculaire est de 98 kDa (Figure 1.20, p 86). Elle possède un domaine kinase

en N-terminal, qui est homologue à 51 % à celui de Erk1, et un domaine auto-inhibiteur en C-terminal. La forme ERK5 activée est relocalisée vers le noyau et interagit plus fortement avec ses substrats puisqu'elle s'auto-phosphoryle sur la queue C-terminale, causant un changement de conformation du NLS et du domaine d'interaction avec ses substrats (domaine CD) [563].

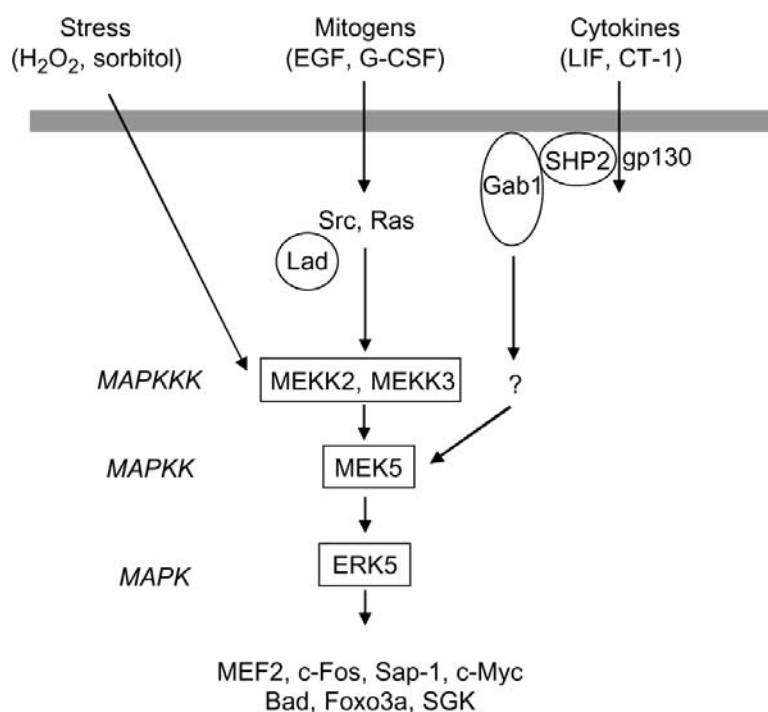


Figure 1.18 **Voie de signalisation de ERK5**

Les stimuli extracellulaires provoquent l'activation des MAPKKK MEKK2 et MEKK3, qui activent à leur tour MEK5. La phosphorylation de la boucle d'activation de ERK5 permet l'augmentation de son activité enzymatique et la phosphorylation de ses substrats. Quelques-uns sont indiqués au bas de la figure. D'après [558].

#### 1.5.4.1 Fonctions de la voie MEK5-ERK5

Bien que son organisation soit relativement simple, la voie de signalisation MEK5- ERK5 est impliquée dans un large éventail de processus biologiques, dont le développement, la prolifération et la survie cellulaire. Récemment, un rôle lors de la mitose lui a également été attribué.

#### **1.5.4.1.1 Rôle au cours du développement**

Tout d'abord, ERK5 a un rôle dans le développement cardiaque. En effet, les études phénotypiques des souris *Erk5* KO ont révélé que ces souris meurent au jour embryonnaire E10.5 suite à des défauts cardiovasculaires et angiogéniques [564-566]. Ensuite, l'utilisation d'oligonucléotides morpholinos antisens dirigés contre ERK5 et MEK5 chez le xénope a mis au jour des rôles positifs de cette voie de signalisation dans la formation des structures de la tête et dans la différenciation neurale au cours de l'embryogenèse [567].

#### **1.5.4.1.2 Rôle dans la prolifération et la survie cellulaire**

La voie de signalisation ERK5 participe de différentes façons au contrôle de la prolifération en réponse aux facteurs mitogéniques. Ainsi, une stimulation des cellules HeLa et MCF10A à l'EGF, active ERK5 qui phosphoryle et entraîne l'augmentation considérable de l'activité transcriptionnelle du facteur MEF2C [560, 568]. Une des cibles transcriptionnelles de cette réponse précoce, qui a pour effet d'induire la prolifération des cellules, est le facteur de transcription c-Jun. Par la suite, il a été démontré que l'activité de ERK5 intervient dans le contrôle de l'expression de la cycline D1, importante pour la progression en phase G1 (Section 1.1.3.4) [569]. De plus, la protéine kinase induite par le sérum et les glucocorticoïdes SGK (*Serum and glucocorticoid-inducible kinase*) a été identifiée par double hybride comme cible directe de ERK5 [570]. ERK5 active SGK par phosphorylation de la Ser 78, lui permettant ainsi d'exercer son rôle positif sur la progression en G1 [570, 571].

En plus de son rôle dans la prolifération, ERK5 intervient également dans la survie cellulaire. La première démonstration est venue de l'observation que l'inhibition de ERK5 avec le PD98059 et le U0126 (deux inhibiteurs bien connus des MAPKK) entraîne la mort de cellules neuronales PC12 traitées avec le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [572]. Plusieurs études ont proposé divers mécanismes d'action de ERK5 dans ce processus. Premièrement, la stimulation des axones neuronaux par la neurotrophine provoque l'endocytose de récepteurs à activité tyrosine kinase. Lors de leur transport rétrograde, ceux-ci activent ERK5, qui est ensuite transportée au noyau [573]. ERK5

phosphoryle et active alors le facteur de transcription CREB pour maintenir les cellules en vie. Deuxièmement, l'utilisation de mutants dominants actifs de ERK5 protège les cellules endothéliales de l'apoptose via un mécanisme impliquant la phosphorylation de Bad [574]. Finalement, dans les fibroblastes *Erk5<sup>-/-</sup>* et *Mek5<sup>-/-</sup>*, un stress osmotique provoque une augmentation de l'expression de FasL, ce qui entraîne la mort cellulaire [575]. Tous ces résultats suggèrent donc que MEK5 et ERK5 interviennent dans la survie cellulaire.

#### 1.5.4.1.3 Rôle lors de la mitose

La voie de signalisation MEK5-ERK5 a aussi été impliquée dernièrement dans le contrôle de l'entrée en mitose (Figure 1.19). En effet, ERK5 devient spécifiquement activée par MEK5 au cours de la mitose [576-578]. L'activation soutenue de cette voie entraîne les cellules en mitose, alors que son inhibition en prévient l'entrée [576, 578]. Il est connu que la protéine p90 RSK, membre de la famille des MAPKAP kinases, est un substrat direct de ERK5 [573, 579, 580]. Le groupe de Z. Xia a ainsi démontré qu'une fois activée par ERK5, RSK2 peut phosphoryler IκB, ce qui provoque la dégradation par le protéasome de cette dernière [576]. La dégradation de l'inhibiteur IκB engendre l'activation du complexe transcriptionnel NFκB, qui était déjà connu pour être activé par la voie ERK5 [579]. La translocation nucléaire de NFκB permet la transcription de régulateurs importants de l'entrée en mitose tels que cycline B, Plk1 et Cdc25B [576, 579].

En plus de ce rôle dans le contrôle de l'entrée en mitose, il a été proposé que ERK5 participe à la décision de survie au cours de la mitose [577]. L'inhibition génétique ou pharmacologique de ERK5 lors de la mitose induit l'apoptose, un processus qui est exécuté en partie par Bim (*B-cell lymphoma 2 interacting mediator of cell death*), une protéine proapoptotique membre de la famille des protéines à domaine BH3 seulement (*BCL-2 homology domain 3 (BH3)-only protein*). La phosphorylation de Bim par ERK5, sur des sites qui n'ont pas encore été identifiés, prévient l'activation des caspases en l'empêchant d'interagir avec Bad, une autre protéine proapoptotique.



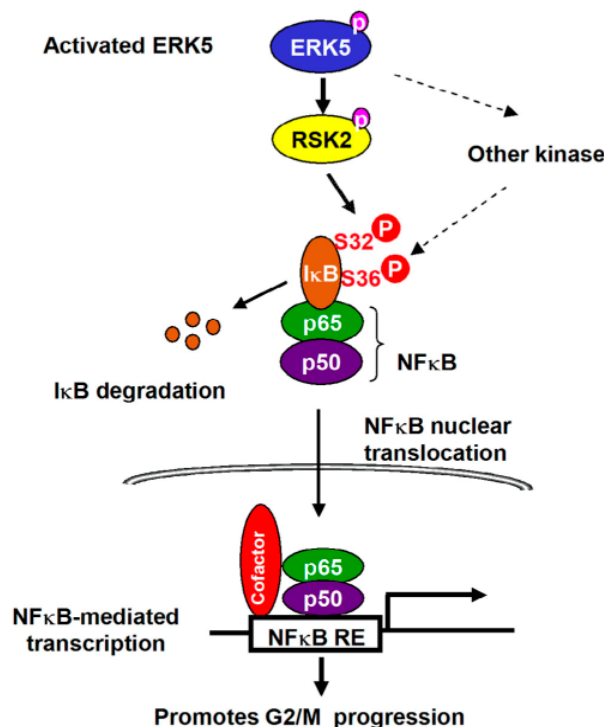


Figure 1.19 La voie MEK5-ERK5-RSK2 dans le contrôle d'entrée en mitose  
Voir le texte pour plus de détails. Issue de [576].

## 1.6 L'émergence d'une nouvelle voie : ERK3/4-MK5

### 1.6.1 Les MAP kinases atypiques ERK3/ERK4

En plus des MAP kinases dites classiques, le génome des mammifères encode quatre MAP kinases atypiques : ERK3/4, NLK et ERK7 [398]. Contrairement aux MAP kinases conventionnelles qui font partie de modules d'activation à trois paliers, MAPKKK-MAPKK-MAPK, aucune observation ne suggère pour l'instant que les MAP kinases atypiques se retrouvent au sein de modules semblables. En fait, la définition « atypique » est attribuée aux MAP kinases qui ne sont pas activées par un membre de la famille des MAPKK [398]. Le laboratoire du Dr Meloche s'intéresse à la régulation et aux fonctions de ERK3 et ERK4, qui sont largement moins bien caractérisées que les MAP kinases classiques.

### 1.6.1.1 Identification et structure

On connaît l'existence du gène *Mapk6* (*Erk3*) depuis 1991, année au cours de laquelle celui-ci a été cloné, tout comme *Erk2*, par homologie de séquence à *Erk1* à partir d'une librairie d'ADNc de rat [422]. Quelques années plus tard, le gène *Erk3* a été cloné chez l'humain et la souris [581-583]. À cette époque, les analyses prédisaient une protéine de 543 aa ayant une masse moléculaire de 63 kDa chez le rat, comparativement à 721 aa et une centaine de kDa chez l'humain et la souris. Des études additionnelles de la séquence de ERK3 de rat ont permis de conclure qu'une erreur entraînant un changement de cadre de lecture était survenue dans l'étude originale de Boulton *et al.* [583, 584]. Ainsi, chez tous les mammifères, ERK3 est une protéine de 720/721 aa.

Le gène *Mapk4* (*Erk4*) a quant à lui été identifié par des approches de PCR en utilisant des sondes de *Erk1* de rat à partir d'une librairie d'ADNc de cellules HeLa [585]. Initialement nommé p63<sup>mapk</sup> en référence à la taille moléculaire prédite, le gène a été analysé à nouveau quelques années plus tard dans le laboratoire du Dr Meloche [398, 586]. Ceci a permis de relever des erreurs dans la séquence originale et d'établir qu'ERK4 est plutôt une protéine de 587 aa ayant une masse moléculaire de 70 kDa.

ERK3 et ERK4 définissent une famille distincte de MAP kinases qu'on ne retrouve que chez les vertébrés [587]. ERK3 et ERK4 possèdent chacune un domaine kinase situé en N-terminal identique à 73 % entre eux. Ceux-ci sont également identiques à 41-42 % à celui de ERK1 (Figure 1.20). Par contre, il existe des différences importantes entre les structures primaires de ERK3/4 et celles des MAP kinases ERK1-2. Une des principales caractéristiques qui les distinguent des autres MAPKs se situe au niveau de la boucle d'activation du domaine kinase. Habituellement, on retrouve le motif Thr-Xxx-Tyr, qui doit être phosphorylé sur les deux sites pour activer pleinement la kinase. Cependant, chez ERK3/4, on retrouve plutôt la séquence Ser-Glu-Gly ne pouvant être phosphorylée que sur un seul résidu [422]. Il est intéressant de mentionner que lorsque le motif TEY de la boucle d'activation de ERK2 est remplacé par le SEG retrouvé chez ERK3/4, ERK2 n'a plus d'activité catalytique [588]. Cette particularité de séquence, de même que l'absence

de substrat reconnu pour être phosphorylé par ERK3/4 ont contribué à semer un doute quant à la présence d'activité enzymatique chez ces kinases. La découverte que ERK3/4 phosphorylent MK5 a révélé que ERK3/4 sont des « vraies » kinases, et qu'un seul site de phosphorylation dans la boucle d'activation est suffisant pour activer certaines MAPKs.

Une caractéristique additionnelle qui distingue ERK3/4 des autres MAPKs se situe au niveau du sous-domaine VIII du domaine kinase. En effet, ERK3/4 possèdent la séquence Ser-Pro-Arg plutôt que la séquence Ala-Pro-Glu. Il est important de souligner que ERK3/4 sont les seules kinases de tout le kinome humain à avoir une arginine dans ce motif. Toutefois, l'impact de cette différence sur l'activité

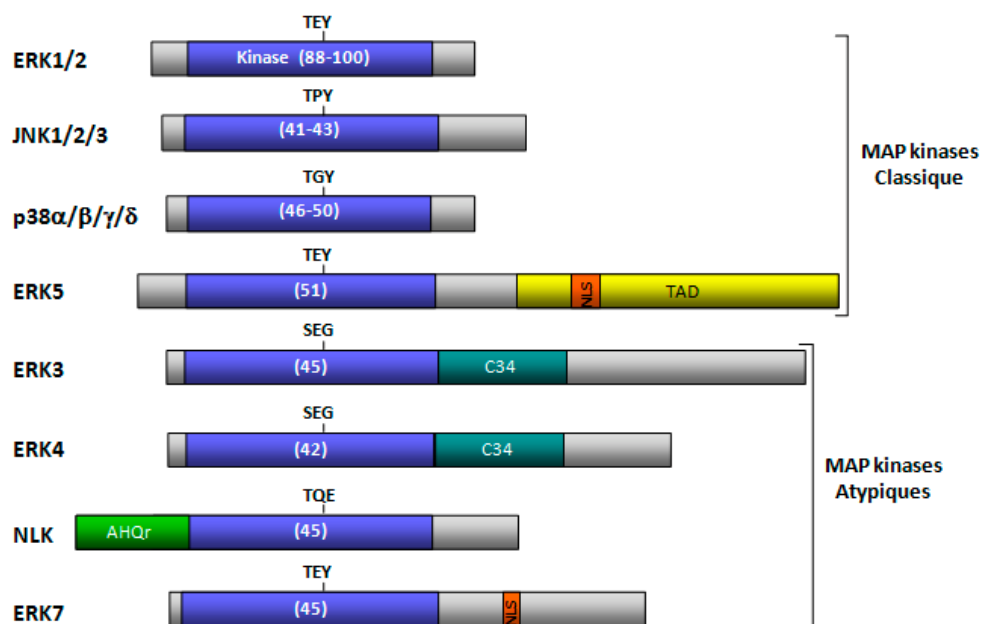


Figure 1.20 **Structure primaire des MAPKs retrouvées chez les mammifères**

Le domaine kinase est représenté en bleu. La région d'homologie entre les domaines en C-terminal de ERK3 et ERK4 (C34, *conserved region in ERK3/4*) est en turquoise. Le pourcentage d'identité entre les différents domaines kinases et celui de ERK1 est indiqué entre parenthèses. La séquence de la boucle d'activation qui est phosphorylée est représentée au-dessus du domaine kinase. TAD : Domaine de transactivation, NLS : Séquence de localisation nucléaire, AHQr : Région riche en alanine, histidine et glutamine. Figure tirée de [398].

enzymatique n'est pas connu à ce jour.

Finalement, en plus du domaine kinase, ERK3/4 possèdent une extension en C-terminal qu'on ne retrouve pas chez ERK1/2 (Figure 1.20). Les 150 premiers aa de ces domaines, nommé C34 (*conserved region in ERK3/4*), sont identiques à 50% entre ERK3 et ERK4 alors que leur extrémité, plus longue chez ERK3, est complètement différente [398, 589]. Par contre, l'extension C-terminale des deux protéines est très bien conservée entre les différentes espèces de vertébrés, ce qui implique une fonction possiblement importante pour cette région de la protéine. Jusqu'à présent, les études suggèrent que le domaine C-terminal d'ERK3 pourrait être impliqué dans des interactions protéines-protéines (Section 1.6.1.5.3).

#### 1.6.1.2 Régulation de l'expression de ERK3/4

L'ARNm de ERK3 est exprimé de façon ubiquitaire chez le rat et la souris adultes, mais c'est au niveau du cerveau que l'expression est la plus importante [422, 583]. Toutefois, une étude histochimique de l'expression de la  $\beta$ -galactosidase insérée au locus de *Erk3* démontre une différence significative d'expression d'un tissu à l'autre chez l'embryon [590]. Les niveaux d'expression varient au cours du développement embryonnaire, atteignant un maximum durant les premiers stades de l'organogenèse, entre le jour E9 et E11 [583]. Par la suite, l'expression décroît graduellement jusqu'à la naissance. Les études d'expression de l'ARNm et de la protéine ERK3 suggèrent que cette kinase pourrait avoir un rôle à jouer lors de la différenciation cellulaire. En effet, il a été montré que suite à la différenciation de cellules de carcinome embryonnaire P19 ou de cellules PC12 en cellules neuronales et des P19 et C2C12 en cellules musculaires, l'ARNm et/ou la protéine ERK3 deviennent fortement exprimés [422, 591]. De plus, l'ARNm de ERK3 augmente suite à un arrêt de la prolifération des cellules Raji provoqué par un traitement au ganglioside IV<sup>3</sup>NeuAc-nLcOse<sub>4</sub>Cer ou lorsqu'une lignée cellulaire de carcinome humain est ensemencée sur du collagène de type IV, un inhibiteur de la prolifération [592, 593]. Ces résultats suggèrent donc un rôle potentiel de ERK3 dans le contrôle de la prolifération, dans certaines circonstances.

ERK3 pourrait également être régulée par l'activation de voies classiques de MAP kinases. Premièrement, une étude de Zimmermann *et al.* a démontré que l'ARNm et la protéine ERK3 augmentaient d'environ trois et six fois respectivement suite à l'inhibition du protéasome dans différentes lignées cellulaires [594]. L'inhibition simultanée de l'activité de p38 et du protéasome prévient cette augmentation de l'expression de ERK3. Deuxièmement, dans un modèle cellulaire de surexpression d'une forme conditionnellement active de l'oncogène BRAF, on note une augmentation de l'expression de l'ARNm et de la protéine ERK3 [595]. À l'inverse, l'inhibition par RNAi de BRAF endogène ou l'utilisation d'inhibiteurs pharmacologiques de MEK conduisent à une diminution de l'expression de ERK3. Ces résultats suggèrent que la voie RAF-MEK-ERK peut moduler les niveaux d'expression de ERK3, du moins dans certaines conditions.

L'expression de la protéine ERK4 est très peu étudiée. On sait que l'ARNm de ERK4 n'est pas exprimé dans tous les tissus, mais qu'il est retrouvé de façon abondante dans le cœur et le cerveau humain [585]. Une étude effectuée au laboratoire du Dr Meloche a démontré que la protéine ERK4 est fortement exprimée dans le cerveau de la souris [596].

### **1.6.1.3 Contrôle de ERK3 par le système ubiquitine-protéasome**

L'activité des MAP kinases est contrôlée par l'état de phosphorylation des résidus Thr et Tyr de la boucle d'activation. Le laboratoire du Dr Meloche a démontré que l'activité de ERK3 est plutôt régulée par le système ubiquitine-protéasome [591]. Dans des cellules en prolifération, ERK3 est très instable et a une demi-vie d'environ trente minutes. Deux petites régions de 15 et 20 aa situées à l'extrémité N-terminale, nommées *NDRI/2* (*N-terminal degradation region 1 and 2*) sont suffisantes et nécessaires pour induire la dégradation de ERK3. Cette dégradation de ERK3 par le protéasome ne semble pas se produire suite à l'ubiquitination de lysines internes, mais plutôt après l'ubiquitination du groupement NH<sub>2</sub> libre de l'extrémité de la protéine [597]. Jusqu'à présent, on ne connaît que quelques protéines qui sont ubiquitinées sur l'extrémité N-terminale : les protéines virales E7 HPV16, LMP1, LMP2A, E7 HPV58 et les régulateurs du cycle cellulaire

MyoD, Id2, Id1, p16<sup>INK4a</sup>, p19<sup>Arf</sup>, p21, cycline G1 et BCL2L12 [597-607]. Il est possible que l'ubiquitination en N-terminal soit réservée à seulement quelques protéines, mais il est encore trop tôt pour en être certain. La cartographie des sites ubiquitinés sur toutes les protéines dégradées par le protéasome permettra de répondre à cette question.

Il est intéressant de noter que la MAP kinase atypique ERK7, qui a la capacité de s'autoactiver et dont l'activité catalytique est contrôlée par la phosphorylation des résidus Thr et Tyr de la boucle d'activation, est également dégradée par le protéasome suite à son ubiquitination par un complexe SCF [608]. Contrairement à ERK3 et ERK7, ERK4 a une demi-vie beaucoup plus longue (plus de quatre heures) et ne semble pas être un substrat du protéasome [586, 609].

#### **1.6.1.4 Les fonctions de ERK3**

Bien que le gène *Erk3* ait été cloné depuis bientôt une vingtaine d'années, on connaît très peu ses fonctions cellulaires. Néanmoins, certaines données expérimentales suggèrent qu'elle joue un rôle lors du développement, dans la sécrétion d'insuline et dans la prolifération cellulaire.

##### **1.6.1.4.1 Rôle dans le développement et la différenciation cellulaire**

Le laboratoire du Dr Meloche a révélé le rôle physiologique de ERK3 en générant des souris *Erk3*<sup>-/-</sup> [590]. Ces souris, dans lesquelles le gène *Erk3* a été inactivé par insertion du rapporteur *LacZ*, présentent un retard de croissance intra-utérin, une hypoplasie pulmonaire et meurent au cours de la première journée de vie. Puisque l'expression de ERK3 varie au cours de la différenciation cellulaire, des études précédentes suggéraient qu'elle avait un rôle potentiel lors de ce processus (Section 1.6.1.2) [422, 591]. En accord avec ces observations, l'absence de ERK3 chez la souris entraîne un défaut de différenciation des pneumocytes de type II [590]. De plus, le sérum des embryons *Erk3*<sup>-/-</sup> contient moins d'IGF2, un facteur de croissance important lors du développement embryonnaire. Ces résultats suggèrent

que ERK3 est très important pour la croissance fœtale et pour le développement pulmonaire chez l'embryon.

La délétion génétique de *Erk4* (*Mapk4*) a également été réalisée au laboratoire du Dr Meloche par Justine Rousseau. Les souris *Erk4*<sup>-/-</sup> sont viables, fertiles et ne présentent aucun défaut morphologique des organes. Cependant, ces souris présentent un comportement de type dépressif. D'un autre côté, la perte de fonction de ERK4 dans les souris *Erk3*<sup>-/-</sup> n'accentue pas les différents phénotypes attribués à l'inhibition de l'expression de ERK3, démontrant des rôles spécifiques et non redondants pour chacune de ces MAP kinases [596].

#### **1.6.1.4.2 Rôle dans la sécrétion d'insuline**

La prolactine est une hormone qui entraîne une augmentation de la sécrétion d'insuline en réponse au glucose au cours de la grossesse. L'expression de l'ARNm et de la protéine ERK3 augmente lorsque des îlots  $\beta$  du pancréas de rats femelles adultes sont traités avec la prolactine *in vitro* et *in vivo* chez des rats femelles enceintes [610, 611]. De manière intéressante, un oligonucléotide bloquant l'expression de ERK3 inhibe la sécrétion d'insuline en réponse au glucose dans des îlots  $\beta$  en culture et dans des cellules RINm5F, une lignée de cellules  $\beta$  du pancréas [611]. Lors de cette étude, le groupe a montré l'existence d'une interaction entre ERK3 et MAP-2, une protéine liant les microtubules également impliquée dans le transport des vésicules d'insuline. Toutefois, on ne connaît pas le rôle de l'interaction entre ERK3 et MAP-2 et notre laboratoire n'a pu démontrer que MAP-2 est un substrat de ERK3 (résultats non publiés). Des expériences supplémentaires sont requises pour clarifier ces interrogations. Ces études d'expression et de perte de fonction suggèrent que ERK3 est impliquée dans la sécrétion d'insuline dans certaines conditions, entre autres en réponse à la prolactine.

#### **1.6.1.4.3 Rôle dans la prolifération**

Les MAP kinases classiques ont des fonctions bien caractérisées dans le contrôle de la prolifération cellulaire. La première suggestion que ERK3 pourrait

jouer un rôle dans le contrôle de la progression dans le cycle cellulaire est venue de notre laboratoire [591]. En effet, la surexpression de chimères stables de ERK3 dans des fibroblastes en culture inhibe l'entrée des cellules en phases S. ERK3 est une protéine nucléo-cytoplasmique dont l'export nucléaire est effectué par un mécanisme qui dépend de Crm1 [612]. Il semble que le va-et-vient constant de ERK3 entre le noyau et le cytoplasme soit requis pour inhiber l'entrée en phase S [612]. Par la suite, il a été rapporté que la surexpression de ERK3 est suffisante pour inhiber la prolifération, la migration et l'invasion de cellules de carcinome humain [593].

D'autres évidences suggèrent également que ERK3 joue un rôle dans le contrôle du cycle cellulaire. Premièrement, ERK3 a été identifiée comme un nouveau partenaire de la cycline D3 par une approche de deux hybrides chez la levure [613]. En association avec CDK4/CDK6, les cyclines D contrôlent la progression en G1 (Section 1.1.3.4). Cette interaction spécifique entre la cycline D3 et ERK3 se fait via l'extension C-terminale de cette dernière. L'impact fonctionnel de la formation de ce complexe demeure toutefois inconnu. Deuxièmement, encore par une stratégie de deux hybrides, Hansen *et al.* a identifié ERK3 comme partenaire de la phosphatase Cdc14A [614]. L'interaction entre Cdc14A et ERK3, qui se fait également via le C-terminal de ERK3, a pour effet de colocaliser ERK3 au centrosome avec Cdc14A. Durant mes études doctorales, j'ai également observé une interaction entre les phosphatases Cdc14A et B (Chapitre 2). Troisièmement, il semble que la localisation intracellulaire de ERK3 soit régulée en fonction des phases du cycle cellulaire. En effet, Bind *et al.* a observé que ERK3 est localisée au ERGIC et que suite à un clivage protéolytique dans le C-terminal de ERK3, cette forme tronquée se déplace vers le noyau au cours des phases S et G2 [584]. Toutefois, il est important de mentionner que ces observations n'ont jamais pu être reproduites à notre laboratoire.

ERK7 joue également un rôle inhibiteur de la progression en phase S [615]. Tout comme pour ERK3, ce rôle observé en condition de surexpression ne requiert pas l'activité kinase de l'enzyme, mais dépend plutôt de la présence de l'extension en C-terminal (Coulombe, P. et Meloche, S., résultats non publiés). À ce jour, aucune étude n'a démontré de rôle pour ERK4 dans le contrôle de la prolifération cellulaire.



## 1.6.2 La MAPKAP kinase 5

Lorsqu'elles sont activées, les MAP kinases phosphorylent une myriade de substrats. Parmi ceux-ci on retrouve des facteurs de transcription, des protéines du cytosquelette, des phosphatases, des régulateurs et effecteurs de l'apoptose et des protéines de signalisation qui permettent de générer la réponse adéquate dictée par le stimulus en question [411]. Les MAP kinases ERK1/2 et p38 ont également la capacité de phosphoryler un ou plusieurs des membres d'une famille de onze kinases, les MAPKAP kinases (MKs) (Figure 1.21). Cette famille regroupe les quatre *90 kDa ribosomal S6 kinases* (RSK1-4), les deux *mitogen- and stress-activated kinases* (MSK1-2), les deux *MAPK-interacting kinases* (MNK1-2) et les trois *MAPK-activated protein kinases* (MAPKAPK/MK2, 3 et 5) [616]. Dans cette Section de la thèse, il sera question de la littérature traitant de MK5.

### 1.6.2.1 Identification, structure et expression

MK5/PRAK (*p38-regulated/activated protein kinase*) a été clonée simultanément par deux groupes en 1998 [617, 618]. Cette identification est survenue suite à la purification biochimique et l'isolation du gène *Mk2* [619-621] et aux découvertes que MK3 est un partenaire de p38 [622] et que le gène est localisé sur une région supprimée du chromosome 3p21.3 dans une lignée de cellules pulmonaires cancéreuses [623]. MK5 a ainsi été identifiée en cherchant des kinases homologues à MK2 ou possédant, tout comme les kinases RSK et MAPKAPK, le motif LXTP dans la boucle d'activation [617, 618].

Tandis que la mouche *D. melanogaster* et le nématode *C. elegans* encodent un homologue identique à 60 % à MK2, on ne retrouve MK5 que chez les vertébrés. Les levures n'expriment pas d'homologues structurels des MK, mais on retrouve des homologues fonctionnels, Rck1-2 chez *S. cerevisiae* et Mkp1-2 chez *S. pombe* [523, 624]. MK5 est une protéine de 471 aa ayant une masse moléculaire de 54 kDa. Contrairement à MK2-3, MK5 ne possède pas de région riche en prolines en N-terminal (domaine de liaison SH3). Son extrémité C-terminale, beaucoup plus longue

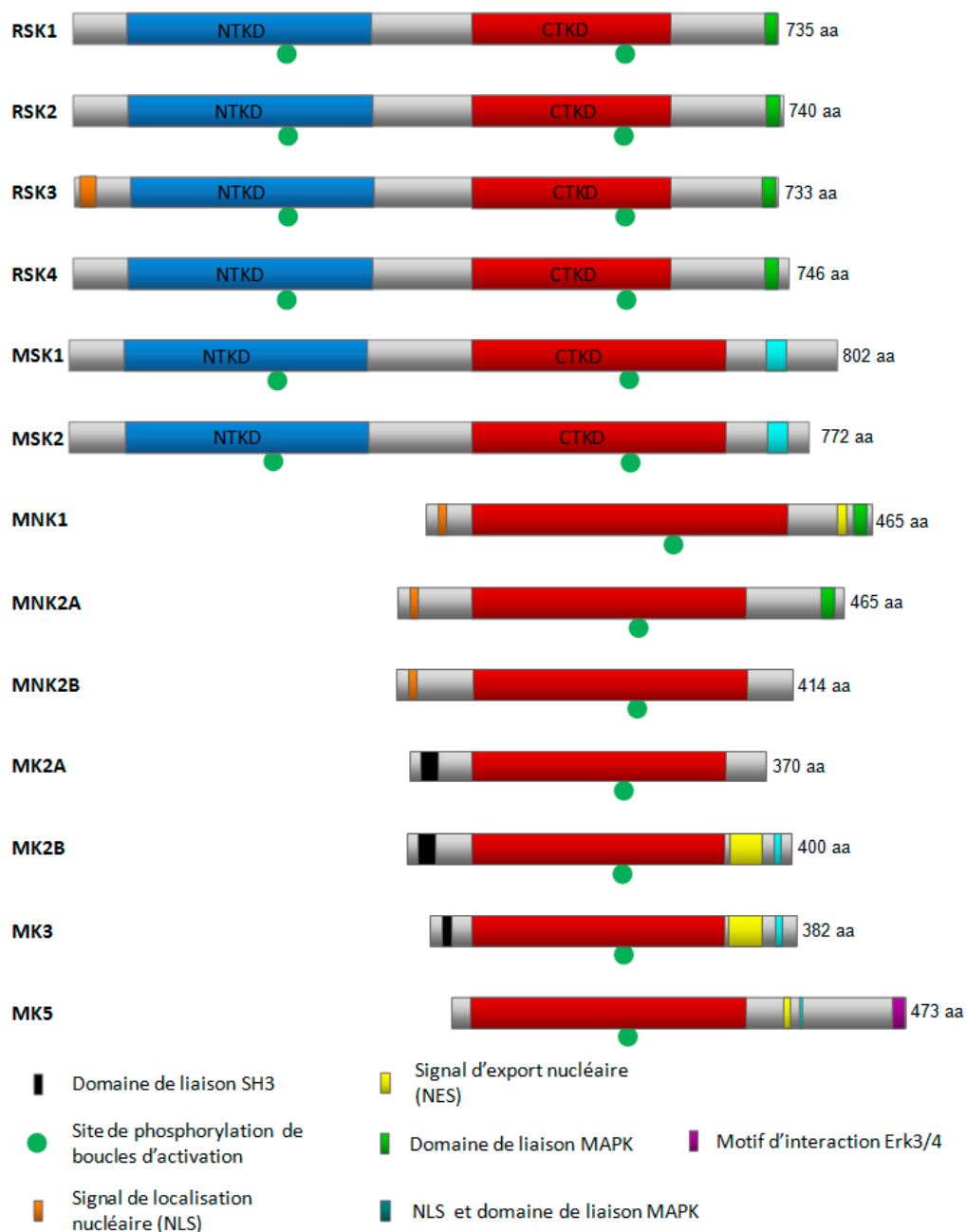


Figure 1.21 **Membres de la famille des MAKAP kinases.**

Les kinases RSK et MSK possèdent deux domaines kinases fonctionnels. Le domaine kinase situé en N-terminal de la protéine est en bleu (NTKD) et celui en C-terminal est en rouge (CTKD). Le domaine kinase des MNK et MK présente une plus grande homologie avec le domaine kinase en C-terminal des RSK et MSK. La légende des différentes couleurs utilisées pour représenter les domaines et motifs est indiquée au bas de la figure. Inspiré de [616]

que ses homologues, contient les signaux d'import et d'export nucléaire ainsi que les domaines de liaison à p38 et ERK3/4 (Figure 1.21) [518].

L'ARNm de MK5 est exprimé dans plusieurs tissus [618]. En fait, il existe cinq isoformes différents de MK5 qui se distinguent de la forme pleine longueur, soit par : 1) délétion de 106 aa en C-terminal (variant 5.3), 2) délétion des sous-domaines 1-VIb du domaine kinase (variant 5,4 35 5,5) et 3) délétion de 2 aa en C-terminal du domaine kinase (variant 5.2) [625]. Toutes ces isoformes sont exprimées à divers niveaux dans plusieurs tissus. Le promoteur de MK5 contient un élément de réponse au cAMP qui peut être lié par la CREB (*cAMP responsive element-binding protein*) [626].

### 1.6.2.2 Régulation de l'activité kinase de MK5 par différents partenaires

#### 1.6.2.2.1 p38 $\alpha$ et p38 $\beta$ : Des kinases de MK5?

MK5 nécessite la phosphorylation de la Thr 182 de sa boucle d'activation pour être pleinement active [617]. À ce jour, HSP25, HSP27 et ERK3/4 sont les seuls substrats connus de MK5 ([617, 627, 628], voir Annexe I). *In vitro*, MK5 peut être phosphorylée par p38 et ERK1/2, mais non pas par JNK, tout comme les autres membres de la famille des MAPKAPKs [617, 618]. Cependant, la phosphorylation de MK5 par ERK1/2 n'a été rapportée que par un seul groupe et l'activité catalytique de MK5 n'est pas stimulée par les facteurs de croissance ou le sérum, bien connus pour engager la voie ERK1/2 [617]. D'un autre côté, des stress cellulaires tels le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, l'arsénite et l'anisomycine, le TNF- $\alpha$ , une cytokine pro-inflammatoire, et la surexpression d'un mutant constitutivement actif MKK6EE entraînent la phosphorylation de la Thr 182 de la boucle d'activation de manière dépendante de p38 [617]. De plus, l'inhibition pharmacologique de p38 entraîne une diminution de la phosphorylation de HSP27 par MK5 endogène immunoprécipitée [617]. Toutefois, ce résultat est controversé puisque l'anticorps utilisé dans cette étude semble reconnaître également MK2 [629]. Néanmoins, ces résultats suggèrent qu'il est plus probable que p38 soit la seule MAP kinase classique pouvant activer MK5. Pour cette raison, le groupe de J. Han (encore aujourd'hui le seul groupe à n'utiliser que cette

nomenclature!) l'a initialement nommée PRAK (*p38-regulated/activated protein kinase*).

L'interaction entre MK5 et p38 endogène n'a jamais été démontrée par co-immunoprécipitation des deux protéines, de même qu'elle n'a pu être observée par double-hybride [630, 631]. Cependant, cette interaction a été clairement mise en évidence dans des expériences de surexpression [632-634]. Alors que le complexe MK5-p38 $\alpha$  est localisé au noyau, le complexe MK5-p38 $\beta$  est plutôt retrouvé au cytoplasme [633]. MK5 interagit avec p38 via son domaine d'interaction avec les MAPKs (*MAPK-docking site*, aa 361-364) [635]. Cette région, située en C-terminal du domaine catalytique, consiste en un motif riche en aa chargés positivement que l'on retrouve chez tous les membres des familles de MAPKKs, MAPKAPKs et phosphatases qui interagissent avec les MAPKs [635]. Pour sa part, p38 interagit avec MK5 via deux régions utilisées par les MAP kinases pour lier leurs partenaires : le site ED (acide glutamique-acide aspartique) et le domaine CD (*Common docking*) [634, 635]. Le domaine CD est caractérisé par la présence de résidus chargés négativement et a été très bien conservé au cours de l'évolution [636]. Il contribue grandement à la spécificité d'interaction entre les MAP kinases et leurs substrats.

#### **1.6.2.2.2 La sous-unité catalytique C $\alpha$ de la PKA**

La PKA stimule l'activité kinase de MK5 en phosphorylant sa Thr 182 de la boucle d'activation [637]. En effet, la sous-unité catalytique C $\alpha$  de la PKA interagit de manière spécifique avec MK5 mais non pas avec MK2. Un traitement des cellules à la forskoline, un agent qui entraîne l'augmentation de cAMP intracellulaire et qui active la PKA, permet la relocalisation de MK5 du noyau vers le cytoplasme. Ce changement de distribution subcellulaire requiert l'activité kinase de MK5.

#### **1.6.2.2.3 14-3-3 $\epsilon$ inhibe MK5**

De façon surprenante, sans avoir décrit ni présenté les résultats du crible de deux hybrides chez la levure, Tak *et al.* affirment avoir identifié MK5 comme étant une protéine pouvant interagir avec 14-3-3 $\epsilon$  [638]. Cette interaction se produit via le

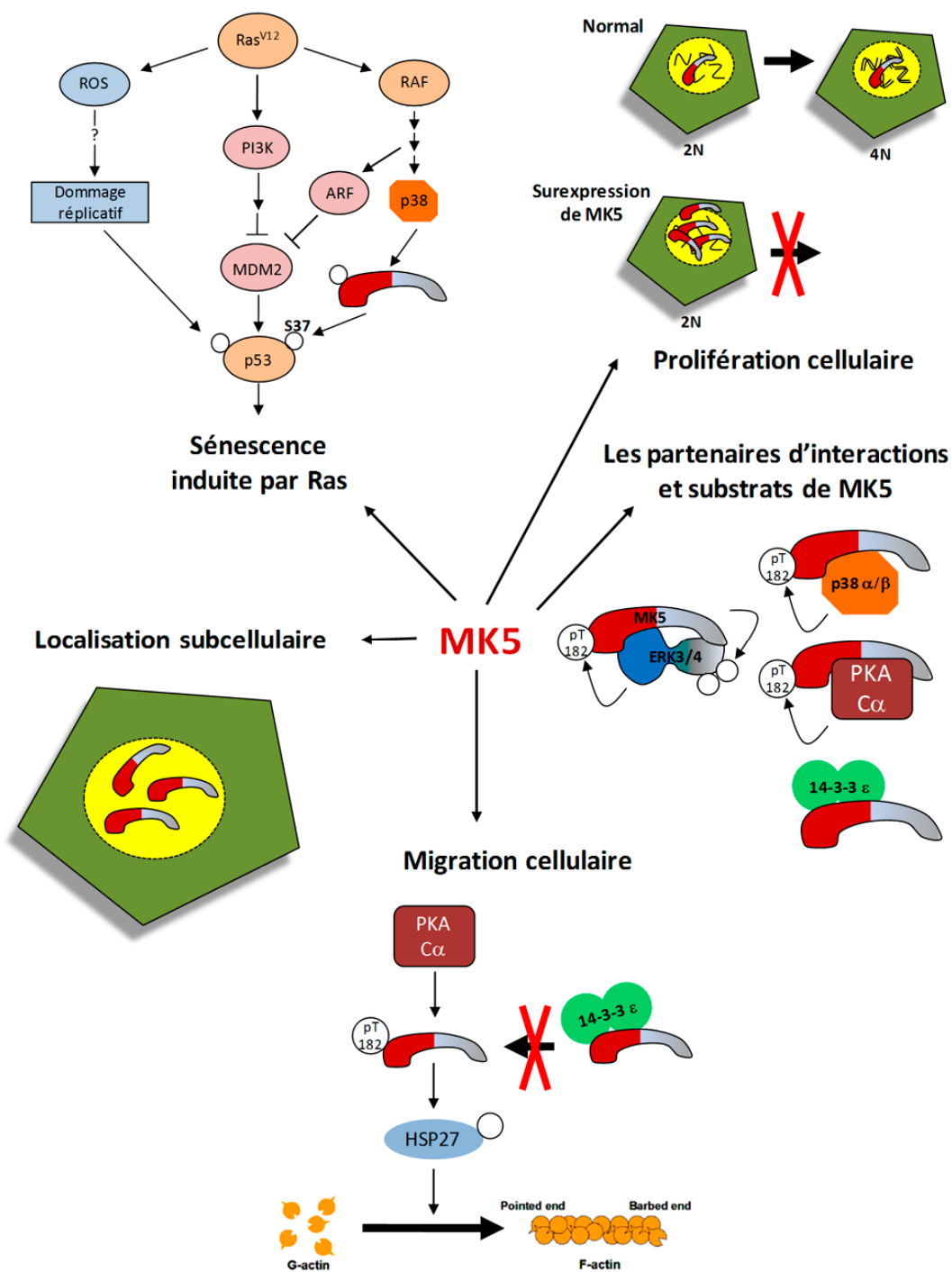


Figure 1.22 Fonctions et partenaires de MK5

domaine kinase de MK5 et ne nécessite pas que la Thr 182 soit phosphorylée. Les données de surexpression ou de perte de fonction suggèrent que l'association de 14-3-3 $\epsilon$  à MK5 diminue l'activité enzymatique de cette dernière, faisant de 14-3-3 $\epsilon$  le premier inhibiteur cellulaire de MK5.

#### **1.6.2.2.4 La relation complexe avec ERK3/4**

Trois groupes, incluant celui du Dr Meloche, ont identifié une interaction spécifique entre MK5 et ERK3 suite à un crible de deux hybrides chez la levure avec MK5 ou suite à une expérience de TAP (*Tandem affinity purification*) avec ERK3 [630, 631] (S. Meloche, résultats non publiés). Quelques années plus tard, les mêmes groupes ont rapporté qu'il y avait interaction spécifique entre MK5 et ERK4 [586, 609].

Tandis que la forme surexprimée de MK5 est majoritairement située au noyau, la co-expression de ERK3/4 relocalise le complexe au cytoplasme [586, 609, 630, 631]. L'interaction entre MK5 et ERK3/4 fait appel à des régions différentes de celles impliquées dans l'association de MK5 avec p38. En effet, les sites d'interaction de MK5 avec ERK3/4 sont situés à l'extrémité complète du C-terminal de la protéine (aa 383-393 et 460-473) [639]. La formation du complexe ERK3/4-MK5 a lieu malgré l'absence de domaines ED et CD fonctionnels chez ERK3/4 [639]. Par contre, celle-ci est beaucoup moins efficace sans la phosphorylation de la boucle d'activation de ERK3/4 ([627, 628], voir Annexe I). Récemment, une étude a démontré pour la première fois l'importance d'une région située dans la boucle L16 en C-terminal du domaine CD de ERK3/4, nommée domaine FRIEDE (FRIEDE chez ERK4 et FHIEDE chez ERK3), dans l'interaction MK5-ERK3/4 [639]. Le rôle de cette boucle n'a été démontré pour aucune autre interaction MAPK-substrat. Par contre, il était déjà connu que la boucle L16, qui subit des changements de conformation suite à la phosphorylation de la boucle d'activation, est une région importante pour l'homodimérisation et l'activation des MAP kinases [640, 641]. La découverte de nouveaux substrats de ERK3/4 permettra de vérifier si ce domaine, qui n'est pas parfaitement conservé chez les autres MAPKs, est spécifique à l'interaction ERK3/4-MK5 ou représente un site d'interaction plus général.

L'utilisation de différents mutants inactifs et de délétion de ERK3/4 et MK5 a contribué à mettre au jour une relation plutôt complexe entre les deux kinases (voir Figure 1.23) ([627, 628, 639] et Annexe I). MK5 favorise la phosphorylation de la Ser186/9 de la boucle d'activation de ERK3/4, mais n'est pas la kinase directement responsable cet évènement. MK5 doit plutôt faciliter le recrutement de la kinase de la

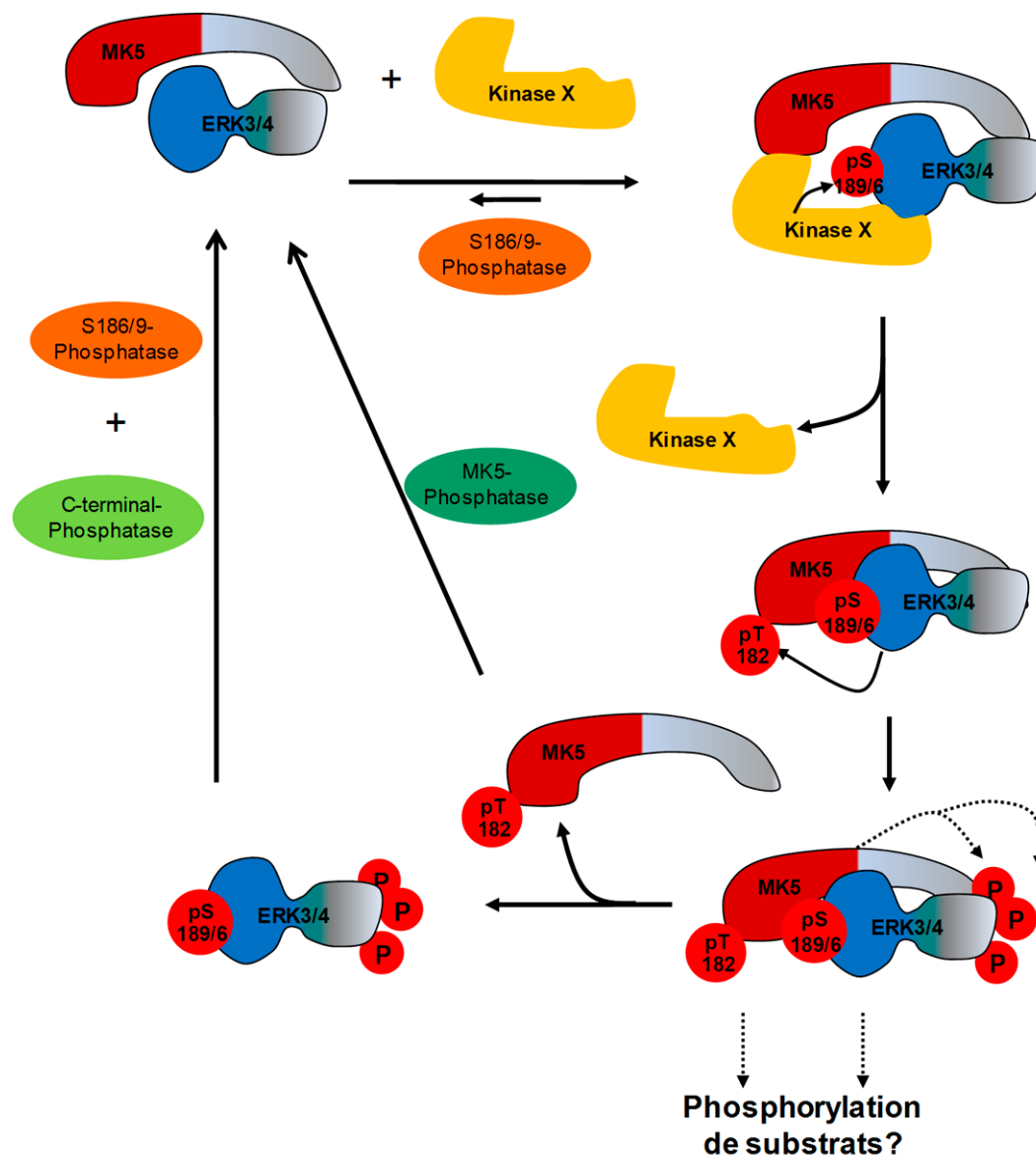


Figure 1.23 **Modèle d'interaction et de phosphorylation entre ERK3/4 et MK5**  
Voir le texte pour plus de détails. Inspiré de [627, 628].

boucle d'activation (Kinase X) ou prévenir l'interaction avec une phosphatase. Notre laboratoire a récemment montré que les kinases PAK de groupe I phosphorylent la boucle d'activation de ERK3/4 (Déléris, P *et al.*, voir annexe 2). Cependant, pour l'instant, aucune évidence expérimentale ne suggère qu'il s'agisse des kinases recrutées par MK5. Des résultats préliminaires indiquent que d'autres kinases phosphorylent également la boucle d'activation de ERK3/4. On ne sait pas encore si celles-ci sont recrutées par MK5. Lorsque la Ser 186/9 de ERK3/4 est phosphorylée, elles interagissent plus fortement avec MK5, elles peuvent la phosphoryler sur la boucle d'activation et entraînent la translocation du complexe vers le cytoplasme. Ainsi activée, MK5 phosphoryle (possiblement sur plusieurs sites, mais non la boucle d'activation) ERK3/4. Les conséquences cellulaires de ces interactions/activations demeurent par contre toujours énigmatiques. Il a été démontré que l'interaction entre ERK3 et MK5 augmente l'expression de ERK3 [630, 631]. On ne connaît cependant pas le(s) mécanisme(s) par le(s)quel(s) cela se produit.

### **1.6.2.3 Fonctions de MK5**

#### **1.6.2.3.1 Rôle physiologique chez la souris**

Les souris *Mk5* KO ont été générées pour la première fois en 2003 par le groupe de M. Gaestel [629]. Ces souris, obtenues dans un fond génétique mixte, sont viables, fertiles et non aucun défaut morphologique, tout comme l'a rapporté le groupe de J. Han [642]. Cependant, dans un fond génétique pur C57BL6, une partie des souris *Mk5* KO meurt aux environs du jour embryonnaire E11 [631]. Dans ce même fond génétique, les souris *Mk5* KO qui survivent à la naissance sont plus petites que les souris sauvages. Il est cependant très difficile de comprendre ces différences de phénotypes et même d'expliquer ce qui est à l'origine de la pénétrance partielle du phénotype associé au fond génétique pur. Toutefois, il est évident que MK5 joue un rôle au cours du développement embryonnaire, du moins dans certaines conditions. Puisque les souris *Erk3* KO et *Erk3/Erk4* DKO ne meurent qu'à la naissance et que les souris *Erk4* KO n'ont pas de défauts de développement, MK5



doit certainement avoir d'autres effecteurs/substrats qui expliquent le phénotype des souris [590, 596].

#### **1.6.2.3.2 Rôle dans le contrôle de la prolifération et de la sénescence**

L'inhibition de la prolifération en réponse à l'activation soutenue de Ras (mutant Ras<sup>V12</sup>) a été la première fonction cellulaire attribuée à MK5 [643]. En fait, il semble que Ras<sup>V12</sup> entraîne l'activation de p38, qui phosphoryle et active à son tour MK2 et MK5. Cette voie de signalisation a pour effet de créer une boucle de rétroaction négative inhibant la prolifération et l'expression de gènes induits par la forme oncogénique de Ras. Une des fonctions de MK2 et MK5 dans ce processus est d'inhiber l'activité de JNK, habituellement impliquée positivement dans la signalisation Ras<sup>V12</sup>. Il a été démontré par la suite que la localisation nucléaire de MK5 est nécessaire pour inhiber la prolifération cellulaire [633].

Une étude a également proposé que MK5 est un gène suppresseur de tumeurs [642]. En fait, un traitement au DMBA (Diméthylbenzanthracène, un agent mutagénique) provoque la formation de papillomes cutanés chez un plus grand nombre de souris *Mk5*<sup>-/-</sup> que chez les souris de type sauvage. Ceci s'explique par le fait qu'en absence de MK5, les cellules de la peau n'ont pas la capacité d'induire le programme de sénescence. Pour que les cellules puissent entrer en sénescence lorsque la forme oncogénique de Ras est exprimée, MK5 doit être activée par p38 pour phosphoryler la Ser 37 et activer le facteur de transcription p53 (Voir Figure 1.22, p.95). Ce résidu de p53 a déjà été décrit pour être phosphorylé par ATR et DNA-PK lors de la réponse aux dommages à l'ADN [644, 645]. Cependant, selon les auteurs, MK5 semble être la kinase majeure de ce site lors de l'induction de la sénescence.

#### **1.6.2.3.3 Rôle dans la migration et la polymérisation de l'actine**

Lorsque les cellules sont soumises à des stress environnementaux, il y a une réorganisation des filaments d'actine qui contribue à modifier l'architecture du cytosquelette [646]. Plusieurs substrats connus de MK2-3 sont impliqués dans le remodelage de l'actine [518]. Parmi les mieux caractérisés, les chaperonnes moléculaires HSP25 et HSP27 ont un rôle important à jouer dans le contrôle de la

polymérisation des microfilaments d'actine. Cependant, l'implication directe des MK dans ce processus est demeurée énigmatique jusqu'à très récemment. En effet, des études ont révélé que MK5, mais non MK2, est requise pour le réarrangement des filaments d'actine en réponse à l'activation de la PKA par la forskoline [637, 647]. Cette fonction de MK5 nécessite la phosphorylation de HSP27 *in vivo*, qui est inhibée lorsque 14-3-3 $\epsilon$  séquestre MK5 [638, 647].

#### 1.6.2.3.4 Anxiété et locomotion

L'étude de souris transgéniques exprimant un mutant constitutivement actif de MK5 (MK5 L337A) a révélé que cette kinase joue un rôle dans l'anxiété et dans l'activité locomotrice des souris [648, 649]. Ces différents phénotypes observés dépendent du sexe des souris, les femelles étant plus anxieuses que les souris contrôles et les mâles présentant une plus grande activité locomotrice. Des études plus approfondies sont requises pour bien comprendre la cause moléculaire de ce phénotype et vérifier l'implication de MK5 dans la neurotransmission au niveau du cerveau. Pour l'instant, il est difficile d'associer ce phénotype à l'activation par ERK3 et/ou ERK4. En fait, les souris *Erk4*<sup>-/-</sup> mâles ou femelles ne semblent pas plus anxieuses que les souris contrôles et ne présentent pas de problème de locomotion [596]. Pour évaluer le rôle de ERK3 dans ce phénotype, il faudrait générer des souris conditionnelles, dans lesquelles l'expression de ERK3 serait inhibée spécifiquement chez l'adulte ou dans le cerveau.

## 1.7 Hypothèse

Les MAP kinases ont des rôles importants à jouer dans le contrôle de la prolifération, notamment en relayant l'information provenant de différents stimuli à la machinerie du cycle cellulaire. Leur activité est principalement régulée par phosphorylation des deux sites phospho-accepteurs de leur boucle d'activation. Contrairement aux autres MAP kinases, la régulation de ERK3 se fait plutôt via sa dégradation par le système ubiquitine-protéasome. Des données suggèrent également un lien entre l'activité de ERK3 et le contrôle du cycle cellulaire. Tel que décrit au

Chapitre 1, l'expression et l'activité de plusieurs régulateurs du cycle cellulaire sont finement contrôlées lors des différentes phases du cycle. Nous avons donc émis l'hypothèse que l'expression de ERK3 pourrait également être régulée au cours du cycle cellulaire.

Lors de cette première étude, nous avons obtenu des résultats qui suggéraient un rôle pour la kinase MK5 dans le contrôle de l'entrée en mitose. MK5 a été identifiée comme partenaire de ERK3, et tout comme cette dernière, peu d'information est disponible sur sa régulation et ses fonctions. La deuxième étude de cette thèse visait à évaluer le rôle de MK5 lors de l'entrée des cellules en mitose.

## **CHAPITRE 2**

### **Article 1:**

# **C-TERMINAL DOMAIN PHOSPHORYLATION OF ERK3 CONTROLLED BY CDK1 AND CDC14 REGULATES ITS STABILITY IN MITOSIS**

Publié dans Biochemical Journal Vol. 428 no.1 pp 103-111

2010

## 2.1 Mise en situation

ERK3 est une kinase membre de la famille des MAP kinases qui a été identifiée il y a une vingtaine d'années. Contrairement aux MAP kinases ERK1/2 qui sont fortement activées par phosphorylation de leur boucle d'activation en réponse à divers mitogènes, ERK3 semble être régulée différemment. En fait, à ce jour, aucun stimulus extracellulaire n'est connu pour induire l'activité enzymatique de ERK3. Toutefois, le laboratoire du Dr Meloche a pu démontrer que l'activité de ERK3 est régulée via la dégradation de la protéine par le système ubiquitine/protéasome. De plus, la surexpression de formes non dégradables d'ERK3 entraîne un arrêt de la prolifération, inhibant l'entrée en phase S. Ce résultat est en accord avec plusieurs données dans la littérature décrivant une augmentation de l'expression de la protéine et de l'ARNm dans des conditions expérimentales induisant la différenciation cellulaire ou un arrêt de la prolifération.

À mon arrivée au laboratoire, nous nous sommes intéressés au contrôle de ERK3 au cours du cycle cellulaire. De façon surprenante, nous avons constaté que ERK3 est hyperphosphorylée et que ses niveaux d'expression sont augmentés au cours de la mitose. Ainsi, cette première étude est une caractérisation des événements de phosphorylation et déphosphorylation qui surviennent au cours de la mitose et de l'entrée en phase G1. Les expériences nous ont permis de démontrer un lien entre la phosphorylation et la stabilité de la protéine au cours de la mitose.

Bien que les premières observations aient été faites par Geneviève Rodier, stagiaire postdoctoral au laboratoire, j'ai réalisé la grande majorité des expériences présentées dans le manuscrit, à l'exception des analyses de spectrométrie de masse, réalisées par Dr Éric Bonneil de la plate-forme de protéomique de l'IRIC. Finalement, j'ai écrit le manuscrit qui a été corrigé par Dr Meloche.

# **C-terminal domain phosphorylation of ERK3 controlled by Cdk1 and Cdc14 regulates its stability in mitosis**

**Pierre-Luc Tanguay<sup>\*,†</sup>, Geneviève Rodier<sup>\*,1</sup> and Sylvain Meloche<sup>\*,†,‡</sup>**

<sup>\*</sup>Institut de Recherche en Immunologie et Cancérologie and Departments of  
<sup>†</sup>Molecular Biology and <sup>‡</sup>Pharmacology, Université de Montréal, Montreal, Quebec,  
Canada H3C 3J7

<sup>1</sup>Present address: Institut de Génétique Moléculaire, CNRS-UMII, 34293  
Montpellier, France

Running title: Phosphorylation of ERK3 in mitosis

Key words: MAP kinases, ERK3, Cell cycle, Mitosis, Protein phosphorylation

Abbreviations used: ERK, extracellular signal-regulated kinase; MAP, mitogen-activated protein; Cdk, cyclin-dependent kinase; MS, mass spectrometry; DTT, dithiothreitol

## 2.2 Abstract

Extracellular signal-regulated kinase 3 (ERK3) is an atypical mitogen-activated protein kinase that is suggested to play a role in cell cycle progression and cellular differentiation. However, it is not known if the function of ERK3 is regulated during the cell cycle. Here, we report that ERK3 is stoichiometrically hyperphosphorylated during entry into mitosis and is dephosphorylated at the M→G1 transition. The phosphorylation of ERK3 is associated with the accumulation of the protein in mitosis. *In vitro* phosphorylation of a series of ERK3 deletion mutants by mitotic cell extracts revealed that phosphorylation is confined to the unique C-terminal extension of the protein. Using mass spectrometry analysis, we identified four novel phosphorylation sites, Ser684, Ser688, Thr698 and Ser705, located at the extreme C-terminus of ERK3. All four sites are followed by a proline residue. We show that purified cyclin B-Cdk1 phosphorylates these sites *in vitro* and demonstrate that Cdk1 acts as a major Thr698 kinase *in vivo*. Reciprocally, we found that the phosphatases Cdc14A and Cdc14B bind to ERK3 and reverse its C-terminal phosphorylation in mitosis. Importantly, alanine substitution of the four C-terminal phosphorylation sites markedly decreases the half-life of ERK3 in mitosis, thereby linking phosphorylation to the stabilization of the kinase. Our results identify a novel regulatory mechanism of ERK3 that operates in a cell cycle-dependent manner.

## 2.3 Introduction

Extracellular signal-regulated kinase 3 (ERK3) is an atypical member of the mitogen-activated protein (MAP) kinase family of Ser/Thr protein kinases. Together with the paralogous kinase ERK4, ERK3 defines a distinct subfamily of MAP kinases that is found exclusively in vertebrates [1]. Structurally, the ERK3 protein is composed of a kinase domain at the N-terminus followed by a long C-terminal extension rich in serine and threonine residues [2-4]. The kinase domain of ERK3 displays ~ 45% amino acid identity to that of the MAP kinases ERK1/ERK2 and is catalytically active. One notable feature that distinguishes these two subfamilies of MAP kinases is the presence of a single phospho-acceptor site in the activation loop of ERK3, instead of the canonical T-X-Y motif. The unique C-terminal extension of ERK3 is conserved throughout vertebrate evolution, suggesting an important function. Recent findings indicate that this region is involved in mediating protein-protein interactions [5, 6].

Although the exact cellular functions of ERK3 remain to be defined, several lines of evidence link ERK3 signaling to the regulation of cell cycle progression and cellular differentiation. The levels of ERK3 mRNA and protein are up-regulated during cell cycle exit and terminal differentiation of P19 embryonal carcinoma cells [2] and C2C12 myoblasts [7] *in vitro*. ERK3 expression is also induced following treatment of Raji lymphoma cells with gangliosides [8] or after plating of squamous cell carcinoma lines on type IV collagen [9], two conditions associated with proliferation arrest. In further support of this idea, overexpression of ERK3 was shown to inhibit G1 to S phase progression in fibroblasts [7, 10]. Interestingly, two recent studies have documented that ERK3 interacts with the cell cycle regulators cyclin D3 [6] and Cdc14A [5] through its unique C-terminal domain, suggesting a possible implication of this region in cell cycle control.

The activity of ERK3 is regulated in large part by post-translational mechanisms. ERK3 is a highly unstable protein (half-life ~ 30-60 min) that is constitutively degraded by the ubiquitin-proteasome pathway in exponentially proliferating cells [7]. Analysis of a series of chimeras made between the stable



ERK1 protein and ERK3 delimited two degrons in the N-terminal lobe of ERK3 kinase domain that are both necessary and sufficient to target ERK3 for degradation [7]. Analogous to other MAP kinases, ERK3 is phosphorylated on the activation loop residue Ser189 in intact cells [7, 11, 12]. Activation loop phosphorylation of ERK3 stimulates its intrinsic catalytic activity and is required for the formation of a stable complex with the substrate MAP kinase-activated protein kinase 5 (MK5) [12]. Notably, phosphopeptide mapping analysis revealed that ERK3 is phosphorylated on additional residues outside of the activation loop ([12]; unpublished observations). We have identified one of these sites as Ser386, which lies within a putative MK5 consensus phosphorylation sequence [12]. It is not known whether the phosphorylation and activity of ERK3 vary during the cell cycle.

In this study, we report on the identification by mass spectrometry of four residues in the C-terminal extension of ERK3 (Ser684, Ser688, Thr698 and Ser705) that are specifically phosphorylated in mitosis. We provide evidence that phosphorylation of Thr698 is catalyzed by the mitotic kinase cyclin B-Cdk1 and that mitotic phosphorylation is reversed by the action of the phosphatases Cdc14A and Cdc14B. Importantly, we show that phosphorylation of the four C-terminal sites stabilizes the protein during mitosis. Our results identify a novel mechanism of regulation of ERK3 and a further connection of the kinase with the regulation of cell cycle progression.

## 2.4 Materials and methods

### 2.4.1 Reagents and antibodies

Thymidine, nocodazole, taxol, demecolcine and cycloheximide were obtained from Sigma-Aldrich. Roscovitine and SU9516 were from Calbiochem. Active cyclin B-Cdc2 and Lambda protein phosphatase were from New England Biolabs. Histone H1 was obtained from Roche. The ERK3 phospho-Thr698 specific antibody was generated by GeneScript Corporation by immunization of rabbits with the synthetic peptide CTLpTPSAMKS. Polyclonal anti-ERK3 antibody E3-CTE4 has been described [7]. Commercial antibodies were from the following suppliers: rabbit monoclonal anti-ERK3 from Epitomics; monoclonal anti-actin (AC-40) and polyclonal anti-FLAG from Sigma; monoclonal anti-cyclin B1 (GNS1) and anti-cyclin A (E23) from Neomarkers; monoclonal anti-phospho-histone H3(Ser10) (6G3) from Cell Signaling Technology; rabbit polyclonal anti-GAPDH and anti-Myc from Santa-Cruz Biotechnology; horseradish peroxidase (HRP)-conjugated goat anti-mouse and anti-rabbit IgG from Biorad. Anti-Flag M2-agarose antibody was obtained from Sigma.

### 2.4.2 Plasmid constructs and mutagenesis

pcDNA3-EGFP-ERK3 was described previously [13]. pcDNA3-EGFP-ERK3-Flag was constructed by inserting the Flag sequence into *EcoRI/XbaI* sites of pcDNA3-GFP followed by cloning of ERK3 into the *EcoRI* site. pcDNA3-Myc<sub>6</sub>-ERK3 and pcDNA3-Flag-ERK3 wild-type and mutants were obtained by cloning ERK3 into the *EcoRI* site of pcDNA3-Myc<sub>6</sub> and pcDNA3-Flag. pHGST.1-ERK3 has been described [14]. The hCdc14A cDNA was kindly provided by H. Charbonneau (Purdue University). *EcoRI* and *XhoI* sites were added by PCR and the hCdc14A sequence was subcloned in pcDNA3-Flag. The catalytically inactive mutant of hCdc14A (C238G) was generated by PCR. pcDNA3-Flag-Cdc14B wild-type and catalytically inactive have been described previously [15]. pcDNA3-Myc<sub>6</sub>-cyclin A2, pcDNA3-Myc<sub>6</sub>-cyclin B1, pcDNA3-Myc<sub>6</sub>-cyclin D1 and pcDNA3-Myc<sub>6</sub>-cyclin E2

have been described elsewhere [12, 15]. Mutations were introduced in the human ERK3 cDNA by PCR and were confirmed by DNA sequencing.

#### **2.4.3 Purification of recombinant proteins and *in vitro* translation**

Purification of His<sub>6</sub>-ERK3-GST protein was carried out as described previously [14]. The yield and purity of ERK3 preparation was evaluated by SDS-gel electrophoresis and Coomassie staining using bovine serum albumin as standard.

*In vitro* transcription-translation reactions were performed using the TNT coupled reticulocyte lysate system from Promega according to the manufacturer's instructions.

#### **2.4.4 Cell culture, transfections and cell synchronization**

HeLa and HEK 293 cells were grown in Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) and minimal essential medium (MEM), respectively, supplemented with 10% fetal bovine serum and antibiotics. HeLa cells were transfected with polyethylenimine. HEK 293 cells were transfected using the calcium phosphate co-precipitation method.

For synchronization experiments, HeLa cells at 50-60% confluence were incubated with 2 mM thymidine for 18 h. The cells were then washed with PBS, and cultured in fresh medium for 8 h. To obtain mitotic cells, nocodazole (100 ng/mL), taxol (1 μM) or demecolcine (1 μM) were added for 18 h and round cells were collected by mitotic shake-off. Synchronization of cells at the G1/S transition was obtained by a double-thymidine block [15].

#### **2.4.5 *In vitro* phosphorylation analysis**

For identification of ERK3 phosphorylation sites, recombinant His<sub>6</sub>-ERK3-GST protein was phosphorylated *in vitro* by synchronized HeLa cell extracts. Exponentially proliferating or mitotic HeLa cells were lysed in buffer C (50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 1.5 mM KCl, 1 mM dithiothreitol (DTT), 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM sodium orthovanadate, 1 mM pepstatin A, 1 mM leupeptin, 0.1 mM PMSF) using a

dounce homogenizer. 100  $\mu$ g of protein extract was incubated with 1  $\mu$ g of His<sub>6</sub>-ERK3-GST on Ni-NTA beads in kinase assay buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 1.5 mM KCl, 1 mM DTT, 5 mM MgCl<sub>2</sub>) in the presence of 200  $\mu$ M ATP. At the end of the reaction, the beads were washed four times with 800  $\mu$ L of buffer D (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 10 mM NaF, 20 mM  $\beta$ -glycerophosphate, 1% Triton X-100, 1 mM pepstatin A, 1 mM leupeptin, 0.1 mM PMSF, 0.1 mM sodium orthovanadate) and boiled in Laemmli buffer. The proteins were resolved by SDS-gel electrophoresis and detected by silver nitrate staining.

#### **2.4.6 Mass spectrometry (MS) analysis**

Phosphorylated His<sub>6</sub>-ERK3-GST was separated by SDS-gel electrophoresis and visualized by silver staining. The band was excised from the gel and cut in small pieces. The gel slices were then reduced in 10 mM DTT for 1 h at 56°C and alkylated in 55 mM iodoacetamide for one h at room temperature. After washing in 50 mM NH<sub>4</sub>CO<sub>3</sub>, the gel pieces were shrunk in 100% acetonitrile. Digestion was performed with trypsin in 50 mM NH<sub>4</sub>CO<sub>3</sub> for 4 h at 37°C. The peptides were finally extracted in 90% acetonitrile/0.5 M urea and dried in a Speed Vac. Samples were resolubilized in 5% acetonitrile /0.2% formic acid and analyzed on a Eksigent nano-LC system coupled to a Thermo LTQ Orbitrap mass spectrometer with a home-made C<sub>18</sub> pre-column and an analytical column (10 cm x 150  $\mu$ m, Jupiter 3  $\mu$ m C<sub>18</sub>). A volume of 10  $\mu$ l of sample was injected for analysis. Tryptic peptide digests were first loaded on the pre-column at a flow rate of 10  $\mu$ l/min and subsequently eluted onto the analytical column using a gradient from 10% to 60% acetonitrile in 0.2 % formic acid over 56 min at 600 nl/min. Database searches were run using Mascot version 2.1 (Matrix Science).

#### **2.4.7 Immunoblot analysis, immunoprecipitation and kinase assays**

Cell lysis and immunoblot analysis were performed as described [16]. For co-immunoprecipitation experiments, cells were lysed in buffer E (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 125 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0.2% NP-40, 10 mM NaF, 1 mM DTT, 0.2 mM

sodium orthovanadate, 1 mM pepstatin A, 1 mM leupeptin, 0.1 mM PMSF). Cell lysates were incubated with anti-Flag M2 agarose beads for 2 h at 4°C, and the precipitated complexes were analysed by immunoblotting.

Kinase assays with recombinant active cyclin B-Cdc2 were performed according to the manufacturer's conditions. Recombinant His<sub>6</sub>-ERK3-GST (2 µg protein) was incubated with 2 units of enzyme, 200 µM ATP and 10 µCi [ $\gamma$ <sup>32</sup>P]ATP for 30 min at 30°C. The reaction products were analyzed by SDS-gel electrophoresis and autoradiography.

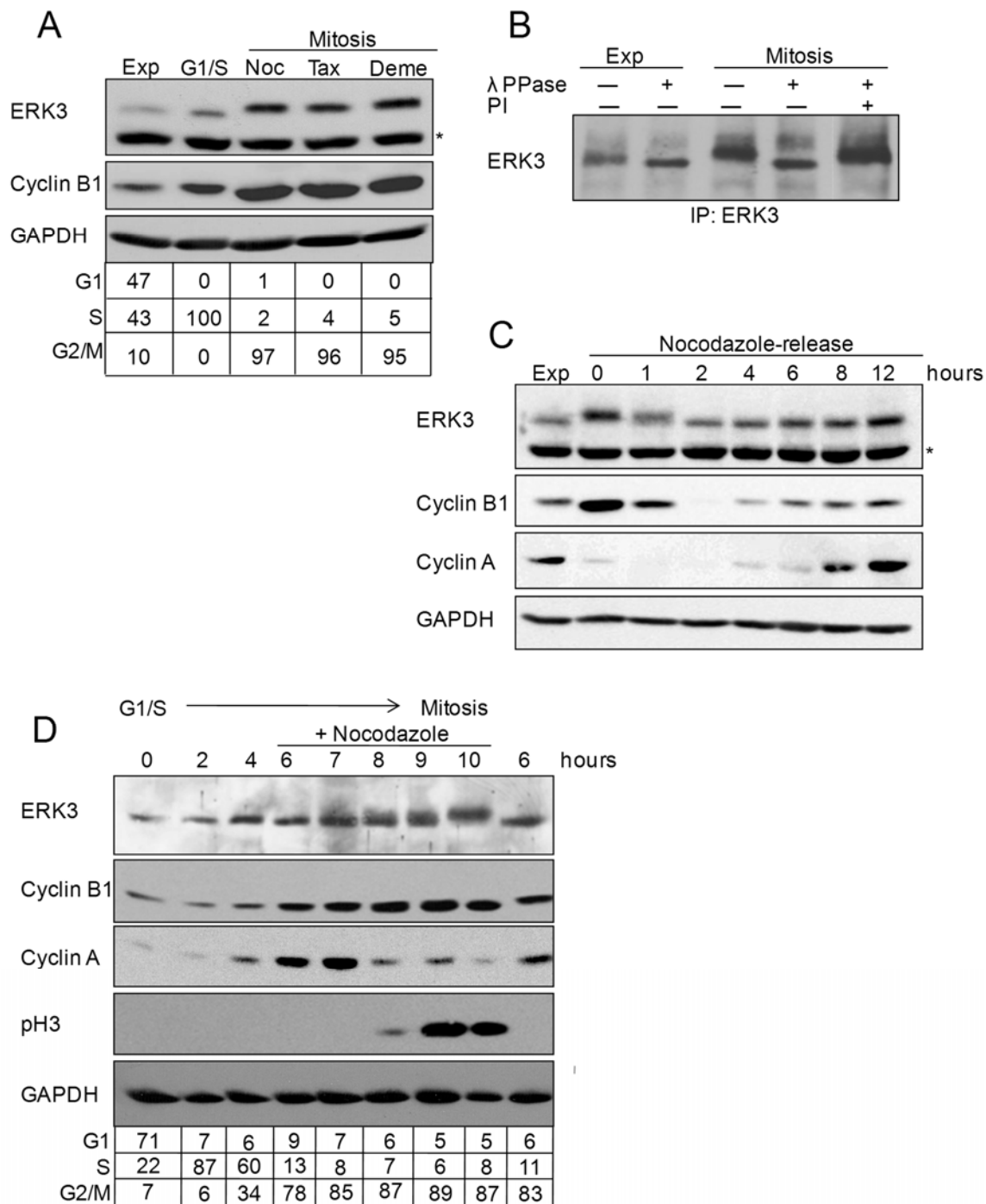
#### **2.4.8 Flow cytometry**

Cell cycle distribution was monitored by FACS analysis after propidium iodide staining using a LSRII cytometer (Beckton Dickinson) as previously described [17].

## 2.5 Results

### 2.5.1 ERK3 is hyperphosphorylated and accumulates in mitosis

In an effort to determine whether the levels or activity of ERK3 oscillate during the cell cycle, we monitored the expression of ERK3 at different stages of the cell cycle using highly synchronized HeLa cell populations. We observed that ERK3 protein levels are significantly higher in mitotic cells as compared to asynchronous or late G1 cells (Figure 2.1A). Notably, the accumulation of ERK3 in mitosis was accompanied by a stoichiometric upward electrophoretic mobility shift of the protein. Essentially similar results were obtained using three different microtubule-disrupting agents, indicating that the slower migration of ERK3 is not artifactually caused by the method of cell synchronization (Figure 2.1A). The most likely explanation for the mobility shift of ERK3 observed in mitosis is a post-translational modification by phosphorylation. Given the importance of phosphorylation in the regulation of mitotic events, we set out to investigate whether ERK3 is differentially phosphorylated in mitosis. To test this idea, we immunoprecipitated endogenous ERK3 from asynchronous or nocodazole-arrested prometaphase cells and incubated the precipitates with Lambda protein phosphatase. Lambda phosphatase treatment of ERK3 isolated from exponentially proliferating cells resulted in a slight acceleration of its electrophoretic migration, consistent with the fact that ERK3 is phosphorylated on at least two residues in proliferating cells (Figure 2.1B) [12]. However, phosphatase treatment of ERK3 isolated from mitotic cells markedly increased the mobility of the kinase, which now migrated at the same rate as the protein in asynchronous cells. This change in mobility was completely prevented by preincubation with a phosphatase inhibitor cocktail. We concluded from these experiments that ERK3 is hyperphosphorylated in mitosis. This phosphorylation of ERK3 in mitosis was observed in several other cell lines, including T98G, U2OS and HT-29 (data not shown).



**Figure 2.1 ERK3 is hyperphosphorylated in mitosis**

(A) HeLa cells were left asynchronous or synchronized at the G1/S transition by a double-thymidine block or in mitosis with the microtubule poisons nocodazole (100 ng/mL), taxol (1  $\mu$ M) or demecolcine (1  $\mu$ M). Cell lysates were prepared and analyzed by immunoblotting with antibodies specific to ERK3, cyclin B1 and GAPDH. Cell cycle distribution of synchronized cells was determined by FACS

analysis. (\*) Indicates non specific bands. **(B)** ERK3 was immunoprecipitated from cell lysates of exponentially proliferating or nocodazole-arrested mitotic HeLa cells. The precipitated ERK3 protein was incubated with Lambda protein phosphatase ( $\lambda$  PPase) for 1 h at 30°C in the absence or presence of phosphatase inhibitors (PPI) (50 mM NaF, 25 mM EDTA, 2 mM sodium orthovanadate and 25 mM  $\beta$ -glycerophosphate). The reaction products were analyzed by immunoblotting with anti-ERK3 antibody. **(C)** Mitotic HeLa cells were obtained by a double-thymidine block followed by nocodazole treatment and mitotic shake-off. Rounded cells were washed, and replated in fresh medium at low density for the indicated periods of time. Cell lysates were analyzed by immunoblotting with the indicated antibodies. **(D)** HeLa cells were synchronized at the G1/S transition by a double-thymidine block. Cells were washed, and replated in fresh medium for the indicated times. At 6 h after the release, nocodazole was added to trap cells in mitosis. Cell lysates were analyzed by immunoblotting. Progression into mitosis was monitored by phospho-histone H3(Ser10) (pH3) immunoreactivity. Cell cycle distribution was determined by FACS analysis of DNA content. (\*) non-specific bands.

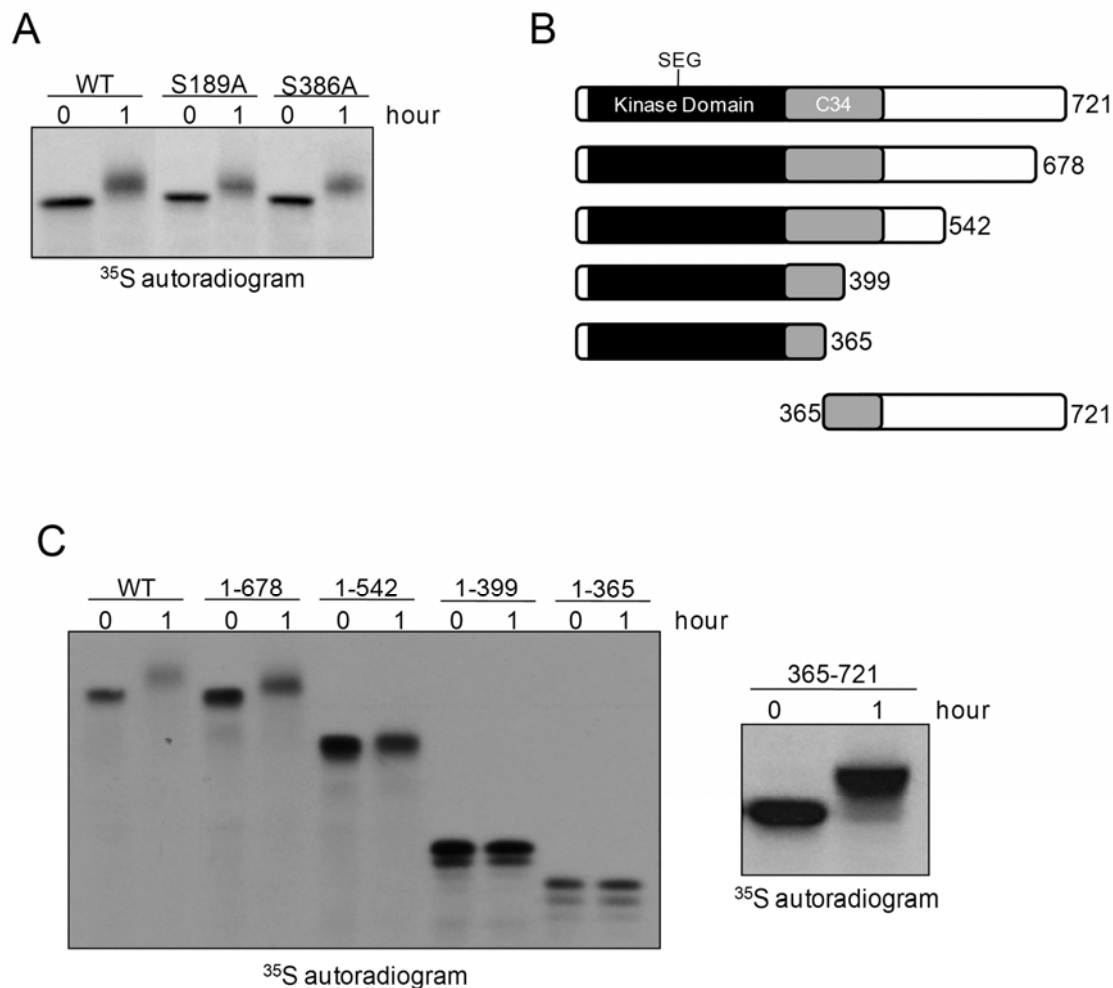
We next analyzed the kinetics of phosphorylation of ERK3 during the cell cycle. HeLa cells were first synchronized in mitosis by nocodazole treatment followed by mitotic shake-off, and the rounded cells were replated in fresh medium to allow synchronous exit from mitosis and entry into the next G1 phase. ERK3 was stoichiometrically hyperphosphorylated in mitotic cells (0 time point) as indicated by its retarded mobility on gel (Figure 2.1C). By two h of nocodazole-release, the slow migrating form of ERK3 had completely shifted to a faster migrating species similar to that observed in asynchronous cells (Figure 2.1C). This mobility shift was associated with a decrease in ERK3 levels. The kinetics of dephosphorylation of ERK3 paralleled the degradation of cyclin B1, which occurs in late mitosis and early G1. These results indicate that the phosphorylation of ERK3 in mitosis is reversible. We next synchronized the cells at the G1/S transition by a double-thymidine block and allowed them to progress into mitosis in the presence of nocodazole to create a mitotic trap. Entry into mitosis was monitored by the phosphorylation of histone H3 on Ser10. ERK3 mobility started to shift upward between 8 to 9 h after release from G1/S, when cyclin B1 and phospho-H3 levels reach a maximum and the majority of cells have a 4N DNA content (Figure 2.1D). Notably, at 6 and 7 h after G1/S, when cells are mainly in G2 (as indicated by the high percentage of cells with 4N DNA and



the absence of phospho-H3 signal), ERK3 migration was not modified. These results demonstrate that ERK3 is reversibly hyperphosphorylated in mitosis concomitant with its transient accumulation.

### **2.5.2 ERK3 is specifically phosphorylated in the C-terminal extension in mitosis**

ERK3 is phosphorylated on the activation loop residue Ser189 and on Ser386 in exponentially proliferating cells [7, 11, 12]. To determine whether these two serines contribute to the mobility shift of ERK3 in mitosis, we analyzed the phosphorylation of *in vitro* translated wild-type ERK3 or S189A and S386A mutants by mitotic extracts. The migration of ERK3 was clearly shifted upward after 1 h of incubation with an extract of mitotic HeLa cells (Figure 2.2A). The ERK3 mutants S189A and S386A shifted to the same level as the wild-type protein, indicating that these sites are not responsible for the hyperphosphorylation of ERK3 in mitosis. To define the region(s) of ERK3 phosphorylated in mitosis, we analyzed the electrophoretic motility shift of a series of ERK3 deletion mutants (Figure 2.2B) following incubation with mitotic HeLa cell extract. Deletion of the last 43 amino acids of ERK3 resulted in a slight reduction of the mobility shift on gel (Figure 2.2C). However, deletion of the entire C-terminal extension (mutants 1-399 and 1-365) completely abrogated the shift. Conversely, incubation of only the C-terminal extension of ERK3 (mutant 365-721) with a mitotic extract resulted in a marked electrophoretic mobility retardation (Figure 2.2C, right panel). These results identify the C-terminal domain of ERK3 as the main region phosphorylated during mitosis.



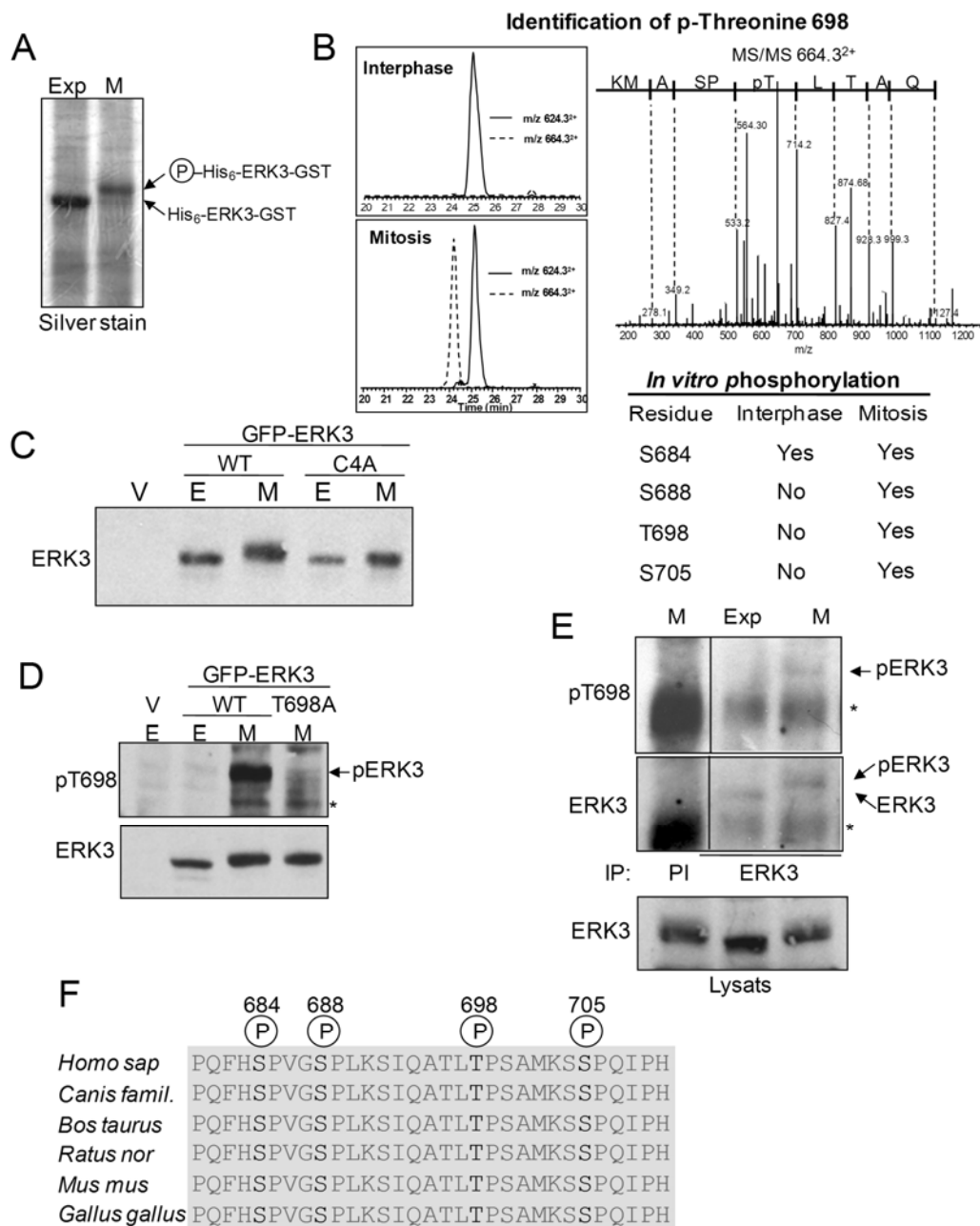
**Figure 2.2 *In vitro* phosphorylation of the C-terminal extension of ERK3 by mitotic extracts**

(A) ERK3 wild-type or mutants S189A and S386A were in vitro-translated with <sup>35</sup>S-methionine. The <sup>35</sup>S-labeled proteins were then incubated with 100 µg of protein extract from mitotic HeLa cells for 1 h at 30°C in the presence of 100 µM ATP. Reaction products were resolved by SDS-gel electrophoresis and analysed by autoradiography. (B) Schematic representation of the constructs used in the experiment. C34 is a region conserved in the C-terminus of ERK3 and ERK4. (C) ERK3 wild-type or deletion mutants were in vitro-translated and subjected to in vitro phosphorylation by mitotic extracts as above.

To identify individual ERK3 sites that are specifically phosphorylated in mitosis, extracts from asynchronously proliferating or mitotic HeLa cells were

incubated with purified recombinant His<sub>6</sub>-ERK3-GST and 200 μM ATP (Figure 2.3A). The reaction mixture was separated by SDS-gel electrophoresis, and the band corresponding to ERK3 was excised and digested in-gel with trypsin. The resulting peptides were subjected to LC-MS/MS analysis on a LTQ Orbitrap. The analysis resulted in a coverage of 68% of the protein sequence. We confirmed the identification of Ser189 and Ser386 as two phosphorylation sites of ERK3 [7, 11, 12], thereby validating our MS analysis, and showed that these two residues are phosphorylated both by asynchronous and mitotic extracts. In addition, we identified four new phosphorylation sites, Ser684, Ser688, Thr698 and Ser705, all located in the C-terminal extension of ERK3, that are phosphorylated by mitotic extracts (Figure 2.3B). Of these four sites, only Ser684 was found to be phosphorylated by an extract of asynchronous cells in one single experiment (Figure 2.3B).

To verify if these four C-terminal residues contribute to the mobility shift of ERK3 observed in mitosis, we transfected HeLa cells with GFP-ERK3 wild-type or a mutant where all four sites were substituted by alanine residues, GFP-ERK3(S684A/S688A/T698A/S705A) (referred to as C4A). Both GFP-ERK3 and GFP-ERK3C4A mutant migrated similarly in lysates of exponentially proliferating cells (Figure 2.3C). However, their migration pattern was different in mitotic cell lysates. The upward mobility shift of the ERK3 C4A mutant band was less pronounced as compared to the wild-type protein (Figure 2.3C). This indicates that one or more of the four C-terminal residues identified by MS contribute to the hyperphosphorylation of ERK3 in mitosis. It should be noted that the migration of the C4A mutant was still slightly retarded in mitosis, suggesting the existence of additional phosphorylation sites (Figure 2.3C).

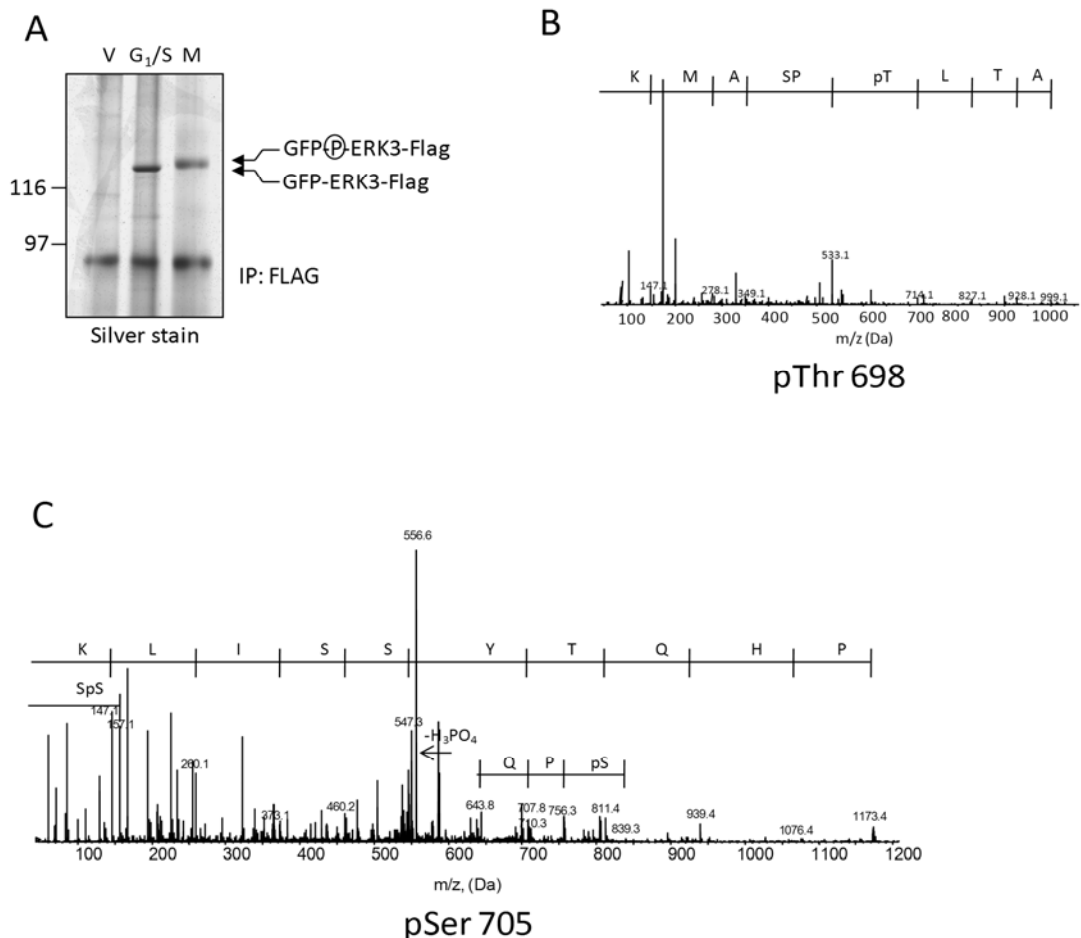


**Figure 2.3 ERK3 is phosphorylated on Thr698 in mitosis**

(A) Recombinant His<sub>6</sub>-ERK3-GST was phosphorylated *in vitro* by cell extracts of exponentially proliferating (Exp) or nocodazole-arrested mitotic (M) cells in the presence of ATP. Proteins were resolved by SDS-gel electrophoresis and visualized by silver staining. (B) Example of MS results obtained for the identification of phospho-acceptor residues in ERK3. Shown are spectra of precursor ions at m/z 624.3<sup>2+</sup> and 664.3<sup>2+</sup> and MS/MS spectrum of m/z 664.3<sup>2+</sup> ion confirming phosphorylation of Thr698. The table shows the list of phosphorylated residues identified *in vitro* following incubation with asynchronous or mitotic cell extracts. (C) HeLa cells were transfected with GFP-ERK3 wild-type or C4A mutant and

synchronized or not in mitosis. Electrophoretic mobility of ERK3 was analyzed by SDS-gel electrophoresis and immunoblotting with anti-ERK3 antibody. **(D)** HeLa cells were transfected with GFP-ERK3 wild-type or T698A mutant and synchronized or not in mitosis. Cell lysates were analyzed by immunoblotting with specific antibodies to phospho-ERK3(Thr698) and total ERK3. (\*) Indicates non specific bands. **(E)** Endogenous ERK3 was immunoprecipitated from cell lysates of exponentially proliferating or mitotic HeLa cells with pre-immune (PI) serum or anti-ERK3 antibody. The reaction products were analyzed by immunoblotting with anti-phospho-ERK3(T698) and anti-ERK3 antibodies. **(F)** Sequence alignment of the C-terminal region of ERK3 surrounding the identified phosphorylation sites in different orthologs. (\*) Indicates non specific bands.

To determine if Ser684, Ser688, Thr698 and Ser705 are phosphorylated *in vivo*, GFP-ERK3-Flag was transiently expressed in HeLa cells and the cells were synchronized in mitosis as above. The ectopically expressed ERK3 was immunoprecipitated with anti-Flag antibody, separated by SDS-gel electrophoresis, and the silver-stained band corresponding to ERK3 was processed for LC-MS/MS analysis (Supplementary Figure 2.S1). These analyses confirmed that Thr698 and Ser705 of ERK3 are phosphorylated in mitosis in intact cells. To facilitate the detection of phosphorylated Thr698 and Ser705 and to study their regulation *in vivo*, we generated phospho-specific antibodies to these two residues. Unfortunately, the antibody raised to phospho-Ser705 of ERK3 failed to detect any specific immunoreactive band in cells. However, immunoblotting with anti-phospho-ERK3(T698) antibody recognized ectopic wild-type GFP-ERK3 but not the T698A mutant in lysates of mitotic cells (Figure 2.3D). As expected, no immunoreactivity could be detected in lysates of asynchronously proliferating cells. To confirm that the endogenous ERK3 protein is phosphorylated on Thr698, we immunoprecipitated ERK3 from asynchronous or nocodazole-arrested HeLa cells and analyzed its phosphorylation by immunoblotting with anti-phospho-ERK3(T698) antibody. The antibody recognized an endogenous band of ~110 kDa that co-migrated with ERK3 protein and was detected specifically in mitotic cells (Figure 2.3E). The band was not detected with a pre-immune serum.



**Figure 2.S1 Mass spectra for phosphorylation sites identified on ERK3**

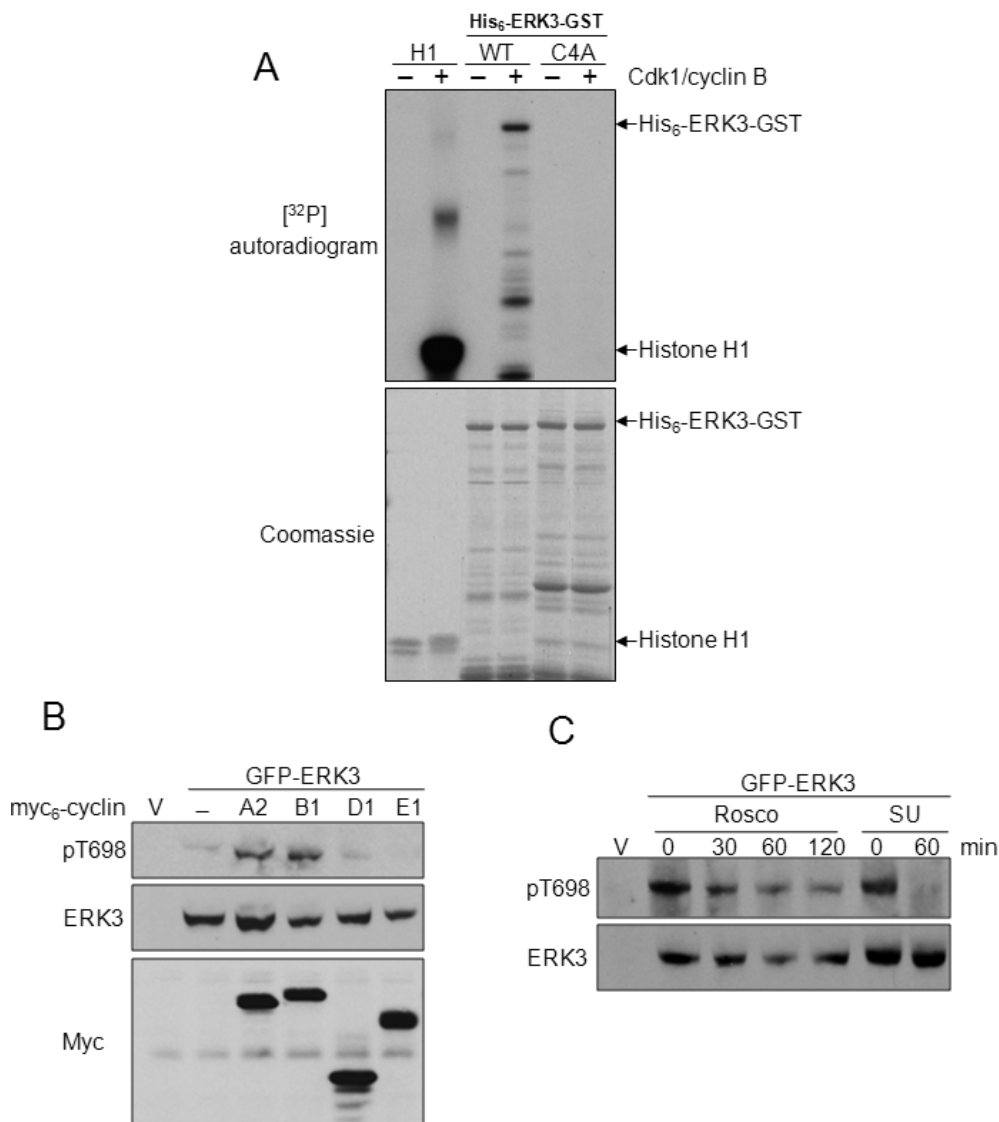
(A) HeLa cells were transfected with GFP-ERK3-Flag and synchronized or not in mitosis. ERK3 was immunoprecipitated with M2-agarose beads, separated by SDS-gel electrophoresis and visualized by silver staining. Bands corresponding to GFP-ERK3-Flag were cut and analysis by LC-MS/MS. (B-C) Spectra for phosphorylated Thr 698 and Ser 705 identified from mitotic ERK3.

Sequence alignment revealed that the four C-terminal Ser/Thr sites identified are conserved in mammals (Figure 2.3F). The amino acid sequences surrounding these residues are also perfectly conserved, suggesting an important function.

### 2.5.3 Identification of cyclin B-Cdk1 as a candidate for the C-terminal phosphorylation of ERK3 in mitosis

The four residues Ser684, Ser688, Thr698 and Ser705 are all followed by a proline and lie within a minimal Cdk consensus site [18]. The activity of the kinase

cyclin B-Cdk1 peaks in mitosis and is required for normal entry and progression into mitosis [19]. To investigate whether ERK3 is a candidate substrate for cyclin B-Cdk1, we first tested the ability of purified active cyclin B-Cdk1 to phosphorylate recombinant His<sub>6</sub>-ERK3-GST *in vitro*. As previously reported [5], we found that active cyclin B-Cdk1 is able to catalyze the phosphorylation of ERK3 *in vitro* (Figure 2.4A). Mutation of the four Ser/Thr-Pro sites (ERK3C4A) resulted in complete loss of the phosphorylation signal, confirming that these sites are the targets of the mitotic kinase. To address the role of Cdk1 in the *in vivo* phosphorylation of ERK3, HeLa cells were co-transfected with GFP-ERK3 and different cyclin regulatory subunits. The C-terminal phosphorylation of ERK3 was monitored by immunoblotting with the anti-phospho-ERK3(T698) antibody. Expression of the mitotic cyclins A2 and B1, but not cyclins D1 and E1, induced the phosphorylation of ERK3 on Thr698 (Figure 2.4B). Reciprocally, treatment of mitotic HeLa cells with two distinct pharmacological inhibitors of Cdk1 and Cdk2, roscovitine and SU9516, resulted in a marked decrease in the extent of Thr698 phosphorylation (Figure 2.4C). Together, these data strongly suggest that cyclin B-Cdk1 is a bona fide physiological kinase of ERK3 in mitosis.



**Figure 2.4 Cyclin B-Cdk1 phosphorylates ERK3 *in vitro* and *in vivo***

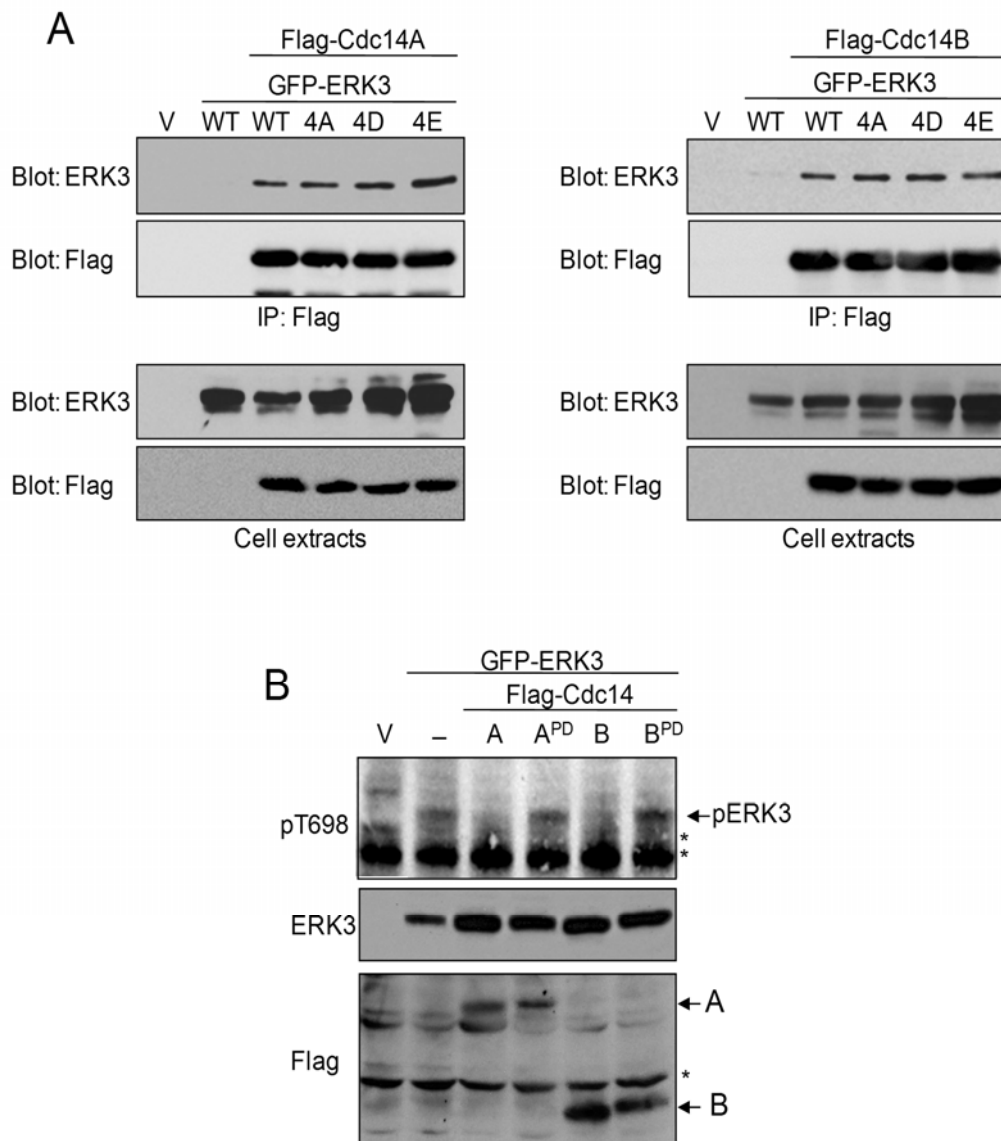
(A) Purified active cyclin B1-Cdk1 was incubated with histone H1 (positive control) or His<sub>6</sub>-ERK3-GST wild-type or C4A mutant (4A) in the presence of [<sup>32</sup>P]ATP for 30 min at 30°C. The reaction was stopped with Laemmli's buffer and the proteins were separated by SDS-gel electrophoresis. The gel was stained with Coomassie (lower panel) and analysed by autoradiography (upper panel). (B) HeLa cells were co-transfected with GFP-ERK3 and the indicated Myc-tagged cyclin subunits. Lysates of exponentially proliferating cells were analyzed by immunoblotting with the indicated antibodies. (C) HeLa cells were transfected with GFP-ERK3 and synchronized in mitosis by a double-thymidine block followed by nocodazole treatment. At the end of nocodazole incubation, roscovitine (25 μM) or SU9516 (5 μM) were added for the indicated times. Cells lysates were analyzed by immunoblotting.



#### 2.5.4 Cdc14A and Cdc14B dephosphorylate ERK3 at mitosis exit

The results presented above show that ERK3 is hyperphosphorylated on Cdk sites located in the C-terminal extension in mitosis. Upon mitosis exit and entry into G1, ERK3 migrates more rapidly on gel, indicating that it is dephosphorylated as cells enter the next cell cycle (Figure 2.1C). Mitotic exit is controlled in part by the activity of protein phosphatases, among which Cdc14 plays a key role [20, 21]. Cdc14 is a proline-directed phosphatase that opposes Cdk action to regulate various cell cycle events. Mammalian cells express two Cdc14 homologs, termed Cdc14A and Cdc14B, whose specific substrates are poorly documented [22]. In a recent study, Hansen *et al.* reported that Cdc14A physically interacts with ERK3 [5]. However, the authors did not examine the functional consequence of this interaction on the phosphorylation of ERK3 in intact cells. We first wanted to determine whether the interaction of Cdc14 with ERK3 is specific to the Cdc14A isoform by co-immunoprecipitation experiments. We found that both Cdc14A and Cdc14B physically interact with ERK3 when co-expressed in HEK 293 cells (Figure 2.5A). Substitution of the four C-terminal Ser/Thr-Pro sites of ERK3 by alanine residues or phospho-mimetic Asp or Glu residues had no effect on the interaction with Cdc14 isoforms.

We next investigated the role of Cdc14 in the dephosphorylation of ERK3 Ser/Thr-Pro sites during mitosis exit. HeLa cells were co-transfected with GFP-ERK3 and wild-type or catalytically inactive forms of either Flag-Cdc14A or Flag-Cdc14B, and the cells were synchronized in mitosis with nocodazole. Immunoblot analysis revealed that overexpression of Cdc14A and Cdc14B, but not the phosphatase-dead mutants, leads to dephosphorylation of Thr698 and the appearance of a faster migrating form of ERK3 in mitotic cells (Figure 2.5B). These results suggest that phosphorylation of ERK3 by cyclin B-Cdk1 during mitosis is antagonized by Cdc14 as cell exit mitosis.

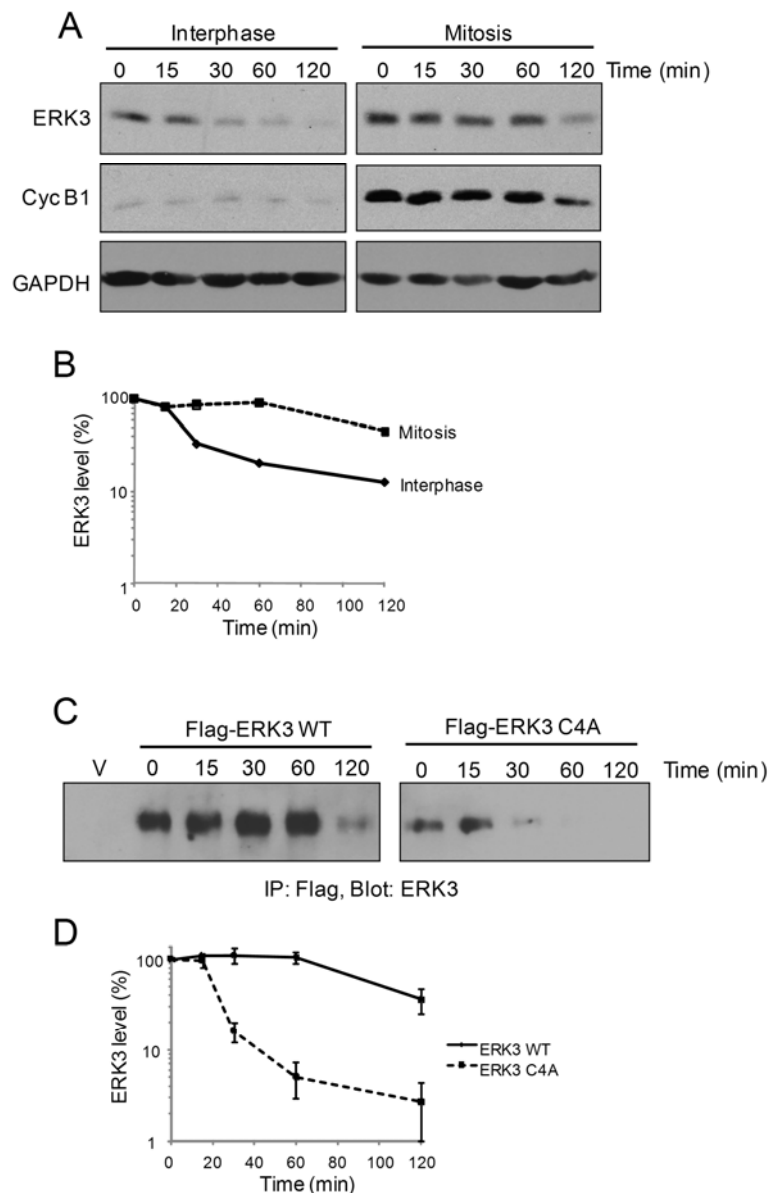


**Figure 2.5 Cdc14A and Cdc14B interact with and dephosphorylate ERK3 *in vivo***  
**(A)** HEK 293 cells were co-transfected with GFP-ERK3 wild-type or phosphorylation mutants together with Flag-Cdc14A (left panels) or Flag-Cdc14B (right panels). After 36 h, protein complexes were immunoprecipitated with Flag M2-agarose beads. Total lysates and immunoprecipitated proteins were analyzed by immunoblotting with anti-Flag and anti-ERK3 antibodies. **(B)** HeLa cells were co-transfected with GFP-ERK3 together with wild-type or phosphatase-dead mutant (PD) of Flag-Cdc14A or Flag-Cdc14B. The cells were synchronized in mitosis by a double-thymidine block followed by nocodazole treatment. Rounded cells obtained by mitotic shake-off were lysed and proteins were analyzed by immunoblotting with the indicated antibodies. (\*) Indicates non specific bands.

### 2.5.5 ERK3 stability is regulated by phosphorylation in mitosis

To determine whether the fluctuations in ERK3 levels observed during mitosis progression results from a change in protein stability, we measured the half-life of the kinase in asynchronous and mitotic HeLa cells by cycloheximide-chase experiments. As previously reported [7]), ERK3 was found to be highly unstable in asynchronously proliferating cells with a half-life of ~ 22 min (Figure 2.6, A and B). However, in prometaphase-arrested cells the half-life of ERK3 markedly increased to ~ 115 min. The behaviour of ERK3 resembles that of cyclin B1, which is stabilized during mitosis and is degraded as cells progress into G1 phase [23].

We next asked if the C-terminal phosphorylation sites identified are involved in the stabilization of ERK3 protein during mitosis. To address this question, we transfected HeLa cells with Flag-ERK3 wild-type or C4A mutant and synchronized the cells in mitosis by a double-thymidine nocodazole block. The ectopically expressed ERK3 protein was immunoprecipitated with anti-Flag agarose-beads and revealed by immunoblotting with anti-ERK3 antibody. The half-life of ectopic Flag-ERK3 in prometaphase-arrested cells was estimated to be ~ 102 min, which is essentially similar to the endogenous protein (Figure 2.6, C and D). In these conditions, the ERK3 C4A mutant was degraded much more rapidly with a half-life of ~ 20 min. We conclude from these results that phosphorylation of the four C-terminal Ser/Thr-Pro stabilizes ERK3 protein, leading to its accumulation during mitosis.



**Figure 2.6 Phosphorylation of the C-terminus stabilizes ERK3 in mitosis**

(A) HeLa cells asynchronously proliferating or synchronized in mitosis by a double thymidine-nocodazole block were treated with cycloheximide (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) for the indicated times. Endogenous ERK3 levels were analyzed by immunoblotting. (B) Quantification of ERK3 degradation shown in panel A. (C) HeLa cells were transfected with Flag-ERK3 wild-type or C4A mutant. The cells were then synchronized in mitosis by a double thymidine-nocodazole block. Cycloheximide was added for the indicated periods of time. Ectopic Flag-ERK3 was immunoprecipitated with Flag-M2 agarose beads and analyzed by immunoblotting using anti-ERK3 antibody. (D) Quantification of ERK3 degradation shown in panel C. Data represent the quantification of three independent experiments.

## 2.6 Discussion

Signaling by various subfamilies of MAP kinases has been shown to play important roles in the regulation of cell cycle progression. Sustained activation of the MAP kinases ERK1/ERK2 is necessary for G1 to S phase progression and is associated with induction of positive regulators of the cell cycle and inactivation of antiproliferative genes [24, 25]. Activation of p38 MAP kinase by DNA damage or various stresses triggers a G2 checkpoint that delays entry into mitosis [26, 27]. JNK1 and JNK2 MAP kinases positively regulate cell proliferation at least in part by augmenting c-Jun expression [28]. More recently, ERK5 was shown to promote G2-M progression by regulating the transcription of G2/M-specific genes through activation of NFkB [29]. Mounting evidence also links ERK3 signaling to the regulation of cell cycle progression. The results of this study further substantiate this idea by demonstrating that ERK3 is phosphorylated and stabilized in a cell cycle-dependent manner. We show that ERK3 is stoichiometrically hyperphosphorylated as cells enter mitosis and is dephosphorylated at the M→G1 transition.

By MS analysis, we identified four residues (Ser684, Ser688, Thr698 and Ser705) in the unique C-terminal extension of ERK3 that are specifically phosphorylated by mitotic cell extracts *in vitro*. All four residues are followed by a proline and therefore represent candidate Cdk substrates. Here, we present compelling evidence that cyclin B-Cdk1 is a major ERK3 C-terminal kinase in mitosis. This conclusion is supported by the following observations: 1) active cyclin B-Cdk1 phosphorylates recombinant ERK3 *in vitro* and alanine mutation of the four Ser/Thr-Pro sites completely abolishes phosphorylation; 2) ERK3 is hyperphosphorylated when the activity of Cdk1 is highest in the cell cycle; 3) immunoblotting with a phospho-specific antibody to Thr698 recognizes an immunoreactive band that co-migrates with ERK3 specifically in mitotic cells; 4) ectopic expression of mitotic cyclins induces the phosphorylation of ERK3 on Thr698; and 5) pharmacological inhibition of Cdk1 during mitosis results in a marked decrease in the phosphorylation of ERK3 on Thr698. This identifies ERK3 as a novel substrate of Cdk1. However, we do not exclude the possibility that ERK3 is

phosphorylated by another mitotic kinase. Indeed, migration of an ERK3 mutant with all four C-terminal Ser/Thr-Pro sites substituted by alanine still exhibited a slight mobility shift in mitosis, suggesting the existence of additional phosphorylation sites. This idea is consistent with the results of *in vitro* phosphorylation of ERK3 deletion mutants, showing that the electrophoretic mobility of the 1-678 and 1-542 truncation mutants is still shifted upon phosphorylation by mitotic extracts (Figure 2C). Future identification of these additional phosphorylation sites of ERK3 will be important to understand the function of the kinase in cell cycle regulation.

Cdc14 is an evolutionarily conserved Ser/Thr phosphatase that regulates various aspects of the cell division cycle [20, 21, 30]. Mammalian cells express two Cdc14 homologs, named Cdc14A and Cdc14B, whose specific substrates and functions remain to be fully characterized. These phosphatases have been implicated in the regulation of the centrosome duplication cycle, chromosome segregation, cytokinesis, G1 length, and the G2 DNA damage checkpoint [15, 31-33]. Genetic, biochemical and structural studies have shown that Cdc14 dephosphorylates phospho-Ser/Thr residues immediately followed by a proline and opposes Cdk action [32, 34, 35]. To date, Cdc14A has been reported to dephosphorylate Cdc25A, Sirt2, RN-Tre, iron regulatory protein 2, p53 and INCENP, whereas Cdc14B was shown to dephosphorylate Skp2, Sirt2 and p53 [15, 36-41]. A recent study has shown that ERK3 can be dephosphorylated by Cdc14A *in vitro* [5]. Here, we provide evidence that ERK3 is a substrate of Cdc14A and Cdc14B in intact cells. We show that ERK3 physically interacts with both Cdc14A and Cdc14B homologs in co-immunoprecipitation experiments. Most importantly, we show that overexpression of Cdc14A or Cdc14B, but not their catalytically-inactive forms, dephosphorylate ERK3 in mitotic cells. These results add ERK3 to the growing list of Cdc14 substrates.

Cdc14 phosphatase isoforms exhibit distinct subcellular localisations during interphase and mitosis. Cdc14A is localized to centrosome during interphase, and is redistributed to the cytoplasm during mitosis [33]. Cdc14B is mainly localized to nucleoli in interphase cells, and is dispersed throughout the cell in prophase and

metaphase [32, 42]. We previously reported that ERK3 is found in both the cytoplasmic and nuclear compartments of exponentially proliferating cells [10]. Interestingly, we observed that ERK3 localizes at the centrosome when co-expressed with Cdc14A, and is relocalized in the nucleus when co-transfected with Cdc14B isoform (data not shown). The physiological significance of these observations for the regulation of ERK3 activity requires further investigation.

Why is ERK3 specifically stabilized in mitosis? The answer to this question will await the elucidation of ERK3 cellular functions. The high conservation of the C-terminus of ERK3 suggests that this region is likely to play an important functional role. Interestingly, ERK3 was recently identified as a potential regulator of mitosis in HT-29 colon cancer cells in a lentiviral-based shRNA genetic screen [43]. In this high-content screen, ERK3 knockdown resulted in an increase in mitotic index. Additional work is needed to connect this observation with our finding of ERK3 hyperphosphorylation and accumulation during mitosis.

## **2.7 Author's contributions**

PLT designed the study, carried out the experiments, analyzed the data and drafted the manuscript. GR contributed to the design of the study and to data analysis. SM contributed to study design and data analysis and prepared the final manuscript. All authors read and approved the manuscript.

## **2.8 Acknowledgments**

We thank E. Bonneil and P. Thibault from IRIC Proteomic Facility for MS analysis, M. Ewen and H. Charbonneau for plasmids, and C. Julien for technical assistance.

## **2.9 Funding**

P.L. Tanguay is recipient of a studentship from the Canadian Institutes for Health Research (CIHR) and G. Rodier is recipient of fellowships from the National Cancer Institute of Canada and the American Association for Cancer Research. S. Meloche holds the Canada Research Chair in Cellular Signaling. This work was supported by a grant to S. M. from the CIHR.



## 2.10 References

1. **Coulombe, P., and Meloche, S.** (2007). Atypical mitogen-activated protein kinases: structure, regulation and functions. *Biochim Biophys Acta* **1773**, 1376-1387.
2. **Boulton, T.G., Nye, S.H., Robbins, D.J., Ip, N.Y., Radziejewska, E., Morgenbesser, S.D., DePinho, R.A., Panayotatos, N., Cobb, M.H., and Yancopoulos, G.D.** (1991). ERKs: a family of protein-serine/threonine kinases that are activated and tyrosine phosphorylated in response to insulin and NGF. *Cell* **65**, 663-675.
3. **Meloche, S., Beatty, B.G., and Pellerin, J.** (1996). Primary structure, expression and chromosomal locus of a human homolog of rat ERK3. *Oncogene* **13**, 1575-1579.
4. **Zhu, A.X., Zhao, Y., Moller, D.E., and Flier, J.S.** (1994). Cloning and characterization of p97MAPK, a novel human homolog of rat ERK-3. *Mol Cell Biol* **14**, 8202-8211.
5. **Hansen, C.A., Bartek, J., and Jensen, S.** (2008). A functional link between the human cell cycle-regulatory phosphatase Cdc14A and the atypical mitogen-activated kinase Erk3. *Cell Cycle* **7**, 325-334.
6. **Sun, M., Wei, Y., Yao, L., Xie, J., Chen, X., Wang, H., Jiang, J., and Gu, J.** (2006). Identification of extracellular signal-regulated kinase 3 as a new interaction partner of cyclin D3. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **340**, 209-214.
7. **Coulombe, P., Rodier, G., Pelletier, S., Pellerin, J., and Meloche, S.** (2003). Rapid turnover of extracellular signal-regulated kinase 3 by the ubiquitin-proteasome pathway defines a novel paradigm of mitogen-activated protein kinase regulation during cellular differentiation. *Mol Cell Biol* **23**, 4542-4558.
8. **Kleines, M., Gartner, A., Ritter, K., and Schaade, L.** (2000). Early steps in termination of the immortalization state in Burkitt lymphoma: induction of genes involved in signal transduction, transcription, and trafficking by the ganglioside IV(3)NeuAc- nLcOse(4)Cer. *Biochim Biophys Acta* **1492**, 139-144.
9. **Crowe, D.L.** (2004). Induction of p97MAPK expression regulates collagen mediated inhibition of proliferation and migration in human squamous cell carcinoma lines. *Int J Oncol* **24**, 1159-1163.
10. **Julien, C., Coulombe, P., and Meloche, S.** (2003). Nuclear export of ERK3 by a CRM1-dependent mechanism regulates its inhibitory action on cell cycle progression. *J Biol Chem* **278**, 42615-42624.
11. **Cheng, M., Boulton, T.G., and Cobb, M.H.** (1996). ERK3 is a constitutively nuclear protein kinase. *J Biol Chem* **271**, 8951-8958.
12. **Deleris, P., Rousseau, J., Coulombe, P., Rodier, G., Tanguay, P.L., and Meloche, S.** (2008). Activation loop phosphorylation of the atypical MAP kinases ERK3 and ERK4 is required for binding, activation and cytoplasmic relocalization of MK5. *J Cell Physiol* **217**, 778-788.

13. **Coulombe, P., Rodier, G., Bonneil, E., Thibault, P., and Meloche, S.** (2004). N-Terminal ubiquitination of extracellular signal-regulated kinase 3 and p21 directs their degradation by the proteasome. *Molecular and Cellular Biology* **24**, 6140-6150.
14. **Coulombe, P., and Meloche, S.** (2002). Dual-tag prokaryotic vectors for enhanced expression of full-length recombinant proteins. *Anal Biochem* **310**, 219-222.
15. **Rodier, G., Coulombe, P., Tanguay, P.L., Boutonnet, C., and Meloche, S.** (2008). Phosphorylation of Skp2 regulated by CDK2 and Cdc14B protects it from degradation by APC(Cdh1) in G1 phase. *EMBO J* **27**, 679-691.
16. **Servant, M.J., Coulombe, P., Turgeon, B., and Meloche, S.** (2000). Differential regulation of p27(Kip1) expression by mitogenic and hypertrophic factors: Involvement of transcriptional and posttranscriptional mechanisms. *J Cell Biol* **148**, 543-556.
17. **Rodier, G., Makris, C., Coulombe, P., Scime, A., Nakayama, K., Nakayama, K.I., and Meloche, S.** (2005). p107 inhibits G1 to S phase progression by down-regulating expression of the F-box protein Skp2. *J Cell Biol* **168**, 55-66.
18. **Ubersax, J.A., Woodbury, E.L., Quang, P.N., Paraz, M., Blethrow, J.D., Shah, K., Shokat, K.M., and Morgan, D.O.** (2003). Targets of the cyclin-dependent kinase Cdk1. *Nature* **425**, 859-864.
19. **Nigg, E.A.** (2001). Mitotic kinases as regulators of cell division and its checkpoints. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**, 21-32.
20. **Stegmeier, F., and Amon, A.** (2004). Closing mitosis: the functions of the Cdc14 phosphatase and its regulation. *Annu Rev Genet* **38**, 203-232.
21. **Trinkle-Mulcahy, L., and Lamond, A.I.** (2006). Mitotic phosphatases: no longer silent partners. *Current Opinion in Cell Biology* **18**, 623-631.
22. **Li, L., Ernsting, B.R., Wishart, M.J., Lohse, D.L., and Dixon, J.E.** (1997). A family of putative tumor suppressors is structurally and functionally conserved in humans and yeast. *J Biol Chem* **272**, 29403-29406.
23. **Clute, P., and Pines, J.** (1999). Temporal and spatial control of cyclin B1 destruction in metaphase. *Nat Cell Biol* **1**, 82-87.
24. **Meloche, S., and Pouyssegur, J.** (2007). The ERK1/2 mitogen-activated protein kinase pathway as a master regulator of the G1- to S-phase transition. *Oncogene* **26**, 3227-3239.
25. **Roovers, K., and Assoian, R.K.** (2000). Integrating the MAP kinase signal into the G1 phase cell cycle machinery. *Bioessays* **22**, 818-826.
26. **Mikhailov, A., Shinohara, M., and Rieder, C.L.** (2005). The p38-mediated stress-activated checkpoint. A rapid response system for delaying progression through antephase and entry into mitosis. *Cell Cycle* **4**, 57-62.
27. **Zarubin, T., and Han, J.** (2005). Activation and signaling of the p38 MAP kinase pathway. *Cell Res* **15**, 11-18.
28. **Jaeschke, A., Karasarides, M., Ventura, J.J., Ehrhardt, A., Zhang, C., Flavell, R.A., Shokat, K.M., and Davis, R.J.** (2006). JNK2 is a positive regulator of the cJun transcription factor. *Mol Cell* **23**, 899-911.

29. **Cude, K., Wang, Y., Choi, H.J., Hsuan, S.L., Zhang, H., Wang, C.Y., and Xia, Z.** (2007). Regulation of the G2-M cell cycle progression by the ERK5-NFkappaB signaling pathway. *J Cell Biol* **177**, 253-264.
30. **Clifford, D.M., Chen, C.T., Roberts, R.H., Feoktistova, A., Wolfe, B.A., Chen, J.S., McCollum, D., and Gould, K.L.** (2008). The role of Cdc14 phosphatases in the control of cell division. *Biochem Soc Trans* **36**, 436-438.
31. **Bassermann, F., Frescas, D., Guardavaccaro, D., Busino, L., Peschiaroli, A., and Pagano, M.** (2008). The Cdc14B-Cdh1-Plk1 axis controls the G2 DNA-damage-response checkpoint. *Cell* **134**, 256-267.
32. **Hansen, D.V., Hsu, J.Y., Kaiser, B.K., Jackson, P.K., and Eldridge, A.G.** (2002). Control of the centriole and centrosome cycles by ubiquitination enzymes. *Oncogene* **21**, 6209-6221.
33. **Mailand, N., Lukas, C., Kaiser, B.K., Jackson, P.K., Bartek, J., and Lukas, J.** (2002). Deregulated human Cdc14A phosphatase disrupts centrosome separation and chromosome segregation. *Nat Cell Biol* **4**, 317-322.
34. **Gray, C.H., Good, V.M., Tonks, N.K., and Barford, D.** (2003). The structure of the cell cycle protein Cdc14 reveals a proline-directed protein phosphatase. *EMBO J* **22**, 3524-3535.
35. **Visintin, R., Craig, K., Hwang, E.S., Prinz, S., Tyers, M., and Amon, A.** (1998). The phosphatase Cdc14 triggers mitotic exit by reversal of Cdk-dependent phosphorylation. *Mol Cell* **2**, 709-718.
36. **Esteban, V., Vazquez-Novelle, M.D., Calvo, E., Bueno, A., and Sacristan, M.P.** (2006). Human Cdc14A reverses CDK1 phosphorylation of Cdc25A on serines 115 and 320. *Cell Cycle* **5**, 2894-2898.
37. **Gruneberg, U., Neef, R., Honda, R., Nigg, E.A., and Barr, F.A.** (2004). Relocation of Aurora B from centromeres to the central spindle at the metaphase to anaphase transition requires MKlp2. *J Cell Biol* **166**, 167-172.
38. **Lanzetti, L., Margaria, V., Melander, F., Virgili, L., Lee, M.H., Bartek, J., and Jensen, S.** (2007). Regulation of the Rab5 GTPase-activating protein RN-tre by the dual specificity phosphatase Cdc14A in human cells. *J Biol Chem* **282**, 15258-15270.
39. **Li, L., Ljungman, M., and Dixon, J.E.** (2000). The human Cdc14 phosphatases interact with and dephosphorylate the tumor suppressor protein p53. *Journal of Biological Chemistry* **275**, 2410-2414.
40. **North, B.J., and Verdin, E.** (2007). Mitotic regulation of SIRT2 by cyclin-dependent kinase 1-dependent phosphorylation. *J Biol Chem* **282**, 19546-19555.
41. **Wallander, M.L., Zumbrennen, K.B., Rodansky, E.S., Romney, S.J., and Leibold, E.A.** (2008). Iron-independent phosphorylation of iron regulatory protein 2 regulates ferritin during the cell cycle. *J Biol Chem* **283**, 23589-23598.
42. **Cho, H.P., Liu, Y., Gomez, M., Dunlap, J., Tyers, M., and Wang, Y.** (2005). The dual-specificity phosphatase CDC14B bundles and stabilizes microtubules. *Mol Cell Biol* **25**, 4541-4551.

43. **Moffat, J., Grueneberg, D.A., Yang, X., Kim, S.Y., Kloepper, A.M., Hinkle, G., Piqani, B., Eisenhaure, T.M., Luo, B., Grenier, J.K., et al.** (2006). A lentiviral RNAi library for human and mouse genes applied to an arrayed viral high-content screen. *Cell* **124**, 1283-1298.

## **CHAPITRE 3**

*Article 2 :*

**INHIBITION OF CDK1/CYCLIN B ACTIVITY BY MK5  
DELAYS ENTRY INTO MITOSIS AFTER  
REPLICATIVE STRESS**

### 3.1 Mise en situation

Pendant la caractérisation de la phosphorylation de ERK3 en mitose, nous voulions déterminer l'impact de la phosphorylation sur l'interaction entre ERK3 et MK5. Nous avons cependant remarqué que l'expression de MK5 influençait beaucoup les niveaux détectés de ERK3/4 ectopiques dans les cellules synchronisées en mitose. De même, les niveaux de MK5 étaient également plus faibles dans les extraits de cellules en mitose. Plusieurs hypothèses différentes pouvaient expliquer ce résultat. Certaines données suggéraient que l'expression de MK5 modifiait la progression dans le cycle cellulaire. Ainsi, nos observations soulevaient la possibilité que l'expression de MK5 « *bypass* » le point de contrôle imposé par le nocodazole utilisé pour arrêter les cellules en mitose. Une autre possibilité était que les cellules qui surexpriment MK5 entrent moins bien en mitose et restent en interphase plus longtemps. Dans ce même ordre d'idée, il était déjà connu que la voie de signalisation p38-MK2 contrôle la progression en G1/S et G2/M conséquemment à une exposition des cellules à un stress génotoxique.

L'étude présentée dans ce chapitre avait comme premiers objectifs d'identifier l'impact réel de la surexpression de MK5 sur l'entrée ou la progression en mitose, de comparer l'effet de MK5 à MK2 et d'identifier dans quelles conditions MK5 intervenait dans le contrôle du cycle cellulaire. J'ai donc mis au point une approche de surexpression pour étudier le cycle cellulaire des cellules transfectées.

Dans le prochain article, sous la supervision de mon directeur de recherche, Dr Sylvain Meloche, j'ai réalisé tout le travail présenté, de la conception des expériences à l'écriture du manuscrit. Cet article est en phase finale de préparation et sera soumis sous peu pour publication.

# **Inhibition of CDK1/cyclin B activity by MK5 delays entry into mitosis after replicative stress**

**Pierre-Luc Tanguay,<sup>\*,†</sup> and Sylvain Meloche<sup>\*,†,§</sup>**

<sup>\*</sup>Institut de Recherche en Immunologie et Cancérologie and Departments of  
<sup>†</sup>Molecular Biology and <sup>§</sup>Pharmacology, Université de Montréal, Montreal, Quebec,  
Canada H3C 3J7

Running title: MK5 regulates mitotic entry

Abbreviations: MK5, MAP kinase activated protein kinase 5; CDK1, cyclin dependant kinase 1; Cdc25, Cell division cycle 25; ERK, Extracellular regulated kinase

Manuscrit en préparation

### **3.2 Abstract**

MAPK-activated protein kinase 5 (MK5) is a member of the MK family. Relatively little is known about MK5 functions. Recently, it was demonstrated to be essential for Ras-induced senescence and tumor suppression. MK2, another member of the MK family, is required for the DNA-damage response in cancer cells. In the present study, we compared the ability of MK2 and MK5 to control the mitotic entry. We show that ectopic expression of active MK5 increases the length of the G2 phase and delays entry in mitosis more than MK2. Reciprocally, loss-of-function experiments demonstrate a physiological function of MK5 in the control of mitotic entry specifically after inhibition of the replication. Importantly, we observed that silencing of MK5 increases the enzymatic activity of CDK1/cyclin B complex after a replicative arrest. Finally, we show that Cdc25A is a good substrate of MK5 in vitro and that its ectopic expression counteracts the accumulation of cells in G2 mediated by MK5 enzymatic activity. Our results unravel a novel function of MK5 as a regulator of CDK1/cyclin B activity involved in the initiation of mitosis after recovery from a replicative arrest.



### 3.3 Introduction

Eukaryotic cell division is tightly controlled to ensure perfect coordination between DNA replication and chromosome segregation [1]. Cyclin-dependent kinases (CDKs) are the core components of the cell cycle machinery regulating transition and progression in the cell cycle phases. For example, entry in and execution of mitosis requires the essential CDK1/cyclin B complex activity [2]. This kinase is regulated at different levels by many mechanisms to guaranty accurate timing of activation [2, 3]. Firstly, control of the abundance of cyclin B is responsible for the timing of its association with CDK1. From S phase to mitosis, the rate of transcription of its mRNA increases and the protein degradation is inhibited to promote its accumulation [2]. During metaphase-anaphase transition, cyclin B is completely degraded, contributing to the inactivation of CDK1 complex. Secondly, CDK1 is directly submitted to tight control of its phosphorylation status. Phosphorylation of Thr161 in the activation loop catalyzed by the constitutively active CAK complex is required for full enzymatic activity, but does not represent a limiting step in the activation of CDK1 [4]. Finally, CDK1 bound to cyclin B is kept inactive by phosphorylation of Thr14 and Tyr15, two residues in the ATP-binding site, by Wee1 and Myt1 kinases [5-8]. Dephosphorylation of these residues by the dual-specificity phosphatases of the Cdc25 family results in full activation of CDK1/cyclin B complexes and promotes entry into mitosis [9]. Human genome encodes three *Cdc25* genes (A, B and C) which all seems to regulate G1-S and G2-M transitions [9]. Even though they are all specific for CDK1 making their function somewhat redundant, the subcellular compartment and the timing of their activation are different. The proposed model is that Cdc25B is the first activator of CDK1 localized to centrosomes followed by nuclear activation of CDK1 by Cdc25C and Cdc25A [2, 9].

Upon genotoxic stress, cell cycle progression is delayed to allow repair of damaged DNA or, in very severe cases, induction of apoptosis [10]. Depending on the types of DNA lesions, very few signalling pathways are solicited to generate the appropriate cellular response. For examples, the kinase ataxia-telangectasia mutated

(ATM) is primarily activated by DNA double-strand breaks (DSBs) (ex: IR-induced DNA lesions) whereas the kinase ataxia-telangectasia- and RAD3-related (ATR) is mainly activated by bulky DNA lesions or stalled replication forks in S phase [1, 10]. These kinases engage the checkpoint response by phosphorylation of various substrates including the effector kinases Chk1 and Chk2. Another signalling pathway is defined by the stress kinases p38/MK2 [11-13]. MK2 is absolutely required to promote cell survival after DNA damaged in p53-deficient cells [12]. Very recently it was demonstrated that nuclear Chk1 is required to activate an early checkpoint response whereas cytoplasmic MK2 mediates and maintains a late response [13]. The phosphatases Cdc25 are common targets of Chk1, Chk2 and MK2 mediating the cell cycle inhibition.

MK5 was cloned by homology to MAPKAP Kinases simultaneously by two independent groups and was first identified as a substrate of p38 [14, 15]. Cellular stress such as H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, TNF $\alpha$  and anisomycin were shown to stimulate its enzymatic activity via Thr182 phosphorylation of its activation loop. MK5 was also identified as a binding partner and substrate of the atypical MAP kinases ERK3 and ERK4 both *in vitro* and *in vivo* [16-19]. Although the downstream effectors and biological functions of these complexes remain elusive, ERK3/4 increase the kinase activity of MK5 by phosphorylation of its Thr 182. Ectopic expression of MK5 and ERK3/4 retains the complexes in the cytoplasm.

Very little is known about the functions of MK5. MK5, together with MK2, was demonstrated to inhibit Ras-induced proliferation via inhibition of JNK pathway [20]. MK5 was recently described as a mediator of oncogenic Ras-induced senescence activated by p38 [21]. The tumor suppressing function of MK5 resides in its ability to directly phosphorylate and activate transcriptional activity of p53. On the other hand, MK5 is described as a positive regulator of actin rearrangements via phosphorylation of HSP27.

Herein, we describe a novel function of MK5 in the control of mitotic entry following recovery from S phase arrest. We show that MK5 gain of function experiments delays mitotic entry in a kinase-dependent manner and that siRNA-

mediated knock-down of MK5 shortened the G2 phase. Interestingly, we observed that MK5 activity has no effect on cell cycle progression in unperturbed cells. We present data revealing that MK5 inhibits CDK1/cyclin B activity. Importantly, we discovered that Cdc25A is efficiently phosphorylated *in vitro* by MK5 and its expression rescue MK5-mediated delay in G2 phase.

### 3.4 Materials and Methods

#### 3.4.1 Reagents and Antibodies

Thymidine, doxorubicin, taxol and sorbitol were obtained from Sigma-Aldrich. Aphidicolin was purchased from Calbiochem. SB203580 is from LC Laboratories. Histone H1 was obtained from Roche. Polyclonal anti-ERK3 and anti-ERK4 antibodies have been described [22, 23]. Commercial antibodies were from the following suppliers: Polyclonal anti-GAPDH and anti-MK5 and monoclonal anti-cyclin B1 (GNS1) from Santa-Cruz Biotechnology; polyclonal anti-FLAG was from Sigma; monoclonal anti-cyclin A (E23) from Neomarkers; polyclonal anti-phospho-Cdk1(Tyr15), anti-phospho-MK2 (Thr334 ) and anti-p38 and monoclonal anti-phospho-histone H3(Ser10) (6G3) from Cell Signaling Technology; monoclonal anti-HA from Covance; monoclonal Flag M2-agarose beads from Sigma; polyclonal anti-GFP from US Biological; horseradish peroxidase (HRP)-conjugated goat anti-mouse and anti-rabbit IgG from Biorad; Alexa-fluor 350-conjugated goat anti-mouse from Invitrogen.

#### 3.4.2 Plasmid Constructs and siRNA

pCDNA3-HA-MK5 wild type (WT), MK5 TA (T182A), MK5 kinase dead (KD, K51A) and pCDNA3-Flag-ERK4 have been described elsewhere [22]. MK2 cDNA was subcloned into EcoRI-XbaI site of pCDNA3-HA plasmid. All sequences were confirmed by DNA sequencing. pCDNA3.0 GFP-Luciferase was a kind gift of Daniel Lamarre. pGEX2T-Cdc25A and pCDNA3.0 HA-Cdc25A, pGEX-Cdc25B and pGEX-Cdc25C(Addgene plasmid 10969, [24]) were kindly provided by Drs I. Hoffmann, D. Bulavin and T. Finkel respectively.

The siRNA sequences were: MK5 A: 5'-CAG ATA AAG TAG ATC GAC TAA-3'; MK5 B: 5'-GAC GCC CTA CAC TTA CAA CAA-3'; MAPK6 (ERK3): 5'- CAG GCT TCC TGT TGA AAT AAA-3'; MAKPK4 (ERK4): 5'-GGG TGA GCT GTT CAA GTT CTT-3'; and control: 5'-GCG CGC TTT GTA GGA TTC GTT-3'. siRNAs were purchased from Qiagen and IDT and were transfected in HeLa

cells using Oligofectamine reagent (Invitrogen) according to manufacturer's condition.

### **3.4.3 Cell Culture, Transfections and Cell Synchronization**

HeLa cells were grown in Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum and antibiotics. HeLa cells were transfected with Lipofectamine reagent from Invitrogen. For transfection and synchronization experiments, HeLa cells were plated at 50-60 % confluence. To synchronize cells at the G1/S phase transition, double-thymidine block was performed as previously described [25, 26]. Briefly, after transfection, cells were incubated with 2 mM thymidine for 18 h. The cells were then washed with PBS, cultured in fresh medium for 8 h and thymidine was added for another 18 h. 6 h after the release of the second block, 1 $\mu$ M taxol was added to prevent mitotic exit.

### **3.4.4 Expression and purification of recombinant proteins**

pGEX2T-Cdc25A, pGEX-Cdc25B and pGEX-Cdc25C were expressed for 3h at 37 °C with 0,2 mM IPTG into *E.coli* BL21 strain. Bacteria were lysed and the recombinant proteins were purified as described in [27]. Glutathione-bound GST-Cdc25 were eluted with 50 mM reduced Glutathione, 20 mM Tris pH 8,0. Eluted proteins were dialysed overnight at 4 °C in 150 mM NaCl, 20 mM Tris pH7.5 and 1 mM DTT. Expression and purification of His-MK5 WT, His-MK5 KD and HSP27 have been described previously [22].

### **3.4.5 Immunoblot Analysis and Kinase Assays**

Cell lysis and immunoblot analysis were performed as described previously [28]. To determine kinase activity of endogenous MK5, HeLa cells were synchronized and harvested in different phases of the cell cycle. Cells were lysed in buffer A (50 mM tris, pH7.5, 150 mM NaCl, 0.5% NP-40, 50 mM NaF, 1 mM Vanadate, 12.5  $\mu$ M DTT, 1 mM pepstatine, 1 mM Leupeptine, 0,1 mM PMSF, 10 mM  $\beta$ -glycerophosphate) for 30 min on ice. Cellular debris were removed by

centrifugation at 13 000 rpm for 10 min at 4 °C. To immunoprecipitate MK5, we incubated 3 µg of anti-MK5 antibodies with a mixture of protein A/G-agarose beads overnight at 4 °C with agitation. Unbound antibodies were washed out with buffer A. Next, 3 mg of cell lysates were incubated with this preparation of antibody-coated agarose-beads overnight at 4 °C. Immunoprecipitations were washed four times with buffer A and two times with kinase assay buffer (25 mM Hepes, pH 7.4, 25 mM MgCl<sub>2</sub> and 1 mM DTT). Immunoprecipitated MK5 was incubated in the kinase assay buffer supplement with 200 µM ATP, 10 µCi [ $\gamma^{32}$ P] ATP and 2 µg HSP27 as a substrate for 5 min at 30 °C. Reactions were stopped by addition of Laemmli buffer and analysed by SDS-gel electrophoresis and autoradiography.

To measure CDK1/cyclinB complex activity, synchronized cells were harvested at indicated times and lysed in buffer A for 30 min on ice. 30 µg of proteins were incubated with 0,3 µg of anti-cyclin B antibody and a mix of protein A/protein G-agarose conjugated beads for 4 h at 4 °C. Beads were washed 3 times with lysis buffer followed by washes with kinase reaction buffer (50 mM Tris, pH7.5, 15 mM MgCl<sub>2</sub> and 1 mM DTT). Immunoprecipitates were incubated in the kinase reaction buffer supplemented with 50 µM ATP, 5 µCi [ $\gamma^{32}$ P] ATP and 5 µg histone H1 as a substrate for 15 min at 30 °C. Reactions were stopped with Laemmli buffer and analysed by SDS-gel electrophoresis and autoradiography.

To determine phosphorylation of Cdc25 by MK5, HeLa cells were transfected with Flag-tagged MK5 constructs. MK5 was immunoprecipitated with M2-agarose beads washed three times with buffer A and two times with kinase assay buffer. 1µg of recombinant GST-Cdc25 was incubated with immunoprecipitated proteins at 30°C for 30 min in in the kinase assay buffer supplement with 200 µM ATP, 10 µCi [ $\gamma^{32}$ P] ATP. *In vitro* kinase assays using recombinant MK5 and Cdc25 were carried out as described previously [22].

### 3.4.6 Flow Cytometry

Cells were trypsinized and fixed in ice-cold 70% ethanol overnight at -20 oC. Cells were then washed with PBS-0.5 mg/mL BSA and stained with anti-phospho

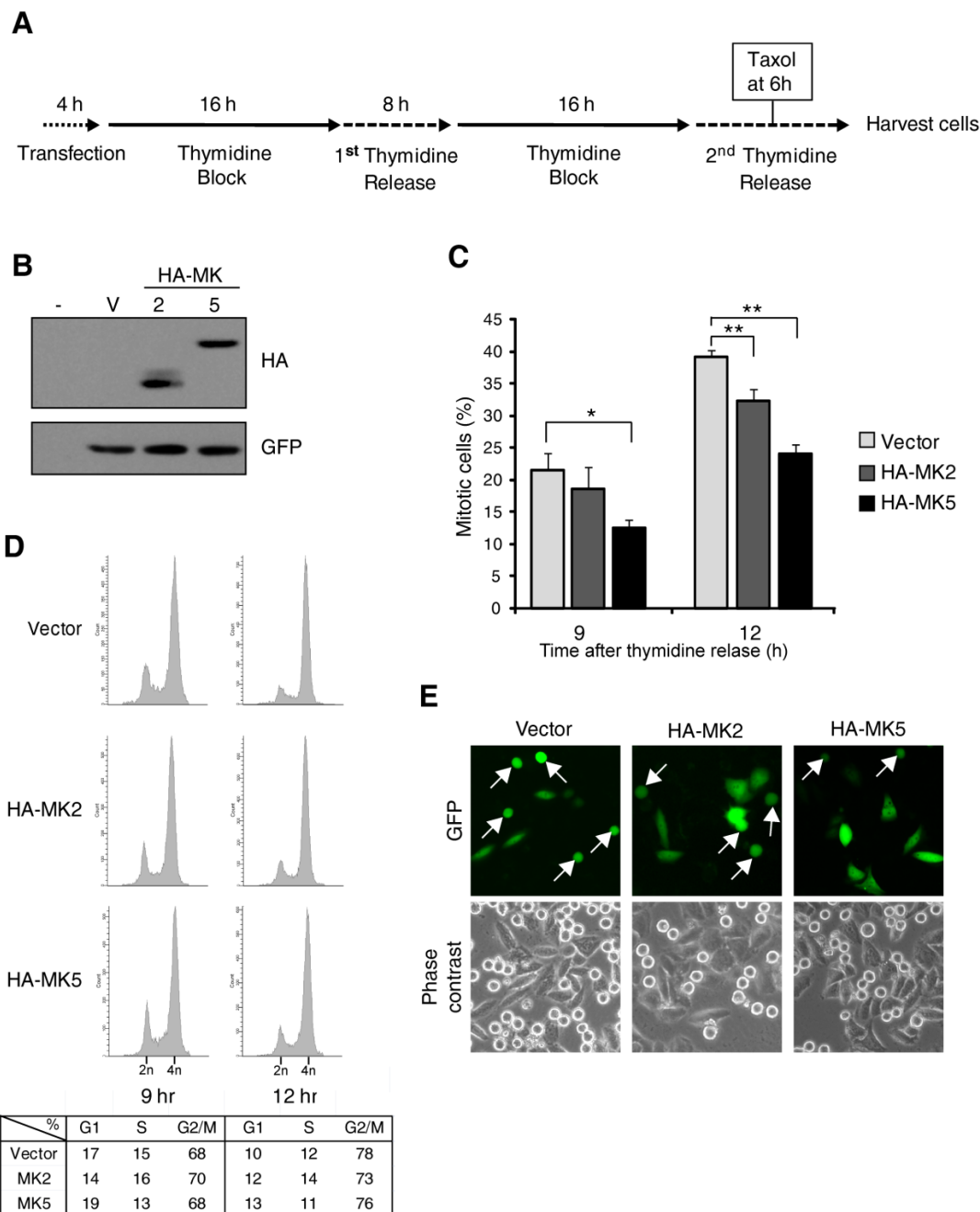
Histone H3(Ser10) antibody and Alexa-fluor 350 or Alexa-fluor 647. Cells were resuspended in staining solution containing 50 mg/mL propidium-iodide and 200 mg/mL RNase A. Cell cycle distribution and mitotic positivity were determined by analysing 104 events by FACS using a LSRII cytometer (Beckton Dickinson). Data were analysed using BD Diva software.

## 3.5 Results

### 3.5.1 Overexpression of MK5 delays mitotic entry

The checkpoint kinase MK2 control G2/M transition when cells are submitted to different DNA damaging agents [11-13]. However, it is not known whether other member of the MK family have such a function. In addition, its function in the timing of mitotic entry in the absence of stress is not completely elucidated. As a first step, we decided to compare the effect of gain of function of MK2 and MK5 during mitotic entry of a mammalian epithelial cell line in the absence of DNA damage (Figure 3.1A). HA-tagged MK2 or MK5 were expressed to similar levels in HeLa cells, as demonstrated by immunoblotting with anti-HA antibody (Figure 3.1B). To analyse cell cycle profiles of MK-expressing cells, we co-transfected a GFP-Luciferase reporter plasmid to score transfected cells. This GFP-Luciferase inert fusion protein is large enough to not leach out of the cells during fixation protocol used for flow cytometry analysis [29]. We took advantage of the double thymidine block protocol depicted in Figure 3.1A to measure mitotic entry of a highly synchronized population of cells trapped in mitosis with the microtubule-stabilizing drug paclitaxel (1  $\mu$ M taxol). As shown in Figure 3.1C, measurement of the mitotic index (phosphorylated Histone H3 positivity) of the GFP-expressing cells by flow cytometry reveals that overexpression of MK2 only slightly inhibits mitotic entry. The inhibition was only significant at 12 h post release, when 20% less cells enter mitosis compared to control cells. On the other hand, we made the very interesting observation that MK5 is a more potent inhibitor of mitotic entry compared to MK2 in these conditions. In fact, 40% less of the cells enter mitosis at 9h and 12h after release from thymidine block as compared to control cells (Figure 3.1C). Examination of the DNA content by PI staining reveals the same cell cycle profiles for control and MK-expressing cells at 9h and 12h after release from the thymidine block (Figure 3.1D). The effect of MK5 on mitotic index was also visible by comparison of the amount of rounded GFP-positive cells by microscopy between MK5 and control cells (Figure 3.1E). These results suggest that the decrease of mitotic index observed following MK5 overexpression is due to a longer G2 phase and not a by-pass of the checkpoint leading to re-entry into

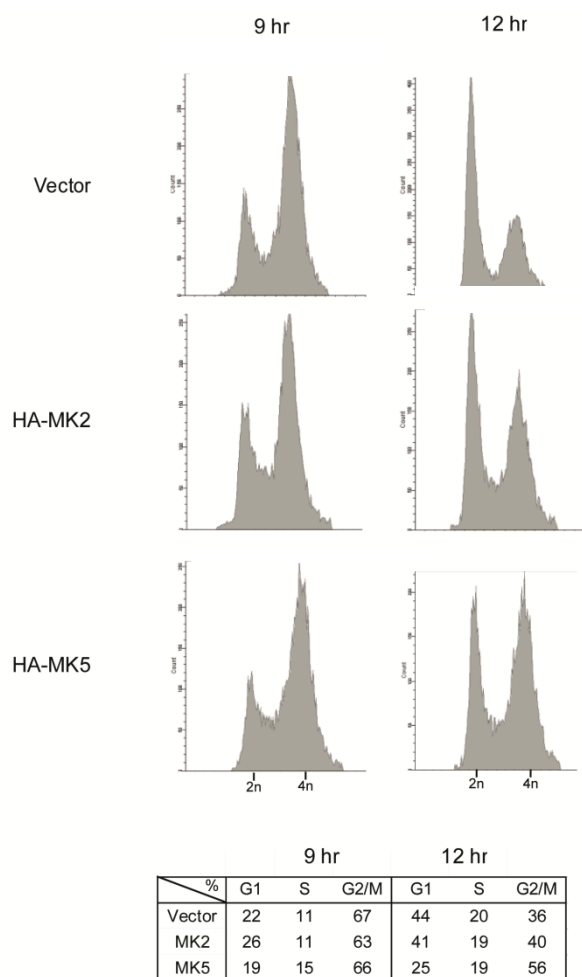




### Figure 3.1 Overexpression of MK5 delays mitotic entry in HeLa cells

**A)** Schematic representation of the protocol used to synchronize transfected HeLa cells. 6 h after the second release from thymidine block, 1  $\mu$ M taxol was added to the media to trap cells in mitosis. **B)** HeLa cells were co-transfected with HA-tagged MK2/5 and GFP-Luciferase. Expression of the proteins was verified by immunoblotting with anti-HA and anti-GFP antibodies. **C)** Cells were transfected with indicated constructs, synchronized as in A) and harvested at 9h and 12h after release. Mitotic index is expressed as the percentage of pHH3(ser10) positive cells in the GFP-expressing population of cells determined by flow cytometry. For each

experiment,  $10^4$  cells per time points were analyzed. The results are means  $\pm$  SEM of three independent experiments. \* $P < 0,05$  and \*\*  $P < 0,01$  compare to vector-expressing cells. **D)** Cell cycle profiles obtained by PI staining for  $10^4$  GFP positive events. Graphics are representatives of three independent experiments. **E)** Transfected cells were identified by visualisation of the GFP signal by fluorescence. Phase contrast microscopy is shown to distinguish the cell morphologies. The images were taken 11 h after release from the second thymidine block.



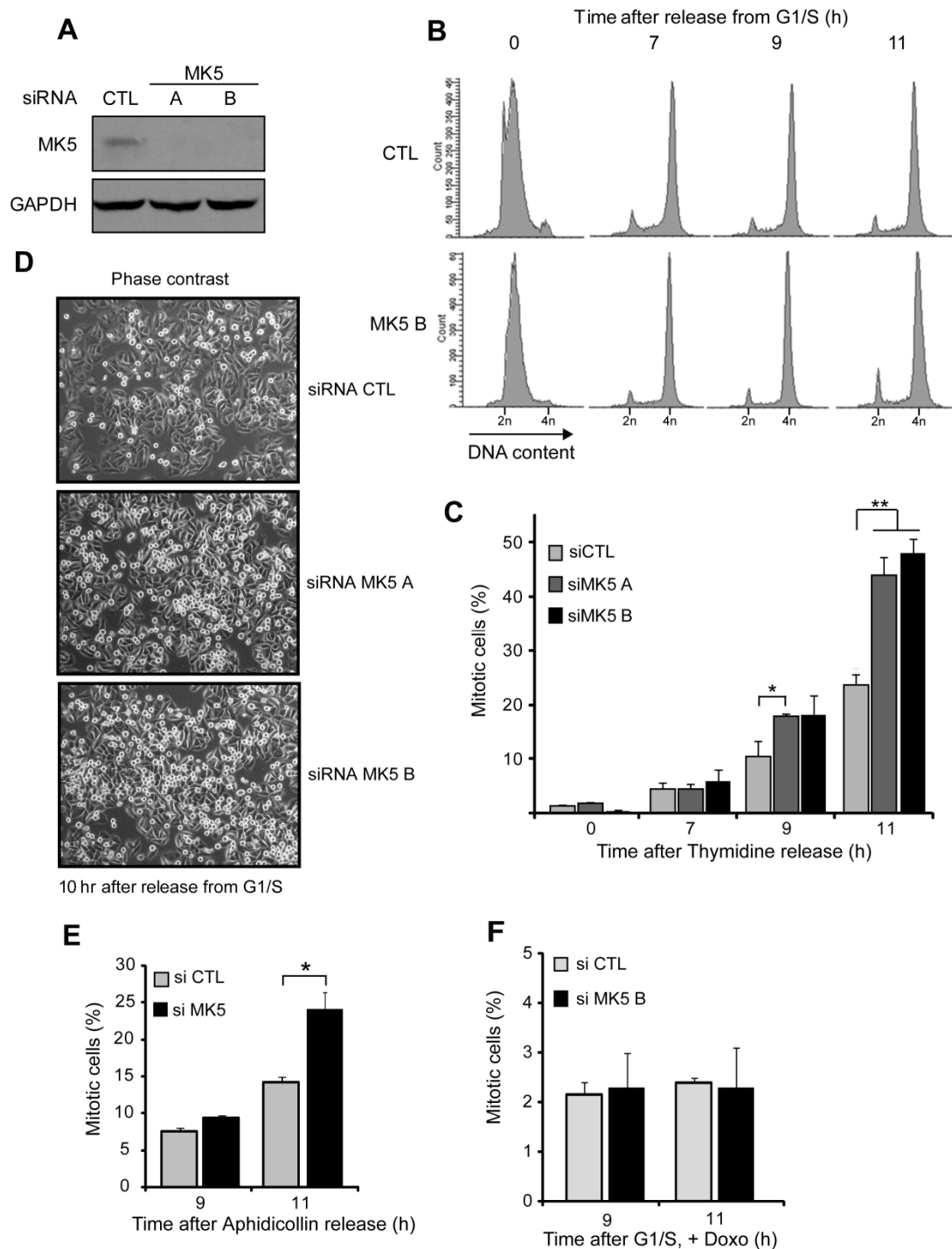
### Figure 3.S1 Expression of MK5 induces a partial G2/M block

Cells were transfected with indicated constructs, synchronized as in Figure 1A without addition of taxol and harvested at 9h and 12h after release. Cell cycle profiles of the GFP-expressing population of cells were determined by flow cytometry. For each experiment,  $10^4$  cells per time points were analyzed.

the next G1 phase nor a block in S phase. To ascertain that the addition of taxol has no effect on the kinetics of G2/M transition observed, we evaluated the entry of the synchronized transfected cells into the G1 phase. Cell cycle profiles of GFP-positives cells at 12h post release, reveals that 44% of the control cells are in G1 phase compared to 25% for the MK5-expressing cells (Figure Supplementary 3.S1). From all these results, we conclude that overexpression of MK5, and to a lesser extent MK2, results in delayed mitotic entry. We thus decided to further characterize the role of MK5 in the control of G2/M transition.

### **3.5.2 Mitotic entry after a replicative arrest is accelerated in absence of MK5**

To ascertain that the control of G2/M transition by MK5 was physiologically relevant, we decided to knock down endogenous MK5 expression and to evaluate the kinetics of entry into mitosis. To avoid the possibility of an off-target effect, we used two different siRNA targeting regions 1334-1354 (siRNA A) and 639-659 (siRNA B) of MK5 coding sequence. Transfection of the cells with both siRNA resulted in very efficient knock-down of endogenous MK5 protein as detected by Western blot (Figure 3.2A). We used the synchronization protocol described in Figure 1A to measure kinetics of mitotic entry after silencing MK5 expression. Under these experimental conditions, we did not observed any gross cell cycle distribution difference between control and MK5-depleted cells (Figure 3.2B, p.13). 7h after removal of thymidine from the media, the majority of the cells in both populations were already in G2 phase (Figure 3.2B and C). However, at 9h and 11h after release around two times more cells accumulate in mitosis when MK5 is knocked-down. This difference is also revealed by the detection of more rounded cells when MK5 is depleted (Figure 3.2D). MK5-depleted HeLa cells synchronized at the G1/S transition with aphidicolin, a specific inhibitor of DNA polymerase  $\alpha$ , also accumulates more rapidly in mitosis compared to control cells (Figure 3.2E, 14% for siCTL vs 24 % for siMK5 11hr post-release). The results presented above suggest that MK5 modulate the length of the G2 phase.



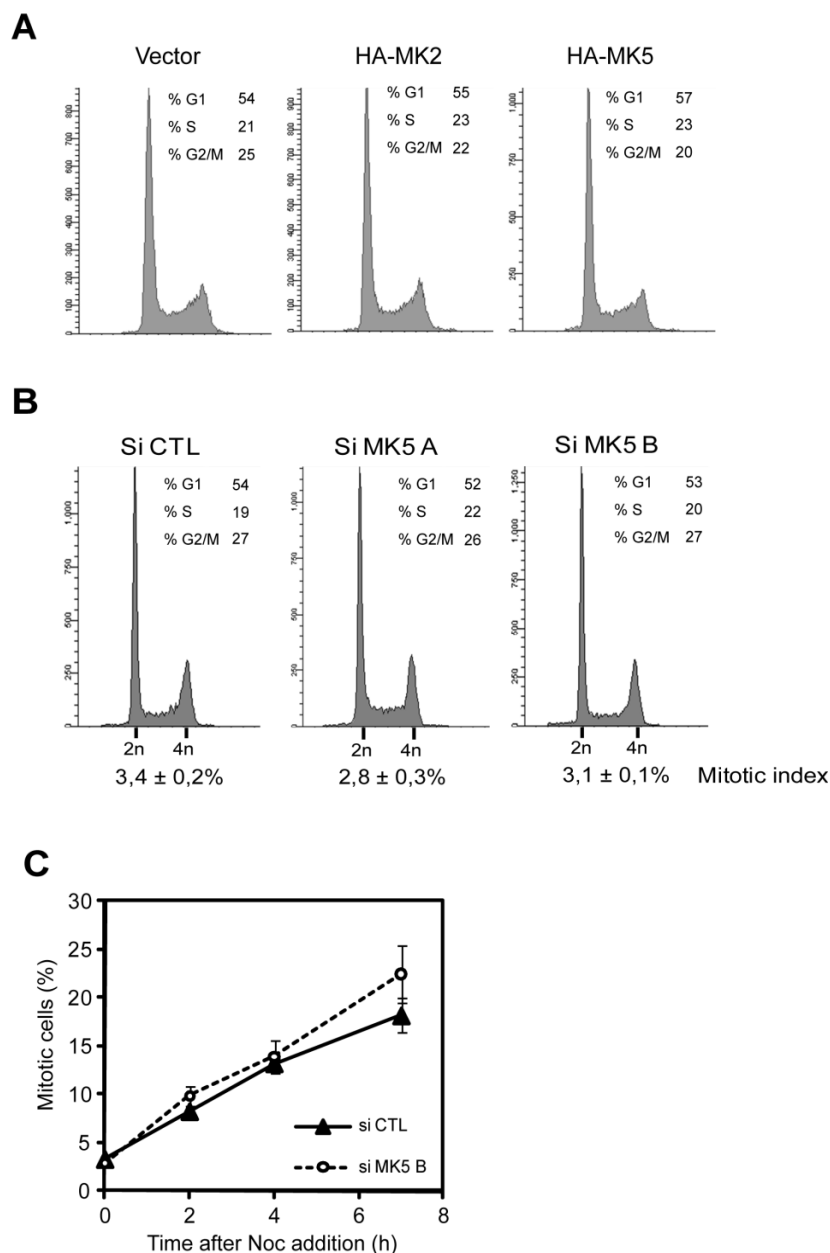
**Figure 3.2 Depletion of MK5 accelerates mitotic entry**

**A)** HeLa cells were transfected with a control siRNA (CTL) and two siRNA targeting MK5 (A and B). Cell extracts were prepared and analyzed by immunoblotting with anti-MK5 antibody to evaluate the efficacy of the knock-down. GAPDH immunoblot serves as a loading control. **B)** HeLa cells were transfected with the indicated siRNA and cells were synchronized by a double thymidine (2mM) block at the G1/S transition and trap in mitosis using the protocol described in Figure 1A. Cells were

collected at different time points and their DNA content was evaluated by flow cytometry after PI staining. A representative example of three independent experiments is shown. **C)** Kinetics of mitotic entry of HeLa cells transfected with control and two siRNA against MK5. Cells were harvested at the indicated time points. The percentage of pHH3(ser10) positive cells was evaluated by flow cytometry. The results are expressed as means  $\pm$  SEM of three experiments. \* $P < 0,05$  and \*\*  $P < 0,01$  compare to siCTL treated cells. **D)** Phase contrast images of HeLa cells transfected with the indicated siRNA and synchronized at G1/S transition. Cells were observed 10 h after release from thymidine block. **E)** Mitotic index is determined at indicated time, as in C), after aphidicolin synchronization (0,5 mg/mL) for 24 h. **F)** Cells were synchronized at the G1/S transition and 6 h after release they were treated with doxorubicin (1 $\mu$ M) for 1 h. Cells were then washed and mitotic entry was monitored at indicated time points. The results represent the means  $\pm$  SEM of three independent experiments.

We next wanted to verify if MK5 depletion can bypass a cell cycle arrest imposed by treatment of the cells in G2 for 1 h with 1 $\mu$ M doxorubicin. Interestingly, control and MK5-deficient populations have both a mitotic index of 2% 3h and 5h after addition of doxorubicin (Figure 3.2F).

Since the inhibition of mitotic entry by MK5 described above was observed in synchronised cells, we wanted to verify the distribution of the cell cycle phases in exponentially proliferating cells after transfection of ectopic MK5. When overexpressed in HeLa cells for 48 h or 72 h, MK5 and MK2 do not change the distribution of the cells in the phases (Figure 3.3A and data not shown). Surprisingly, MK5 expression does not allow accumulation of the cells in G2/M phase. In agreement with these results, loss of function of MK5 does not affect cell cycle profiles of the proliferating cells compared to the control populations (Figure 3.3B). We then directly tested the role of MK5 in the control of G2/M transition in the absence of any cellular stress by measuring the kinetics of accumulation of mitotic cells after addition of taxol. Under these conditions, there is virtually no effect of MK5 on the entry into mitosis (Fig. 3.3C). We conclude from these results, that MK5 inhibits mitotic entry solely after a replication arrest.



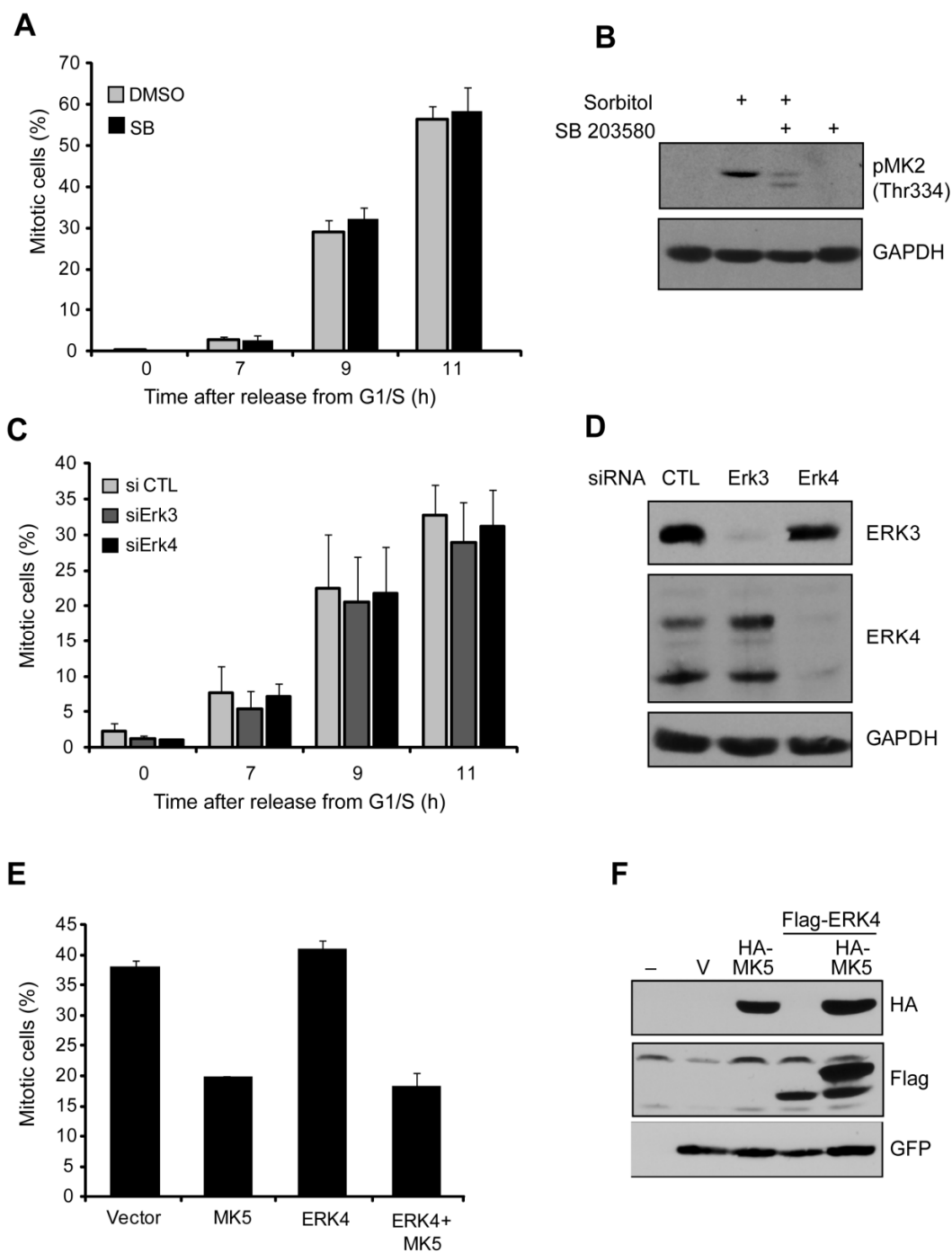
**Figure 3.3 MK5 does not regulate G2/M transition of proliferating cells**

**A)** HeLa cells were co-transfected with HA-tagged MK2 or MK5 and GFP-Luciferase. 48 h after transfection, cell cycle distribution of GFP positive cells was analyzed by flow cytometry after PI staining. **B)** Cell cycle profiles of exponentially growing HeLa cells transfected with the indicated siRNA was analysed by flow cytometry for PI content. Mitotic index represent the percentage of pHH3 (Ser10)-positive cells. Data for the mitotic index are expressed as means  $\pm$  SEM of three independent experiments. **C)** 48 hours after transfection of HeLa cells with indicated siRNA, mitotic accumulation was monitored at different time points by addition of taxol (1  $\mu$ M) to the medium.

### 3.5.3 p38- and ERK3/4-independent function of MK5 in mitotic entry

p38 is known to be a checkpoint component which activation following exposure to DNA-damaging agents leads to MK2 phosphorylation and inhibition of cell cycle progression [11, 30]. In addition, under certain conditions, p38 activates MK5 [14]. We thus verified if the inhibition of mitotic entry by MK5 depends on p38 catalytic activity. If so, inhibition of p38 with the specific pharmacological inhibitor SB230580 is expected to accelerate the kinetics of mitotic entry. We first performed analysis of MK2 phosphorylation to demonstrate that p38 activity increases as cells progress towards mitosis (Figure 3.S2). However, treatment of G1/S arrested cells with SB230580 does not affect entry into mitosis compared to DMSO-treated cells, indicating that in these conditions, p38 activity does not modulate the progression in mitosis (Figure 3.4A et B).

ERK3/4 are atypical MAP kinases involved in MK5 activation loop phosphorylation [16-19]. Interestingly, we recently demonstrated that ERK3 is hyperphosphorylated and stabilized during mitosis [26] We thus decided to explore the involvement of ERK3/4 in the control of the G2/M transition. We used siRNA directed against ERK3 and ERK4 coding sequences to efficiently knock-down their endogenous expression (Figure 3.4D). In the experimental conditions tested, it appears that depletion of ERK3 or ERK4 has no impact on mitotic entry (Figure 3.4C). To further characterize the role of ERK3/4 in the control of mitotic entry, we overexpressed Flag-ERK4 alone or in combination with MK5 and measure the mitotic index of synchronized cells 12 h after G1/S transition. In agreement with the loss of function experiment, Flag-ERK4 does not modify the percentage of mitotic cells and it does not enhance MK5-mediated mitotic delay (Figure 3.4E and F).

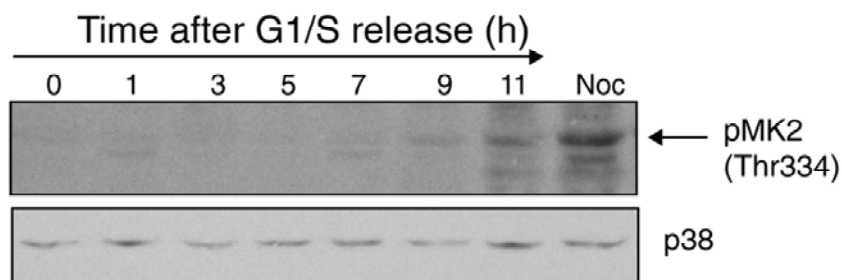


**Figure 3.4 p38 and Erk3/4 inactivation does not affect entry into mitosis**

**A)** HeLa cells were synchronized at the G1/S transition and released in presence of SB203580 (10 $\mu$ M). Mitotic index was measured by flow cytometry. **B)** Western Blot analysis of pThr344 of MK2 demonstrates SB203580 efficiency. **C)** siRNA against Erk3 and Erk4 were transfected and cells were synchronized by double thymidine block. Mitotic index was measured at indicated time points. **D)** Immunoblotting shows siRNA efficacy to decrease Erk3/4 expression. **E)** HeLa cells were transfected with indicated construct and synchronized at the G1/S transition. Mitotic index of GFP+



cells was measured 12h after release. **F)** Expression of the proteins was verified by immunoblotting with anti-HA, anti-Flag and anti-GFP antibodies. Data for the mitotic index are expressed as means  $\pm$  SEM of three independent experiments.

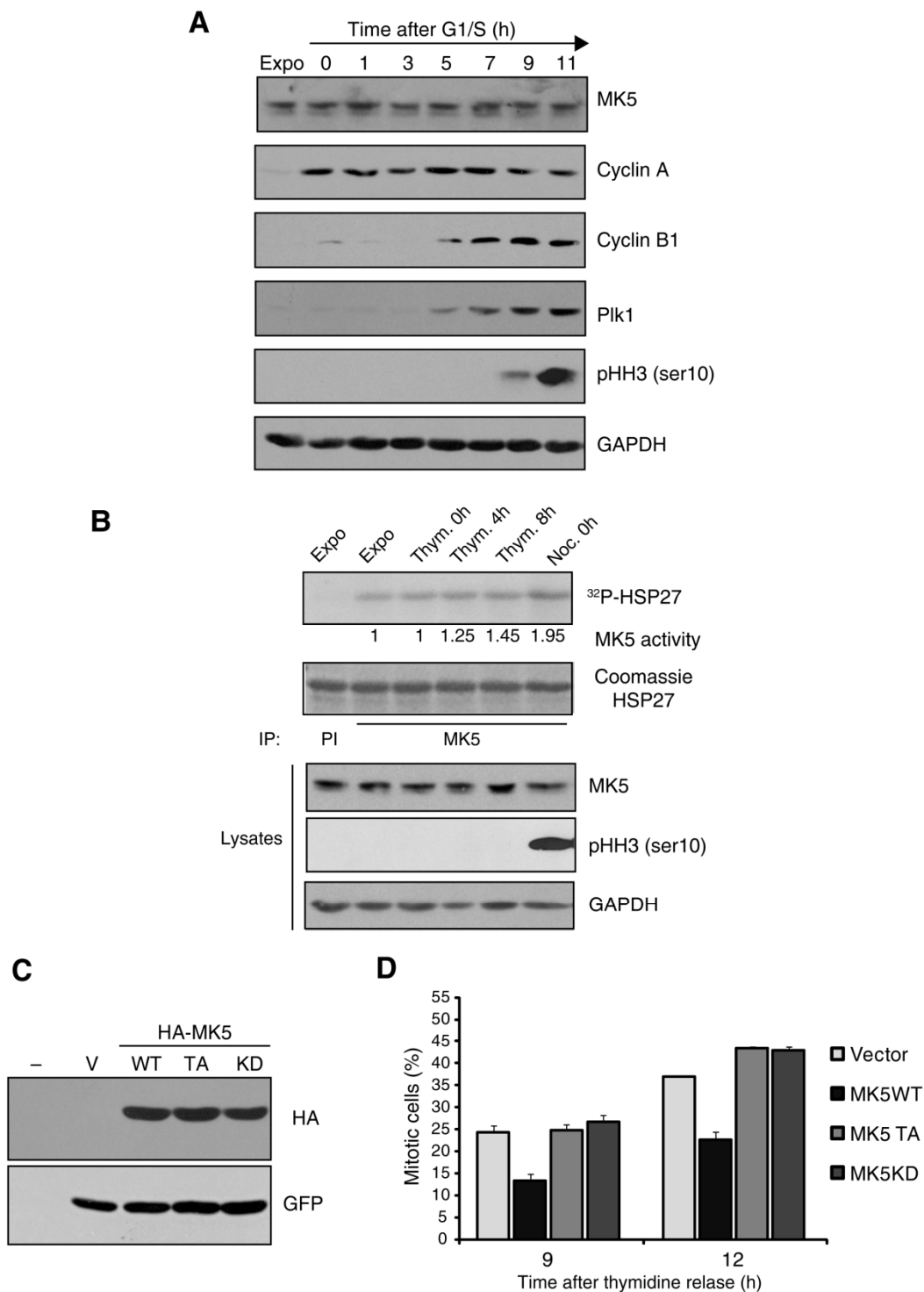


**Figure 3.S2 p38 activity is regulated in a cell cycle-dependent manner**

HeLa cells were synchronized at the G1/S transition by a double thymidine block and p38 activity was measured at the indicated time points by immunoblot analysis of pThr344 of MK2. p38 serves as a loading control.

### 3.5.4 MK5 kinase activity is required to inhibit mitotic entry

The results presented above prompted us to investigate the regulation of MK5 activity during the recovery from replication arrest. As a first step, we analyzed the expression levels of MK5 from the G1/S-arrested state to the G2/M transition of HeLa cells. Whereas the expression of different mitotic regulators is modulated as cells progress to mitosis, endogenous expression of MK5 remains unchanged in the tested time course (Figure 3.5A). We next evaluated the enzymatic activity of MK5 as cells progress toward mitosis. Because there is no commercial antibody against the phosphorylated Thr182 of the activation loop available, we immunoprecipitated endogenous MK5 with polyclonal antibodies and assessed its activity in an *in vitro* kinase assay (Figure 3.5B). In the pre-immune immunoprecipitate, there is no phosphorylation of HSP27 detected confirming the specificity of the assay (Figure 3.5B). Interestingly, the activity of immunoprecipitated endogenous activity slightly increases as cells progress in mitosis. In nocodazole-arrested cells, MK5 activity is almost two fold higher than in G1/S-arrested cells (Figure 3.5B). These results suggested that catalytic activity of MK5 may be important to delay entry in mitosis.



**Figure 3.5 MK5 activity is necessary to inhibit mitotic entry**

**A)** Expression of MK5, cyclin A, cyclin B, Plk1, pHH3(Ser10) and GAPDH during progression from G1/S to mitosis was determined by immunoblotting. **B)** Endogenous MK5 was immunoprecipitated and its kinase activity was measured at indicated time

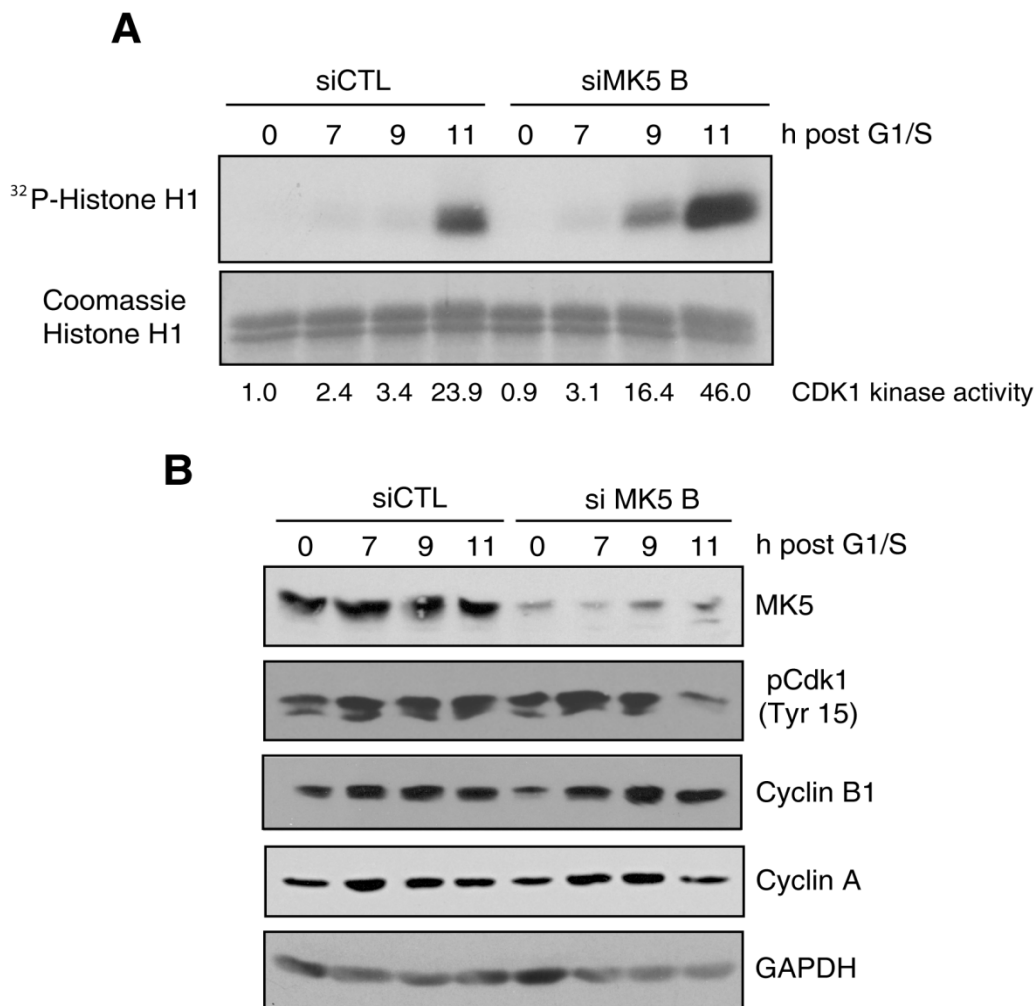
points after release from thymidine block or from exponential and nocodazole-arrested cells. Autoradiogram of phosphorylated HSP27 is shown. The expression of MK5, pHH3(Ser10) and GAPDH was determined by immunoblotting. Activity of MK5 from exponential cells was arbitrary defines as 1. **C)** HeLa cells were co-transfected with indicated HA-tagged MK5 constructs and GFP-Luciferase. Expression of the proteins was verified by immunoblotting with anti-HA and anti-GFP antibodies. **D)** Transfected HeLa cells were synchronized at G1/S transition and harvested at 9h and 12h after release. Mitotic index is expressed as the percentage of pHH3(ser10) positive cells in the GFP-expressing population determined by flow cytometry. For each experiment,  $10^4$  cells per time points were analyzed. The results are expressed as means  $\pm$  SEM of three independent experiments.

To directly assessed the role of MK5 kinase activity, we analyzed the ability to modulate mitotic entry of two different catalytically inactive mutants overexpressed to levels comparable to HA-MK5 WT (Figure 3.5C). Revealing the importance of the enzymatic activity of MK5 to delay G2/M transition, expression of HA-MK5 T182A (phosphorylation loop mutant) and HA-MK5KD (mutation of the Lys 51 of the subdomain II to Ala) results in mitotic index similar to control cells (Figure 3.5D). Together, these results confirmed that enzymatic activity of MK5 is required to modulate the G2/M transition.

### **3.5.5 MK5 modulates CDK1/cyclinB kinase activity**

Entry into mitosis is controlled by CDK1/cyclin B [2]. The results presented above suggested that CDK1 activity may be modulated by MK5. Thus, we analyzed the activity of endogenous CDK1 after depletion of MK5 by siRNA. *In vitro* phosphorylation of Histone H1 by immunoprecipitated CDK1-cyclin B revealed that MK5 inhibits CDK1. In fact, activity of CDK1 is already detectable at 9 h and is increased by two fold at 11 h post-release in MK5-depleted cells compared to control cells (Figure 3.6A). In parallel, we monitored the status of the inhibitory phosphorylation site Tyr15 of CDK1 by immunoblotting. Notably, at 11 h the phospho-specific signal almost completely disappeared in cells depleted for MK5 whereas it persists in control cells (Figure 3.6B). These results, together with the

observation that recombinant MK5 does not perturb activity of CDK1/cyclin B *in vitro* (data not shown), suggested that MK5 indirectly inhibits CDK1/cyclin B.

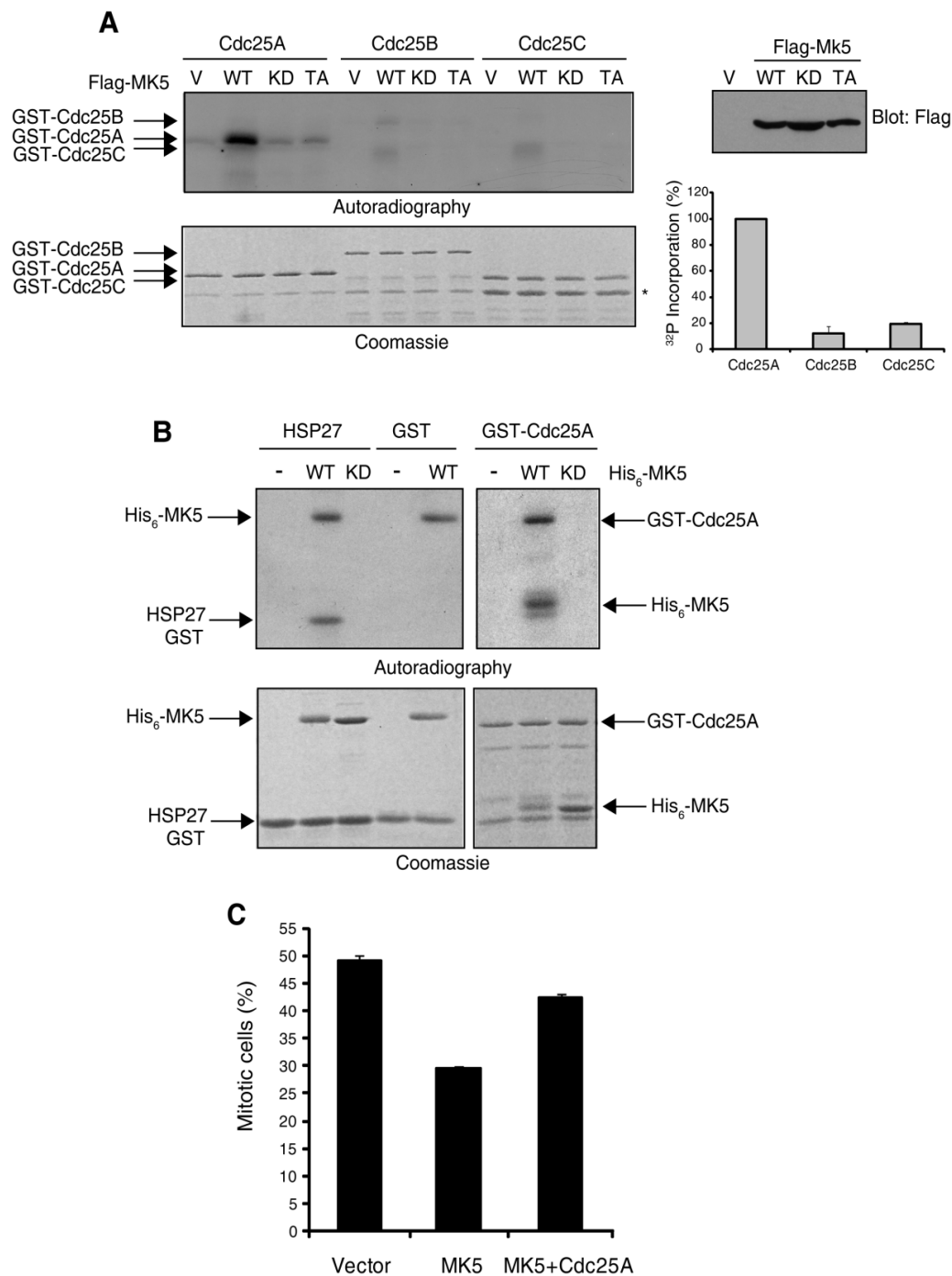


**Figure 3.6 MK5 inhibits CDK1/cyclin B1 activity**

**A)** HeLa cells were transfected with indicated siRNA and synchronized at the G1/S transition. Endogenous activity of CDK1/cyclin B1 complex was assessed at indicated time points after immunoprecipitation of cyclin B1. Kinase assays of Histone H1 were performed in presence of [ $\gamma^{32}$ P]-ATP. Autoradiogram and coomassie staining of Histone H1 are shown. The CDK1/activity of siCTL cells at 0 h post release was arbitrary defined as 1. **B)** Expression of indicated proteins was analyzed by immunoblotting.

### 3.5.6 Cdc25A rescue MK5-dependent G2 delay

Cdc25 phosphatases are key regulators of CDK activity during cell cycle progression. MK2 directly phosphorylates and regulates the activity of Cdc25 upon exposure of the cells to genotoxic stress [11, 12]. Because of the high degree of similarity between the kinase domain of MK2 and MK5 (48% identity) we hypothesized that MK5 might be able to phosphorylate Cdc25 [31]. To test this idea, Flag-MK5 WT or catalytically inactive mutants (T182A and KD) were immunoprecipitated from cells synchronized in G2 phase and incubated *in vitro* with recombinant GST-Cdc25A, B and C and <sup>32</sup>P-ATP. Although similar amount of Cdc25 proteins were incubated, Figure 3.7A clearly shows that Cdc25A is a better substrate of MK5 than Cdc25B or C. To further characterize the specificity of this phosphorylation, we performed reactions using recombinant His<sub>6</sub>-MK5. From these experiments, we conclude that Cdc25A is directly phosphorylated *in vitro* by MK5 (Figure 3B). Previous studies have shown that Cdc25A is a regulator of mitotic entry via activation of CDK1/cyclin B [32]. We tested the functional relation between MK5 and Cdc25A by measuring the mitotic index when both proteins are overexpressed in HeLa cells. Interestingly, whereas ectopic expression of MK5 inhibits mitotic entry, addition of Cdc25A counteracts the delay in G2 phase mediated by MK5 activity (Figure 3.7C). These results suggest that MK5 and Cdc25A have opposite functions in the control of mitotic entry.



**Figure 3.7 Cdc25A rescue MK5-dependant G2 delay**

**A)** HeLa cells were transfected with indicated Flag-MK5 constructs. Immunoprecipitated Flag-MK5 was incubated in presence of recombinant GST-Cdc25A, B and C and [ $\gamma^{32}$ P]-ATP in kinase buffer for 30 min at 30 °C. Autoradiogram and coomassie staining of Cdc25 are presented. \* Indicated non-specific band. Expression of MK5 constructs was detected by immunoblotting with Flag-antibody. Incorporation of  $^{32}$ P was quantified by densitometry, and Cdc25A was

arbitrary set to 100%. **B)** Recombinant His<sub>6</sub>-MK5 was incubated with HSP27, GST and GST-Cdc25A in presence of [ $\gamma^{32}$ P]-ATP in kinase buffer for 30 min at 30 °C. Autoradiogram and coomassie staining are shown. **C)** HeLa were transfected with indicated constructs and synchronized at the G1/S transition. Mitotic index of GFP+ cells was measured 12h after release. The results are expressed as means of two experiments.

### 3.6 Discussion

MK5 is a member of the family of MAP kinase-activated protein kinases which includes RSK, MNK, MSK and MK [33]. These kinases have a broad spectrum of biological functions in response to mitogens and/or stress stimuli. MAPKAP kinases are core components of the pathways involved in transduction of the signal dictated by the stimuli to the cell cycle machinery. For example, in response to mitogens stimulation, phosphorylation and activation of many transcriptional and translational factors by RSK contributes to the immediate-early gene response involved in G0/G1 transition and to cell cycle proliferation. At the opposite, MK2 mediates cell cycle arrest by at least two distinct mechanisms following exposure of the cells to various genotoxic stresses. In fact, MK2 activated by p38 was shown to phosphorylate and inactivate Cdc25 phosphatases and to stabilize Gadd45 $\alpha$  mRNA via hnRNPA0 phosphorylation and PARN inhibition in cancer cells [11-13]. Evidence in the literature argue that MK5 is an inhibitor of cell cycle progression in some circumstances. First, it was demonstrated that MK5 inhibits oncogenic ras-induced gene expression and cell proliferation in fibroblasts [20]. Next, MK5 was shown to be essential for ras-induced senescence and tumor suppression [21]. MK5 directly activates p53 by phosphorylation of its Ser37.

In the present study, we further link MK5 with cell cycle inhibition by demonstrating that it delays initiation of mitosis entry in specific conditions. Several lines of evidence support this notion. First, ectopic expression of MK5 results in a decrease of mitotic index and in accumulation of G2/M population when cells recovered from inhibition of replication. Importantly, in the experimental conditions used in the present study we observed that the inhibitory effect of MK5 is more important than that of MK2. Second, loss-of-function experiments of MK5 results in

acceleration of the mitotic entry following an arrest of proliferation imposed by thymidine or aphidicolin treatments of the cells. Intriguingly, gain or loss of function of MK5 did not alter cell cycle distribution of cycling cells. From all these results, we conclude that MK5 delays mitotic entry after inhibition of the replication.

Yeasts have functional homologues of mammalian MKs, which possessed some structural characteristics found in the catalytic domain of the members of the CaMK family of kinases [31]. For example, expression of Rck1/2 proteins of *S. cerevisiae* restores resistance to radiation in checkpoint-deficient strains of *S. pombe* and increase the length of G2 phase in cycling cells [34]. The *S. pombe* Srk1 kinase, which is activated by p38 MAP kinase, blocks mitotic entry via phosphorylation and inhibition of Cdc25 phosphatases [35]. Srk1 is activated in G2 phase of each cell cycle and is part of a checkpoint activated in response to nongenotoxic stress (such as osmotic stress). Srk1 is not involved in Cdc25 regulation upon replication arrest or DNA damage. In light of all these studies of MKs in the control of cell progression in yeast and mammalian cells, it appears that MK get activated and control initiation of mitosis in very particular situation.

Herein, we show that silencing of MK5 expression increases the enzymatic activity of CDK1/cyclin B. This increase of activity is also reflected by a more rapid dephosphorylation of the Tyr15 of CDK1. Two different catalytically inactive mutants of MK5 have no impact on the kinetics of mitotic entry. This indicates that MK5 might phosphorylate one or more key regulators of CDK1/cyclin B activity to inhibit initiation of mitosis. We made the interesting observation that MK5 phosphorylates Cdc25A very efficiently *in vitro*, compared to Cdc25B and C. In addition, ectopic expression of this phosphatase reverses the delay of entry in mitosis generated by MK5. This suggests that MK5 and Cdc25A have antagonistic functions. From these results, we speculate that the increase of the length of the G2 phase provoked by the activity of MK5 is mediated by Cdc25A phosphorylation. However, we cannot rule out the possibility that MK5 controlled the activity of a regulator of Cdc25A. The first studies on Cdc25A revealed that it activates CDK2/cyclin E complex which in turn stimulates Cdc25A phosphatase activity to promote G1/S



transition [36, 37]. Mounting evidence suggests that it is also involved in the control of the G2/M transition. Cdc25A is degraded by the proteasome in response to inhibition of replication, a mechanism suggested to preventing premature entry into mitosis [38]. In Chk1-deficient cells, the defective IR-induced S and G2 checkpoints can be restored by interfering with the accumulation of Cdc25A [39]. Recently, an important study demonstrates the relative importance of each Cdc25 phosphatases in the initiation of mitosis. From these results, it was proposed that Cdc25B plays a unique role as the initial activator of CDK1 at the centrosome, that Cdc25A functions in chromatin condensation and activation of CDK1 in the nucleus and that Cdc25C on its own cannot induce mitosis [32, 40].

The activity of Cdc25A is predominantly regulated by control of its stability. Expression of Cdc25A increases from S phase to mitosis in unperturbed cell cycle progression, and it is ubiquitinated by the APC<sup>Cdh1</sup> at mitosis exit [41]. When cells are exposed to inhibitor of DNA replication or DNA-damaging agents, Cdc25A is rapidly ubiquitinated by SCF <sup>$\beta$ -TRCP</sup> [38, 42]. Ubiquitination of Cdc25A is controlled by phosphorylation by various kinases. In mitosis, phosphorylation by CDK1/cyclin B of Ser18 and Ser116 stabilized Cdc25A to create an autoamplification loop [43]. In response to various cellular stresses, Chk1/2 phosphorylates Ser76 to promote Cdc25A degradation [44]. MK2 directly phosphorylates Cdc25A and controls its stability in response to camptothecin treatment [12]. Phosphorylation of Cdc25A on Ser 178 and Thr 507 by Chk1 facilitates Cdc25A binding to 14-3-3 [45]. Interaction with 14-3-3 sequesters Cdc25A in the cytoplasm and prevents its association with nuclear CDK1. Recently, a novel mechanism of Cdc25A control by Cdc14A was proposed to control the timing of entry into mitosis [46]. The data suggested that Cdc14A dephosphorylates an unknown protein to inhibit Cdc25A activity. Additional work is required to understand the exact mechanistic interaction between MK5 and Cdc25 A phosphatase.

The activation of MK5 by p38 is still very controversial [47]. In the present study, we show that pharmacological inhibition of p38 do not accelerate the initiation of mitotic entry. This result suggests that p38 is probably not the kinase responsible

for MK5 activity in the control of G2 length. This is in agreement with a previous study showing that pharmacological inhibition of p38 with SB203580 and LiLy p38 inhibitor have no effect on cell cycle progression in HeLa cells [48]. However, inhibition of p38 in HCT116 cells accelerates the timing of mitotic entry [49]. Clearly, more studies are required to fully understand the cell type specificity of p38 activity in the initiation of mitosis. On the other hand, it was shown that silencing of ERK3 and ERK4 expression impaired MK5 kinase activity [18, 19]. Surprisingly, ERK3 and ERK4 loss-of function or ERK4 ectopic expression do not modulates mitotic entry of synchronized cells. Additional work is needed to decipher the upstream mechanism of MK5 activation in the control of mitotic entry.

### 3.7 Acknowledgments

We thank Drs Philippe Coulombe and Paul Déléris for helpful discussions and Dani  le Gagné for technical assistance with FACS experiments. P.L. Tanguay is recipient of a studentship from the Canadian Institutes for Health Research (CIHR) and Faculté des   tudes Supérieures de l'Université de Montréal. This work was supported by a grant to S. Meloche from the CIHR. S. Meloche holds the Canada Research Chair in Cellular Signaling.

### 3.8 References

1. **Harper, J.W., and Elledge, S.J.** (2007). The DNA damage response: ten years after. *Mol Cell* **28**, 739-745.
2. **Lindqvist, A., Rodriguez-Bravo, V., and Medema, R.H.** (2009). The decision to enter mitosis: feedback and redundancy in the mitotic entry network. *J Cell Biol* **185**, 193-202.
3. **Morgan, D.O.** (1997). Cyclin-dependent kinases: engines, clocks, and microprocessors. *Annu Rev Cell Dev Biol* **13**, 261-291.
4. **Tassan, J.P., Schultz, S.J., Bartek, J., and Nigg, E.A.** (1994). Cell cycle analysis of the activity, subcellular localization, and subunit composition of human CAK (CDK-activating kinase). *J Cell Biol* **127**, 467-478.
5. **Russell, P., and Nurse, P.** (1987). Negative regulation of mitosis by *wee1+*, a gene encoding a protein kinase homolog. *Cell* **49**, 559-567.
6. **Mueller, P.R., Coleman, T.R., Kumagai, A., and Dunphy, W.G.** (1995). Myt1: a membrane-associated inhibitory kinase that phosphorylates Cdc2 on both threonine-14 and tyrosine-15. *Science* **270**, 86-90.

7. **Liu, F., Stanton, J.J., Wu, Z., and Piwnica-Worms, H.** (1997). The human Myt1 kinase preferentially phosphorylates Cdc2 on threonine 14 and localizes to the endoplasmic reticulum and Golgi complex. *Mol Cell Biol* **17**, 571-583.
8. **Gould, K.L., and Nurse, P.** (1989). Tyrosine phosphorylation of the fission yeast *cdc2+* protein kinase regulates entry into mitosis. *Nature* **342**, 39-45.
9. **Boutros, R., Dozier, C., and Ducommun, B.** (2006). The when and wheres of CDC25 phosphatases. *Curr Opin Cell Biol* **18**, 185-191.
10. **Reinhardt, H.C., and Yaffe, M.B.** (2009). Kinases that control the cell cycle in response to DNA damage: Chk1, Chk2, and MK2. *Curr Opin Cell Biol* **21**, 245-255.
11. **Manke, I.A., Nguyen, A., Lim, D., Stewart, M.Q., Elia, A.E., and Yaffe, M.B.** (2005). MAPKAP kinase-2 is a cell cycle checkpoint kinase that regulates the G2/M transition and S phase progression in response to UV irradiation. *Mol Cell* **17**, 37-48.
12. **Reinhardt, H.C., Aslanian, A.S., Lees, J.A., and Yaffe, M.B.** (2007). p53-deficient cells rely on ATM- and ATR-mediated checkpoint signaling through the p38MAPK/MK2 pathway for survival after DNA damage. *Cancer Cell* **11**, 175-189.
13. **Reinhardt, H.C., Hasskamp, P., Schmedding, I., Morandell, S., van Vugt, M.A., Wang, X., Linding, R., Ong, S.E., Weaver, D., Carr, S.A., et al.** (2010). DNA damage activates a spatially distinct late cytoplasmic cell-cycle checkpoint network controlled by MK2-mediated RNA stabilization. *Mol Cell* **40**, 34-49.
14. **New, L., Jiang, Y., Zhao, M., Liu, K., Zhu, W., Flood, L.J., Kato, Y., Parry, G.C., and Han, J.** (1998). PRAK, a novel protein kinase regulated by the p38 MAP kinase. *EMBO J* **17**, 3372-3384.
15. **Ni, H., Wang, X.S., Diener, K., and Yao, Z.** (1998). MAPKAPK5, a novel mitogen-activated protein kinase (MAPK)-activated protein kinase, is a substrate of the extracellular-regulated kinase (ERK) and p38 kinase. *Biochem Biophys Res Commun* **243**, 492-496.
16. **Kant, S., Schumacher, S., Singh, M.K., Kispert, A., Kotlyarov, A., and Gaestel, M.** (2006). Characterization of the atypical MAPK ERK4 and its activation of the MAPK-activated protein kinase MK5. *J Biol Chem* **281**, 35511-35519.
17. **Schumacher, S., Laass, K., Kant, S., Shi, Y., Visel, A., Gruber, A.D., Kotlyarov, A., and Gaestel, M.** (2004). Scaffolding by ERK3 regulates MK5 in development. *EMBO J* **23**, 4770-4779.
18. **Aberg, E., Perander, M., Johansen, B., Julien, C., Meloche, S., Keyse, S.M., and Seternes, O.M.** (2006). Regulation of MAPK-activated protein kinase 5 activity and subcellular localization by the atypical MAPK ERK4/MAPK4. *J Biol Chem* **281**, 35499-35510.
19. **Seternes, O.M., Mikalsen, T., Johansen, B., Michaelsen, E., Armstrong, C.G., Morrice, N.A., Turgeon, B., Meloche, S., Moens, U., and Keyse, S.M.** (2004). Activation of MK5/PRAK by the atypical MAP kinase ERK3 defines a novel signal transduction pathway. *EMBO J* **23**, 4780-4791.

20. **Chen, G., Hitomi, M., Han, J., and Stacey, D.W.** (2000). The p38 pathway provides negative feedback for Ras proliferative signaling. *J Biol Chem* **275**, 38973-38980.
21. **Sun, P., Yoshizuka, N., New, L., Moser, B.A., Li, Y., Liao, R., Xie, C., Chen, J., Deng, Q., Yamout, M., et al.** (2007). PRAK is essential for ras-induced senescence and tumor suppression. *Cell* **128**, 295-308.
22. **Deleris, P., Rousseau, J., Coulombe, P., Rodier, G., Tanguay, P.L., and Meloche, S.** (2008). Activation loop phosphorylation of the atypical MAP kinases ERK3 and ERK4 is required for binding, activation and cytoplasmic relocalization of MK5. *J Cell Physiol* **217**, 778-788.
23. **Coulombe, P., Rodier, G., Pelletier, S., Pellerin, J., and Meloche, S.** (2003). Rapid turnover of extracellular signal-regulated kinase 3 by the ubiquitin-proteasome pathway defines a novel paradigm of mitogen-activated protein kinase regulation during cellular differentiation. *Mol Cell Biol* **23**, 4542-4558.
24. **Savitsky, P.A., and Finkel, T.** (2002). Redox regulation of Cdc25C. *J Biol Chem* **277**, 20535-20540.
25. **Rodier, G., Coulombe, P., Tanguay, P.L., Boutonnet, C., and Meloche, S.** (2008). Phosphorylation of Skp2 regulated by CDK2 and Cdc14B protects it from degradation by APC(Cdh1) in G1 phase. *EMBO J* **27**, 679-691.
26. **Tanguay, P.L., Rodier, G., and Meloche, S.** (2010). C-terminal domain phosphorylation of ERK3 controlled by Cdk1 and Cdc14 regulates its stability in mitosis. *Biochem J* **428**, 103-111.
27. **Coulombe, P., and Meloche, S.** (2002). Dual-tag prokaryotic vectors for enhanced expression of full-length recombinant proteins. *Anal Biochem* **310**, 219-222.
28. **Servant, M.J., Coulombe, P., Turgeon, B., and Meloche, S.** (2000). Differential regulation of p27(Kip1) expression by mitogenic and hypertrophic factors: Involvement of transcriptional and posttranscriptional mechanisms. *J Cell Biol* **148**, 543-556.
29. **Kalejta, R.F., Shenk, T., and Beavis, A.J.** (1997). Use of a membrane-localized green fluorescent protein allows simultaneous identification of transfected cells and cell cycle analysis by flow cytometry. *Cytometry* **29**, 286-291.
30. **Bulavin, D.V., Higashimoto, Y., Popoff, I.J., Gaarde, W.A., Basrur, V., Potapova, O., Appella, E., and Fornace, A.J., Jr.** (2001). Initiation of a G2/M checkpoint after ultraviolet radiation requires p38 kinase. *Nature* **411**, 102-107.
31. **Gaestel, M.** (2006). MAPKAP kinases - MKs - two's company, three's a crowd. *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**, 120-130.
32. **Lindqvist, A., Kallstrom, H., Lundgren, A., Barsoum, E., and Rosenthal, C.K.** (2005). Cdc25B cooperates with Cdc25A to induce mitosis but has a unique role in activating cyclin B1-Cdk1 at the centrosome. *J Cell Biol* **171**, 35-45.

33. **Roux, P.P., and Blenis, J.** (2004). ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions. *Microbiol Mol Biol Rev* **68**, 320-344.
34. **Dahlkvist, A., Kanter-Smoler, G., and Sunnerhagen, P.** (1995). The RCK1 and RCK2 protein kinase genes from *Saccharomyces cerevisiae* suppress cell cycle checkpoint mutations in *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Gen Genet* **246**, 316-326.
35. **Lopez-Aviles, S., Grande, M., Gonzalez, M., Helgesen, A.L., Alemany, V., Sanchez-Piris, M., Bachs, O., Millar, J.B., and Aligue, R.** (2005). Inactivation of the Cdc25 phosphatase by the stress-activated Srk1 kinase in fission yeast. *Mol Cell* **17**, 49-59.
36. **Jinno, S., Suto, K., Nagata, A., Igarashi, M., Kanaoka, Y., Nojima, H., and Okayama, H.** (1994). Cdc25A is a novel phosphatase functioning early in the cell cycle. *EMBO J* **13**, 1549-1556.
37. **Hoffmann, I., Draetta, G., and Karsenti, E.** (1994). Activation of the phosphatase activity of human cdc25A by a cdk2-cyclin E dependent phosphorylation at the G1/S transition. *EMBO J* **13**, 4302-4310.
38. **Molinari, M., Mercurio, C., Dominguez, J., Goubin, F., and Draetta, G.F.** (2000). Human Cdc25 A inactivation in response to S phase inhibition and its role in preventing premature mitosis. *EMBO Rep* **1**, 71-79.
39. **Zhao, H., Watkins, J.L., and Piwnica-Worms, H.** (2002). Disruption of the checkpoint kinase 1/cell division cycle 25A pathway abrogates ionizing radiation-induced S and G2 checkpoints. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 14795-14800.
40. **Boutros, R., Lobjois, V., and Ducommun, B.** (2007). CDC25 phosphatases in cancer cells: key players? Good targets? *Nat Rev Cancer* **7**, 495-507.
41. **Donzelli, M., Squatrito, M., Ganoth, D., Hershko, A., Pagano, M., and Draetta, G.F.** (2002). Dual mode of degradation of Cdc25 A phosphatase. *EMBO J* **21**, 4875-4884.
42. **Busino, L., Donzelli, M., Chiesa, M., Guardavaccaro, D., Ganoth, D., Dorrello, N.V., Hershko, A., Pagano, M., and Draetta, G.F.** (2003). Degradation of Cdc25A by beta-TrCP during S phase and in response to DNA damage. *Nature* **426**, 87-91.
43. **Mailand, N., Podtelejnikov, A.V., Groth, A., Mann, M., Bartek, J., and Lukas, J.** (2002). Regulation of G(2)/M events by Cdc25A through phosphorylation-dependent modulation of its stability. *EMBO J* **21**, 5911-5920.
44. **Xiao, Z., Chen, Z., Gunasekera, A.H., Sowin, T.J., Rosenberg, S.H., Fesik, S., and Zhang, H.** (2003). Chk1 mediates S and G2 arrests through Cdc25A degradation in response to DNA-damaging agents. *J Biol Chem* **278**, 21767-21773.
45. **Chen, M.S., Ryan, C.E., and Piwnica-Worms, H.** (2003). Chk1 kinase negatively regulates mitotic function of Cdc25A phosphatase through 14-3-3 binding. *Mol Cell Biol* **23**, 7488-7497.

46. **Vazquez-Novelle, M.D., Mailand, N., Ovejero, S., Bueno, A., and Sacristan, M.P.** (2010). Human Cdc14A phosphatase modulates the G2/M transition through Cdc25A and Cdc25B. *J Biol Chem*.
47. **Shiryaev, A., and Moens, U.** (2010). Mitogen-activated protein kinase p38 and MK2, MK3 and MK5: menage a trois or menage a quatre? *Cell Signal* **22**, 1185-1192.
48. **Fan, L., Yang, X., Du, J., Marshall, M., Blanchard, K., and Ye, X.** (2005). A novel role of p38 alpha MAPK in mitotic progression independent of its kinase activity. *Cell Cycle* **4**, 1616-1624.
49. **Cha, H., Wang, X., Li, H., and Fornace, A.J., Jr.** (2007). A functional role for p38 MAPK in modulating mitotic transit in the absence of stress. *J Biol Chem* **282**, 22984-22992.

## **CHAPITRE 4**

### **DISCUSSION**

## 4.1 La Régulation de ERK3

### 4.1.1 L'étude de ERK3

La protéine ERK3 est un membre de la famille des MAP kinases. Le gène a été identifié par homologie de séquence à *Erk1*, en 1991, en même temps que *Erk2* [422]. Cependant, depuis ce temps, les travaux sur ERK3 ne se sont pas effectués au même rythme que ceux sur ERK1/2. À la mi-décembre 2010, on comptait 64 titres sur le site internet de Pubmed en effectuant une recherche « ERK3 » comparativement à 13 097 pour une recherche « ERK1 and/or ERK2 ». La recherche sur ERK1/2 a pris une très grande avance sur celle de ERK3 pour différentes raisons. Premièrement, très rapidement, il a été démontré que ERK1/2 sont phosphorylées et activées en réponse à des facteurs mitogéniques. La connaissance des stimuli qui favorisent l'activité d'une kinase facilite énormément son étude, puisqu'il est ainsi possible de tester son rôle dans les conditions identifiées. Deuxièmement, ERK1/2 phosphorylent fortement plusieurs substrats différents *in vitro* (ex. : Histone H1 et MBP), ce qui a permis de bien caractériser leur régulation et leur mécanisme d'activité enzymatique. Ces observations ont largement contribué à établir les rôles cruciaux de ERK1/2 dans la transduction des signaux provenant de l'extérieur vers l'intérieur de la cellule afin de générer une panoplie de réponses cellulaires (contrôle de la prolifération, migration, différenciation, etc.) [415, 416]. Par contre, l'étude des fonctions et de la régulation de ERK3 souffre grandement de la méconnaissance des stimuli qui augmentent son activité kinase et de l'absence de substrats phosphorylés par celle-ci. Une autre raison qui peut expliquer le peu de connaissances sur ERK3 à ce jour, est le fait que les premières études aient été réalisées en utilisant un ADNc erroné. Suite à son identification, le groupe de M. Cobb, qui a contribué à cloner le gène, travaillait avec un ADNc codant pour une protéine de 546 aa [650, 651]. Or, nous savons aujourd'hui que le gène *Mapk6* code pour une protéine de 721 aa [582, 583]. Lorsqu'il existe de la confusion sur la séquence exacte d'une protéine, il est compréhensible que l'étude de celle-ci soit compromise.



#### 4.1.2 ERK3, une kinase associée à la différenciation et la prolifération cellulaire

Encore aujourd'hui, on connaît très peu de processus cellulaires impliquant ERK3. Cependant, plusieurs évidences l'associent au contrôle de la prolifération et de la différenciation cellulaire. Tout d'abord, les niveaux d'ARNm et de la protéine sont augmentés dans des conditions qui provoquent l'arrêt de la prolifération cellulaire ou la différenciation (Chapitre 1, Sections 1.6.1.2 et 1.6.1.4). Ensuite, Philippe Coulombe, un ancien étudiant au doctorat dans le laboratoire du Dr Meloche, a démontré que ERK3 est une protéine dont la demi-vie est très courte (environ 30 min) et est constitutivement dégradée par le système ubiquitine-protéasome dans des cellules en prolifération [591]. Il a remarqué que ERK3 est stabilisée lors de la différenciation de cellules PC12 et C2C12 en cellules neuronales et musculaires respectivement. La différenciation étant caractérisée par une sortie du cycle cellulaire et un arrêt de la prolifération, il a testé le rôle de ERK3 dans la progression dans le cycle. Ainsi, l'expression de ERK3 ectopique à un niveau bien plus élevé que le niveau endogène, obtenu en utilisant des chimères ERK1-ERK3 stables ou en ajoutant un épitope de grande taille au N-terminal de ERK3, ralentit l'entrée des cellules en phase S [591, 612]. Finalement, pendant que j'effectuais mes études doctorales, deux groupes ont rapporté des interactions entre ERK3 et la cycline D3, une sous-unité des complexes CDK4/6 et la phosphatase Cdc14A [613, 614].

Au Chapitre 2, nous décrivons pour la première fois un mécanisme de régulation de ERK3 qui opère de manière dépendante au cycle cellulaire. En effet, nous avons pu démontrer que l'état de phosphorylation de ERK3 varie au cours du cycle cellulaire, devenant hyper-phosphorylée spécifiquement lors de la mitose (Figure 2.1, p114). ERK3 avait été décrite pour être associée à la phase G1/S. La découverte d'une modification spécifiquement lors de la mitose était donc pour nous plutôt surprenante. Dans le but de caractériser l'impact de cette phosphorylation sur la régulation de ERK3, nous avons entrepris l'identification de(s) site(s) phosphorylé(s) en mitose. À ce moment, nous savions que ERK3 était phosphorylée sur la Ser 189 de sa boucle d'activation *in vivo*, un résidu important pour son activité catalytique. Nous avons également démontré que cette phosphorylation est importante pour

l'interaction avec MK5 (Annexe I). La Ser 386, un site à l'extérieur du domaine kinase, représente l'autre site de phosphorylation, mais dont la fonction demeure inconnue (Annexe I). Des analyses de migration sur gel de mutants non phosphorylables de ces deux sites et de différents mutants de délétion de l'extrémité C-terminale ont permis de conclure que la phosphorylation en mitose se produit sur l'extrémité C-terminale de la protéine (Figure 2.2, p.117). Nous avons tiré profit de la spectrométrie de masse afin d'identifier directement les résidus qui étaient phosphorylés spécifiquement par des extraits protéiques de cellules en mitose et non par des extraits protéiques de cellules en interphase. Cette étude a révélé que les Ser 189 et 386 sont phosphorylées dans chacune des conditions, tout comme la Ser 665, un site qui n'avait pas encore été identifié. Ces trois résidus ont également été observés pour être phosphorylés dans une étude à grande échelle visant à répertorier tous les sites phosphorylés sur toutes les protéines lors de la mitose [652]. Notre analyse par spectrométrie de masse a mené à l'identification des nouveaux sites de phosphorylation Ser684, Ser688, Thr698 et Ser705 spécifiques à la mitose (Figure 2.3, p. 119). Seule la Ser688 est située dans une séquence consensus parfaite des CDK (S/T-P-X-R/K), les trois autres résidus étant situés dans une séquence consensus minimale S/T-P seulement. *In vitro*, CDK1/cycline B phosphoryle ERK3 de type sauvage, mais pas un mutant de ces quatre sites et des inhibiteurs pharmacologiques de CDK1 inhibent la phosphorylation d'au moins un des sites, tel que démontré à l'aide de l'anticorps phospho-spécifique pThr698 (Figure 2.4 A et C, p.123). Ainsi, l'ensemble de ces résultats suggère fortement que ERK3 est un nouveau substrat physiologique de CDK1 lors de la mitose.

#### 4.1.3 Identifier les phospho-protéines en mitose

L'identification des protéines phosphorylées en mitose est un sujet qui intéresse les chercheurs depuis plusieurs années. De nombreux efforts sont déployés dans le but d'identifier tous les substrats de certaines kinases mitotiques dont CDK1/cycline B ou Plk1 [281, 653-655]. Bien qu'une estimation du nombre de substrats de CDK1 chez les mammifères ne soit pas encore tout à fait possible, chez la levure *S. cerevisiae* ce nombre est d'environ 500 sur un total de 6300 protéines, soit environ

8 % du protéome [653]. Une bonne connaissance des substrats des kinases permet de mieux comprendre comment elles exercent leurs fonctions. Une des premières approches à grande échelle utilisée pour identifier des protéines hyper-phosphorylées spécifiquement durant la mitose faisait appel à la traduction de pool de ADNc *in vitro* [656]. De cette façon, après avoir traduit 12 000 ADNc en présence de  $^{35}\text{S}$ , M. Kirschner et son équipe ont remarqué que seulement une minorité de protéines (ils en ont identifié une quinzaine) migraient plus lentement sur gel après avoir été phosphorylées par des extraits protéiques de cellules en mitose [657]. Suite à cette étude, ils ont également conclu que la majorité des protéines phosphorylées en mitose le sont sur plus d'un site et que certaines de celles-ci sont phosphorylées par plusieurs kinases.

Plus récemment, une autre étude à grande échelle dans les cellules de mammifères visant à découvrir des substrats spécifiques de CDK1/cycline B lors de la mitose a été décrite [654]. Dans cette étude originale, les chercheurs ont utilisé une variante de la « méthode Shokat » pour identifier plus de 70 protéines et sites phosphorylés. Pour appliquer cette méthode, les auteurs ont inséré des mutations dans le site de liaison de l'ATP de CDK1 afin que seule cette kinase modifiée puisse utiliser un analogue de l'ATP. Celui-ci possède un groupement phosphate « bio-orthogonal » qui est utilisé pour purifier et identifier par spectrométrie de masse les peptides phosphorylés. Cependant, dans cette étude, les auteurs ont pu constater que des centaines de protéines sont phosphorylées par CDK1/cycline B, mais que leur approche, pas suffisamment sensible, ne leur permettait que d'identifier des protéines très abondantes [654]. En accord avec la séquence dans laquelle se retrouvent les sites de ERK3 phosphorylés lors de la mitose, cette étude a révélé que 32 % des sites phosphorylés par CDK1 ne possèdent que la proline en position P+1 mais pas le résidu basique en position P+3 [654]. La phosphorylation de ERK3 par CDK1 représente donc un autre exemple pour lequel la proline en position P+1 est suffisante.

Une autre caractéristique des sites phosphorylés sur ERK3 lors de la mitose est le fait qu'ils sont regroupés à proximité les uns des autres. En accord avec cette

observation, l'analyse des sites de phosphorylation des substrats de CDK1 chez la levure révèle que ceux-ci sont fréquemment rapprochés dans la séquence primaire [653, 658]. C'est le cas notamment des protéines Cdc6p, Cdh1p, Orc6p et Pds1p pour n'en nommer que quelques-unes. Les raisons d'un tel regroupement ne sont pas parfaitement claires. Il est possible qu'une telle proximité de sites soit nécessaire pour l'atteinte d'un seuil critique de régulation des substrats ou pour contrôler des interactions protéines-protéines qui reposent sur la présence (lorsque CDK1 est active) ou l'absence (lorsque CDK1 est inactive) de régions chargées très négativement.

Finalement, lors d'une analyse du phospho-protéome de foie de souris, le groupe de S. Gygi est venu à la conclusion que le dernier 5 % des aa en C-terminal est phosphorylé dans une plus grande proportion que le reste de la séquence des protéines [659]. Ceci peut s'expliquer par le fait que le C-terminal d'une protéine est souvent non structuré et exposé, donc plus facilement accessible pour une kinase. Les sites de ERK3 identifiés dans la première étude de cette thèse se retrouvent également dans le dernier 5 % de la protéine. Bien que la structure tridimensionnelle de ERK3 ne soit pas connue, la modélisation du domaine kinase de ERK3 à partir de la structure résolue de ERK2 prédit que ces deux kinases s'organisent de façon semblable [591]. Toutefois, il est impossible, pour l'instant, de prédire comment l'extension en C-terminal unique à ERK3 est positionnée par rapport au domaine kinase. La résolution de la structure de ERK3 est essentielle pour répondre à cette question et déterminer la nature des interactions intramoléculaires qui se produisent entre le domaine kinase et le domaine en C-terminal.

#### **4.1.4 Est-ce que ERK3 est phosphorylée par plusieurs kinases lors de la mitose?**

Certaines évidences suggèrent que ERK3 n'est pas phosphorylée uniquement par CDK1 au cours de la mitose correspondant ainsi à la description formulée par Stukenberg *et al.* que certains substrats sont phosphorylés par plusieurs kinases lors de la mitose [657]. Voici les résultats qui permettent de proposer que tel soit le cas pour ERK3. Premièrement, le mutant de délétion ERK3<sub>1-678</sub>, qui ne contient plus aucun site CDK, phosphorylé par des extraits de cellules en mitose présente une

migration ralentie sur gel semblable à la forme sauvage traitée de la même façon (Figure 2.2C, p117). Deuxièmement, la phosphorylation *in vitro* par CDK1/cycline B ne provoque pas de retard de migration de ERK3 et la migration du mutant ERK3 C4A n'est que partiellement accélérée en comparaison à la protéine sauvage (Figure 2.3C, p.119). Finalement, les analyses par spectrométrie de masse des sites de ERK3 phosphorylés lors de la mitose ont révélé deux autres sites, soient les Ser 477 et Ser 511, qui ne sont pas suivis d'une proline.

#### 4.1.4.1 Plk1

De manière intéressante, les Ser 477 et Ser 511 sont situées dans une séquence consensus minimale de phosphorylation par Plk1 qui est D/E-X-S/T (Figure 4.1A) [223]. Nous avons également observé qu'*in vitro*, Plk1 phosphoryle ERK3 produite en bactérie (Figure 4.1B). De plus, les deux kinases interagissent ensemble, lorsqu'elles sont surexprimées dans des cellules HEK 293T (Figure 4.1C). Plk1 interagit avec ses substrats via son domaine PBD, situé en C-terminal du domaine kinase. Dans les expériences d'interaction que nous avons effectuées, nous avons démontré que ERK3 interagit directement avec le domaine PBD de Plk1 (Figure 4.1D). Des résultats similaires ont été obtenus *in vitro* en effectuant des «*GST-PBD pull-down*» (résultats non présentés). Finalement, en examinant attentivement le patron de migration de GFP-ERK3 sur gel, on constate qu'en présence du mutant constitutivement actif de Plk1 (CA, Thr210Asp), ERK3 est très légèrement retardé comparativement à sa migration en présence du mutant catalytiquement inactif de Plk1 (Plk1 KD) (Figure 4.1C). Des expériences supplémentaires sont nécessaires afin de mieux préciser le lien qui existe entre ERK3 et Plk1. Par exemple, il faudrait confirmer que les Ser 477 et Ser 511 sont réellement phosphorylées *in vivo* lors de la mitose de manière dépendante à Plk1. Un des mécanismes intéressants de contrôle de l'interaction entre Plk1 et ses substrats/partenaires est la nécessité de la pré-phosphorylation de ceux-ci par CDK1 [279]. Au cours de mon doctorat, nous avons exploré l'influence de la phosphorylation par CDK1 sur l'interaction ERK3-Plk1. Cependant, il semble que le mutant non phosphorylable de ERK3 (ERK3 C4A) interagisse avec Plk1 de la même façon que la protéine sauvage et cette interaction se

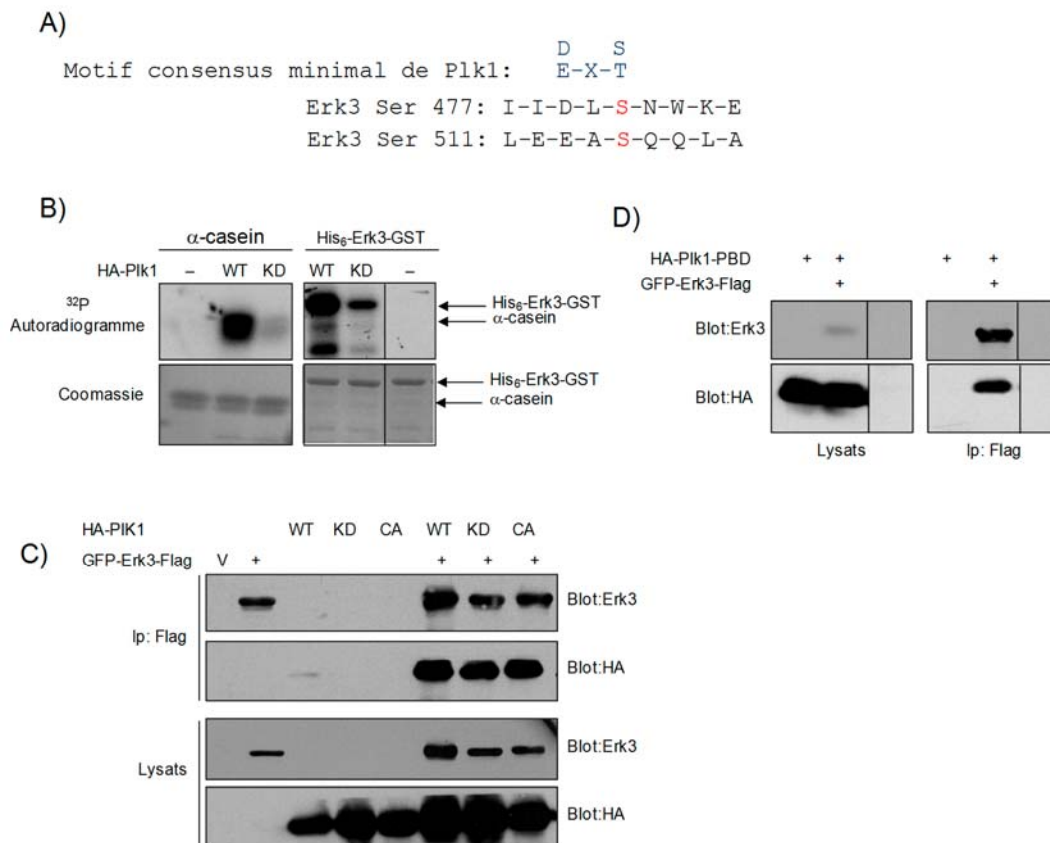


Figure 4.1 **Plk1 phosphoryle *in vitro* et interagit avec ERK3**

A) Localisation des deux sites identifiés par spectrométrie de masse comme étant phosphorylés dans des extraits de cellules en mitose. La séquence dans laquelle se retrouvent ces résidus est alignée avec la séquence consensus de phosphorylation par Plk1. B) HA-Plk1 transfectée dans des HEK 293T a été immuno-précipitée et incubée avec l' $\alpha$ -caséine, un contrôle positif, ou His<sub>6</sub>-ERK3-GST produite en bactérie ainsi que 10  $\mu$ Ci de  $\gamma^{32}$ P-ATP. Les panneaux supérieurs montrent les autoradiogrammes. Le mutant Plk1 KD est un mutant catalytiquement inactif (K83R). Il est à noter que les intensités respectives entre l' $\alpha$ -caséine et ERK3 ne peuvent être comparées. C) Des cellules HEK 293T ont été transfectées avec les constructions indiquées et suite à leur lyse, une immuno-précipitation à l'aide des billes  $\alpha$ -Flag M2-Agarose a été réalisée. Un western blot à l'aide des anticorps anti-ERK3 et anti-HA a été effectué. Le mutant Plk1 CA est constitutivement actif (Plk1 Thr210Asp). D) L'expérience présentée dans ce panneau, est similaire à celle décrite en C), à l'exception que la construction HA-Plk1-PBD a été utilisée.

produit également en interphase, au moment où CDK1 est inactive (résultats non présentés). En accord avec ces observations, il a été démontré que la reconnaissance par Plk1 de certains de ses substrats/partenaires, dont MAP205, ne dépend pas

strictement de la phosphorylation préalable par les CDKs [660]. Plk1 exerce différentes fonctions au cours du cycle cellulaire, consistant avec sa localisation très dynamique. Par exemple, en interphase et lors de la cytokinèse, Plk1 est associée aux microtubules et centrosomes, alors que durant la mitose Plk1 est surtout retrouvée aux pôles du fuseau mitotiques, aux kinétochores et au site de clivage [276]. Comment la régulation de la localisation de Plk1 est-elle effectuée au moment où les kinases mitotiques sont inactives? Une partie de la réponse provient du fait que Plk1 est localisée aux microtubules en interphase via son interaction avec MAP205, et que la phosphorylation de cette dernière par CDK1 en mitose provoque la dissociation de Plk1 [660]. Cet exemple illustre bien les divers mécanismes possibles de contrôle de l'interaction Plk1-partenaires/substrats. Ainsi, la relation entre Plk1 et ERK3 mériterait d'être étudiée plus en détail.

#### **4.1.4.2. Les kinases de la famille Aurora et NIMA**

En mitose, deux autres familles de kinases sont bien connues pour être activées, il s'agit des kinases de la famille Aurora et NIMA. Mes résultats n'excluent pas la possibilité qu'un(des) membre(s) de ces familles phosphoryle(nt) ERK3.

Le génome humain contient trois gènes Aurora, soient Aurora A, B et C [27]. Ces trois Ser/Thr kinases sont décrites pour être impliquées dans plusieurs aspects du déroulement de la mitose. Ainsi, l'activité de Aurora A est importante pour la maturation et la séparation des centrosomes en G2 de même que la nucléation des microtubules à partir des centrosomes [661]. De plus, comme décrit à la section 1.2.2, Aurora A participe à l'activation de CDK1 lors de l'entrée des cellules en mitose. Pour sa part, Aurora B intervient plutôt dans la condensation des chromosomes, la cohésion des chromatides sœurs, l'organisation du fuseau mitotique et l'attachement des microtubules aux kinétochores, le SAC et la cytokinèse [661]. Finalement, Aurora C est la moins bien caractérisée des trois et semble jouer un rôle surtout dans la spermatogénèse. Son rôle dans le contrôle de la mitose demeure encore incertain, malgré qu'elle ait été observée aux centrosomes durant l'anaphase et la télophase [661].

NIMA a été identifié chez *Aspergillus nidulans* et est essentiel pour l'entrée des levures en mitose [662]. Chez les mammifères, il y a 11 gènes *Nek* (*NIMA-related kinases*) qui, comme le nom l'indique, sont les homologues les plus proches de NIMA. De celles-ci, Nek2 est la plus étudiée. Bien qu'elle ne puisse compléter la mutation de NIMA chez *A. nidulans*, Nek2 est importante dans la maturation des centrosomes et pour la formation d'un fuseau mitotique fonctionnel. Il existe deux isoformes de Nek2 issus de l'épissage alternatif, soit Nek2A et B [662]. Au laboratoire, Nek2 a été identifiée comme partenaire de ERK3 dans une approche de purification par affinité de type « *TAP-tag* ». Cependant, cette interaction n'a pas encore été reproduite et on ne sait pas si l'une ou l'autre de ces kinases phosphoryle l'autre. De plus, pendant les travaux de purification de la kinase de la boucle d'activation de ERK3, le Dr Déléris a identifié Nek9 comme kinase interagissant avec ERK3 et qui la phosphoryle sur aux moins deux résidus (mais non pas la boucle d'activation) situés dans le domaine kinase et l'extrémité C-terminale (P. Déléris et S. Meloche, résultats non publiés).

L'étude de peptides préférentiellement phosphorylés par Aurora A *in vitro* révèle que celle-ci est une kinase basophile ayant comme préférence la séquence R/K/N-R-X-S/T-B, où B est un résidu hydrophobe à l'exception de la proline [663]. Par ailleurs, une telle étude n'a été faite que pour déterminer la séquence consensus de la kinase NIMA de *A. nidulans*, membre fondateur de cette famille. Cette kinase a la particularité unique de phosphoryler un résidu Ser ou Thr lorsqu'il y a une Phe en position -3 (F-X-X-S/T) [664, 665]. À ce jour, Hec1 est le seul substrat de Nek2 dont le site a été identifié et il s'agit de la Ser 165 dans la séquence FALSK [666]. Ces kinases représentent toutes des candidates potentielles pour expliquer la phosphorylation du domaine C-terminal de ERK3 en mitose, qui ne peut être attribuée à CDK1. Cependant, basé strictement sur l'analyse des sites consensus de phosphorylation de ces kinases, il est peu probable, mais non pas impossible, que tel soit le cas. En effet, l'analyse de la séquence primaire du domaine C-terminal ne révèle la présence d'aucun de ces motifs. Des essais de phosphorylation *in vitro* amèneraient plus de précisions.



#### 4.1.5 Quel est le rôle de la phosphorylation en mitose?

La phosphorylation des protéines peut affecter plusieurs propriétés de celles-ci, dont l'activité enzymatique, la localisation subcellulaire et les interactions protéines-protéines. L'étude de l'hyper-phosphorylation de ERK3 lors de la mitose présentée au Chapitre 2 constitue le premier exemple dans la littérature d'une telle modification de MAP kinases. Toutefois, il a été démontré très récemment que la MAP kinase ERK5 est également hyperphosphorylée lors de la mitose [667, 668]. De manière similaire à ERK3, la phosphorylation de ERK5 se fait en partie par CDK1/cycline B et par d'autres kinases qui restent à identifier. De plus, les résidus qui sont phosphorylés (Ser567, 706, 720, 753, 773 et 803 et la Thr 732) sont situés dans le domaine C-terminal de la protéine. D'après les résultats de ces recherches, l'hyper-phosphorylation de ERK5 lors de la mitose inhibe son activité kinase, affecte son activité transcriptionnelle (positivement ou négativement, selon les études qui ont identifié différents sites de phosphorylation) et favorise sa localisation nucléaire. Lors de notre étude sur la caractérisation de l'impact de la phosphorylation mitotique de ERK3, nous n'avons pas observé de changement dans la phosphorylation de la boucle d'activation et ERK3 isolée de cellules synchronisées en mitose a la même activité enzymatique envers son seul substrat connu MK5 que ERK3 isolée de cellules en interphase (données non présentées). De plus, il ne semble pas que la phosphorylation de ERK3 sur son extrémité C-terminale affecte l'interaction entre ERK3 et MK5. Ce résultat n'est pas surprenant puisque la région de ERK3 importante pour son association avec MK5 a été assignée aux aa 326 à 340 du domaine kinase, ainsi qu'à l'état de phosphorylation du motif SEG de la boucle d'activation, qui ne varie pas au cours du cycle cellulaire (Annexe 1, et résultats non publiés). Le fait que peu de substrats et partenaires d'interaction soient connus nous limitait considérablement dans les différentes interactions protéines-protéines à tester. Avec la découverte de nouveaux partenaires/substrats qui viendra certainement dans les prochaines années, il sera intéressant de tester si l'interaction entre ERK3 et ceux-ci est régulée au cours du cycle cellulaire. Par conséquent, il est donc possible que ERK3 est phosphorylé par CDK1 pour la stabiliser au cours de la mitose et que la phosphorylation par une

(ou plusieurs) autre(s) kinase(s) contribue à modifier ses interactions protéines-protéines.

#### **4.1.6 L'ubiquitination de ERK3**

Notre première étude a permis de mettre en évidence que la dégradation de ERK3 par le système ubiquitine-protéasome est régulée au cours du cycle cellulaire. En effet, l'expression de ERK3 atteint un maximum lorsque les cellules sont en mitose (Figure 2.1, p. 114). Tandis que la demi-vie de ERK3 est d'environ 20-25 min en interphase, elle devient d'environ 100 min dans des cellules synchronisées en prométaphase (Figure 2.6, p.127). Ces cinétiques de dégradation ressemblent énormément à celles observées pour la cycline B1 [264]. Nos résultats indiquent que la phosphorylation en mitose par CDK1/cycline B stabilise ERK3, puisque le mutant non phosphorylable ERK34A a une demi-vie d'environ 20 min lors de la mitose (Figure 2.6, p.127).

Sachant que ERK3 se comporte différemment des autres MAP kinases au niveau de sa stabilité, à l'exception de ERK7, nous sommes intéressés à identifier la E3 ligase responsable de la dégradation de ERK3, afin de mieux comprendre ses mécanismes de régulation. De par les travaux présentés dans cette thèse, il est possible d'émettre l'hypothèse qu'une E3 ligase de ERK3 est active tout au long du cycle cellulaire et que la phosphorylation de la queue C-terminale de ERK3 prévienne leur interaction. En fait, il a été démontré que la dégradation de ERK3 se produit conséquemment à l'ubiquitination de son extrémité N-terminale [597]. Pour se faire, deux régions en N-terminal de ERK3, NDR1 et NDR2, sont nécessaires pour promouvoir l'instabilité de ERK3. Il est possible que ces régions servent de motifs reconnus par la E3 ligase de ERK3. Par contre, le domaine C-terminal ne semble pas affecter la dégradation constitutive de ERK3 puisqu'un mutant de délétion de ce domaine est dégradé avec la même cinétique que la protéine sauvage [597]. D'après les résultats présentés au Chapitre 2, il est possible de proposer que la phosphorylation du C-terminal induise un changement de conformation de ce domaine qui vient ainsi interférer dans l'interaction entre ERK3 et la E3 ligase. D'un

autre côté, la phosphorylation de ERK3 au cours de la mitose pourrait favoriser l'interaction avec une enzyme de déubiquitination (Figure 4.2).

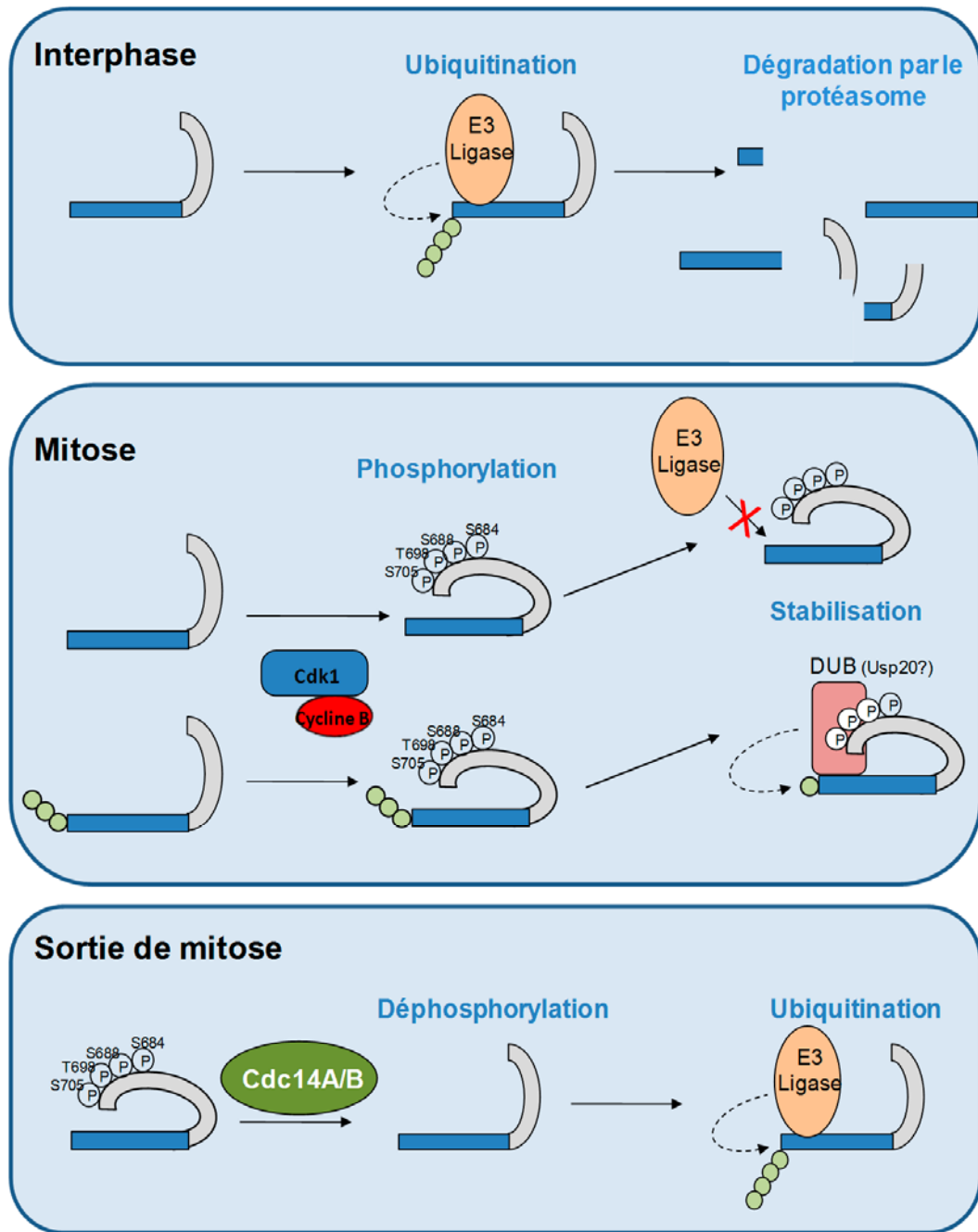


Figure 4.2 **Modèle de régulation de ERK3 au cours du cycle cellulaire**  
Relation entre la phosphorylation du domaine C-terminal de ERK3 et la dégradation dans les cellules en interphase et en mitose.

#### 4.1.6.1 La E3 ligase de ERK3

Tel que décrit à la Section 1.1.3.6, les activités des deux complexes E3 ligases APC et SCF contrôlent la progression dans le cycle cellulaire. L'APC<sup>Cdh1</sup> est actif de la fin de la mitose jusqu'à la phase S, et l'APC<sup>Cdc20</sup> est actif pendant la mitose [94]. Les complexes SCF, régulés par différentes protéines à boîte F, sont actifs tout au long du cycle cellulaire [85]. Au cours de mes études doctorales, j'ai effectué des expériences d'ubiquitination *in vitro* afin de déterminer si l'APC<sup>Cdh1</sup> ou l'APC<sup>Cdc20</sup> ubiquitinent ERK3. Ces expériences me permirent d'exclure l'APC comme E3 ubiquitine ligase de ERK3, malgré le fait que l'abondance de ERK3 varie de manière semblable à la cycline B, un substrat de l'APC. De plus, l'expression d'un mutant dominant négatif de Cullin-1 (composante essentielle des complexes SCF) n'a aucun effet sur la stabilité de ERK3 (P. Coulombe et S. Meloche, résultats non publiés).

Le génome humain contient environ 600 gènes codant pour des protéines à domaine RING pouvant agir comme E3 ubiquitine ligases et 28 E3 ligases de la famille HECT [87, 669]. Seulement quelques-unes des ces E3 ligases ont des substrats connus, mais il faut considérer que la grande majorité des E3 ligases n'est pas étudiée à ce jour. Il est donc normal que très peu de ligases soient associées au contrôle du cycle cellulaire. Tout indique que des études futures permettront sans aucun doute d'accroître le nombre de E3 ligases contrôlant l'expression de protéines de manière dépendante au cycle cellulaire. Par exemple, lors d'un crible à grande échelle visant l'identification de protéines du système ubiquitine-protéasome (E1, E2, E3 ligases, déubiquitinases, protéines qui lient l'ubiquitine) impliquées dans l'entrée en anaphase suivant l'activation du SAC, six nouveaux candidats E3 ligases ont été identifiés [670]. Ainsi, cinq protéines à domaine RING (RING1, ZNFP294, RingFP\_32, Rad18hom et DZIP-3) et une protéine à boîte F (FBOX41) ont été trouvées. Évidemment, aucun substrat ne leur a été assigné pour l'instant. D'autres cribles similaires, faisant appel à une telle librairie de molécules d'ARN antisens, pourrait fournir de nouvelles listes de E3 ligases qui régulent la progression dans le cycle ou la transition entre les différentes phases. Dans ce même ordre d'idée, il a été publié récemment que la protéine EB3, une protéine associée aux microtubules, est

ubiquitinée par la E3 ligase à domaine RING SIAH-1 (*Seven in absentia from human 1*) [671]. Lors de la mitose, Aurora A/B phosphoryle EB3 sur sa Ser 176, ce qui prévient son interaction avec et son ubiquitination par SIAH-1. Afin d'identifier la(les) E3 ubiquitine ligases de ERK3, la stratégie la plus simple serait de faire un criblage pour tester l'impact de la suppression de chacun des gènes de protéines à domaines RING, HECT ou boîtes F sur la stabilité de ERK3. Au laboratoire, Benoît Pelletier, chercheur postdoctoral, a développé un essai luciférase pour tester l'effet de molécules chimiques sur la dégradation d'un inhibiteur du cycle cellulaire. Dans un essai semblable, il serait possible de faire une construction ERK3-Luciférase et de mesurer son abondance après avoir supprimé l'expression des protéines sélectionnées par infection lentivirale de shRNA.

#### 4.1.6.2 Les enzymes de déubiquitination

Jusqu'à présent, les rôles des enzymes de déubiquitination (DUBs, *deubiquitinating enzymes*) dans le cycle cellulaire ne sont que très peu caractérisés, l'accent ayant été mis sur la compréhension du processus d'ubiquitination lors des dernières décennies. Cependant, il existe quelques exemples dans la littérature de DUBs dont l'activité et l'expression fluctuent au cours du cycle cellulaire. Ainsi, le suppresseur de tumeurs Cyld, est requis pour promouvoir l'entrée des cellules en mitose [672]. Son activité et ses niveaux protéiques atteignent des maximums lors de la mitose. On observe le même patron de régulation pour Usp44 dont l'activité est essentielle pour prévenir l'activation de l'APC lorsque le SAC est activé [670].

Pour mieux définir les réseaux d'interactions des DUBs, le groupe de W. Harper a analysé les interactions de 75 DUBs par une approche de « TAP-tag » couplée à l'identification de leurs partenaires par spectrométrie de masse [673]. Parmi les 774 partenaires candidats repêchés, ERK3 a été trouvée en association avec l'enzyme de déubiquitination Usp20. Au laboratoire, Paul Déléris, chercheur postdoctoral, a confirmé cette interaction par co-immunoprécipitation (résultats non publiés). Il a également été possible de démontrer expérimentalement que Usp20 déubiquitine ERK3. Usp20 (ou VDU2, *pVHL-interacting deubiquitinating enzyme-2*) est décrite pour déubiquitiner HIF 1 $\alpha$ , un substrat de la E3 ligase VHL qui devient stabilisé en

condition d'hypoxie [674] et du  $\beta$ 2-AR ( $\beta$ 2-Adrenergic Receptor), dont l'ubiquitination régule positivement son internalisation [675]. Il serait intéressant de vérifier si cette DUB joue un rôle lors du cycle cellulaire, si son expression ou son activité varie dans les différentes phases et si son interaction avec ERK3 est modulée au cours du cycle. À partir de nos travaux, on peut supposer que l'interaction entre ERK3 et Usp20 est plus forte au cours de la mitose, ce qui favorise la déubiquitination de ERK3 et ainsi augmente sa stabilité. De plus, il est possible que Usp20 soit plus fortement exprimée ou plus active en mitose. Toutefois, on ne peut écarter la possibilité qu'une ou plusieurs autres DUBs contrôlent la stabilité de ERK3 au cours du cycle cellulaire.

#### 4.1.7 ERK3 se retrouve aux centrosomes

Identifier l'endroit dans la cellule où se retrouve une protéine facilite la compréhension de ses fonctions, surtout lorsqu'on est en quête de celles-ci, comme c'est le cas avec ERK3. Malgré que ERK3 ait été initialement assignée au noyau, il a par la suite été démontré par le laboratoire du Dr Meloche que ERK3 oscille constamment entre le noyau et le cytoplasme [612, 651]. D'un autre côté, une étude suggère que ERK3 se situe également au niveau du ERGIC et que son déplacement vers le noyau dépend d'un nouveau mécanisme de contrôle de localisation des MAP kinases [584]. En fait, selon ce modèle, ERK3 est située principalement au ERGIC en phase G1 et lorsqu'une région en C-terminal est clivée via un mécanisme inconnu, une fraction du pool de ERK3 est redirigée vers le noyau en phases S et G2. Dans certaines conditions, il est également possible d'observer ERK3 aux centrosomes ou associée à au moins une protéine centrosomale. Tout d'abord, la co-expression de ERK3 et Cdc14A dirige ERK3 aux centrosomes ([614] et Fig 4.3A). En effet, chez les mammifères, Cdc14A est une phosphatase qui se situe aux centrosomes en interphase et en prométaphase [306]. Pendant la télophase, Cdc14A se retrouve aussi au niveau du « *midbody* ». La localisation centrosomale est en partie attribuable à sa séquence NES qui prévient qu'elle soit transportée vers le nucléole. Cette localisation ne dépend pas de l'activité phosphatase de Cdc14A car ERK3 est aussi située au centrosome, du moins en interphase, en présence d'un mutant inactif de Cdc14A

[614]. Ensuite, lorsque Plk1 est surexprimée en même temps que ERK3, on peut retrouver celle-ci aux centrosomes dans certaines cellules (Fig 4.3). Nous n'avons pu confirmer l'impact de l'activité kinase de Plk1 sur la localisation centrosomale de ERK3, puisque le mutant inactif utilisé, quoique moins actif que Plk1 sauvage, possède une activité résiduelle (Fig 4.1B). Par contre, la co-expression du domaine PBD, n'engendre pas le recrutement de ERK3 au centrosome, bien que ce domaine soit important pour la localisation de Plk1 à ces structures cellulaires (résultats non démontrés) et [676]. Finalement, tout récemment, un groupe de chercheurs a réalisé une étude à grande échelle pour définir le « *MAP kinase interactome* » à partir de 86 protéines reliées aux MAPKs [677]. Parmi les 1500 interactions protéines-protéines répertoriées, on retrouve une association entre ERK3 et Cep1 (*Centrosomal protein 1*, aussi nommée Cep110). Celle-ci a été décrite pour faire partie des centrioles et lorsqu'elle est neutralisée à l'aide d'anticorps, les centrosomes perdent leur capacité à être le centre d'organisation des microtubules [678]. De plus, Cep1 est requise pour reformer le centrosome d'interphase après la mitose. De toute évidence, cette interaction mérite d'être reconfirmée tout comme il faudrait vérifier si l'expression de Cep1 localise ERK3 aux centrosomes et si Cep1 est un substrat de ERK3.

Comme nous l'avons démontré au Chapitre 2, ERK3 est phosphorylée sur quatre résidus qui sont suivis d'une proline. Plusieurs protéines phosphorylées sur un motif S/T-P interagissent avec la peptidyl-prolyl cis/trans isomérase PIN1 (*protein interacting with NIMA 1*) ( revue dans [679]). Cette isomérase est impliquée dans une multitude de processus cellulaires dont la réponse cellulaire aux stress, certaines fonctions neuronales, l'immunité et la progression dans le cycle cellulaire [679]. PIN1 contrôle la progression en mitose en modifiant l'activité de plusieurs régulateurs clés tels Emi1, Cdc25 et Wee1. De manière intéressante, en interphase, PIN1 est retrouvée au centrosome tandis qu'elle est déplacée de ces structures au cours de la mitose [680]. En fait, la délétion génétique de Pin1 entraîne un défaut de duplication des centrosomes, alors que sa surexpression les amplifie. Au cours de mon doctorat, j'ai tenté de vérifier une relation possible entre PIN1 et ERK3.

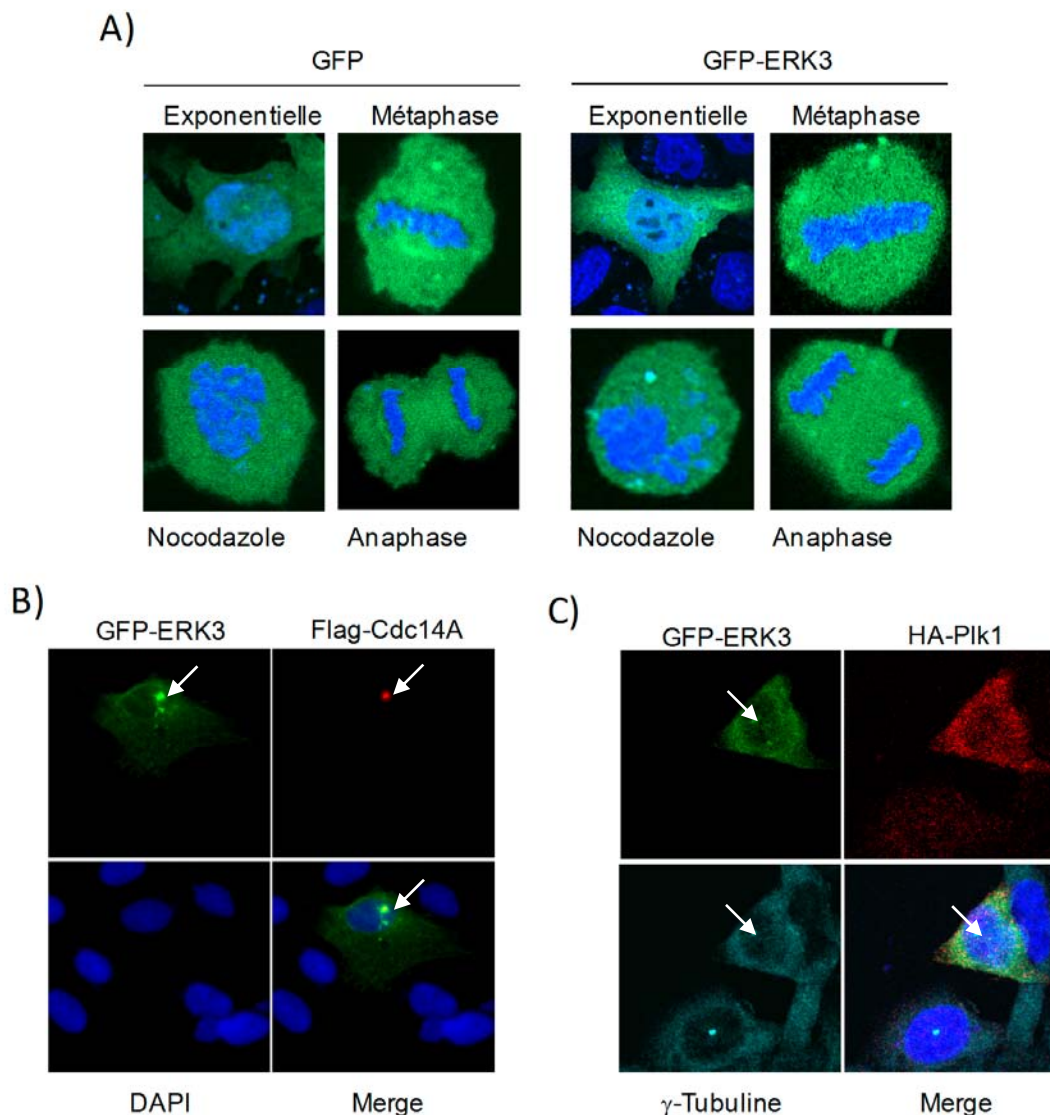


Figure 4.3 **ERK3 peut être retrouvée aux centrosomes**

**A)** Des HeLa sont transfectées avec la GFP ou ERK3-GFP. Localisation de la GFP ou GFP-ERK3 dans des cellules en interphase (exponentielle), en métaphase, en anaphase ou arrêtées avec le nocodazole. **B et C)** Des HeLa sont transfectées avec GFP-ERK3 et Flag-Cdc14A ou HA-Plk1 respectivement. GFP-ERK3 et la localisation de Flag-Cdc14A et HA-Plk1 démontre un certain niveau de co-localisation des deux protéines. Dans le panneau C), un marquage de la  $\gamma$ -tubuline est effectué pour démontrer la co-localisation de ERK3 au centrosome.

Cependant, les expériences effectuées *in vivo* et *in vitro* n'ont pas permis de mettre en évidence une interaction entre les deux protéines (résultats non publiés).



Que signifie l'association de ERK3 aux centrosomes? Les centrosomes sont des structures cellulaires extrêmement denses en protéines, et il est très peu probable que ERK3 soit localisée à ces structures par « erreur ». Le fait qu'on n'y détecte pas la protéine endogène pourrait seulement être dû au fait que les anticorps utilisés contre ERK3 ne sont pas suffisamment sensibles. De plus, comment expliquer que GFP-ERK3 exprimée seule ne soit pas localisée aux centrosomes, mais qu'elle le soit en présence de Cdc14A et Plk1? Il se pourrait que la surexpression de Cdc14A et Plk1 reproduise tout simplement certaines conditions dans lesquelles ERK3 est située à cette structure cellulaire. Il est possible aussi qu'une très petite fraction de ERK3 soit localisée aux centrosomes et que la surexpression de Cdc14A et Plk1 l'augmente considérablement. Maintenant, est-ce qu'il est plus probable que ERK3 influence la fonction du centrosome en interphase ou lors de la mitose? En fait, en interphase, le centrosome est associé à l'organisation du réseau de microtubules à partir duquel l'architecture de l'appareil de Golgi prend place [681]. Il est à noter que la sécrétion d'insuline est diminuée en réponse au glucose dans des cellules  $\beta$  du pancréas ou au PMA dans des cellules RINm5F de rats dans lesquelles ERK3 est inhibée et qu'on détecte moins d'IGF-2 dans le sérum des souris nouvelles nées *Erk3*<sup>-/-</sup> [590, 611]. Les mécanismes qui expliquent ces baisses de sécrétion lorsque ERK3 est inactivée ne sont pas connus, mais il serait intéressant de tester, dans ces cellules qui sécrètent l'insuline ou l'IGF-2, si le réseau de microtubules ou les centrosomes sont bien formés. D'un autre côté, Plk1 et Cdc14A sont surexprimés dans certains types de tumeurs et il serait intéressant de vérifier la localisation de ERK3 dans ces tumeurs et d'examiner quel est le rôle de ERK3 dans la formation et le développement de celles-ci. L'utilisation des souris *Erk3*<sup>-/-</sup> représente certainement un outil de choix pour répondre à cette question. Une autre approche qui pourrait également être utilisée serait de forcer la localisation de ERK3 au centrosome en générant une protéine de fusion ERK3-AKAP. Il a été démontré que les 266 derniers acides aminés de la protéine AKAP450 étaient suffisant pour localiser la GFP au centrosome [682]. Ainsi, en surexprimant cette construction, on pourrait déterminer si la localisation de ERK3 aux centrosomes a un impact sur l'intégrité de ceux-ci, la sécrétion d'hormones ou la stabilité génomique.

#### 4.1.8 Un rôle en méiose

La ségrégation des chromosomes se produit au cours de la mitose, lors de la division cellulaire, et de la méiose, lors de la formation des gamètes. Plusieurs similarités existent entre la mitose et la méiose, puisque l'objectif fondamental de ces deux processus est de distribuer des chromosomes dans deux nouvelles cellules. Les ovocytes immatures sont arrêtés à la prophase de la méiose I (également considérée comme la fin de la phase G2). Une stimulation hormonale entraîne la maturation des ovocytes pour former des gamètes fertilisables bloqués à la métaphase de la méiose II [438]. Cette étape de maturation est régie principalement par l'activité oscillante de CDK1/cycline B. Dernièrement, une équipe a démontré que l'inhibition de ERK3 à l'aide de morpholinos bloque les ovocytes de souris à la transition métaphase-anaphase de la méiose I [683]. Il semble, dans ce modèle cellulaire, que ERK3 soit localisée au niveau du fuseau méiotique et que son inhibition altère la structure du réseau de microtubules et prévient l'attachement de ceux-ci aux kinétochores. Ceci a pour effet d'activer le SAC et de bloquer les ovocytes en métaphase I. Le mécanisme d'action précis de ERK3 dans ce processus n'est pas connu. Cependant, il est possible que la phosphorylation par CDK1 décrite au Chapitre 2 stabilise ERK3 dont l'activité (ou du moins la présence) semble être requise pour le déroulement normal de la méiose. Il serait intéressant de vérifier le phénotype associé à la maturation des ovocytes avec un modèle génétique. Bien que les souris hétérozygotes *Erk3*<sup>+/-</sup> soient fertiles, il se pourrait que la délétion de la deuxième allèle entraîne une inhibition de maturation des ovocytes. Cependant, les souris *Erk3*<sup>-/-</sup> étant non viables à la naissance, il faudrait générer des modèles de souris mutantes conditionnelles, dans lesquels le gène ERK3 serait spécifiquement inactivé dans les ovocytes ou chez l'adulte.

De manière intéressante, il a été démontré que PAK1 régule la formation du fuseau mitotique et l'alignement des chromosomes dans les ovocytes [684]. De plus, il est connu que l'activité de PAK1 est régulée par CDK1 au cours de la mitose et qu'elle est requise pour la progression des cellules en G2/M [685, 686] Il est connu que ERK3 est phosphorylée sur le motif SEG de sa boucle d'activation dans les

cellules. Cependant, la kinase qui est responsable de cet évènement n'a jamais été identifiée. À l'annexe II, je présente l'étude menée par Dr Paul Délérés au laboratoire qui a démontré que les PAK de groupe I (PAK 1-3) phosphorylent ERK3 *in vivo*. Il est intéressant de constater que les deux kinases PAK1 et ERK3 jouent des rôles importants dans la maturation des ovocytes. Le rôle de PAK2 et 3 dans ce processus demeure encore inexploré. Il serait pertinent de valider que dans les ovocytes, les PAK de groupe I phosphorylent effectivement ERK3 sur la boucle d'activation, d'autant plus qu'il semble que ces deux protéines co-localisent ensemble sur les microtubules [683, 684]. Par la suite, on pourrait tester le rôle de différents mutants de ERK3 en les micro-injectant dans les ovocytes. Ainsi, on pourrait tester l'effet de l'activité enzymatique, de l'extension C-terminale et de mutants de phosphorylation de ERK3 sur le bon déroulement de la méiose.

De plus, Cdc14 semble être impliquée dans la maturation des ovocytes chez la souris [687]. En fait, entre la métaphase I et la métaphase II, Cdc14A et B sont localisées sur le fuseau méiotique. L'inhibition de Cdc14A ralentit la transition entre la métaphase I et la métaphase II et entraîne un mauvais alignement des chromosomes sur la plaque équatoriale, deux phénotypes semblables à ce qui est observé en absence de ERK3.

De toutes évidences, l'ensemble de ces résultats suggère que les relations entre ERK3 et ses différents partenaires/activateurs dans le contexte de la méiose méritent d'être étudiées. Il sera intéressant, si ce rôle pour ERK3 est confirmé dans un modèle murin, d'évaluer s'il s'agit d'une fonction qui dépend ou non de MK5. En fait, il a été rapporté que les souris *Mk5<sup>-/-</sup>*, lorsqu'elles sont générées dans un fond génétique mixte, n'ont aucun défaut apparent et sont fertiles [629, 642 {Shi, 2003 #139}. Toutefois, lorsque l'inactivation de MK5 se fait dans des souris à fond génétiques pures, une partie des souris décède autour du jour E11.5, suggérant que dans ces conditions MK5 est requise pour le développement et la viabilité des souris [631]. Pour tester le rôle de MK5 lors de la méiose, il serait donc préférable d'étudier des souris *knock-out* conditionnelles.

Un autre modèle d'étude qui s'est avéré fort utile dans la compréhension des événements biochimiques de la méiose est l'œuf de la grenouille *X. laevis*. Puisque ERK3 et MK5 sont conservées chez la grenouille, et que celle-ci est particulièrement facile à manipuler, des expériences dans ce modèle devraient être envisagées. L'utilisation d'un tel modèle permettrait de valider que cette fonction est conservée au cours de l'évolution ou qu'elle est apparue plus tard et permettrait de caractériser l'effet de différents mutants de ces kinases dans la méiose. Ainsi, on pourrait plus facilement déterminer le rôle de l'activité kinase, du domaine C-terminal de ERK3, de la phosphorylation par CDK1 et de l'interaction ERK3/MK5 dans ce processus cellulaire.

## **4.2 MK5, un inhibiteur du cycle cellulaire**

Au Chapitre 3, nous présentons les résultats d'une étude dans laquelle nous identifions une nouvelle fonction de MK5. De manière intéressante, nous avons observé que MK5 ralentit l'entrée en mitose en réponse à un arrêt de la réplication. Ainsi, les données de la littérature et de cette thèse suggèrent que MK5 régule la progression en phase S, l'entrée en mitose et est essentielle pour induire la sénescence [642, 643].

### **4.2.1 Les voies qui activent MK5**

Jusqu'à présent quatre kinases ont été décrites pour activer MK5 dans différentes conditions : la MAP kinase p38, les MAP kinases ERK3/4 et la PKA. Afin de disséquer les composantes de la voie impliquées dans l'activation de MK5 lors de l'entrée en mitose, nous avons testé le rôle de p38 et ERK3/4, mais n'avons pu observer de phénotype semblable en inhibant ces kinases (Figure 3.4, p.155). D'un autre côté, il a été trouvé que MK5 interagit avec la sous-unité catalytique C $\alpha$  de la PKA [637]. En fait, l'augmentation de l'APMc intracellulaire ou la surexpression de la sous-unité C $\alpha$  provoque l'export nucléaire de MK5 et stimule son activité kinase. Il a été démontré dans cette étude que le réarrangement des filaments d'actine engendré par l'activité de la PKA était exécuté en partie via MK5. L'AMPC a plusieurs effets sur la prolifération, qui peuvent être activateurs, mais plus souvent inhibiteurs selon

le type cellulaire [688]. Ainsi, un traitement des cellules au 8-Br-AMPC, un analogue de l'AMPC, a pour effet de prévenir l'entrée des cellules en mitose en allongeant la durée de la phase G2 [689]. Cet effet de l'AMPC sur l'entrée en mitose est dépendant de l'activité de la PKA. Considérant le lien qu'il existe entre la PKA et MK5, au cours de mes études, nous avons exploré la possibilité que l'inhibition de l'entrée en mitose suite à une augmentation des niveaux d'APMc intracellulaire passe par l'activité de MK5. Tout d'abord, nous avons pu confirmer qu'un traitement des HeLa en phase G2 au 8-Br-AMPC et à la forskoline (un activateur de l'adénylate cyclase) ralentit leur progression en mitose. Cependant, l'inhibition de MK5 par siRNA ne renverse que très partiellement cet effet inhibiteur (résultats non publiés). De même, après une synchronisation des cellules à la transition G1/S, l'inhibition de la PKA par le KT5720 ne modifie pas la vitesse d'entrée en mitose. Il semble donc que MK5 ne soit pas la cible principale de la PKA dans cette fonction. L'ensemble de ces résultats suggère qu'une autre kinase puisse être responsable de l'activation de MK5 suite à un arrêt de la réplication.

Il est bien connu que les kinases Chk1 et Chk2 ont des rôles primordiaux dans le contrôle de l'entrée en mitose en réponse aux dommages à l'ADN, mais également en absence de stress génotoxique [336, 690]. Il a été démontré que MK2 est activée en réponse à des lésions à l'ADN et qu'elle est importante pour les points de contrôles en G1/S et G2/M et que son activité est essentielle pour maintenir la survie cellulaire en absence de p53 [513, 519]. Afin de déterminer l'interdépendance entre Chk1 et MK2, le laboratoire de M. Yaffe a testé l'état d'activation de MK2 après avoir inhibé Chk1 et vice-versa. Les résultats de ces expériences démontrent que la stimulation de l'activité des deux kinases conséquemment à une exposition à des stress génotoxiques ne dépend pas de l'autre [513]. Ainsi, il est peu probable que MK5 se situe en aval de Chk1 bien que celle-ci soit activée suite à un arrêt de la réplication.

L'utilisation de la génomique fonctionnelle serait un bon choix pour analyser l'effet de la délétion des kinases du génome sur l'activité de MK5.

#### 4.2.2 L'identification de substrats et de la séquence consensus de phosphorylation par MK5

Afin de parfaitement bien comprendre les mécanismes d'action d'une kinase, il est absolument essentiel de connaître ses substrats et les résidus qu'elle phosphoryle. Cependant, depuis les douze dernières années, seulement huit protéines ont été démontrées pour être phosphorylées par MK5 *in vitro* ou *in vivo* (Tableau III). De ces huit protéines, on ne connaît que trois sites phosphorylés (Tableau III). Ainsi, selon le groupe de U. Moens, MK5 phosphoryle HSP27 *in vivo* sur les Ser 78 et 82, deux sites phospho-accepteurs situés dans un motif R-X-X-S reconnu également par MK2 [647]. ERK4 (et possiblement ERK3) est un autre substrat de MK5 *in vivo*. En fait, suivant l'activation de MK5 par ERK4, MK5 phosphoryle à son tour ERK4 sur l'extrémité C-terminale ([628], voir Annexe 1) et (Justine Rousseau, résultats non publiés). Afin de déterminer les sites de ERK4 qui sont phosphorylés par MK5, une analyse par spectrométrie de masse a été effectuée après avoir purifié ERK4 co-exprimée en présence de MK5. Quatre sites ont été identifiés et parmi ceux-ci on retrouve la Ser 386 conservée chez ERK3 dans la séquence DPRAGSA avec une Arg en position P-3. Cependant, la validation que ce site est phosphorylé directement par MK5 n'a pas encore été effectuée. *In vitro*, MK5 phosphoryle la Tyrosine hydroxylase 1 sur la Ser19 [691]. Cette phosphorylation de Th1 par MK5 crée un site de haute affinité pour la protéine 14-3-3 qui lie préférentiellement des protéines qui sont, entre autres, phosphorylées sur le motif R-X-X-pS/pT-X-P [692]. Toutefois, pour l'instant, cette relation enzymatique n'a pas été confirmée *in vivo*. Au Chapitre 3, nous démontrons que MK5 phosphoryle les trois Cdc25 *in vitro*, mais que Cdc25A est celle qui est clairement le plus fortement phosphorylée. Il était déjà connu que MK2 phosphoryle les trois Cdc25 *in vitro* et *in vivo* et que c'est en partie par ces phosphorylations que MK2 exerce son effet inhibiteur sur la progression à travers les phases du cycle cellulaire [513, 519]. Tandis que MK2 phosphoryle Cdc25B et C sur les Ser309 et Ser216 respectivement, la phosphorylation de Cdc25A est moins bien caractérisée. De plus, il est possible que MK5 reconnaisse également différents motifs de phosphorylation puisqu'une étude a proposée qu'elle phosphoryle p53 sur la Ser 37 de la séquence SPLPSQA [642].

Tableau III Les substrats connus de MK5

Substrats	Site(s)	Séquence	Phosphorylé		Ref.
			par MK2	<i>In vivo</i> / <i>In vitro</i>	
Hsp27	Ser 78 Ser 82	SRALS <u>R</u> SRQL <u>S</u> S	✓	✓	[617, 647]
Hsp25	—		✓		[617]
Glycogène Syn.	—		✓		[617]
Myosine HC	—		✓		[617]
cPLA2	Ser727	SRCS <u>V</u> S			[693]
TH1	Ser 19	RRAV <u>S</u> E	✓		[691]
ERK3/ERK4	ERk4 Ser386(?)	PRAG <u>S</u> A		✓	[609, 627, 628, 630]
p53	Ser 37	SPLPS <u>Q</u>	(?)	✓	[642]

MK5 fait partie de la famille de kinases MK qui comprend les RSK, MNK, MSK et MK [616]. Les kinases caractérisées de cette famille sont dites majoritairement basophiles, c'est-à-dire qu'elles phosphorylent préférentiellement des substrats qui ont une Arg ou Lys en position P-3. Par exemple, le domaine kinase en N-terminal de RSK phosphoryle les séquences consensus R-X-R-X-X-pS/pT, ou la sérine est préférée par rapport à la thréonine [694]. De même, les kinases MSK partagent la même séquence consensus minimale que RSK, soit R-X-X-pS [616].

Finalement, deux cribles de bibliothèques de peptides ont démontré que MK2 est également une kinase qui phosphoryle des séquences X-X-R-X-X-pS/pT mais qui a de petites préférences pour chacune des positions [519, 620]. Les substrats de MK2 les mieux caractérisés sont Cdc25B et C. Il n'existe, pour l'instant aucune évidence démontrant que MK3 ne phosphoryle pas des Ser situées dans la même séquence consensus que MK2 [695].

Le faible nombre de substrats de MK5 connus, nous empêche de tracer un portrait parfaitement clair des différentes fonctions qu'exerce MK5, autant sur le cycle cellulaire, sur la migration que lors du développement. Pour approfondir nos connaissances à ce niveau, différentes approches expérimentales devraient être envisagées dans le but d'identifier des nouveaux substrats de MK5. Les cribles d'interaction comme le système deux hybrides chez la levure ou la purification en tandem (*TAP*) ont l'avantage de permettre de trouver des partenaires qui interagissent fortement avec MK5. Les protéines identifiées peuvent autant être des régulateurs (activateurs, protéines d'échafaudage, etc.) que des substrats. Cependant, ces techniques ont un léger biais envers les protéines qui interagissent fortement les unes avec les autres. Deux autres approches visant directement l'identification de substrats pourrait être employées. Premièrement, on pourrait purifier les peptides phosphorylés sur une colonne IMAC (*Immobilized-metal affinity chromatography*) à partir de cellules dépourvues en MK5 (des MEF *Mk5*<sup>-/-</sup> par exemple) que l'on compare à ceux isolés de cellules normales. Dans ce cas, l'identité des peptides est obtenue après analyse par spectrométrie de masse. La spectrométrie de masse pourrait également être utilisée pour identifier des peptides phosphorylés par SILAC (*Stable isotope labeling by amino acids in cell culture*). Une autre méthode qui semble donner de bons résultats, mais qui n'a été que très peu utilisée est celle de Shokat (voir Section 4.1.3). Dans ce cas, il faudrait générer un mutant de MK5 afin d'agrandir le site de liaison de l'ATP (mutant MK5 V76A/M102A) pour lui permettre d'utiliser un analogue orthogonal de l'ATP. Les protéines phosphorylées avec cet ATP modifié peuvent alors être purifiées et identifiées par spectrométrie de masse.

### 4.2.3 Les fonctions cellulaires de MK5

MK5 a initialement été identifiée pour être activée par p38 en réponse à différents stress [617, 618]. Par la suite, il a été démontré que MK5, tout comme MK2, inhibe la transition en phase S de cellules qui surexpriment un mutant activé de Ras (Ha-Ras L61) [643]. Dans ce contexte cellulaire, il semble que MK2/5 inhibent la voie JNK et donc indirectement l'activité transcriptionnelle des facteurs AP-1. Dernièrement, MK5 a également été impliquée dans l'induction de la sénescence



induite par une forme Ras active (Ha-Ras V12) [642]. En fait, durant ce développement tumoral, le modèle proposé est que Ras active p38 qui phosphoryle MK5 qui, à son tour, phosphoryle et active le facteur de transcription p53. Paradoxalement, bien que MK2 représente la principale cible de p38 [518], elle joue un rôle complètement différent lors du développement des tumeurs. Souhaitant explorer l'importance de MK2 dans la formation de tumeurs cutanées, Johansen *et al.* ont observé qu'il n'y a pas de formation de papillomes chez les souris *Mk2<sup>-/-</sup>* puisque l'expression de p53 est augmentée en conséquence à l'inactivation de sa E3 ligase Mdm2 [696]. Ces données sont surprenantes puisqu'à priori, dans des fibroblastes en culture, MK2 et MK5 ont le même effet sur la prolifération. Il est important de noter que le rôle de suppresseur de tumeurs de MK5 est observé dans un protocole de traitement au DMBA à une étape, alors que le rôle « d'inducteur » de tumeurs de MK2 se manifeste suivant un protocole à deux étapes qui inclut l'administration de DMBA et TPA, un puissant agent inducteur [642, 696]. Dans un tel protocole, autant de tumeurs sont formées chez les souris *Mk5<sup>-/-</sup>* que chez les souris sauvage [642]. Ces résultats suggèrent donc que MK5 agit dans une voie qui intervient dans la formation des tumeurs induites par le DMBA. Un des effets du DMBA est d'induire des mutations dans *Ha-Ras*. Ces données suggèrent donc que dans des conditions semblables, mais non identiques, la voie Ras-p38 engage à la fois des mécanismes de promotion et suppression tumorales via MK2 ou MK5. Enfin, selon la nature du type cellulaire ou l'intensité de l'activation de Ras, il est probable que MK2 et MK5 puissent avoir des rôles similaires ou totalement opposés.

#### 4.2.3.1 Un frein pour l'entrée en mitose

Au cours de mes études doctorales, nous avons démontré pour la première fois que MK5 inhibe l'entrée en mitose sous certaines conditions. En fait, la surexpression ou la déplétion de MK5 dans des cellules HeLa en prolifération exponentielle ne modifie pas la distribution des phases du cycle cellulaire (Figure 3.3, p.1533). Cependant, et de façon intéressante, après avoir synchronisé les cellules à la transition G1/S, il s'avère que l'expression de MK5 ectopique ou la déplétion de MK5 endogène modifie la cinétique de progression en mitose (Figure 3.3, p.153). Ces

résultats démontrent ainsi que MK5 est un inhibiteur de la transition G2/M. Il est connu que MK2 est une composante des points de contrôles des transitions G1/S et G2/M de cellules soumises à des stress génotoxiques tels que la doxorubicine, les UV ou la cisplatine [513, 519]. Nous avons donc testé le rôle de MK5 dans des conditions de stress aussi « agressifs ». Il semble que, dans ces conditions, l'inhibition de MK5 n'affecte pas l'entrée en mitose (Figure 3.2 F, p.151). D'un autre côté, la cinétique d'entrée en mitose de cellules ayant subi un arrêt de la réplication est moins affectée par la surexpression de MK2 que par MK5 (Figure 3.1C, p.148). À la lumière de ces résultats, il est possible de proposer qu'une reconnexion (traduction libre de *rewiring*) s'effectue selon les contextes cellulaires pour freiner l'entrée en mitose. Ainsi, des cellules normales soumises à différents agents génotoxiques dépendent strictement de la voie Chk1-Cdc25 pour freiner l'entrée en mitose [513]. Cependant, le passage de la phase G2 à la mitose (ou l'entrée en phase S) de cellules déficientes en p53 ayant été soumises à des stress génotoxiques est contrôlé autant par la voie ATM/ATR-Chk1 que par p38/MK2. Cependant, le rôle de chacune des voies est différent. En effet, le groupe de M. Yaffe a démontré que Chk1 nucléaire est essentielle pour induire le point de contrôle et que la relocalisation de MK2 du noyau vers le cytoplasme est requise pour le maintenir sur une longue période [697]. Les auteurs de l'étude ont démontré que MK2 cytoplasmique phosphoryle la protéine liant l'ARNm hnRNPA0 et la ribonucléase PARN, menant à la stabilisation de l'ARNm de Gadd45 $\alpha$ , alors que p38 cytoplasmique phosphoryle et désactive l'inhibiteur de la traduction TIAR. L'expression de Gadd45 $\alpha$  est augmentée en réponse aux stress cellulaires et celle-ci favorise l'activation de MK2 par p38 [697]. Il a été proposé que cet effet de stabilisation de l'ARNm soit le mécanisme par lequel MK2 permet de maintenir le point de contrôle activé sur une longue période. De fait, il est à noter que l'expression d'un mutant cytoplasmique de Chk1 permet également de maintenir le point de contrôle sur une longue période. Ainsi, il est proposé qu'une kinase basophile est requise dans le cytoplasme pour maintenir la survie cellulaire suite à un dommage à l'ADN.

D'un autre côté, nous savons pour l'instant que dans des cellules déficientes en p53 fonctionnel (comme les HeLa) ayant subi un arrêt de la réplication, MK5

intervient pour ralentir, mais non pas complètement empêcher l'entrée en mitose de façon prématurée. Il semble que différentes kinases soient sollicitées pour contrôler la transition G2/M, selon que les cellules expriment ou non p53 et selon la nature et l'ampleur des lésions et de l'arrêt de la synthèse d'ADN.

#### 4.2.4 MK5, ERK3 et les dommages à l'ADN

L'activation de p38 et MK2 en réponse aux dommages à l'ADN causés par certains types d'agents mutagéniques (ex : la cisplatine, mais non pas les UV) nécessite que ATM et ATR soient fonctionnelles [513]. Toutefois, à la lumière des expériences réalisées pour déterminer l'importance de ATM et ATR dans l'activation de la voie p38-MK2, il est encore incertain que ATM soit réellement impliquée dans cette voie de signalisation. En fait, il a été démontré que les UV ou d'autres stress réplicatifs (tels que la cisplatine ou la camptothécine) induisent l'activation de ATM de manière ATR-dépendante [698]. Néanmoins, ces résultats démontrent que l'activation de p38, dans ce contexte, passe, du moins en partie, par l'activation d'une (ATR) ou des deux (ATM et ATR) kinases de stress.

De plus, il est connu qu'un des mécanismes par lequel les oncogènes, comme Ras, MYC ou STAT5 induisent la sénescence requiert l'engagement des voies ATM/ATR/Chk1-2 de réponse aux dommages à l'ADN [699-701]. En fait, l'expression de RasV12, ou de tout autre oncogène, provoque des dommages à l'ADN de différentes façons. Ainsi, les oncogènes induisent l'hyper-réplication (un stress réplicatif) causant des dommages à l'ADN et provoque également l'augmentation d'espèces oxygénées réactives (ROS, *reactive oxygen species*) qui introduisent des cassures simples et doubles brins [702]. Le fait que MK5 soit nécessaire pour induire la sénescence et qu'elle affecte la cinétique d'entrée en mitose après un arrêt de la réplication soulève plusieurs questions. Est-ce que l'absence de ATM ou ATR conduit à l'activation de MK5 dans des cellules qui surexpriment RasV12 ou dans des cellules qui ont subi un arrêt de la réplication? Est-ce que MK5 est un médiateur général de la sénescence ou si elle devient activée spécifiquement par certains oncogènes (comme Ras)? Une étude a déjà démontré que l'expression de l'oncogène B-RAF, qui peut induire la sénescence, conduit à la surexpression de

ERK3 [595, 703]. Donc, le rôle de ERK3 dans la sénescence devrait être étudié plus en détail, considérant qu'il est possible qu'une partie des effets de MK5 dans la sénescence passe par l'activation de ERK3 qui est surexprimée lorsque la voie Ras-Raf est fortement active.

Suite à l'expression d'un oncogène, certaines cellules « échappent » à la sénescence. Néanmoins, les stress réplicatifs provoqué par l'expression de l'oncogène persistent toujours dans ces cellules. Il a été démontré que de contourner les mécanismes de sénescence n'est pas en soi suffisant pour transformer une cellule primaire en cellule tumorale [704]. Par exemple, la surexpression du proto-oncogène MYC induit un arrêt des cellules en G2 de manière dépendante de p53 alors qu'elles progressent bien en phase G1 et S, suggérant que le point de contrôle en G2 contribue à la prévention de la transformation tumorale [705]. Dans ce contexte, il serait intéressant de vérifier si dans des cellules ayant échappé à la sénescence, MK5 est toujours activée et quel est l'effet de son inhibition sur la cinétique d'entrée en mitose. De même, nous pouvons imaginer que l'inhibition de MK5 pourrait entraîner les cellules en mitose de façon prématurée. L'accumulation d'erreurs provoquées par l'hyper-réplication au cours des divisions cellulaires pourrait ainsi entraîner la mort par apoptose en mitose (appelé *mitotic catastrophe*). Si tel est le cas, MK5 pourrait s'avérer être une cible à considérer dans le traitement de tumeurs.

L'étude du rôle de MK5 dans le contrôle de l'entrée en mitose a révélé que l'inhibition de ERK3 ou ERK4 par siRNA, de même que la surexpression de ERK4 (qui s'exprime beaucoup plus que ERK3), n'ont aucun effet sur la cinétique d'entrée des cellules en mitose (Figure 3.4, p.1555). Ces résultats nous ont amenés à conclure que MK5 n'agissait pas en aval de ERK3/ERK4 dans ce processus. De manière tout à fait intrigante, le laboratoire de N. Labrecque à l'hôpital Maisonneuve-Rosemont, en collaboration avec le laboratoire du Dr Meloche, a trouvé que ERK3 est impliquée dans le contrôle de l'accumulation des cassures double-brin durant le développement des cellules T (Marquis, M. et al. manuscrit en préparation). En effet, l'absence de ERK3 entraîne une réduction de 50 % du nombre de cellules CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> et une accumulation anormale de cassures doubles brins dans ces cellules. Lorsque les souris

*Erk3*<sup>-/-</sup> sont croisées avec les souris *Rag2*<sup>-/-</sup>, il y a restauration du nombre de cellules CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>. Dans les cellules B et T, il y a un vaste réarrangement de l'ADN, nommé *variable-diversity-joining (V(D)J) recombination*, qui est effectué dans le but de générer une multitude de récepteurs antigéniques. Les protéines RAG1 et RAG2 initient ce réarrangement en faisant des coupures doubles brins, qui sont par la suite réparées via le *classical nonhomologous end-joining (cNHEJ) pathway* [706]. L'ensemble de ces résultats suggère que ERK3 prévient les cassures doubles brins par RAG2. De façon surprenante, le contrôle du nombre de cellules CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> par ERK3 s'effectue indépendamment de l'activité MK5, alors que le contrôle de la différenciation des cellules CD4<sup>+</sup> par ERK3, quant à elle, semble dépendre de l'activité MK5.

Très certainement des études supplémentaires sont requises pour bien comprendre quelle est la relation exacte qui existe entre ERK3, MK5, les cassures à l'ADN, les causes de celles-ci et les régulateurs/activateurs impliqués. Ces études devront être réalisées afin de mieux comprendre le rôle du complexe MK5-ERK3/4. Il est possible que ces complexes de kinases interviennent lors de certains processus physiologiques qui restent à identifier et que dans certaines conditions de stress, l'activité de ce complexe ne soit pas requise.

## Conclusion

Au moment où j'ai entrepris mes études doctorales, plusieurs données dans la littérature reliaient la MAP kinase atypique ERK3 à la différenciation et la progression cellulaire. L'activité de ERK3 étant contrôlée de manière très différente de celle des autres membres de la famille des MAP kinases, il est important de bien comprendre ses mécanismes de régulation. Dans cette thèse, nous avons tout d'abord identifié un nouveau mécanisme de régulation de ERK3, proposant ainsi une relation supplémentaire entre cette kinase et le cycle cellulaire. En effet, nous avons démontré que l'extrémité C-terminale de ERK3 est hyperphosphorylée lors de la mitose par CDK1/cycline B sur quatre résidus. Cette phosphorylation est responsable de la stabilisation de ERK3 au cours de la mitose. Les fonctions cellulaires de ERK3 sont encore très peu définies. Le contrôle de ERK3 au cours de la mitose suggère qu'elle y exerce une fonction. En accord avec cette idée, des travaux récents dans la littérature démontrent que ERK3 est impliquée dans le contrôle de la transition métaphase-anaphase lors de la méiose. D'autres études devront être effectuées pour mieux comprendre les modes d'action de ERK3 lors de la phase G2/M.

Nos travaux ont également démontré pour la première fois un rôle de MK5 dans le contrôle de l'entrée en mitose. En effet, la transition G2/M de cellules ayant subi un arrêt de la réplication est ralenti par l'activité de MK5. Il semble que MK5 inhibe indirectement l'activité de CDK1. Nos données démontrent également que la surexpression de la phosphatase Cdc25A, identifiée comme nouveau substrat *in vitro* de MK5, abolit l'effet inhibiteur de MK5 sur l'entrée en mitose. Toutefois, des expériences supplémentaires sont requises pour mieux comprendre l'impact de la phosphorylation de MK5 sur l'activité de Cdc25A. L'ensemble de ces résultats suggèrent que MK5 est un acteur des mécanismes de contrôles qui ralentissent la progression dans le cycle lorsque celui-ci est perturbé.

En conclusion, il est permis de souhaiter que nos travaux proposent de nouvelles pistes d'études pour mieux comprendre les rôles encore peu définis des kinases ERK3/4-MK5.

## **BIBLIOGRAPHIE**

1. **Morgan, D.O.** (2007). *The Cell Cycle: Principles of Control*, (London: New Science Press).
2. **Luo, J., Solimini, N.L., and Elledge, S.J.** (2009). Principles of cancer therapy: oncogene and non-oncogene addiction. *Cell* **136**, 823-837.
3. **Hanahan, D., and Weinberg, R.A.** (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* **100**, 57-70.
4. **Branzei, D., and Foiani, M.** Maintaining genome stability at the replication fork. *Nat Rev Mol Cell Biol* **11**, 208-219.
5. **Bell, S.P., and Dutta, A.** (2002). DNA replication in eukaryotic cells. *Annu Rev Biochem* **71**, 333-374.
6. **Sclafani, R.A., and Holzen, T.M.** (2007). Cell cycle regulation of DNA replication. *Annu Rev Genet* **41**, 237-280.
7. **Losada, A., and Hirano, T.** (2005). Dynamic molecular linkers of the genome: the first decade of SMC proteins. *Genes Dev* **19**, 1269-1287.
8. **Bettencourt-Dias, M., and Glover, D.M.** (2007). Centrosome biogenesis and function: centrosomes brings new understanding. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**, 451-463.
9. **Acilan, C., and Saunders, W.S.** (2008). A tale of too many centrosomes. *Cell* **134**, 572-575.
10. **Nigg, E.A.** (2007). Centrosome duplication: of rules and licenses. *Trends Cell Biol* **17**, 215-221.
11. **Badano, J.L., Teslovich, T.M., and Katsanis, N.** (2005). The centrosome in human genetic disease. *Nat Rev Genet* **6**, 194-205.
12. **Sivan, G., and Elroy-Stein, O.** (2008). Regulation of mRNA Translation during cellular division. *Cell Cycle* **7**, 741-744.
13. **Pyronnet, S., and Sonenberg, N.** (2001). Cell-cycle-dependent translational control. *Curr Opin Genet Dev* **11**, 13-18.
14. **Shorter, J., and Warren, G.** (2002). Golgi architecture and inheritance. *Annu Rev Cell Dev Biol* **18**, 379-420.
15. **Pines, J., and Rieder, C.L.** (2001). Re-staging mitosis: a contemporary view of mitotic progression. *Nat Cell Biol* **3**, E3-6.
16. **Hirano, T.** (2005). Condensins: organizing and segregating the genome. *Curr Biol* **15**, R265-275.
17. **Cheeseman, I.M., and Desai, A.** (2008). Molecular architecture of the kinetochore-microtubule interface. *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**, 33-46.
18. **Swedlow, J.R., and Hirano, T.** (2003). The making of the mitotic chromosome: modern insights into classical questions. *Mol Cell* **11**, 557-569.
19. **Perez-Cadahia, B., Drohic, B., and Davie, J.R.** (2009). H3 phosphorylation: dual role in mitosis and interphase. *Biochem Cell Biol* **87**, 695-709.
20. **Guttinger, S., Laurell, E., and Kutay, U.** (2009). Orchestrating nuclear envelope disassembly and reassembly during mitosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* **10**, 178-191.
21. **Kutay, U., and Hetzer, M.W.** (2008). Reorganization of the nuclear envelope during open mitosis. *Curr Opin Cell Biol* **20**, 669-677.
22. **Walczak, C.E., Cai, S., and Khodjakov, A.** (2010) Mechanisms of chromosome behaviour during mitosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* **11**, 91-102.



23. **Nezi, L., and Musacchio, A.** (2009). Sister chromatid tension and the spindle assembly checkpoint. *Curr Opin Cell Biol* **21**, 785-795.
24. **Uhlmann, F., Lottspeich, F., and Nasmyth, K.** (1999). Sister-chromatid separation at anaphase onset is promoted by cleavage of the cohesin subunit Scc1. *Nature* **400**, 37-42.
25. **Nasmyth, K.** (2005). How do so few control so many? *Cell* **120**, 739-746.
26. **Pollard, T.D.** (2010) Mechanics of cytokinesis in eukaryotes. *Curr Opin Cell Biol* **22**, 50-56.
27. **Nigg, E.A.** (2001). Mitotic kinases as regulators of cell division and its checkpoints. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**, 21-32.
28. **Barr, F.A., and Gruneberg, U.** (2007). Cytokinesis: placing and making the final cut. *Cell* **131**, 847-860.
29. **Morgan, D.O.** (1997). Cyclin-dependent kinases: engines, clocks, and microprocessors. *Annu Rev Cell Dev Biol* **13**, 261-291.
30. **De Bondt, H.L., Rosenblatt, J., Jancarik, J., Jones, H.D., Morgan, D.O., and Kim, S.H.** (1993). Crystal structure of cyclin-dependent kinase 2. *Nature* **363**, 595-602.
31. **Malumbres, M., Harlow, E., Hunt, T., Hunter, T., Lahti, J.M., Manning, G., Morgan, D.O., Tsai, L.H., and Wolgemuth, D.J.** (2009). Cyclin-dependent kinases: a family portrait. *Nat Cell Biol* **11**, 1275-1276.
32. **Malumbres, M., and Barbacid, M.** (2005). Mammalian cyclin-dependent kinases. *Trends Biochem Sci* **30**, 630-641.
33. **Pavletich, N.P.** (1999). Mechanisms of cyclin-dependent kinase regulation: structures of Cdks, their cyclin activators, and Cip and INK4 inhibitors. *J Mol Biol* **287**, 821-828.
34. **Fisher, R.P.** (2005). Secrets of a double agent: CDK7 in cell-cycle control and transcription. *J Cell Sci* **118**, 5171-5180.
35. **Evans, T., Rosenthal, E.T., Youngblom, J., Distel, D., and Hunt, T.** (1983). Cyclin: a protein specified by maternal mRNA in sea urchin eggs that is destroyed at each cleavage division. *Cell* **33**, 389-396.
36. **Pines, J.** (1995). Cyclins and cyclin-dependent kinases: a biochemical view. *Biochem J* **308 ( Pt 3)**, 697-711.
37. **Gautier, J., Minshull, J., Lohka, M., Glotzer, M., Hunt, T., and Maller, J.L.** (1990). Cyclin is a component of maturation-promoting factor from *Xenopus*. *Cell* **60**, 487-494.
38. **Labbe, J.C., Capony, J.P., Caput, D., Cavadore, J.C., Derancourt, J., Kaghad, M., Lelias, J.M., Picard, A., and Doree, M.** (1989). MPF from starfish oocytes at first meiotic metaphase is a heterodimer containing one molecule of cdc2 and one molecule of cyclin B. *EMBO J* **8**, 3053-3058.
39. **Kobayashi, H., Stewart, E., Poon, R., Adamczewski, J.P., Gannon, J., and Hunt, T.** (1992). Identification of the domains in cyclin A required for binding to, and activation of, p34cdc2 and p32cdk2 protein kinase subunits. *Mol Biol Cell* **3**, 1279-1294.
40. **Lees, E.M., and Harlow, E.** (1993). Sequences within the conserved cyclin box of human cyclin A are sufficient for binding to and activation of cdc2 kinase. *Mol Cell Biol* **13**, 1194-1201.

41. **Jeffrey, P.D., Russo, A.A., Polyak, K., Gibbs, E., Hurwitz, J., Massague, J., and Pavletich, N.P.** (1995). Mechanism of CDK activation revealed by the structure of a cyclinA-CDK2 complex. *Nature* **376**, 313-320.
42. **Endicott, J.A., Noble, M.E., and Tucker, J.A.** (1999). Cyclin-dependent kinases: inhibition and substrate recognition. *Curr Opin Struct Biol* **9**, 738-744.
43. **Richardson, H.E., Stueland, C.S., Thomas, J., Russell, P., and Reed, S.I.** (1990). Human cDNAs encoding homologs of the small p34Cdc28/Cdc2-associated protein of *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe*. *Genes Dev* **4**, 1332-1344.
44. **Bourne, Y., Watson, M.H., Hickey, M.J., Holmes, W., Rocque, W., Reed, S.I., and Tainer, J.A.** (1996). Crystal structure and mutational analysis of the human CDK2 kinase complex with cell cycle-regulatory protein CksHs1. *Cell* **84**, 863-874.
45. **Patra, D., and Dunphy, W.G.** (1996). Xe-p9, a *Xenopus* Suc1/Cks homolog, has multiple essential roles in cell cycle control. *Genes Dev* **10**, 1503-1515.
46. **Sherr, C.J., and Roberts, J.M.** (1999). CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev* **13**, 1501-1512.
47. **Spruck, C., Strohmaier, H., Watson, M., Smith, A.P., Ryan, A., Krek, T.W., and Reed, S.I.** (2001). A CDK-independent function of mammalian Cks1: targeting of SCF(Skp2) to the CDK inhibitor p27Kip1. *Mol Cell* **7**, 639-650.
48. **Ganoth, D., Bornstein, G., Ko, T.K., Larsen, B., Tyers, M., Pagano, M., and Hershko, A.** (2001). The cell-cycle regulatory protein Cks1 is required for SCF(Skp2)-mediated ubiquitinylation of p27. *Nat Cell Biol* **3**, 321-324.
49. **Spruck, C.H., de Miguel, M.P., Smith, A.P., Ryan, A., Stein, P., Schultz, R.M., Lincoln, A.J., Donovan, P.J., and Reed, S.I.** (2003). Requirement of Cks2 for the first metaphase/anaphase transition of mammalian meiosis. *Science* **300**, 647-650.
50. **Martinsson-Ahlzen, H.S., Liberal, V., Grunfelder, B., Chaves, S.R., Spruck, C.H., and Reed, S.I.** (2008). Cyclin-dependent kinase-associated proteins Cks1 and Cks2 are essential during early embryogenesis and for cell cycle progression in somatic cells. *Mol Cell Biol* **28**, 5698-5709.
51. **Xiong, Y., Zhang, H., and Beach, D.** (1993). Subunit rearrangement of the cyclin-dependent kinases is associated with cellular transformation. *Genes Dev* **7**, 1572-1583.
52. **Harper, J.W., and Elledge, S.J.** (1996). Cdk inhibitors in development and cancer. *Curr Opin Genet Dev* **6**, 56-64.
53. **Pei, X.H., and Xiong, Y.** (2005). Biochemical and cellular mechanisms of mammalian CDK inhibitors: a few unresolved issues. *Oncogene* **24**, 2787-2795.
54. **Niculescu, A.B., 3rd, Chen, X., Smeets, M., Hengst, L., Prives, C., and Reed, S.I.** (1998). Effects of p21(Cip1/Waf1) at both the G1/S and the G2/M cell cycle transitions: pRb is a critical determinant in blocking DNA replication and in preventing endoreduplication. *Mol Cell Biol* **18**, 629-643.

55. **Medema, R.H., Klompaker, R., Smits, V.A., and Rijksen, G.** (1998). p21<sup>waf1</sup> can block cells at two points in the cell cycle, but does not interfere with processive DNA-replication or stress-activated kinases. *Oncogene* **16**, 431-441.
56. **Bunz, F., Dutriaux, A., Lengauer, C., Waldman, T., Zhou, S., Brown, J.P., Sedivy, J.M., Kinzler, K.W., and Vogelstein, B.** (1998). Requirement for p53 and p21 to sustain G2 arrest after DNA damage. *Science* **282**, 1497-1501.
57. **Bates, S., Ryan, K.M., Phillips, A.C., and Vousden, K.H.** (1998). Cell cycle arrest and DNA endoreduplication following p21<sup>Waf1/Cip1</sup> expression. *Oncogene* **17**, 1691-1703.
58. **Dulic, V., Stein, G.H., Far, D.F., and Reed, S.I.** (1998). Nuclear accumulation of p21<sup>Cip1</sup> at the onset of mitosis: a role at the G2/M-phase transition. *Mol Cell Biol* **18**, 546-557.
59. **Nakayama, K., Nagahama, H., Minamishima, Y.A., Miyake, S., Ishida, N., Hatakeyama, S., Kitagawa, M., Iemura, S., Natsume, T., and Nakayama, K.I.** (2004). Skp2-mediated degradation of p27 regulates progression into mitosis. *Dev Cell* **6**, 661-672.
60. **LaBaer, J., Garrett, M.D., Stevenson, L.F., Slingerland, J.M., Sandhu, C., Chou, H.S., Fattaey, A., and Harlow, E.** (1997). New functional activities for the p21 family of CDK inhibitors. *Genes Dev* **11**, 847-862.
61. **Cheng, M., Olivier, P., Diehl, J.A., Fero, M., Roussel, M.F., Roberts, J.M., and Sherr, C.J.** (1999). The p21<sup>(Cip1)</sup> and p27<sup>(Kip1)</sup> CDK 'inhibitors' are essential activators of cyclin D-dependent kinases in murine fibroblasts. *EMBO J* **18**, 1571-1583.
62. **Sandhu, C., Garbe, J., Bhattacharya, N., Daksis, J., Pan, C.H., Yaswen, P., Koh, J., Slingerland, J.M., and Stampfer, M.R.** (1997). Transforming growth factor beta stabilizes p15<sup>INK4B</sup> protein, increases p15<sup>INK4B</sup>-cdk4 complexes, and inhibits cyclin D1-cdk4 association in human mammary epithelial cells. *Mol Cell Biol* **17**, 2458-2467.
63. **Reynisdottir, I., Polyak, K., Iavarone, A., and Massague, J.** (1995). Kip/Cip and Ink4 Cdk inhibitors cooperate to induce cell cycle arrest in response to TGF-beta. *Genes Dev* **9**, 1831-1845.
64. **Giacinti, C., and Giordano, A.** (2006). RB and cell cycle progression. *Oncogene* **25**, 5220-5227.
65. **Cobrinik, D.** (2005). Pocket proteins and cell cycle control. *Oncogene* **24**, 2796-2809.
66. **Dyson, N.** (1998). The regulation of E2F by pRB-family proteins. *Genes Dev* **12**, 2245-2262.
67. **Weinberg, R.A.** (1995). The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell* **81**, 323-330.
68. **Lukas, J., Bartkova, J., Rohde, M., Strauss, M., and Bartek, J.** (1995). Cyclin D1 is dispensable for G1 control in retinoblastoma gene-deficient cells independently of cdk4 activity. *Mol Cell Biol* **15**, 2600-2611.

69. **Koh, J., Enders, G.H., Dynlacht, B.D., and Harlow, E.** (1995). Tumour-derived p16 alleles encoding proteins defective in cell-cycle inhibition. *Nature* **375**, 506-510.
70. **Medema, R.H., Herrera, R.E., Lam, F., and Weinberg, R.A.** (1995). Growth suppression by p16ink4 requires functional retinoblastoma protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 6289-6293.
71. **Lukas, J., Parry, D., Aagaard, L., Mann, D.J., Bartkova, J., Strauss, M., Peters, G., and Bartek, J.** (1995). Retinoblastoma-protein-dependent cell-cycle inhibition by the tumour suppressor p16. *Nature* **375**, 503-506.
72. **Santamaria, D., Barriere, C., Cerqueira, A., Hunt, S., Tardy, C., Newton, K., Caceres, J.F., Dubus, P., Malumbres, M., and Barbacid, M.** (2007). Cdk1 is sufficient to drive the mammalian cell cycle. *Nature* **448**, 811-815.
73. **Wood, V., Gwilliam, R., Rajandream, M.A., Lyne, M., Lyne, R., Stewart, A., Sgouros, J., Peat, N., Hayles, J., Baker, S., et al.** (2002). The genome sequence of *Schizosaccharomyces pombe*. *Nature* **415**, 871-880.
74. **Hwang, H.C., and Clurman, B.E.** (2005). Cyclin E in normal and neoplastic cell cycles. *Oncogene* **24**, 2776-2786.
75. **Lundberg, A.S., and Weinberg, R.A.** (1998). Functional inactivation of the retinoblastoma protein requires sequential modification by at least two distinct cyclin-cdk complexes. *Mol Cell Biol* **18**, 753-761.
76. **Harbour, J.W., Luo, R.X., Dei Santi, A., Postigo, A.A., and Dean, D.C.** (1999). Cdk phosphorylation triggers sequential intramolecular interactions that progressively block Rb functions as cells move through G1. *Cell* **98**, 859-869.
77. **Pagano, M., Pepperkok, R., Verde, F., Ansorge, W., and Draetta, G.** (1992). Cyclin A is required at two points in the human cell cycle. *EMBO J* **11**, 961-971.
78. **Pagano, M., Pepperkok, R., Lukas, J., Baldin, V., Ansorge, W., Bartek, J., and Draetta, G.** (1993). Regulation of the cell cycle by the cdk2 protein kinase in cultured human fibroblasts. *J Cell Biol* **121**, 101-111.
79. **Rosenblatt, J., Gu, Y., and Morgan, D.O.** (1992). Human cyclin-dependent kinase 2 is activated during the S and G2 phases of the cell cycle and associates with cyclin A. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 2824-2828.
80. **Yam, C.H., Fung, T.K., and Poon, R.Y.** (2002). Cyclin A in cell cycle control and cancer. *Cell Mol Life Sci* **59**, 1317-1326.
81. **Dynlacht, B.D., Flores, O., Lees, J.A., and Harlow, E.** (1994). Differential regulation of E2F transactivation by cyclin/cdk2 complexes. *Genes Dev* **8**, 1772-1786.
82. **Krek, W., Ewen, M.E., Shirodkar, S., Arany, Z., Kaelin, W.G., Jr., and Livingston, D.M.** (1994). Negative regulation of the growth-promoting transcription factor E2F-1 by a stably bound cyclin A-dependent protein kinase. *Cell* **78**, 161-172.
83. **Xu, M., Sheppard, K.A., Peng, C.Y., Yee, A.S., and Piwnicka-Worms, H.** (1994). Cyclin A/CDK2 binds directly to E2F-1 and inhibits the DNA-binding activity of E2F-1/DP-1 by phosphorylation. *Mol Cell Biol* **14**, 8420-8431.

84. **Furuno, N., den Elzen, N., and Pines, J.** (1999). Human cyclin A is required for mitosis until mid prophase. *J Cell Biol* **147**, 295-306.
85. **Cardozo, T., and Pagano, M.** (2004). The SCF ubiquitin ligase: insights into a molecular machine. *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**, 739-751.
86. **Petroski, M.D., and Deshaies, R.J.** (2005). Function and regulation of cullin-RING ubiquitin ligases. *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**, 9-20.
87. **Deshaies, R.J., and Joazeiro, C.A.** (2009). RING domain E3 ubiquitin ligases. *Annu Rev Biochem* **78**, 399-434.
88. **Zheng, N., Schulman, B.A., Song, L., Miller, J.J., Jeffrey, P.D., Wang, P., Chu, C., Koepp, D.M., Elledge, S.J., Pagano, M., et al.** (2002). Structure of the Cull1-Rbx1-Skp1-F boxSkp2 SCF ubiquitin ligase complex. *Nature* **416**, 703-709.
89. **Merlet, J., Burger, J., Gomes, J.E., and Pintard, L.** (2009). Regulation of cullin-RING E3 ubiquitin-ligases by neddylation and dimerization. *Cell Mol Life Sci* **66**, 1924-1938.
90. **Yamoah, K., Oashi, T., Sarikas, A., Gazdoiu, S., Osman, R., and Pan, Z.Q.** (2008). Autoinhibitory regulation of SCF-mediated ubiquitination by human cullin 1's C-terminal tail. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 12230-12235.
91. **Saha, A., and Deshaies, R.J.** (2008). Multimodal activation of the ubiquitin ligase SCF by Nedd8 conjugation. *Mol Cell* **32**, 21-31.
92. **Jin, J., Cardozo, T., Lovering, R.C., Elledge, S.J., Pagano, M., and Harper, J.W.** (2004). Systematic analysis and nomenclature of mammalian F-box proteins. *Genes Dev* **18**, 2573-2580.
93. **Reed, S.I.** (2003). Ratchets and clocks: the cell cycle, ubiquitylation and protein turnover. *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**, 855-864.
94. **Peters, J.M.** (2006). The anaphase promoting complex/cyclosome: a machine designed to destroy. *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**, 644-656.
95. **Dube, P., Herzog, F., Gieffers, C., Sander, B., Riedel, D., Muller, S.A., Engel, A., Peters, J.M., and Stark, H.** (2005). Localization of the coactivator Cdh1 and the cullin subunit Apc2 in a cryo-electron microscopy model of vertebrate APC/C. *Mol Cell* **20**, 867-879.
96. **Fuchs, S.Y., Spiegelman, V.S., and Kumar, K.G.** (2004). The many faces of beta-TrCP E3 ubiquitin ligases: reflections in the magic mirror of cancer. *Oncogene* **23**, 2028-2036.
97. **van Leuken, R., Clijsters, L., and Wolthuis, R.** (2008). To cell cycle, swing the APC/C. *Biochim Biophys Acta* **1786**, 49-59.
98. **Tang, Z., Li, B., Bharadwaj, R., Zhu, H., Ozkan, E., Hakala, K., Deisenhofer, J., and Yu, H.** (2001). APC2 Cullin protein and APC11 RING protein comprise the minimal ubiquitin ligase module of the anaphase-promoting complex. *Mol Biol Cell* **12**, 3839-3851.
99. **Gmachl, M., Gieffers, C., Podtelejnikov, A.V., Mann, M., and Peters, J.M.** (2000). The RING-H2 finger protein APC11 and the E2 enzyme UBC4 are sufficient to ubiquitinate substrates of the anaphase-promoting complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 8973-8978.
100. **Glotzer, M., Murray, A.W., and Kirschner, M.W.** (1991). Cyclin is degraded by the ubiquitin pathway. *Nature* **349**, 132-138.

101. **Pfleger, C.M., and Kirschner, M.W.** (2000). The KEN box: an APC recognition signal distinct from the D box targeted by Cdh1. *Genes Dev* **14**, 655-665.
102. **Littlepage, L.E., and Ruderman, J.V.** (2002). Identification of a new APC/C recognition domain, the A box, which is required for the Cdh1-dependent destruction of the kinase Aurora-A during mitotic exit. *Genes Dev* **16**, 2274-2285.
103. **Passmore, L.A., McCormack, E.A., Au, S.W., Paul, A., Willison, K.R., Harper, J.W., and Barford, D.** (2003). Doc1 mediates the activity of the anaphase-promoting complex by contributing to substrate recognition. *EMBO J* **22**, 786-796.
104. **Carroll, C.W., and Morgan, D.O.** (2002). The Doc1 subunit is a processivity factor for the anaphase-promoting complex. *Nat Cell Biol* **4**, 880-887.
105. **Rudner, A.D., and Murray, A.W.** (2000). Phosphorylation by Cdc28 activates the Cdc20-dependent activity of the anaphase-promoting complex. *J Cell Biol* **149**, 1377-1390.
106. **Kraft, C., Herzog, F., Gieffers, C., Mechtler, K., Hagting, A., Pines, J., and Peters, J.M.** (2003). Mitotic regulation of the human anaphase-promoting complex by phosphorylation. *EMBO J* **22**, 6598-6609.
107. **Kramer, E.R., Scheuringer, N., Podtelejnikov, A.V., Mann, M., and Peters, J.M.** (2000). Mitotic regulation of the APC activator proteins CDC20 and CDH1. *Mol Biol Cell* **11**, 1555-1569.
108. **Musacchio, A., and Salmon, E.D.** (2007). The spindle-assembly checkpoint in space and time. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**, 379-393.
109. **Di Fiore, B., and Pines, J.** (2008). Defining the role of Emi1 in the DNA replication-segregation cycle. *Chromosoma* **117**, 333-338.
110. **Mailand, N., and Diffley, J.F.** (2005). CDKs promote DNA replication origin licensing in human cells by protecting Cdc6 from APC/C-dependent proteolysis. *Cell* **122**, 915-926.
111. **Rodier, G., Coulombe, P., Tanguay, P.L., Boutonnet, C., and Meloche, S.** (2008). Phosphorylation of Skp2 regulated by CDK2 and Cdc14B protects it from degradation by APC(Cdh1) in G1 phase. *EMBO J* **27**, 679-691.
112. **Wang, H., Liu, D., Wang, Y., Qin, J., and Elledge, S.J.** (2001). Pds1 phosphorylation in response to DNA damage is essential for its DNA damage checkpoint function. *Genes Dev* **15**, 1361-1372.
113. **Harley, M.E., Allan, L.A., Sanderson, H.S., and Clarke, P.R.** (2010). Phosphorylation of Mcl-1 by CDK1-cyclin B1 initiates its Cdc20-dependent destruction during mitotic arrest. *EMBO J* **29**, 2407-20
114. **Biggs, J.R., Peterson, L.F., Zhang, Y., Kraft, A.S., and Zhang, D.E.** (2006). AML1/RUNX1 phosphorylation by cyclin-dependent kinases regulates the degradation of AML1/RUNX1 by the anaphase-promoting complex. *Mol Cell Biol* **26**, 7420-7429.
115. **Nakayama, K.I., and Nakayama, K.** (2005). Regulation of the cell cycle by SCF-type ubiquitin ligases. *Semin Cell Dev Biol* **16**, 323-333.

116. **Manchado, E., Eguren, M., and Malumbres, M.** (2010). The anaphase-promoting complex/cyclosome (APC/C): cell-cycle-dependent and -independent functions. *Biochem Soc Trans* **38**, 65-71.
117. **Frescas, D., and Pagano, M.** (2008). Deregulated proteolysis by the F-box proteins SKP2 and beta-TrCP: tipping the scales of cancer. *Nat Rev Cancer* **8**, 438-449.
118. **Ho, M.S., Ou, C., Chan, Y.R., Chien, C.T., and Pi, H.** (2008). The utility F-box for protein destruction. *Cell Mol Life Sci* **65**, 1977-2000.
119. **McGarry, T.J., and Kirschner, M.W.** (1998). Geminin, an inhibitor of DNA replication, is degraded during mitosis. *Cell* **93**, 1043-1053.
120. **Diffley, J.F.** (2004). Regulation of early events in chromosome replication. *Curr Biol* **14**, R778-786.
121. **Petersen, B.O., Wagener, C., Marinoni, F., Kramer, E.R., Melixetian, M., Lazzarini Denchi, E., Gieffers, C., Matteucci, C., Peters, J.M., and Helin, K.** (2000). Cell cycle- and cell growth-regulated proteolysis of mammalian CDC6 is dependent on APC-CDH1. *Genes Dev* **14**, 2330-2343.
122. **Bashir, T., Dorrello, N.V., Amador, V., Guardavaccaro, D., and Pagano, M.** (2004). Control of the SCF(Skp2-Cks1) ubiquitin ligase by the APC/C(Cdh1) ubiquitin ligase. *Nature* **428**, 190-193.
123. **Wei, W., Ayad, N.G., Wan, Y., Zhang, G.J., Kirschner, M.W., and Kaelin, W.G., Jr.** (2004). Degradation of the SCF component Skp2 in cell-cycle phase G1 by the anaphase-promoting complex. *Nature* **428**, 194-198.
124. **Sheaff, R.J., Groudine, M., Gordon, M., Roberts, J.M., and Clurman, B.E.** (1997). Cyclin E-CDK2 is a regulator of p27Kip1. *Genes Dev* **11**, 1464-1478.
125. **Vlach, J., Hennecke, S., and Amati, B.** (1997). Phosphorylation-dependent degradation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27. *EMBO J* **16**, 5334-5344.
126. **Carrano, A.C., Eytan, E., Hershko, A., and Pagano, M.** (1999). SKP2 is required for ubiquitin-mediated degradation of the CDK inhibitor p27. *Nat Cell Biol* **1**, 193-199.
127. **Sutterluty, H., Chatelain, E., Marti, A., Wirbelauer, C., Senften, M., Muller, U., and Krek, W.** (1999). p45SKP2 promotes p27Kip1 degradation and induces S phase in quiescent cells. *Nat Cell Biol* **1**, 207-214.
128. **Nakayama, K., Nagahama, H., Minamishima, Y.A., Matsumoto, M., Nakamichi, I., Kitagawa, K., Shirane, M., Tsunematsu, R., Tsukiyama, T., Ishida, N., et al.** (2000). Targeted disruption of Skp2 results in accumulation of cyclin E and p27(Kip1), polyploidy and centrosome overduplication. *EMBO J* **19**, 2069-2081.
129. **Kossatz, U., Dietrich, N., Zender, L., Buer, J., Manns, M.P., and Malek, N.P.** (2004). Skp2-dependent degradation of p27kip1 is essential for cell cycle progression. *Genes Dev* **18**, 2602-2607.
130. **Koepp, D.M., Schaefer, L.K., Ye, X., Keyomarsi, K., Chu, C., Harper, J.W., and Elledge, S.J.** (2001). Phosphorylation-dependent ubiquitination of cyclin E by the SCFFbw7 ubiquitin ligase. *Science* **294**, 173-177.

131. **Welcker, M., Singer, J., Loeb, K.R., Grim, J., Bloecher, A., Gurien-West, M., Clurman, B.E., and Roberts, J.M.** (2003). Multisite phosphorylation by Cdk2 and GSK3 controls cyclin E degradation. *Mol Cell* **12**, 381-392.
132. **Geley, S., Kramer, E., Gieffers, C., Gannon, J., Peters, J.M., and Hunt, T.** (2001). Anaphase-promoting complex/cyclosome-dependent proteolysis of human cyclin A starts at the beginning of mitosis and is not subject to the spindle assembly checkpoint. *J Cell Biol* **153**, 137-148.
133. **Huang, J.N., Park, I., Ellingson, E., Littlepage, L.E., and Pellman, D.** (2001). Activity of the APC(Cdh1) form of the anaphase-promoting complex persists until S phase and prevents the premature expression of Cdc20p. *J Cell Biol* **154**, 85-94.
134. **Jaspersen, S.L., Charles, J.F., and Morgan, D.O.** (1999). Inhibitory phosphorylation of the APC regulator Hct1 is controlled by the kinase Cdc28 and the phosphatase Cdc14. *Curr Biol* **9**, 227-236.
135. **Zachariae, W., Schwab, M., Nasmyth, K., and Seufert, W.** (1998). Control of cyclin ubiquitination by CDK-regulated binding of Hct1 to the anaphase promoting complex. *Science* **282**, 1721-1724.
136. **Rape, M., and Kirschner, M.W.** (2004). Autonomous regulation of the anaphase-promoting complex couples mitosis to S-phase entry. *Nature* **432**, 588-595.
137. **Walker, A., Acquaviva, C., Matsusaka, T., Koop, L., and Pines, J.** (2008). UbcH10 has a rate-limiting role in G1 phase but might not act in the spindle checkpoint or as part of an autonomous oscillator. *J Cell Sci* **121**, 2319-2326.
138. **Hsu, J.Y., Reimann, J.D., Sorensen, C.S., Lukas, J., and Jackson, P.K.** (2002). E2F-dependent accumulation of hEmi1 regulates S phase entry by inhibiting APC(Cdh1). *Nat Cell Biol* **4**, 358-366.
139. **Miller, J.J., Summers, M.K., Hansen, D.V., Nachury, M.V., Lehman, N.L., Loktev, A., and Jackson, P.K.** (2006). Emi1 stably binds and inhibits the anaphase-promoting complex/cyclosome as a pseudosubstrate inhibitor. *Genes Dev* **20**, 2410-2420.
140. **Reimann, J.D., Freed, E., Hsu, J.Y., Kramer, E.R., Peters, J.M., and Jackson, P.K.** (2001). Emi1 is a mitotic regulator that interacts with Cdc20 and inhibits the anaphase promoting complex. *Cell* **105**, 645-655.
141. **Hansen, D.V., Loktev, A.V., Ban, K.H., and Jackson, P.K.** (2004). Plk1 regulates activation of the anaphase promoting complex by phosphorylating and triggering SCFbetaTrCP-dependent destruction of the APC Inhibitor Emi1. *Mol Biol Cell* **15**, 5623-5634.
142. **Moshe, Y., Boulaire, J., Pagano, M., and Hershko, A.** (2004). Role of Polo-like kinase in the degradation of early mitotic inhibitor 1, a regulator of the anaphase promoting complex/cyclosome. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 7937-7942.
143. **Fry, A.M., and Yamano, H.** (2006). APC/C-mediated degradation in early mitosis: how to avoid spindle assembly checkpoint inhibition. *Cell Cycle* **5**, 1487-1491.



144. **Hayes, M.J., Kimata, Y., Wattam, S.L., Lindon, C., Mao, G., Yamano, H., and Fry, A.M.** (2006). Early mitotic degradation of Nek2A depends on Cdc20-independent interaction with the APC/C. *Nat Cell Biol* **8**, 607-614.
145. **Amador, V., Ge, S., Santamaria, P.G., Guardavaccaro, D., and Pagano, M.** (2007). APC/C(Cdc20) controls the ubiquitin-mediated degradation of p21 in prometaphase. *Mol Cell* **27**, 462-473.
146. **Rape, M., Reddy, S.K., and Kirschner, M.W.** (2006). The processivity of multiubiquitination by the APC determines the order of substrate degradation. *Cell* **124**, 89-103.
147. **Stemmann, O., Zou, H., Gerber, S.A., Gygi, S.P., and Kirschner, M.W.** (2001). Dual inhibition of sister chromatid separation at metaphase. *Cell* **107**, 715-726.
148. **Bharadwaj, R., and Yu, H.** (2004). The spindle checkpoint, aneuploidy, and cancer. *Oncogene* **23**, 2016-2027.
149. **Fang, G., Yu, H., and Kirschner, M.W.** (1998). The checkpoint protein MAD2 and the mitotic regulator CDC20 form a ternary complex with the anaphase-promoting complex to control anaphase initiation. *Genes Dev* **12**, 1871-1883.
150. **Tang, Z., Bharadwaj, R., Li, B., and Yu, H.** (2001). Mad2-Independent inhibition of APCCdc20 by the mitotic checkpoint protein BubR1. *Dev Cell* **1**, 227-237.
151. **Guardavaccaro, D., Frescas, D., Dorrello, N.V., Peschiaroli, A., Multani, A.S., Cardozo, T., Lasorella, A., Iavarone, A., Chang, S., Hernando, E., et al.** (2008). Control of chromosome stability by the beta-TrCP-REST-Mad2 axis. *Nature* **452**, 365-369.
152. **Tang, Z., Shu, H., Oncel, D., Chen, S., and Yu, H.** (2004). Phosphorylation of Cdc20 by Bub1 provides a catalytic mechanism for APC/C inhibition by the spindle checkpoint. *Mol Cell* **16**, 387-397.
153. **Pan, J., and Chen, R.H.** (2004). Spindle checkpoint regulates Cdc20p stability in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev* **18**, 1439-1451.
154. **Reddy, S.K., Rape, M., Margansky, W.A., and Kirschner, M.W.** (2007). Ubiquitination by the anaphase-promoting complex drives spindle checkpoint inactivation. *Nature* **446**, 921-925.
155. **Suijkerbuijk, S.J., and Kops, G.J.** (2008). Preventing aneuploidy: the contribution of mitotic checkpoint proteins. *Biochim Biophys Acta* **1786**, 24-31.
156. **Doree, M., and Hunt, T.** (2002). From Cdc2 to Cdk1: when did the cell cycle kinase join its cyclin partner? *J Cell Sci* **115**, 2461-2464.
157. **Lohka, M.J., Hayes, M.K., and Maller, J.L.** (1988). Purification of maturation-promoting factor, an intracellular regulator of early mitotic events. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**, 3009-3013.
158. **Lee, M.G., and Nurse, P.** (1987). Complementation used to clone a human homologue of the fission yeast cell cycle control gene *cdc2*. *Nature* **327**, 31-35.

159. **Labbe, J.C., Lee, M.G., Nurse, P., Picard, A., and Doree, M.** (1988). Activation at M-phase of a protein kinase encoded by a starfish homologue of the cell cycle control gene *cdc2+*. *Nature* **335**, 251-254.
160. **Murray, A.W., and Kirschner, M.W.** (1989). Cyclin synthesis drives the early embryonic cell cycle. *Nature* **339**, 275-280.
161. **Murray, A.W., Solomon, M.J., and Kirschner, M.W.** (1989). The role of cyclin synthesis and degradation in the control of maturation promoting factor activity. *Nature* **339**, 280-286.
162. **Wasner, M., Tschop, K., Spiesbach, K., Haugwitz, U., Johne, C., Mossner, J., Mantovani, R., and Engeland, K.** (2003). Cyclin B1 transcription is enhanced by the p300 coactivator and regulated during the cell cycle by a CHR-dependent repression mechanism. *FEBS Lett* **536**, 66-70.
163. **Zhu, W., Giangrande, P.H., and Nevins, J.R.** (2004). E2Fs link the control of G1/S and G2/M transcription. *EMBO J* **23**, 4615-4626.
164. **Wasner, M., Haugwitz, U., Reinhard, W., Tschop, K., Spiesbach, K., Lorenz, J., Mossner, J., and Engeland, K.** (2003). Three CCAAT-boxes and a single cell cycle genes homology region (CHR) are the major regulating sites for transcription from the human cyclin B2 promoter. *Gene* **312**, 225-237.
165. **Sciortino, S., Gurtner, A., Manni, I., Fontemaggi, G., Dey, A., Sacchi, A., Ozato, K., and Piaggio, G.** (2001). The cyclin B1 gene is actively transcribed during mitosis in HeLa cells. *EMBO Rep* **2**, 1018-1023.
166. **Laoukili, J., Kooistra, M.R., Bras, A., Kauw, J., Kerkhoven, R.M., Morrison, A., Clevers, H., and Medema, R.H.** (2005). FoxM1 is required for execution of the mitotic programme and chromosome stability. *Nat Cell Biol* **7**, 126-136.
167. **Joaquin, M., and Watson, R.J.** (2003). Cell cycle regulation by the B-Myb transcription factor. *Cell Mol Life Sci* **60**, 2389-2401.
168. **Laoukili, J., Alvarez, M., Meijer, L.A., Stahl, M., Mohammed, S., Kleij, L., Heck, A.J., and Medema, R.H.** (2008). Activation of FoxM1 during G2 requires cyclin A/Cdk-dependent relief of autorepression by the FoxM1 N-terminal domain. *Mol Cell Biol* **28**, 3076-3087.
169. **Chae, H.D., Yun, J., Bang, Y.J., and Shin, D.Y.** (2004). Cdk2-dependent phosphorylation of the NF-Y transcription factor is essential for the expression of the cell cycle-regulatory genes and cell cycle G1/S and G2/M transitions. *Oncogene* **23**, 4084-4088.
170. **Saville, M.K., and Watson, R.J.** (1998). The cell-cycle regulated transcription factor B-Myb is phosphorylated by cyclin A/Cdk2 at sites that enhance its transactivation properties. *Oncogene* **17**, 2679-2689.
171. **Ziebold, U., Bartsch, O., Marais, R., Ferrari, S., and Klempnauer, K.H.** (1997). Phosphorylation and activation of B-Myb by cyclin A-Cdk2. *Curr Biol* **7**, 253-260.
172. **Lindqvist, A., Rodriguez-Bravo, V., and Medema, R.H.** (2009). The decision to enter mitosis: feedback and redundancy in the mitotic entry network. *J Cell Biol* **185**, 193-202.

173. **Fung, T.K., and Poon, R.Y.** (2005). A roller coaster ride with the mitotic cyclins. *Semin Cell Dev Biol* **16**, 335-342.
174. **Bassermann, F., von Klitzing, C., Munch, S., Bai, R.Y., Kawaguchi, H., Morris, S.W., Peschel, C., and Duyster, J.** (2005). NIPA defines an SCF-type mammalian E3 ligase that regulates mitotic entry. *Cell* **122**, 45-57.
175. **Bassermann, F., von Klitzing, C., Illert, A.L., Munch, S., Morris, S.W., Pagano, M., Peschel, C., and Duyster, J.** (2007). Multisite phosphorylation of nuclear interaction partner of ALK (NIPA) at G2/M involves cyclin B1/Cdk1. *J Biol Chem* **282**, 15965-15972.
176. **Pines, J., and Hunter, T.** (1991). Human cyclins A and B1 are differentially located in the cell and undergo cell cycle-dependent nuclear transport. *J Cell Biol* **115**, 1-17.
177. **Pines, J., and Hunter, T.** (1994). The differential localization of human cyclins A and B is due to a cytoplasmic retention signal in cyclin B. *EMBO J* **13**, 3772-3781.
178. **Hagting, A., Karlsson, C., Clute, P., Jackman, M., and Pines, J.** (1998). MPF localization is controlled by nuclear export. *EMBO J* **17**, 4127-4138.
179. **Toyoshima, F., Moriguchi, T., Wada, A., Fukuda, M., and Nishida, E.** (1998). Nuclear export of cyclin B1 and its possible role in the DNA damage-induced G2 checkpoint. *EMBO J* **17**, 2728-2735.
180. **Yang, J., Bardes, E.S., Moore, J.D., Brennan, J., Powers, M.A., and Kornbluth, S.** (1998). Control of cyclin B1 localization through regulated binding of the nuclear export factor CRM1. *Genes Dev* **12**, 2131-2143.
181. **Jackman, M., Lindon, C., Nigg, E.A., and Pines, J.** (2003). Active cyclin B1-Cdk1 first appears on centrosomes in prophase. *Nat Cell Biol* **5**, 143-148.
182. **Gavet, O., and Pines, J.** (2010). Activation of cyclin B1-Cdk1 synchronizes events in the nucleus and the cytoplasm at mitosis. *J Cell Biol* **189**, 247-259.
183. **Toyoshima-Morimoto, F., Taniguchi, E., Shinya, N., Iwamatsu, A., and Nishida, E.** (2001). Polo-like kinase 1 phosphorylates cyclin B1 and targets it to the nucleus during prophase. *Nature* **410**, 215-220.
184. **Hagting, A., Jackman, M., Simpson, K., and Pines, J.** (1999). Translocation of cyclin B1 to the nucleus at prophase requires a phosphorylation-dependent nuclear import signal. *Curr Biol* **9**, 680-689.
185. **Yuan, J., Eckerdt, F., Bereiter-Hahn, J., Kurunci-Csacsko, E., Kaufmann, M., and Strebhardt, K.** (2002). Cooperative phosphorylation including the activity of polo-like kinase 1 regulates the subcellular localization of cyclin B1. *Oncogene* **21**, 8282-8292.
186. **Thuriaux, P., Nurse, P., and Carter, B.** (1978). Mutants altered in the control co-ordinating cell division with cell growth in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Gen Genet* **161**, 215-220.
187. **Nurse, P., and Thuriaux, P.** (1980). Regulatory genes controlling mitosis in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Genetics* **96**, 627-637.
188. **Beach, D., Durkacz, B., and Nurse, P.** (1982). Functionally homologous cell cycle control genes in budding and fission yeast. *Nature* **300**, 706-709.

189. **Simanis, V., and Nurse, P.** (1986). The cell cycle control gene *cdc2+* of fission yeast encodes a protein kinase potentially regulated by phosphorylation. *Cell* **45**, 261-268.
190. **Draetta, G., and Beach, D.** (1988). Activation of *cdc2* protein kinase during mitosis in human cells: cell cycle-dependent phosphorylation and subunit rearrangement. *Cell* **54**, 17-26.
191. **Draetta, G., Piwnica-Worms, H., Morrison, D., Druker, B., Roberts, T., and Beach, D.** (1988). Human *cdc2* protein kinase is a major cell-cycle regulated tyrosine kinase substrate. *Nature* **336**, 738-744.
192. **Gould, K.L., and Nurse, P.** (1989). Tyrosine phosphorylation of the fission yeast *cdc2+* protein kinase regulates entry into mitosis. *Nature* **342**, 39-45.
193. **Krek, W., and Nigg, E.A.** (1991). Differential phosphorylation of vertebrate p34cdc2 kinase at the G1/S and G2/M transitions of the cell cycle: identification of major phosphorylation sites. *EMBO J* **10**, 305-316.
194. **Norbury, C., Blow, J., and Nurse, P.** (1991). Regulatory phosphorylation of the p34cdc2 protein kinase in vertebrates. *EMBO J* **10**, 3321-3329.
195. **Huse, M., and Kuriyan, J.** (2002). The conformational plasticity of protein kinases. *Cell* **109**, 275-282.
196. **Russo, A.A., Jeffrey, P.D., and Pavletich, N.P.** (1996). Structural basis of cyclin-dependent kinase activation by phosphorylation. *Nat Struct Biol* **3**, 696-700.
197. **Poon, R.Y., Yamashita, K., Adamczewski, J.P., Hunt, T., and Shuttleworth, J.** (1993). The *cdc2*-related protein p40MO15 is the catalytic subunit of a protein kinase that can activate p33cdk2 and p34cdc2. *EMBO J* **12**, 3123-3132.
198. **Fesquet, D., Labbe, J.C., Derancourt, J., Capony, J.P., Galas, S., Girard, F., Lorca, T., Shuttleworth, J., Doree, M., and Cavadore, J.C.** (1993). The MO15 gene encodes the catalytic subunit of a protein kinase that activates *cdc2* and other cyclin-dependent kinases (CDKs) through phosphorylation of Thr161 and its homologues. *EMBO J* **12**, 3111-3121.
199. **Shuttleworth, J., Godfrey, R., and Colman, A.** (1990). p40MO15, a *cdc2*-related protein kinase involved in negative regulation of meiotic maturation of *Xenopus* oocytes. *EMBO J* **9**, 3233-3240.
200. **Fisher, R.P., and Morgan, D.O.** (1994). A novel cyclin associates with MO15/CDK7 to form the CDK-activating kinase. *Cell* **78**, 713-724.
201. **Nigg, E.A.** (1996). Cyclin-dependent kinase 7: at the cross-roads of transcription, DNA repair and cell cycle control? *Curr Opin Cell Biol* **8**, 312-317.
202. **Krek, W., and Nigg, E.A.** (1991). Mutations of p34cdc2 phosphorylation sites induce premature mitotic events in HeLa cells: evidence for a double block to p34cdc2 kinase activation in vertebrates. *EMBO J* **10**, 3331-3341.
203. **Solomon, M.J., Glotzer, M., Lee, T.H., Philippe, M., and Kirschner, M.W.** (1990). Cyclin activation of p34cdc2. *Cell* **63**, 1013-1024.
204. **Pomerening, J.R., Ubersax, J.A., and Ferrell, J.E., Jr.** (2008). Rapid cycling and precocious termination of G1 phase in cells expressing CDK1AF. *Mol Biol Cell* **19**, 3426-3441.

205. **O'Farrell, P.H.** (2001). Triggering the all-or-nothing switch into mitosis. *Trends Cell Biol* **11**, 512-519.
206. **Russell, P., and Nurse, P.** (1987). Negative regulation of mitosis by *wee1+*, a gene encoding a protein kinase homolog. *Cell* **49**, 559-567.
207. **Parker, L.L., Atherton-Fessler, S., Lee, M.S., Ogg, S., Falk, J.L., Swenson, K.I., and Piwnica-Worms, H.** (1991). Cyclin promotes the tyrosine phosphorylation of p34cdc2 in a *wee1+* dependent manner. *EMBO J* **10**, 1255-1263.
208. **Parker, L.L., and Piwnica-Worms, H.** (1992). Inactivation of the p34cdc2-cyclin B complex by the human WEE1 tyrosine kinase. *Science* **257**, 1955-1957.
209. **McGowan, C.H., and Russell, P.** (1993). Human Wee1 kinase inhibits cell division by phosphorylating p34cdc2 exclusively on Tyr15. *EMBO J* **12**, 75-85.
210. **Mueller, P.R., Coleman, T.R., Kumagai, A., and Dunphy, W.G.** (1995). Myt1: a membrane-associated inhibitory kinase that phosphorylates Cdc2 on both threonine-14 and tyrosine-15. *Science* **270**, 86-90.
211. **Baldin, V., and Ducommun, B.** (1995). Subcellular localisation of human *wee1* kinase is regulated during the cell cycle. *J Cell Sci* **108** ( Pt 6), 2425-2432.
212. **Liu, F., Stanton, J.J., Wu, Z., and Piwnica-Worms, H.** (1997). The human Myt1 kinase preferentially phosphorylates Cdc2 on threonine 14 and localizes to the endoplasmic reticulum and Golgi complex. *Mol Cell Biol* **17**, 571-583.
213. **Liu, F., Rothblum-Oviatt, C., Ryan, C.E., and Piwnica-Worms, H.** (1999). Overproduction of human Myt1 kinase induces a G2 cell cycle delay by interfering with the intracellular trafficking of Cdc2-cyclin B1 complexes. *Mol Cell Biol* **19**, 5113-5123.
214. **Wells, N.J., Watanabe, N., Tokusumi, T., Jiang, W., Verdecia, M.A., and Hunter, T.** (1999). The C-terminal domain of the Cdc2 inhibitory kinase Myt1 interacts with Cdc2 complexes and is required for inhibition of G(2)/M progression. *J Cell Sci* **112** ( Pt 19), 3361-3371.
215. **Watanabe, N., Broome, M., and Hunter, T.** (1995). Regulation of the human WEE1Hu CDK tyrosine 15-kinase during the cell cycle. *EMBO J* **14**, 1878-1891.
216. **McGowan, C.H., and Russell, P.** (1995). Cell cycle regulation of human WEE1. *EMBO J* **14**, 2166-2175.
217. **Booher, R.N., Holman, P.S., and Fattaey, A.** (1997). Human Myt1 is a cell cycle-regulated kinase that inhibits Cdc2 but not Cdk2 activity. *J Biol Chem* **272**, 22300-22306.
218. **Wu, L., and Russell, P.** (1993). Nim1 kinase promotes mitosis by inactivating Wee1 tyrosine kinase. *Nature* **363**, 738-741.
219. **Parker, L.L., Walter, S.A., Young, P.G., and Piwnica-Worms, H.** (1993). Phosphorylation and inactivation of the mitotic inhibitor Wee1 by the *nim1/cdr1* kinase. *Nature* **363**, 736-738.
220. **Watanabe, N., Arai, H., Iwasaki, J., Shiina, M., Ogata, K., Hunter, T., and Osada, H.** (2005). Cyclin-dependent kinase (CDK) phosphorylation

- destabilizes somatic Wee1 via multiple pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 11663-11668.
221. **Watanabe, N., Arai, H., Nishihara, Y., Taniguchi, M., Hunter, T., and Osada, H.** (2004). M-phase kinases induce phospho-dependent ubiquitination of somatic Wee1 by SCFbeta-TrCP. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 4419-4424.
  222. **Ayad, N.G., Rankin, S., Murakami, M., Jebanathirajah, J., Gygi, S., and Kirschner, M.W.** (2003). Tome-1, a trigger of mitotic entry, is degraded during G1 via the APC. *Cell* **113**, 101-113.
  223. **Nakajima, H., Toyoshima-Morimoto, F., Taniguchi, E., and Nishida, E.** (2003). Identification of a consensus motif for Plk (Polo-like kinase) phosphorylation reveals Myt1 as a Plk1 substrate. *J Biol Chem* **278**, 25277-25280.
  224. **Russell, P., and Nurse, P.** (1986). cdc25+ functions as an inducer in the mitotic control of fission yeast. *Cell* **45**, 145-153.
  225. **Gould, K.L., Moreno, S., Tonks, N.K., and Nurse, P.** (1990). Complementation of the mitotic activator, p80cdc25, by a human protein-tyrosine phosphatase. *Science* **250**, 1573-1576.
  226. **Dunphy, W.G., and Kumagai, A.** (1991). The cdc25 protein contains an intrinsic phosphatase activity. *Cell* **67**, 189-196.
  227. **Alonso, A., Sasin, J., Bottini, N., Friedberg, I., Osterman, A., Godzik, A., Hunter, T., Dixon, J., and Mustelin, T.** (2004). Protein tyrosine phosphatases in the human genome. *Cell* **117**, 699-711.
  228. **Boutros, R., Lobjois, V., and Ducommun, B.** (2007). CDC25 phosphatases in cancer cells: key players? Good targets? *Nat Rev Cancer* **7**, 495-507.
  229. **Boutros, R., Dozier, C., and Ducommun, B.** (2006). The when and wheres of CDC25 phosphatases. *Curr Opin Cell Biol* **18**, 185-191.
  230. **Trinkle-Mulcahy, L., and Lamond, A.I.** (2006). Mitotic phosphatases: no longer silent partners. *Curr Opin Cell Biol* **18**, 623-631.
  231. **Rudolph, J.** (2007). Cdc25 phosphatases: structure, specificity, and mechanism. *Biochemistry* **46**, 3595-3604.
  232. **Karlsson-Rosenthal, C., and Millar, J.B.** (2006). Cdc25: mechanisms of checkpoint inhibition and recovery. *Trends Cell Biol* **16**, 285-292.
  233. **Gautier, J., Solomon, M.J., Booher, R.N., Bazan, J.F., and Kirschner, M.W.** (1991). cdc25 is a specific tyrosine phosphatase that directly activates p34cdc2. *Cell* **67**, 197-211.
  234. **Sebastian, B., Kakizuka, A., and Hunter, T.** (1993). Cdc25M2 activation of cyclin-dependent kinases by dephosphorylation of threonine-14 and tyrosine-15. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 3521-3524.
  235. **Hoffmann, I., Draetta, G., and Karsenti, E.** (1994). Activation of the phosphatase activity of human cdc25A by a cdk2-cyclin E dependent phosphorylation at the G1/S transition. *EMBO J* **13**, 4302-4310.
  236. **Jinno, S., Suto, K., Nagata, A., Igarashi, M., Kanaoka, Y., Nojima, H., and Okayama, H.** (1994). Cdc25A is a novel phosphatase functioning early in the cell cycle. *EMBO J* **13**, 1549-1556.

237. **Blomberg, I., and Hoffmann, I.** (1999). Ectopic expression of Cdc25A accelerates the G(1)/S transition and leads to premature activation of cyclin E- and cyclin A-dependent kinases. *Mol Cell Biol* **19**, 6183-6194.
238. **Gabrielli, B.G., De Souza, C.P., Tonks, I.D., Clark, J.M., Hayward, N.K., and Ellem, K.A.** (1996). Cytoplasmic accumulation of cdc25B phosphatase in mitosis triggers centrosomal microtubule nucleation in HeLa cells. *J Cell Sci* **109** ( Pt 5), 1081-1093.
239. **Lammer, C., Wagerer, S., Saffrich, R., Mertens, D., Ansorge, W., and Hoffmann, I.** (1998). The cdc25B phosphatase is essential for the G2/M phase transition in human cells. *J Cell Sci* **111** ( Pt 16), 2445-2453.
240. **Millar, J.B., Blevitt, J., Gerace, L., Sadhu, K., Featherstone, C., and Russell, P.** (1991). p55CDC25 is a nuclear protein required for the initiation of mitosis in human cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 10500-10504.
241. **Turowski, P., Franckhauser, C., Morris, M.C., Vaglio, P., Fernandez, A., and Lamb, N.J.** (2003). Functional cdc25C dual-specificity phosphatase is required for S-phase entry in human cells. *Mol Biol Cell* **14**, 2984-2998.
242. **Garner-Hamrick, P.A., and Fisher, C.** (1998). Antisense phosphorothioate oligonucleotides specifically down-regulate cdc25B causing S-phase delay and persistent antiproliferative effects. *Int J Cancer* **76**, 720-728.
243. **Mailand, N., Podtelejnikov, A.V., Groth, A., Mann, M., Bartek, J., and Lukas, J.** (2002). Regulation of G(2)/M events by Cdc25A through phosphorylation-dependent modulation of its stability. *EMBO J* **21**, 5911-5920.
244. **Chen, M.S., Hurov, J., White, L.S., Woodford-Thomas, T., and Piwnica-Worms, H.** (2001). Absence of apparent phenotype in mice lacking Cdc25C protein phosphatase. *Mol Cell Biol* **21**, 3853-3861.
245. **Lincoln, A.J., Wickramasinghe, D., Stein, P., Schultz, R.M., Palko, M.E., De Miguel, M.P., Tessarollo, L., and Donovan, P.J.** (2002). Cdc25b phosphatase is required for resumption of meiosis during oocyte maturation. *Nat Genet* **30**, 446-449.
246. **Ray, D., Terao, Y., Nimbalkar, D., Hirai, H., Osmundson, E.C., Zou, X., Franks, R., Christov, K., and Kiyokawa, H.** (2007). Hemizygous disruption of Cdc25A inhibits cellular transformation and mammary tumorigenesis in mice. *Cancer Res* **67**, 6605-6611.
247. **Ferguson, A.M., White, L.S., Donovan, P.J., and Piwnica-Worms, H.** (2005). Normal cell cycle and checkpoint responses in mice and cells lacking Cdc25B and Cdc25C protein phosphatases. *Mol Cell Biol* **25**, 2853-2860.
248. **Kumagai, A., and Dunphy, W.G.** (1999). Binding of 14-3-3 proteins and nuclear export control the intracellular localization of the mitotic inducer Cdc25. *Genes Dev* **13**, 1067-1072.
249. **Conklin, D.S., Galaktionov, K., and Beach, D.** (1995). 14-3-3 proteins associate with cdc25 phosphatases. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 7892-7896.
250. **Kallstrom, H., Lindqvist, A., Pospisil, V., Lundgren, A., and Rosenthal, C.K.** (2005). Cdc25A localisation and shuttling: characterisation of sequences mediating nuclear export and import. *Exp Cell Res* **303**, 89-100.

251. **Chen, M.S., Ryan, C.E., and Piwnica-Worms, H.** (2003). Chk1 kinase negatively regulates mitotic function of Cdc25A phosphatase through 14-3-3 binding. *Mol Cell Biol* **23**, 7488-7497.
252. **Peng, C.Y., Graves, P.R., Thoma, R.S., Wu, Z., Shaw, A.S., and Piwnica-Worms, H.** (1997). Mitotic and G2 checkpoint control: regulation of 14-3-3 protein binding by phosphorylation of Cdc25C on serine-216. *Science* **277**, 1501-1505.
253. **Dalal, S.N., Schweitzer, C.M., Gan, J., and DeCaprio, J.A.** (1999). Cytoplasmic localization of human cdc25C during interphase requires an intact 14-3-3 binding site. *Mol Cell Biol* **19**, 4465-4479.
254. **Peng, C.Y., Graves, P.R., Ogg, S., Thoma, R.S., Byrnes, M.J., 3rd, Wu, Z., Stephenson, M.T., and Piwnica-Worms, H.** (1998). C-TAK1 protein kinase phosphorylates human Cdc25C on serine 216 and promotes 14-3-3 protein binding. *Cell Growth Differ* **9**, 197-208.
255. **Sanchez, Y., Wong, C., Thoma, R.S., Richman, R., Wu, Z., Piwnica-Worms, H., and Elledge, S.J.** (1997). Conservation of the Chk1 checkpoint pathway in mammals: linkage of DNA damage to Cdk regulation through Cdc25. *Science* **277**, 1497-1501.
256. **Bonnet, J., Coopman, P., and Morris, M.C.** (2008). Characterization of centrosomal localization and dynamics of Cdc25C phosphatase in mitosis. *Cell Cycle* **7**, 1991-1998.
257. **Busch, C., Barton, O., Morgenstern, E., Gotz, C., Gunther, J., Noll, A., and Montenarh, M.** (2007). The G2/M checkpoint phosphatase cdc25C is located within centrosomes. *Int J Biochem Cell Biol* **39**, 1707-1713.
258. **Bahassi el, M., Hennigan, R.F., Myer, D.L., and Stambrook, P.J.** (2004). Cdc25C phosphorylation on serine 191 by Plk3 promotes its nuclear translocation. *Oncogene* **23**, 2658-2663.
259. **Toyoshima-Morimoto, F., Taniguchi, E., and Nishida, E.** (2002). Plk1 promotes nuclear translocation of human Cdc25C during prophase. *EMBO Rep* **3**, 341-348.
260. **Lindqvist, A., Kallstrom, H., and Karlsson Rosenthal, C.** (2004). Characterisation of Cdc25B localisation and nuclear export during the cell cycle and in response to stress. *J Cell Sci* **117**, 4979-4990.
261. **Davezac, N., Baldin, V., Gabrielli, B., Forrest, A., Theis-Febvre, N., Yashida, M., and Ducommun, B.** (2000). Regulation of CDC25B phosphatases subcellular localization. *Oncogene* **19**, 2179-2185.
262. **Dutertre, S., Cazales, M., Quaranta, M., Froment, C., Trabut, V., Dozier, C., Mirey, G., Bouche, J.P., Theis-Febvre, N., Schmitt, E., et al.** (2004). Phosphorylation of CDC25B by Aurora-A at the centrosome contributes to the G2-M transition. *J Cell Sci* **117**, 2523-2531.
263. **Girard, F., Strausfeld, U., Cavadore, J.C., Russell, P., Fernandez, A., and Lamb, N.J.** (1992). cdc25 is a nuclear protein expressed constitutively throughout the cell cycle in nontransformed mammalian cells. *J Cell Biol* **118**, 785-794.



264. **Donzelli, M., Squatrito, M., Ganoth, D., Hershko, A., Pagano, M., and Draetta, G.F.** (2002). Dual mode of degradation of Cdc25 A phosphatase. *EMBO J* **21**, 4875-4884.
265. **Busino, L., Donzelli, M., Chiesa, M., Guardavaccaro, D., Ganoth, D., Dorrello, N.V., Hershko, A., Pagano, M., and Draetta, G.F.** (2003). Degradation of Cdc25A by beta-TrCP during S phase and in response to DNA damage. *Nature* **426**, 87-91.
266. **Baldin, V., Cans, C., Knibiehler, M., and Ducommun, B.** (1997). Phosphorylation of human CDC25B phosphatase by CDK1-cyclin A triggers its proteasome-dependent degradation. *J Biol Chem* **272**, 32731-32734.
267. **Kanemori, Y., Uto, K., and Sagata, N.** (2005). Beta-TrCP recognizes a previously undescribed nonphosphorylated destruction motif in Cdc25A and Cdc25B phosphatases. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 6279-6284.
268. **Gabrielli, B.G., Clark, J.M., McCormack, A.K., and Ellem, K.A.** (1997). Hyperphosphorylation of the N-terminal domain of Cdc25 regulates activity toward cyclin B1/Cdc2 but not cyclin A/Cdk2. *J Biol Chem* **272**, 28607-28614.
269. **Bouche, J.P., Froment, C., Dozier, C., Esmenjaud-Mailhat, C., Lemaire, M., Monsarrat, B., Burlet-Schiltz, O., and Ducommun, B.** (2008). NanoLC-MS/MS analysis provides new insights into the phosphorylation pattern of Cdc25B in vivo: full overlap with sites of phosphorylation by Chk1 and Cdk1/cycB kinases in vitro. *J Proteome Res* **7**, 1264-1273.
270. **Theis-Febvre, N., Filhol, O., Froment, C., Cazales, M., Cochet, C., Monsarrat, B., Ducommun, B., and Baldin, V.** (2003). Protein kinase CK2 regulates CDC25B phosphatase activity. *Oncogene* **22**, 220-232.
271. **Mirey, G., Chartrain, I., Froment, C., Quaranta, M., Bouche, J.P., Monsarrat, B., Tassan, J.P., and Ducommun, B.** (2005). CDC25B phosphorylated by pEg3 localizes to the centrosome and the spindle poles at mitosis. *Cell Cycle* **4**, 806-811.
272. **Davezac, N., Baldin, V., Blot, J., Ducommun, B., and Tassan, J.P.** (2002). Human pEg3 kinase associates with and phosphorylates CDC25B phosphatase: a potential role for pEg3 in cell cycle regulation. *Oncogene* **21**, 7630-7641.
273. **Hoffmann, I., Clarke, P.R., Marcote, M.J., Karsenti, E., and Draetta, G.** (1993). Phosphorylation and activation of human cdc25-C by cdc2--cyclin B and its involvement in the self-amplification of MPF at mitosis. *EMBO J* **12**, 53-63.
274. **Lindqvist, A., Kallstrom, H., Lundgren, A., Barsoum, E., and Rosenthal, C.K.** (2005). Cdc25B cooperates with Cdc25A to induce mitosis but has a unique role in activating cyclin B1-Cdk1 at the centrosome. *J Cell Biol* **171**, 35-45.
275. **Lindqvist, A., van Zon, W., Karlsson Rosenthal, C., and Wolthuis, R.M.** (2007). Cyclin B1-Cdk1 activation continues after centrosome separation to control mitotic progression. *PLoS Biol* **5**, e123.

276. **Archambault, V., and Glover, D.M.** (2009). Polo-like kinases: conservation and divergence in their functions and regulation. *Nat Rev Mol Cell Biol* **10**, 265-275.
277. **Llamazares, S., Moreira, A., Tavares, A., Girdham, C., Spruce, B.A., Gonzalez, C., Karess, R.E., Glover, D.M., and Sunkel, C.E.** (1991). polo encodes a protein kinase homolog required for mitosis in *Drosophila*. *Genes Dev* **5**, 2153-2165.
278. **Sunkel, C.E., and Glover, D.M.** (1988). polo, a mitotic mutant of *Drosophila* displaying abnormal spindle poles. *J Cell Sci* **89 ( Pt 1)**, 25-38.
279. **Elia, A.E., Cantley, L.C., and Yaffe, M.B.** (2003). Proteomic screen finds pSer/pThr-binding domain localizing Plk1 to mitotic substrates. *Science* **299**, 1228-1231.
280. **Petronczki, M., Lenart, P., and Peters, J.M.** (2008). Polo on the Rise—from Mitotic Entry to Cytokinesis with Plk1. *Dev Cell* **14**, 646-659.
281. **Lowery, D.M., Clauser, K.R., Hjerrild, M., Lim, D., Alexander, J., Kishi, K., Ong, S.E., Gammeltoft, S., Carr, S.A., and Yaffe, M.B.** (2007). Proteomic screen defines the Polo-box domain interactome and identifies Rock2 as a Plk1 substrate. *EMBO J* **26**, 2262-2273.
282. **Lobjois, V., Jullien, D., Bouche, J.P., and Ducommun, B.** (2009). The polo-like kinase 1 regulates CDC25B-dependent mitosis entry. *Biochim Biophys Acta* **1793**, 462-468.
283. **Qian, Y.W., Erikson, E., Taieb, F.E., and Maller, J.L.** (2001). The polo-like kinase Plx1 is required for activation of the phosphatase Cdc25C and cyclin B-Cdc2 in *Xenopus* oocytes. *Mol Biol Cell* **12**, 1791-1799.
284. **Hanisch, A., Wehner, A., Nigg, E.A., and Sillje, H.H.** (2006). Different Plk1 functions show distinct dependencies on Polo-Box domain-mediated targeting. *Mol Biol Cell* **17**, 448-459.
285. **Lenart, P., Petronczki, M., Steegmaier, M., Di Fiore, B., Lipp, J.J., Hoffmann, M., Rettig, W.J., Kraut, N., and Peters, J.M.** (2007). The small-molecule inhibitor BI 2536 reveals novel insights into mitotic roles of polo-like kinase 1. *Curr Biol* **17**, 304-315.
286. **van Vugt, M.A., Bras, A., and Medema, R.H.** (2004). Polo-like kinase-1 controls recovery from a G2 DNA damage-induced arrest in mammalian cells. *Mol Cell* **15**, 799-811.
287. **Seki, A., Coppinger, J.A., Jang, C.Y., Yates, J.R., and Fang, G.** (2008). Bora and the kinase Aurora a cooperatively activate the kinase Plk1 and control mitotic entry. *Science* **320**, 1655-1658.
288. **Macurek, L., Lindqvist, A., Lim, D., Lampson, M.A., Klompaker, R., Freire, R., Clouin, C., Taylor, S.S., Yaffe, M.B., and Medema, R.H.** (2008). Polo-like kinase-1 is activated by aurora A to promote checkpoint recovery. *Nature* **455**, 119-123.
289. **Hutterer, A., Berdnik, D., Wirtz-Peitz, F., Zigman, M., Schleiffer, A., and Knoblich, J.A.** (2006). Mitotic activation of the kinase Aurora-A requires its binding partner Bora. *Dev Cell* **11**, 147-157.
290. **Hirota, T., Kunitoku, N., Sasayama, T., Marumoto, T., Zhang, D., Nitta, M., Hatakeyama, K., and Saya, H.** (2003). Aurora-A and an interacting

- activator, the LIM protein Ajuba, are required for mitotic commitment in human cells. *Cell* **114**, 585-598.
291. **Chan, E.H., Santamaria, A., Sillje, H.H., and Nigg, E.A.** (2008). Plk1 regulates mitotic Aurora A function through betaTrCP-dependent degradation of hBora. *Chromosoma* **117**, 457-469.
  292. **Seki, A., Coppinger, J.A., Du, H., Jang, C.Y., Yates, J.R., 3rd, and Fang, G.** (2008). Plk1- and beta-TrCP-dependent degradation of Bora controls mitotic progression. *J Cell Biol* **181**, 65-78.
  293. **Fu, Z., Malureanu, L., Huang, J., Wang, W., Li, H., van Deursen, J.M., Tindall, D.J., and Chen, J.** (2008). Plk1-dependent phosphorylation of FoxM1 regulates a transcriptional programme required for mitotic progression. *Nat Cell Biol* **10**, 1076-1082.
  294. **Wheatley, S.P., Hinchcliffe, E.H., Glotzer, M., Hyman, A.A., Sluder, G., and Wang, Y.** (1997). CDK1 inactivation regulates anaphase spindle dynamics and cytokinesis in vivo. *J Cell Biol* **138**, 385-393.
  295. **Skoufias, D.A., Indorato, R.L., Lacroix, F., Panopoulos, A., and Margolis, R.L.** (2007). Mitosis persists in the absence of Cdk1 activity when proteolysis or protein phosphatase activity is suppressed. *J Cell Biol* **179**, 671-685.
  296. **Stegmeier, F., and Amon, A.** (2004). Closing mitosis: the functions of the Cdc14 phosphatase and its regulation. *Annu Rev Genet* **38**, 203-232.
  297. **Visintin, R., Craig, K., Hwang, E.S., Prinz, S., Tyers, M., and Amon, A.** (1998). The phosphatase Cdc14 triggers mitotic exit by reversal of Cdk-dependent phosphorylation. *Mol Cell* **2**, 709-718.
  298. **Visintin, R., Hwang, E.S., and Amon, A.** (1999). Cfi1 prevents premature exit from mitosis by anchoring Cdc14 phosphatase in the nucleolus. *Nature* **398**, 818-823.
  299. **Shou, W., Seol, J.H., Shevchenko, A., Baskerville, C., Moazed, D., Chen, Z.W., Jang, J., Charbonneau, H., and Deshaies, R.J.** (1999). Exit from mitosis is triggered by Tem1-dependent release of the protein phosphatase Cdc14 from nucleolar RENT complex. *Cell* **97**, 233-244.
  300. **D'Amours, D., and Amon, A.** (2004). At the interface between signaling and executing anaphase--Cdc14 and the FEAR network. *Genes Dev* **18**, 2581-2595.
  301. **Bosl, W.J., and Li, R.** (2005). Mitotic-exit control as an evolved complex system. *Cell* **121**, 325-333.
  302. **Li, L., Ernsting, B.R., Wishart, M.J., Lohse, D.L., and Dixon, J.E.** (1997). A family of putative tumor suppressors is structurally and functionally conserved in humans and yeast. *J Biol Chem* **272**, 29403-29406.
  303. **Rosso, L., Marques, A.C., Weier, M., Lambert, N., Lambot, M.A., Vanderhaeghen, P., and Kaessmann, H.** (2008). Birth and rapid subcellular adaptation of a hominoid-specific CDC14 protein. *PLoS Biol* **6**, e140.
  304. **Gray, C.H., Good, V.M., Tonks, N.K., and Barford, D.** (2003). The structure of the cell cycle protein Cdc14 reveals a proline-directed protein phosphatase. *EMBO J* **22**, 3524-3535.
  305. **Kaiser, B.K., Zimmerman, Z.A., Charbonneau, H., and Jackson, P.K.** (2002). Disruption of centrosome structure, chromosome segregation, and

- cytokinesis by misexpression of human Cdc14A phosphatase. *Mol Biol Cell* **13**, 2289-2300.
306. **Mailand, N., Lukas, C., Kaiser, B.K., Jackson, P.K., Bartek, J., and Lukas, J.** (2002). Deregulated human Cdc14A phosphatase disrupts centrosome separation and chromosome segregation. *Nat Cell Biol* **4**, 317-322.
307. **Bembenek, J., and Yu, H.** (2001). Regulation of the anaphase-promoting complex by the dual specificity phosphatase human Cdc14a. *J Biol Chem* **276**, 48237-48242.
308. **Cho, H.P., Liu, Y., Gomez, M., Dunlap, J., Tyers, M., and Wang, Y.** (2005). The dual-specificity phosphatase CDC14B bundles and stabilizes microtubules. *Mol Cell Biol* **25**, 4541-4551.
309. **Bassermann, F., Frescas, D., Guardavaccaro, D., Busino, L., Peschiaroli, A., and Pagano, M.** (2008). The Cdc14B-Cdh1-Plk1 axis controls the G2 DNA-damage-response checkpoint. *Cell* **134**, 256-267.
310. **Vazquez-Novelle, M.D., Esteban, V., Bueno, A., and Sacristan, M.P.** (2005). Functional homology among human and fission yeast Cdc14 phosphatases. *J Biol Chem* **280**, 29144-29150.
311. **Wu, J., Cho, H.P., Rhee, D.B., Johnson, D.K., Dunlap, J., Liu, Y., and Wang, Y.** (2008). Cdc14B depletion leads to centriole amplification, and its overexpression prevents unscheduled centriole duplication. *J Cell Biol* **181**, 475-483.
312. **Mocciaro, A., Berdugo, E., Zeng, K., Black, E., Vagnarelli, P., Earnshaw, W., Gillespie, D., Jallepalli, P., and Schiebel, E.** (2010). Vertebrate cells genetically deficient for Cdc14A or Cdc14B retain DNA damage checkpoint proficiency but are impaired in DNA repair. *J Cell Biol* **189**, 631-639.
313. **Berdugo, E., Nachury, M.V., Jackson, P.K., and Jallepalli, P.V.** (2008). The nucleolar phosphatase Cdc14B is dispensable for chromosome segregation and mitotic exit in human cells. *Cell Cycle* **7**, 1184-1190.
314. **Potapova, T.A., Daum, J.R., Pittman, B.D., Hudson, J.R., Jones, T.N., Satinover, D.L., Stukenberg, P.T., and Gorbsky, G.J.** (2006). The reversibility of mitotic exit in vertebrate cells. *Nature* **440**, 954-958.
315. **Ceulemans, H., and Bollen, M.** (2004). Functional diversity of protein phosphatase-1, a cellular economizer and reset button. *Physiol Rev* **84**, 1-39.
316. **Cohen, P.T.** (2002). Protein phosphatase 1--targeted in many directions. *J Cell Sci* **115**, 241-256.
317. **Eichhorn, P.J., Creighton, M.P., and Bernards, R.** (2009). Protein phosphatase 2A regulatory subunits and cancer. *Biochim Biophys Acta* **1795**, 1-15.
318. **Bollen, M., Gerlich, D.W., and Lesage, B.** (2009). Mitotic phosphatases: from entry guards to exit guides. *Trends Cell Biol* **19**, 531-541.
319. **Axton, J.M., Dombradi, V., Cohen, P.T., and Glover, D.M.** (1990). One of the protein phosphatase 1 isoenzymes in *Drosophila* is essential for mitosis. *Cell* **63**, 33-46.

320. **Cheng, A., Dean, N.M., and Honkanen, R.E.** (2000). Serine/threonine protein phosphatase type 1 $\gamma$  is required for the completion of cytokinesis in human A549 lung carcinoma cells. *J Biol Chem* **275**, 1846-1854.
321. **Fernandez, A., Brautigan, D.L., and Lamb, N.J.** (1992). Protein phosphatase type 1 in mammalian cell mitosis: chromosomal localization and involvement in mitotic exit. *J Cell Biol* **116**, 1421-1430.
322. **Wu, J.Q., Guo, J.Y., Tang, W., Yang, C.S., Freel, C.D., Chen, C., Nairn, A.C., and Kornbluth, S.** (2009). PP1-mediated dephosphorylation of phosphoproteins at mitotic exit is controlled by inhibitor-1 and PP1 phosphorylation. *Nat Cell Biol* **11**, 644-651.
323. **Kwon, Y.G., Lee, S.Y., Choi, Y., Greengard, P., and Nairn, A.C.** (1997). Cell cycle-dependent phosphorylation of mammalian protein phosphatase 1 by cdc2 kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 2168-2173.
324. **Ishii, K., Kumada, K., Toda, T., and Yanagida, M.** (1996). Requirement for PP1 phosphatase and 20S cyclosome/APC for the onset of anaphase is lessened by the dosage increase of a novel gene sds23<sup>+</sup>. *EMBO J* **15**, 6629-6640.
325. **Thompson, L.J., Bollen, M., and Fields, A.P.** (1997). Identification of protein phosphatase 1 as a mitotic lamin phosphatase. *J Biol Chem* **272**, 29693-29697.
326. **Schmitz, M.H., Held, M., Janssens, V., Hutchins, J.R., Hudecz, O., Ivanova, E., Goris, J., Trinkle-Mulcahy, L., Lamond, A.I., Poser, I., et al.** (2010). Live-cell imaging RNAi screen identifies PP2A-B55 $\alpha$  and importin-beta1 as key mitotic exit regulators in human cells. *Nat Cell Biol*.
327. **Mochida, S., Ikeo, S., Gannon, J., and Hunt, T.** (2009). Regulated activity of PP2A-B55 $\delta$  is crucial for controlling entry into and exit from mitosis in *Xenopus* egg extracts. *EMBO J* **28**, 2777-2785.
328. **Forester, C.M., Maddox, J., Louis, J.V., Goris, J., and Virshup, D.M.** (2007). Control of mitotic exit by PP2A regulation of Cdc25C and Cdk1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 19867-19872.
329. **D'Angiolella, V., Palazzo, L., Santarpia, C., Costanzo, V., and Grieco, D.** (2007). Role for non-proteolytic control of M-phase-promoting factor activity at M-phase exit. *PLoS One* **2**, e247.
330. **Yu, J., Fleming, S.L., Williams, B., Williams, E.V., Li, Z., Somma, P., Rieder, C.L., and Goldberg, M.L.** (2004). Greatwall kinase: a nuclear protein required for proper chromosome condensation and mitotic progression in *Drosophila*. *J Cell Biol* **164**, 487-492.
331. **Yu, J., Zhao, Y., Li, Z., Galas, S., and Goldberg, M.L.** (2006). Greatwall kinase participates in the Cdc2 autoregulatory loop in *Xenopus* egg extracts. *Mol Cell* **22**, 83-91.
332. **Zhao, Y., Haccard, O., Wang, R., Yu, J., Kuang, J., Jesus, C., and Goldberg, M.L.** (2008). Roles of Greatwall kinase in the regulation of cdc25 phosphatase. *Mol Biol Cell* **19**, 1317-1327.

333. **Vigneron, S., Brioude, E., Burgess, A., Labbe, J.C., Lorca, T., and Castro, A.** (2009). Greatwall maintains mitosis through regulation of PP2A. *EMBO J* **28**, 2786-2793.
334. **Castilho, P.V., Williams, B.C., Mochida, S., Zhao, Y., and Goldberg, M.L.** (2009). The M phase kinase Greatwall (Gwl) promotes inactivation of PP2A/B55delta, a phosphatase directed against CDK phosphosites. *Mol Biol Cell* **20**, 4777-4789.
335. **Burgess, A., Vigneron, S., Brioude, E., Labbe, J.C., Lorca, T., and Castro, A.** (2010). Loss of human Greatwall results in G2 arrest and multiple mitotic defects due to deregulation of the cyclin B-Cdc2/PP2A balance. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 12564-12569.
336. **Harper, J.W., and Elledge, S.J.** (2007). The DNA damage response: ten years after. *Mol Cell* **28**, 739-745.
337. **Nyberg, K.A., Michelson, R.J., Putnam, C.W., and Weinert, T.A.** (2002). Toward maintaining the genome: DNA damage and replication checkpoints. *Annu Rev Genet* **36**, 617-656.
338. **Kastan, M.B., and Bartek, J.** (2004). Cell-cycle checkpoints and cancer. *Nature* **432**, 316-323.
339. **Lee, J.H., and Paull, T.T.** (2005). ATM activation by DNA double-strand breaks through the Mre11-Rad50-Nbs1 complex. *Science* **308**, 551-554.
340. **Lavin, M.F.** (2007). ATM and the Mre11 complex combine to recognize and signal DNA double-strand breaks. *Oncogene* **26**, 7749-7758.
341. **Lavin, M.F.** (2008). Ataxia-telangiectasia: from a rare disorder to a paradigm for cell signalling and cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**, 759-769.
342. **Mirzoeva, O.K., and Petrini, J.H.** (2001). DNA damage-dependent nuclear dynamics of the Mre11 complex. *Mol Cell Biol* **21**, 281-288.
343. **Falck, J., Coates, J., and Jackson, S.P.** (2005). Conserved modes of recruitment of ATM, ATR and DNA-PKcs to sites of DNA damage. *Nature* **434**, 605-611.
344. **You, Z., Chahwan, C., Bailis, J., Hunter, T., and Russell, P.** (2005). ATM activation and its recruitment to damaged DNA require binding to the C terminus of Nbs1. *Mol Cell Biol* **25**, 5363-5379.
345. **You, Z., Bailis, J.M., Johnson, S.A., Dilworth, S.M., and Hunter, T.** (2007). Rapid activation of ATM on DNA flanking double-strand breaks. *Nat Cell Biol* **9**, 1311-1318.
346. **Berkovich, E., Monnat, R.J., Jr., and Kastan, M.B.** (2007). Roles of ATM and NBS1 in chromatin structure modulation and DNA double-strand break repair. *Nat Cell Biol* **9**, 683-690.
347. **Savitsky, K., Bar-Shira, A., Gilad, S., Rotman, G., Ziv, Y., Vanagaite, L., Tagle, D.A., Smith, S., Uziel, T., Sfez, S., et al.** (1995). A single ataxia telangiectasia gene with a product similar to PI-3 kinase. *Science* **268**, 1749-1753.
348. **Canman, C.E., Lim, D.S., Cimprich, K.A., Taya, Y., Tamai, K., Sakaguchi, K., Appella, E., Kastan, M.B., and Siliciano, J.D.** (1998). Activation of the ATM kinase by ionizing radiation and phosphorylation of p53. *Science* **281**, 1677-1679.

349. **Banin, S., Moyal, L., Shieh, S., Taya, Y., Anderson, C.W., Chessa, L., Smorodinsky, N.I., Prives, C., Reiss, Y., Shiloh, Y., et al.** (1998). Enhanced phosphorylation of p53 by ATM in response to DNA damage. *Science* **281**, 1674-1677.
350. **Lavin, M.F., and Kozlov, S.** (2007). ATM activation and DNA damage response. *Cell Cycle* **6**, 931-942.
351. **Bakkenist, C.J., and Kastan, M.B.** (2003). DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation. *Nature* **421**, 499-506.
352. **Pellegrini, M., Celeste, A., Difilippantonio, S., Guo, R., Wang, W., Feigenbaum, L., and Nussenzweig, A.** (2006). Autophosphorylation at serine 1987 is dispensable for murine Atm activation in vivo. *Nature* **443**, 222-225.
353. **Kozlov, S.V., Graham, M.E., Peng, C., Chen, P., Robinson, P.J., and Lavin, M.F.** (2006). Involvement of novel autophosphorylation sites in ATM activation. *EMBO J* **25**, 3504-3514.
354. **Cimprich, K.A., Shin, T.B., Keith, C.T., and Schreiber, S.L.** (1996). cDNA cloning and gene mapping of a candidate human cell cycle checkpoint protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 2850-2855.
355. **O'Driscoll, M., Ruiz-Perez, V.L., Woods, C.G., Jeggo, P.A., and Goodship, J.A.** (2003). A splicing mutation affecting expression of ataxia-telangiectasia and Rad3-related protein (ATR) results in Seckel syndrome. *Nat Genet* **33**, 497-501.
356. **Brown, E.J., and Baltimore, D.** (2000). ATR disruption leads to chromosomal fragmentation and early embryonic lethality. *Genes Dev* **14**, 397-402.
357. **de Klein, A., Muijtjens, M., van Os, R., Verhoeven, Y., Smit, B., Carr, A.M., Lehmann, A.R., and Hoeijmakers, J.H.** (2000). Targeted disruption of the cell-cycle checkpoint gene ATR leads to early embryonic lethality in mice. *Curr Biol* **10**, 479-482.
358. **Barlow, C., Hirotsune, S., Paylor, R., Liyanage, M., Eckhaus, M., Collins, F., Shiloh, Y., Crawley, J.N., Ried, T., Tagle, D., et al.** (1996). Atm-deficient mice: a paradigm of ataxia telangiectasia. *Cell* **86**, 159-171.
359. **Xu, Y., Ashley, T., Brainerd, E.E., Bronson, R.T., Meyn, M.S., and Baltimore, D.** (1996). Targeted disruption of ATM leads to growth retardation, chromosomal fragmentation during meiosis, immune defects, and thymic lymphoma. *Genes Dev* **10**, 2411-2422.
360. **Auclair, Y., Rouget, R., and Drobetsky, E.A.** (2009). ATR kinase as master regulator of nucleotide excision repair during S phase of the cell cycle. *Cell Cycle* **8**, 1865-1871.
361. **Cimprich, K.A., and Cortez, D.** (2008). ATR: an essential regulator of genome integrity. *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**, 616-627.
362. **Fanning, E., Klimovich, V., and Nager, A.R.** (2006). A dynamic model for replication protein A (RPA) function in DNA processing pathways. *Nucleic Acids Res* **34**, 4126-4137.

363. **Zou, L., and Elledge, S.J.** (2003). Sensing DNA damage through ATRIP recognition of RPA-ssDNA complexes. *Science* **300**, 1542-1548.
364. **Cortez, D., Guntuku, S., Qin, J., and Elledge, S.J.** (2001). ATR and ATRIP: partners in checkpoint signaling. *Science* **294**, 1713-1716.
365. **Delacroix, S., Wagner, J.M., Kobayashi, M., Yamamoto, K., and Karnitz, L.M.** (2007). The Rad9-Hus1-Rad1 (9-1-1) clamp activates checkpoint signaling via TopBP1. *Genes Dev* **21**, 1472-1477.
366. **Kumagai, A., Lee, J., Yoo, H.Y., and Dunphy, W.G.** (2006). TopBP1 activates the ATR-ATRIP complex. *Cell* **124**, 943-955.
367. **Kumagai, A., Kim, S.M., and Dunphy, W.G.** (2004). Claspin and the activated form of ATR-ATRIP collaborate in the activation of Chk1. *J Biol Chem* **279**, 49599-49608.
368. **Kinner, A., Wu, W., Staudt, C., and Iliakis, G.** (2008). Gamma-H2AX in recognition and signaling of DNA double-strand breaks in the context of chromatin. *Nucleic Acids Res* **36**, 5678-5694.
369. **Lou, Z., Minter-Dykhouse, K., Franco, S., Gostissa, M., Rivera, M.A., Celeste, A., Manis, J.P., van Deursen, J., Nussenzweig, A., Paull, T.T., et al.** (2006). MDC1 maintains genomic stability by participating in the amplification of ATM-dependent DNA damage signals. *Mol Cell* **21**, 187-200.
370. **Stucki, M., Clapperton, J.A., Mohammad, D., Yaffe, M.B., Smerdon, S.J., and Jackson, S.P.** (2005). MDC1 directly binds phosphorylated histone H2AX to regulate cellular responses to DNA double-strand breaks. *Cell* **123**, 1213-1226.
371. **Mailand, N., Bekker-Jensen, S., Faustrup, H., Melander, F., Bartek, J., Lukas, C., and Lukas, J.** (2007). RNF8 ubiquitylates histones at DNA double-strand breaks and promotes assembly of repair proteins. *Cell* **131**, 887-900.
372. **Spycher, C., Miller, E.S., Townsend, K., Pavic, L., Morrice, N.A., Janscak, P., Stewart, G.S., and Stucki, M.** (2008). Constitutive phosphorylation of MDC1 physically links the MRE11-RAD50-NBS1 complex to damaged chromatin. *J Cell Biol* **181**, 227-240.
373. **Chapman, J.R., and Jackson, S.P.** (2008). Phospho-dependent interactions between NBS1 and MDC1 mediate chromatin retention of the MRN complex at sites of DNA damage. *EMBO Rep* **9**, 795-801.
374. **Kim, S.T., Lim, D.S., Canman, C.E., and Kastan, M.B.** (1999). Substrate specificities and identification of putative substrates of ATM kinase family members. *J Biol Chem* **274**, 37538-37543.
375. **O'Neill, T., Dwyer, A.J., Ziv, Y., Chan, D.W., Lees-Miller, S.P., Abraham, R.H., Lai, J.H., Hill, D., Shiloh, Y., Cantley, L.C., et al.** (2000). Utilization of oriented peptide libraries to identify substrate motifs selected by ATM. *J Biol Chem* **275**, 22719-22727.
376. **Matsuoka, S., Ballif, B.A., Smogorzewska, A., McDonald, E.R., 3rd, Hurov, K.E., Luo, J., Bakalarski, C.E., Zhao, Z., Solimini, N., Lerenthal, Y., et al.** (2007). ATM and ATR substrate analysis reveals extensive protein networks responsive to DNA damage. *Science* **316**, 1160-1166.



377. **Stokes, M.P., Rush, J., Macneill, J., Ren, J.M., Sprott, K., Nardone, J., Yang, V., Beausoleil, S.A., Gygi, S.P., Livingstone, M., et al.** (2007). Profiling of UV-induced ATM/ATR signaling pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 19855-19860.
378. **Matsuoka, S., Huang, M., and Elledge, S.J.** (1998). Linkage of ATM to cell cycle regulation by the Chk2 protein kinase. *Science* **282**, 1893-1897.
379. **Zhao, H., and Piwnicka-Worms, H.** (2001). ATR-mediated checkpoint pathways regulate phosphorylation and activation of human Chk1. *Mol Cell Biol* **21**, 4129-4139.
380. **Kumagai, A., and Dunphy, W.G.** (2000). Claspin, a novel protein required for the activation of Chk1 during a DNA replication checkpoint response in *Xenopus* egg extracts. *Mol Cell* **6**, 839-849.
381. **Liu, S., Bekker-Jensen, S., Mailand, N., Lukas, C., Bartek, J., and Lukas, J.** (2006). Claspin operates downstream of TopBP1 to direct ATR signaling towards Chk1 activation. *Mol Cell Biol* **26**, 6056-6064.
382. **Ahn, J., Urist, M., and Prives, C.** (2004). The Chk2 protein kinase. *DNA Repair (Amst)* **3**, 1039-1047.
383. **Lee, C.H., and Chung, J.H.** (2001). The hCds1 (Chk2)-FHA domain is essential for a chain of phosphorylation events on hCds1 that is induced by ionizing radiation. *J Biol Chem* **276**, 30537-30541.
384. **Reinhardt, H.C., and Yaffe, M.B.** (2009). Kinases that control the cell cycle in response to DNA damage: Chk1, Chk2, and MK2. *Curr Opin Cell Biol* **21**, 245-255.
385. **Liu, Q., Guntuku, S., Cui, X.S., Matsuoka, S., Cortez, D., Tamai, K., Luo, G., Carattini-Rivera, S., DeMayo, F., Bradley, A., et al.** (2000). Chk1 is an essential kinase that is regulated by Atr and required for the G(2)/M DNA damage checkpoint. *Genes Dev* **14**, 1448-1459.
386. **Takai, H., Tominaga, K., Motoyama, N., Minamishima, Y.A., Nagahama, H., Tsukiyama, T., Ikeda, K., Nakayama, K., and Nakanishi, M.** (2000). Aberrant cell cycle checkpoint function and early embryonic death in Chk1(-/-) mice. *Genes Dev* **14**, 1439-1447.
387. **Hirao, A., Kong, Y.Y., Matsuoka, S., Wakeham, A., Ruland, J., Yoshida, H., Liu, D., Elledge, S.J., and Mak, T.W.** (2000). DNA damage-induced activation of p53 by the checkpoint kinase Chk2. *Science* **287**, 1824-1827.
388. **Stevens, C., Smith, L., and La Thangue, N.B.** (2003). Chk2 activates E2F-1 in response to DNA damage. *Nat Cell Biol* **5**, 401-409.
389. **Donzelli, M., and Draetta, G.F.** (2003). Regulating mammalian checkpoints through Cdc25 inactivation. *EMBO Rep* **4**, 671-677.
390. **Furnari, B., Rhind, N., and Russell, P.** (1997). Cdc25 mitotic inducer targeted by chk1 DNA damage checkpoint kinase. *Science* **277**, 1495-1497.
391. **Falck, J., Mailand, N., Syljuasen, R.G., Bartek, J., and Lukas, J.** (2001). The ATM-Chk2-Cdc25A checkpoint pathway guards against radioresistant DNA synthesis. *Nature* **410**, 842-847.
392. **Mailand, N., Falck, J., Lukas, C., Syljuasen, R.G., Welcker, M., Bartek, J., and Lukas, J.** (2000). Rapid destruction of human Cdc25A in response to DNA damage. *Science* **288**, 1425-1429.

393. **Jin, J., Shirogane, T., Xu, L., Nalepa, G., Qin, J., Elledge, S.J., and Harper, J.W.** (2003). SCFbeta-TRCP links Chk1 signaling to degradation of the Cdc25A protein phosphatase. *Genes Dev* **17**, 3062-3074.
394. **Lee, J., Kumagai, A., and Dunphy, W.G.** (2001). Positive regulation of Wee1 by Chk1 and 14-3-3 proteins. *Mol Biol Cell* **12**, 551-563.
395. **Rothblum-Oviatt, C.J., Ryan, C.E., and Piwnica-Worms, H.** (2001). 14-3-3 binding regulates catalytic activity of human Wee1 kinase. *Cell Growth Differ* **12**, 581-589.
396. **Tse, A.N., Carvajal, R., and Schwartz, G.K.** (2007). Targeting checkpoint kinase 1 in cancer therapeutics. *Clin Cancer Res* **13**, 1955-1960.
397. **Graves, P.R., Yu, L., Schwarz, J.K., Gales, J., Sausville, E.A., O'Connor, P.M., and Piwnica-Worms, H.** (2000). The Chk1 protein kinase and the Cdc25C regulatory pathways are targets of the anticancer agent UCN-01. *J Biol Chem* **275**, 5600-5605.
398. **Coulombe, P., and Meloche, S.** (2007). Atypical mitogen-activated protein kinases: structure, regulation and functions. *Biochim Biophys Acta* **1773**, 1376-1387.
399. **Pawson, T.** (2002). Regulation and targets of receptor tyrosine kinases. *Eur J Cancer* **38 Suppl 5**, S3-10.
400. **Lowenstein, E.J., Daly, R.J., Batzer, A.G., Li, W., Margolis, B., Lammers, R., Ullrich, A., Skolnik, E.Y., Bar-Sagi, D., and Schlessinger, J.** (1992). The SH2 and SH3 domain-containing protein GRB2 links receptor tyrosine kinases to ras signaling. *Cell* **70**, 431-442.
401. **Rogge, R.D., Karlovich, C.A., and Banerjee, U.** (1991). Genetic dissection of a neurodevelopmental pathway: Son of sevenless functions downstream of the sevenless and EGF receptor tyrosine kinases. *Cell* **64**, 39-48.
402. **Bonfini, L., Karlovich, C.A., Dasgupta, C., and Banerjee, U.** (1992). The Son of sevenless gene product: a putative activator of Ras. *Science* **255**, 603-606.
403. **Zhang, X.F., Settleman, J., Kyriakis, J.M., Takeuchi-Suzuki, E., Elledge, S.J., Marshall, M.S., Bruder, J.T., Rapp, U.R., and Avruch, J.** (1993). Normal and oncogenic p21ras proteins bind to the amino-terminal regulatory domain of c-Raf-1. *Nature* **364**, 308-313.
404. **Leever, S.J., Paterson, H.F., and Marshall, C.J.** (1994). Requirement for Ras in Raf activation is overcome by targeting Raf to the plasma membrane. *Nature* **369**, 411-414.
405. **Dent, P., Haser, W., Haystead, T.A., Vincent, L.A., Roberts, T.M., and Sturgill, T.W.** (1992). Activation of mitogen-activated protein kinase kinase by v-Raf in NIH 3T3 cells and in vitro. *Science* **257**, 1404-1407.
406. **Kyriakis, J.M., App, H., Zhang, X.F., Banerjee, P., Brautigan, D.L., Rapp, U.R., and Avruch, J.** (1992). Raf-1 activates MAP kinase-kinase. *Nature* **358**, 417-421.
407. **Howe, L.R., Leever, S.J., Gomez, N., Nakielny, S., Cohen, P., and Marshall, C.J.** (1992). Activation of the MAP kinase pathway by the protein kinase raf. *Cell* **71**, 335-342.

408. **Seger, R., Ahn, N.G., Posada, J., Munar, E.S., Jensen, A.M., Cooper, J.A., Cobb, M.H., and Krebs, E.G.** (1992). Purification and characterization of mitogen-activated protein kinase activator(s) from epidermal growth factor-stimulated A431 cells. *J Biol Chem* **267**, 14373-14381.
409. **Seger, R., Seger, D., Lozeman, F.J., Ahn, N.G., Graves, L.M., Campbell, J.S., Ericsson, L., Harrylock, M., Jensen, A.M., and Krebs, E.G.** (1992). Human T-cell mitogen-activated protein kinase kinases are related to yeast signal transduction kinases. *J Biol Chem* **267**, 25628-25631.
410. **Crews, C.M., Alessandrini, A., and Erikson, R.L.** (1992). The primary structure of MEK, a protein kinase that phosphorylates the ERK gene product. *Science* **258**, 478-480.
411. **Yoon, S., and Seger, R.** (2006). The extracellular signal-regulated kinase: multiple substrates regulate diverse cellular functions. *Growth Factors* **24**, 21-44.
412. **Dhanasekaran, D.N., Kashef, K., Lee, C.M., Xu, H., and Reddy, E.P.** (2007). Scaffold proteins of MAP-kinase modules. *Oncogene* **26**, 3185-3202.
413. **Owens, D.M., and Keyse, S.M.** (2007). Differential regulation of MAP kinase signalling by dual-specificity protein phosphatases. *Oncogene* **26**, 3203-3213.
414. **Raman, M., Chen, W., and Cobb, M.H.** (2007). Differential regulation and properties of MAPKs. *Oncogene* **26**, 3100-3112.
415. **Meloche, S., and Pouyssegur, J.** (2007). The ERK1/2 mitogen-activated protein kinase pathway as a master regulator of the G1- to S-phase transition. *Oncogene* **26**, 3227-3239.
416. **Shaul, Y.D., and Seger, R.** (2007). The MEK/ERK cascade: from signaling specificity to diverse functions. *Biochim Biophys Acta* **1773**, 1213-1226.
417. **Pages, G., Guerin, S., Grall, D., Bonino, F., Smith, A., Anjuere, F., Auburger, P., and Pouyssegur, J.** (1999). Defective thymocyte maturation in p44 MAP kinase (Erk 1) knockout mice. *Science* **286**, 1374-1377.
418. **Mazzucchelli, C., Vantaggiato, C., Ciamei, A., Fasano, S., Pakhotin, P., Krezel, W., Welzl, H., Wolfer, D.P., Pages, G., Valverde, O., et al.** (2002). Knockout of ERK1 MAP kinase enhances synaptic plasticity in the striatum and facilitates striatal-mediated learning and memory. *Neuron* **34**, 807-820.
419. **Saba-El-Leil, M.K., Vella, F.D., Vernay, B., Voisin, L., Chen, L., Labrecque, N., Ang, S.L., and Meloche, S.** (2003). An essential function of the mitogen-activated protein kinase Erk2 in mouse trophoblast development. *EMBO Rep* **4**, 964-968.
420. **Hatano, N., Mori, Y., Oh-hora, M., Kosugi, A., Fujikawa, T., Nakai, N., Niwa, H., Miyazaki, J., Hamaoka, T., and Ogata, M.** (2003). Essential role for ERK2 mitogen-activated protein kinase in placental development. *Genes Cells* **8**, 847-856.
421. **Yao, Y., Li, W., Wu, J., Germann, U.A., Su, M.S., Kuida, K., and Boucher, D.M.** (2003). Extracellular signal-regulated kinase 2 is necessary for mesoderm differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 12759-12764.
422. **Boulton, T.G., Nye, S.H., Robbins, D.J., Ip, N.Y., Radziejewska, E., Morgenbesser, S.D., DePinho, R.A., Panayotatos, N., Cobb, M.H., and**

- Yancopoulos, G.D.** (1991). ERKs: a family of protein-serine/threonine kinases that are activated and tyrosine phosphorylated in response to insulin and NGF. *Cell* **65**, 663-675.
423. **Nakamura, K.D., Martinez, R., and Weber, M.J.** (1983). Tyrosine phosphorylation of specific proteins after mitogen stimulation of chicken embryo fibroblasts. *Mol Cell Biol* **3**, 380-390.
424. **Cooper, J.A., Sefton, B.M., and Hunter, T.** (1984). Diverse mitogenic agents induce the phosphorylation of two related 42,000-dalton proteins on tyrosine in quiescent chick cells. *Mol Cell Biol* **4**, 30-37.
425. **Kohno, M.** (1985). Diverse mitogenic agents induce rapid phosphorylation of a common set of cellular proteins at tyrosine in quiescent mammalian cells. *J Biol Chem* **260**, 1771-1779.
426. **Meloche, S., Seuwen, K., Pages, G., and Pouyssegur, J.** (1992). Biphasic and synergistic activation of p44mapk (ERK1) by growth factors: correlation between late phase activation and mitogenicity. *Mol Endocrinol* **6**, 845-854.
427. **Pages, G., Lenormand, P., L'Allemain, G., Chambard, J.C., Meloche, S., and Pouyssegur, J.** (1993). Mitogen-activated protein kinases p42mapk and p44mapk are required for fibroblast proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 8319-8323.
428. **Lefloch, R., Pouyssegur, J., and Lenormand, P.** (2008). Single and combined silencing of ERK1 and ERK2 reveals their positive contribution to growth signaling depending on their expression levels. *Mol Cell Biol* **28**, 511-527.
429. **Voisin, L., Saba-El-Leil, M.K., Julien, C., Fremin, C., and Meloche, S.** (2010). Genetic demonstration of a redundant role of extracellular signal-regulated kinase 1 (ERK1) and ERK2 mitogen-activated protein kinases in promoting fibroblast proliferation. *Mol Cell Biol* **30**, 2918-2932.
430. **Chambard, J.C., Lefloch, R., Pouyssegur, J., and Lenormand, P.** (2007). ERK implication in cell cycle regulation. *Biochim Biophys Acta* **1773**, 1299-1310.
431. **Davies, H., Bignell, G.R., Cox, C., Stephens, P., Edkins, S., Clegg, S., Teague, J., Woffendin, H., Garnett, M.J., Bottomley, W., et al.** (2002). Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature* **417**, 949-954.
432. **Lavoie, J.N., L'Allemain, G., Brunet, A., Muller, R., and Pouyssegur, J.** (1996). Cyclin D1 expression is regulated positively by the p42/p44MAPK and negatively by the p38/HOGMAPK pathway. *J Biol Chem* **271**, 20608-20616.
433. **Gille, H., Kortenjann, M., Thomae, O., Moomaw, C., Slaughter, C., Cobb, M.H., and Shaw, P.E.** (1995). ERK phosphorylation potentiates Elk-1-mediated ternary complex formation and transactivation. *EMBO J* **14**, 951-962.
434. **Okazaki, K., and Sagata, N.** (1995). The Mos/MAP kinase pathway stabilizes c-Fos by phosphorylation and augments its transforming activity in NIH 3T3 cells. *EMBO J* **14**, 5048-5059.

435. **Herber, B., Truss, M., Beato, M., and Muller, R.** (1994). Inducible regulatory elements in the human cyclin D1 promoter. *Oncogene* **9**, 1295-1304.
436. **Sears, R., Nuckolls, F., Haura, E., Taya, Y., Tamai, K., and Nevins, J.R.** (2000). Multiple Ras-dependent phosphorylation pathways regulate Myc protein stability. *Genes Dev* **14**, 2501-2514.
437. **Daksis, J.I., Lu, R.Y., Facchini, L.M., Marhin, W.W., and Penn, L.J.** (1994). Myc induces cyclin D1 expression in the absence of de novo protein synthesis and links mitogen-stimulated signal transduction to the cell cycle. *Oncogene* **9**, 3635-3645.
438. **Karaiskou, A., Dupre, A., Haccard, O., and Jessus, C.** (2001). From progesterone to active Cdc2 in *Xenopus* oocytes: a puzzling signalling pathway. *Biol Cell* **93**, 35-46.
439. **Castro, A., Peter, M., Lorca, T., and Mandart, E.** (2001). c-Mos and cyclin B/cdc2 connections during *Xenopus* oocyte maturation. *Biol Cell* **93**, 15-25.
440. **Papkoff, J., Verma, I.M., and Hunter, T.** (1982). Detection of a transforming gene product in cells transformed by Moloney murine sarcoma virus. *Cell* **29**, 417-426.
441. **Nebreda, A.R., and Hunt, T.** (1993). The c-mos proto-oncogene protein kinase turns on and maintains the activity of MAP kinase, but not MPF, in cell-free extracts of *Xenopus* oocytes and eggs. *EMBO J* **12**, 1979-1986.
442. **Posada, J., Yew, N., Ahn, N.G., Vande Woude, G.F., and Cooper, J.A.** (1993). Mos stimulates MAP kinase in *Xenopus* oocytes and activates a MAP kinase kinase in vitro. *Mol Cell Biol* **13**, 2546-2553.
443. **Shibuya, E.K., and Ruderman, J.V.** (1993). Mos induces the in vitro activation of mitogen-activated protein kinases in lysates of frog oocytes and mammalian somatic cells. *Mol Biol Cell* **4**, 781-790.
444. **Sturgill, T.W., Ray, L.B., Erikson, E., and Maller, J.L.** (1988). Insulin-stimulated MAP-2 kinase phosphorylates and activates ribosomal protein S6 kinase II. *Nature* **334**, 715-718.
445. **Palmer, A., Gavin, A.C., and Nebreda, A.R.** (1998). A link between MAP kinase and p34(cdc2)/cyclin B during oocyte maturation: p90(rsk) phosphorylates and inactivates the p34(cdc2) inhibitory kinase Myt1. *EMBO J* **17**, 5037-5047.
446. **Tamemoto, H., Kadowaki, T., Tobe, K., Ueki, K., Izumi, T., Chatani, Y., Kohno, M., Kasuga, M., Yazaki, Y., and Akanuma, Y.** (1992). Biphasic activation of two mitogen-activated protein kinases during the cell cycle in mammalian cells. *J Biol Chem* **267**, 20293-20297.
447. **Edelmann, H.M., Kuhne, C., Petritsch, C., and Ballou, L.M.** (1996). Cell cycle regulation of p70 S6 kinase and p42/p44 mitogen-activated protein kinases in Swiss mouse 3T3 fibroblasts. *J Biol Chem* **271**, 963-971.
448. **Wright, J.H., Munar, E., Jameson, D.R., Andreassen, P.R., Margolis, R.L., Seger, R., and Krebs, E.G.** (1999). Mitogen-activated protein kinase activity is required for the G(2)/M transition of the cell cycle in mammalian fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 11335-11340.

449. **Roberts, E.C., Shapiro, P.S., Nahreini, T.S., Pages, G., Pouyssegur, J., and Ahn, N.G.** (2002). Distinct cell cycle timing requirements for extracellular signal-regulated kinase and phosphoinositide 3-kinase signaling pathways in somatic cell mitosis. *Mol Cell Biol* **22**, 7226-7241.
450. **Shapiro, P.S., Vaisberg, E., Hunt, A.J., Tolwinski, N.S., Whalen, A.M., McIntosh, J.R., and Ahn, N.G.** (1998). Activation of the MKK/ERK pathway during somatic cell mitosis: direct interactions of active ERK with kinetochores and regulation of the mitotic 3F3/2 phosphoantigen. *J Cell Biol* **142**, 1533-1545.
451. **Zecevic, M., Catling, A.D., Eblen, S.T., Renzi, L., Hittle, J.C., Yen, T.J., Gorbsky, G.J., and Weber, M.J.** (1998). Active MAP kinase in mitosis: localization at kinetochores and association with the motor protein CENP-E. *J Cell Biol* **142**, 1547-1558.
452. **Willard, F.S., and Crouch, M.F.** (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**, 653-664.
453. **Liu, X., Yan, S., Zhou, T., Terada, Y., and Erikson, R.L.** (2004). The MAP kinase pathway is required for entry into mitosis and cell survival. *Oncogene* **23**, 763-776.
454. **Cha, H., Hancock, C., Dangi, S., Maignel, D., Carrier, F., and Shapiro, P.** (2004). Phosphorylation regulates nucleophosmin targeting to the centrosome during mitosis as detected by cross-reactive phosphorylation-specific MKK1/MKK2 antibodies. *Biochem J* **378**, 857-865.
455. **Hayne, C., Xiang, X., and Luo, Z.** (2004). MEK inhibition and phosphorylation of serine 4 on B23 are two coincident events in mitosis. *Biochem Biophys Res Commun* **321**, 675-680.
456. **Laird, A.D., Taylor, S.J., Oberst, M., and Shalloway, D.** (1995). Raf-1 is activated during mitosis. *J Biol Chem* **270**, 26742-26745.
457. **Lovric, J., and Moelling, K.** (1996). Activation of Mit/Raf protein kinases in mitotic cells. *Oncogene* **12**, 1109-1116.
458. **Takenaka, K., Moriguchi, T., and Nishida, E.** (1998). Activation of the protein kinase p38 in the spindle assembly checkpoint and mitotic arrest. *Science* **280**, 599-602.
459. **Gomez-Cambroner, J.** (1999). p42-MAP kinase is activated in EGF-stimulated interphase but not in metaphase-arrested HeLa cells. *FEBS Lett* **443**, 126-130.
460. **Hayne, C., Tzivion, G., and Luo, Z.** (2000). Raf-1/MEK/MAPK pathway is necessary for the G2/M transition induced by nocodazole. *J Biol Chem* **275**, 31876-31882.
461. **Harding, A., Giles, N., Burgess, A., Hancock, J.F., and Gabrielli, B.G.** (2003). Mechanism of mitosis-specific activation of MEK1. *J Biol Chem* **278**, 16747-16754.
462. **Ziogas, A., Lorenz, I.C., Moelling, K., and Radziwill, G.** (1998). Mitotic Raf-1 is stimulated independently of Ras and is active in the cytoplasm. *J Biol Chem* **273**, 24108-24114.

463. **Laird, A.D., Morrison, D.K., and Shalloway, D.** (1999). Characterization of Raf-1 activation in mitosis. *J Biol Chem* **274**, 4430-4439.
464. **Knauf, J.A., Ouyang, B., Knudsen, E.S., Fukasawa, K., Babcock, G., and Fagin, J.A.** (2006). Oncogenic RAS induces accelerated transition through G2/M and promotes defects in the G2 DNA damage and mitotic spindle checkpoints. *J Biol Chem* **281**, 3800-3809.
465. **Ma, R.Y., Tong, T.H., Cheung, A.M., Tsang, A.C., Leung, W.Y., and Yao, K.M.** (2005). Raf/MEK/MAPK signaling stimulates the nuclear translocation and transactivating activity of FOXM1c. *J Cell Sci* **118**, 795-806.
466. **Izumi, T., and Maller, J.L.** (1991). Phosphorylation of Xenopus cyclins B1 and B2 is not required for cell cycle transitions. *Mol Cell Biol* **11**, 3860-3867.
467. **Walsh, S., Margolis, S.S., and Kornbluth, S.** (2003). Phosphorylation of the cyclin b1 cytoplasmic retention sequence by mitogen-activated protein kinase and Plx. *Mol Cancer Res* **1**, 280-289.
468. **Wang, R., He, G., Nelman-Gonzalez, M., Ashorn, C.L., Gallick, G.E., Stukenberg, P.T., Kirschner, M.W., and Kuang, J.** (2007). Regulation of Cdc25C by ERK-MAP kinases during the G2/M transition. *Cell* **128**, 1119-1132.
469. **Shinohara, M., Mikhailov, A.V., Aguirre-Ghiso, J.A., and Rieder, C.L.** (2006). Extracellular signal-regulated kinase 1/2 activity is not required in mammalian cells during late G2 for timely entry into or exit from mitosis. *Mol Biol Cell* **17**, 5227-5240.
470. **Sklar, M.D.** (1988). The ras oncogenes increase the intrinsic resistance of NIH 3T3 cells to ionizing radiation. *Science* **239**, 645-647.
471. **Kasid, U., Suy, S., Dent, P., Ray, S., Whiteside, T.L., and Sturgill, T.W.** (1996). Activation of Raf by ionizing radiation. *Nature* **382**, 813-816.
472. **Stevenson, M.A., Pollock, S.S., Coleman, C.N., and Calderwood, S.K.** (1994). X-irradiation, phorbol esters, and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> stimulate mitogen-activated protein kinase activity in NIH-3T3 cells through the formation of reactive oxygen intermediates. *Cancer Res* **54**, 12-15.
473. **Kharbanda, S., Saleem, A., Shafman, T., Emoto, Y., Weichselbaum, R., and Kufe, D.** (1994). Activation of the pp90rsk and mitogen-activated serine/threonine protein kinases by ionizing radiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 5416-5420.
474. **Abbott, D.W., and Holt, J.T.** (1999). Mitogen-activated protein kinase kinase 2 activation is essential for progression through the G2/M checkpoint arrest in cells exposed to ionizing radiation. *J Biol Chem* **274**, 2732-2742.
475. **Tang, D., Wu, D., Hirao, A., Lahti, J.M., Liu, L., Mazza, B., Kidd, V.J., Mak, T.W., and Ingram, A.J.** (2002). ERK activation mediates cell cycle arrest and apoptosis after DNA damage independently of p53. *J Biol Chem* **277**, 12710-12717.
476. **Yan, Y., Black, C.P., and Cowan, K.H.** (2007). Irradiation-induced G2/M checkpoint response requires ERK1/2 activation. *Oncogene* **26**, 4689-4698.
477. **Yan, Y., Haas, J.P., Kim, M., Sgagias, M.K., and Cowan, K.H.** (2002). BRCA1-induced apoptosis involves inactivation of ERK1/2 activities. *J Biol Chem* **277**, 33422-33430.

478. **Yan, Y., Spieker, R.S., Kim, M., Stoeger, S.M., and Cowan, K.H.** (2005). BRCA1-mediated G2/M cell cycle arrest requires ERK1/2 kinase activation. *Oncogene* **24**, 3285-3296.
479. **Nam, H.J., Kim, S., Lee, M.W., Lee, B.S., Hara, T., Saya, H., Cho, H., and Lee, J.H.** (2008). The ERK-RSK1 activation by growth factors at G2 phase delays cell cycle progression and reduces mitotic aberrations. *Cell Signal* **20**, 1349-1358.
480. **Astuti, P., Pike, T., Widberg, C., Payne, E., Harding, A., Hancock, J., and Gabrielli, B.** (2009). MAPK pathway activation delays G2/M progression by destabilizing Cdc25B. *J Biol Chem* **284**, 33781-33788.
481. **Acharya, U., Mallabiabarrena, A., Acharya, J.K., and Malhotra, V.** (1998). Signaling via mitogen-activated protein kinase kinase (MEK1) is required for Golgi fragmentation during mitosis. *Cell* **92**, 183-192.
482. **Colanzi, A., Deerinck, T.J., Ellisman, M.H., and Malhotra, V.** (2000). A specific activation of the mitogen-activated protein kinase kinase 1 (MEK1) is required for Golgi fragmentation during mitosis. *J Cell Biol* **149**, 331-339.
483. **Shaul, Y.D., Gibor, G., Plotnikov, A., and Seger, R.** (2009). Specific phosphorylation and activation of ERK1c by MEK1b: a unique route in the ERK cascade. *Genes Dev* **23**, 1779-1790.
484. **Colanzi, A., Sutterlin, C., and Malhotra, V.** (2003). RAF1-activated MEK1 is found on the Golgi apparatus in late prophase and is required for Golgi complex fragmentation in mitosis. *J Cell Biol* **161**, 27-32.
485. **Shaul, Y.D., and Seger, R.** (2006). ERK1c regulates Golgi fragmentation during mitosis. *J Cell Biol* **172**, 885-897.
486. **Jesch, S.A., Lewis, T.S., Ahn, N.G., and Linstedt, A.D.** (2001). Mitotic phosphorylation of Golgi reassembly stacking protein 55 by mitogen-activated protein kinase ERK2. *Mol Biol Cell* **12**, 1811-1817.
487. **Kyriakis, J.M., and Avruch, J.** (2001). Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. *Physiol Rev* **81**, 807-869.
488. **Han, J., Lee, J.D., Bibbs, L., and Ulevitch, R.J.** (1994). A MAP kinase targeted by endotoxin and hyperosmolarity in mammalian cells. *Science* **265**, 808-811.
489. **Lee, J.C., Laydon, J.T., McDonnell, P.C., Gallagher, T.F., Kumar, S., Green, D., McNulty, D., Blumenthal, M.J., Heys, J.R., Landvatter, S.W., et al.** (1994). A protein kinase involved in the regulation of inflammatory cytokine biosynthesis. *Nature* **372**, 739-746.
490. **Rouse, J., Cohen, P., Trigon, S., Morange, M., Alonso-Llamazares, A., Zamanillo, D., Hunt, T., and Nebreda, A.R.** (1994). A novel kinase cascade triggered by stress and heat shock that stimulates MAPKAP kinase-2 and phosphorylation of the small heat shock proteins. *Cell* **78**, 1027-1037.
491. **Freshney, N.W., Rawlinson, L., Guesdon, F., Jones, E., Cowley, S., Hsuan, J., and Saklatvala, J.** (1994). Interleukin-1 activates a novel protein kinase cascade that results in the phosphorylation of Hsp27. *Cell* **78**, 1039-1049.



492. **Brewster, J.L., de Valoir, T., Dwyer, N.D., Winter, E., and Gustin, M.C.** (1993). An osmosensing signal transduction pathway in yeast. *Science* **259**, 1760-1763.
493. **Cuadrado, A., and Nebreda, A.R.** (2010). Mechanisms and functions of p38 MAPK signalling. *Biochem J* **429**, 403-417.
494. **Tamura, K., Sudo, T., Senftleben, U., Dadak, A.M., Johnson, R., and Karin, M.** (2000). Requirement for p38alpha in erythropoietin expression: a role for stress kinases in erythropoiesis. *Cell* **102**, 221-231.
495. **Adams, R.H., Porras, A., Alonso, G., Jones, M., Vintersten, K., Panelli, S., Valladares, A., Perez, L., Klein, R., and Nebreda, A.R.** (2000). Essential role of p38alpha MAP kinase in placental but not embryonic cardiovascular development. *Mol Cell* **6**, 109-116.
496. **Mudgett, J.S., Ding, J., Guh-Siesel, L., Chartrain, N.A., Yang, L., Gopal, S., and Shen, M.M.** (2000). Essential role for p38alpha mitogen-activated protein kinase in placental angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 10454-10459.
497. **Ventura, J.J., Tenbaum, S., Perdiguero, E., Huth, M., Guerra, C., Barbacid, M., Pasparakis, M., and Nebreda, A.R.** (2007). p38alpha MAP kinase is essential in lung stem and progenitor cell proliferation and differentiation. *Nat Genet* **39**, 750-758.
498. **Hui, L., Bakiri, L., Mairhorfer, A., Schweifer, N., Haslinger, C., Kenner, L., Komnenovic, V., Scheuch, H., Beug, H., and Wagner, E.F.** (2007). p38alpha suppresses normal and cancer cell proliferation by antagonizing the JNK-c-Jun pathway. *Nat Genet* **39**, 741-749.
499. **Casanovas, O., Miro, F., Estanyol, J.M., Itarte, E., Agell, N., and Bachs, O.** (2000). Osmotic stress regulates the stability of cyclin D1 in a p38SAPK2-dependent manner. *J Biol Chem* **275**, 35091-35097.
500. **Brancho, D., Tanaka, N., Jaeschke, A., Ventura, J.J., Kelkar, N., Tanaka, Y., Kyuuma, M., Takeshita, T., Flavell, R.A., and Davis, R.J.** (2003). Mechanism of p38 MAP kinase activation in vivo. *Genes Dev* **17**, 1969-1978.
501. **Lu, H.T., Yang, D.D., Wysk, M., Gatti, E., Mellman, I., Davis, R.J., and Flavell, R.A.** (1999). Defective IL-12 production in mitogen-activated protein (MAP) kinase kinase 3 (Mkk3)-deficient mice. *EMBO J* **18**, 1845-1857.
502. **Tanaka, N., Kamanaka, M., Enslin, H., Dong, C., Wysk, M., Davis, R.J., and Flavell, R.A.** (2002). Differential involvement of p38 mitogen-activated protein kinase kinases MKK3 and MKK6 in T-cell apoptosis. *EMBO Rep* **3**, 785-791.
503. **Thornton, T.M., and Rincon, M.** (2009). Non-classical p38 map kinase functions: cell cycle checkpoints and survival. *Int J Biol Sci* **5**, 44-51.
504. **Yen, A.H., and Yang, J.L.** (2010). Cdc20 proteolysis requires p38 MAPK signaling and Cdh1-independent APC/C ubiquitination during spindle assembly checkpoint activation by cadmium. *J Cell Physiol* **223**, 327-334.
505. **Bulavin, D.V., Higashimoto, Y., Popoff, I.J., Gaarde, W.A., Basrur, V., Potapova, O., Appella, E., and Fornace, A.J., Jr.** (2001). Initiation of a G2/M checkpoint after ultraviolet radiation requires p38 kinase. *Nature* **411**, 102-107.

506. **Mikhailov, A., Shinohara, M., and Rieder, C.L.** (2004). Topoisomerase II and histone deacetylase inhibitors delay the G2/M transition by triggering the p38 MAPK checkpoint pathway. *J Cell Biol* **166**, 517-526.
507. **Hirose, Y., Katayama, M., Stokoe, D., Haas-Kogan, D.A., Berger, M.S., and Pieper, R.O.** (2003). The p38 mitogen-activated protein kinase pathway links the DNA mismatch repair system to the G2 checkpoint and to resistance to chemotherapeutic DNA-methylating agents. *Mol Cell Biol* **23**, 8306-8315.
508. **Cha, H., Wang, X., Li, H., and Fornace, A.J., Jr.** (2007). A functional role for p38 MAPK in modulating mitotic transit in the absence of stress. *J Biol Chem* **282**, 22984-22992.
509. **Matsusaka, T., and Pines, J.** (2004). Chfr acts with the p38 stress kinases to block entry to mitosis in mammalian cells. *J Cell Biol* **166**, 507-516.
510. **Scolnick, D.M., and Halazonetis, T.D.** (2000). Chfr defines a mitotic stress checkpoint that delays entry into metaphase. *Nature* **406**, 430-435.
511. **Raman, M., Earnest, S., Zhang, K., Zhao, Y., and Cobb, M.H.** (2007). TAO kinases mediate activation of p38 in response to DNA damage. *EMBO J* **26**, 2005-2014.
512. **Draviam, V.M., Stegmeier, F., Nalepa, G., Sowa, M.E., Chen, J., Liang, A., Hannon, G.J., Sorger, P.K., Harper, J.W., and Elledge, S.J.** (2007). A functional genomic screen identifies a role for TAO1 kinase in spindle-checkpoint signalling. *Nat Cell Biol* **9**, 556-564.
513. **Reinhardt, H.C., Aslanian, A.S., Lees, J.A., and Yaffe, M.B.** (2007). p53-deficient cells rely on ATM- and ATR-mediated checkpoint signaling through the p38MAPK/MK2 pathway for survival after DNA damage. *Cancer Cell* **11**, 175-189.
514. **Herrlich, P., Karin, M., and Weiss, C.** (2008). Supreme EnLIGHTenment: damage recognition and signaling in the mammalian UV response. *Mol Cell* **29**, 279-290.
515. **Gross, S., Knebel, A., Tenev, T., Neininger, A., Gaestel, M., Herrlich, P., and Bohmer, F.D.** (1999). Inactivation of protein-tyrosine phosphatases as mechanism of UV-induced signal transduction. *J Biol Chem* **274**, 26378-26386.
516. **Knebel, A., Rahmsdorf, H.J., Ullrich, A., and Herrlich, P.** (1996). Dephosphorylation of receptor tyrosine kinases as target of regulation by radiation, oxidants or alkylating agents. *EMBO J* **15**, 5314-5325.
517. **Ben-Levy, R., Hooper, S., Wilson, R., Paterson, H.F., and Marshall, C.J.** (1998). Nuclear export of the stress-activated protein kinase p38 mediated by its substrate MAPKAP kinase-2. *Curr Biol* **8**, 1049-1057.
518. **Gaestel, M.** (2006). MAPKAP kinases - MKs - two's company, three's a crowd. *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**, 120-130.
519. **Manke, I.A., Nguyen, A., Lim, D., Stewart, M.Q., Elia, A.E., and Yaffe, M.B.** (2005). MAPKAP kinase-2 is a cell cycle checkpoint kinase that regulates the G2/M transition and S phase progression in response to UV irradiation. *Mol Cell* **17**, 37-48.

520. **Lemaire, M., Froment, C., Boutros, R., Mondesert, O., Nebreda, A.R., Monsarrat, B., and Ducommun, B.** (2006). CDC25B phosphorylation by p38 and MK-2. *Cell Cycle* **5**, 1649-1653.
521. **She, Q.B., Chen, N., and Dong, Z.** (2000). ERKs and p38 kinase phosphorylate p53 protein at serine 15 in response to UV radiation. *J Biol Chem* **275**, 20444-20449.
522. **She, Q.B., Ma, W.Y., and Dong, Z.** (2002). Role of MAP kinases in UVB-induced phosphorylation of p53 at serine 20. *Oncogene* **21**, 1580-1589.
523. **Dahlkvist, A., Kanter-Smoler, G., and Sunnerhagen, P.** (1995). The RCK1 and RCK2 protein kinase genes from *Saccharomyces cerevisiae* suppress cell cycle checkpoint mutations in *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Gen Genet* **246**, 316-326.
524. **Dahlkvist, A., and Sunnerhagen, P.** (1994). Two novel deduced serine/threonine protein kinases from *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* **139**, 27-33.
525. **Begley, T.J., Rosenbach, A.S., Ideker, T., and Samson, L.D.** (2004). Hot spots for modulating toxicity identified by genomic phenotyping and localization mapping. *Mol Cell* **16**, 117-125.
526. **Lopez-Aviles, S., Grande, M., Gonzalez, M., Helgesen, A.L., Alemany, V., Sanchez-Piris, M., Bachs, O., Millar, J.B., and Aligue, R.** (2005). Inactivation of the Cdc25 phosphatase by the stress-activated Srk1 kinase in fission yeast. *Mol Cell* **17**, 49-59.
527. **Davis, R.J.** (2000). Signal transduction by the JNK group of MAP kinases. *Cell* **103**, 239-252.
528. **Pulverer, B.J., Kyriakis, J.M., Avruch, J., Nikolakaki, E., and Woodgett, J.R.** (1991). Phosphorylation of c-jun mediated by MAP kinases. *Nature* **353**, 670-674.
529. **Derijard, B., Hibi, M., Wu, I.H., Barrett, T., Su, B., Deng, T., Karin, M., and Davis, R.J.** (1994). JNK1: a protein kinase stimulated by UV light and Ha-Ras that binds and phosphorylates the c-Jun activation domain. *Cell* **76**, 1025-1037.
530. **Eferl, R., and Wagner, E.F.** (2003). AP-1: a double-edged sword in tumorigenesis. *Nat Rev Cancer* **3**, 859-868.
531. **Nishina, H., Wada, T., and Katada, T.** (2004). Physiological roles of SAPK/JNK signaling pathway. *J Biochem* **136**, 123-126.
532. **Weston, C.R., and Davis, R.J.** (2002). The JNK signal transduction pathway. *Curr Opin Genet Dev* **12**, 14-21.
533. **Karin, M., and Gallagher, E.** (2005). From JNK to pay dirt: jun kinases, their biochemistry, physiology and clinical importance. *IUBMB Life* **57**, 283-295.
534. **Weston, C.R., and Davis, R.J.** (2007). The JNK signal transduction pathway. *Curr Opin Cell Biol* **19**, 142-149.
535. **Sabapathy, K., Hochedlinger, K., Nam, S.Y., Bauer, A., Karin, M., and Wagner, E.F.** (2004). Distinct roles for JNK1 and JNK2 in regulating JNK activity and c-Jun-dependent cell proliferation. *Mol Cell* **15**, 713-725.

536. **Tournier, C., Hess, P., Yang, D.D., Xu, J., Turner, T.K., Nimmual, A., Bar-Sagi, D., Jones, S.N., Flavell, R.A., and Davis, R.J.** (2000). Requirement of JNK for stress-induced activation of the cytochrome c-mediated death pathway. *Science* **288**, 870-874.
537. **Jaeschke, A., Karasarides, M., Ventura, J.J., Ehrhardt, A., Zhang, C., Flavell, R.A., Shokat, K.M., and Davis, R.J.** (2006). JNK2 is a positive regulator of the cJun transcription factor. *Mol Cell* **23**, 899-911.
538. **Hibi, M., Lin, A., Smeal, T., Minden, A., and Karin, M.** (1993). Identification of an oncoprotein- and UV-responsive protein kinase that binds and potentiates the c-Jun activation domain. *Genes Dev* **7**, 2135-2148.
539. **Raivich, G.** (2008). c-Jun expression, activation and function in neural cell death, inflammation and repair. *J Neurochem* **107**, 898-906.
540. **Morton, S., Davis, R.J., McLaren, A., and Cohen, P.** (2003). A reinvestigation of the multisite phosphorylation of the transcription factor c-Jun. *EMBO J* **22**, 3876-3886.
541. **Hilberg, F., Aguzzi, A., Howells, N., and Wagner, E.F.** (1993). c-jun is essential for normal mouse development and hepatogenesis. *Nature* **365**, 179-181.
542. **Wisdom, R., Johnson, R.S., and Moore, C.** (1999). c-Jun regulates cell cycle progression and apoptosis by distinct mechanisms. *EMBO J* **18**, 188-197.
543. **Schreiber, M., Kolbus, A., Piu, F., Szabowski, A., Mohle-Steinlein, U., Tian, J., Karin, M., Angel, P., and Wagner, E.F.** (1999). Control of cell cycle progression by c-Jun is p53 dependent. *Genes Dev* **13**, 607-619.
544. **Behrens, A., Sibilio, M., and Wagner, E.F.** (1999). Amino-terminal phosphorylation of c-Jun regulates stress-induced apoptosis and cellular proliferation. *Nat Genet* **21**, 326-329.
545. **Yamamoto, K., Ichijo, H., and Korsmeyer, S.J.** (1999). BCL-2 is phosphorylated and inactivated by an ASK1/Jun N-terminal protein kinase pathway normally activated at G(2)/M. *Mol Cell Biol* **19**, 8469-8478.
546. **Fan, M., Du, L., Stone, A.A., Gilbert, K.M., and Chambers, T.C.** (2000). Modulation of mitogen-activated protein kinases and phosphorylation of Bcl-2 by vinblastine represent persistent forms of normal fluctuations at G2-M1. *Cancer Res* **60**, 6403-6407.
547. **Wang, T.H., Wang, H.S., Ichijo, H., Giannakakou, P., Foster, J.S., Fojo, T., and Wimalasena, J.** (1998). Microtubule-interfering agents activate c-Jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinase through both Ras and apoptosis signal-regulating kinase pathways. *J Biol Chem* **273**, 4928-4936.
548. **Tatebayashi, Y., Planel, E., Chui, D.H., Sato, S., Miyasaka, T., Sahara, N., Murayama, M., Kikuchi, N., Yoshioka, K., Rivka, R., et al.** (2006). c-jun N-terminal kinase hyperphosphorylates R406W tau at the PHF-1 site during mitosis. *FASEB J* **20**, 762-764.
549. **Chuang, J.Y., Wang, Y.T., Yeh, S.H., Liu, Y.W., Chang, W.C., and Hung, J.J.** (2008). Phosphorylation by c-Jun NH2-terminal kinase 1 regulates the stability of transcription factor Sp1 during mitosis. *Mol Biol Cell* **19**, 1139-1151.

550. **Du, L., Lyle, C.S., Obey, T.B., Gaarde, W.A., Muir, J.A., Bennett, B.L., and Chambers, T.C.** (2004). Inhibition of cell proliferation and cell cycle progression by specific inhibition of basal JNK activity: evidence that mitotic Bcl-2 phosphorylation is JNK-independent. *J Biol Chem* **279**, 11957-11966.
551. **Mingo-Sion, A.M., Marietta, P.M., Koller, E., Wolf, D.M., and Van Den Berg, C.L.** (2004). Inhibition of JNK reduces G2/M transit independent of p53, leading to endoreduplication, decreased proliferation, and apoptosis in breast cancer cells. *Oncogene* **23**, 596-604.
552. **MacCorkle, R.A., and Tan, T.H.** (2004). Inhibition of JNK2 disrupts anaphase and produces aneuploidy in mammalian cells. *J Biol Chem* **279**, 40112-40121.
553. **Gutierrez, G.J., Tsuji, T., Chen, M., Jiang, W., and Ronai, Z.A.** Interplay between Cdh1 and JNK activity during the cell cycle. *Nat Cell Biol* **12**, 686-695.
554. **MacCorkle-Chosnek, R.A., VanHooser, A., Goodrich, D.W., Brinkley, B.R., and Tan, T.H.** (2001). Cell cycle regulation of c-Jun N-terminal kinase activity at the centrosomes. *Biochem Biophys Res Commun* **289**, 173-180.
555. **Goss, V.L., Cross, J.V., Ma, K., Qian, Y., Mola, P.W., and Templeton, D.J.** (2003). SAPK/JNK regulates cdc2/cyclin B kinase through phosphorylation and inhibition of cdc25c. *Cell Signal* **15**, 709-718.
556. **Gutierrez, G.J., Tsuji, T., Cross, J.V., Davis, R.J., Templeton, D.J., Jiang, W., and Ronai, Z.A.** (2010). JNK-mediated phosphorylation of Cdc25C regulates cell cycle entry and G(2)/M DNA damage checkpoint. *J Biol Chem* **285**, 14217-14228.
557. **Wada, T., Joza, N., Cheng, H.Y., Sasaki, T., Koziaradzki, I., Bachmaier, K., Katada, T., Schreiber, M., Wagner, E.F., Nishina, H., et al.** (2004). MKK7 couples stress signalling to G2/M cell-cycle progression and cellular senescence. *Nat Cell Biol* **6**, 215-226.
558. **Wang, X., and Tournier, C.** (2006). Regulation of cellular functions by the ERK5 signalling pathway. *Cell Signal* **18**, 753-760.
559. **Hayashi, M., and Lee, J.D.** (2004). Role of the BMK1/ERK5 signaling pathway: lessons from knockout mice. *J Mol Med* **82**, 800-808.
560. **Kato, Y., Tapping, R.I., Huang, S., Watson, M.H., Ulevitch, R.J., and Lee, J.D.** (1998). Bmk1/Erk5 is required for cell proliferation induced by epidermal growth factor. *Nature* **395**, 713-716.
561. **Abe, J., Kusuhara, M., Ulevitch, R.J., Berk, B.C., and Lee, J.D.** (1996). Big mitogen-activated protein kinase 1 (BMK1) is a redox-sensitive kinase. *J Biol Chem* **271**, 16586-16590.
562. **Nishimoto, S., and Nishida, E.** (2006). MAPK signalling: ERK5 versus ERK1/2. *EMBO Rep* **7**, 782-786.
563. **Buschbeck, M., and Ullrich, A.** (2005). The unique C-terminal tail of the mitogen-activated protein kinase ERK5 regulates its activation and nuclear shuttling. *J Biol Chem* **280**, 2659-2667.
564. **Yan, L., Carr, J., Ashby, P.R., Murry-Tait, V., Thompson, C., and Arthur, J.S.** (2003). Knockout of ERK5 causes multiple defects in placental and embryonic development. *BMC Dev Biol* **3**, 11.

565. **Sohn, S.J., Sarvis, B.K., Cado, D., and Winoto, A.** (2002). ERK5 MAPK regulates embryonic angiogenesis and acts as a hypoxia-sensitive repressor of vascular endothelial growth factor expression. *J Biol Chem* **277**, 43344-43351.
566. **Regan, C.P., Li, W., Boucher, D.M., Spatz, S., Su, M.S., and Kuida, K.** (2002). Erk5 null mice display multiple extraembryonic vascular and embryonic cardiovascular defects. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 9248-9253.
567. **Nishimoto, S., Kusakabe, M., and Nishida, E.** (2005). Requirement of the MEK5-ERK5 pathway for neural differentiation in *Xenopus* embryonic development. *EMBO Rep* **6**, 1064-1069.
568. **Kato, Y., Kravchenko, V.V., Tapping, R.I., Han, J., Ulevitch, R.J., and Lee, J.D.** (1997). BMK1/ERK5 regulates serum-induced early gene expression through transcription factor MEF2C. *EMBO J* **16**, 7054-7066.
569. **Mulloy, R., Salinas, S., Philips, A., and Hipskind, R.A.** (2003). Activation of cyclin D1 expression by the ERK5 cascade. *Oncogene* **22**, 5387-5398.
570. **Hayashi, M., Tapping, R.I., Chao, T.H., Lo, J.F., King, C.C., Yang, Y., and Lee, J.D.** (2001). BMK1 mediates growth factor-induced cell proliferation through direct cellular activation of serum and glucocorticoid-inducible kinase. *J Biol Chem* **276**, 8631-8634.
571. **Buse, P., Tran, S.H., Luther, E., Phu, P.T., Aponte, G.W., and Firestone, G.L.** (1999). Cell cycle and hormonal control of nuclear-cytoplasmic localization of the serum- and glucocorticoid-inducible protein kinase, Sgk, in mammary tumor cells. A novel convergence point of anti-proliferative and proliferative cell signaling pathways. *J Biol Chem* **274**, 7253-7263.
572. **Suzaki, Y., Yoshizumi, M., Kagami, S., Koyama, A.H., Taketani, Y., Houchi, H., Tsuchiya, K., Takeda, E., and Tamaki, T.** (2002). Hydrogen peroxide stimulates c-Src-mediated big mitogen-activated protein kinase 1 (BMK1) and the MEF2C signaling pathway in PC12 cells: potential role in cell survival following oxidative insults. *J Biol Chem* **277**, 9614-9621.
573. **Watson, F.L., Heerssen, H.M., Bhattacharyya, A., Klesse, L., Lin, M.Z., and Segal, R.A.** (2001). Neurotrophins use the Erk5 pathway to mediate a retrograde survival response. *Nat Neurosci* **4**, 981-988.
574. **Pi, X., Yan, C., and Berk, B.C.** (2004). Big mitogen-activated protein kinase (BMK1)/ERK5 protects endothelial cells from apoptosis. *Circ Res* **94**, 362-369.
575. **Wang, X., Finegan, K.G., Robinson, A.C., Knowles, L., Khosravi-Far, R., Hinchliffe, K.A., Boot-Handford, R.P., and Tournier, C.** (2006). Activation of extracellular signal-regulated protein kinase 5 downregulates FasL upon osmotic stress. *Cell Death Differ* **13**, 2099-2108.
576. **Cude, K., Wang, Y., Choi, H.J., Hsuan, S.L., Zhang, H., Wang, C.Y., and Xia, Z.** (2007). Regulation of the G2-M cell cycle progression by the ERK5-NFkappaB signaling pathway. *J Cell Biol* **177**, 253-264.
577. **Girio, A., Montero, J.C., Pandiella, A., and Chatterjee, S.** (2007). Erk5 is activated and acts as a survival factor in mitosis. *Cell Signal* **19**, 1964-1972.
578. **Zen, K., Yasui, K., Nakajima, T., Zen, Y., Gen, Y., Mitsuyoshi, H., Minami, M., Mitsufuji, S., Tanaka, S., Itoh, Y., et al.** (2009). ERK5 is a

- target for gene amplification at 17p11 and promotes cell growth in hepatocellular carcinoma by regulating mitotic entry. *Genes Chromosomes Cancer* **48**, 109-120.
579. **Pearson, G., English, J.M., White, M.A., and Cobb, M.H.** (2001). ERK5 and ERK2 cooperate to regulate NF-kappaB and cell transformation. *J Biol Chem* **276**, 7927-7931.
580. **Ranganathan, A., Pearson, G.W., Chrestensen, C.A., Sturgill, T.W., and Cobb, M.H.** (2006). The MAP kinase ERK5 binds to and phosphorylates p90 RSK. *Arch Biochem Biophys* **449**, 8-16.
581. **Zhu, A.X., Zhao, Y., Moller, D.E., and Flier, J.S.** (1994). Cloning and characterization of p97MAPK, a novel human homolog of rat ERK-3. *Mol Cell Biol* **14**, 8202-8211.
582. **Meloche, S., Beatty, B.G., and Pellerin, J.** (1996). Primary structure, expression and chromosomal locus of a human homolog of rat ERK3. *Oncogene* **13**, 1575-1579.
583. **Turgeon, B., Saba-El-Leil, M.K., and Meloche, S.** (2000). Cloning and characterization of mouse extracellular-signal-regulated protein kinase 3 as a unique gene product of 100 kDa. *Biochem J* **346 Pt 1**, 169-175.
584. **Bind, E., Kleyner, Y., Skowronska-Krawczyk, D., Bien, E., Dynlacht, B.D., and Sanchez, I.** (2004). A novel mechanism for mitogen-activated protein kinase localization. *Mol Biol Cell* **15**, 4457-4466.
585. **Gonzalez, F.A., Raden, D.L., Rigby, M.R., and Davis, R.J.** (1992). Heterogeneous expression of four MAP kinase isoforms in human tissues. *FEBS Lett* **304**, 170-178.
586. **Aberg, E., Perander, M., Johansen, B., Julien, C., Meloche, S., Keyse, S.M., and Seternes, O.M.** (2006). Regulation of MAPK-activated protein kinase 5 activity and subcellular localization by the atypical MAPK ERK4/MAPK4. *J Biol Chem* **281**, 35499-35510.
587. **Meloche, S.** (March 2008). MAPK4 (mitogen-activated protein kinase 4) In Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol
588. **Robinson, M.J., Cheng, M., Khokhlatchev, A., Ebert, D., Ahn, N., Guan, K.L., Stein, B., Goldsmith, E., and Cobb, M.H.** (1996). Contributions of the mitogen-activated protein (MAP) kinase backbone and phosphorylation loop to MEK specificity. *J Biol Chem* **271**, 29734-29739.
589. **Abbas, T., Sivaprasad, U., Terai, K., Amador, V., Pagano, M., and Dutta, A.** (2008). PCNA-dependent regulation of p21 ubiquitylation and degradation via the CRL4Cdt2 ubiquitin ligase complex. *Genes Dev* **22**, 2496-2506.
590. **Klinger, S., Turgeon, B., Levesque, K., Wood, G.A., Aagaard-Tillery, K.M., and Meloche, S.** (2009). Loss of Erk3 function in mice leads to intrauterine growth restriction, pulmonary immaturity, and neonatal lethality. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 16710-16715.
591. **Coulombe, P., Rodier, G., Pelletier, S., Pellerin, J., and Meloche, S.** (2003). Rapid turnover of extracellular signal-regulated kinase 3 by the ubiquitin-proteasome pathway defines a novel paradigm of mitogen-activated protein kinase regulation during cellular differentiation. *Mol Cell Biol* **23**, 4542-4558.

592. **Kleines, M., Gartner, A., Ritter, K., and Schaade, L.** (2000). Early steps in termination of the immortalization state in Burkitt lymphoma: induction of genes involved in signal transduction, transcription, and trafficking by the ganglioside IV(3)NeuAc-nLcOse(4)Cer. *Biochim Biophys Acta* **1492**, 139-144.
593. **Crowe, D.L.** (2004). Induction of p97MAPK expression regulates collagen mediated inhibition of proliferation and migration in human squamous cell carcinoma lines. *Int J Oncol* **24**, 1159-1163.
594. **Zimmermann, J., Lamerant, N., Grossenbacher, R., and Furst, P.** (2001). Proteasome- and p38-dependent regulation of ERK3 expression. *J Biol Chem* **276**, 10759-10766.
595. **Hoeflich, K.P., Eby, M.T., Forrest, W.F., Gray, D.C., Tien, J.Y., Stern, H.M., Murray, L.J., Davis, D.P., Modrusan, Z., and Seshagiri, S.** (2006). Regulation of ERK3/MAPK6 expression by BRAF. *Int J Oncol* **29**, 839-849.
596. **Rousseau, J., Klinger, S., Rachalski, A., Turgeon, B., Deleris, P., Vigneault, E., Poirier-Heon, J.F., Davoli, M.A., Mechawar, N., El Mestikawy, S., et al.** (2010). Targeted Inactivation of Mapk4 in Mice Reveals Specific Non-Redundant Functions of Erk3/Erk4 Subfamily MAP Kinases. *Mol Cell Biol*. **30**, 5752-5763
597. **Coulombe, P., Rodier, G., Bonneil, E., Thibault, P., and Meloche, S.** (2004). N-Terminal ubiquitination of extracellular signal-regulated kinase 3 and p21 directs their degradation by the proteasome. *Mol Cell Biol* **24**, 6140-6150.
598. **Breitschopf, K., Bengal, E., Ziv, T., Admon, A., and Ciechanover, A.** (1998). A novel site for ubiquitination: the N-terminal residue, and not internal lysines of MyoD, is essential for conjugation and degradation of the protein. *EMBO J* **17**, 5964-5973.
599. **Fajerman, I., Schwartz, A.L., and Ciechanover, A.** (2004). Degradation of the Id2 developmental regulator: targeting via N-terminal ubiquitination. *Biochem Biophys Res Commun* **314**, 505-512.
600. **Trausch-Azar, J.S., Lingbeck, J., Ciechanover, A., and Schwartz, A.L.** (2004). Ubiquitin-Proteasome-mediated degradation of Id1 is modulated by MyoD. *J Biol Chem* **279**, 32614-32619.
601. **Kuo, M.L., den Besten, W., Bertwistle, D., Roussel, M.F., and Sherr, C.J.** (2004). N-terminal polyubiquitination and degradation of the Arf tumor suppressor. *Genes Dev* **18**, 1862-1874.
602. **Ben-Saadon, R., Fajerman, I., Ziv, T., Hellman, U., Schwartz, A.L., and Ciechanover, A.** (2004). The tumor suppressor protein p16(INK4a) and the human papillomavirus oncoprotein-58 E7 are naturally occurring lysine-less proteins that are degraded by the ubiquitin system. Direct evidence for ubiquitination at the N-terminal residue. *J Biol Chem* **279**, 41414-41421.
603. **Bloom, J., Amador, V., Bartolini, F., DeMartino, G., and Pagano, M.** (2003). Proteasome-mediated degradation of p21 via N-terminal ubiquitylation. *Cell* **115**, 71-82.
604. **Ikeda, M., Ikeda, A., and Longnecker, R.** (2002). Lysine-independent ubiquitination of Epstein-Barr virus LMP2A. *Virology* **300**, 153-159.



605. **Aviel, S., Winberg, G., Massucci, M., and Ciechanover, A.** (2000). Degradation of the Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 (LMP1) by the ubiquitin-proteasome pathway. Targeting via ubiquitination of the N-terminal residue. *J Biol Chem* **275**, 23491-23499.
606. **Yang, J., Hong, Y., Wang, W., Wu, W., Chi, Y., Zong, H., Kong, X., Wei, Y., Yun, X., Cheng, C., et al.** (2009). HSP70 protects BCL2L12 and BCL2L12A from N-terminal ubiquitination-mediated proteasomal degradation. *FEBS Lett* **583**, 1409-1414.
607. **Li, H., Okamoto, K., Peart, M.J., and Prives, C.** (2009). Lysine-independent turnover of cyclin G1 can be stabilized by B'alpha subunits of protein phosphatase 2A. *Mol Cell Biol* **29**, 919-928.
608. **Kuo, W.L., Duke, C.J., Abe, M.K., Kaplan, E.L., Gomes, S., and Rosner, M.R.** (2004). ERK7 expression and kinase activity is regulated by the ubiquitin-proteasome pathway. *J Biol Chem* **279**, 23073-23081.
609. **Kant, S., Schumacher, S., Singh, M.K., Kispert, A., Kotlyarov, A., and Gaestel, M.** (2006). Characterization of the atypical MAPK ERK4 and its activation of the MAPK-activated protein kinase MK5. *J Biol Chem* **281**, 35511-35519.
610. **Bordin, S., Amaral, M.E., Anhe, G.F., Delghingaro-Augusto, V., Cunha, D.A., Nicoletti-Carvalho, J.E., and Boschero, A.C.** (2004). Prolactin-modulated gene expression profiles in pancreatic islets from adult female rats. *Mol Cell Endocrinol* **220**, 41-50.
611. **Anhe, G.F., Torrao, A.S., Nogueira, T.C., Caperuto, L.C., Amaral, M.E., Medina, M.C., Azevedo-Martins, A.K., Carpinelli, A.R., Carvalho, C.R., Curi, R., et al.** (2006). ERK3 associates with MAP2 and is involved in glucose-induced insulin secretion. *Mol Cell Endocrinol* **251**, 33-41.
612. **Julien, C., Coulombe, P., and Meloche, S.** (2003). Nuclear export of ERK3 by a CRM1-dependent mechanism regulates its inhibitory action on cell cycle progression. *J Biol Chem* **278**, 42615-42624.
613. **Sun, M., Wei, Y., Yao, L., Xie, J., Chen, X., Wang, H., Jiang, J., and Gu, J.** (2006). Identification of extracellular signal-regulated kinase 3 as a new interaction partner of cyclin D3. *Biochem Biophys Res Commun* **340**, 209-214.
614. **Hansen, C.A., Bartek, J., and Jensen, S.** (2008). A functional link between the human cell cycle-regulatory phosphatase Cdc14A and the atypical mitogen-activated kinase Erk3. *Cell Cycle* **7**, 325-334.
615. **Abe, M.K., Kuo, W.L., Hershenson, M.B., and Rosner, M.R.** (1999). Extracellular signal-regulated kinase 7 (ERK7), a novel ERK with a C-terminal domain that regulates its activity, its cellular localization, and cell growth. *Mol Cell Biol* **19**, 1301-1312.
616. **Roux, P.P., and Blenis, J.** (2004). ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions. *Microbiol Mol Biol Rev* **68**, 320-344.
617. **New, L., Jiang, Y., Zhao, M., Liu, K., Zhu, W., Flood, L.J., Kato, Y., Parry, G.C., and Han, J.** (1998). PRAK, a novel protein kinase regulated by the p38 MAP kinase. *EMBO J* **17**, 3372-3384.

618. **Ni, H., Wang, X.S., Diener, K., and Yao, Z.** (1998). MAPKAPK5, a novel mitogen-activated protein kinase (MAPK)-activated protein kinase, is a substrate of the extracellular-regulated kinase (ERK) and p38 kinase. *Biochem Biophys Res Commun* **243**, 492-496.
619. **Stokoe, D., Campbell, D.G., Nakielny, S., Hidaka, H., Leever, S.J., Marshall, C., and Cohen, P.** (1992). MAPKAP kinase-2; a novel protein kinase activated by mitogen-activated protein kinase. *EMBO J* **11**, 3985-3994.
620. **Stokoe, D., Caudwell, B., Cohen, P.T., and Cohen, P.** (1993). The substrate specificity and structure of mitogen-activated protein (MAP) kinase-activated protein kinase-2. *Biochem J* **296 ( Pt 3)**, 843-849.
621. **Engel, K., Plath, K., and Gaestel, M.** (1993). The MAP kinase-activated protein kinase 2 contains a proline-rich SH3-binding domain. *FEBS Lett* **336**, 143-147.
622. **McLaughlin, M.M., Kumar, S., McDonnell, P.C., Van Horn, S., Lee, J.C., Livi, G.P., and Young, P.R.** (1996). Identification of mitogen-activated protein (MAP) kinase-activated protein kinase-3, a novel substrate of CSBP p38 MAP kinase. *J Biol Chem* **271**, 8488-8492.
623. **Sithanandam, G., Latif, F., Duh, F.M., Bernal, R., Smola, U., Li, H., Kuzmin, I., Wixler, V., Geil, L., and Shrestha, S.** (1996). 3pK, a new mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase located in the small cell lung cancer tumor suppressor gene region. *Mol Cell Biol* **16**, 868-876.
624. **Asp, E., and Sunnerhagen, P.** (2003). Mkp1 and Mkp2, two MAPKAP-kinase homologues in *Schizosaccharomyces pombe*, interact with the MAP kinase Sty1. *Mol Genet Genomics* **268**, 585-597.
625. **Dingar, D., Benoit, M.J., Mamarbachi, A.M., Villeneuve, L.R., Gillis, M.A., Grandy, S., Gaestel, M., Fiset, C., and Allen, B.G.** (2010). Characterization of the expression and regulation of MK5 in the murine ventricular myocardium. *Cell Signal* **22**, 1063-1075.
626. **Gerits, N., Shiryaev, A., Kostenko, S., Klenow, H., Shiryaeva, O., Johannessen, M., and Moens, U.** (2009). The transcriptional regulation and cell-specific expression of the MAPK-activated protein kinase MK5. *Cell Mol Biol Lett* **14**, 548-574.
627. **Perander, M., Aberg, E., Johansen, B., Dreyer, B., Guldvik, I.J., Outzen, H., Keyse, S.M., and Seternes, O.M.** (2008). The Ser(186) phospho-acceptor site within ERK4 is essential for its ability to interact with and activate PRAK/MK5. *Biochem J* **411**, 613-622.
628. **Deleris, P., Rousseau, J., Coulombe, P., Rodier, G., Tanguay, P.L., and Meloche, S.** (2008). Activation loop phosphorylation of the atypical MAP kinases ERK3 and ERK4 is required for binding, activation and cytoplasmic relocalization of MK5. *J Cell Physiol* **217**, 778-788.
629. **Shi, Y., Kotlyarov, A., Laabeta, K., Gruber, A.D., Butt, E., Marcus, K., Meyer, H.E., Friedrich, A., Volk, H.D., and Gaestel, M.** (2003). Elimination of protein kinase MK5/PRAK activity by targeted homologous recombination. *Mol Cell Biol* **23**, 7732-7741.
630. **Seternes, O.M., Mikalsen, T., Johansen, B., Michaelsen, E., Armstrong, C.G., Morrice, N.A., Turgeon, B., Meloche, S., Moens, U., and Keyse,**

- S.M. (2004). Activation of MK5/PRAK by the atypical MAP kinase ERK3 defines a novel signal transduction pathway. *EMBO J* **23**, 4780-4791.
631. **Schumacher, S., Laass, K., Kant, S., Shi, Y., Visel, A., Gruber, A.D., Kotlyarov, A., and Gaestel, M.** (2004). Scaffolding by ERK3 regulates MK5 in development. *EMBO J* **23**, 4770-4779.
632. **New, L., Jiang, Y., and Han, J.** (2003). Regulation of PRAK subcellular location by p38 MAP kinases. *Mol Biol Cell* **14**, 2603-2616.
633. **Li, Q., Zhang, N., Zhang, D., Wang, Y., Lin, T., Zhou, H., Ye, Z., Zhang, F., Lin, S.C., and Han, J.** (2008). Determinants that control the distinct subcellular localization of p38alpha-PRAK and p38beta-PRAK complexes. *J Biol Chem* **283**, 11014-11023.
634. **Tanoue, T., Maeda, R., Adachi, M., and Nishida, E.** (2001). Identification of a docking groove on ERK and p38 MAP kinases that regulates the specificity of docking interactions. *EMBO J* **20**, 466-479.
635. **Tanoue, T., Adachi, M., Moriguchi, T., and Nishida, E.** (2000). A conserved docking motif in MAP kinases common to substrates, activators and regulators. *Nat Cell Biol* **2**, 110-116.
636. **Tanoue, T., and Nishida, E.** (2002). Docking interactions in the mitogen-activated protein kinase cascades. *Pharmacol Ther* **93**, 193-202.
637. **Gerits, N., Mikalsen, T., Kostenko, S., Shiryaev, A., Johannessen, M., and Moens, U.** (2007). Modulation of F-actin rearrangement by the cyclic AMP/cAMP-dependent protein kinase (PKA) pathway is mediated by MAPK-activated protein kinase 5 and requires PKA-induced nuclear export of MK5. *J Biol Chem* **282**, 37232-37243.
638. **Tak, H., Jang, E., Kim, S.B., Park, J., Suk, J., Yoon, Y.S., Ahn, J.K., Lee, J.H., and Joe, C.O.** (2007). 14-3-3epsilon inhibits MK5-mediated cell migration by disrupting F-actin polymerization. *Cell Signal* **19**, 2379-2387.
639. **Aberg, E., Torgersen, K.M., Johansen, B., Keyse, S.M., Perander, M., and Seternes, O.M.** (2009). Docking of PRAK/MK5 to the atypical MAPKs ERK3 and ERK4 defines a novel MAPK interaction motif. *J Biol Chem* **284**, 19392-19401.
640. **Canagarajah, B.J., Khokhlatchev, A., Cobb, M.H., and Goldsmith, E.J.** (1997). Activation mechanism of the MAP kinase ERK2 by dual phosphorylation. *Cell* **90**, 859-869.
641. **Diskin, R., Lebendiker, M., Engelberg, D., and Livnah, O.** (2007). Structures of p38alpha active mutants reveal conformational changes in L16 loop that induce autophosphorylation and activation. *J Mol Biol* **365**, 66-76.
642. **Sun, P., Yoshizuka, N., New, L., Moser, B.A., Li, Y., Liao, R., Xie, C., Chen, J., Deng, Q., Yamout, M., et al.** (2007). PRAK is essential for ras-induced senescence and tumor suppression. *Cell* **128**, 295-308.
643. **Chen, G., Hitomi, M., Han, J., and Stacey, D.W.** (2000). The p38 pathway provides negative feedback for Ras proliferative signaling. *J Biol Chem* **275**, 38973-38980.
644. **Tibbetts, R.S., Brumbaugh, K.M., Williams, J.M., Sarkaria, J.N., Cliby, W.A., Shieh, S.Y., Taya, Y., Prives, C., and Abraham, R.T.** (1999). A role

- for ATR in the DNA damage-induced phosphorylation of p53. *Genes Dev* **13**, 152-157.
645. **Lees-Miller, S.P., Sakaguchi, K., Ullrich, S.J., Appella, E., and Anderson, C.W.** (1992). Human DNA-activated protein kinase phosphorylates serines 15 and 37 in the amino-terminal transactivation domain of human p53. *Mol Cell Biol* **12**, 5041-5049.
646. **Landry, J., and Huot, J.** (1995). Modulation of actin dynamics during stress and physiological stimulation by a signaling pathway involving p38 MAP kinase and heat-shock protein 27. *Biochem Cell Biol* **73**, 703-707.
647. **Kostenko, S., Johannessen, M., and Moens, U.** (2009). PKA-induced F-actin rearrangement requires phosphorylation of Hsp27 by the MAPKAP kinase MK5. *Cell Signal* **21**, 712-718.
648. **Seternes, O.M., Johansen, B., Hegge, B., Johannessen, M., Keyse, S.M., and Moens, U.** (2002). Both binding and activation of p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) play essential roles in regulation of the nucleocytoplasmic distribution of MAPK-activated protein kinase 5 by cellular stress. *Mol Cell Biol* **22**, 6931-6945.
649. **Gerits, N., Van Belle, W., and Moens, U.** (2007). Transgenic mice expressing constitutive active MAPKAPK5 display gender-dependent differences in exploration and activity. *Behav Brain Funct* **3**, 58.
650. **Cheng, M., Zhen, E., Robinson, M.J., Ebert, D., Goldsmith, E., and Cobb, M.H.** (1996). Characterization of a protein kinase that phosphorylates serine 189 of the mitogen-activated protein kinase homolog ERK3. *J Biol Chem* **271**, 12057-12062.
651. **Cheng, M., Boulton, T.G., and Cobb, M.H.** (1996). ERK3 is a constitutively nuclear protein kinase. *J Biol Chem* **271**, 8951-8958.
652. **Dephore, N., Zhou, C., Villen, J., Beausoleil, S.A., Bakalarski, C.E., Elledge, S.J., and Gygi, S.P.** (2008). A quantitative atlas of mitotic phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 10762-10767.
653. **Ubersax, J.A., Woodbury, E.L., Quang, P.N., Paraz, M., Blethrow, J.D., Shah, K., Shokat, K.M., and Morgan, D.O.** (2003). Targets of the cyclin-dependent kinase Cdk1. *Nature* **425**, 859-864.
654. **Blethrow, J.D., Glavy, J.S., Morgan, D.O., and Shokat, K.M.** (2008). Covalent capture of kinase-specific phosphopeptides reveals Cdk1-cyclin B substrates. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 1442-1447.
655. **Holt, L.J., Tuch, B.B., Villen, J., Johnson, A.D., Gygi, S.P., and Morgan, D.O.** (2009). Global analysis of Cdk1 substrate phosphorylation sites provides insights into evolution. *Science* **325**, 1682-1686.
656. **King, R.W., Lustig, K.D., Stukenberg, P.T., McGarry, T.J., and Kirschner, M.W.** (1997). Expression cloning in the test tube. *Science* **277**, 973-974.
657. **Stukenberg, P.T., Lustig, K.D., McGarry, T.J., King, R.W., Kuang, J., and Kirschner, M.W.** (1997). Systematic identification of mitotic phosphoproteins. *Curr Biol* **7**, 338-348.

658. **Moses, A.M., Heriche, J.K., and Durbin, R.** (2007). Clustering of phosphorylation site recognition motifs can be exploited to predict the targets of cyclin-dependent kinase. *Genome Biol* **8**, R23.
659. **Villen, J., Beausoleil, S.A., Gerber, S.A., and Gygi, S.P.** (2007). Large-scale phosphorylation analysis of mouse liver. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 1488-1493.
660. **Archambault, V., D'Avino, P.P., Deery, M.J., Lilley, K.S., and Glover, D.M.** (2008). Sequestration of Polo kinase to microtubules by phosphoprimer-independent binding to Map205 is relieved by phosphorylation at a CDK site in mitosis. *Genes Dev* **22**, 2707-2720.
661. **Vader, G., and Lens, S.M.** (2008). The Aurora kinase family in cell division and cancer. *Biochim Biophys Acta* **1786**, 60-72.
662. **O'Connell, M.J., Krien, M.J., and Hunter, T.** (2003). Never say never. The NIMA-related protein kinases in mitotic control. *Trends Cell Biol* **13**, 221-228.
663. **Ferrari, S., Marin, O., Pagano, M.A., Meggio, F., Hess, D., El-Shemerly, M., Krystyniak, A., and Pinna, L.A.** (2005). Aurora-A site specificity: a study with synthetic peptide substrates. *Biochem J* **390**, 293-302.
664. **Lu, K.P., Kemp, B.E., and Means, A.R.** (1994). Identification of substrate specificity determinants for the cell cycle-regulated NIMA protein kinase. *J Biol Chem* **269**, 6603-6607.
665. **Songyang, Z., Lu, K.P., Kwon, Y.T., Tsai, L.H., Filhol, O., Cochet, C., Brickey, D.A., Soderling, T.R., Bartleson, C., Graves, D.J., et al.** (1996). A structural basis for substrate specificities of protein Ser/Thr kinases: primary sequence preference of casein kinases I and II, NIMA, phosphorylase kinase, calmodulin-dependent kinase II, CDK5, and Erk1. *Mol Cell Biol* **16**, 6486-6493.
666. **Chen, Y., Riley, D.J., Zheng, L., Chen, P.L., and Lee, W.H.** (2002). Phosphorylation of the mitotic regulator protein Hec1 by Nek2 kinase is essential for faithful chromosome segregation. *J Biol Chem* **277**, 49408-49416.
667. **Diaz-Rodriguez, E., and Pandiella, A.** (2010). Multisite phosphorylation of Erk5 in mitosis. *J Cell Sci* **123**, 3146-3156.
668. **Inesta-Vaquera, F.A., Campbell, D.G., Tournier, C., Gomez, N., Lizcano, J.M., and Cuenda, A.** (2010). Alternative ERK5 regulation by phosphorylation during the cell cycle. *Cell Signal* **22**, 1829-1837.
669. **Rotin, D., and Kumar, S.** (2009). Physiological functions of the HECT family of ubiquitin ligases. *Nat Rev Mol Cell Biol* **10**, 398-409.
670. **Stegmeier, F., Rape, M., Draviam, V.M., Nalepa, G., Sowa, M.E., Ang, X.L., McDonald, E.R., 3rd, Li, M.Z., Hannon, G.J., Sorger, P.K., et al.** (2007). Anaphase initiation is regulated by antagonistic ubiquitination and deubiquitination activities. *Nature* **446**, 876-881.
671. **Ban, R., Matsuzaki, H., Akashi, T., Sakashita, G., Taniguchi, H., Park, S.Y., Tanaka, H., Furukawa, K., and Urano, T.** (2009). Mitotic regulation of the stability of microtubule plus-end tracking protein EB3 by ubiquitin ligase SIAH-1 and Aurora mitotic kinases. *J Biol Chem* **284**, 28367-28381.

672. **Stegmeier, F., Sowa, M.E., Nalepa, G., Gygi, S.P., Harper, J.W., and Elledge, S.J.** (2007). The tumor suppressor CYLD regulates entry into mitosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 8869-8874.
673. **Sowa, M.E., Bennett, E.J., Gygi, S.P., and Harper, J.W.** (2009). Defining the human deubiquitinating enzyme interaction landscape. *Cell* **138**, 389-403.
674. **Li, Z., Wang, D., Messing, E.M., and Wu, G.** (2005). VHL protein-interacting deubiquitinating enzyme 2 deubiquitinates and stabilizes HIF-1alpha. *EMBO Rep* **6**, 373-378.
675. **Berthouze, M., Venkataramanan, V., Li, Y., and Shenoy, S.K.** (2009). The deubiquitinases USP33 and USP20 coordinate beta2 adrenergic receptor recycling and resensitization. *EMBO J* **28**, 1684-1696.
676. **Jang, Y.J., Lin, C.Y., Ma, S., and Erikson, R.L.** (2002). Functional studies on the role of the C-terminal domain of mammalian polo-like kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 1984-1989.
677. **Bandyopadhyay, S., Chiang, C.Y., Srivastava, J., Gersten, M., White, S., Bell, R., Kurschner, C., Martin, C.H., Smoot, M., Sahasrabudhe, S., et al.** (2010). A human MAP kinase interactome. *Nat Methods* **7**, 801-805.
678. **Ou, Y.Y., Mack, G.J., Zhang, M., and Rattner, J.B.** (2002). CEP110 and ninein are located in a specific domain of the centrosome associated with centrosome maturation. *J Cell Sci* **115**, 1825-1835.
679. **Lu, K.P., and Zhou, X.Z.** (2007). The prolyl isomerase PIN1: a pivotal new twist in phosphorylation signalling and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**, 904-916.
680. **Suizu, F., Ryo, A., Wulf, G., Lim, J., and Lu, K.P.** (2006). Pin1 regulates centrosome duplication, and its overexpression induces centrosome amplification, chromosome instability, and oncogenesis. *Mol Cell Biol* **26**, 1463-1479.
681. **Sutterlin, C., and Colanzi, A.** (2010). The Golgi and the centrosome: building a functional partnership. *J Cell Biol* **188**, 621-628.
682. **Gillingham, A.K., and Munro, S.** (2000). The PACT domain, a conserved centrosomal targeting motif in the coiled-coil proteins AKAP450 and pericentrin. *EMBO Rep* **1**, 524-529.
683. **Li, S., Ou, X.H., Wang, Z.B., Xiong, B., Tong, J.S., Wei, L., Li, M., Yuan, J., Ouyang, Y.C., Hou, Y., et al.** (2010). ERK3 is required for metaphase-anaphase transition in mouse oocyte meiosis. *PLoS One* **5**.
684. **Lin, S.L., Qi, S.T., Sun, S.C., Wang, Y.P., Schatten, H., and Sun, Q.Y.** (2010). PAK1 regulates spindle microtubule organization during oocyte meiotic maturation. *Front Biosci (Elite Ed)* **2**, 1254-1264.
685. **Maroto, B., Ye, M.B., von Lohneysen, K., Schnelzer, A., and Knaus, U.G.** (2008). P21-activated kinase is required for mitotic progression and regulates Plk1. *Oncogene* **27**, 4900-4908.
686. **Thiel, D.A., Reeder, M.K., Pfaff, A., Coleman, T.R., Sells, M.A., and Chernoff, J.** (2002). Cell cycle-regulated phosphorylation of p21-activated kinase 1. *Curr Biol* **12**, 1227-1232.
687. **Schindler, K., and Schultz, R.M.** (2009). The CDC14A phosphatase regulates oocyte maturation in mouse. *Cell Cycle* **8**, 1090-1098.

688. **Stork, P.J., and Schmitt, J.M.** (2002). Crosstalk between cAMP and MAP kinase signaling in the regulation of cell proliferation. *Trends Cell Biol* **12**, 258-266.
689. **Rodriguez-Collazo, P., Snyder, S.K., Chiffer, R.C., Bressler, E.A., Voss, T.C., Anderson, E.P., Genieser, H.G., and Smith, C.L.** (2008). cAMP signaling regulates histone H3 phosphorylation and mitotic entry through a disruption of G2 progression. *Exp Cell Res* **314**, 2855-2869.
690. **Kramer, A., Mailand, N., Lukas, C., Syljuasen, R.G., Wilkinson, C.J., Nigg, E.A., Bartek, J., and Lukas, J.** (2004). Centrosome-associated Chk1 prevents premature activation of cyclin-B-Cdk1 kinase. *Nat Cell Biol* **6**, 884-891.
691. **Toska, K., Kleppe, R., Armstrong, C.G., Morrice, N.A., Cohen, P., and Haavik, J.** (2002). Regulation of tyrosine hydroxylase by stress-activated protein kinases. *J Neurochem* **83**, 775-783.
692. **Mohammad, D.H., and Yaffe, M.B.** (2009). 14-3-3 proteins, FHA domains and BRCT domains in the DNA damage response. *DNA Repair (Amst)* **8**, 1009-1017.
693. **Hefner, Y., Borsch-Haubold, A.G., Murakami, M., Wilde, J.I., Pasquet, S., Schieltz, D., Ghomashchi, F., Yates, J.R., 3rd, Armstrong, C.G., Paterson, A., et al.** (2000). Serine 727 phosphorylation and activation of cytosolic phospholipase A2 by MNK1-related protein kinases. *J Biol Chem* **275**, 37542-37551.
694. **Anjum, R., and Blenis, J.** (2008). The RSK family of kinases: emerging roles in cellular signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**, 747-758.
695. **Clifton, A.D., Young, P.R., and Cohen, P.** (1996). A comparison of the substrate specificity of MAPKAP kinase-2 and MAPKAP kinase-3 and their activation by cytokines and cellular stress. *FEBS Lett* **392**, 209-214.
696. **Johansen, C., Vestergaard, C., Kragballe, K., Kollias, G., Gaestel, M., and Iversen, L.** (2009). MK2 regulates the early stages of skin tumor promotion. *Carcinogenesis* **30**, 2100-2108.
697. **Reinhardt, H.C., Hasskamp, P., Schmedding, I., Morandell, S., van Vugt, M.A., Wang, X., Linding, R., Ong, S.E., Weaver, D., Carr, S.A., et al.** (2010). DNA damage activates a spatially distinct late cytoplasmic cell-cycle checkpoint network controlled by MK2-mediated RNA stabilization. *Mol Cell* **40**, 34-49.
698. **Stiff, T., Walker, S.A., Cerosaletti, K., Goodarzi, A.A., Petermann, E., Concannon, P., O'Driscoll, M., and Jeggo, P.A.** (2006). ATR-dependent phosphorylation and activation of ATM in response to UV treatment or replication fork stalling. *EMBO J* **25**, 5775-5782.
699. **Bartkova, J., Rezaei, N., Lontos, M., Karakaidos, P., Kletsas, D., Issaeva, N., Vassiliou, L.V., Kolettas, E., Niforou, K., Zoumpourlis, V.C., et al.** (2006). Oncogene-induced senescence is part of the tumorigenesis barrier imposed by DNA damage checkpoints. *Nature* **444**, 633-637.
700. **Di Micco, R., Fumagalli, M., Cicalese, A., Piccinin, S., Gasparini, P., Luise, C., Schurra, C., Garre, M., Nuciforo, P.G., Bensimon, A., et al.**

- (2006). Oncogene-induced senescence is a DNA damage response triggered by DNA hyper-replication. *Nature* **444**, 638-642.
701. **Mallette, F.A., Gaumont-Leclerc, M.F., and Ferbeyre, G.** (2007). The DNA damage signaling pathway is a critical mediator of oncogene-induced senescence. *Genes Dev* **21**, 43-48.
702. **Mallette, F.A., and Ferbeyre, G.** (2007). The DNA damage signaling pathway connects oncogenic stress to cellular senescence. *Cell Cycle* **6**, 1831-1836.
703. **Michaloglou, C., Vredeveld, L.C., Mooi, W.J., and Peeper, D.S.** (2008). BRAF(E600) in benign and malignant human tumours. *Oncogene* **27**, 877-895.
704. **Peeper, D.S., Dannenberg, J.H., Douma, S., te Riele, H., and Bernardis, R.** (2001). Escape from premature senescence is not sufficient for oncogenic transformation by Ras. *Nat Cell Biol* **3**, 198-203.
705. **Felsher, D.W., Zetterberg, A., Zhu, J., Tlsty, T., and Bishop, J.M.** (2000). Overexpression of MYC causes p53-dependent G2 arrest of normal fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 10544-10548.
706. **Matthews, A.G., and Oettinger, M.A.** (2009). RAG: a recombinase diversified. *Nat Immunol* **10**, 817-821.



## **Annexe I**

### **Activation Loop Phosphorylation of the Atypical MAP Kinases ERK3 and ERK4 is Required for Binding, Activation and Cytoplasmic Relocalization of MK5**

Paul Délérís\*, Justine Rousseau\*, Philippe Coulombe\*, Geneviève Rodier, Pierre-Luc Tanguay and Sylvain Meloche

*Journal of Cell Physiology*, **217**: 778–788, (2008)

# Activation Loop Phosphorylation of the Atypical MAP Kinases ERK3 and ERK4 is Required for Binding, Activation and Cytoplasmic Relocalization of MK5

PAUL DÉLÉRIS,<sup>1</sup> JUSTINE ROUSSEAU,<sup>1,2</sup> PHILIPPE COULOMBE,<sup>1,2</sup>  
GENEVIÈVE RODIER,<sup>1</sup> PIERRE-LUC TANGUAY,<sup>1,2</sup> AND SYLVAIN  
MELOCHE<sup>1,2,3\*</sup>

<sup>1</sup>Institut de Recherche en Immunologie et Cancérologie, Montreal, Quebec H3C 3J7, Canada

Departments of <sup>2</sup>Molecular Biology and <sup>3</sup>Pharmacology, Université de Montréal, Montreal, Quebec H3C 3J7, Canada

P. Délérís, J. Rousseau and P. Coulombe contributed equally to this work

P. Coulombe present address is: Institut de Génétique Humaine, CNRS, 34396 Montpellier, France

G. Rodier present address is : Institut de Génétique Moléculaire, CNRS-UMII, 34293 Montpellier, France

Running Head: ERK3/ERK4 activation loop phosphorylation

Keywords: **MAP kinases, ERK3, MK5, activation loop, nucleocytoplasmic shuttling**

**ABSTRACT**

Mitogen-activated protein (MAP) kinases are typical examples of protein kinases whose enzymatic activity is mainly controlled by activation loop phosphorylation. The classical MAP kinases ERK1/ERK2, JNK, p38 and ERK5 all contain the conserved Thr-Xxx-Tyr motif in their activation loop that is dually phosphorylated by members of the MAP kinase kinases family. Much less is known about the regulation of the atypical MAP kinases ERK3 and ERK4. These kinases display structural features that distinguish them from other MAP kinases, notably the presence of a single phospho-acceptor site (Ser-Glu-Gly) in the activation loop. Here, we show that ERK3 and ERK4 are phosphorylated in their activation loop *in vivo*. This phosphorylation is exerted, at least in part, *in trans* by an upstream cellular kinase. Contrary to classical MAP kinases, activation loop phosphorylation of ERK3 and ERK4 is detected in resting cells and is not further stimulated by strong mitogenic or stress stimuli. However, phosphorylation can be modulated indirectly by interaction with the substrate MAP kinase-activated protein kinase 5 (MK5). Importantly, we found that activation loop phosphorylation of ERK3 and ERK4 stimulates their intrinsic catalytic activity and is required for the formation of stable active complexes with MK5 and, consequently, for efficient cytoplasmic redistribution of ERK3/ERK4-MK5 complexes. Our results demonstrate the importance of activation loop phosphorylation in the regulation of the ERK3/ERK4 function and highlight differences in the regulation of atypical MAP kinases as compared to classical family members.

## INTRODUCTION

Phosphorylation is a common post-translational modification involved in the regulation of protein kinases (Huse and Kuriyan, 2002; Nolen et al., 2004). Phosphorylation can have both positive and negative regulatory effects on protein kinase activity. For instance, Tyr15-phosphorylated Cdk1 is inactive due to steric hindrance of the ATP binding site (Krek and Nigg, 1991). Activating phosphorylation has been described for a large number of protein kinases. Although phosphorylation events can occur throughout the kinase sequence, a common theme is the phosphorylation of the activation loop (Huse and Kuriyan, 2002; Nolen et al., 2004). The activation loop is an important regulatory segment located within the kinase domain C-terminal lobe, between subdomains VII and VIII, which often contains conserved serine, threonine and/or tyrosine residues that can be reversibly phosphorylated. This phosphorylation can result either from autophosphorylation *in cis* or phosphorylation *in trans* by an upstream activating kinase.

Mitogen-activated protein (MAP) kinases are evolutionarily conserved Ser/Thr kinases, which are components of signal transduction pathways that control diverse biological processes such as cell proliferation, survival, metabolism, inflammation and immune responses (Kyriakis and Avruch, 2001; Pearson et al., 2001; Widmann et al., 1999). MAP kinases are classical examples of protein kinases whose enzymatic activity is mainly if not solely regulated by phosphorylation. They contain a highly conserved Thr-Xxx-Tyr motif in their activation loop that is dually phosphorylated *in trans* by upstream kinases of the MAP kinase kinases family (Raman et al., 2007). Activating loop phosphorylation of the MAP kinases ERK1 and ERK2 by the MAP kinase kinases MEK1/MEK2 stimulates their catalytic activity by ~1000-fold (Robbins et al., 1993). Solving of the crystal structures of low activity and dually phosphorylated active MAP kinases has uncovered the important role of activation loop phosphorylation for their enzymatic activity. In the case of ERK2, phosphorylation of the Thr and Tyr residues induces a conformational change of the loop that brings the phosphorylated residues into alignment with arginine-rich surface

binding sites, thereby promoting domain closure and allowing an optimal orientation of the catalytic residues (Canagarajah et al., 1997; Zhang et al., 1994). Phosphorylation of the tyrosine also remodels the P+1 specificity pocket, contributing to the recognition of proline-containing substrates. More recently, hydrogen exchange mass spectrometry analysis has revealed that phosphorylation of the activation loop also contributes to the formation of a binding site for DEF motif-containing substrates and nucleoporins (Lee et al., 2004).

ERK3 and ERK4 define a distinct subfamily of atypical MAP kinases that are found exclusively in vertebrates (Coulombe and Meloche, 2007). These kinases display a number of structural features that distinguish them from conventional MAP kinases. Notably, they contain the sequence Ser-Glu-Gly in their activation loop instead of the conserved Thr-Xxx-Tyr motif (Boulton et al., 1991; Meloche et al., 1996; Zhu et al., 1994). The physiological functions of ERK3 and ERK4 are poorly understood. There is evidence that ERK3 may be involved in the regulation of cell proliferation and differentiation. ERK3 mRNA and protein levels are elevated in terminally differentiated and growth arrested cells (Boulton et al., 1991; Coulombe et al., 2003; Kleines et al., 2000). Moreover, overexpression of ERK3 inhibits cell cycle progression in some cell lines (Coulombe et al., 2003; Crowe, 2004; Julien et al., 2003). Recent observations also suggest a role for ERK3 in the regulation of insulin secretion (Anhe et al., 2006). The identification of the MK family member MK5 as the first substrate of ERK3 and ERK4 represented an important step towards a better understanding of ERK3/ERK4 functions. Both ERK3 and ERK4 bind to and phosphorylate MK5, leading to its enzymatic activation (Aberg et al., 2006; Kant et al., 2006; Schumacher et al., 2004; Seternes et al., 2004). Unlike ERK4, activation of MK5 by ERK3 seems to depend in part on the kinase activity of ERK3 but also on its scaffolding ability to increase MK5 autophosphorylation. Association of MK5 with ERK3/ERK4 also results in the cytoplasmic relocation of MK5.

Little is known about the regulation of ERK3 and ERK4 activity. The expression of ERK3 is regulated both at the levels of transcription (Hoeflich et al., 2006;

Zimmermann et al., 2001) and protein stability via the ubiquitin-proteasome pathway (Coulombe et al., 2004; Coulombe et al., 2003). In contrast, ERK4 is a relatively stable protein (Aberg et al., 2006; Kant et al., 2006). Previous studies have shown that ERK3 is phosphorylated on Ser189 in the activation loop, but the functional impact of this phosphorylation has not been addressed in these studies (Cheng et al., 1996; Coulombe et al., 2003). Here, we report that both ERK3 and ERK4 are phosphorylated on the activation loop motif Ser-Glu-Gly in intact cells. This phosphorylation event is observed in unstimulated cells and is minimally influenced by classical MAP kinase stimuli. Importantly, we show that activation loop phosphorylation of ERK3 and ERK4 is necessary for stable interaction with, enzymatic activation and subcellular relocalization of the effector kinase MK5.

## MATERIALS AND METHODS

### Reagents and antibodies

Sorbitol, PMA, anisomycin and hydrogen peroxide were from Sigma. MG132 was from Biomol. Commercial antibodies were obtained from the following suppliers: monoclonal anti-phospho-ERK1/2 (Thr202/Tyr204), anti-phospho-JNK (Thr183/Tyr185) and anti-phospho-p38 (Thr183/Tyr185) from Cell Signaling Technology; polyclonal anti-HA (sc-805) and anti-Myc (Y-11) from Santa-Cruz Biotechnology; horseradish peroxidase-conjugated goat anti-mouse and anti-rabbit IgG from Biorad; monoclonal anti-Flag (M2) from Sigma; FITC-conjugated donkey anti-rabbit and rhodamine-conjugated donkey anti-mouse from Jackson Laboratories. Monoclonal anti-Myc antibody was prepared in-house from 9E10 hybridoma producing cells. Polyclonal antibody to ERK3 C-terminus (E3-CTE4) and anti-phospho-ERK3(Ser189) have been described (Coulombe et al., 2003). Polyclonal ERK4 antibody was generated in-house by immunization of rabbits with His<sub>6</sub>-ERK4<sub>361-497</sub>-GST fusion protein expressed in bacteria. ERK4 specific antibody was purified using the Antibodies Purification GST Orientation Kit (Pierce).

### Plasmid constructs and mutagenesis

pcDNA3-Myc<sub>6</sub>-ERK3 wild type (WT), kinase-dead (KD, K49A/K50A) and Ser189Ala (S189A) have been described (Coulombe et al., 2003; Julien et al., 2003). The ERK4 cDNA was originally provided by Dr Roger Davis (University of Massachusetts Medical School, MA). ERK4 coding sequence was subcloned into EcoRI/XbaI sites of pcDNA3-HA generated as described (Coulombe et al., 2003). pcDNA3-GST was generated by amplifying GST by PCR from pGEX-KG and subcloning into HindIII/EcoRI sites of pcDNA3. A Kozak sequence was inserted into the 5' oligonucleotide for optimal eukaryotic expression. The ERK4 sequence was subsequently subcloned into EcoRI/NotI sites. MK5 cDNA was obtained from ATCC (clone 10436456). pcDNA3-Flag was generated by inserting the Flag sequence between HindIII and EcoRI sites in pcDNA3. MK5 coding sequence was subcloned into the EcoRI site of pcDNA3-Flag and pcDNA3-HA. MK5(1-423) construct was

generated by PCR amplification of the full length MK5 cDNA introducing a stop codon at position 1269. MK5(1-423) was subcloned into the EcoR1/Not1 sites of pcDNA3-Flag. Mutations in ERK3, ERK4 and MK5 cDNAs were generated using the Altered Sites *in vitro* mutagenesis system (Promega). His<sub>6</sub>-MK5 wild type and KD recombinant proteins were constructed by subcloning the MK5 coding region (with stop codon) in frame into pHGST.1 (Coulombe and Meloche, 2002). All mutations were confirmed by DNA sequencing. Sequence of the primers used for PCR and details about the cloning strategies are available upon request.

### **Cell culture and transfections**

HEK 293, NIH 3T3 and Rat1 cells were cultured as described previously (Coulombe et al., 2003). HEK 293 and Rat1 cells were transfected using the calcium phosphate precipitation method and Fugene 6 (Roche Diagnostics), respectively. For stimulation experiments, cells were incubated overnight in serum-free medium 24 h after the transfection as described (Julien et al., 2003). The medium was changed 30 min prior to stimulation, and the cells were stimulated for the indicated times, washed in ice-cold PBS and frozen in liquid nitrogen until analysis.

### **Protein biochemistry methods**

His<sub>6</sub>-MK5 construct was expressed into BL21 pLys(DE3) RIPL strain. The His<sub>6</sub>-MK5 recombinant protein was bound on a HiTrap Chelating HP column (GE Healthcare) in 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 0.5 mM dithiothreitol (buffer A), washed, and then eluted with buffer A supplemented with 250 mM imidazole on an AKTA FLPC system (GE Healthcare). The eluted fractions were dialyzed in buffer A at 4°C overnight. GST-Hsp27 was expressed from pGEX-Hu27 (kind gift of Dr Jacques Landry) into BL21 pLys(DE3) RIL strain and purified as described (Coulombe and Meloche, 2002). Hsp27 was then cleaved from purified recombinant GST-Hsp27 with thrombin in buffer A. Protein purity and yield were evaluated by SDS-gel electrophoresis and Coomassie staining using bovine serum albumin as standard.



Cell lysis, immunoprecipitation and immunoblot analysis were performed as described (Coulombe et al., 2003; Rodier et al., 2001; Servant et al., 2000). For immunoblotting, the chemiluminescent signal was analyzed either on film or by using a LAS3000 imaging system (Fuji). For immunoprecipitation, 750  $\mu$ g of lysate proteins were incubated with anti-HA (12CA5), anti-Myc (9E10) or anti-Flag antibody preadsorbed on protein A-agarose beads (GE Healthcare) for 2-4 h at 4°C. Immunoprecipitated proteins were detected by immunoblotting analysis.

For ERK3 kinase assays, transfected HEK 293 cells were treated with 10  $\mu$ M MG132 for 12 h before lysis. Coupled kinase assays were performed by incubation of immunoprecipitated ERK3 or ERK4 in MK5 kinase buffer (25 mM Hepes (pH 7.5), 25 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM dithiothreitol) with 500  $\mu$ M ATP, 20  $\mu$ Ci ATP[ $\gamma$ <sup>32</sup>P], 5  $\mu$ g of recombinant His<sub>6</sub>-MK5 and 2  $\mu$ g of Hsp27 at 30°C for 30 min. To measure the MK5 enzymatic activity associated with ERK3 or ERK4 (Fig. 7), the same protocol was used except that the ATP concentration was 50  $\mu$ M and no recombinant MK5 protein was added to the assay. The reactions were stopped by addition of loading buffer and the samples were analyzed by SDS-gel electrophoresis. Phosphorylated proteins were detected by phosphorimaging with a FLA5000 imaging system (Fuji).

*In vivo* <sup>32</sup>Pi labeling, two-dimensional phosphopeptide mapping and phosphoamino acid analysis were performed as described previously (Rodier et al., 2001; Servant et al., 2000).

### **Immunofluorescence analysis**

Immunofluorescence microscopy was performed as previously described (Julien et al., 2003). Briefly, Rat1 cells were seeded at 60,000 cells/well onto glass coverslips placed in 6-well plates, and transfected with expression plasmids (2.5  $\mu$ g DNA) as described above. The cells were fixed with 3.7% paraformaldehyde in PBS for 20 min at 37°C. After quenching in 0.1 M glycine for 5 min, the cells were permeabilized by incubation in 0.1% Triton X-100 for 5 min at room temperature. Non specific sites were blocked in PBS, 1% bovine serum albumin for 60 min at

37°C. Staining was performed by incubating cells for 1 h at 37°C with anti-Myc and anti-Flag antibodies, followed by incubation with FITC-conjugated anti-rabbit IgG and rhodamine-conjugated anti-mouse IgG as respective secondary reagents. Cell preparations were viewed by fluorescence microscopy on a Leica DM IRB microscope.

### **Molecular modeling**

Models of un-phosphorylated (1ERK) and phosphorylated (2ERK) rat ERK2 and un-phosphorylated human ERK3 (2I6L) were rendered using Swiss-PDB viewer v3.7.

## RESULTS

### **ERK3 and ERK4 are phosphorylated *in trans* on Ser189 and Ser186, respectively, in their activation loop**

To get insights into the regulation of the atypical MAP kinases ERK3 and ERK4, we performed *in vivo* labeling experiments with  $^{32}\text{P}_i$  to evaluate the phosphorylation status of the two kinases in proliferating cells. The expression of ectopic ERK3 is very weak due to a high turnover rate mediated by the ubiquitin-proteasome system (Coulombe et al., 2003). For labeling experiments, we used a Myc<sub>6</sub>-tagged form of ERK3 to facilitate detection, as we recently showed that N-terminal ubiquitination of ERK3 is perturbed by addition of large N-terminal tags (Coulombe et al., 2004). As previously observed (Cheng et al., 1996; Coulombe et al., 2004), we found that ERK3 is a phosphoprotein *in vivo* (Fig. 1A). Phosphopeptide mapping analysis revealed that ERK3 is phosphorylated on 2 major peptides, and a number of minor sites, in exponentially proliferating HEK 293 cells (Fig. 1B). The two major phosphopeptides contain phosphorylated serine residues as indicated by phosphoamino acid analysis (Supplementary Fig. 1). The phosphorylation of ERK3 does not depend on its own phosphotransferase activity. Indeed, the phosphorylation pattern of an ERK3 mutant in which lysine 49 and 50 of subdomain II are mutated to alanine (ERK3 KD) is similar to that of the wild type protein (Fig. 1, A and B). Another catalytically inactive mutant of ERK3 (lacking the catalytic base Asp152 of subdomain VIB) is also phosphorylated to the same extent (data not shown). Phosphorylation of ERK3 is thus mediated *in trans* by an endogenous cellular kinase, possibly the ERK3 kinase previously characterized (Cheng et al., 1996). In agreement with previous reports (Cheng et al., 1996; Coulombe et al., 2004; Coulombe et al., 2003), we identified the activation loop residue Ser189 (spot 2) as one of the two major phosphorylation sites of ERK3 in asynchronously proliferating cells (Fig. 1B). The phosphorylation of ERK3 on Ser189 was further confirmed by mass spectrometry analysis (data not shown) and by immunoblotting analysis with a phospho-specific antibody to Ser189

(Fig. 1C). This antibody recognizes wild type and kinase-dead ERK3, but not the S189A mutant.

ERK4 was also found to be phosphorylated in exponentially proliferating HEK 293 cells (Fig. 1A). Phosphopeptide maps of labeled ERK4 showed three main spots and several minor ones, all containing phosphoserine exclusively (Fig. 1B and Supplementary Fig. 1). Mutation of the activation loop Ser186 to Ala reduced the total incorporation of  $^{32}\text{P}$  into ERK4 (Fig. 1A) and led to the disappearance of spot 1 on phosphopeptide maps (Fig. 1B), indicating that ERK4 is phosphorylated on Ser186 *in vivo*. Phosphorylation of Ser186 was further confirmed by mass spectrometry analysis (data not shown). Interestingly, Ser186 phosphorylation of ERK4 could also be detected using the anti-ERK3(Ser189) phospho-specific antibody (Fig. 1C). This antibody is thus referred to as a Ser189/186 phospho-specific antibody. Contrary to ERK3, activation loop phosphorylation of ERK4 depends in part on ERK4 kinase activity. The catalytically inactive mutant of ERK4 D149A is significantly less phosphorylated than the wild type protein on Ser186 (Fig. 1, B and C). However, the residual phosphorylation of the D149A mutant on Ser186 indicates that ERK4 is also subject to activation loop phosphorylation by an unknown cellular kinase.

Phylogenetic analysis revealed that Ser189 and Ser186 are conserved in all vertebrate orthologs of ERK3 and ERK4 (Fig. 1D). The surrounding residues in the activation loop are also highly conserved, explaining the cross-reactivity of the anti-ERK3(Ser189) phospho-specific antibody. Ser189/Ser186 corresponds to threonine 185 in the MAP kinase ERK2 (Fig. 1D).

### **Activation loop phosphorylation of ERK3 and ERK4 is not modulated by classical MAP kinase stimuli**

Phosphorylation of the classical MAP kinases ERK1/ERK2, JNKs and p38s in the activation loop is acutely regulated by extracellular mitogenic and stress stimuli. We

therefore examined the regulation of ERK3 and ERK4 activation loop phosphorylation by known MAP kinase stimuli. Analysis of total ERK3 phosphorylation in  $^{32}\text{P}$ -labeled cells revealed that ERK3 is phosphorylated in serum-starved resting cells and that stimulation by mitogenic factors or cellular stresses does not modulate the extent of phosphorylation (Fig. 2A). We then analyzed more specifically the phosphorylation of ERK3 in the activation loop. HEK 293 cells were transfected with Myc<sub>6</sub>-ERK3, starved of serum overnight, and re-stimulated with either 10% serum or 400 mM sorbitol. Ser189 phosphorylation was monitored by immunoblotting with anti-phospho-ERK3/ERK4(Ser189/186). Phosphorylation of ERK3 on Ser189 could be easily detected in unstimulated serum-starved cells and was not modulated by either mitogenic or stress stimuli (Fig. 2, B and C). In sharp contrast, no detectable activating phosphorylation of the MAP kinases ERK1/ERK2, JNK or p38 was detectable under these conditions (Fig. 2, B and C). Stimulation with serum strongly increased the phosphorylation of ERK1/2, whereas treatment with sorbitol augmented the phosphorylation of JNK and p38.

Similarly, ERK4 was found to be phosphorylated on Ser186 in serum-starved cells and the extent of phosphorylation did not change appreciably in response to mitogenic or stress stimuli (Fig. 2, B and C and data not shown). These results clearly indicate that the ERK3/ERK4 subfamily of MAP kinases is regulated very differently than classical family members.

### **The stoichiometry of ERK3/ERK4 activation loop phosphorylation can be indirectly increased by MK5 interaction**

Recent studies have shown that MK5, in addition to being a substrate of ERK3/ERK4, can reciprocally act as a kinase and phosphorylate ERK3 and ERK4 both *in vitro* and *in vivo* (Kant et al., 2006; Schumacher et al., 2004; Seternes et al., 2004), suggesting a complex relationship between these protein kinases. To analyze the impact of MK5 on ERK3 and ERK4 activation loop phosphorylation, we co-transfected the two kinases in HEK 293 cells and monitored the phosphorylation of

ERK3 on Ser189 or of ERK4 on Ser186. As previously reported (Kant et al., 2006), overexpression of MK5 resulted in hyper-phosphorylation of ERK4 revealed by the presence of a slower migrating band on SDS-acrylamide gels (Fig. 3A, middle panel). Co-expression of catalytically inactive MK5 with ERK4 or expression of ERK4 D149A with MK5 failed to induce this mobility shift, indicating that ERK4 hyper-phosphorylation is dependent on both MK5 and ERK4 kinase activities. The ERK4 S186A mutant was also hyper-phosphorylated when co-expressed with MK5, although the mobility shift was only partial compared to the wild type protein.

Interestingly, co-expression of MK5 significantly increased the phosphorylation of both ERK4 and ERK3 in the activation loop (Fig. 3A and 4A, upper panel). This augmented phosphorylation was shown to be completely independent of the catalytic activity of MK5 and of ERK3/ERK4. Analysis of total ERK3 and ERK4 levels (Fig. 3A and 4A, middle panel) suggested that the increase in Ser189 and Ser186 phosphorylation is mainly due to a change in phosphorylation stoichiometry rather than a change in protein abundance. However, unlike ERK3, ERK4 can be detected as two distinct bands on gels, which complicates the quantitative assessment of its phosphorylation. To further address this question, we monitored Ser186 phosphorylation of ERK4 at increasing concentrations of MK5. These experiments convincingly showed that activation loop phosphorylation of wild type ERK4 and KD mutant increases proportionally with the amount of MK5 without any major change in ERK4 protein abundance (Fig. 3B), thus confirming that MK5 expression increases the stoichiometry of ERK3/ERK4 activation loop phosphorylation.

To determine whether the increase in ERK3 Ser189 and ERK4 Ser186 phosphorylation was dependent on MK5 interaction, we co-transfected a truncated form of MK5 (amino acids 1 to 423), which lacks the region required for ERK3/ERK4 interaction but still possesses kinase activity (Aberg et al., 2006). Expression of MK5(1-423) failed to increase ERK3 and ERK4 activation loop phosphorylation (Fig. 3C and 4B). Together, these results suggest that MK5

interaction favors the recruitment of an activating ERK3/ERK4 kinase into the complex.

### **Activation loop phosphorylation of ERK3 and ERK4 is essential for optimal MK5 activation**

To analyze the impact of activation loop phosphorylation on the activity of ERK3 and ERK4, we measured the ability of the two kinases to activate MK5 in an *in vitro* coupled kinase assay. For these experiments, Myc<sub>6</sub>-tagged wild type or mutant ERK3 were transiently expressed in HEK 293 cells, immunoprecipitated, and incubated with purified recombinant wild type or inactive MK5 in the presence of Hsp27 as substrate. As shown in Fig. 5A, wild type ERK3 immunoprecipitated from exponentially proliferating HEK 293 cells strongly activated MK5 as revealed by the robust phosphorylation of its substrate Hsp27. Little or no phosphorylation of Hsp27 was detected in the absence of MK5, confirming that ERK3 acts directly on MK5. The two catalytically inactive mutants of ERK3, KD and D152A, failed to activate MK5, indicating that direct phosphorylation of MK5 is required for its enzymatic activation. Likewise, the S189A activation loop mutant of ERK3 was unable to stimulate the activity of MK5 *in vitro* (Fig. 5A).

Similar results were obtained with ERK4 (Fig. 5B). Notably, ERK4 S186A mutant partially activated MK5 in this assay, suggesting that ERK4 possesses residual kinase activity in the absence of Ser186 phosphorylation. Nevertheless, phosphorylation of Ser186 strongly enhanced ERK4 activity. Altogether, these data demonstrate that activation loop phosphorylation of the atypical MAP kinases ERK3 and ERK4 is required for full kinase activity and subsequent MK5 activation.

### **Phosphorylation of ERK3 and ERK4 in the activation loop allows stable interaction with their substrate MK5**

We then evaluated the impact of Ser189/186 phosphorylation on complex formation between ERK3/ERK4 and MK5. Co-immunoprecipitation experiments confirmed that both ERK3 and ERK4 interact with MK5 in a kinase-independent manner (Fig. 6, A and B) (Aberg et al., 2006; Kant et al., 2006; Schumacher et al., 2004; Seternes et al., 2004). Strikingly, activation loop mutants of ERK3 and ERK4 were found to interact poorly with MK5 (Fig. 6, A and B). In contrast, interaction of ERK3/ERK4 with MK5 is not influenced by the phosphorylation of MK5 activation loop (Fig. 6C).

We next measured the MK5 activity associated with ERK3 and ERK4 in cells. Immunoprecipitates of ERK3 and ERK4 co-expressed with MK5 display high phosphotransferase activity towards Hsp27 (Fig. 7, A and B). Co-transfection with an inactive MK5 mutant abolishes this activity, confirming that MK5 is responsible for the observed Hsp27 phosphorylation. Contrary to the results of *in vitro* coupled kinase assays (Fig. 5A), expression of catalytically inactive mutants of ERK3 induced a partial activation of the physically-associated MK5 (Fig. 7A). This kinase-independent activity is likely due to the scaffolding action of ERK3 as postulated by Schumacher *et al.* (Schumacher et al., 2004). Importantly, the S189A and S186A mutants of ERK3 and ERK4, respectively, were completely devoided of associated MK5 activity (Fig. 7, A and B), in agreement with the results of co-immunoprecipitation studies (Fig. 6). Thus, in addition to stimulating their intrinsic catalytic activity, activation loop phosphorylation of ERK3 and ERK4 is important for the formation of active ERK3/ERK4-MK5 complexes.

### **The nucleocytoplasmic distribution of ERK3/ERK4-MK5 complexes is regulated by activation loop phosphorylation**

Co-expression of ERK3 with MK5 has been reported to induce the cytoplasmic relocalization of MK5 (Schumacher et al., 2004) or of both MK5 and ERK3 (Seternes et al., 2004) in various cell types. Similarly, ERK4 expression with MK5 causes the nuclear-to-cytoplasmic redistribution of MK5 (Aberg et al., 2006; Kant et al., 2006).



Given the importance of Ser189 and Ser186 phosphorylation for the interaction of ERK3 and ERK4 with MK5, we asked whether this phosphorylation event influences the subcellular localization of ERK3/ERK4-MK5 complexes. For these experiments, MK5 and wild type or mutant ERK3 were transiently expressed in Rat1 cells, and the cellular localization of the two kinases was visualized by immunofluorescence microscopy. As previously reported (Julien et al., 2003; Seternes et al., 2004), ERK3 and MK5 when expressed alone localize mainly in the nucleus, while their co-expression induces the relocation of both kinases in the cytoplasm (Fig. 8). The catalytically inactive D152A mutant of ERK3 was similarly relocated to the cytoplasm by MK5. However, ERK3 S189A mutant was less efficiently redistributed to the cytoplasm than the wild type protein (Fig. 8B). In these assays, no apparent difference in the localization of MK5 could be observed upon co-expression with the different ERK3 mutants (Fig. 8A). The reason for this is unclear. It is possible that an inappropriate stoichiometry between the two expressed proteins results in a lack of sensitivity of our assay. Nevertheless, the effect of the Ser189 mutation on the cytoplasmic redistribution of ERK3 by MK5 suggests that activation loop phosphorylation is important for the subcellular localization of ERK3-MK5 complexes.

Unlike ERK3, ERK4 is mainly found in the cytoplasmic compartment of most cell types (Fig. 9 and (Aberg et al., 2006)). This explains why we do not observe a cytoplasmic redistribution of the kinase upon co-expression of MK5 (Fig. 9B). On the other hand, co-expression of wild type or catalytically inactive ERK4 leads to a quantitative redistribution of MK5 from the nucleus to the cytoplasm (Fig. 9A). Mutation of Ser186 of ERK4 markedly impairs the cytoplasmic relocation of MK5. The more efficient subcellular redistribution of MK5 mediated by ERK4 compared to ERK3 could be explained in part by the fact that ERK4 is more stable than ERK3 (Aberg et al., 2006; Coulombe et al., 2003; Kant et al., 2006). We conclude that activation loop phosphorylation of ERK3 and ERK4 is necessary for their stable association with MK5 and, as a consequence, for the redistribution of ERK3/ERK4-MK5 complexes to the cytoplasm.

## DISCUSSION

The enzymatic activity of classical MAP kinases is controlled by reversible phosphorylation of the activation loop. In this study, we show that the ERK3 subfamily of atypical MAP kinases, which consist of ERK3 and ERK4, is also subject to regulation by activating loop phosphorylation *in vivo*. ERK3 and ERK4 possess the sequence Ser-Glu-Gly in their activation loop instead of the conserved Thr-Xxx-Tyr motif found in classical MAP kinases (Coulombe and Meloche, 2007). Like other MAP kinases, ERK3 and ERK4 are phosphorylated on this motif in intact cells (this study; (Cheng et al., 1996; Coulombe et al., 2004; Coulombe et al., 2003)). Interestingly, *in vivo* labeling experiments and immunoblotting analysis with a phospho-specific antibody to Ser189/186 revealed that phosphorylation of ERK3 and ERK4 in the activation loop is constitutive in resting cells. No change in the extent of Ser189/Ser186 phosphorylation of ERK3/ERK4 was observed upon stimulation of quiescent cells by potent mitogenic or stress stimuli. In contrast, the same treatments induced a robust activation of the classical MAP kinases ERK1/2, JNK and p38. These results indicate that ERK3 and ERK4 are regulated differently than classical MAP kinases.

Interestingly, we observed that MK5 expression indirectly increases the stoichiometry of phosphorylation of ERK3/ERK4 in the activation loop. This increase is independent of the catalytic activity of both MK5 and ERK3/ERK4, suggesting that the physical association of ERK3/ERK4-MK5 complexes may facilitate the recruitment and/or activation of the ERK3/ERK4 activation loop kinase. This mechanism may create a positive feedback loop to enforce MK5 activation. The physiological relevance of this observation requires further investigation.

Our findings confirm that phosphorylation of ERK3 on Ser189 is exerted *in trans* by one or more cellular kinases, which may correspond to a previously characterized and partially purified ERK3-kinase activity (Cheng et al., 1996). On the other hand, activation loop phosphorylation of ERK4 appears to depend both on

autophosphorylation and on phosphorylation by a cellular kinase. The identity of the ERK3 and ERK4 kinase(s) is unknown. The observation that ERK3 and ERK4 are phosphorylated in all cellular conditions tested, including growth-arrested and terminally differentiated cells, suggest that ERK3 and ERK4 activation loop kinases are constitutively active in most cellular contexts and may represent a single protein kinase.

Some activation loop kinases are known to be constitutively active. The cyclin-dependent kinase activating kinase (CAK) is responsible for phosphorylation of the conserved threonine residue present in the activation loop of the cell cycle kinases Cdk1, Cdk2 and Cdk4/6. Studies indicate that CAK is active in all phases of the cell cycle and is therefore not limiting for cyclin-dependent kinase activation (Tassan et al., 1994). Activation loop phosphorylation of ERK3 and ERK4 could result from the basal activity of a highly expressed ERK3/ERK4 kinase(s). As suggested by Dummler *et al.* (Dummler et al., 2005), the basal activity of ERK1/ERK2 is sufficient to activate RSK4 in the absence of extracellular stimulation. For certain protein kinases, activation loop phosphorylation is necessary but not sufficient to induce full activation of the enzyme. Phosphorylation of a second site or protein-protein interactions is necessary. In the case of ERK3 and ERK4, interaction with MK5 and/or phosphorylation induced by MK5 could represent an additional regulatory step leading to their activation.

Our results clearly demonstrate the positive regulatory role of Ser189/Ser186 phosphorylation on the kinase activity of ERK3/ERK4. Recently, the crystal structure of the unphosphorylated ERK3 kinase domain was solved (Filippakopoulos, 2006). This structure helps explain the lack of activity of ERK3 S189A mutant. The non-phosphorylated ERK3 is found in an open conformation, often observed in inactive protein kinases (Huse and Kuriyan, 2002; Nolen et al., 2004) (Supplementary Fig. 2A). Moreover, the activation loop of non-phosphorylated ERK3 blocks access to the active site (Supplementary Fig. 2B). The fact that ERK4 S186A mutant displays partial kinase activity suggests that the configuration of its activation loop differs

from that of ERK3, despite the high degree of amino acid conservation between the two kinases.

Previous studies have shown that physical interaction, but not kinase activity, is important for the nuclear-to-cytoplasmic redistribution of MK5 by ERK3 and ERK4. A motif between amino acids 330 to 340 of ERK3/ERK4 was shown to be essential for this phenomenon (Seternes et al., 2004). The results presented here now reveal a role of ERK3/ERK4 activation loop phosphorylation in regulating the subcellular localization of ERK3/ERK4-MK5 complexes. This effect is most likely a consequence of the stabilizing effect of Ser189/Ser186 phosphorylation on the physical association between ERK3/ERK4 and MK5. A subset of ERK1/ERK2 substrates preferentially associates with the dually phosphorylated kinases (Lee et al., 2004). These substrates are characterized by the presence of a DEF domain, which interacts with a hydrophobic patch located on the C-terminal lobe of the kinase, near the activation loop (Jacobs et al., 1999). In fact, the activation loop partially masks the FxFP binding site in the non-phosphorylated ERK2 structure (Lee et al., 2004). Pull-down experiments have revealed that phosphorylated ERK2 has 3 times more affinity to FxFP-containing Elk1 than the non-phosphorylated kinase. Our results suggest that phosphorylated ERK3 and ERK4 interact ~10 times more efficiently with MK5 than the S189A/S186A mutants. Similarly to other MAP kinases, ERK3 and ERK4 could preferentially associate with their substrates (e.g. MK5) in the phospho-Ser189/186 form via a specific binding interface. Alternatively, MK5 might directly contact the phosphorylated activation loop segment.

The results of the present study can be summarized in the following model (Fig 10). MK5 has low affinity for and interacts transiently with unphosphorylated ERK3/ERK4. This interaction recruits and/or contributes to the activation of ERK3/ERK4 activation loop kinase, which catalyzes the phosphorylation of Ser189 or Ser186. Once this phosphorylation step has occurred, the ERK3/ERK4-MK5 interaction is strengthened, ERK3/ERK4 is activated and subsequently phosphorylates MK5 on its own activation loop (Aberg et al., 2006). Phosphorylation

of MK5 on Thr182 fully activates the kinase and induces the phosphorylation of ERK3/ERK4 outside of the activation loop. The two activated kinases are then competent to phosphorylate additional physiological substrates and relay the signal downstream.

Dysregulation of MAP kinase signaling pathways is associated to diverse pathologies such as cancer, inflammation and diabetes. The physiological consequences of ERK3/ERK4 activation of MK5 remain unclear. However, it will be interesting to explore the role of this interaction in tumorigenesis since MK5 was recently implicated in the control of Ras-induced senescence (Sun et al., 2007).

#### **ACKNOWLEDGMENTS**

We thank R. Davis and J. Landry for reagents and I. Topisirovic for technical help. We also thank the following institutions for scholarship and fellowship support: Fonds de la Recherche en Santé du Québec (P.D.); Fondation pour la Recherche Médicale (P.D.); National Cancer Institute of Canada (P.C. and G.R.); American Association for Cancer Research (G.R.); and Canadian Institutes for Health Research (P.L.T.). S.Meloche holds the Canada Research Chair in Cellular Signaling.

**LITERATURE CITED**

- Aberg E, Perander M, Johansen B, Julien C, Meloche S, Keyse SM, Seternes OM. 2006. Regulation of MAPK-activated protein kinase 5 activity and subcellular localization by the atypical MAPK ERK4/MAPK4. *J Biol Chem* 281(46):35499-35510.
- Anhe GF, Torrao AS, Nogueira TC, Caperuto LC, Amaral ME, Medina MC, Azevedo-Martins AK, Carpinelli AR, Carvalho CR, Curi R, Boschero AC, Bordin S. 2006. ERK3 associates with MAP2 and is involved in glucose-induced insulin secretion. *Mol Cell Endocrinol* 251(1-2):33-41.
- Boulton TG, Nye SH, Robbins DJ, Ip NY, Radziejewska E, Morgenbesser SD, DePinho RA, Panayotatos N, Cobb MH, Yancopoulos GD. 1991. ERKs: a family of protein-serine/threonine kinases that are activated and tyrosine phosphorylated in response to insulin and NGF. *Cell* 65(4):663-675.
- Canagarajah BJ, Khokhlatchev A, Cobb MH, Goldsmith EJ. 1997. Activation mechanism of the MAP kinase ERK2 by dual phosphorylation. *Cell* 90(5):859-869.
- Cheng M, Zhen E, Robinson MJ, Ebert D, Goldsmith E, Cobb MH. 1996. Characterization of a protein kinase that phosphorylates serine 189 of the mitogen-activated protein kinase homolog ERK3. *J Biol Chem* 271(20):12057-12062.
- Coulombe P, Meloche S. 2002. Dual-tag prokaryotic vectors for enhanced expression of full-length recombinant proteins. *Anal Biochem* 310(2):219-222.
- Coulombe P, Meloche S. 2007. Atypical mitogen-activated protein kinases: structure, regulation and functions. *Biochim Biophys Acta* 1773(8):1376-1387.
- Coulombe P, Rodier G, Bonneil E, Thibault P, Meloche S. 2004. N-Terminal ubiquitination of extracellular signal-regulated kinase 3 and p21 directs their degradation by the proteasome. *Mol Cell Biol* 24(14):6140-6150.
- Coulombe P, Rodier G, Pelletier S, Pellerin J, Meloche S. 2003. Rapid turnover of extracellular signal-regulated kinase 3 by the ubiquitin-proteasome pathway defines a novel paradigm of mitogen-activated protein kinase regulation during cellular differentiation. *Mol Cell Biol* 23(13):4542-4558.
- Crowe DL. 2004. Induction of p97MAPK expression regulates collagen mediated inhibition of proliferation and migration in human squamous cell carcinoma lines. *Int J Oncol* 24(5):1159-1163.
- Dummler BA, Hauge C, Silber J, Yntema HG, Kruse LS, Kofoed B, Hemmings BA, Alessi DR, Frodin M. 2005. Functional characterization of human RSK4, a new 90-kDa ribosomal S6 kinase, reveals constitutive activation in most cell types. *J Biol Chem* 280(14):13304-13314.
- Filippakopoulos P, Turnbull, A.P., Savitsky, P., Fedorov, O., Berridge, G., Das, S., Elkins, J., Soundararajan, M., Yang, X.W., Doyle, D., Papagrigoriou, E., Pike, A.C.W., Bunkoncz, G., Ugochukwu, E., Debreczeni, J., von Delft, F., Edwards, A., Arrowsmith, C., Sundstrom, M., Knapp, S. 2006. Crystal structure of human mitogen activated protein kinase 6 (MAPK6) <http://www.rcsb.org/pdb/explore?structureId=2I6L>.

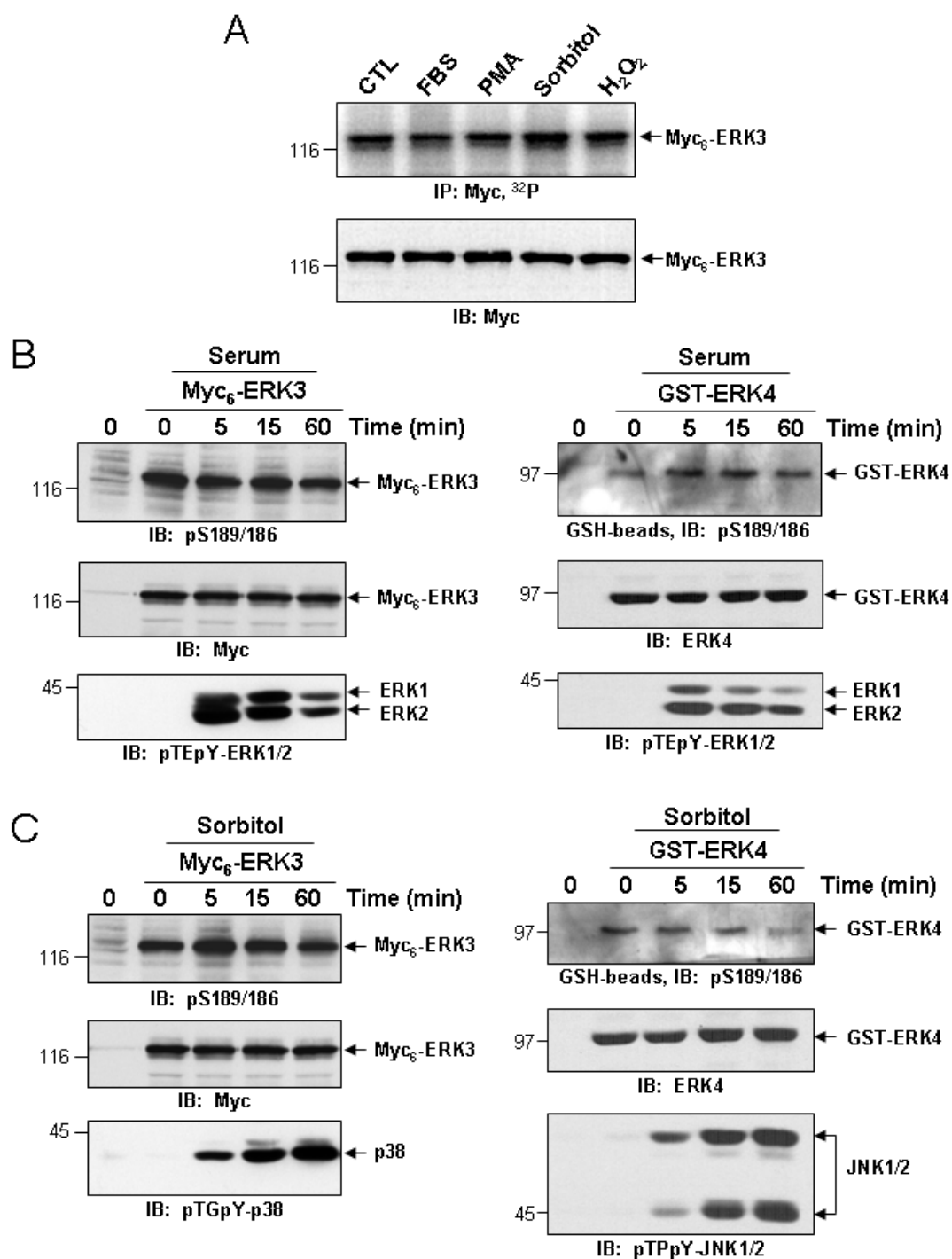
- Hoeflich KP, Eby MT, Forrest WF, Gray DC, Tien JY, Stern HM, Murray LJ, Davis DP, Modrusan Z, Seshagiri S. 2006. Regulation of ERK3/MAPK6 expression by BRAF. *Int J Oncol* 29(4):839-849.
- Huse M, Kuriyan J. 2002. The conformational plasticity of protein kinases. *Cell* 109(3):275-282.
- Jacobs D, Glossip D, Xing H, Muslin AJ, Kornfeld K. 1999. Multiple docking sites on substrate proteins form a modular system that mediates recognition by ERK MAP kinase. *Genes Dev* 13(2):163-175.
- Julien C, Coulombe P, Meloche S. 2003. Nuclear export of ERK3 by a CRM1-dependent mechanism regulates its inhibitory action on cell cycle progression. *J Biol Chem* 278(43):42615-42624.
- Kant S, Schumacher S, Singh MK, Kispert A, Kotlyarov A, Gaestel M. 2006. Characterization of the atypical MAPK ERK4 and its activation of the MAPK-activated protein kinase MK5. *J Biol Chem* 281(46):35511-35519.
- Kleines M, Gartner A, Ritter K, Schaade L. 2000. Early steps in termination of the immortalization state in Burkitt lymphoma: induction of genes involved in signal transduction, transcription, and trafficking by the ganglioside IV(3)NeuAc-nLcOse(4)Cer. *Biochim Biophys Acta* 1492(1):139-144.
- Krek W, Nigg EA. 1991. Differential phosphorylation of vertebrate p34cdc2 kinase at the G1/S and G2/M transitions of the cell cycle: identification of major phosphorylation sites. *Embo J* 10(2):305-316.
- Kyriakis JM, Avruch J. 2001. Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. *Physiol Rev* 81(2):807-869.
- Lee T, Hoofnagle AN, Kabuyama Y, Stroud J, Min X, Goldsmith EJ, Chen L, Resing KA, Ahn NG. 2004. Docking motif interactions in MAP kinases revealed by hydrogen exchange mass spectrometry. *Mol Cell* 14(1):43-55.
- Meloche S, Beatty BG, Pellerin J. 1996. Primary structure, expression and chromosomal locus of a human homolog of rat ERK3. *Oncogene* 13(7):1575-1579.
- Nolen B, Taylor S, Ghosh G. 2004. Regulation of protein kinases; controlling activity through activation segment conformation. *Mol Cell* 15(5):661-675.
- Pearson G, Robinson F, Beers Gibson T, Xu BE, Karandikar M, Berman K, Cobb MH. 2001. Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocr Rev* 22(2):153-183.
- Raman M, Chen W, Cobb MH. 2007. Differential regulation and properties of MAPKs. *Oncogene* 26(22):3100-3112.
- Robbins DJ, Zhen E, Owaki H, Vanderbilt CA, Ebert D, Geppert TD, Cobb MH. 1993. Regulation and properties of extracellular signal-regulated protein kinases 1 and 2 in vitro. *J Biol Chem* 268(7):5097-5106.
- Rodier G, Montagnoli A, Di Marcotullio L, Coulombe P, Draetta GF, Pagano M, Meloche S. 2001. p27 cytoplasmic localization is regulated by phosphorylation on Ser10 and is not a prerequisite for its proteolysis. *Embo J* 20(23):6672-6682.

- Schumacher S, Laass K, Kant S, Shi Y, Visel A, Gruber AD, Kotlyarov A, Gaestel M. 2004. Scaffolding by ERK3 regulates MK5 in development. *Embo J* 23(24):4770-4779.
- Servant MJ, Coulombe P, Turgeon B, Meloche S. 2000. Differential regulation of p27(Kip1) expression by mitogenic and hypertrophic factors: Involvement of transcriptional and posttranscriptional mechanisms. *J Cell Biol* 148(3):543-556.
- Seternes OM, Mikalsen T, Johansen B, Michaelsen E, Armstrong CG, Morrice NA, Turgeon B, Meloche S, Moens U, Keyse SM. 2004. Activation of MK5/PRAK by the atypical MAP kinase ERK3 defines a novel signal transduction pathway. *Embo J* 23(24):4780-4791.
- Sun P, Yoshizuka N, New L, Moser BA, Li Y, Liao R, Xie C, Chen J, Deng Q, Yamout M, Dong MQ, Frangou CG, Yates JR, 3rd, Wright PE, Han J. 2007. PRAK is essential for ras-induced senescence and tumor suppression. *Cell* 128(2):295-308.
- Tassan JP, Schultz SJ, Bartek J, Nigg EA. 1994. Cell cycle analysis of the activity, subcellular localization, and subunit composition of human CAK (CDK-activating kinase). *J Cell Biol* 127(2):467-478.
- Widmann C, Gibson S, Jarpe MB, Johnson GL. 1999. Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human. *Physiol Rev* 79(1):143-180.
- Zhang F, Strand A, Robbins D, Cobb MH, Goldsmith EJ. 1994. Atomic structure of the MAP kinase ERK2 at 2.3 Å resolution. *Nature* 367(6465):704-711.
- Zhu AX, Zhao Y, Moller DE, Flier JS. 1994. Cloning and characterization of p97MAPK, a novel human homolog of rat ERK-3. *Mol Cell Biol* 14(12):8202-8211.
- Zimmermann J, Lamerant N, Grossenbacher R, Furst P. 2001. Proteasome- and p38-dependent regulation of ERK3 expression. *J Biol Chem* 276(14):10759-10766.



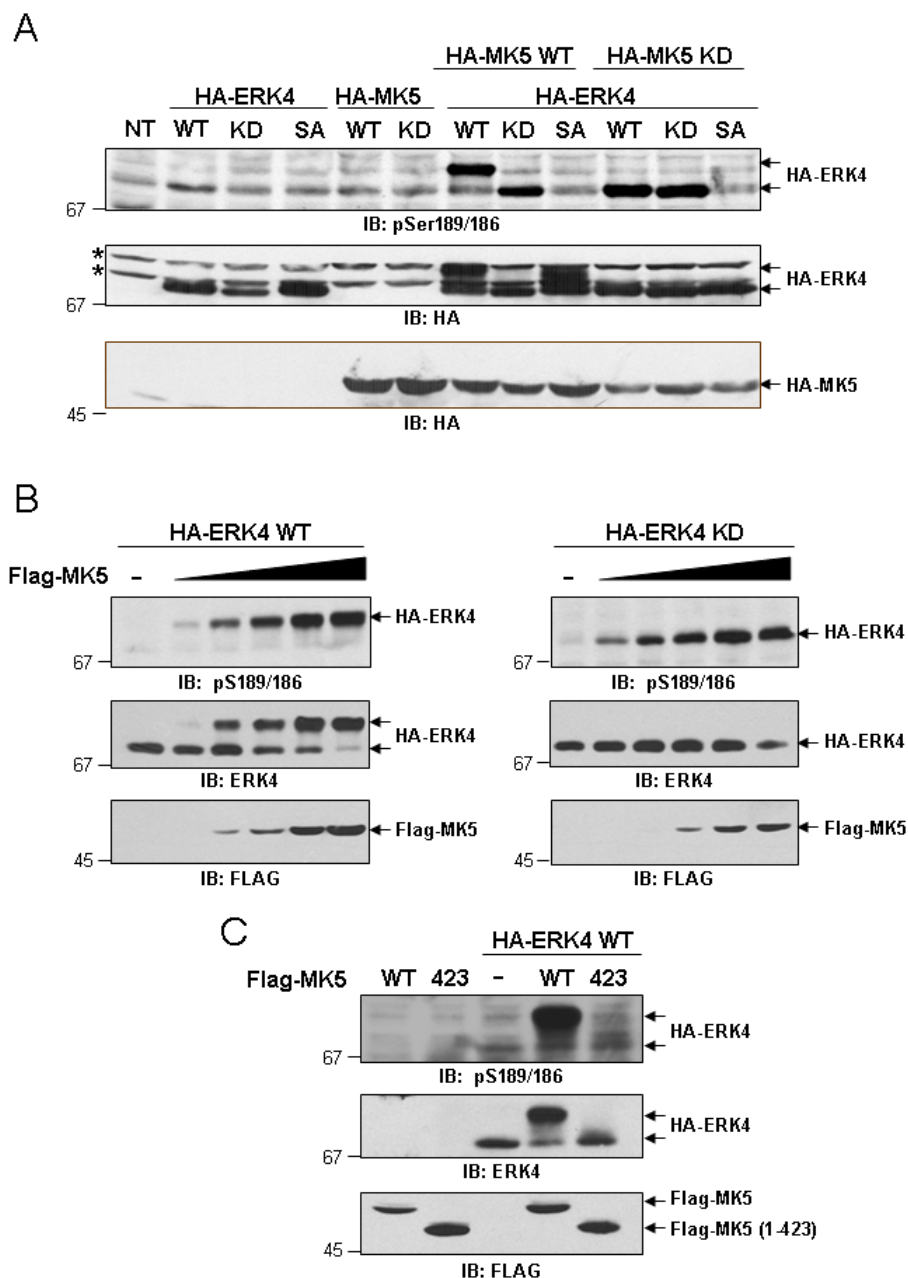


panels). The cells were metabolically labeled with  $^{32}\text{P}$ i, and the ectopic ERK3 and ERK4 proteins were immunoprecipitated with anti-Myc and anti-HA antibody, respectively. Phosphorylation was detected by autoradiography (upper panels). The same membrane was analyzed for ERK3 and ERK4 expression by immunoblotting (lower panels). **B**: Phosphopeptide mapping analysis of  $^{32}\text{P}$ -labeled ERK3 and ERK4 proteins purified as in A. Major phosphopeptides are numbered. The arrowhead indicates the position of sample application. Note the disappearance of spot 2 in ERK3 S189A mutant and spot 1 in ERK4 S186A mutant maps, respectively (arrows). **C**: HEK 293 cells were transfected with the indicated Myc<sub>6</sub>-tagged ERK3 (left panels) or HA-tagged ERK4 (right panels) constructs. Total lysates from exponentially proliferating cells were analyzed by immunoblotting using S189/186 phospho-specific (upper panels) or Myc/HA (lower panels) antibodies. **D**: Sequence alignment of the region in the activation loop surrounding Ser189 and Ser186 in different ERK3/ERK4 orthologs and human ERK2. Asterisk indicates phosphorylation.

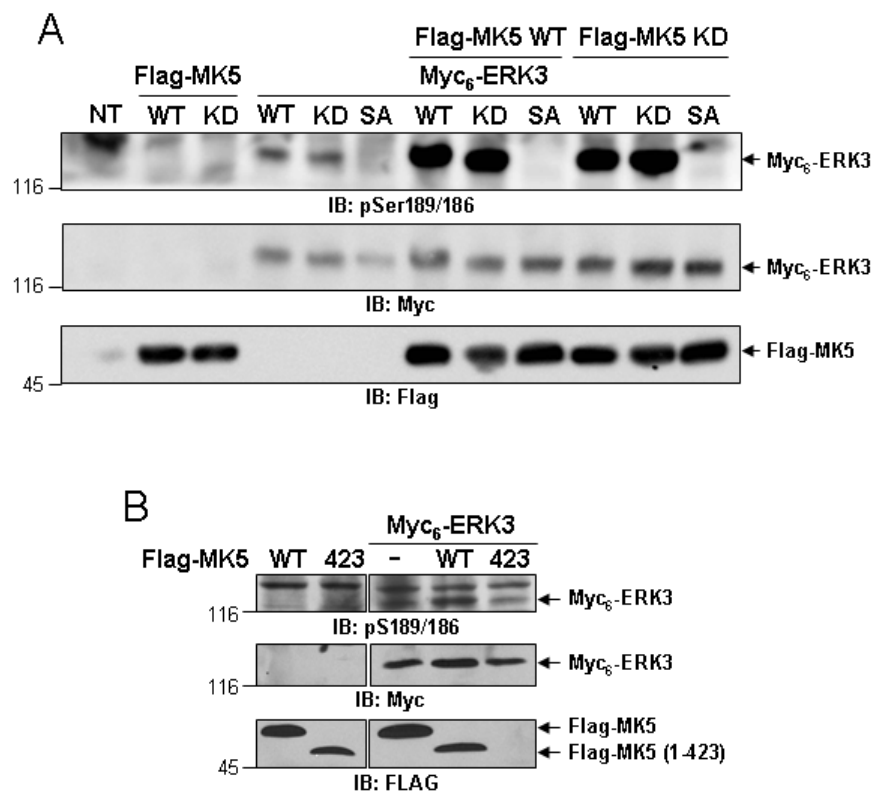


**Figure 2. Mitogenic or stress stimuli do not modulate activation loop phosphorylation of ERK3 and ERK4.** A: HEK 293 cells were transfected with Myc<sub>6</sub>-ERK3 and serum-starved overnight. Quiescent cells were labeled with <sup>32</sup>Pi and then stimulated with 10% fetal bovine serum (FBS), 200 nM phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA), 400 mM sorbitol, or 200 μM hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) for 10 min. Ectopic ERK3 was immunoprecipitated with anti-Myc antibody and

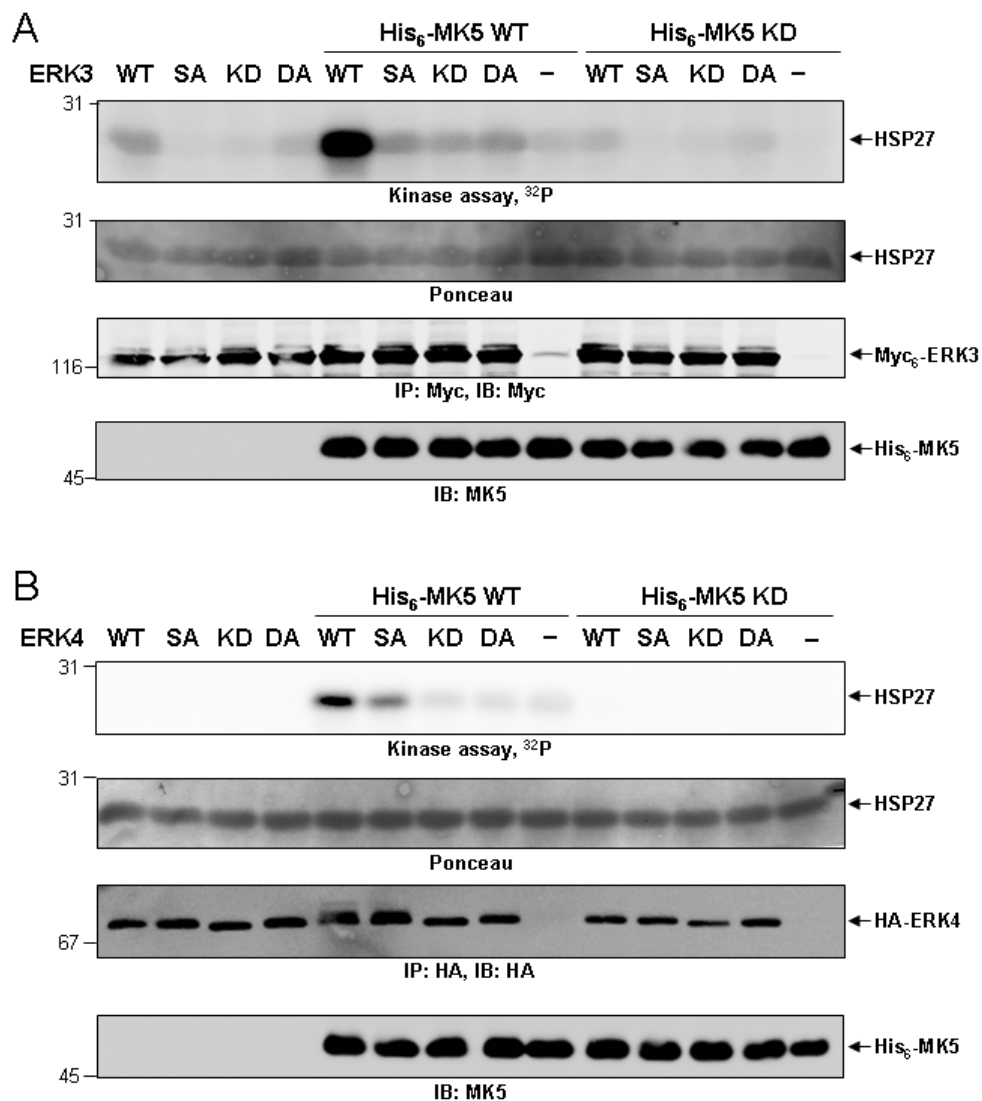
phosphorylation was detected by autoradiography (upper panel). Expression of ERK3 was analyzed by anti-HA immunoblotting of the same membrane (lower panel). **B:** HEK 293 cells were transfected with either Myc<sub>6</sub>-ERK3 or GST-ERK4. The cells were made quiescent by serum deprivation, and then stimulated with 10% calf serum for the indicated times. The phosphorylation of ERK3/ERK4 on Ser189/Ser186 (upper panels), the total expression of ERK3 and ERK4 (middle panels), and the activation loop phosphorylation of ERK1/ERK2 (lower panels) was analyzed by immunoblotting. **C:** Same as in B, except that cells were stimulated with 400 mM sorbitol. The activation loop phosphorylation of p38 (lower left panel) and JNK (lower right panel) was monitored by immunoblotting.



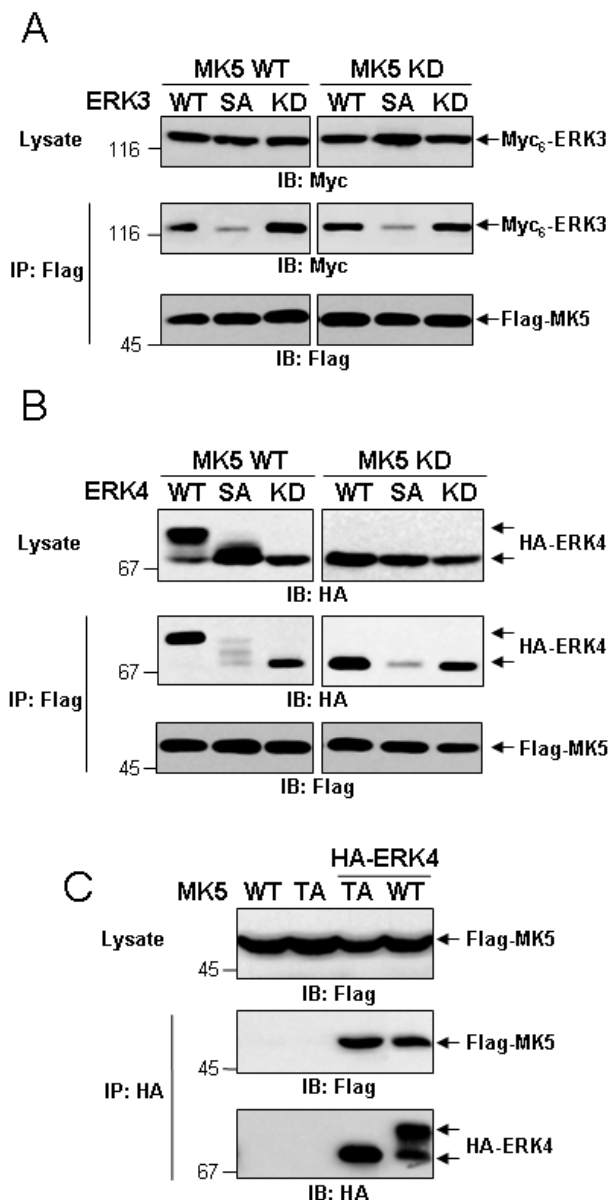
**Figure 3. Overexpression of MK5 increases the phosphorylation of ERK4 on Ser186. A and C:** HEK 293 cells were transfected with HA- or Flag-tagged MK5 WT, KD or the truncated 1-423 mutant (423) together with the indicated HA-ERK4 constructs. After 48 h, the phosphorylation of ERK4 on Ser186 (upper panel), and the total expression of ERK4 (middle panel) and MK5 (lower panel) were analyzed by immunoblotting. **B:** HEK 293 cells were transfected with increasing amounts of Flag-MK5 in the presence of HA-ERK4 WT (left panel) or HA-ERK4 KD (right panel). Phosphorylation of ERK4 on Ser186 (upper panel), and total expression of ERK4 (middle panel) and MK5 (lower panel) were analyzed as above.



**Figure 4. Overexpression of MK5 increases phosphorylation of ERK3 on Ser189.**  
**A and B:** HEK 293 cells were transfected with Flag-tagged MK5 WT, KD or the truncated 1-423 mutant (423) together with the indicated Myc<sub>6</sub>-ERK3 constructs. After 48 h, the phosphorylation of ERK3 on Ser189 (upper panel), and the total expression of ERK3 (middle panel) and MK5 (lower panel) were analyzed by immunoblotting.

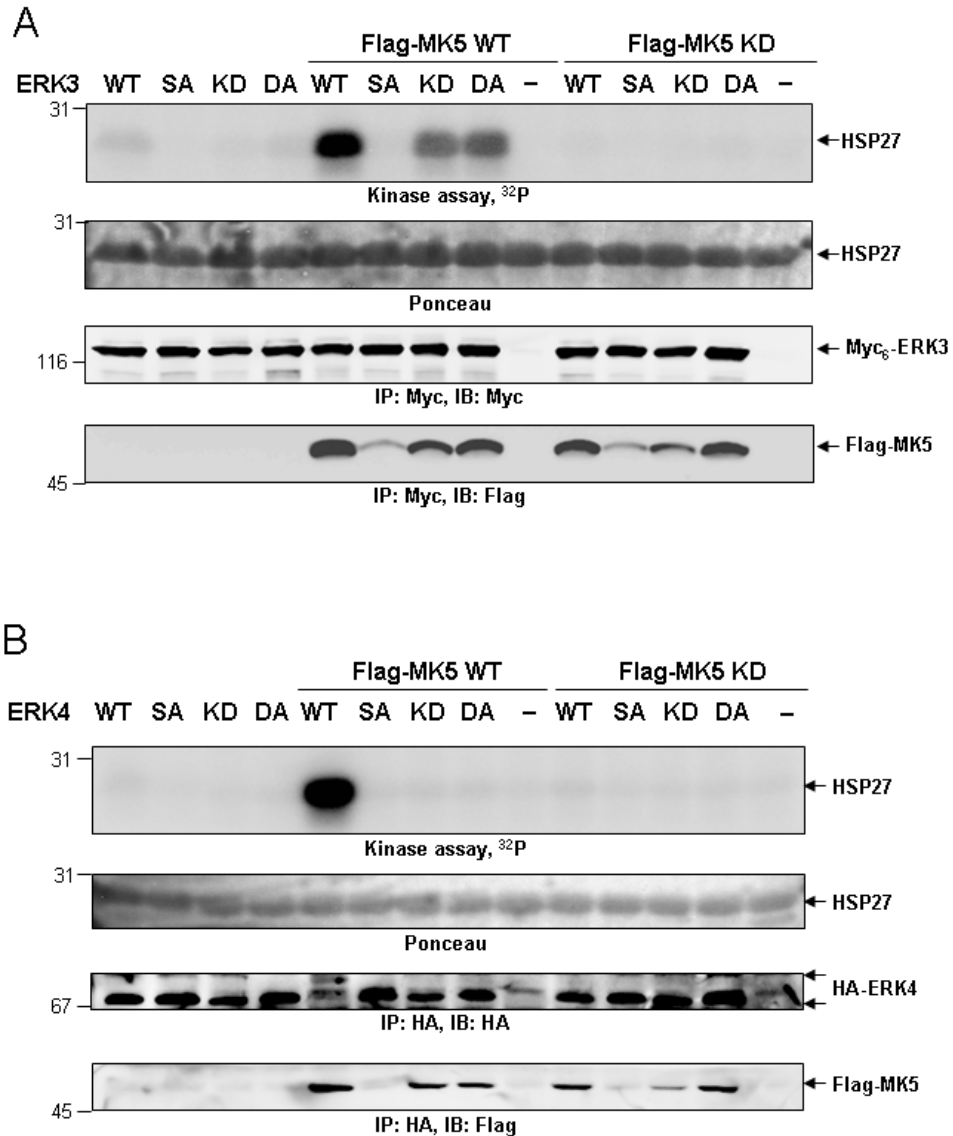


**Figure 5. Activation loop phosphorylation of ERK3 and ERK4 is essential for optimal MK5 activation *in vitro*.** **A:** HEK 293 cells were transfected with the indicated Myc<sub>6</sub>-tagged ERK3 constructs. After 24 h, the cells were treated with 10  $\mu$ M MG132 for 12 h, and ERK3 was immunoprecipitated with anti-Myc antibody. Enzymatic activity was measured in a coupled kinase assay by incubation of ERK3 with recombinant His<sub>6</sub>-MK5 (wild type (WT) or kinase-dead (KD)) and Hsp27 in the presence of ATP[ $\gamma$ <sup>32</sup>P]. The reaction products were analyzed by autoradiography (upper panel) and immunoblotting of the indicated proteins. The amount of Hsp27 was normalized by Ponceau staining of the membrane. **B:** Same as above, except that HEK 293 cells were transfected with the indicated HA-tagged ERK4 constructs. After 36 h, ERK4 was immunoprecipitated with anti-HA and enzymatic activity was assayed as in A.

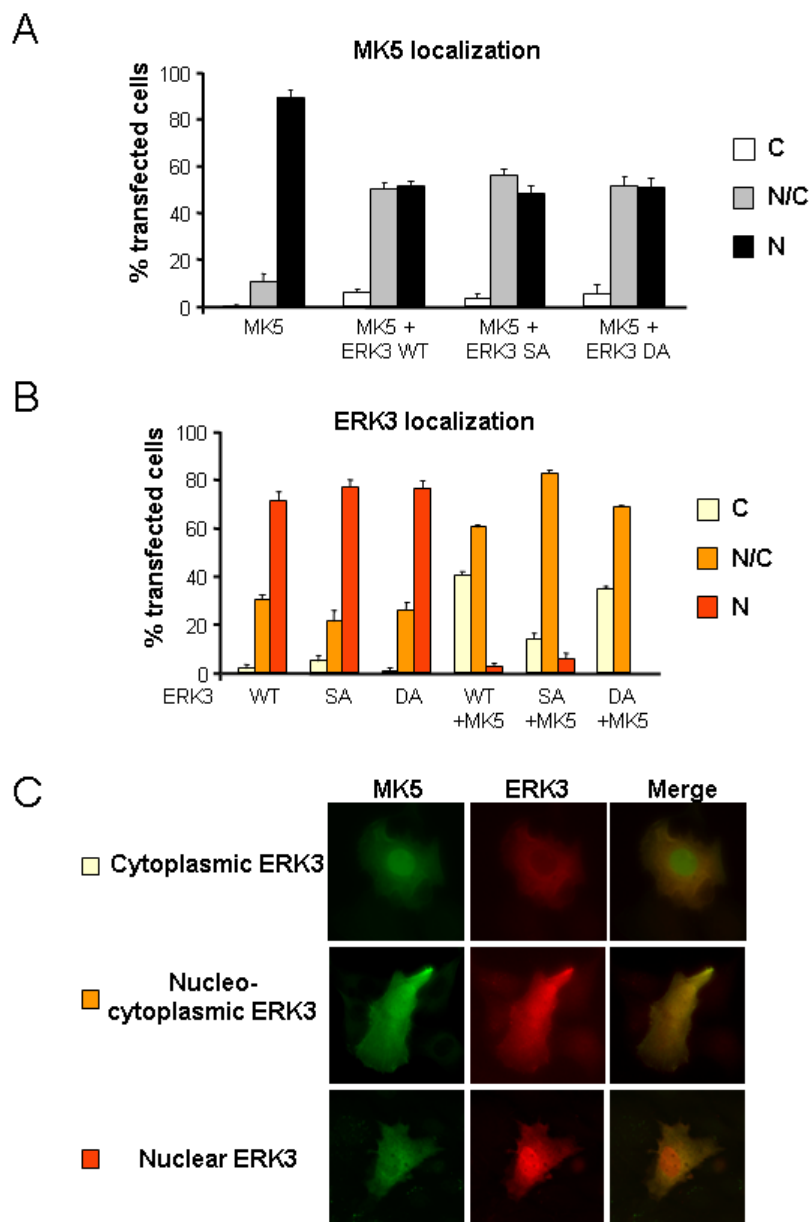


**Figure 6 Activation loop phosphorylation of ERK3 and ERK4 is required for their stable interaction with MK5 *in vivo*.** A and B: HEK 293 cells were transfected with the indicated Myc<sub>6</sub>-ERK3 (A) or HA-ERK4 (B) constructs together with wild type or kinase-dead Flag-MK5. After 36 h, the cells were lysed and MK5 was immunoprecipitated with anti-Flag antibody. Total lysates and Flag immunoprecipitates were analyzed by immunoblotting with antibodies to Myc, HA and Flag epitopes. C: HEK 293 cells were transfected with the indicated expression plasmids. After 36 h, cells were lysed and ERK4 was immunoprecipitated with anti-HA antibody. Total lysates and HA immunoprecipitates were analyzed by immunoblotting with appropriate antibodies.

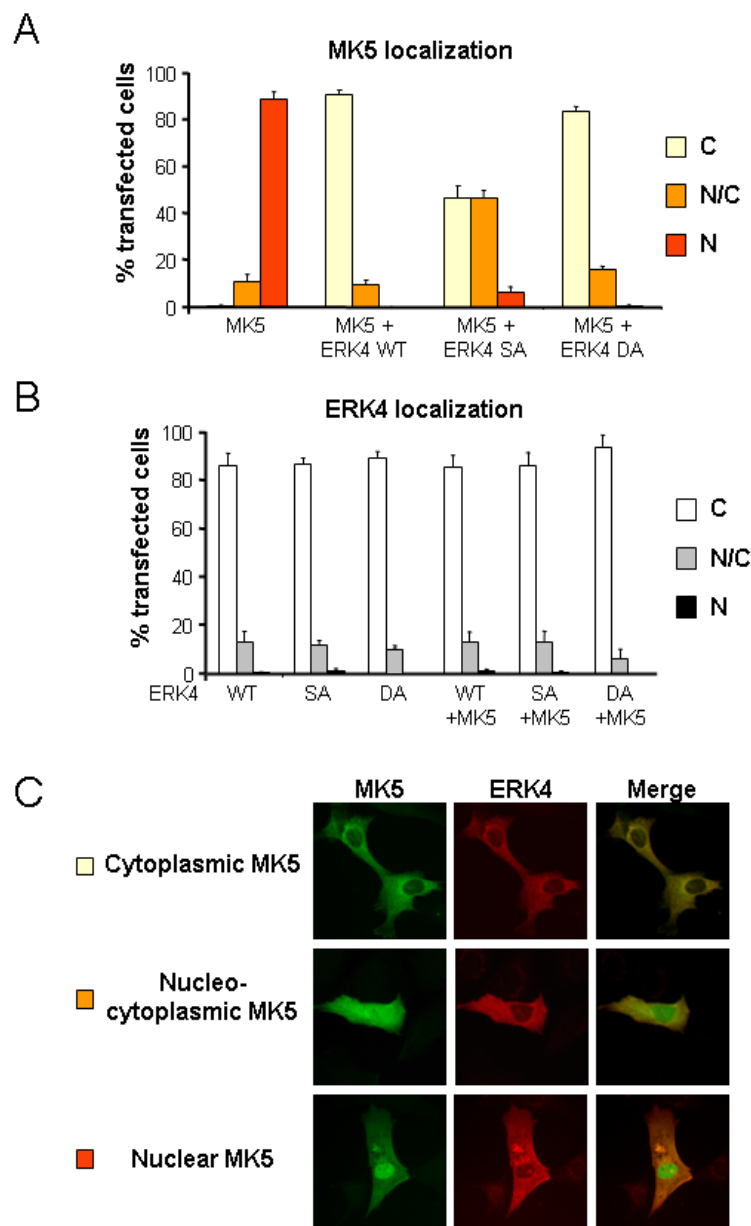




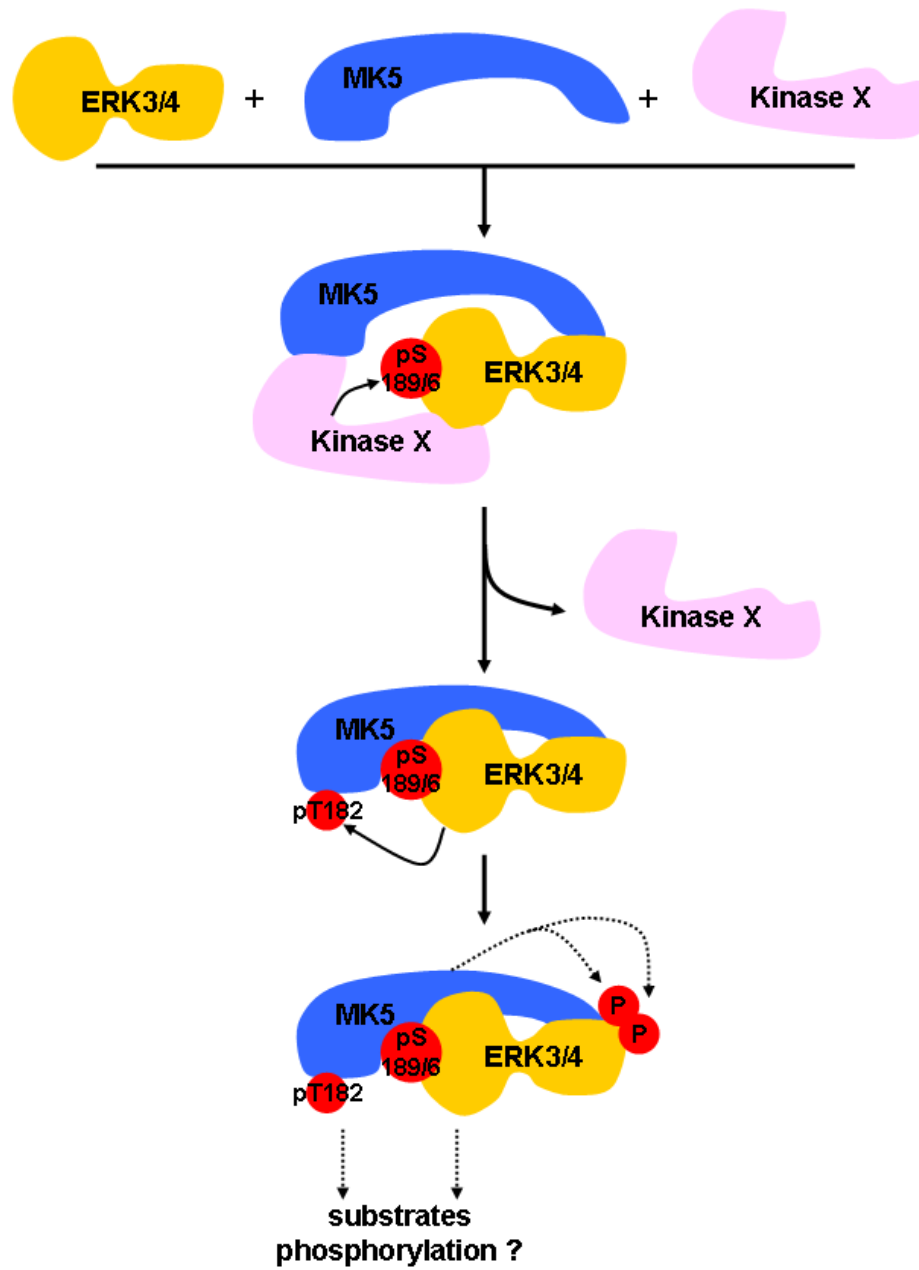
**Figure 7. Activation loop phosphorylation allows the formation of active ERK3/ERK4-MK5 complexes *in vivo*.** **A:** HEK 293 cells were transfected with the indicated Myc<sub>6</sub>-tagged ERK3 and Flag-tagged MK5 constructs. After 24 h, the cells were treated with 10 μM MG132 for 12 h, and ERK3 was immunoprecipitated with anti-Myc antibody. Enzymatic activity was measured by incubation of ERK3 with Hsp27 in the presence of ATP[γ<sup>32</sup>P]. The reaction products were analyzed by autoradiography (upper panel) and immunoblotting of the indicated proteins. Hsp27 was normalized by Ponceau staining of the membrane. **B:** Same as above, except that HEK 293 cells were transfected with the indicated HA-tagged ERK4 constructs. After 36 h, ERK4 was immunoprecipitated with anti-HA and enzymatic activity was assayed as in A.



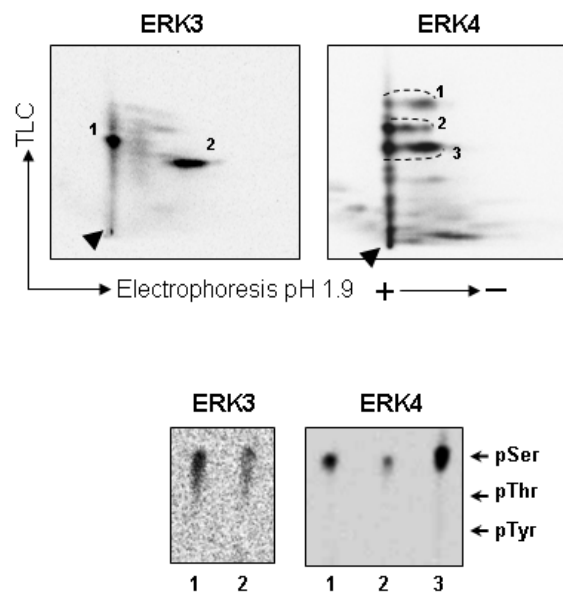
**Figure 8. The cytoplasmic redistribution of ERK3 induced by MK5 depends in part on Ser189 phosphorylation.** A and B: Rat1 cells were transfected with the indicated Myc<sub>6</sub>-tagged ERK3 and Flag-tagged MK5 constructs. After 48 h, the cells were fixed and the subcellular localization of ERK3 and MK5 was visualized by fluorescence microscopy after double staining with anti-Myc and anti-Flag antibodies. For each condition, at least 100 cells co-expressing ERK3 and MK5 were scored as follow: cells showing predominant cytoplasmic (C), uniform nuclear and cytoplasmic (N/C) or predominant nuclear (N) staining. Bar graphs represent the mean  $\pm$  SEM of three independent experiments. C: Representative examples of the different subcellular localization patterns of ERK3.



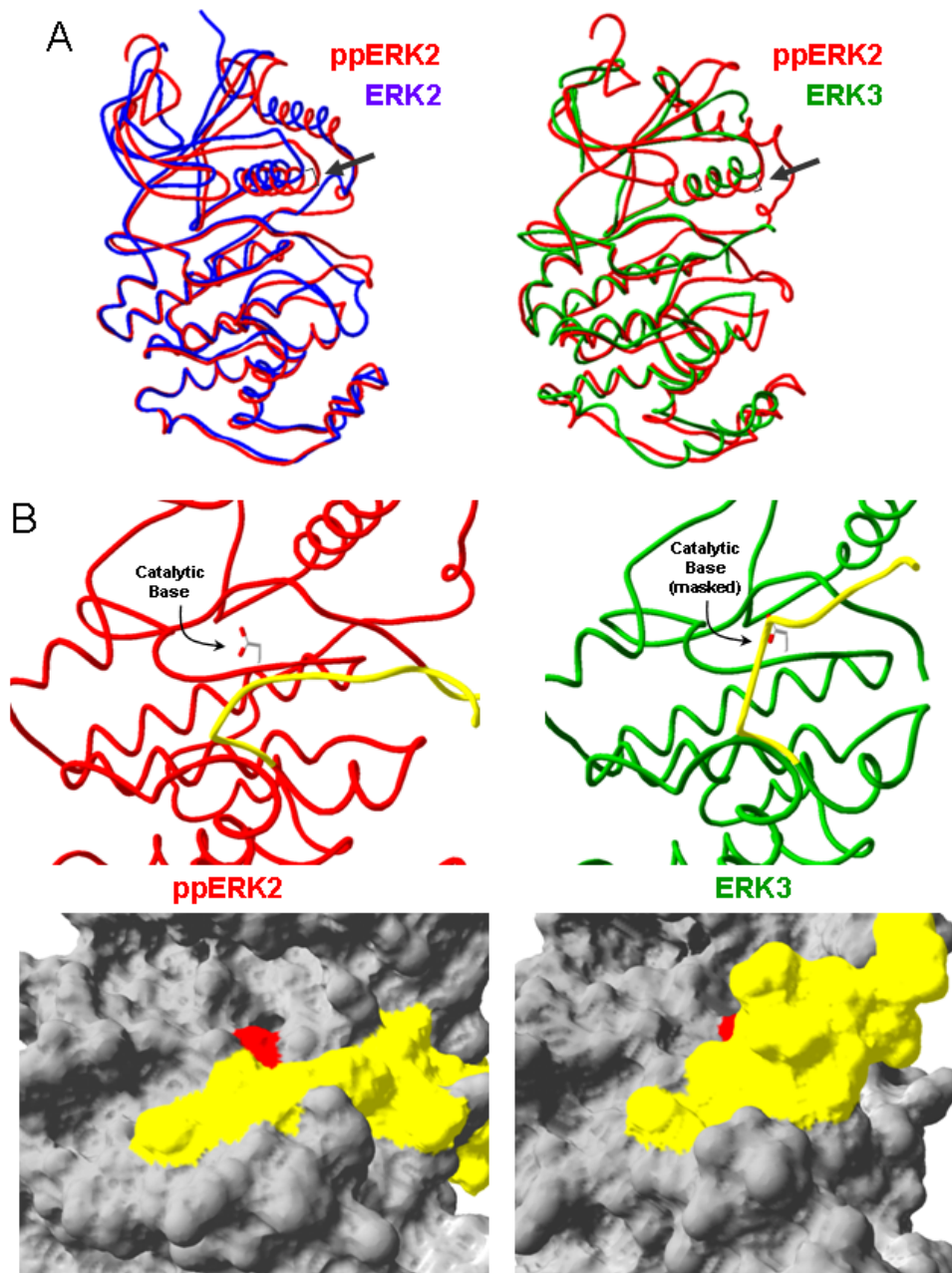
**Figure 9. Ser186 phosphorylation of ERK4 is required for efficient cytoplasmic relocation of MK5.** **A** and **B**: Rat1 cells were transfected with the indicated HA-tagged ERK3 and Flag-tagged MK5 constructs. After 48 h, the cells were fixed and the subcellular localization of ERK4 and MK5 was visualized by fluorescence microscopy after double staining with anti-HA and anti-Flag antibodies. The data were analyzed and expressed as in Fig. 6. Bar graphs represent the mean  $\pm$  SEM of three independent experiments. **C**: Representative examples of the different subcellular localization patterns of MK5.



**Figure 10. Model of the activation of ERK3/ERK4-MK5 complexes.** See text for details.



SUPPLEMENTARY FIGURE 1. **ERK3 and ERK4 are phosphorylated mainly on serine residues *in vivo*.** Numbered spots from phosphopeptide maps of  $^{32}\text{P}$ -labeled Myc<sub>6</sub>-ERK3 and HA-ERK4 were processed for phosphoamino acid analysis. The migration of unlabeled phosphoamino acids is indicated.



**SUPPLEMENTARY FIGURE 2. Unphosphorylated ERK3 is not in a catalytically active conformation.** **A**, The structures of unphosphorylated ERK2 (1ERK) and ERK3 (2I6L) were superposed on dually-phosphorylated ERK2 (2ERK) using the C-terminal lobe as reference. Note that unphosphorylated kinases are in an open configuration (see arrow). **B**, The activation loop of ERK3 partially masks its catalytic site. Dually-phosphorylated ERK2 (left panels) and unphosphorylated ERK3 (right panels) are shown in ribbon (upper panels) and molecular surface (lower panels) representation. The catalytic base, revealing the position of the active site, is highlighted in red on the surface. The activation loop segment is colored yellow.

## **Annexe II**

### **Activation loop phosphorylation of the atypical MAP kinases ERK3/ERK4 by group I PAKs defines a novel PAK-ERK3/4-MK5 signaling pathway**

Paul Déléris, Matthias Trost, Ivan Topisirovic, Pierre-Luc Tanguay, Katherine L.B. Borden, Pierre Thibault, and Sylvain Meloche

*Journal of Biological Chemistry*, **286(8)**: 6470–6478, (2011)

## **Activation Loop Phosphorylation of ERK3/ERK4 by Group I PAKs Defines a Novel PAK-ERK3/4-MK5 Signaling Pathway**

**Paul Déléris<sup>‡</sup>, Matthias Trost<sup>‡</sup>, Ivan Topisirovic<sup>‡,1</sup>, Pierre-Luc Tanguay<sup>‡,§</sup>, Katherine  
L.B. Borden<sup>‡,¶</sup>, Pierre Thibault<sup>‡,||</sup>, and Sylvain Meloche<sup>‡,§,\*\*,2</sup>**

<sup>‡</sup>Institut de Recherche en Immunologie et Cancérologie and Departments of <sup>§</sup>Molecular  
Biology, <sup>¶</sup>Pathology and Cell Biology, <sup>||</sup>Chemistry and <sup>\*\*</sup>Pharmacology, Université de  
Montréal, Montreal, Quebec H3C 3J7, Canada

Running title: PAKs are activation loop kinases for ERK3/ERK4

<sup>1</sup>Present address: Department of Biochemistry, McGill University, Montreal, Quebec H3A  
1A3, Canada.



## ABSTRACT

Classical mitogen-activated protein (MAP) kinases are activated by dual phosphorylation of the Thr-Xxx-Tyr motif in their activation loop, which is catalyzed by members of the MAP kinase kinase family. The atypical MAP kinases extracellular signal-regulated kinase 3 (ERK3) and ERK4 contain a single phospho-acceptor site in this segment and are not substrates of MAP kinase kinases. Previous studies have shown that ERK3 and ERK4 are phosphorylated on activation loop residue Ser189/Ser186, resulting in their catalytic activation. However, the identity of the protein kinase mediating this regulatory event has remained elusive. We have used an unbiased biochemical purification approach to isolate the kinase activity responsible for ERK3 Ser189 phosphorylation. Here, we report the identification of group I p21-activated kinases (PAKs) as ERK3/ERK4 activation loop kinases. We show that group I PAKs phosphorylate ERK3 and ERK4 on Ser189 and Ser186, respectively, both *in vitro* and *in vivo*, and that expression of activated Rac1 augment this response. Reciprocally, silencing of PAK1/2/3 expression by RNA interference (RNAi) completely abolishes Rac1-induced Ser189 phosphorylation of ERK3. Importantly, we demonstrate that PAK-mediated phosphorylation of ERK3/ERK4 results in their enzymatic activation and in downstream activation of MAP kinase-activated protein kinase 5 (MK5) *in vivo*. Our results reveal that group I PAKs act as upstream activators of ERK3 and ERK4 and unravel a novel PAK-ERK3/ERK4-MK5 signaling pathway.

## INTRODUCTION

ERK3 and ERK4 define a distinct subfamily of atypical MAP kinases that display structural and functional differences with conventional MAP kinases (1). First, they possess a single phospho-acceptor site (Ser-Glu-Gly) in their activation loop instead of the classical dual phosphorylation Thr-Xxx-Tyr motif (2,3). Accordingly, they are not phosphorylated and activated by dual-specificity MAP kinase kinase family members (4,5). Second, ERK3 and ERK4 bear the sequence Ser-Pro-Arg instead of Ala-Pro-Glu in subdomain VIII of the kinase domain, being the only kinases in the human kinome to have an arginine at this position. Third, contrary to conventional MAP kinases like ERK1/ERK2, which are multifunctional Ser/Thr kinases capable of phosphorylating a vast array of substrates, ERK3 and ERK4 appear to have a very narrow substrate specificity (6). Their only known physiological substrate is the protein kinase MK5 (7-10).

The regulation of ERK3 and ERK4 activity remains poorly understood. We and others have shown that the serine residue within the activation loop of ERK3/ERK4 (Ser189/Ser186) is phosphorylated *in vivo* (6,11-13). Catalytically inactive forms of the kinases are similarly phosphorylated on this motif, indicating that activation loop phosphorylation is mediated by an upstream cellular kinase (12,13). Phosphorylation of Ser189/Ser186 leads to enzymatic activation of ERK3/ERK4, and is required for binding to and for cytoplasmic relocation of the substrate MK5 (12,13). Recently, we have shown that phosphorylation of ERK3 in the C-terminal extension by CDK1 stabilizes the protein and leads to its accumulation in mitosis (14).

The lack of information on the stimuli and upstream regulatory events that control the activity of ERK3 and ERK4 has hampered the comprehensive study of these atypical MAP kinase signaling pathways. To get new insights into the regulation of ERK3/ERK4 activity, we have used a classical biochemical purification approach to isolate the kinase(s) responsible for ERK3 Ser189 phosphorylation. Here, we identify group I PAKs as ERK3 and ERK4 activation loop kinases. We demonstrate that PAKs phosphorylate ERK3 and ERK4 *in vitro* and *in vivo*, leading to their catalytic activation and to downstream MK5 phosphorylation and activation.

## EXPERIMENTAL PROCEDURES

### Reagents and Antibodies

Antibodies to PAK1, PAK2 and PAK3 were from Cell Signaling Technology; anti-GAPDH was from Santa Cruz Biotechnology; HRP-conjugated goat anti-mouse and anti-rabbit IgG were from Bio-Rad; polyclonal anti-Flag was from Sigma. Monoclonal anti-Myc antibody was prepared from 9E10 hybridoma producing cells. Monoclonal rabbit-anti-ERK3 antibody was from Epitomics. Polyclonal anti-phospho-ERK3(Ser189) antibody has been described (11). This antibody also recognizes phosphorylated Ser186 in ERK4. SMARTpool siRNAs targeted to PAK1 (L-003597-00), PAK2 (L-003521-00) and PAK3 (L-003614-00) were from Dharmacon.

### Plasmid Constructs

pcDNA3-Myc<sub>6</sub>-ERK3 wild type (WT), kinase-dead (KA, K49A/K50A) and Ser189Ala (SA), pcDNA3-HA-ERK4, pcDNA3-Flag-ERK4 and pcDNA3-Flag-MK5 have been described (11,12,15). His<sub>6</sub>-ERK3 WT and SA recombinant proteins were generated as in (16) except that the stop codon was conserved to avoid fusion with the C-terminal GST tag of pHGST.1. His<sub>6</sub>-ERK3(1-365)KA-GST and His<sub>6</sub>-ERK3(1-365) (WT, KA and SA) recombinant proteins were generated by PCR subcloning of the sequence corresponding to the first 365 residues of ERK3 (with or without a stop codon) in frame into the EcoR1 site of pHGST.1 (16). pHGST-ERK3(365-721) plasmid encoding the C-terminal extension of ERK3 has been described (16). PAK1 cDNA (17) was obtained from J. Chernoff (Fox Chase Cancer Center) and subcloned into EcoR1/Xba1 sites of pcDNA3-Flag (12). Mouse PAK2 cDNA was purchased from Origene and was subcloned into EcoR1/Xba1 sites of pcDNA3-Flag. The PAK2KD (K279R/T402A) mutant was generated by mutagenesis using the QuickChange system (Stratagene). Mouse HA-PAK3 was obtained from E. Van Obberghen-Schilling (Université de Nice) and was subcloned into the Xba1 site of pcDNA3-Flag. For recombinant protein production, PAK2 WT and KD were subcloned into EcoR1/Not1 sites of pHGST.2T (16). pRK5-Myc vectors encoding activated Rac1L61 (CA) and inactive Rac1N17 (DN) were provided by N. Lamarche

(McGill University). The pGEX-hu27 prokaryotic vector coding for GST-Hsp27 protein was a gift from J. Landry (Laval University). All mutations and PCR products were verified by DNA sequencing. Sequence of primers used for PCR and details about cloning strategies are available upon request.

### **Recombinant Protein Purification**

Recombinant Hsp27 and His<sub>6</sub>-MK5 were produced as described (12). Other recombinant proteins were expressed in BL21 pLys(DE3) strain and purified as described (16). Protein purity and yield were evaluated by SDS-gel electrophoresis and Coomassie staining using bovine serum albumin as standard.

### **Cell culture and Transfections**

HEK 293 cells were cultured in minimal essential medium supplemented with 10% fetal bovine serum plus antibiotics. Cells were transiently transfected by the calcium phosphate precipitation method.

### **Purification of ERK3 Ser189 Kinase**

Exponentially proliferating HEK 293 cells were lysed with a Dounce homogenizer in hypotonic buffer B (50 mM  $\beta$ -glycerophosphate (pH 7.3), 1.5 mM EGTA, 1 mM EDTA, 1 mM dithiothreitol (DTT), 100  $\mu$ M sodium orthovanadate; 1  $\mu$ M pepstatin A, 1  $\mu$ M leupeptin, 100  $\mu$ M PMSF). The lysate was clarified by centrifugation and 50 mg of protein was fractionated on a Mono Q 10/100 GL column (GE Healthcare) using an AKTA Explorer FPLC system (GE Healthcare). Fractions were collected and assayed for ERK3 Ser189 kinase activity as described below. Fractions 43 to 53 were pooled and further fractionated on a gel filtration Superdex 16/60 200 column (GE Healthcare). Superdex fraction 36 containing high Ser189 kinase activity was then incubated with 1  $\mu$ g of His<sub>6</sub>-ERK3(1-365)KA-GST recombinant protein bound on glutathione-agarose beads for 2 h at 4°C. The beads were washed 4 times with buffer B and bound proteins were further separated by SDS-gel electrophoresis. The gel was stained with Coomassie blue and 7 bands were

excised, reduced with DTT, and alkylated with iodoacetamide prior to trypsin digestion. Peptides were extracted three times with 90% acetonitrile (ACN)/0.5 M urea. Combined extracts were dried and resuspended in 5% ACN, 0.1% trifluoroacetic acid (TFA). Tryptic peptides were analyzed by nanoLC-MS/MS using an Eksigent nano2D system coupled to a LTQ-Orbitrap XL mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific). Peptides were separated on a 150- $\mu\text{m}$  x 10-cm C<sub>18</sub> analytical column using a gradient of 5-40% acetonitrile (in 0.2% formic acid) over 65 min. The mass spectrometer was operated in a data-dependent acquisition mode with a 1 sec survey scan at 60,000 resolution, followed by three ion trap product ion spectra (MS/MS) of the most abundant precursors. The centroided data was merged into single peak-list files and searched with the Mascot search engine v2.10 (Matrix Science) against the combined forward and reverse human IPI protein database v3.24 containing 133,842 protein sequences.

### **Immunoblotting, Immunoprecipitation and Kinase Assays**

Cell lysis, immunoprecipitation and immunoblot analysis were performed as described (11,18,19). For immunoprecipitation experiments, 750  $\mu\text{g}$  of lysate proteins were incubated with the indicated antibodies for 2-4 h at 4°C. To detect endogenous ERK3 Ser189 phosphorylation, monoclonal anti-ERK3 antibody was precoupled with protein A/agarose beads for 2 h at 4°C and washed three times in lysis buffer. HEK293 cells, transfected 36 h with the indicated constructs or SiRNAs, were lysed 36 h post transfection. To immunoprecipitate endogenous ERK3, beads were incubated 2-4 h at 4°C with 5mg of cell lysate. Immunoprecipitated proteins were analyzed by SDS-PAGE and western blots with the indicated antibodies.

For *in vitro* kinase assay of Ser189 phosphorylation, cell lysate (50  $\mu\text{g}$  protein) or recombinant PAK2 (1  $\mu\text{g}$ ) was incubated with 1  $\mu\text{g}$  of the indicated purified recombinant ERK3(1-365) protein in 50  $\mu\text{l}$  of Buffer A (50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1.5 mM KCl, 25 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT, 200  $\mu\text{M}$  ATP) at 37°C for 45 min. The reaction was stopped with Laemmli buffer and Ser189 phosphorylation was analyzed by immunoblotting with a phospho-ERK3(S189) specific antibody. For analysis of

FPLC fractions, 8% of each fraction was assayed in a final volume of 100  $\mu$ l of buffer A. For radioactive assays, 10  $\mu$ Ci  $\gamma^{32}$ P-ATP was added to buffer A and the reaction was analyzed by autoradiography with a FLA5000 phosphorimager (Fuji).

For *in vivo* assay of ERK3/ERK4 activity, immunoprecipitated proteins were incubated with 0.5  $\mu$ g of recombinant His<sub>6</sub>-MK5 and Hsp27 in kinase assay buffer (25 mM Hepes (pH 7.5), 25 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT) with 50  $\mu$ M ATP and 20  $\mu$ Ci  $\gamma^{32}$ P-ATP. Proteins were separated by SDS-gel electrophoresis, transferred to nitrocellulose membrane and analyzed by autoradiography. Expression of transfected proteins was analyzed by immunoblotting. The same conditions were used to monitor MK5 activity, except that Flag-MK5 protein was immunoprecipitated from cells and no recombinant MK5 was added to the assay.

### **Mass Spectrometry Analysis of MK5 Phosphorylation**

For the *in vivo* quantitative analysis of MK5 Thr182 phosphorylation, Flag-MK5 was immunoprecipitated from HEK 293 cell lysates using anti-Flag M2 agarose beads (Sigma). After elution in 0.1 M glycine (pH 3.5), proteins were dialyzed in 8 M urea, 50 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>, 0.5 mM TCEP using 10 kDa cut-off microcon devices (Millipore) as published (20). Prior to digestion, the urea concentration was diluted to 1.5 M in 50 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>, 0.5 mM TCEP. Proteins were digested with sequence-grade trypsin (Promega) for 3 h and the eluted peptides dried in a SpeedVac. Peptides were analyzed on an Orbitrap mass spectrometer using similar settings as above. Peptide intensities were extracted from raw data, clustered with Mascot results and validated using the in-house software ProteoProfile. Specifically, for the quantification of MK5 Thr182 phosphopeptides we detected four isoforms by MS/MS with peptide MOWSE scores of 57-114 (doubly- and triply-charged IDQGDLM(Ox)PQFTPYYVAPQVLEAQR (m/z 1480.705 respectively m/z 987.4684); triply-charged form of the methionine-oxidized IDQGDLM(Ox)PQFTPYYVAPQVLEAQR (m/z 992.8018) and the low-abundant, triply-charged missed cleavage form IDQGDLM(Ox)PQFTPYYVAPQVLEAQR (m/z 1044.84)). We extracted ion intensities of the four detected peptide isoforms

containing the Thr182 site from three independent replicates. The average intensities of each peptide isoform and the corresponding standard deviations were calculated. The summed peptide intensity of the MK5 control experiment (without ERK4) was set to 1 and the relative increase in MK5 phosphorylation was calculated from the ratio of peptide intensities over that of control condition.

## RESULTS

### Purification of ERK3 Activation Loop Kinase.

To purify the ERK3 activation loop kinase(s), we developed a robust *in vitro* assay to monitor Ser189 kinase activity using recombinant catalytically inactive His<sub>6</sub>-ERK3KA(1-365) protein (produced in *E. coli*) as substrate and a phospho-ERK3(S189) specific antibody for detection. This assay readily detects the phosphorylation of wild type and kinase-dead ERK3, but not that of the S189A mutant from a HEK 293 cell lysate (Fig. 1A). The strategy used for the purification of ERK3 Ser189 kinase activity is summarized in Fig. 1B. Extracts of proliferating HEK 293 cells were sequentially fractionated on anion exchange and gel filtration columns (Fig. 1, C and D). Then, fraction GF1 of the Superdex column was incubated with recombinant His<sub>6</sub>-ERK3(1-365)KA-GST immobilized on glutathione-agarose beads. After washing, bound proteins were further separated by SDS-gel electrophoresis (Fig. 1E). The gel was stained with Coomassie and cut into 7 bands that were subjected to in-gel digestion with trypsin and analyzed by LC-mass spectrometry (MS)/MS. Among 142 proteins detected in the samples, two protein kinases were identified with a high Mascot score: PAK2 and PAK1 (Fig. 1F and Table S1). Three peptides shared by PAK1 and PAK3 were also identified from this analysis.

*Group I PAKs Phosphorylate ERK3 and ERK4 on Ser189/Ser186.* We first tested the ability of PAK2 to phosphorylate ERK3 on Ser189 *in vitro* using purified recombinant PAK2 and full length His<sub>6</sub>-ERK3KA protein as substrate. PAK2 wild type but not the catalytically inactive K279R/T402A (PAK2KD) mutant efficiently phosphorylated ERK3KA but not ERK3S189A (Fig. 2A). Neither the S189A mutant of ERK3(1-365) nor the C-terminal extension of the kinase (residues 365-721) were phosphorylated by PAK2 *in vitro* (Fig. 2B), indicating that Ser189 is the main PAK2

phosphorylation site. The *in vitro* phosphorylation of Ser189 by PAK2 was further confirmed using the anti-phospho-ERK3(S189) antibody for detection (Fig. 2C). Notably, PAK2 also phosphorylated the paralogous protein ERK4 on the activation loop residue Ser186 (Fig. 2D).

To determine if PAK2 phosphorylates ERK3 *in vivo*, we co-transfected HEK 293 cells with ERK3, PAK2 and an activated form of Rac1 (Rac1CA). Co-transfection of PAK2 increased the phosphorylation of ERK3 on Ser189 (Fig. 2E, lane 3). The phosphorylation signal was further increased when activated Rac1 was transfected at the same time (Fig. 2E, lane 4). It should be noted that co-transfection of ERK3 with Rac1CA is sufficient to increase the Ser189 phosphorylation signal when compared to ERK3 alone (Fig. 2E, lane 5 and 2G). This is likely due to the activation of endogenous PAK by Rac1. Similar results were obtained with the other group I PAK activator Cdc42 (Fig. 2G).

MS analysis identified both PAK2 and PAK1, and possibly PAK3, as candidate ERK3 Ser189 kinases (Fig. 1F). We therefore wished to determine if PAK1 and PAK3 are also able to phosphorylate ERK3 on Ser189 in intact cells. Both PAK2 and PAK3 markedly increased the activation loop phosphorylation of ERK3, whereas PAK1 had a weaker albeit measurable effect (Fig. 2F). We conclude from these results that group I PAKs display ERK3/ERK4 activation loop kinase activity.

### **Silencing of Group I PAKs Inhibits Rac1-Induced ERK3 Ser189 Phosphorylation**

To directly address the contribution of endogenous group I PAKs to the activation loop phosphorylation of ERK3, we silenced the expression of PAK1, PAK2 and PAK3 by RNAi using SMARTpool siRNAs targeting each individual kinase. Silencing of a single PAK isoform partially reduced Rac1-stimulated ERK3 Ser189 phosphorylation, with PAK2 and PAK3 siRNAs showing greater effects (Fig. 3, A and B). Importantly, a combination of siRNAs to all three group I PAKs completely abolished the effect of Rac1 on both ectopic and endogenous ERK3 phosphorylation (Fig. 3 and 4). These results confirm that group I PAKs are *bona fide* activation loop



kinases for ERK3 and mediate the stimulatory effect of the small GTPases Rac1/Cdc42 on ERK3 phosphorylation.

### **Group I PAKs Stimulate the Enzymatic Activity of ERK3 and ERK4**

We wanted to verify whether PAK-induced phosphorylation of ERK3 or ERK4 leads to their enzymatic activation. HEK 293 cells were co-transfected with ERK3/ERK4 and Rac1CA, in the absence or presence of PAK2 or a mixture of siRNAs targeting PAK1/PAK2/PAK3. Ectopically expressed ERK3 or ERK4 was immunoprecipitated and its phosphotransferase activity was measured in a coupled kinase assay using recombinant His<sub>6</sub>-MK5 and its substrate Hsp27 in the presence of  $\gamma^{32}$ P-ATP. Expression of activated Rac1 clearly induced the catalytic activation of ERK3 and ERK4 as demonstrated by the increased phosphorylation of Hsp27 (Fig. 5, A and B, lane 3). This activation was significantly attenuated in cells transfected with siRNAs to group I PAKs. These data indicate that PAK-mediated phosphorylation of ERK3 and ERK4 leads to their catalytic activation *in vivo*.

### **Activation of ERK3/ERK4 by PAK3 Results in Downstream Activation of MK5 *in vivo***

We next wished to determine if the activation of ERK3/ERK4 by Rac1-PAK signaling translates into enzymatic activation of the downstream substrate MK5 *in vivo*. Since all the anti-phospho-MK5(T182) antibodies tested were found unsatisfactory, we analyzed the extent of MK5 Thr182 (activation loop) phosphorylation by quantitative MS. HEK 293 cells were transfected with Flag-MK5 in the absence or presence of ERK4, activated Rac1 and PAK3. MK5 was immunoprecipitated with anti-Flag M2 beads, eluted, digested with trypsin, and subjected to quantitative LC-MS/MS analysis. Activating Thr182 phosphorylation of MK5 was increased by 26-fold following ERK4 overexpression and by 46-fold when ERK4 was co-expressed with activated Rac1 and PAK3 (Fig. 6A and Fig. S2). A comparison of the intensity of non-phosphorylated and phosphorylated peptide species around MK5 Thr182 indicated that MK5 is phosphorylated at high stoichiometry upon activation of the Rac1-PAK-ERK3/4 pathway.

To confirm that increased Thr182 phosphorylation results in MK5 catalytic activation *in vivo*, the phosphotransferase activity of MK5 was measured by immune-complex kinase assay using recombinant Hsp27 as substrate. Expression of ERK3 or ERK4 augmented MK5 activity, and this activation was further potentiated by co-expression of Rac1CA and PAK3 (Figs. 6, *B* and *C*). These results confirm that activation of the Rac1-PAK-ERK3/4 signaling pathway leads to downstream activation of MK5 in cells.

## DISCUSSION

A full understanding of the physiological functions of the atypical MAP kinases ERK3 and ERK4 will be greatly facilitated by the characterization of the upstream regulatory signals and pathways that control their activity. ERK3 and ERK4 are not components of classical MAP kinase modules and their activator(s) has remained elusive so far. Of note, Cobb and colleagues have previously reported the partial characterization of a protein kinase immunologically distinct from MEK1 and MEK2 that phosphorylates ERK3 on Ser189 (6). Here, we report the successful purification and identification of group I PAKs as ERK3 activation loop kinases. The PAK family is composed of six members divided in two subgroups of three members each based on their mechanism of regulation (21). All six members share a similar architecture with an N-terminal regulatory domain containing the Rac1/Cdc42 binding site and a C-terminal kinase domain. Group I PAKs include PAK1, PAK2 and PAK3, which are enzymatically activated by binding of Rac1 and Cdc42. PAKs belong to the STE (homologs of yeast Ste7, Ste11, Ste20 kinases) group of protein kinases, which also includes MAP kinase kinases.

We have used a three-step chromatographic procedure including an affinity step on ERK3(1-365)KA-agarose beads to isolate the ERK3 Ser189 kinase. The affinity step was inspired by the observation that a candidate ERK3 Ser189 kinase binds tightly to the catalytic domain of ERK3 (6). ERK3 binding proteins were further separated by SDS-gel electrophoresis and analyzed by LC-MS/MS, leading to the identification of PAK1 (and possibly PAK3) and PAK2. Overexpression and loss-of-function experiments confirmed that PAK1, PAK2 and PAK3 efficiently

phosphorylate ectopic and endogenous ERK3 on Ser189, and that the three protein kinases are responsible for all the Ser189 kinase activity induced by activated Rac1 in cells. We conclude from these results that group I PAKs are *bona fide* ERK3 activation loop kinases. However, we cannot exclude the possibility that other kinases can phosphorylate ERK3 on Ser189 under different cellular conditions.

All ERK3 activation loop (from Leu174 to Trp216) amino acids but three are conserved in human ERK4 sequence. These residues are also highly conserved from zebrafish to Human (12). In agreement with this observation, we found that group I PAKs similarly phosphorylate ERK4 on activation loop residue Ser186, indicating a common mechanism of activation of ERK3 and ERK4 MAP kinases.

Rennefahrt *et al.* have used a degenerate peptide library to analyze the optimal phosphorylation sequence of group I and II PAKs (22). According to this work, the ERK3/ERK4 activation loop contains several favorable residues for PAK1 and PAK2 phosphorylation (Fig. 7). Notably, these kinases clearly favor serine residues over threonine as substrates (22). It is noteworthy that the ERK3/ERK4 sequence appears to fit more closely the PAK2 consensus motif than PAK1, consistent with our observation that PAK2 is apparently a better activation loop kinase than PAK1.

Importantly, we have demonstrated that PAK-mediated phosphorylation of ERK3/ERK4 leads to their enzymatic activation and to downstream activation of MK5 *in vivo*. Group I PAKs have been implicated in many cellular processes including transcription, apoptosis, cell proliferation, and cell motility (23-26). Specifically, multiple studies have documented the important role of PAKs in the regulation of actin dynamics and cytoskeletal remodeling (27,28). In the past years, MK5 has also emerged as a regulator of F-actin polymerization and cell migration (29-31). In this study, we uncover a hitherto unrecognized link between Rac/Cdc42-PAK signaling and ERK3/4-MK5 activation, potentially explaining in part the common effect of group I PAKs and MK5 on the actin cytoskeleton. Future studies will investigate how this new signaling branch of PAK signaling contributes to physiological responses such as cell motility, apoptosis and senescence that can eventually impact on cancer progression.

## REFERENCES

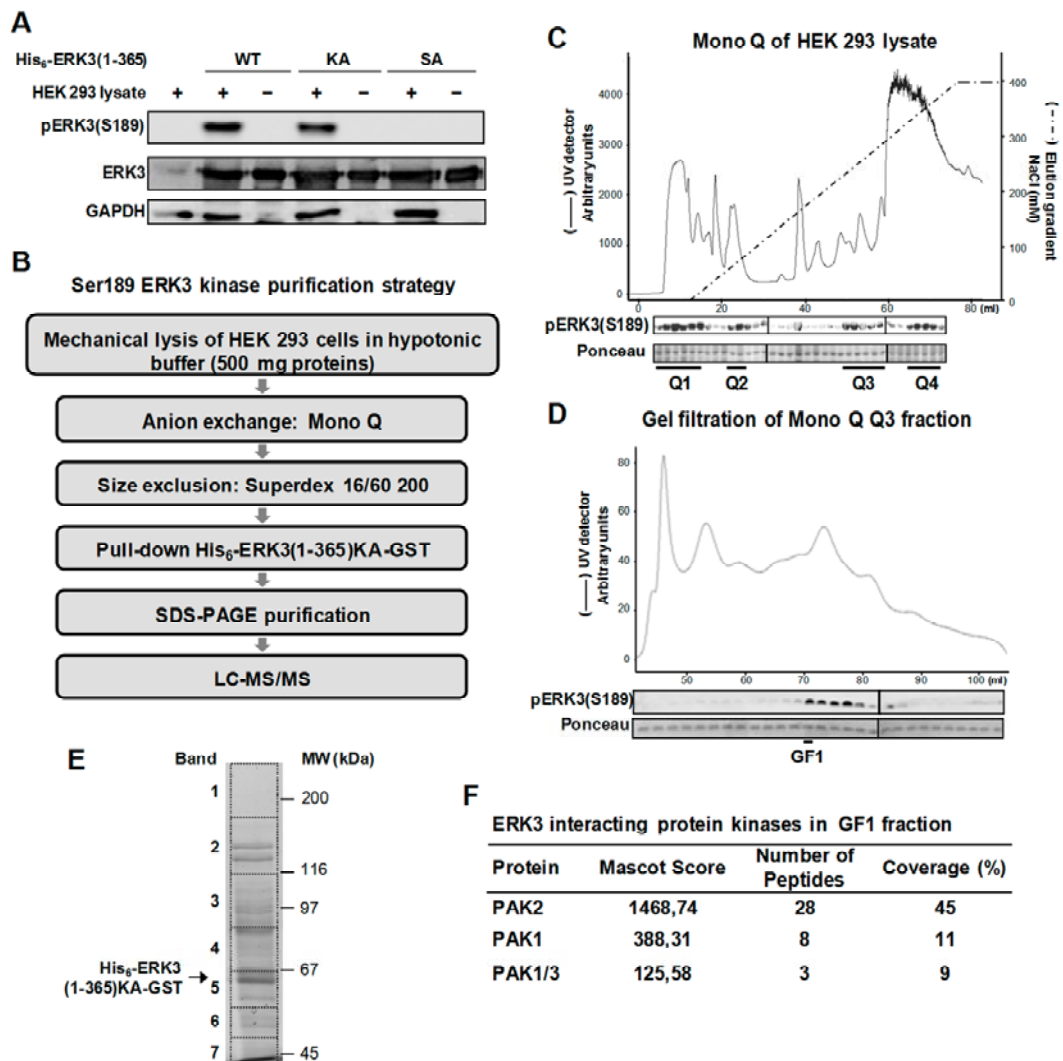
1. Coulombe, P., and Meloche, S. (2007) *Biochim Biophys Acta* **1773**, 1376-1387
2. Boulton, T. G., Nye, S. H., Robbins, D. J., Ip, N. Y., Radziejewska, E., Morgenbesser, S. D., DePinho, R. A., Panayotatos, N., Cobb, M. H., and Yancopoulos, G. D. (1991) *Cell* **65**, 663-675
3. Gonzalez, F. A., Raden, D. L., Rigby, M. R., and Davis, R. J. (1992) *FEBS Lett* **304**, 170-178
4. English, J. M., Vanderbilt, C. A., Xu, S., Marcus, S., and Cobb, M. H. (1995) *J Biol Chem* **270**, 28897-28902
5. Robinson, M. J., Cheng, M., Khokhlatchev, A., Ebert, D., Ahn, N., Guan, K. L., Stein, B., Goldsmith, E., and Cobb, M. H. (1996) *J Biol Chem* **271**, 29734-29739
6. Cheng, M., Zhen, E., Robinson, M. J., Ebert, D., Goldsmith, E., and Cobb, M. H. (1996) *J Biol Chem* **271**, 12057-12062
7. Aberg, E., Perander, M., Johansen, B., Julien, C., Meloche, S., Keyse, S. M., and Seternes, O. M. (2006) *J Biol Chem* **281**, 35499-35510
8. Kant, S., Schumacher, S., Singh, M. K., Kispert, A., Kotlyarov, A., and Gaestel, M. (2006) *J Biol Chem* **281**, 35511-35519
9. Schumacher, S., Laass, K., Kant, S., Shi, Y., Visel, A., Gruber, A. D., Kotlyarov, A., and Gaestel, M. (2004) *Embo J* **23**, 4770-4779
10. Seternes, O. M., Mikalsen, T., Johansen, B., Michaelsen, E., Armstrong, C. G., Morrice, N. A., Turgeon, B., Meloche, S., Moens, U., and Keyse, S. M. (2004) *Embo J* **23**, 4780-4791
11. Coulombe, P., Rodier, G., Pelletier, S., Pellerin, J., and Meloche, S. (2003) *Mol Cell Biol* **23**, 4542-4558
12. Deleris, P., Rousseau, J., Coulombe, P., Rodier, G., Tanguay, P. L., and Meloche, S. (2008) *J Cell Physiol* **217**, 778-788
13. Perander, M., Aberg, E., Johansen, B., Dreyer, B., Guldvik, I. J., Outzen, H., Keyse, S. M., and Seternes, O. M. (2008) *Biochem J* **411**, 613-622
14. Tanguay, P. L., Rodier, G., and Meloche, S. (2010) *Biochem J* **428**, 103-111
15. Julien, C., Coulombe, P., and Meloche, S. (2003) *J Biol Chem* **278**, 42615-42624
16. Coulombe, P., and Meloche, S. (2002) *Anal Biochem* **310**, 219-222
17. Sells, M. A., Knaus, U. G., Bagrodia, S., Ambrose, D. M., Bokoch, G. M., and Chernoff, J. (1997) *Curr Biol* **7**, 202-210
18. Rodier, G., Montagnoli, A., Di Marcotullio, L., Coulombe, P., Draetta, G. F., Pagano, M., and Meloche, S. (2001) *Embo J* **20**, 6672-6682
19. Servant, M. J., Coulombe, P., Turgeon, B., and Meloche, S. (2000) *J Cell Biol* **148**, 543-556
20. Manza, L. L., Stamer, S. L., Ham, A. J., Codreanu, S. G., and Liebler, D. C. (2005) *Proteomics* **5**, 1742-1745
21. Arias-Romero, L. E., and Chernoff, J. (2008) *Biol Cell* **100**, 97-108

22. Rennefahrt, U. E., Deacon, S. W., Parker, S. A., Devarajan, K., Beeser, A., Chernoff, J., Knapp, S., Turk, B. E., and Peterson, J. R. (2007) *J Biol Chem* **282**, 15667-15678
23. Bokoch, G. M. (1998) *Cell Death Differ* **5**, 637-645
24. Dummler, B., Ohshiro, K., Kumar, R., and Field, J. (2009) *Cancer Metastasis Rev* **28**, 51-63
25. Hofmann, C., Shepelev, M., and Chernoff, J. (2004) *J Cell Sci* **117**, 4343-4354
26. Szczepanowska, J. (2009) *Acta Biochim Pol* **56**, 225-234
27. Bokoch, G. M. (2003) *Annu Rev Biochem* **72**, 743-781
28. Molli, P. R., Li, D. Q., Murray, B. W., Rayala, S. K., and Kumar, R. (2009) *Oncogene* **28**, 2545-2555
29. Gerits, N., Mikalsen, T., Kostenko, S., Shiryaev, A., Johannessen, M., and Moens, U. (2007) *J Biol Chem* **282**, 37232-37243
30. Kostenko, S., Johannessen, M., and Moens, U. (2009) *Cell Signal* **21**, 712-718
31. Tak, H., Jang, E., Kim, S. B., Park, J., Suk, J., Yoon, Y. S., Ahn, J. K., Lee, J. H., and Joe, C. O. (2007) *Cell Signal* **19**, 2379-2387

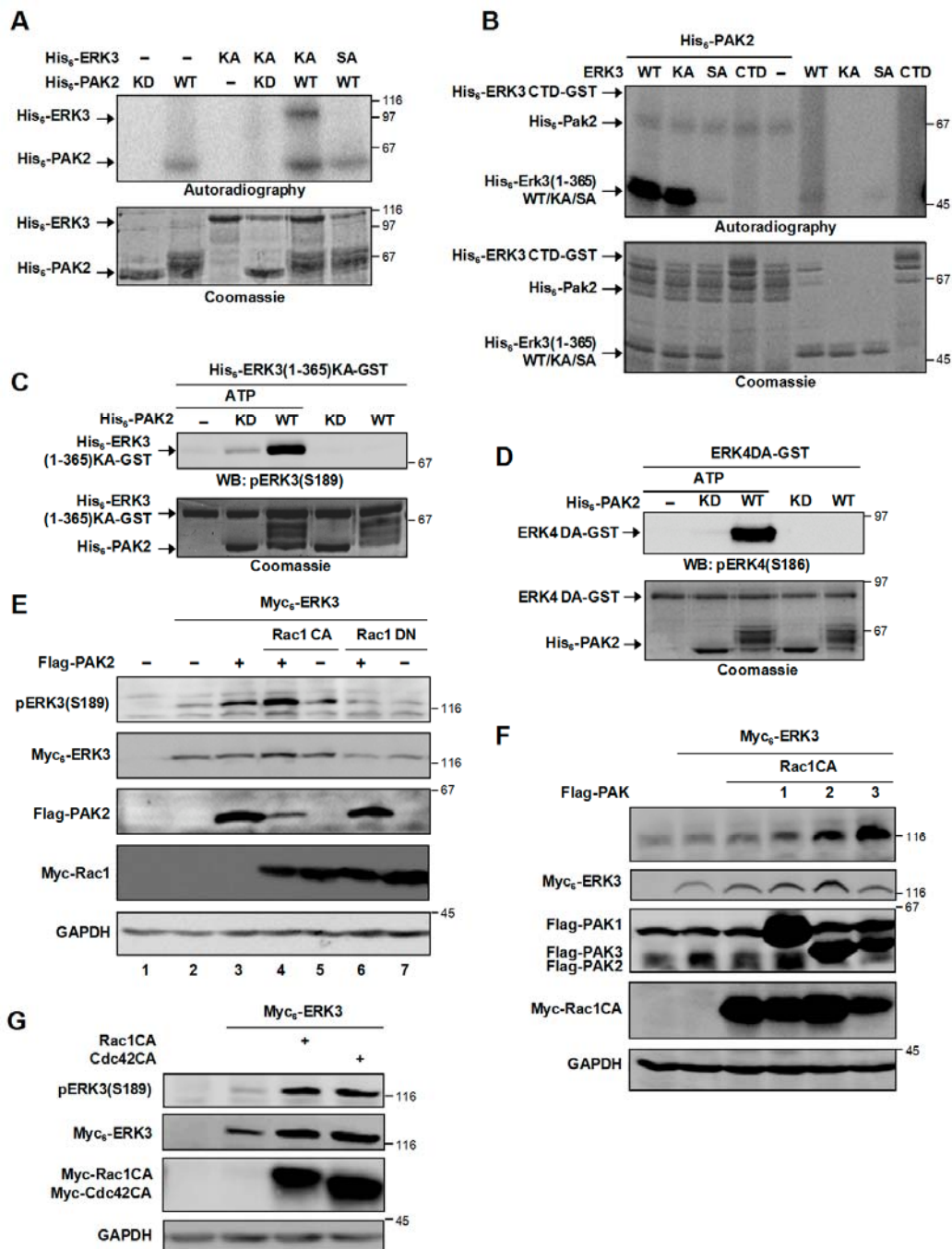
### FOOTNOTES

We thank A. Beeser, J. Chernoff, E. Van Obberghen-Schilling, N. Lamarche and J. Landry for reagents, and M. Therrien for critical reading of the manuscript. We thank the following organizations for fellowship and studentship support: FRSQ (PD), Fondation pour la Recherche Médicale (PD), Leukemia and Lymphoma Society (IT) and Canadian Institutes for Health Research (CIHR) (PLT). This work was supported by a grant from the CIHR to S. Meloche and by NIH grant 98781 to K.L.B. Borden. K.L.B Borden, P. Thibault and S. Meloche hold respectively the Canada Research Chair in Molecular Biology of the Cell Nucleus, Proteomics and Bioanalytical Spectrometry, and Cellular Signaling.

The abbreviations used are: MAP, mitogen-activated protein; ERK, extracellular signal-regulated kinase; PAK, p21-activated kinase; RNAi, RNA interference ; MK5, MAP kinase-activated protein kinase 5.



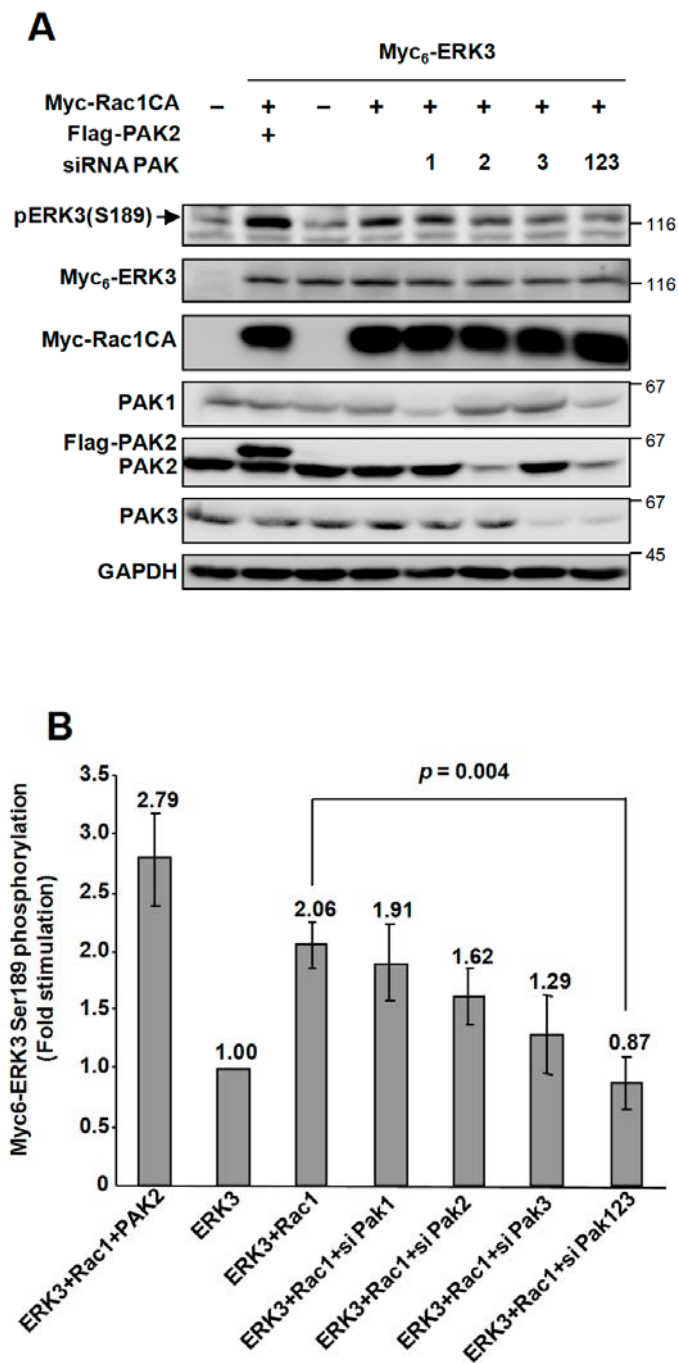
**Figure 1.** Purification of ERK3 Ser189 kinase. (A) ERK3 Ser189 kinase assay. Purified recombinant ERK3(1-365) wild type (WT), kinase-dead (KA) or non-phosphorylatable Ser189Ala (SA) mutant was incubated for 45 min at 30°C with a lysate of HEK 293 cells. Ser189 phosphorylation was analyzed by immunoblotting with anti-phospho-ERK3(S189) and indicated antibodies. (B) Strategy for the purification of ERK3 Ser189 kinase. (C) Anion exchange chromatography. HEK 293 cell lysate was fractionated on a Mono Q column. Each individual fraction was assayed for Ser189 kinase activity. (D) Fractions Q3 from the Mono Q column were fractionated by gel filtration chromatography and assayed as in C. (E and F) Fraction GF1 from the Sephadex column was incubated with His-ERK3(1-365)KA-GST protein immobilized on glutathione-agarose beads. Bound proteins were further purified by SDS-gel electrophoresis and subjected to LC-MS/MS analysis. Protein kinases with the highest Mascot scores are presented in the table.



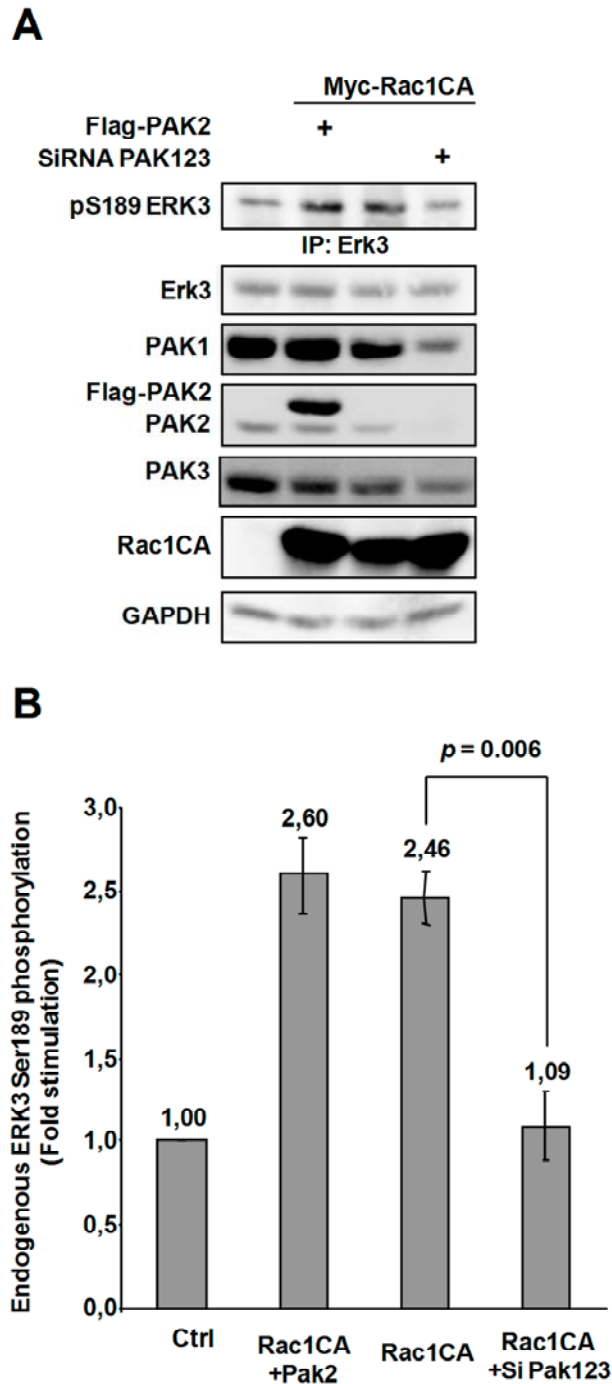
**Figure 2.** Group I PAKs phosphorylate ERK3 and ERK4 in the activation loop *in vitro* and *in vivo*. (A) Purified recombinant catalytically inactive His<sub>6</sub>-ERK3KA or His<sub>6</sub>-ERK3SA were incubated in kinase assay buffer with recombinant wild type (WT) or kinase-dead (KD) His<sub>6</sub>-PAK2 and  $\gamma^{32}$ P-ATP. The reaction products were analyzed by SDS-gel electrophoresis and autoradiography. The Coomassie stained gel is shown at the bottom. (B) Recombinant wild type His<sub>6</sub>-PAK2 was incubated with His<sub>6</sub>-ERK3(1-365) WT, KA or SA mutant, or with ERK3(365-721) C-terminal domain fused with GST (CTD) in the presence of  $\gamma^{32}$ P-ATP. The reaction products

were analyzed by SDS-gel electrophoresis and autoradiography. (C) and (D) Same as in A except that  $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP was omitted from the reaction. The phosphorylation of recombinant His<sub>6</sub>-ERK3(1-365)KA-GST and ERK4DA-GST were analyzed by immunoblotting using a phospho-ERK3(S189)/phospho-ERK4(S186) antibody. A duplicate gel was comassie stained as loading control. (E, F and G) HEK 293 cells were transfected with the indicated constructs. After 36 h, the cells were lyzed and analyzed by immunoblotting with anti-phospho-ERK3(S189) and indicated antibodies.

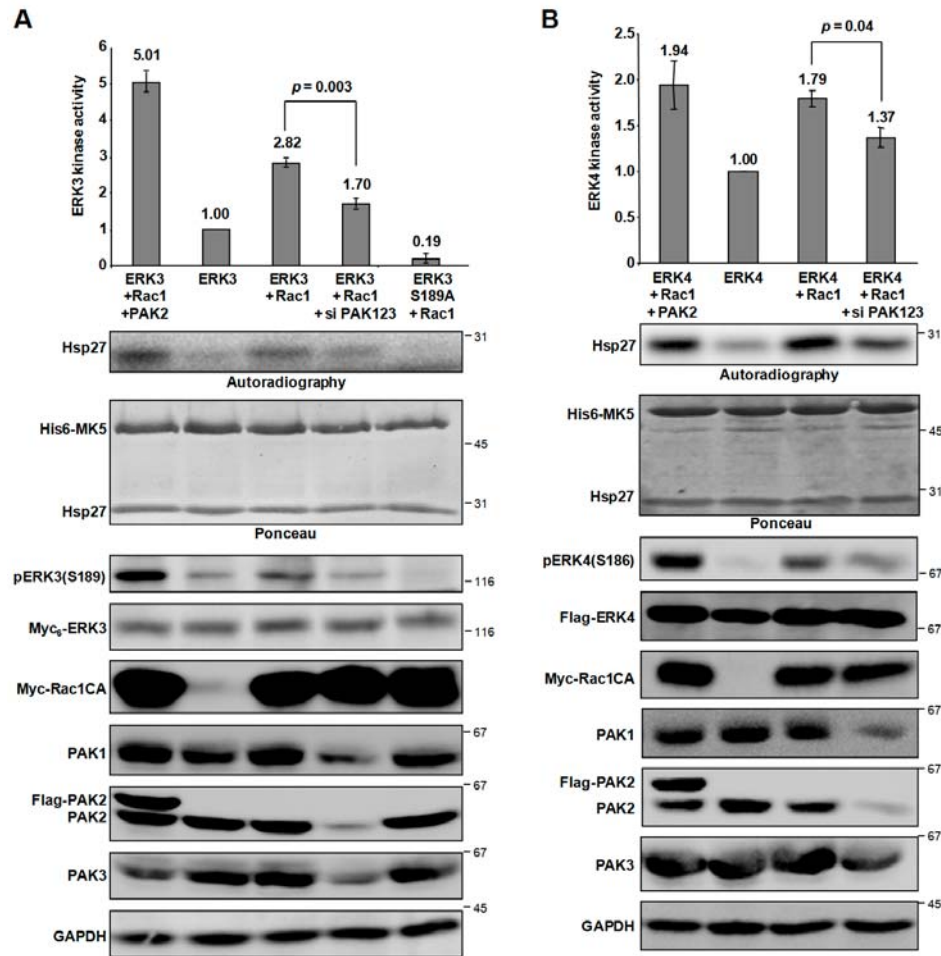




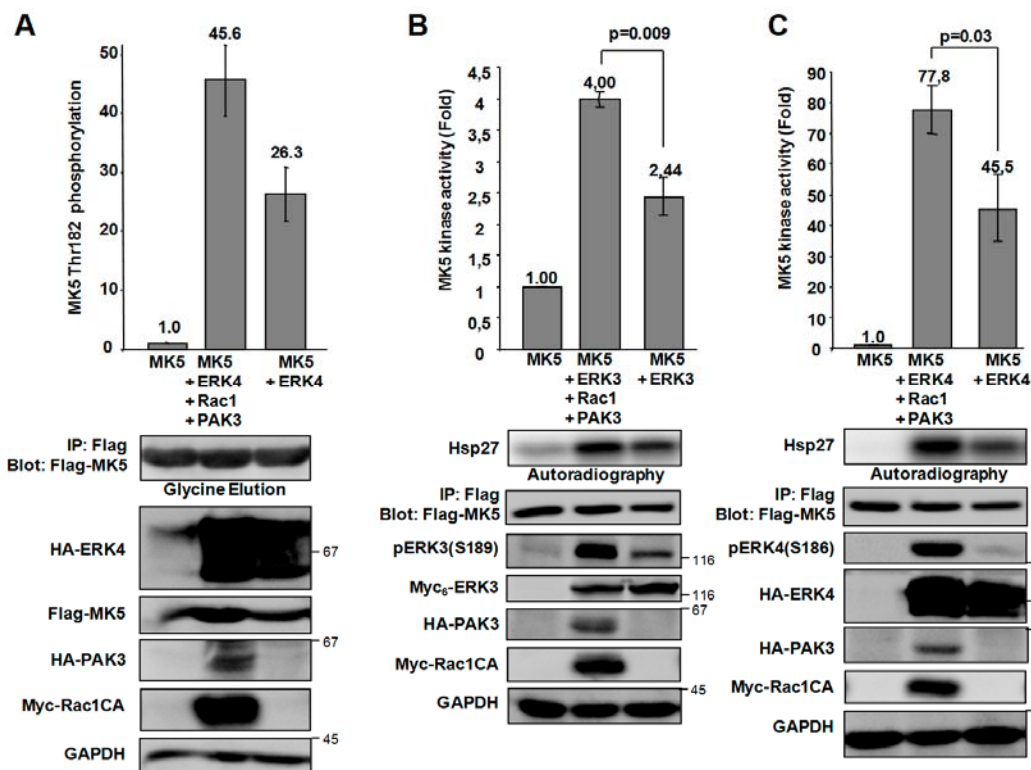
**Figure 3.** Requirement of group I PAKs for Rac1-induced activation loop phosphorylation of ERK3. (A) HEK 293 cells were transfected with the indicated constructs in combination or not with SMARTpool siRNAs targeting group I PAKs. After 36 h, the cells were lysed and analyzed by immunoblotting with anti-phospho-ERK3(S189) and indicated antibodies. (B) The ratio of phospho-Ser189 ERK3 to total ERK3 was determined by quantifying the anti-phospho-ERK3(S189) and anti-Myc immunoblots by densitometry. The bar graph represents the mean  $\pm$  SEM of five independent experiments as shown in panel A.



**Figure 4.** Group I PAKs phosphorylates endogenous ERK3 on the activation loop. (A) HEK 293 cells were transfected with the indicated constructs in combination or not with SMARTpool siRNAs targeting group I PAKs. After 36 h, the cells were lysed, ERK3 was immunoprecipitated and analyzed by immunoblotting with anti-phospho-ERK3(S189) and indicated antibodies. (B) The ratio of phospho-Ser189 ERK3 to total ERK3 was determined by quantifying the anti-phospho-ERK3(S189) and anti-ERK3 immunoblots by densitometry. The bar graph represents the mean  $\pm$  SEM of three independent experiments as shown in panel A.



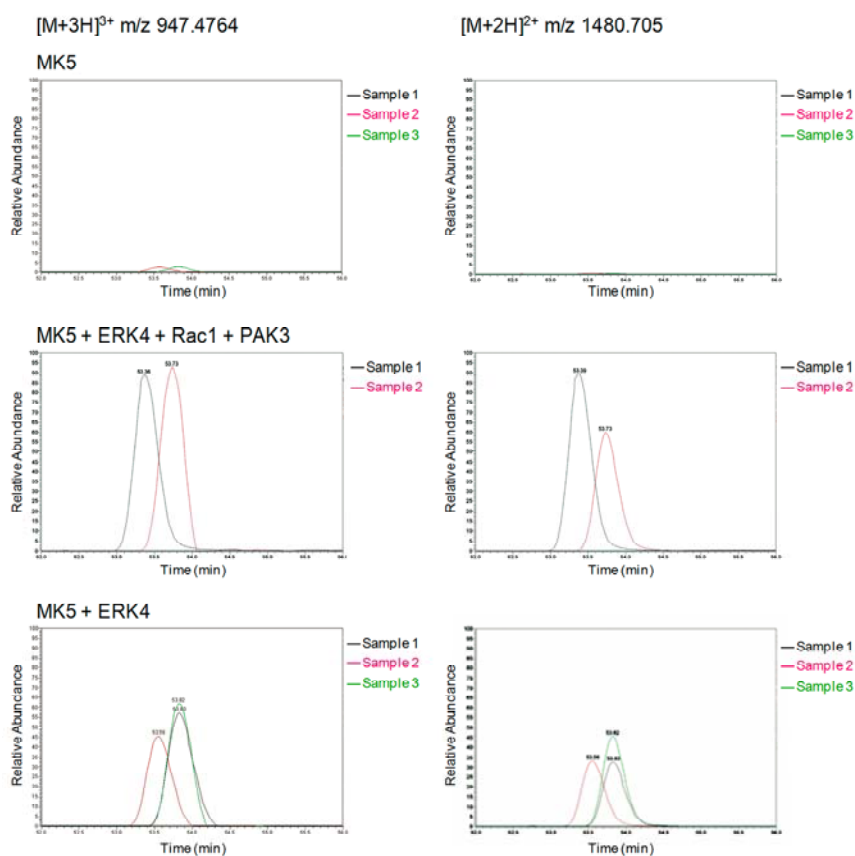
**Figure 5.** PAKs stimulate the phosphotransferase activity of ERK3 and ERK4. HEK 293 cells were transfected with the indicated constructs in combination or not with SMARTpool siRNAs to PAK1/2/3. After 36 h, the cells were lysed and Myc<sub>6</sub>-ERK3WT/S189A (A) or Flag-ERK4 (B) was immunoprecipitated with anti-Myc or anti Flag-antibody, respectively. Phosphotransferase activity was measured in a coupled kinase assay by incubating immunoprecipitated ERK3 or ERK4 with recombinant His<sub>6</sub>-MK5 and Hsp27 proteins in the presence of  $\gamma^{32}$ P-ATP. The reaction products were analyzed by SDS-gel electrophoresis and autoradiography (upper panel). Ponceau staining was used to control His<sub>6</sub>-MK5 and Hsp27 protein loading. The activation loop phosphorylation of ERK3/ERK4 and the expression of ERK3/ERK4, Rac1CA and PAKs were analyzed by immunoblotting of cell lysates. The bar graph represents the mean  $\pm$  SEM of three independent experiments.



**Figure 6.** Rac1-PAK signaling induces MK5 phosphorylation and activation. HEK 293 cells were transfected with the indicated constructs. After 36 h, the cells were lysed and Flag-MK5 was immunoprecipitated with anti-Flag M2 antibody coupled to agarose beads. (A) Following elution, proteins were trypsin-digested and the relative abundance of MK5 Thr182 phosphorylation was analyzed by LC-MS-MS. Control of MK5 elution and expression of the transfected constructs was monitored by immunoblot analysis with the indicated antibodies. The bar graph represents the mean  $\pm$  SEM of two independent experiments. (B and C) MK5 kinase activity was assayed by incubating immunoprecipitated MK5 with recombinant Hsp27 protein in the presence of  $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP. The reaction products were analyzed by SDS-gel electrophoresis and autoradiography (upper panel). The Coomassie stained gel is shown at the bottom. The phosphorylation of ERK3/ERK4 and the expression of transfected proteins were analyzed by immunoblotting. The bar graph represents the mean  $\pm$  SEM of three independent experiments.

ERK3 activation loop sequence : **HKGHLSEGLV**  
 PAK1 : **5-531S2-4-**  
 PAK2 : **62625S3-5-**

**Figure 7.** Matching of ERK3 activation loop sequence to PAK1 and PAK2 consensus phosphorylation motifs. The sequence of ERK3 activation loop was matched to the position-specific scoring matrices (PSSM) documented by Rennefahrt *et al.* (16) for optimal *in vitro* phosphorylation by PAK1 and PAK2. Green color corresponds to residues favouring phosphorylation, whereas red color indicates unfavourable residues. Numbers refer to the order of preference.



**Figure S1 : Extracted Ion Chromatograms (XICs) of the MK5 phosphopeptide IDQGDLMP TPQFTPYVAPQVLEAQR**

Extracted ion chromatograms of triply- ( $m/z$  947.4764, left) and doubly-charged ( $m/z$  1480.705, right) ions of the phosphopeptide IDQGDLMP TPQFTPYVAPQVLEAQR which harbours the MK5 activation site phosphorylated through ERK3/4. Co-Transfection of MK5 with ERK4, RAC1 and PAK3 resulted in the highest intensity of the MK5 phosphopeptide. Without co-transfection of the up-stream kinases RAC1 and PAK3, MK5 activation was considerably lower.

## Annexe III

**Pierre-Luc Tanguay****Bourses d'études:**

- 2009-2010 Bourse de Fin d'études doctorales, FES, Université de Montréal  
 2009 et 2004 Bourse de doctorat en biologie moléculaire, Université de Montréal  
**2005-2008 Bourse d'Études Supérieures du Canada - Bourse au Doctorat, IRSC**  
 2005-2008 Bourse de formation de 3<sup>e</sup> cycle de recherche - Doctorat, FRSQ, *Décliné*  
 2005-2009 TFF Research Studentship – Biomedical, NCIC, *Décliné*  
 2001-2002 Bourses d'excellence à la maîtrise Luigi Liberatore (maîtrise)  
 2001-2002 Bourses d'excellence de la FES (maîtrise), Université de Montréal

**Prix:**

- 2008 Prix de l'Institut de Recherche en Immunologie et Cancer, 2<sup>ième</sup> Journée scientifique de l'IRIC  
 2008 Prix de l'Institut du Cancer de Montréal, Journée de la recherche des programmes de Biologie Moléculaire  
 2007 Prix Glaxo-Smith-Kline, Journée de la recherche des programmes de biologie moléculaire  
 2006 Médaille d'argent des IRSC, Institut National du Cancer, Présentation par Affiche au National Poster Contest du CIHR Student Forum

**Articles publiés:**

- 1) **Tanguay PL** and Meloche S. Inhibition of CDK1/cyclin B activity by MK5 delays entry into mitosis after replicative stress. Manuscrit en préparation.
- 2) Déléris P, Trost M, Topisirovic I, **Tanguay PL**, Borden KLB, Thibault P and Meloche S (2011) Activation loop phosphorylation of the atypical MAP kinases ERK3/ERK4 by group I PAKs defines a novel PAK-ERK3/4-MK5 signaling pathway. *J. Biol. Chem.* **286**, 6470-8
- 3) **Tanguay PL**, Rodier G and Meloche S (2010) Regulation of ERK3 in Mitosis via C-Terminal Domain Phosphorylation Controlled by CDK1 and Cdc14. *Biochem. J.* **428**, 103-11.
- 4) Boutonnet C, **Tanguay PL**, Julien C, Rodier G, Coulombe P and Meloche S (2010). Phosphorylation of Ser72 does not regulate the ubiquitin ligase activity and subcellular localization of Skp2. *Cell Cycle* **9**, 975-9.
- 5) Granados, DP, **Tanguay PL**, Hardy MP, Caron E, de Verteuille D, Meloche S and Perreault C (2008) ER stress affects processing of MHC class-I associated peptides. *BMC immunology*, 10:10 **Highly Acces paper**.

- 6) Deleris P\*, Rousseau J\*, Coulombe P\*, Rodier G, **Tanguay PL** and Meloche S (2008) Activation loop phosphorylation of the atypical map kinases ERK3 and ERK4 is required for binding, activation and cytoplasmic relocalization of MK5. *J. Cell Physiology* **217**, 778-88.
- 7) Rodier G\*, Coulombe P\*, **Tanguay PL**, Boutonnet C and Meloche S (2008) Phosphorylation of Skp2 regulated by CDK2 and Cdc14B protects it from degradation by APC<sup>Cdh1</sup> in G1 phase. *EMBO J.* **27**, 679-91.
- 8) **Tanguay PL\***, Maréchal A\*, Guérin R, Callejo M, Boileau G and Rokeach L.A., (2004) Cell viability and secretion of active proteins in *Schizosaccharomyces pombe* do not require the chaperone function of calnexin. *Biochem J.* **380**, 441-8.

\* These authors contributed equally

