

Université de Montréal

Implication de MEK1 et MEK2 dans l'initiation et la
progression du cancer colorectal

par

Stéphanie Duhamel

Programme de biologie moléculaire

Faculté de médecine

Thèse présentée à la Faculté de médecine
en vue de l'obtention du grade de Doctorat
en Biologie moléculaire

Août, 2011

© Stéphanie Duhamel, 2011

Université de Montréal
Faculté de médecine

Cette thèse intitulée :

Implication de MEK1 et MEK2 dans l'initiation et la progression du cancer colorectal

Présentée par :
Stéphanie Duhamel

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Jean-François Côté: président-rapporteur
Dr Sylvain Meloche: directeur de recherche
Dr Vincent Archambault: membre du jury
Dr François Boudreau: examinateur externe
Dr Stéphane Roy: représentant du doyen

RÉSUMÉ

Une dérégulation de la voie de signalisation Ras/Raf/MEK/ERK1/2 est observée dans plus de 30% des cancers et des mutations activatrices de *RAS* sont observées dans 30% à 50% des adénomes colorectaux. À la suite d'une analyse extensive de biopsies de tumeurs colorectales humaines par micromatrices tissulaires (TMA), nous avons observé que 44% des tissus cancéreux exprimaient MEK1/2 phosphorylés, contre 10% des tissus normaux. L'analyse des TMA a également révélé que 79% des tumeurs arboraient un marquage nucléaire de MEK1/2 phosphorylés, contre 4 % pour les tissus normaux. Bien que la voie MEK/ERK1/2 soit fréquemment activée dans les cancers, le rôle précis des isoformes de MEK1 et de MEK2 n'a jamais été clairement établie. De même, l'impact de cette localisation nucléaire aberrante de phospho-MEK1/2, dans l'initiation et la progression des cancers colorectaux, est inconnu.

Lors d'un premier projet, nous avons démontré, que l'expression de MEK1 ou MEK2 activé est suffisante pour transformer *in vitro* des cellules intestinales épithéliales de rat (IEC-6). L'expression des mutants actifs de MEK1 ou MEK2 est suffisante pour induire une dérégulation de la prolifération cellulaire et engendrer la formation d'adénocarcinomes invasifs dans un modèle de greffe orthotopique du côlon chez la souris. Nous avons également démontré que l'inhibition de MEK2 par shRNA supprime complètement la prolifération des lignées humaines de cancer du côlon, alors que la suppression de MEK1 a peu d'effet sur la capacité de prolifération.

Le deuxième projet, nous a permis d'observer que l'expression d'un mutant nucléaire de MEK1 dans les cellules IEC-6 transforme drastiquement les cellules. Une augmentation de prolifération, une résistance à l'anoikose, un dérèglement du cycle cellulaire, de l'instabilité chromosomique (CIN), de la tétra/aneuploïdie sont observés. La caractérisation des mécanismes responsables de cette localisation aberrante de MEK1/2 phosphorylés, a permis d'identifier la protéine Sef, un régulateur de la localisation cytoplasmique de

MEK/ERK1/2. Nous avons démontré que l'expression d'une forme oncogénique de Ras (H-Ras^{V12}) inhibe l'expression de Sef, engendrant alors une accumulation nucléaire de MEK1/2 activés. Plus encore, la réexpression de Sef restaure la localisation cytoplasmique de MEK1/2 et renverse les propriétés tumorigéniques ainsi que l'aneuploïdie induite par Ras activé.

Un troisième projet, visant la caractérisation des mécanismes associés à la CIN et à l'aneuploïdie engendrés par l'activation aberrante de la voie de Ras-ERK1/2, a permis d'observer que l'hyperactivation de ERK1/2 induit des anomalies mitotiques menant à la binucléation. Une localisation erronée et une surexpression de la kinase Aurora A, de même que des protéines de passage du complexe chromosomique (CPC), Aurora B, Survivine et INCENP, sont observées. L'inhibition partielle de l'activation de ERK1/2 par de faible dose de PD184352, un inhibiteur de MEK1/2, est suffisante pour renverser la surexpression de ces régulateurs mitotiques, de même que corriger les anomalies de la mitose et réduire la tétra/aneuploïdie engendrée par Ras oncogénique.

Ainsi, nous avons démontré, pour la première fois, que la voie des MAP kinases ERK1/2 est impliquée dans la CIN, la tétraploïdie et l'aneuploïdie. Nos résultats suggèrent que la perte de Sef est un événement oncogénique précoce, qui contribue à la localisation nucléaire aberrante de MEK1/2 qui est observée dans les tumeurs colorectales. Cette localisation anormale de MEK1/2 est associée à l'initiation de la transformation, la progression tumorale et la CIN, via l'activité soutenue de ERK1/2. Ces informations sont capitales et démontrent l'importance de la voie de signalisation Ras/Raf/MEK/ERK1/2 dans le processus de tumorigénèse colorectale.

Mots-clés : Voie de signalisation, RAS oncogénique, MEK1/2, ERK1/2, cancer colorectal, tumorigénèse, transformation, aneuploïdie, instabilité chromosomique, inhibiteur de MEK1/2.

ABSTRACT

The Ras-dependent Raf/MEK/ERK1/2 signaling pathway is frequently hyperactivated in human cancer as a result of receptor tyrosine kinase overexpression or gain-of-function mutations in *RAS* or *RAF* genes. More specifically, activating mutation in *RAS* genes are found in ~ 30-50% of colorectal adenomas and phosphorylation of ERK1/2 is frequently observed in human colorectal cancer cells and tumor specimens. In a large TMA analysis, we found that MEK1/MEK2 are aberrantly activated in 44% of human colorectal cancers. In addition, our analysis revealed that 79% of colorectal cancers exhibit aberrant phospho-MEK1/2 staining in the nucleus, as compared to 4% of normal tissue. How dysregulation and mislocalization of MEK1/2 contribute to tumor initiation and progression is not well understood.

In order to determine the exact contribution of MEK1 and MEK2 to the pathogenesis of colorectal cancer, wild type and constitutively active forms of MEK1 and MEK2 were ectopically expressed by retroviral gene transfer in the normal intestinal epithelial cell line IEC-6. We found that the expression of activated MEK1 or MEK2 is sufficient to morphologically transform intestinal epithelial cells, dysregulate cell proliferation and induce the formation of high-grade adenocarcinomas after orthotopic transplantation in mice. A large proportion of these intestinal tumors metastasize to the liver and lung. Importantly, we show that silencing of MEK2 expression completely suppresses the proliferation of human colon carcinoma cell lines, whereas inactivation of MEK1 has a much weaker effect.

In a second project, we have investigated the impact of the nuclear mislocalization of phosphorylated MEK1/2 observed in colorectal tumors. We show that oncogenic activation of Ras is sufficient to induce the nuclear accumulation of phosphorylated MEK1/2 and ERK1/2 in intestinal epithelial cells. To evaluate the biological impact of the mislocalization of MEK1/2, we have forced the localization of MEK1 in the nucleus of

epithelial cells. We found that sustained nuclear MEK1 signaling leads to hyperactivation of ERK1/2 and to enhanced cell proliferation. Nuclear localization of MEK1 also leads to tetraploidization, chromosomal instability (CIN) and tumorigenesis. Importantly, we show that oncogenic Ras downregulates the spatial regulator Sef, concomitant to nuclear accumulation of activated MEK1/2. Moreover, re-expression of Sef is sufficient to restore the normal localization of MEK1/2 and to revert the cell cycle defects and tumorigenesis induced by oncogenic Ras.

Another project was initiated to characterize the tetraploidy and CIN observed upon hyperactivation of the Ras-ERK1/2 pathway. Aneuploidy and CIN are observed in the majority of colorectal cancers and are associated with a poorer prognosis. We show that hyperactivation of ERK1/2 by oncogenic Ras or sustained nuclear MEK-ERK1/2 signaling induces mitotic defects that lead to tetraploidy, aneuploidy and CIN. We also found that dysregulation of Ras-ERK1/2 signaling alters the expression and localization of Aurora A and the Chromosomal passenger complex proteins.

In conclusion, we show for the first time that the MEK/ERK1/2 signaling pathway is implicated in aneuploidy and CIN. Our results suggest that sustained nuclear ERK1/2 signaling may contribute to the initiation and progression of colorectal cancer by rapidly inducing aneuploidy and CIN. We suggest that loss of Sef is an early oncogenic event that contributes to genetic instability and tumor progression by sustaining nuclear ERK1/2 signaling. These observations are significant and highlight the importance of the Ras-ERK1/2 signaling pathway in colorectal tumorigenesis.

Keywords : Signaling pathway, oncogenic RAS, MEK1/2, ERK1/2, colorectal cancer, tumorigenesis, transformation, aneuploidy, chromosomal instability, MEK1/2 inhibitor.

TABLE DES MATIÈRES

Résumé.....	iii
Abstract.....	v
Table des matières.....	vii
Liste des tableaux.....	xiv
Liste des figures.....	xv
Liste des abréviations.....	xxii
La dédicace.....	xxx
Remerciements.....	xxxi
INTRODUCTION.....	1
CHAPITRE 1. Voie de signalisation Ras/Raf/MEK/ERK1/2.....	2
1.1 Les composantes	2
1.1.1 La GTPase Ras.....	2
1.1.2 Les MAP kinase kinase kinases A-Raf, B-Raf et Raf-1	4
1.1.3 Les MAP kinase kinases MEK1/2.....	6
1.1.4. Les MAP kinases ERK1/2.....	8
1.2 Les mécanismes d'activation.....	9
1.2.1 La voie des récepteurs couplés aux protéines G	10
1.2.2 La voie des récepteurs tyrosine kinases.....	10
1.3.3 La voie des intégrines.....	11
1.3 Les mécanismes d'inactivation	13
1.3.1 Les protéines phosphatases.....	13
1.3.2 La régulation négative par phosphorylation.....	14
1.3.3 La dégradation protéolytique via le protéasome.....	15

1.4 Le rôle spécifique des isoformes de MEK1/2 et ERK1/2.....	16
1.4.1 Les modèles de souris knockout ERK1 et ERK2.....	16
1.4.1.1 Le modèle de souris knockout ERK1.....	17
1.4.1.2 Le modèle de souris knockout ERK2.....	18
1.4.2 Les modèles de souris knockout MEK1 et MEK2.....	19
1.4.2.1 Le modèle de souris knockout MEK1.....	19
1.4.2.2 Le modèle de souris knockout MEK2.....	20
1.4.2.3 La délétion des deux isoformes de MEK1/2.....	20
1.4.3 Les modèles de souris transgéniques de MEK.....	21
1.4.3.1 L'expression de MEK1 actif dans le coeur.....	21
1.4.3.2 L'expression de MEK1 actif dans le cristallin.....	22
1.4.3.3 L'expression de MEK1 actif dans les chondrocytes.....	22
1.4.3.4 L'expression de MEK1 et MEK2 actif dans la peau.....	23
1.5 La localisation et les mécanismes de transport de MEK/ERK1/2.....	24
1.5.1 La localisation subcellulaire de MEK1/2.....	24
1.5.2 La localisation subcellulaire de ERK1/2.....	26
1.5.3 Les mécanismes de transport de MEK1/2 et ERK1/2.....	27
1.5.3.1 L'import nucléaire de ERK1/2.....	28
1.5.3.1.1 La diffusion passive.....	28
1.5.3.1.2 Le transport actif sous forme de dimère.....	28
1.5.3.1.3 Le transport via des interactions avec les nucléoporines.....	28
1.5.3.1.4 La translocation nucléaire de MEK et ERK via la séquence SPS.....	29
1.5.3.2 L'export nucléaire.....	30

1.6 La régulation spatio-temporelle de la cascade de MEK/ERK1/2.....	30
1.6.1 La régulation de l'amplitude de MEK/ERK1/2.....	31
1.6.2 La régulation temporelle de MEK/ERK1/2.....	32
1.6.3 La régulation par les protéines d'échafaudages.....	32
1.6.4 La régulation spatiale de MEK/ERK1/2.....	33
1.6.5 La régulation par interaction avec d'autres voies de signalisation.....	34
1.6.6 La régulation par la présence de plusieurs isoformes et formes alternativement épissées.....	35
1.6.6.1 La spécificité des substrats de chacune des isoformes.....	36
1.6.6.2 Les formes alternativement épissées.....	37
1.7 Les fonctions biologiques des MAP kinases ERK1/2.....	38
1.7.1 La prolifération cellulaire.....	39
1.7.1.1 La synthèse des nucléotides.....	39
1.7.1.2 Le remodelage de la chromatine.....	39
1.7.1.3 La traduction synthèse et la des protéines.....	40
1.7.2 La régulation du cycle cellulaire.....	41
1.7.2.1 La régulation de la transition G1/S.....	42
1.7.2.1.1 La régulation de la Cyclin D1 par ERK1/2.....	42
1.7.2.1.2 La répression de la transcription de gène anti- prolifératifs par ERK1/2.....	42
1.7.2.1.3 La régulation des inhibiteurs du cycle cellulaire p21 et p27 par ERK1/2.....	43
1.7.2.2 La régulation de la transition G2/M.....	44
1.7.2.3 La régulation de la Mitose.....	45
1.7.2.3.1 L'implication de ERK1/2 dans la translocation nucléaire de la Cyclin B1.....	46
1.7.2.3.2 La régulation de RSK par ERK1/2.....	47

1.7.2.3.3 La localisation de MEK/ERK1/2 actifs sur la tubuline mitotique.....	47
1.7.3 La régulation de la différenciation cellulaire.....	48
1.7.4 La régulation de l'apoptose et la survie cellulaire.....	50
CHAPITRE 2. Implication de la voie de signalisation Ras/Raf/MEK/ERK1/2 dans le cancer métastatique.....	51
2.1 Mise en situation.....	52
2.2 Contribution des auteurs	52
2.3 Résumé.....	52
2.4 Article de revue 1: Targeting the ERK1/2 MAP Kinase Signaling Pathway in advanced metastatic cancer.....	53
CHAPITRE 3. Le cancer colorectal.....	83
3.1 L'épidémiologie.....	84
3.2 La carcinogenèse colorectale.....	85
3.3 Les critères histologiques.....	88
3.4 Le traitement du cancer colorectal.....	90
3.5 L'implication de la voie de Ras-ERK1/2 dans le cancer du côlon.....	91
RÉSULTATS.....	93
CHAPITRE 4. Le rôle de MEK1 et MEK2 dans l'initiation et la progression des cancers colorectaux.....	94
4.1 Mise en situation et objectif.....	94
4.2 Contribution des auteurs	94
4.3 Résumé.....	94

4.4 Article 2: Activation of MEK1 or MEK2 isoform is sufficient to fully transform intestinal epithelial cells and induce the formation of metastatic tumors.....	96
---	----

CHAPITRE 5. Implication de la localisation nucléaire de MEK1/2 activées dans la tumorigénèse colorectale.....131

5.1 Mise en situation et objectif.....	132
5.2 Contribution des auteurs	132
5.3 Résumé.....	132
5.4 Article 3: Sef downregulation by Ras causes MEK1/2 to become aberrantly nuclear localized leading to polyploidy and neoplastic transformation.....	134

CHAPITRE 6. L'implication de la voie Ras-ERK1/2 dans la tétraploïdie et l'instabilité chromosomique.....175

6.1 Mise en situation et objectif.....	176
6.2 Contribution des auteurs	176
6.3 Résumé.....	176
6.4 Article 4: Implication of the Ras/Raf/MEK/ERK1/2 signaling pathway in tetraploidy and chromosomal instability.....	178

CHAPITRE 7. L'implication de la signalisation de MEK/ERK1/2 dans l'initiation et la progression du cancer colorectal chez la souris.....201

7.1 Mise en situation et objectif.....	202
7.2 Contribution des auteurs	202
7.3 Introduction.....	202
7.4 Matériels et méthodes	203
7.5 Résultats.....	205
7.4.1 Validation de la souris transgénique.....	205

7.4.2 L'expression de MEK2 constitutivement actif dans l'intestin engendre de l'hyperplasie lymphoïde.....	210
7.6 Discussion.....	216
7.7 Perspectives.....	220
CHAPITRE 8. La découverte de nouveaux rôles de MEK/ERK1/2 dans l'induction de l'aneuploïdie et l'instabilité chromosomique.....	223
8.1 Mise en situation et objectif.....	224
8.2 Contribution des auteurs	224
8.3 Introduction.....	224
8.4 Résultats.....	227
8.4.1 La découverte d'un nouveau mécanisme menant à la tétraploïdie.....	227
8.4.2 La découverte d'une potentielle interaction de MEK1 avec des régulateurs de la mitose.....	228
8.4.3 L'implication potentielle de la voie de MEK/ERK1/2 dans la régulation de la mitose.....	229
8.5 Discussion.....	235
8.6 Perspectives.....	237
CONCLUSION.....	238
CHAPITRE 9. Conclusions, perspectives et directions futures.....	238
9.1 L'importance de la régulation spatiale de la voie ERK1/2 dans la tumorigénèse.....	238
9.2 La découverte de nouveaux rôles de MEK/ERK1/2 dans la tétraploïdie, l'aneuploïdie et l'instabilité chromosomique.....	243
9.3 L'implication potentielle de MEK/ERK1/2 dans la régulation de la mitose....	248

9.4 Perspectives.....	251
9.4.1 Le développement d'inhibiteurs de MEK/ERK1/2 pour le traitement du cancer.....	251
9.4.2 Le développement d'inhibiteurs de l'import nucléaire de MEK.....	254
9.4.2.1 L'utilisation de molécules bloquant la dégradation de Sef.....	254
9.5 Conclusion.....	255
BIBLIOGRAPHIE.....	258
ANNEXE 1.....	i
ANNEXE 2.....	vii

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I	Small molecule MEK1/2 inhibitors	71
Tableau II	List of up-regulated and down-regulated genes in IEC-6 cells expressing MEK1DD.....	116
Tableau III	List of up-regulated and down-regulated genes in IEC-6 cells expressing MEK2DD.....	117
Tableau IV	Durée des phases de la mitose des cellules IEC-6-H2B-GFP traitées au PD184352, 5 μ M.....	230
Tableau V	Anomalies de la mitose observées dans les cellules IEC-6-H2B-GFP traitées au PD184352, 5 μ M.....	231

LISTE DES FIGURES

Figure 1.1.	Schéma de la voie de signalisation de RAS.....	3
Figure 1.2.	Mécanisme d'activation de la voie de signalisation de Ras/Raf/MEK/ERK1/2.....	9
Figure 1.3.	Schéma des différentes protéines associées à la localisation cytoplasmique de MEK/ERK1/2.....	24
Figure 1.4.	Schéma des mécanismes de transport de ERK1/2.....	27
Figure 1.5.	Schéma des phases du cycle cellulaire et de ces principaux régulateurs.....	41
Figure 1.6.	Schéma des phases de la mitose et de ces principaux régulateurs.....	46
Figure 2.1.	The ERK1/2 MAP kinase signaling pathway in cancer metastasis.....	81
Figure 3.1.	Schéma des mutations associées à la progression des cancers colorectaux de type MSI.....	86
Figure 3.2.	Schéma des mutations associées à la progression des cancers colorectaux de type CIN.....	87
Figure 3.3.	Schéma des mutations associées à la progression des cancers colorectaux de type CIMP.....	87
Figure 3.4.	Critères histologiques des différents grades de tumeurs colorectales.....	89

Figure 4.1.	Expression of activated MEK1 or MEK2 morphologically transforms intestinal epithelial cells.....	108
Figure 4.2.	Expression of activated MEK1 or MEK2 enhances the proliferation of IEC-6 cells and induces the formation of intestinal tumors.....	111
Figure 4.3.	Constitutive activation of MEK1 or MEK2 promotes tumor metastasis to the liver and lung.....	114
Figure 4.4.	Expression of proteases in IEC-6 cell populations transduced with activated MEK isoforms.....	118
Figure 4.5.	Constitutive activation of MEK1 or MEK2 confers intestinal epithelial cells resistance to anoikis.....	120
Figure 4.S3.	HCT116 cells were infected with lentiviruses encoding shRNAs to MEK1 or MEK2 gene.....	122
Figure 4.6.	Impact of MEK1 or MEK2 silencing on the proliferation of human colon carcinoma cell lines.....	123
Figure 4.7.	Silencing of MEK1 or MEK2 expression restrains activating phosphorylation of the MAP kinases ERK1/ERK2.....	124
Figure 4.S4	Impact of MEK1 or MEK2 silencing on the proliferation of a breast carcinoma cell line.....	126
Figure 5.1.	Phosphorylated MEK1/2 and ERK1/2 aberrantly localize to the nucleus in human colorectal cancer cells.....	140

Figure 5.2.	Oncogenic Ras induces the nuclear accumulation of phosphorylated MEK1/2 and ERK1/2.....	142
Figure 5.3.	Nuclear staining of phosphorylated MEK1/2 increases with tumor malignancy.....	143
Figure 5.S1.	Ectopic expression of MEK1DD induces the nuclear accumulation of phosphorylated MEK1/2 and ERK1/2.....	145
Figure 5.S2.	Nuclear accumulation of MEK1 transforms fibroblastic cells.....	146
Figure 5.4.	Nuclear accumulation of MEK1 dysregulates the cell cycle and accelerates the proliferation of intestinal epithelial cells.....	148
Figure 5.S3.	Effect of MEK1 localization mutants on ERK1/2 activity and G1 cell cycle regulators.....	150
Figure 5.5.	Nuclear accumulation of MEK1 leads to cell transformation.....	152
Figure 5.S4.	Oncogenic Ras promotes chromosomal instability in epithelial and fibroblastic cells.....	154
Figure 5.6.	Nuclear accumulation of MEK1 induces chromosomal instability.....	155
Figure 5.S5.	Effect of activation loop mutations on the nuclear entry of MEK1.....	157
Figure 5.7.	Sef is downregulated in human colorectal cancer.....	159
Figure 5.8.	Reexpression of Sef prevents the nuclear accumulation of phosphorylated MEK1/2 and constitutive activation of ERK1/2.....	161

Figure 5.9.	Reexpression of Sef normalizes the cell cycle and suppresses tumorigenesis induced by oncogenic Ras.....	163
Figure 5.S6.	Model of the proposed tumor suppressor function of Sef in epithelial cancers.....	168
Figure 6.1.	Sustained ERK1/2 signaling induces cytokinesis defects.....	183
Figure 6.S1.	Sustained ERK1/2 signaling dysregulates mitotic regulators and induces mitotic aberrations.....	185
Figure 6.2.	Overexpression of Aurora A induces cytokinesis defects.....	189
Figure 6.S2.	Hyperactivation of ERK1/2 signaling dysregulates CPCs and Aurora A localization.....	189
Figure 6.3.	Aurora A partial knockdown reduces mitotic defects in IEC-6 cells expressing oncogenic Ras.....	191
Figure 6.S3.	Aurora A partial knockdown restores CPCs localization in IEC-6 cells expressing oncogenic Ras.....	192
Figure 6.4.	Partial reduction of ERK1/2 phosphorylation reduces mitotic defects and aneuploidy in IEC-6 cells expressing oncogenic Ras.....	193

Figure 7.1.	Expression de la construction TetO-HA-MEK2DD dans des HEK293T, induit à la doxycycline durant 48 heures.....	205
Figure 7.2.	Induction de l'expression de la protéine transgénique HA-MEK2DD dans le colon du clone 725 par ajout de doxycycline dans l'eau de breuvage des souris.....	206
Figure 7.3.	Expression de la protéine transgénique HA-MEK2DD dans les différents organes du clone 725 induit avec 500 µg/ml de doxycycline durant 2 semaines.....	207
Figure 7.4.	Lésions observées sur les souris transgéniques HA-MEK2DD âgées de 2 mois.....	208
Figure 7.5.	Analyse histologique par coloration Hématoxyline/Eosine (HE) des lésions observées chez les souris HA-MEK2DD.....	209
Figure 7.6.	Marquage immunohistochimique de phospho-ERK1/2 dans le côlon et l'intestin des souris HA-MEK2DD/Villin et Villin induite à la doxycycline 500 µg/ml depuis 4 mois.....	211
Figure 7.7.	Côlon et intestin des souris HA-MEK2DD/Villin et Villin induite à la doxycycline 500 µg/ml depuis 2 mois.....	212
Figure 7.8.	Côlon des souris HA-MEK2DD/Villin et Villin induite à la doxycycline 500 µg/ml depuis 8 mois.....	214
Figure 7.9.	Estomac des souris HA-MEK2DD/Villin et Villin induite à la doxycycline 500 µg/ml depuis 4 et 8 mois.....	215

Figure 7.10.	Schéma de la tumorigénèse colorectale induite par une inflammation chronique.....	218
Figure 8.1	Tétraploïdie générée par un arrêt en prométaphase des cellules IEC-6-H-Ras ^{V12} -H2B-GFP.....	228
Figure 8.2.	Interaction de MEK1 avec divers régulateurs mitotiques révélés par immunoprécipitation de MEK1 endogène dans les cellules IEC-6-H-Ras ^{V12}	229
Figure 8.3.	Anomalies de la cytokinèse observées dans les cellules IEC-6-H2B-GFP traitées au PD184352, 5µM.....	232
Figure 8.4.	Anomalies mitotiques observées dans les cellules IEC-6-H2B-GFP traitées au PD184352, 5µM.....	233
Figure 8.5.	Anomalies en anaphase observées dans les cellules IEC-6-H2B-GFP traitées au PD184352, 5µM.....	234
Figure 9.1.	Marquage immunohistochimique de Sef (rose) et phospho-MEK1/2 (brun) de l'épithélium normal de côlon humain.....	240
Figure 9.2.	Analyse par immunobuvardage de l'expression de PEA-15.....	241
Figure 9.3.	Analyse par immunobuvardage de l'expression des nucléoporines Nup153 et Nup214.....	243
Figure 9.4.	Aberrations mitotiques des cellules IEC-6-H-Ras ^{V12} à différents temps post-infection.....	246

Figure 9.5. Diminution de la phosphorylation de la serine 15 de p53 dans les cellules IEC-6-MEK1-nucléaire.....	247
---	-----

LISTE DES ABRÉVIATIONS

GÉNÉRALES

4NQO	4-nitroquinoline 1-oxide
4-OHT	4-hydroxytamoxifen
Ala	Résidu Alanine (A)
APC	Adenomatous polyposis coli
ACF	Foyer de crypte aberante (<i>Aberrant crypt foci</i>)
ADN	Acide désoxyribonucléique
AML	<i>Acute myeloid leukemia</i>
AOM	Azoxyméthane
APL	<i>Acute promyelocytic leukemia</i>
ARNm	ARN messenger
ARNr	ARN ribosomique
ASI	<i>Applied Spectral Imaging</i>
Asn	Résidu Asparagine (N)
Asp	Résidu Acide aspartique (D)
ATM	<i>Mutated in ataxia-telangiectasia</i>
ATO	<i>Arsenic trioxide</i>
ATR	<i>Ataxia-telangiectasia and Rad3-related</i>
ATP	Adénosine Triphosphate
BrdU	5-Bromo-2'-deoxyuridine
CIITA	<i>Transcriptional activator class II transactivator</i>
CCAC	Cancers colorectaux associés aux coliques
CCR1	<i>Chemokine (C-C motif) receptor 1</i>
CDK	Kinase dépendante des cyclines (<i>Cyclin-Dependent Kinase</i>)
CFC	Cardio-facial-cutané (<i>Cardio-facial-cutaneous</i>)
CIN	Instabilité chromosomique (<i>Chromosomal instability</i>)

CNS	<i>Central nervous system</i>
CIMP	Phénotype de méthylation des îlots CpG (<i>CpG island methylator phenotype</i>)
CPC	Protéine de passage du complexe chromosomique (<i>Chromosomal passenger complex protein</i>)
CPS	Carbamoyl-phosphate synthétase (<i>Carbamoyl phosphate synthetase</i>)
CRC	Cancer colorectal (<i>Colorectal cancer</i>)
CRS	Séquence de rétention cytoplasmique (<i>Cytoplasmic retention sequence</i>)
DAPI	<i>4',6-Diamidino-2-phenylindole</i>
DKO	Double knockout
DMEM	Milieu de Eagle modifié par Dulbecco (<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>)
DMSO	Diméthyle sulfoxyde
DTT	Dithiothréitol
E1	Enzyme d'activation de l'ubiquitine
E2	Enzyme de conjugaison de l'ubiquitine
E3	Ligase de l'ubiquitine
EBV	Virus Epstein-Barr (<i>Epstein-Barr virus</i>)
ECM	<i>Extracellular matrix</i>
EDTA	Acide éthylène-diamine tétra acétique (<i>Ethylene diamine tetraacetic acid</i>)
EGTA	Acide éthylène glycol-bis-b aminoéthyl éther-N, N, N', N'-tétra acétique (<i>Ethylene glycol tetra acetic acid</i>)
eIF4E	Facteur d'initiation de la traduction chez les eucaryotes 4E (<i>Eukaryotic translation initiation factor 4E</i>)
EGF	Facteur de croissance épidermique (<i>Epidermal Growth Factor</i>)
EGFR	Récepteur du facteur de croissance épidermique (<i>Epidermal Growth Factor Receptor</i>)
EMT	Transition épithélio-mésenchymateuse (<i>Epithelial-mesenchymal transition</i>)

ERK	Kinase régulée par un signal extracellulaire (<i>Extracellular signal-Regulated Kinase</i>)
FACS	Cytométrie en flux (<i>Fluorescence Activated Cell Sorting</i>)
FAK	Kinase d'adhérence focale (<i>Focal Adhesion Kinase</i>)
FBS	Sérum foetal de bovin (<i>Foetal Bovine Serum</i>)
HCC	Carcinome hépatocellulaire (<i>Hepatocellular carcinoma</i>)
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
FGF	Facteur de croissance fibroblastique (<i>Fibroblast Growth Factor</i>)
FTI	Inhibiteurs de la farnesyle transférase (<i>Farnesyl transferase inhibitors</i>)
G0	Phase G0 (Gap 0)
G1	Phase G1 (Gap 1)
GDP	Guanosine di-phosphate
GFP	Protéine fluorescente verte (<i>Green Fluorescent Protein</i>)
Gln	Résidu Glutamine (Q)
Glu	Résidu Acide glutamique (E)
GLUT1	Transporteur de glucose de type 1 (<i>Glucose transporter 1</i>)
GNEF	facteur d'échange des nucléotides guanine (<i>Guanine nucleotide exchange factor</i>)
GPCR	Récepteurs couplés aux protéines G (<i>G protein-coupled receptors</i>)
Grb2	Protéine qui lie le récepteur des facteurs de croissance 10 (<i>Growth-factor receptor-bound protein 10</i>)
GTP	Guanosine tri-phosphate
HA	<i>Human influenza hemagglutinin</i>
HAT	Histones acétyltrasférases (<i>Histone actetyltrasferase</i>)
HBV	Virus de l'hépatite B (<i>Hepatitis B virus</i>)
HCL	<i>Hydrogen chloride</i>
HCV	Virus de l'hépatite C (<i>Hepatitis C virus</i>)
HGF	Hepatocyte growth factor

HIEC	Cellule épithéliale intestinale normale humaine (<i>Normal human intestinal epithelial cell</i>)
h-Int3sh	Domaine intracellulaire de Notch4/Int3
HIV	Virus de l'immunodéficience humaine (<i>Human immunodeficiency virus</i>)
HMG	Protéine à haute mobilité (<i>High mobility protein</i>)
HTLV-1	Virus lymphotrope des cellules T de type 1 (<i>Human T-cell lymphotropic virus type 1</i>)
HNSCC	<i>Head and neck squamous cell carcinoma</i>
H ₂ O ₂	Peroxyde d'hydrogène
HP	Polype hyperplasique (<i>Hyperplaisc polyp</i>)
HPRT	<i>Hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase</i>
HPV	Virus du papillome humain (<i>Human papilloma virus</i>)
IBD	Maladies inflammatoires de l'intestin (<i>Inflammatory bowel disease</i>)
IEC-6	Cellule intestinale épithéliale de rat (<i>Intestinal epithelial rat cell</i>)
IEMC	Cellule endothéliale microvasculaire de l'intestin (<i>Intestinal microvascular endothelial cells</i>)
IFN	Interféron
IGF-I	Facteur de croissance analogue de l'insuline (<i>Insulin-like growth factor I</i>)
IL	Interleukine
IP3	Inositol- triphosphate
IRIC	Institut de recherche en immunologie et cancérologie
JNK	<i>c-Jun N-terminal kinase</i>
KSR	Protéine kinase suppresseur de RAS (<i>Kinase suppressor of Ras</i>)
Leu	Résidu Leucine (L)
LMB	Leptomycin B
Lys	Résidu Lysine (K)
MAP	Protéine activée par les mitogènes (<i>Mitogen Activated Protein</i>)
MAPK	Protéine-kinase activée par les mitogènes (<i>Mitogen Activated Protein Kinase</i>)

MAPKK	Protéine-kinase kinase activée par les mitogènes (<i>Mitogen Activated Protein Kinase Kinase</i>)
MEC	Matrice extracellulaire
MEF	Fibroblaste embryonnaire de souris (<i>Mouse Embryonic Fibroblast</i>)
MEK	MAP/ERK kinase
MKK	MAP kinase kinases
MKKK	MAP kinase kinase kinases
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i>
MKP	Protéine phosphatase MAP kinase
MLCK	<i>Myosin light chain kinase</i>
MMP	Métalloprotéinase de la matrice (<i>Matrix metalloproteinase</i>)
MMR	Réparation des mésappariements (<i>Mismatch repair</i>)
MOG35-55	Glycoprotéine oligodendrocyte de la myéline
MP-1	Partenaire de MEK1 -1 (<i>MEK1-Partner-1</i>)
MSI	Instabilité microsatellite (<i>Microsatellite instability</i>)
MSK	Kinase activée par les mitogènes et par le stress (<i>Mitogen- and stress activated protein kinase</i>)
Myr	<i>Sarcoma virus Src myristoylation signal (MGSSKSK)</i>
Ncaph2	Sous-unité H2 des complexes des condensines non-SMC (<i>Non-SMC condensin II complex subunit H2</i>)
NCFC	Neuro-cardio-facial-cutané (<i>Neuro-cardio-facial-cutaneous</i>)
NES	Séquence d'exclusion nucléaire
NF1	Neurofibromatose de type 1 (<i>Neurofibromatosis type 1</i>)
NIH 3T3	Fibroblaste embryonique de souris (<i>Mouse embryonic fibroblast cell line</i>)
NGF	Facteur de croissance neuronal
NLS	Signal de localisation nucléaire
NSCLC	<i>Non small cell lung cancer</i>
NPC	Complexe des pore nucléaires (<i>Nuclear pore complex</i>)

PAGE	Électrophorèse en gel de polyacrylamide (<i>Polyacrylamide gel electrophoresis</i>)
PAK	p21-activated protein kinase
PBS	Tampon phosphate salin (<i>Phosphate buffer salin</i>)
PCR	Réaction de polymérisation en chaîne (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PDGF	Facteur de croissance dérivé des plaquettes (<i>Platelet-derived growth factor</i>)
PEA-15	Phosphoprotéine 15 enrichi dans les astrocytes (<i>Phosphoprotein enriched in astrocytes 15</i>)
PI	Propidium iodide
PI-3K	Kinase-3 phosphoinositide (<i>Phosphoinositide 3-Kinase</i>)
PKA	Protéine kinase A
PLC- β	Phospholipase C- β
PMA	<i>Phorbol 12-myristate 13-acetate</i>
PMSF	Fluorure de phényl-méthyl sulfoxyde (<i>Phenyl Methyl Sulfonyl Fluoride</i>)
poly-HEMA	<i>Poly(2-hydroxyethyl methacrylate)</i>
PP1	Protéine phosphatase 1 (<i>Phosphatase protein 1</i>)
PP2A	Protéine phosphatase 2A (<i>Phosphatase protein 2A</i>)
RALGDS	Stimulateur de la dissociation des nucléotides guanine (<i>Ral guanine nucleotide-dissociation stimulator</i>)
RKIP	Protéine inhibitrice de la kinase RAF (<i>RAF kinase inhibitor protein</i>)
ROCK	<i>Rho-associated protein kinase</i>
RSK	Ribosomal s6 kinase
RTK	Récepteur à activité tyrosine kinase (Receptor tyrosine kinase)
RT-PCR	<i>Reverse transcriptase-polymerase chain reaction</i>
S	Phase S (Synthèse)
SAC	Checkpoint d'assemblage du fuseau mitotique (<i>Spindle assembly checkpoint</i>)
SDS	Dodécyle-sulfate de sodium (<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>)
SEM	<i>Standard error of the mean</i>

Ser	Résidu sérine (S)
shRNA	short hairpin RNA
SOS	Facteur d'échange de GTP pour Ras (<i>Son of Sevenless</i>)
SPRED	<i>SPROUTY-related enabled/vasodilator-stimulated phosphoprotein homology 1 domain-containing</i>
SSA	Adénome serrate sessile (<i>Sessile serrated adenoma</i>)
SKY	Caryotypage spectrale (<i>Spectral karyotyping</i>)
TGF- α	Facteur de croissance tumorale-béata (<i>Tumor growth factor-α</i>)
TGF- β	Facteur de croissance tumorale-béata (<i>Tumor growth factor-β</i>)
Thr	Résidu Thréonine
TMA	Micromatrice tissulaire (Tissue microarray)
TNF	Facteur de nécrose tumorale (<i>Tumor Necrosis Factor</i>)
Topo II	Topoisomérase II
TS	Souche trophoblastique
TSA	Adénome serrate traditionnel (<i>Traditionnal serrated adenoma</i>)
TUNEL	<i>Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling</i>
Tyr	Résidu Tyrosine
Ub	Ubiquitine
uPA	<i>Urokinase-type plasminogen activator</i>
USP	Ubiquitine par le protéasome
UV	Ultra violet
Val	Résidu Valine (V)
VEGF	Facteur de croissance endothélial vasculaire (<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>)

UNITÉS

μ	Micro
Da	Dalton
g	Gramme
h	Heure
min	Minute
M	Molaire

LA DÉDICACE

à Cristian

REMERCIEMENTS

Mes remerciements vont d'abord au Dr Sylvain Meloche, mon directeur de recherche, qui m'a accordé son entière confiance et m'a laissé une grande liberté quant aux directions choisies par rapport au projet de doctorat initialement proposé. La porte de son bureau était toujours ouverte pour les discussions de tous genres et cette facilité de communication fut grandement appréciée. Je tiens aussi à exprimer ma profonde gratitude à Sylvain pour avoir dit «oui» à pratiquement toutes mes (nombreuses) idées et pour avoir respecté mon besoin d'indépendance et mes choix.

Je tiens aussi à exprimer ma reconnaissance aux membres du Jury, soit les Dr Vincent Archambault, Dr François Boudreau, Dr Jean-François Côté et Dr Stéphane Roy, qui ont gracieusement accepté de prendre le temps de lire ma thèse et de siéger sur ce comité.

Ma gratitude et mon admiration vont aussi à Cristian, mon conjoint, qui a toujours été d'un grand enthousiasme et positivisme. Il a su me soutenir, m'encourager et m'aider tout au long de mon doctorat. Cristian s'informait chaque soir de «la découverte du jour» : j'aurais bien apprécié qu'il y en ait autant...

Un merci tout spécial à Kim Lévesque, technicienne en soin animal, pour son aide d'une grande valeur avec les souris. Kim a effectué avec professionnalisme et minutie divers protocoles d'expérimentations et s'est occupée de la génération des cohortes, du génotypage, des traitements, etc.

Merci également aux collaborateurs, notamment le Dr Jonas Dorn, avec qui j'ai eu de très intéressantes discussions scientifiques et le Dr Louis Gaboury, qui m'a beaucoup appris sur l'analyse histopathologique.

Je voudrais également remercier les Dr Marc Saba El Leil et Dre Laure Voisin qui ont gentiment lu une partie de ma thèse et qui m'ont fait part de leurs commentaires. J'adresse aussi mes remerciements au Dr Philippe Charland et Kristin Talbot Neel, qui ont

révisé les manuscrits et la thèse.

Et, finalement, je tiens à exprimer ma gratitude à tous les membres du laboratoire Meloche, présents et passés, qui ont su créer une ambiance de travail conviviale, chaleureuse et agréable. Ils sont aussi devenus des amis avec qui j'ai pu partager des discussions animées, tant sur le plan scientifique que personnel.

INTRODUCTION

Chapitre 1

Voie de signalisation Ras/Raf/MEK/ERK1/2

1.1 Voie de signalisation Ras/Raf/MEK/ERK1/2

La voie de signalisation Ras/Raf/MEK/ERK1/2, qui intègre une grande variété de signaux extracellulaires pour contrôler les réponses biologiques comme la prolifération, la différenciation, l'apoptose et la survie cellulaire, est une des voies de signalisation les plus étudiées et les mieux caractérisées. Elle est constituée de la GTPase RAS qui, une fois activée, transmet ses signaux à la sérine/thréonine kinase RAF. Raf activé phosphoryle MEK1 et MEK2 qui, à leur tour, activent les kinases ERK1 et ERK2, leurs seuls substrats connus à ce jour. La phosphorylation de ERK1/2 permet l'activation de nombreuses cibles localisées à la membrane plasmique, au cytoplasme et au noyau : l'activation de ces substrats enclenche une multitude de réponses.

1.1 Les composantes

1.1.1 La GTPase RAS

RAS est une petite GTPase qui alterne entre sa conformation inactive, liée au GDP (guanosine diphosphate) et sa forme active, liée au GTP (guanosine triphosphate) (Ras-GDP et Ras-GTP respectivement). Les protéines Ras régulent de multiples réponses cellulaires par des stimulus extracellulaires tels que les facteurs de croissances qui se lient aux récepteurs de surface cellulaire.

À la suite d'une activation, les récepteurs tyrosines kinases vont recruter le facteur d'échange de nucléotides guanine (GNEF) SOS via les protéines adaptatrices Shc et Grb2. SOS peut ensuite convertir RAS localisé à la membrane sous sa forme inactive, liée au GDP, en RAS activé, sous sa forme liée au GTP (revue dans [1]). RAS lié au GTP peut interagir avec plusieurs effecteurs tel que : RAF, PI3K (Kinase-3 phosphoinositide) et RALGDS (Ral guanine nucleotide-dissociation stimulator), permettant ainsi la régulation de divers processus cellulaires tel que la prolifération, l'apoptose et la migration cellulaire [2, 3] (figure 1.1).

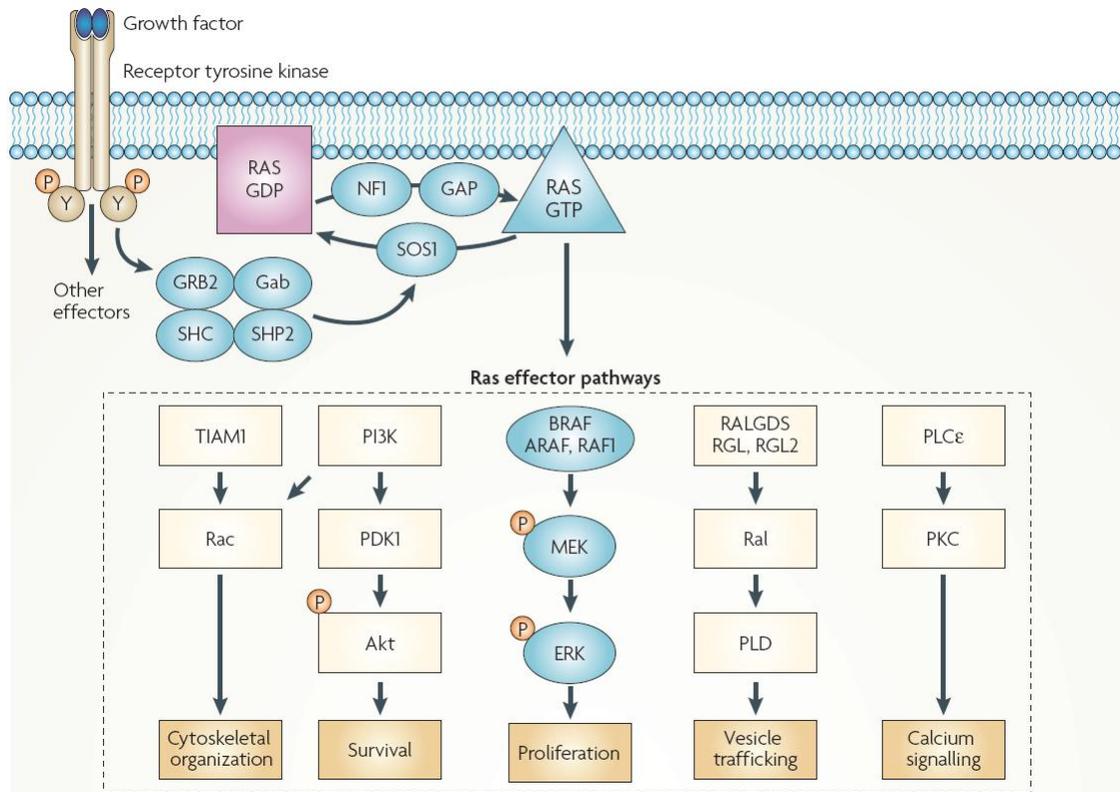


Figure 1.1. Schéma de la voie de signalisation de RAS. (Schubbert et al, 2007. Nature reviews [1]).

Les trois gènes *Ras* codent pour quatre protéines de 21 kD hautement homologues : HRAS, KRAS4A, KRAS4B et NRAS. KRAS4A et KRAS4B sont le résultat d'un épissage alternatif de la portion C-terminale de l'isoforme KRAS. Les résidus 1-165 de la portion N-terminale des trois isoformes de RAS, comprennent le domaine G, qui constitue la partie hautement conservée de cette GTPases. Les protéines RAS divergent davantage au niveau de la partie C-terminale connue comme étant la région variable [4, 5]. Les protéines Ras sont exprimées ubiquitairement mais, plus spécifiquement, HRAS est fortement exprimée dans le cerveau, l'épithélium, les muscles et faiblement dans le foie. KRAS est présente dans le poumon, le colon et le thymus, alors que NRAS est davantage présente dans le thymus et les testicules [5, 6].

Des mutations activatrices de RAS sont observées dans environ 30% des cancers. Habituellement, les mutations somatiques de *RAS* introduisent une substitution d'acide aminé aux positions 12, 13 ou 61. Ces altérations induisent l'activation constitutive de RAS en conférant une résistance au GAP, ce qui engendre l'accumulation de RAS dans sa forme active liée au GTP [7]. Les mutations activatrices de KRAS sont principalement associées aux cancers colorectaux, pancréatiques, endométriaux, pulmonaires et du col de l'utérus. Les mutations de KRAS et de NRAS se retrouvent dans les leucémies myéloïdes, alors que les mutations de NRAS et de HRAS sont prédominantes dans les mélanomes et les cancers de la vessie, respectivement [4, 8]. Certains désordres de développement sont également associés à une dérégulation de l'activation de la voie MAP kinase ERK1/2, tels que les syndromes neuro-cardio-facio-cutané (NCFC). Les NCFC regroupent des syndromes qui possèdent des phénotypes similaires associés à une régulation aberrante de RAS, tels que la neurofibromatose de type 1 (NF1), les syndromes de Costello, de Noonan, de LEOPARD et le CFC [9]. À titre d'exemple, le CFC est un syndrome caractérisé par diverses anomalies cranio-faciales, des tissus cardiaques et ectodermiques, ainsi que de retard mental [10].

La signalisation de RAS requiert des modifications post-traductionnelles, telles que la farnesylation, qui est requise pour la localisation à la membrane. L'idée de développer des inhibiteurs de la farnesyle transférase (FTI) pour le traitement du cancer a donc été explorée. Par exemple, le Tipifarnib (R115777), s'est avéré être un puissant inhibiteur de RAS. Le Tipifarnib avait démontré des effets anti-prolifératifs, anti-angiogéniques et pro-apoptotiques intéressants lors d'études précliniques sur le cancer du pancréas [11]. Toutefois, lors des essais cliniques, le Tipifarnib n'a pas démontré d'effet anti-tumoral satisfaisant [12]. De plus, des analyses subséquentes ont démontré que plusieurs autres voies de signalisation étaient affectées par l'inhibiteur [13].

1.1.2 Les MAP kinase kinases A-RAF, B-RAF et RAF-1

La partie la plus complexe de la voie de signalisation Ras/Raf/MEK/ERK1/2 est l'activation de RAF. Cette étape requiert l'orchestration de plusieurs événements clés,

incluant le recrutement à la membrane, la phosphorylation et l'oligomérisation de RAF. L'un des régulateurs critiques de cette étape est KSR, qui agit à titre de protéine d'échafaudage mais aussi, selon de récentes études, serait associé spécifiquement au processus d'activation de RAF [14].

La famille RAF est constituée de trois membres, soit A-RAF, B-RAF et RAF-1 (ou C-RAF). Sous sa forme inactive, RAF est localisé dans le cytoplasme et est associé à la protéine 14-3-3. Le processus d'activation de RAF requiert son recrutement à la membrane par RAS-GTP et est associé avec la déphosphorylation de la serine 259, sa dissociation d'avec 14-3-3 et sa stabilisation dans une conformation ouverte [15]. Il n'a pas été clairement établi si les différents paralogues de RAF ont la même affinité pour les différents isoformes de RAS, mais il a été rapporté que RAF-1 est recruté principalement par KRAS suivant une stimulation par des facteurs de croissance [16].

RAF-1 est exprimé ubiquitairement dans les différents tissus, alors que A-RAF est exprimé principalement en réponse aux stéroïdes, particulièrement dans les tissus urogénitaux et les reins. B-RAF est retrouvée dans la plupart des tissus, mais avec une prédominance au niveaux des tissus neuronaux et ses dérivés [17].

La phosphorylation de RAF-1 sur la sérine 259 médie sa liaison avec 14-3-3- et a un rôle négatif sur son activité. Il a d'ailleurs été démontré qu'une substitution en alanine de ce site augmente l'activité basale de RAF. Akt et PKA ont été associés à la phosphorylation de la serine 259. La déphosphorylation de la serine 259, suivant une stimulation par des facteurs de croissance, est médié par la protéine phosphatase 2A (PP2A) ou la protéine phosphatase 1 (PP1) [15]. De récentes études ont démontré que RAF-1 et B-RAF sont soumis à une régulation négative par ERK1/2. La phosphorylation de cinq résidus de RAF-1 (Ser29, Ser289, Ser296, Ser301 et Ser642) par ERK1/2, à la suite d'une stimulation par des facteurs de croissance, a été associée à une régulation négative de l'activité kinase de RAF [15, 18].

Des mutations de A-RAF et C-RAF sont extrêmement rares mais une mutation de la valine 600 en acide glutamique (V600E) de B-RAF est observée dans environ 8% des cancers et, plus spécifiquement, dans 43% des mélanomes, 27% des cancers de la glande thyroïde, 15% des cancers des ovaires et 15 % des cancer colorectaux [19]. Une douzaine de mutations de B-RAF ont également été répertoriées dans le CFC [10].

L'inhibition de RAF pour le traitement du cancer est une avenue intéressante. Parmi les inhibiteurs de RAF, se retrouve le Sorafenib ou Nexavar (BAY 43-9006), qui cible les protéines RAF-1 et très faiblement, B-RAF. Par contre, il a été démontré que la molécule n'est pas spécifique et que les récepteurs VEGF-R2 et VEGF-R3, FGFR-1, Flt3 et c-Kit, ainsi que le récepteur du facteur plaquettaire PDGF β sont également ciblés. Ceci étant dit, le Sorafenib est actuellement indiqué pour le carcinome hépatocellulaire (CHC) et le cancer rénal métastatique [20]. Plus récemment, le Vemurafenib ou Zelboraf (PLX4032, RG7204 ou RO5185426), un inhibiteur de BRafV600E, a été approuvé pour le traitement du mélanome métastatique.

1.1.3 Les MAP kinase kinases MEK1/2

MEK1 et MEK2 forment un duo de kinases dont les deux isoformes ont été hautement conservés, à travers l'évolution, avec environ 85% d'homologie. Les deux isoformes mammaliens sont : MEK1 (45 kD) (et sa forme alternativement épissée MEK1b (43 kD)) et MEK2 (46 kD). Ces protéines sont composées d'un domaine kinase entouré d'un domaine N-terminal de 80 acides aminés et d'un domaine C-terminal de 30 acides aminés [21].

MEK1/2 sont activés par la phosphorylation de deux serines (Ser218 et Ser222 pour MEK1), situées dans leur boucle d'activation dans le motif Ser-Xaa-Ala-Xaa-Ser/Thr, qui se localise entre les sous-domaines VII et VIII de la boucle catalytique de MEK1 [22]. Les principaux activateurs de MEK sont les membres de la famille RAF, mais d'autres kinases, tels que c-Mos, MEKK1 et Tpl-2, sont aussi habilités à phosphoryler ces deux résidus [23].

L'inactivation de MEK1/2 se fait par une rapide déphosphorylation de ces deux serines, principalement par la phosphatase Ser/Thr PP2A [24]. En plus de la phosphorylation des deux résidus de la boucle d'activation, l'activité de MEK1/2 est régulée par plusieurs événements de phosphorylation/déphosphorylation de divers résidus. Par exemple, la phosphorylation de la Ser386 de MEK1 se fait par ERK1/2. Cette phosphorylation peut à la fois inhiber l'activité de ERK1/2 ou, sous certaines conditions, faciliter son activation en augmentant la liaison de MEK1 avec la protéine d'échafaudage Grb10 [25]. La phosphorylation de la Ser298 de MEK1 par PAK1 interfère également avec son activation [26].

MEK1/2 sont des kinases à double spécificité qui, lorsqu'activées, phosphorylent les résidus thréonine et tyrosine de ERK1/2 (Thr183 et Tyr185), engendrant leur activation [27]. ERK1 et ERK2 sont les deux seuls substrats connus de MEK1/2. En plus de leur rôle d'activateurs, MEK1/2 agissent comme ancre cytoplasmique de ERK1/2 [28, 29]. Il a également été proposé que MEK transloque au noyau, uniquement pour procéder à l'exportation de ERK1/2 vers le cytoplasme [30].

Bien que la voie MEK/ERK1/2 soit fréquemment activée dans les cancers et les leucémies [31], des mutations de MEK1 ou MEK2 sont extrêmement rares. L'analyse de 207 tumeurs primaires du poumon a permis d'identifier une mutation somatique dans l'exon 2 de MEK1. La substitution K57N a été révélée dans deux adénocarcinomes pulmonaires [32]. Également, l'analyse d'une quinzaine de lignées de tumeurs ovariennes a révélé la substitution D67N [33]. Des mutations de MEK1 ont aussi été retrouvées dans des mélanomes (K57N), avec une prévalence de 3%, ainsi que dans des tumeurs du colon (D67N) dans 2,2% des cas. Aucune mutation de MEK2 n'a été répertoriée à ce jour [34]. L'expression de ces divers mutants de MEK1 a été associée à une augmentation de l'activation de ERK1/2 [32-34]. Une quinzaine de mutations de MEK1 et MEK2 ont aussi été rapportées dans le syndrome CFC [35, 36].

Une description détaillée des divers inhibiteurs de MEK1/2 se retrouve dans l'article

de revue présenté au chapitre 2.

1.1.4 Les MAP kinases ERK1/2

La dernière portion de la cascade des MAP kinases est composée des kinases ERK1 et ERK2, qui sont le produit des gènes conservés au cours de l'évolution, ERK1 (Mapk1) et ERK2 (Mapk3) [37-39]. En plus des deux principales protéines ERK1 (44 kD) et ERK2 (42 kD), qui ont environ 85% d'homologie, des formes alternativement épissées ont été décrites, soit : ERK1b chez les rongeurs [40], de même que ERK1c et ERK2b chez les primates [41].

Tel que mentionné précédemment, ERK1/2 sont activés par la double phosphorylation des résidus tyrosine et thréonine (Thr183 et Tyr185) de leur motif Thr-Xaa-Tyr [42] par MEK1/2. Des analyses de divers mutants de ERK1/2 avaient permis d'établir que la région comprise entre les acides aminés 312-320, localisée dans la partie C-terminale, est importante pour l'interaction de ERK avec MEK [29, 43]. Cette région avait alors été nommée séquence de rétention cytoplasmique (CRS), mais des études subséquentes ont démontré que cette portion interagit avec plusieurs autres protéines : elle fut dès lors nommé domaine de docking commun (CD) [44]. Les principaux sites d'interaction de cette région sont les acides aminés Asp316, Asp318 et Glu320 dans ERK2, ainsi que quelques résidus hydrophobes. Cette région est connue pour interagir avec les trois résidus basiques et deux résidus hydrophobes du N terminal de MEK appelé domaine D [45]. L'autre domaine important est le site de docking qui contient une séquence consensus Phe-X-Pro (domaine DEF) [46].

À ce jour, aucune mutation dans ERK1/2 n'a été associée au cancer [31]. Les inhibiteurs de ERK ne sont pas une avenue thérapeutique intéressante en raison d'un manque de spécificité. Le domaine de liaison à l'ATP de ERK, qui est similaire à celui des kinases dépendantes des cyclines (CDK), rend une inhibition spécifique de ERK plus difficile.

1.2 Mécanismes d'activation

La voie de signalisation de Ras/Raf/MEK/ERK1/2 peut être activée par divers mécanismes, tels que la liaison de ligands aux récepteurs tyrosines kinases ou aux récepteurs couplés aux protéines G, ainsi que par les récepteurs d'adhésion cellulaire tels que les intégrines. L'activation des divers composants du sentier Ras-ERK1/2 mène à l'activation ultime des MAP kinases ERK1/2, dont la phosphorylation des résidus de la boucle d'activation engendre une activité de mille fois supérieure à l'activité basale [47]. L'activation de ERK par MEK nécessite la reconnaissance de structures secondaires et de conformations spécifiques. ERK doit absolument être sous sa forme native car MEK n'est pas habilité à phosphoryler la protéine dénaturée ou des peptides dérivés de la séquence de la boucle d'activation [27] (figure 1.2).

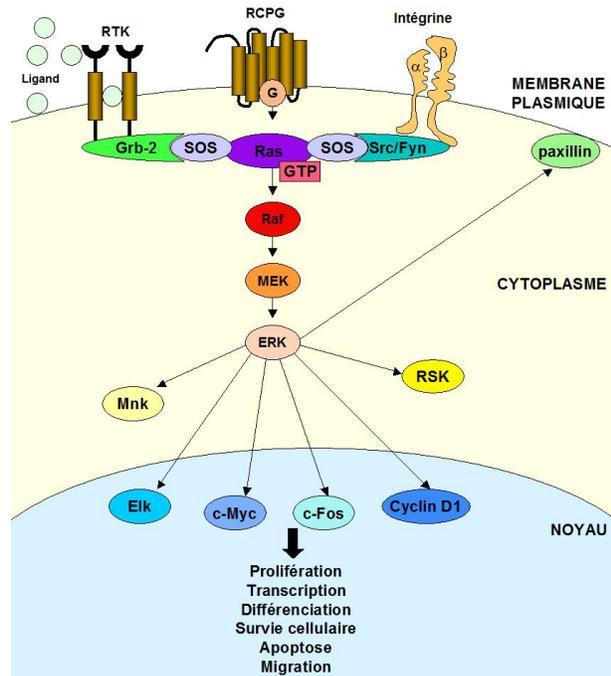


Figure 1.2 Mécanisme d'activation de la voie de signalisation de Ras/Raf/MEK/ERK1/2.

1.2.1 Voie des récepteurs couplés aux protéines G

La voie de signalisation des MAP kinases ERK1/2 peut être activée par des ligands qui stimulent les récepteurs couplés aux protéines G (GPCR). Les récepteurs compris dans cette famille sont formés de sept domaines transmembranaires constitués d'hélice- α et qui sont couplés aux protéines G hétérotrimériques. Les protéines G sont composées des sous-unités α , β et γ et, sous leur forme non activée, la sous-unité α est associée au GDP. À la suite d'une activation, le GDP est remplacé par un GTP ; ensuite, la protéine G hétérotrimérique se dissocie du récepteur et puis se scinde en sous-unités α -GTP et $\beta\gamma$ [48].

L'activation de ERK par la voie des récepteurs couplés aux protéines G est bien documentée [49, 50]. Il a même été démontré que la surexpression des sous-unités $\beta\gamma$ est suffisante pour l'induction de la phosphorylation de ERK via l'activation de RAS et de la phospholipase C- β (PLC- β) [51]. En fait, lorsque la protéine G hétérotrimérique est dissociée en sous-unités α -GTP et $\beta\gamma$, la sous-unité $\beta\gamma$ stimule la phosphorylation en tyrosine de Shc par Src via l'intermédiaire de PI-3 kinase- γ . Cette phosphorylation permet l'accumulation de RAS-GTP et, par conséquent, l'activation de la voie Ras-ERK1/2. Ainsi, les complexes Shc-Grb2 couplent le signal des GPCR jusqu'à ERK [52].

L'activation de ERK peut également se faire via les sous-unités $\alpha_q/11$: le mécanisme est alors dépendant de PKC et de la PLC- β plutôt que de PI-3 kinase- γ [53-55]. L'activation jusqu'à ERK1/2 peut aussi s'effectuer via les GPCR, la signalisation menant à ERK requérant alors la présence de la protéine kinase A, en plus d'impliquer la participation de Rap1 et B-RAF [56].

1.2.2 Voie des récepteurs tyrosine kinases

Les MAP kinases ERK1/2 sont aussi activées par des stimulus qui agissent sur les récepteurs à la surface des cellules, tels que les récepteurs tyrosine kinase (RTK). Des études ont démontré que le récepteur de l'EGF est rapidement phosphorylé en tyrosine à la suite d'une stimulation par des antagonistes des GPCR, tels que la thrombine, l'acide

lipophosphatidique [55] ou des facteurs de croissance tels que l'EGF, PDGF et IGF [57]. Cette activation a été associée à l'induction de l'expression de c-fos et à la synthèse de l'ADN, événement initié par l'activation de ERK. Ces effets sont inhibés par l'expression d'un dominant négatif du récepteur de l'EGF et il a été démontré que l'activité tyrosine kinase du récepteur EGF est essentielle à la réponse mitogénique des GPCRs [55].

La liaison des ligands de type EGF, PDGF ou IGF aux RTKs [57] enclenche l'homomérisation et/ou hétérodimérisation et stimule l'activité du récepteur. Le récepteur RTK activé peut alors s'autophosphoryler ou phosphoryler un de ses partenaires de dimérisation. Cette phosphorylation permet alors la création d'un motif phospho-tyrosine, qui sert de site d'ancrage pour les protéines adaptatrices qui contiennent un domaine SH2 [58], tels que Shc et Grb2 [59]. Les protéines qui contiennent un domaine SH3, tels que le facteur d'échange SOS, se lient plutôt à des régions riches en prolines [60]. Comme nous l'avons décrit précédemment à la section 1.1, SOS catalyse l'échange du GDP en GTP de RAS, permettant ensuite au RAS-GTP de recruter RAF à la membrane, ce qui permet sa phosphorylation par d'autres kinases. RAF activé peut ensuite enclencher l'activation du module MEK-ERK1/2 [61].

1.3.3 Voie des intégrines

L'activation de ERK1/2 peut également s'effectuer suite à l'adhésion cellulaire qui est modulée par les intégrines. Celles-ci font partie d'une famille de récepteurs transmembranaires qui sont constitués d'hétérodimères situés entre les sous-unités α et β . Ces sous-unités dirigent la liaison des cellules avec les protéines de la matrice extracellulaire (MEC) comme le collagène ou la fibronectine. Cette interaction intégrine/MEC permet la formation de points d'adhésion focaux et l'adhésion [62]. Les intégrines modulent à la fois des interactions mécaniques qui permettent l'adhésion cellulaire, mais aussi des interactions biochimiques qui modulent la signalisation cellulaire [63].

Des analyses menées par Aplin et *al.* (1999) [64] ont démontré qu'en réponse aux facteurs de croissance, les sous-unités $\alpha 2$, $\alpha 3$ et $\alpha 5$ des intégrines, activent fortement la voie des MAP kinase ERK1/2 et que le niveau d'activation était comparable, peu importe le type de chaîne α . Par contre, la stimulation par des facteurs de croissance de cellules maintenues en suspension, engendre plutôt une faible activation de ERK1/2. Des résultats similaires ont été observés avec l'utilisation d'anticorps dirigés contre l'intégrine [64-67].

En fait, la liaison des intégrines à la MEC induit la formation de complexes d'adhésion cellulaires via l'assemblage de protéines de signalisation et d'éléments du cytosquelette. En se liant à p125FAK, les intégrines induisent son autophosphorylation sur la tyrosine 397, ce qui permet alors le recrutement de Src ou Fyn via leur domaine SH2. Src recruté induit la phosphorylation de plusieurs composants du complexe d'adhésion, dont la phosphorylation de pFAK125, ce qui engendre la création d'un site de liaison pour le complexe Grb2-Sos et l'activation subséquente de la voie Ras-ERK1/2 [68].

L'activation de ERK peut aussi être induite via l'activation de la tyrosine kinase Fyn. Fyn recrute Shc et phosphoryle sa tyrosine 317, ce qui permet le recrutement du complexe Grb2-Sos et l'activation subséquente de la voie [69]. L'intensité de l'activation de la voie de ERK varie selon les acteurs : une activation par Fyn-Shc est associée à une activation rapide et intense alors qu'une activation via pFAK125 est plus lente, mais plus soutenue [70-72].

La régulation de l'activité de ERK1/2 par les intégrines peut se faire via la kinase activée p21 (PAK). L'activation de PAK1 par la GTPase Rac et la protéine Nck nécessite l'adhésion cellulaire [73]. Des études menées sur des cellules non adhérentes ont montré que le recrutement à la membrane de Rac est inhibé, ce qui empêche sa liaison avec Nck et son activation [74]. Il a également été rapporté que des traitements à la cytochalasine D, un agent de dépolymérisation de l'actine qui rompt les points d'adhésion focaux, engendre une diminution de l'activité de PAK1, ERK1/2 et FAK [75]. Plus encore, il semblerait que l'adhésion cellulaire et/ou l'intégrité du cytosquelette soit nécessaire pour la translocation

nucléaire de ERK dans certaines cellules. Enfin, il a été rapporté que des traitements à la cytochalasine D inhibent la translocation de ERK dans le noyau, de même que l'activation de Elk1, une cible nucléaire de ERK, critique pour l'entrée des cellules en cycle [76]. Il semblerait donc que l'adhésion cellulaire soit requise pour une activation optimale de ERK1/2 par les intégrines.

1.3 Les mécanismes d'inactivation

1.3.1 Les protéines phosphatases

Les protéines phosphatases des MAP kinases (MKPs) catalysent la déphosphorylation des MAP kinases activées. Les MKPs jouent un rôle pivot dans la détermination de la amplitude et la durée du signal. Leur distribution dans les divers compartiments sub-cellulaires et tissus, intensifient leurs spécificités. Les MKPs qui déphosphorylent ERK se classent en trois types, soit : le type I, comprenant MKP-1, MKP-2, PAC1 et hVH3 qui sont localisées au noyau ; le type II, constitué de MKP-3, MKP-X et MKP-4, ces phosphatases contiennent une séquence d'exclusion nucléaire (NES) et sont localisées dans le cytoplasme ; et le troisième type qui est constitué des MKPs atypiques, VHR et MKP-6. Ces MKPs atypiques sont des phosphatases à double spécificité, de petit poids moléculaire et qui sont localisées dans le noyau et le cytoplasme respectivement [77-79].

La régulation de ERK1/2 par les phosphatases peut agir sur plusieurs processus cellulaires. Par exemple, il a été observé qu'une déplétion de VHR induit un arrêt du cycle cellulaire en raison d'une hyperphosphorylation de ERK et JNK. En fait, VHR module finement les niveaux de phosphorylation de ERK selon les différentes phases du cycle. Il a donc été suggéré que VHR soit nécessaire pour une progression adéquate du cycle cellulaire [79].

La phosphatase hVH3 (ou DUSP5) quant à elle, peut moduler la localisation de ERK1/2. hVH3 engendre la translocation et la séquestration de ERK dans le noyau [80].

Cet ancrage nucléaire, spécifique à ERK, requiert la présence d'un NLS fonctionnel et d'une interaction entre le domaine MKB de hVH3 et le domaine CD de ERK. De plus, l'activité kinase de hVH3 n'est pas essentielle pour la rétention de ERK dans le noyau.

La phosphatase MKP-3 intervient aussi au niveau de la localisation de ERK1/2. Il a été démontré que l'habileté de MKP-3 à maintenir ERK dans le cytoplasme requière un NES et un domaine kinase (KIM) fonctionnels [81]. L'activité phosphatase de MKP-3 est augmentée par la liaison de ERK à son domaine MKB [82, 83].

Ainsi, non seulement les phosphatases peuvent réguler l'activité de ERK via une modulation de la déphosphorylation ou de la localisation de la kinase, mais ERK peut également jouer sur leur activation et leur dégradation. Des mécanismes de régulations positives des MKPs par ERK ont été caractérisés et suggèrent une boucle de régulation négative. Par exemple, MKP-1 est phosphorylé sur les résidus Ser359 et Ser364 par ERK, ce qui prévient sa dégradation par le protéasome 26S [84]. De plus, cette phosphorylation n'interfère pas avec sa capacité à déphosphoryler ERK.

1.3.2 La régulation négative par phosphorylation

La voie de signalisation de ERK est également assujetti à une régulation négative par phosphorylation. L'un des premiers mécanismes de rétroaction négatif identifié a été celui du facteur d'échange de nucléotides guanine SOS qui active RAS. La phosphorylation de SOS, à proximité de sa séquence riche en proline, inhibe l'interaction de SOS avec Grb-2. Cela prévient le recrutement de SOS à la membrane plasmique et, par conséquent, réduit l'activation de RAS. La phosphorylation de SOS est médiée par RSK2, une sérine/thréonine kinase directement activée par ERK dans le cytoplasme [85].

La phosphorylation de divers sites de RAF est un autre mécanisme de rétroaction négatif. L'hyperphosphorylation de six sérines (S29, S43, S289, S296, S301 et S642), dépendantes de la signalisation de MEK, coïncide avec l'inactivation de RAF-1, ce qui engendre une diminution de l'activation de ERK1/2 [15, 18]. En fait, la phosphorylation de

ces sites prévient l'interaction de RAF-1 avec RAS et promeut sa déphosphorylation par PP2A [86].

Une régulation négative par une phosphorylation de MEK est également possible. Des analyses *in vitro* et *in vivo* avaient associé la phosphorylation des thréonines 292 et 386 de MEK1 par ERK1/2 à une diminution de l'activité. Un mécanisme de contrôle par rétroaction négatif avait alors été proposé [87]. Non seulement la phosphorylation de la thréonine 292 de MEK1/2 a un effet inhibiteur sur ERK1/2, mais elle prévient également la phosphorylation de la sérine 298 de MEK1 par PAK1. Ceci empêchant la formation du complexe Rac1-PAK1, avec MEK1-ERK1/2, réduisant donc l'activation de la cascade de ERK1/2 [26] [88]. La phosphorylation de la thréonine 212 de MEK par ERK1/2 a également un effet inhibiteur sur son activité et cette phosphorylation [89] n'interfère pas avec les phosphorylations activatrices des sérines 218 et 222 de MEK1 ni sur la liaison avec ERK2 [90]. La phosphorylation de la thréonine 386 de MEK1 par cdk5/p35 a également été associée à une diminution de l'activation de ERK1/2 [91].

1.3.3 La dégradation protéolytique via le protéasome

L'inhibition définitive de la signalisation cellulaire se fait généralement par la dégradation de ses composantes protéiques. La plupart des protéines, cytoplasmiques ou nucléaires, sont ciblées localement pour une dégradation dépendante de l'ubiquitine (Ub) par le protéasome 26S [92]. Le protéasome 26S est un énorme complexe (de 2000 kDa) constitué d'environ 50 sous-unités qui est habilité à dégrader les peptides et les protéines via ses multiples activités protéases [93].

Les protéines visées pour la dégradation sont ciblées par les molécules d'Ub. L'ubiquitine est une protéine hautement conservée de 8 kDa qui se lie, de manière covalente, au résidu lysine des protéines à cibler pour la protéolyse. Les protéines peuvent être modifiées par une seule molécule d'Ub (monoubiquitination), par une chaîne d'Ub (polyubiquitination) [94] ou, encore, par l'addition d'Ub simple mais sur plusieurs résidus

lysines (multiubiquitination) [95]. Le processus d'ubiquitination classique requiert la présence de trois classes d'enzymes : i) l'enzyme activation de l'Ub (E1) ; ii) les enzymes de conjugaisons de l'Ub (E2) et ; iii) les ligases de l'Ub (E3) [96]. Plus de 600 E3 ont été répertoriées chez l'humain [97].

Dans une étude menée sur *Dictyostelium*, il a été observé que MEK1 est polyubiquitiné en réponse à un chémoattractant par l'ubiquitine ligase E3 MIP-1. MIP-1 a donc une double fonction : une dans le contrôle de la localisation nucléaire de MEK1 et une deuxième au niveau de sa dégradation via l'ubiquitination [98].

Des analyses *in vitro* et *in vivo* ont démontré que le domaine PHD de MEKK1 lui confère une activité de type E3 ligase envers ERK1/2. MEKK1 s'associe directement à ERK et stimule la polyubiquitination et la dégradation de ERK, en réponse à certains stress, tels que le sorbitol [99]. Ainsi, MEKK1 agit à titre d'activateur des voies de signalisation de ERK et JNK via son domaine kinase mais, il agit également à titre de régulation négatif grâce à son activité d'ubiquitine E3 ligase via son domaine PHD.

1.4 Les rôles spécifiques des isoformes de MEK1/2 et ERK1/2

1.4.1 Les modèles de souris knockout ERK1 et ERK2

Bien que les deux isoformes soient ubiquitairement exprimés dans les divers tissus et types cellulaires, le niveau d'expression de chacune des protéines varie d'un tissu à l'autre. Des niveaux plus élevés de ERK1 ont été observés dans le poumon et l'intestin, alors que des niveaux plus élevés de ERK2 ont été associés aux tissus cardiaques et musculaires. Des différences au niveau de l'ARN messager (ARNm) de ERK1 et ERK2 ont aussi été relevés lors de la différenciation de tératocarcinome P19 [39]. Ces observations suggèrent que chacune des isoformes de ERK pourrait avoir des rôles spécifiques.

1.4.1.1 Le modèle de souris knockout ERK1

La spécificité de l'isoforme de ERK1 a été étudiée par la génération d'une souris déficiente en ERK1 par recombinaison homologue dans des cellules souches embryonnaires. Les souris *Erk1*^{-/-} sont viables, fertiles et de taille normale. L'ablation spécifique de ERK1 n'influence pas le niveau d'expression de l'isoforme ERK2 dans les cellules du thymus, de la rate, du nerf sciatique ou les fibroblastes embryonnaires de souris (MEFs). Aucune différence dans le taux de prolifération des MEFs *Erk1*^{-/-} versus les MEFs de type sauvage n'a été observé. Cependant, il été observé que la maturation des thymocytes en cellules CD4⁺ et CD8⁺ des souris *Erk1*^{-/-}, est réduite de moitié [100]. Ces résultats ont toutefois été invalidés dans une étude menée par un autre groupe, qui a montré que l'activité de ERK1/2 n'est pas requise pour la complétion de la différenciation ni pour la maturation des thymocytes en cellules CD4⁺ et CD8⁺ [101].

Également, notre laboratoire a démontré des variations dans la prolifération des MEFs *Erk1*^{-/-} en fonction des fonds génétique des souris. Nous avons observé que les MEFs *Erk1*^{-/-} prolifèrent significativement moins que des MEFs de type sauvage en fond génétique CD-1. Alors que, tel que publié par Pagès et al. [100], les MEFs *Erk1*^{-/-} dérivées des souris de fond mixte 129 X C57BL/6 prolifèrent similairement aux MEFs de type sauvage [102].

Un rôle pour ERK1 dans le système immunitaire a également été rapporté. Les souris *Erk1*^{-/-} ont une sensibilité plus accrue à des peptides de la glycoprotéine oligodendrocyte de la myéline (MOG35-55) et développent une encéphalite auto-immune expérimentale plus sévère que les souris de type sauvage. Il semble donc que ERK1 ait un rôle spécifique dans les réponses auto-immunes via les cellules Th1 [103].

1.4.1.2 Le modèle de souris knockout ERK2

Bien que l'inactivation de l'isoforme ERK1 n'affecte pas la viabilité des souris [100], l'ablation de l'isoforme de ERK2, telle que démontré par les travaux du Dr Saba El Leil [104] dans le laboratoire, est associée à une létalité embryonnaire précoce chez la souris. La létalité survient après le stade de l'implantation et se caractérise par une incapacité des embryons *Erk2*^{-/-} à former le cône ectoplacentaire et l'ectoderme extra-embryonnaire, qui doit donner place au trophoblaste mature. Bien que ERK1 et ERK2 soient largement exprimés durant tous les stades du développement embryonnaire, l'incapacité de *Erk1* à compenser pour la perte de *Erk2* suggère une fonction spécifique de l'isoforme de ERK2 pour le développement normal du trophoblaste chez la souris. En fait, la signalisation de ERK2 serait requise pour la prolifération des cellules souches trophoblastiques (TS) du trophoctoderme polaire [104]. Cette hypothèse est d'ailleurs supportée par des analyses *in vitro*, qui ont démontré que des lignées de cellules TS ne peuvent pas être générées en présence d'inhibiteurs de MEK1/2 [105].

Le modèle knockout de *Erk2* a donc permis de suggérer un rôle différentiel de ERK1 et de ERK2 dans la prolifération et la différenciation de certains types cellulaires. Il avait également été suggéré que l'activation de ERK1/2 est dispensable pour la prolifération des cellules ES mais essentielle pour leur différenciation [106]. Le modèle de souris *Erk2*^{-/-} a permis de confirmer cette hypothèse : aucun changement dans la prolifération des cellules épiblastiques provenant des embryons *Erk2*^{-/-} ou de type sauvage, au jour E6,5, n'a été observé. Ces résultats indiquent que dans les lignées cellulaires précoces, les cellules répondent différemment à la signalisation de ERK1 et de ERK2.

Dans un tout autre registre, de récentes études ont proposé un rôle unique de ERK2 dans le processus de reconsolidation de la mémoire en réponse à la peur [107]. Des études

subséquentes, menées par une autre équipe, ont associé ERK2 avec la mémoire à long terme, de même qu'avec l'apprentissage [108].

1.4.2 Le modèle de souris knockout de MEK1 et de MEK2

La protéine MEK2 est à 80% identique et à 90% similaire à la protéine MEK1 chez la souris, alors que chez *Xenopus*, elle est à 91% identique et à 96% similaire [109-111]. Deux régions de MEK2 ont une homologie, plus restreinte, avec MEK1, soit le domaine de docking de ERK, qui inclut la séquence d'exclusion nucléaire (identique à 33% et similaire à 66%) et la séquence spécifique de MEK, qui contient le site de phosphorylation par PAK1 et le domaine d'interaction avec RAF (21% identique et 36% similaire) [28, 112-114]. Les différences de séquence observées entre MEK1 et MEK2 suggèrent une divergence au cours de l'évolution qui pourrait mener à des fonctions uniques de MEK1 et MEK2.

1.4.2.1 Le modèle knockout de MEK1

L'étude du rôle spécifique du gène *Mek1* a démontré un rôle essentiel de la protéine dans le développement placentaire. Aucune anomalie n'a été détectée avant la mi-gestation des embryons *Mek1*^{-/-}. Cependant, à 10,5 jours de gestation, les souris déficientes des deux allèles de MEK1 meurent. Les analyses histopathologiques ont révélé une diminution de la vascularisation du placenta caractérisée par une réduction des cellules vasculaires endothéliales au niveau du labyrinthe. La fonction de *Mek1* est donc requise pour une réponse normale aux signaux angiogéniques et promeut la vascularisation de la région labyrinthique du placenta.

Également, la présence de *Mek2* ne s'est pas avérée suffisante pour compenser la perte de *Mek1* dans les MEFs *Mek1*^{-/-}. Les essais de migration menés sur des fibroblastes *Mek1*^{-/-} ont démontré que les cellules n'étaient pas habilitées à migrer sur la fibronectine,

bien que les niveaux de MEK2 et l'activation de ERK1/2 aient été normaux. La réexpression de MEK1 dans les MEFs *Mek1*^{-/-} a permis de restaurer leur capacité de migration [115].

1.4.2.2 Le modèle knockout de MEK2

L'inactivation du gène de *Mek1* est létale au stade embryonnaire et a démontré un rôle unique de MEK1 dans l'angiogénèse [115]. Toutefois, l'inactivation du gène de *Mek2* n'a pas révélé de phénotype particulier, que se soit au niveau du poids, de la durée de vie ou du comportement des animaux. Les souris *Mek2*^{-/-} sont viables, fertiles et ne présentent aucune altération morphologique ou défaut de croissance. Il semblerait donc que les fonctions de *Mek2* soient redondantes avec celles de *Mek1*. Ainsi, la protéine MEK2 ne possède pas de fonction spécifique ou essentielle au développement de l'animal qui ne puisse pas être compensée par la protéine MEK1 [116].

1.4.2.3 La délétion des deux isoformes de MEK1/2

Les interactions génétiques et la redondance fonctionnelle de *Mek1* et *Mek2* dans le renouvellement des cellules épithéliales ont été étudiées dans le laboratoire du Dr Khavari (2007) [117]. L'absence de l'une ou l'autre des deux protéines dans l'épiderme n'a pas donné de phénotype détectable à la naissance ou à l'âge adulte. Toutefois, le double knockout (DKO) s'est avéré létal. Les souris DKO meurent dès les premières 24 heures suivant la naissance, principalement de déshydratation et d'une anomalie fonctionnelle des barrières épidermiques. Vers la fin de l'embryogenèse, l'épiderme des DKO démontre une hypoprolifération et une augmentation de l'apoptose des cellules épidermiques, ce qui explique l'hypoplasie épidermique observée chez les nouveau-nés. La délétion de *Mek1* et *Mek2* dans l'épiderme adulte résultent en une inhibition de la prolifération et une apoptose

massive des cellules épidermiques, accompagnées de l'induction des caspases 3 et 9, qui sont associées à l'apoptose.

Il pourrait sembler surprenant à première vue, que l'ablation de l'un ou l'autre des isoformes de MEK n'ait aucun phénotype, alors que l'ablation des deux résulte en une drastique anomalie [117]. Toutefois, il est possible que le phénotype se développe plus tardivement à la suite de l'excision d'un seul isoforme ou que la sévérité soit très faible et passe alors inaperçue.

1.4.3 Les modèles de souris transgéniques de MEK

Au cours des dernières années, plusieurs modèles *in vivo* ont été développés afin de caractériser le rôle de MEK1 dans divers processus et/ou tissus spécifiques. Plutôt que par l'ablation de la protéine, l'étude s'est effectuée à l'aide de modèles de souris transgéniques exprimant la protéine constitutivement active dans des tissus particuliers. Des animaux transgéniques exprimant MEK1 activé dans les tissus cardiaques, le cristallin, les chondrocytes et la peau ont ainsi été créés.

1.4.3.1 L'expression de MEK1 constitutivement actif dans le coeur

Afin d'examiner le rôle de MEK1 dans la régulation de l'hypertrophie cardiaque *in vivo*, l'équipe du Dr Molkenin (2000) [118] a généré des souris transgéniques exprimant MEK1 actif sous le contrôle d'un promoteur spécifique au tissu cardiaque (promoteur des chaînes lourdes de l' α -myosine). Les animaux transgéniques sont affectés d'une hypertrophie concentrique ventriculaire accompagnée d'une augmentation de l'épaisseur septale et du mur postérieur du ventricule gauche de 50%. Toutefois, les souris ne démontrent aucun signe de cardiomyopathie ou de létalité jusqu'à l'âge de 12 mois [118]. Ces souris MEK1EE/ α -myosine ont un phénotype cardiaque comparable aux souris transgéniques exprimant RAS oncogénique dans les ventricules, mais moins sévère car

elles demeurent dans un état non-myopathique [119].

1.4.3.2 L'expression de MEK1 actif dans le cristallin

Pour comprendre le rôle de la voie de signalisation des MAP Kinases ERK1/2 dans la fonction du cristallin, une souris exprimant MEK1 constitutivement actif (MEK1 S218E/S222E), sous le contrôle du promoteur α -A-cristallin, a été générée. Aucun changement notable dans le cristallin n'a été observé dans les premiers jours suivant la naissance. Toutefois, après quatre semaines, les souris transgéniques ont développé de la macrophtalmie et des cataractes. Plusieurs altérations morphologiques, tels qu'une augmentation de la taille du cristallin, un élargissement des espaces intercellulaires et une augmentation des vacuoles cytoplasmiques, ont été observées dans les régions corticales. De plus, les cristallins des souris transgéniques ont un taux quatre fois plus élevé du transporteur de glucose de type 1 (GLUT1) et ont une augmentation du taux de glucose de 80% [120]. L'expression de HRAS oncogénique dans le cristallin est suffisante pour stimuler la prolifération des cellules du cristallin, induire de l'hyperplasie, mais ne permet toutefois pas la différenciation prématurée des cellules épithéliales du cristallin. L'expression de HRAS oncogénique dans le cristallin engendre exactement le même phénotype que l'expression de MEK1 actif, soit une hyperplasie dépourvue de différenciation précoce [121], démontrant donc l'implication majeure de ERK1/2 dans le phénotype.

1.4.3.3 L'expression de MEK1 actif dans les chondrocytes

L'étude du rôle de MEK1 dans le développement et la différenciation des chondrocytes a été menée par Murakami et *al.* (2004) [122]. Les souris transgéniques exprimant un mutant constitutivement actif de MEK1 (S218E/S222E) et le promoteur Col2 α 1, ont un phénotype similaire à l'achondroplasie. L'achondroplasie est la forme de nanisme la plus commune chez l'humain et elle est causée par des mutations activatrices de FGFR3. Les animaux transgéniques MEK1EE/Col2 α 1 ont une hypertrophie incomplète des

chondrocytes dans les plaques de croissance et ont un retard de l'ossification endochondrale. Une réduction du collagène de type X et une persistante expression de Sox9 ont été observées dans les chondrocytes. Ces résultats indiquent que la voie de ERK1/2 inhibe la différenciation hypertrophique des chondrocytes et régule négativement la croissance des os, sans affecter la prolifération des chondrocytes. Une diminution de la taille des chondrocytes en comparaison aux lignées issues des animaux de type sauvage est également observée chez les animaux transgéniques. L'expression de MEK1 actif dans les chondrocytes engendre donc une différenciation hypertrophique et l'achondroplasie [122].

1.4.3.4 L'expression de MEK1 et MEK2 actif dans la peau

Deux modèles d'animaux décrivant l'expression de MEK1 spécifiquement dans la peau ont été analysés. Le premier modèle, avec MEK1 actif et le promoteur involucrine, qui permet l'expression de MEK1 dans les couches suprabasale de la peau, a été créé. De deux à trois mois suivant la naissance, les souris transgéniques ont montré des signes importants d'hyperkératose et une hyperprolifération prononcée [123].

Le deuxième modèle de souris, permettant l'expression de MEK1 actif au niveau de la kératine (promoteur de la kératine 14), de façon inductible au 4-hydroxytamoxifen (4-OHT), a été créé. L'ajout de 4-OHT topique sur le dos des souris induit une hyperplasie épidermique et de l'hyperkératose. De façon surprenante, le modèle de la souris MEK2 activé-kératine 14, n'a développé aucun phénotype. Bien qu'une augmentation de la phosphorylation de ERK1/2 ait été relevée dans les tissus, aucune altération de l'homéostasie épidermique n'a été observé dans les souris MEK2 activé [124].

Les deux modèles de souris transgéniques de MEK1 activé ont mis en relief une forte phosphorylation de ERK1/2. Une augmentation de la taille des glandes sébacées, un marquage de Ki-67 dans les couches basales de l'épithélium, l'expression du marqueur kératine 6 dans l'épiderme interfolliculaire et un délai dans la différenciation terminale a été noté. Le modèle de souris MEK1 actif dans l'épiderme répète les phénotypes d'hyperplasie

et d'inhibition de la différenciation cutanée qui sont observés avec les souris transgéniques de RAS ou RAF activé exprimé dans la kératine [125].

1.5 La localisation et les mécanismes de transport de MEK1/2 et ERK1/2

1.5.1 La localisation subcellulaire de MEK1/2

Dans les cellules en quiescence, les divers composés de la cascade de MEK/ERK1/2 sont localisés dans le cytoplasme. MEK est essentiellement cytoplasmique en raison de sa puissante séquence d'exclusion nucléaire (NES) situé dans le domaine N-terminal de la protéine [126, 127]. L'interaction de MEK avec différentes protéines d'ancrages et d'échafaudages contribue également à sa localisation cytoplasmique. Parmi celles-ci, citons KSR1 près de la membrane plasmique [128], Sef au niveau de l'appareil de Golgi et de la membrane [129], ainsi que paxilline sur le cytosquelette [130, 131] (Figure 1.3).

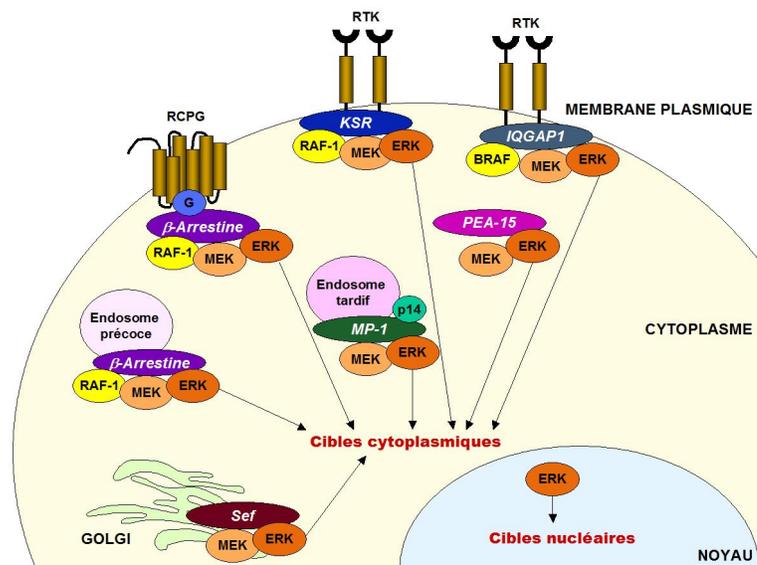


Figure 1.3. Schéma des différentes protéines associées à la localisation cytoplasmique de MEK/ERK1/2.

Bien que les régions responsables des interactions de MEK avec les protéines d'échafaudages ne soient pas complètement caractérisées, le domaine D basique, qui médie

aussi l'interaction de MEK avec ERK, a été associée à des interactions qui stabilisent la localisation cytoplasmique de MEK [44]. Le domaine DVD, qui interagit avec les régulateurs en amont [132], de même que les résidus du C-terminal, a aussi été associée à des interactions qui maintiennent MEK dans le cytoplasme [133].

Bien qu'initialement on ait cru que MEK résidait exclusivement dans le cytoplasme des cellules [126, 134], il est désormais établi que MEK fait la navette entre le cytoplasme et le noyau [127]. Sous stimulation, MEK se détache de ses ancrages cytoplasmiques et transloque rapidement dans le noyau. MEK est toutefois rapidement exporté en raison de son NES et des exportines. Des analyses ont d'ailleurs révélé que l'export de MEK du noyau se fait dix fois plus rapidement que son import nucléaire [135, 136].

La fonction de cet aller-retour de MEK dans le noyau, n'est pas clairement établie. Il a été proposé que MEK transloque au noyau pour aller phosphoryler sa seule cible connue : ERK. Une autre fonction possible de cette translocation, davantage étayée, serait l'export nucléaire de protéines qui ne contiennent pas de NES. Il a été démontré que MEK interagit avec ERK inactif dans le noyau via leur domaine interaction respectifs (D et CD) et que MEK est habilité à exporter ERK du noyau vers le cytoplasme. L'export peut s'effectuer rapidement après la stimulation ou plus tardivement [30]. Ce mécanisme n'est pas restreint exclusivement à ERK car il a été démontré que le récepteur nucléaire PPAR γ interagit avec MEK et qu'il est exporté du noyau par MEK à la suite d'une stimulation mitogénique [136]. Il n'a pas encore été établi si ce rôle «d'exportateur nucléaire» de MEK s'étend à d'autres candidats. Mais étant donné l'existence de plusieurs protéines nucléaires possédant un domaine CD, il est possible que MEK joue un rôle de transporteur nucléo-cytoplasmique pour certaines protéines, en plus de son rôle d'activateur et d'ancre cytoplasmique pour ERK.

1.5.2 La localisation subcellulaire de ERK1/2

Il en va de même pour ERK1/2, qui demeurent presque exclusivement dans le cytoplasme des cellules en quiescence. Suivant une stimulation mitogénique, de 60 à 70% des molécules de ERK1/2 transloquent dans le noyau [134]. ERK est maintenu dans le cytoplasme en raison de nombreuses interactions protéiques avec soit MEK1/2, les protéines d'échafaudages, les protéines d'ancrages [43], les microtubules [137, 138] ou les phosphatases [139].

Ces interactions peuvent être classées en deux catégories : les réversibles, qui s'effectuent principalement via la séquence de rétention cytoplasmique de ERK (CRS/CD) et qui sont les plus fréquentes [29] et les permanentes, médiées par les régions L6 et KID [137, 140]. Les interactions de ERK1/2 peuvent également s'effectuer via les résidus 91-95, qui sont responsables des interactions avec les microtubules [137] ou via le domaine de liaison DEF situé dans le lobe du domaine kinase de ERK1/2 [141].

À la suite d'une stimulation mitogénique, les molécules de ERK1/2 qui sont liées par le domaine CD (environ de 65 à 75%) se détachent de leur protéines d'ancrages, en raison du changement de conformation de leur bouche d'activation [141]. Elles transloquent ensuite vers différents sites, où elles interagissent avec leurs substrats, principalement via le domaine de liaison DEF [142]. Toutefois, un autre type d'interaction (environ de 25 à 35%) qui ne permet pas le détachement de ERK1/2, séquestre ERK1/2 dans le cytoplasme, sans qu'une interaction avec d'autres organelles ne soit possible [138]. La protéine d'ancrage, β -Arrestine, en est un exemple [143]. En fait, la proportion de molécules de ERK1/2 détachées versus celles constitutivement attachées correspond directement à la localisation de ses divers substrats, soit environ 50% se localisant dans le noyau, 40% dans le cytoplasme et 10% au niveau des autres organelles [144].

1.5.3 Les mécanismes de transport de MEK1/2 et ERK1/2

En dépit de l'importance de la translocation nucléaire de ERK dans la signalisation de cette voie, les mécanismes qui y sont associés n'étaient pas bien caractérisés jusqu'à tout récemment. Dans la cellule, le noyau est séparé du cytoplasme par l'enveloppe nucléaire, qui assure la sélection des différentes protéines qui transloquent au noyau à travers le complexe des pores nucléaires (NPC) [145]. Le NPC est constitué d'une trentaine de protéines appelées nucléoporines, qui forment un canal permettant le transport nucléocytoplasmique des molécules. Les petites protéines d'environ 45 kDa et moins peuvent librement transloquer au noyau via le NPC, mais les protéines de plus hauts poids moléculaire ont recours à des mécanismes de transport énergie-dépendants qui requièrent l'interaction du NLS ou d'un autre signal avec des importines (Importine- α et Importine- β pour le NLS) [146] (Figure 1.4).

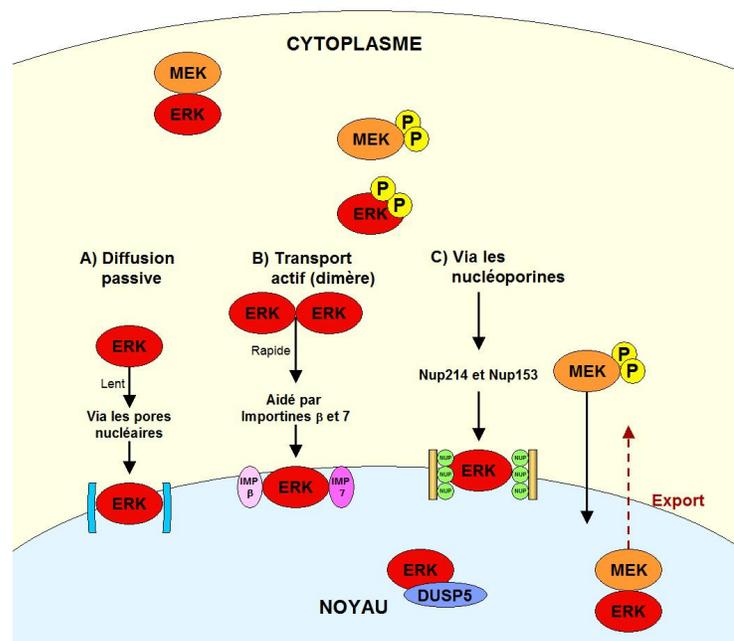


Figure 1.4. Schéma des mécanismes de transport de ERK1/2. A) Par diffusion passive. B) Transport actif, sous forme de dimère. C) Via une interaction avec les nucléoporines.

1.5.3.1 L'import nucléaire de ERK1/2

Les mécanismes régulateurs de la localisation subcellulaire de ERK1/2 ont été largement étudiés. Il a été démontré que ERK transloque dans le noyau via trois mécanismes : i) par diffusion passive, sous forme de monomère via les pores nucléaires; ii) par transport actif sous forme de dimère et; iii) via un mécanisme dépendant des nucléoporines [147-150]. Plus récemment, une séquence de trois acides amines, nommée séquence de signal SPS, a été associée à la translocation nucléaire de ERK [151].

1.5.3.1.1 La diffusion passive

ERK1/2 sont suffisamment petits (44 kD et 42 kD) pour entrer dans le noyau par diffusion passive via les pores nucléaires. La liaison de ERK1/2 avec MEK1/2 forme un hétérodimère MEK/ERK qui engendre la localisation cytoplasmique du complexe. La phosphorylation de ERK1/2 par MEK1/2 est suffisante et nécessaire pour activer la dissociation de ERK1/2 du complexe et promouvoir sa translocation au noyau [28].

1.5.3.1.2 Le transport actif sous forme de dimère

ERK2 phosphorylé peut former un homodimère avec ERK2 inactif. La prévention de cette homodimérisation par mutagenèse de ERK2 réduit l'accumulation au noyau de ERK2, indiquant que la dimérisation semble importante pour la translocation nucléaire [152]. Des études subséquentes ont démontré que les Importine- β et Importine-7 sont des composés essentiels au mécanisme de transport actif [148]. Ceci étant dit, des études menées avec RanQ69L, qui est déficient en activité GTPases, n'ont pas réussi à bloquer complètement l'entrée de ERK2 dans le noyau, suggérant donc que ERK2 monomérique est tout de même habilitée à transloquer dans le noyau par diffusion passive.

1.5.3.1.3 Le transport via des interactions avec les nucléoporines

Un troisième mécanisme a été découvert plus récemment avec l'aide de protéines fusionnées à la GFP. Les travaux ont révélé que ERK2-GFP, qui est trop large pour passer à

travers les pores nucléaires par diffusion passive, entre au noyau via une interaction avec les nucléoporines. Il a été observé que ERK2 interagit directement avec les nucléoporines Nup214 et Nup153 via un mécanisme ATP-indépendant [149, 150].

1.5.3.1.4 La translocation nucléaire de MEK et ERK via la séquence SPS

Un quatrième élément de régulation de la localisation vient s'ajouter. Il avait été démontré, par l'équipe de Coob et *al.* (2007) [153], que des mutations du domaine KID de ERK altéraient les interactions avec les motifs FXF, réduisant alors la liaison de ERK avec Nup153, ce qui a pour effet de ralentir l'import nucléaire de ERK [153]. Des analyses subséquentes du domaine KID ont conduit à la détermination d'une séquence de trois acides aminés (Ser244-Pro245-Ser246), nommés SPS, qui est requise pour la régulation de la localisation de ERK [151]. La substitution en alanine ou la délétion de ces trois résidus engendre la séquestration dans le cytoplasme de ces mutants de ERK2. En fait, la phosphorylation de la séquence SPS semblerait requise pour l'interaction de ERK2 avec l'Importine-7 et son relâchement des protéines des pores nucléaires.

Plusieurs protéines qui transloquent au noyau, tels que SMAD3 et MEK1, possèdent également cette séquence signal SPS (ou TPT pour MEK1). D'ailleurs, le mutant en alanine du domaine TPT de MEK1 a corroboré les observations faites avec ERK2 : le mutant AAA-MEK1 est demeuré dans le cytoplasme. Ces résultats suggèrent que le domaine TPT pourrait être un autre élément régulateur de sa translocation nucléaire de MEK; ce mécanisme est par ailleurs observé dans des cellules stimulées et non stimulées [151].

En conclusion, il n'a pas été clairement établi si ces mécanismes sont d'importances similaires pour la translocation nucléaire de ERK1/2 ou s'il y a un mécanisme qui est privilégié. Il a toutefois été démontré, par de l'imagerie en temps réel de cellules vivantes, que le mécanisme de transport actif n'est pas le mode dominant et que ERK1/2 semblent transloquer au noyau principalement par des mécanismes énergie-indépendants [154].

1.5.3.2 L'export nucléaire

L'accumulation dans le noyau de ERK1/2 peut être modulée par des protéines d'ancrages nucléaires. Ces protéines d'ancrages sont de courte vie et sont régulées par l'activité même de ERK1/2 [155]. DUSP5, une phosphatase inductible qui interagit spécifiquement avec ERK2 via le domaine KIM, en est un exemple. L'expression de DUSP5 engendre la séquestration de ERK2 inactif dans le noyau. L'ancrage nucléaire de ERK2 par DUSP5 est spécifique et requiert un NLS fonctionnel, de même que l'interaction du domaine KIM de DUSP5 avec le site de docking de ERK2 [80].

L'accumulation de ERK1/2 dans le noyau est cependant transitoire. Il a été proposé que ERK1/2 doivent se relocaliser au cytoplasme afin d'être disponible pour une prochaine stimulation. Par le biais d'analyse de FRET, l'équipe de Matsuda et *al.* (2006) [156] a observé que, tel que précédemment décrit [126], l'export de MEK du noyau se fait beaucoup plus rapidement que celui de ERK, en raison du NES de MEK. Ils ont aussi observé que le statut de phosphorylation de MEK n'affecte pas significativement sa vitesse d'export du noyau. Cependant, la vitesse d'export du noyau de ERK est grandement supérieure en présence de MEK actif que lorsque ERK est seul. Les analyses d'import nucléaire n'ont toutefois pas démontré de différence dans la vitesse d'entrée de ERK en présence ou en absence de MEK actif : seul l'export nucléaire de ERK est influencé par son activité [156]. Ces observations étayent l'idée que MEK1/2 serviraient à la relocalisation de ERK1/2 au cytoplasme [30, 156].

1.6 La régulation spatio-temporelle de la cascade de signalisation de MEK/ERK1/2

La voie de signalisation de ERK1/2 est activée par de nombreux stimulus extracellulaires. L'activation de la cascade enclenche diverses réponses cellulaires, telles que la prolifération, la différenciation, le développement et, sous certaines conditions, la migration, la survie cellulaire, la détermination morphologique et l'apoptose. Lorsque

dérégulée, la voie de signalisation de ERK1/2 est aussi associée à la transformation oncogénique [144, 157-159].

La capacité du sentier de signalisation des MAPKs ERK1/2 à transmettre des signaux aussi différents, voire même opposés, est possible grâce à des mécanismes de régulation diversifiés, tels que : i) la force ou amplitude du signal; ii) la durée du signal; iii) l'interaction avec diverse protéines d'échafaudages; iv) la localisation subcellulaire de MEK/ERK1/2; v) l'interaction avec d'autres voies de signalisation et, finalement; vi) la présence de plus d'un isoforme.

1.6.1 La régulation de l'amplitude de MEK/ERK1/2

Un premier modèle, basé sur les cinétiques d'activation de ERK, a démontré que la stimulation avec l'EGF des cellules PC12 engendre leur prolifération, alors qu'une stimulation avec le NGF engage plutôt un processus de différenciation en neurites [160]. Bien que l'activation de ERK1/2 soit responsable des deux processus, il a été démontré qu'une activation forte et transitoire par l'EGF permettait la prolifération, alors qu'une activation forte, mais soutenue, engendrait plutôt l'accumulation nucléaire et la différenciation [161].

Des études subséquentes ont démontré à l'aide de mutants de l'activité de Raf (Δ Raf:ER), qu'un faible niveau d'activité de Raf mène à l'activation des complexes Cyclin D/cdk4 et Cyclin E/cdk2 et à la progression du cycle cellulaire. Alors qu'une activation plus forte de Raf, engendre l'induction de p21, une inhibition de l'activité des complexes cyclins/cdks et un arrêt du cycle cellulaire. Ces résultats indiquent que dépendamment du niveau de l'activité kinase, Raf peut engendrer la progression du cycle cellulaire et la prolifération ou engendrer un arrêt du cycle cellulaire menant à la différenciation des cellules [162].

1.6.2 La régulation temporelle de MEK/ERK1/2

Tout comme la force du signal, la durée revêt une importance. Murphy et *al.* (2002) [163] ont montré qu'une activation transitoire de ERK1/2 influençait la transcription et l'activité des gènes précoces immédiats, tels que c-Fos, c-Jun, c-Myc et Egr1 [163, 164]. Ainsi, lorsque ERK1/2 sont transitoirement activés, l'expression de c-Fos est induite mais, si l'activation de ERK1/2 décline rapidement, c-Fos ne peut pas s'accumuler. Par contre, lorsque l'activation de ERK1/2 est soutenue, c-Fos peut être phosphorylé et activé par ERK1/2 et RSK1/2. c-Fos activé peut ensuite induire l'expression d'un plus large répertoire de gènes et participer à la régulation de processus plus tardifs comme la progression du cycle cellulaire [164].

Cette corrélation de force et de durée a également été observée dans d'autres systèmes [165], notamment chez la *Levure*, où il a été démontré que l'activation soutenue de KSS1 (l'homologue des MAPKs) est requise pour la croissance des filaments, alors qu'une activation transitoire de KSS1 est associée à l'accouplement [166].

1.6.3 La régulation par les protéines d'échafaudages

Un autre mécanisme qui contribue à la spécificité de la cascade ERK est la formation de complexes multi-protéiques via les protéines d'échafaudages. Les protéines d'échafaudages permettent une plus grande stabilité des différents éléments de la cascade de signalisation. Elles permettent aussi la détermination de la localisation des composés [167], ainsi que la régulation de l'activité des composés, en les protégeant des phosphatases par exemple [168]. À ce jour, plus de 50 protéines d'échafaudages et protéines d'ancrages ont été associées à la cascade signalétique de ERK1/2 [43].

L'une des protéines d'échafaudage les plus étudiées de la voie de ERK1/2 est KSR1. MEK1/2 et ERK1/2 s'associent directement à KSR1 après stimulation, alors que dans les cellules en quiescence, KSR1 est associé exclusivement à MEK1/2. La liaison de MEK1/2 à KSR1 se fait directement via un domaine de type kinase, alors que l'interaction de KSR1

à Raf1 semble être indirecte [169].

D'autres protéines, telles que β -Arrestine, participent à la cascade ERK1/2 en se liant à ERK1/2, MEK1/2 et Raf1 de façon irréversible. β -Arrestine facilite l'activation de la cascade de ERK1/2 à la membrane en prévenant sa translocation au noyau, favorisant ainsi les substrats cytoplasmiques de ERK1/2 [143].

Paxilline, qui est un composant des plaques focales d'adhésion, interagit avec les composés de la voie de signalisation de ERK1/2 et permet la régulation de la morphogénèse épithéliale [170] ainsi que de la migration cellulaire [130]. Similairement à KSR1, paxilline semble constitutivement lié à MEK1/2, alors que ERK1/2 et Raf1 sont recrutés seulement lorsqu'ils sont activés [170]. Sef et MP1 sont deux autres protéines d'échafaudages importantes qui régulent la voie de ERK1/2 en dirigeant sa localisation dans certains compartiments du cytoplasme [128,169] (voir section suivante) (figure 1.3).

1.6.4 La régulation spatiale de MEK/ERK1/2

La restriction à certains compartiments cellulaires des composés de la voie de signalisation de ERK1/2 est un autre mécanisme de régulation du sentier. Selon sa localisation, ERK a accès à différents substrats, ce qui permet la génération de réponses variées. Dans les cellules en quiescence, les membres de la cascade de Raf/MEK/ERK1/2 sont localisés dans le cytoplasme et, suite à une stimulation, la distribution cytoplasmique des éléments de la voie se modifie. Ainsi, RAF-1 est recruté à la membrane en raison de son interaction avec RAS activé [171] puis, une fois activés, MEK1/2 et ERK1/2 peuvent quitter leurs ancras cytoplasmiques. ERK peut transloquer au noyau, via divers mécanismes, ou demeurer dans le cytoplasme selon les substrats ciblés [127, 172].

Les principales protéines régulatrices de la localisation subcellulaire de MEK/ERK1/2 sont PEA-15, MP1, IQGAP-1, β -Arrestine et Sef. Dans le cytoplasme, PEA-15 se lie exclusivement à ERK1/2. Cette liaison prévient la translocation dans le noyau de ERK1/2 et, par le fait même, l'activité nucléaire s'y rattachant, sans toutefois affecter

l'activité kinase ni la phosphorylation des substrat cytoplasmiques de ERK1/2 [173]. Les mécanismes qui permettent la rétention de ERK par PEA-15 ne sont pas clairement établis, mais il a été proposé que PEA-15 interfère avec la liaison de ERK1/2 avec les nucléoporines [174].

De récentes recherches ont décrit un rôle d'échafaudage de IQGAP-1 pour la voie des MAPKs ERK1/2. IQGAP-1 est une large protéine qui intervient dans de nombreux processus cellulaires tels que la dynamique des microtubules et de l'actine, l'adhésion cellulaire et la régulation de la transcription [175, 176]. Il a été démontré que IQGAP-1 se lie directement à BRAF, MEK1/2 et ERK1/2 et régule leur activation en réponse à l'EGF [177, 178].

Une autre protéine qui influence la localisation de ERK1/2 est MP1 : cette protéine de 13,5 kD interagit avec MEK1 et ERK1 mais pas MEK2 ni ERK2. Bien que des analyses *in vivo* aient montré que MP1 n'augmente pas significativement l'activation de ERK1, il a été démontré que le complexe MP1-MEK1/ERK1 interagit avec la protéine endosomale P14. Cette interaction dirige MEK1 et ERK1 vers les endosomes et les lysosomes, permettant ainsi la régulation de fonctions spécifiques [179].

Finalement, MEK1/2 et les complexes MEK/ERK1/2 interagissent avec Sef. Cette interaction permet la localisation à l'appareil de Golgi et à la membrane plasmique du complexe, prévenant ainsi la translocation nucléaire de ERK1/2 [129, 158]. L'impact de cette association Sef/MEK1/2 et Sef/MEK/ERK1/2, de même que le rôle de Sef dans la tumorigénèse, seront approfondis au chapitre 5.

1.6.5 La régulation par interaction avec d'autres voies de signalisation

Un autre mécanisme de régulation de la cascade de Ras-ERK1/2 est l'interaction avec les membres d'autres voies de signalisation. L'activation des différents membres de la cascade Raf/MEK/ERK1/2, par des protéines provenant d'autres voies de signalisation, peut survenir dans des conditions physiologiques spécifiques. Ces événements de

phosphorylation/déphosphorylation, par des kinases ou des phosphatases, peuvent affecter la force et la durée du signal, de même que la localisation des membres du sentier MEK/ERK1/2.

L'une des voies de signalisation qui contribue à l'activation de ERK1/2 est la cascade de Rac1/Cdc42-PAK1. Rac1 et Cdc42 sont des membres de la famille des Rho GTPases, qui sont activés par l'adhésion cellulaire et qui permettent l'extension de lamellipodes et la formation de plaques focales d'adhésion, via l'effecteur en aval PAK1 [180]. PAK1 peut phosphoryler MEK1 sur la sérine 298 au niveau des complexes protéiques formés sur les plaques focales d'adhésion. Cette phosphorylation est un événement clé de la régulation de l'adhésion et la migration cellulaire et constitue un site de convergence pour la signalisation des intégrines et des facteurs de croissance [26].

Les kinases dépendantes des cyclines (CDKs) peuvent également participer à la régulation de la cascade de ERK1/2. Des études ont suggéré que CDK1 et CDK5 phosphorylent MEK1 sur les résidus thr286 et thr292 et, par conséquent, en modifie son activité. Contrairement à la phosphorylation médiée par PAK1, qui agit comme un régulateur positif, la phosphorylation médiée par les CDKs amène une inhibition de l'activité de MEK1 [181].

1.6.6 La régulation par la présence de plusieurs isoformes et formes alternativement épissées

Bien que MEK1 et MEK2, ainsi que ERK1 et ERK2, soient identiques à 80% et 85% respectivement [39, 182], des analyses biochimiques et génétiques ont suggéré des différences possibles dans la régulation des différents isoformes. Outre la présence de plus d'un isoforme, il existe des formes alternativement épissées de ces protéines, qui pourraient également multiplier le nombre de cibles possibles et, donc, de processus cellulaires régulés par la cascade de ERK1/2.

1.6.6.1 La spécificité des substrats de chacune des isoformes

Tel que décrit précédemment, les modèles de souris transgéniques ont mis en relief des différences fonctionnelles possibles entre MEK1 et MEK2 et entre ERK1 et ERK2. Bien que le modèle de souris *Mek2^{-/-}* n'ait démontré aucun phénotype, il a été observé que MEK2 est spécifiquement activé par la lactosylcéramide dans des cellules humaines de muscle lisse de l'aorte [183] ou par l'estradiol dans un modèle de cortex cérébral de souris [184].

Pareillement, seul l'isoforme de MEK1 est activé dans les macrophages en réponse au TNF α [185]. De même, la bombésine active exclusivement MEK1 dans des cellules Swiss 3T3 [186] et s'est avérée inefficace dans l'activation de ERK1/2 dans les MEFs *Mek1^{-/-}* [116]. Plus encore, seulement MEK1 peut former un complexe de signalisation avec RAS et RAF-1 dans des cellules Swiss 3T3 stimulées, suggérant que la voie de signalisation de RAF-1 active les MAP kinases préférentiellement via MEK1 [187]. Une étude a aussi rapporté que la signalisation endosomale médiée par le complexe p14-MP1-MEK1 joue une fonction spécifique et essentielle *in vivo* dans la prolifération et la régulation du trafic des endosomes. Cette signalisation est essentielle pour l'embryogenèse précoce et pour la maintenance de l'homéostasie des tissus [188].

Plus récemment, il a été montré que ERK1 est un régulateur négatif de l'érythropoïèse de la rate via le contrôle de la protéine morphogénétique des os 4 (BPM4) [189]. Les travaux de Frémin et *al.* (2007) [190], menés sur des hépatocytes ERK1^{-/-}, ont démontré que l'inhibition de ERK2 par RNAi ou par le U0126 inhibe la progression du cycle cellulaire en fin de phase G1/S, alors que l'inhibition de ERK1 n'a pas d'effet sur la prolifération cellulaire, indiquant que ERK1 ne peut pas compenser pour la perte de ERK2. Des analyses subséquentes ont confirmé que ERK2 joue un rôle crucial dans l'entrée en phase S et ces analyses ont aussi mis en relief un nouveau rôle pour ERK1 dans la

régulation négative de la survie des hépatocytes. L'inhibition soutenue de ERK1 (mais pas de ERK2) a été associée à une augmentation de la survie cellulaire des hépatocytes [191].

Il est à noter que toutes ces observations suggérant un rôle spécifique d'une isoforme sont sujet à des interprétations différentes et ne prouvent pas un rôle spécifique de ERK1 ou ERK2. Par exemple, il a été rapporté que l'ablation de ERK1 dans des fibroblastes par RNAi augmente la signalisation de ERK2 et mène à une augmentation de la prolifération [192]. Il a aussi été montré que la surexpression de ERK1 dans des NIH 3T3 inhibe l'augmentation de prolifération induite par Ras oncogénique. Également, il a été observé que le knockdown de ERK2 inhibe complètement la prolifération cellulaire. Ces résultats ont alors menés à un modèle hypothétique dans lequel ERK1 agit à titre de régulateur négatif de la prolifération en antagonisant la signalisation de ERK2 [192, 193]. Toutefois, une étude récente, menée dans notre laboratoire, a démontré à l'aide d'une approche génétique robuste, que ERK1 et ERK2 sont redondants et que les deux kinases agissent à titre de régulateurs positifs de la prolifération cellulaire [102].

1.6.6.2 Les formes alternativement épissées

En plus des isoformes de 44 kD et 42 kD de ERK1 et ERK2, une forme alternativement épissée de 46 kD, nommé ERK1b, a été répertoriée chez les rongeurs par le groupe du Dr Seger (2001) [194]. ERK1c (42 kD), qui serait l'équivalent de ERK1b, se retrouve chez le singe et l'humain, a par la suite été identifié. Le niveau d'expression de ERK1c est d'environ 10% celui de ERK1. ERK1c est exprimé dans une grande variété de tissus et cellules. Son activation est médiée par MEK1/2 et son inactivation par les phosphatases, se fait plus lentement que pour ERK1. La surexpression de ERK1c a été associée à une augmentation de la fragmentation du Golgi dans des cellules de forte densité [195].

Plus récemment, il a été suggéré que l'activation de ERK1c soit principalement médiée par l'isoforme MEK1b, qui avait jusqu'à maintenant été considérée comme étant

une kinase inactive. Tel qu'observé pour ERK1c, l'expression et l'activation de MEK1c sont élevées durant la mitose et sont associées à l'augmentation de la fragmentation du Golgi. Shaul *et al.* (2009) [196] ont alors proposé que la cascade de ERK se divise en deux parties, soit la voie classique de MEK/ERK1/2 et la voie des variants alternativement épissés MEK1b/ERK1c. Selon eux, ces deux voies réguleraient des processus distincts et augmenteraient ainsi la spécificité de la cascade MEK/ERK1/2 [196].

Ceci demeure toutefois à confirmer. D'une part parce que les souris knockout de ERK1^{-/-} sont viables et, d'autre part, parce que les MEFs ERK1^{-/-} prolifèrent de façon similaire aux MEFs de type sauvage et ne s'accumulent pas en G2/M [102]. La fragmentation du Golgi est une étape impérative de la mitose, car elle permet la séparation équitable des composés cellulaires dans les deux cellules filles. Il a même été proposé qu'un «checkpoint Golgi-mitose» devrait être satisfait afin d'initier la complétion de la mitose (revue dans [197]). Étant donné le rôle critique de la fragmentation du Golgi dans la mitose, il apparaît impossible que ERK1c, à lui seul, soit responsable de sa fragmentation. De plus, il a été démontré, à l'aide de différents mutants de ERK2, que la phosphorylation de ERK2 est requise pour la fragmentation du Golgi via un mécanisme indépendant de son l'activité kinase [198]. Donc, pour le moment, des rôles spécifiques de ces formes alternativement épissés demeurent à caractériser.

1.7 Les fonctions biologiques des MAP kinases ERK1/2

L'activation des MAP kinases ERK1/2, en réponse aux signaux extracellulaires, engage de nombreux de processus cellulaires tels que la prolifération, la différenciation ainsi que la survie cellulaire. ERK1/2 sont directement impliqués dans la modulation de l'expression des gènes via leur implication dans la synthèse des nucléotides, du remodelage de la chromatine, de la traduction et de la synthèse des protéines. L'activation de la voie de signalisation de ERK est également associée à des rôles opposés, comme la survie cellulaire et l'apoptose.

1.7.1 La prolifération cellulaire

Afin de se diviser, les cellules doivent s'assurer d'avoir tout les métabolites requis ou d'avoir la capacité de les synthétiser au moment opportun [199]. La croissance cellulaire requiert donc l'augmentation de la biosynthèse de macromolécules, d'organelles et de membranes. La synthèses de ces éléments essentiels est régulée par plusieurs facteurs de croissance extracellulaires [200]. L'une des premières évidences liant l'activité de ERK1/2 avec la prolifération cellulaire a été rapporté par Pagès et *al.* (1993) [201]. Ils ont montré, dans des fibroblastes, que l'expression de mutant actif de MEK accélère la prolifération, alors l'expression d'un dominant négatif de ERK la bloque. Ils ont alors conclu que l'activation de ERK1/2 par les facteurs de croissance est absolument requise pour l'activation de la prolifération.

1.7.1.1 La synthèse des nucléotides

Afin de produire de l'ADN et de l'ARN ribosomique (ARNr), une augmentation de la synthèse de nucléotide de pyrimidine est nécessaire. La synthèse *de novo* des pyrimidines est catalysée par la carbamoyl-phosphate synthétase II (CPSII), qui fait partie du complexe protéique multifonctionnelle CAD. ERK1/2 augmente l'activité de CAD en phosphorylant la thréonine 456 de la CPSII, ce qui induit des modifications allostériques, entraînant alors l'activation du domaine CPAses [202]. L'activation de ERK1/2 a donc été associée à la synthèse des pyrimidines.

1.7.1.2 Le remodelage de la chromatine

L'activation de l'activité transcriptionnelle ne requiert pas seulement l'activation de facteurs de transcription : une réorganisation de la structure de la chromatine est aussi nécessaire. La chromatine est constituée d'ADN entouré d'histone et d'un groupe de protéines à haute mobilité, nommé protéine-HMG. L'activation de ERK1/2 stimule l'activation de ses substrats MSK1 et MSK2 qui, à leur tour, phosphorylent l'histone H3 et HMG-14, ce qui engendre le remodelage de la chromatine [203].

ERK2 régule aussi le remodelage de la chromatine par l'activation de processus nucléaires telles que la poly-ribosylation d'ADP par PARP1 ou par des interactions directes avec la Topoisomérase II α (Topo II α), qui est associée à la réorganisation de la chromatine. Ces processus sont uniquement régulés par l'interaction directe de ERK avec PARP1 ou Topo II α et ils ne requièrent pas leur phosphorylation [204].

1.7.1.3 La traduction et la synthèse des protéines

La croissance et la prolifération cellulaire nécessite également la traduction et la synthèse de protéine. L'activation de ERK1/2 a été associée à la régulation transcriptionnelle des protéines. Un des substrats directs de ERK1/2 est la protéine kinase MNK1. Suivant une stimulation, ERK1/2 phosphoryle la serine 209 du facteur d'initiation de la traduction 4E (eIF4E), augmentant son affinité pour l'ARNm coiffé et stimulant ainsi la traduction [205].

La voie de mTOR/p70S6K est une autre voie de signalisation associée à la traduction protéique. L'un des régulateurs importants de mTOR est l'hétérodimère TSC1/TSC2, un complexe suppresseur de tumeurs qui réprime l'activité de mTOR. Il a été démontré *in vitro* et *in vivo* que ERK1/2 phosphorylent la serine 664 de TSC2, engendrant ainsi la dissolution du complexe TSC1/TSC2. Ceci permet l'activation de la traduction de l'ARNm via l'activité de mTOR [206]. La kinase RSK, une cible directe de ERK1/2, peut phosphoryler TSC2 sur la serine 1798, ce qui permet également d'inhiber la fonction de répression du complexe de TSC1/TSC2 sur mTOR [207].

La prolifération cellulaire nécessite aussi la synthèse de ribosomes pour combler la demande de synthèse protéique. Servant *et al.* (1996) [208] avaient montré que le PD98059, un inhibiteur de MEK1/2, bloque la synthèse protéique globale. Suivant la stimulation de ERK1/2, la transcription de gènes associés à l'ARNr par l'ARN polymérase I est rapidement enclenchée. La phosphorylation de UBF, un facteur de transcription architectural par ERK1/2, permet une rigidité de l'ADN entre les deux boîtes HMG, permettant une

conformation optimale pour le «enhancesome» et l'augmentation de la transcription des gènes de l'ARNr [209, 210].

1.7.2 La régulation du cycle cellulaire

La régulation de l'entrée en cycle cellulaire des cellules requiert non seulement une forte et persistante activation de ERK1/2, mais aussi leurs translocation dans le noyau afin d'y activer des cibles spécifiques, assurant ainsi la transition de la phase G1 à la phase S du cycle cellulaire. À titre d'exemple, l'expression d'une forme catalytiquement inactive de la phosphatase MKP-3 (DUSP6) est suffisante pour séquestrer ERK dans le cytoplasme, ce qui empêche les cellules d'entrer en cycle [211]. Similairement, l'augmentation de l'expression de PEA-15, qui inhibe l'import nucléaire de ERK, réprime l'activation de la transcription des régulateurs du cycle dans le noyau, inhibant du même coup la prolifération cellulaire [173]. (Figure 1.5).

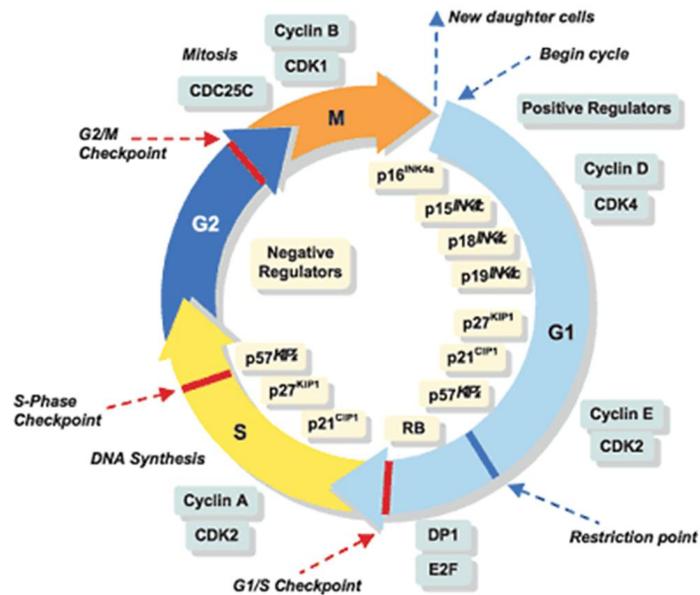


Figure 1.5. Schéma des phases du cycle cellulaire et de ces principaux régulateurs. (Kong et al, 2003. Drugs Fut. [212])

1.7.2.1 La régulation de la transition G1/S

Les étapes-clés pour l'entrée en cycle des cellules est la formation d'un complexe Cyclin D-CDK4/6 actif ainsi que la répression des inhibiteurs des CDKs (CDKIs). L'activation de ERK1/2 agit à plusieurs niveaux dans l'activation des CDKs en fin G1 et aussi dans l'inhibition des CDKIs .

1.7.2.1.1 La régulation de la Cyclin D1 par ERK1/2

Il a été observé que l'expression d'un mutant inactif de MEK diminue l'expression de Cyclin D1, alors que la stimulation de l'activité de ERK en augmente l'expression [213]. Toutefois, une stimulation soutenue de la phosphorylation de ERK est requise pour induire l'expression de Cyclin D1 [214]. L'activation de ERK induit l'expression de Cyclin D1 de plusieurs façons et de manière complexe. L'activation spatio-temporelle de ERK se doit d'être parfaitement orchestrée afin d'induire l'expression de la Cyclin D1 via les membres de la famille Fos [215]. Après plusieurs heures de stimulation, lorsque l'activation de ERK décline (spécialement dans le noyau), c-Fos est déphosphorylé et dégradé; Fra-1 remplace alors c-Fos au promoteur de Cyclin D1 [216]. ERK régule également la transcription de Cyclin D1 via Myc. La phosphorylation de la sérine 62 de Myc par ERK en augmente sa stabilité [217]. Il a été démontré que Myc participe directement à l'induction transcriptionnelle de Cyclin D1 [218].

1.7.2.1.2 La répression de la transcription de gène anti-prolifératifs par ERK1/2

Il a été observé que les cellules n'entrent pas en phase S si ERK est inactivé et ce, même si les cellules sont à la fin de phase G1. Il a été démontré que ERK est requis pour l'inhibition continue des gènes anti-prolifératifs durant la phase G1 afin de permettre la progression du cycle cellulaire [219]. Une analyse extensive a d'ailleurs rapporté l'inhibition de plus de 175 gènes en G1 via des mécanismes dépendants de l'activation de

ERK. Plus encore, une privation de sérum ou l'utilisation d'inhibiteurs de MEK1/2 est suffisant pour restaurer l'expression de ces gènes anti-prolifératifs et bloquer l'entrée en phase S. Parmi ceux-ci, citons JunD et Gadd45 α , qui sont dépendants de l'activité de AP1, ainsi que Tob1. Bien que leur mécanisme d'action ne soit pas clairement identifié, il a été montré que JunD et Tob1 régulent négativement l'activité de Cyclin D1 [220, 221].

1.7.2.1.3 La régulation des inhibiteurs du cycle cellulaire p21 et p27 par ERK1/2

Contrairement à la transcription de la Cyclin D1, il a été montré qu'une activation transitoire de ERK est suffisante pour induire l'activation transcriptionnelle de p21 [222, 223]. L'accumulation transitoire de p21 contribue à la stabilisation des complexes Cyclin D/Cdk4 en phase G1 [224]. En fait, la régulation de p21 varie beaucoup selon les contextes cellulaires. Par exemple, c-Myc, dont la stabilité est augmentée par ERK, est un puissant répresseur de p21 [225]. Plus récemment, il a également été rapporté que l'activation de ERK inhibe p21 à des niveaux post-traductionnels en promouvant sa dégradation de manière dépendante à l'ubiquitine [226].

Les données concernant la régulation de p27 par ERK sont aussi variables selon les contextes. Plusieurs études ont suggéré que la voie Ras-ERK1/2 inhibe p27. Par exemple, l'expression d'une forme active de RAF-1 ou de MEK dans des NIH3T3 inhibe l'expression de p27 [227, 228]. Il a aussi été montré que la cascade de ERK1/2 inhibe l'expression de p27 via un mécanisme indépendant de la phosphorylation de la thr187 de p27 par CDK2 [229]. Toutefois, d'autres études, menées avec des inhibiteurs de MEK1/2 ou des dominants négatifs de ERK2, n'ont pas réussi à démontrer un changement significatif de l'expression de p27 [224, 230]. Il a été observé que l'activation de ERK dans les cellules NIH3T3 ne change pas les niveaux de p27, mais induit plutôt l'expression de Cycline D1 qui, en s'associant avec CDK4, séquestre p27 du complexe Cycline E/CDK2 pour faciliter son activation [231]. Il est probable que la régulation de p27 par ERK soit dépendante du type

et du contexte cellulaire. Il est aussi possible que ERK puisse réguler indirectement l'expression de p27 via la synthèse de facteurs de croissances autocrines ou, encore, que la régulation diffère dans des contextes de cellules transformées. Il a notamment été observé que l'inhibition de l'activité de ERK1/2, par le U0126 dans des cellules de cancer mammaires (MCF-7), restaure l'expression de p27 et induit un arrêt en G1 [232].

1.7.2.2 La régulation de la transition G2/M

Contrairement à la transition G1/S du cycle cellulaire, où ERK y joue des rôles essentiels et bien caractérisés, le rôle de ERK dans la régulation de la transition G2/M, ainsi que de la mitose, sont mal définis. En fait, la littérature renferme beaucoup de zones grises et même des contradictions.

Par exemple, il a été observé, dans des cellules NIH 3T3 et des HeLa, que ERK est phosphorylé en fin de phase S et que son activation persiste jusqu'à la fin de la mitose. Le blocage de l'activité de ERK, par la transfection de mutants inactifs de MEK [233] ou l'utilisation d'inhibiteurs de MEK, ont été associés à un retard de la transition G2/M et un retard de l'entrée en mitose [234]. Plus encore, Wright et *al.* (1999) [233] ont observé une mitose deux fois plus longue lorsque ERK est inhibé à la transition G2/M et ce, en raison d'un délai de la progression des cellules à la transition métaphase/anaphase. Il fut ensuite montré, dans des cellules somatiques, que ERK est activé durant la transition G2/M, puis déphosphorylé à la métaphase [235]. Bien qu'il n'y ait pas de consensus quant au «timing» exact où la phosphorylation de ERK est spécifiquement requise, il semblerait que l'activité de ERK soit requise pour la transition G2/M.

Le contrôle de la force de l'activation de ERK est également important. Par exemple, l'expression ectopique de BRCA1 engendre une forte augmentation de la phosphorylation de ERK, accompagné d'un arrêt en G2/M. Il a été démontré que

l'hyperphosphorylation de ERK1/2 engendrée par BRCA1 a pour effet le blocage de l'activité Cyclin B/Cdc2, inhibant ainsi l'entrée en mitose [236].

1.7.2.3 La régulation de la mitose

L'implication de ERK dans la mitose est largement controversé. La littérature renferme des résultats impliquant ERK dans la régulation mitotique qui semblent, à première vue, très probants, alors que d'autres travaux réfutent le rôle de ERK dans la régulation de la mitose. Le groupe de Rieder (2010) affirme que ERK n'est pas requis en mitose, mais plutôt en aval de la transition G2/M et que l'inhibition de ERK en G2 se répercute sur la mitose de façon indirecte, via l'inhibition de la transcription de gène requis pour la transition G2/M ou la mitose [237].

Bien que la mitose soit la plus courte des phases du cycle cellulaire, elle est la plus complexe. La machinerie macromoléculaire responsable de la ségrégation des chromosomes requiert plus de 800 protéines [238]. Le déroulement de la mitose nécessite la nucléation des microtubules à partir des centrosomes et l'attachement des centromères des chromosomes aux microtubules via les kinétochores ; cette étape est appelée prométaphase. Ensuite, un alignement adéquat des chromosomes sur la plaque équatoriale en métaphase et la ségrégation équitable des chromosomes en anaphase sont requis. Finalement, l'ingression du sillon de clivage, la reformation de l'enveloppe nucléaire et la décondensation des chromosomes en télophase mènent à l'étape ultime. La terminaison de la mitose s'accomplit avec l'abscission finale du pont intercellulaire, lors de la complétion de la cytokinèse (revue dans [239-242]). Toutes ces étapes étant régies par une pléthore de régulateurs et de nombreuses protéines associées aux checkpoints de régulation mitotique (Figure 1.6).

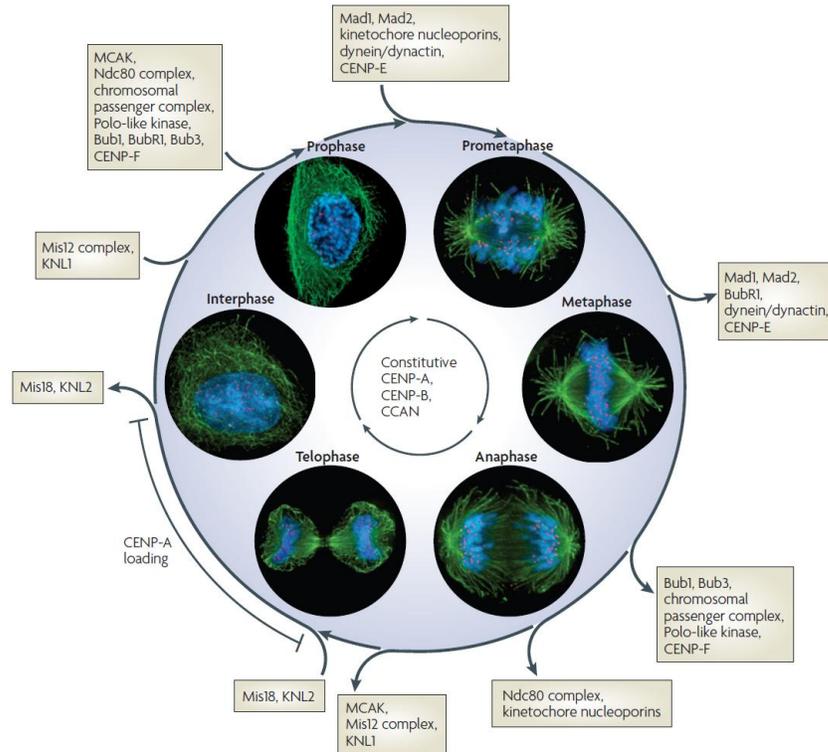


Figure 1.6 Schéma des phases de la mitose et de ces principaux régulateurs.
(Cheeseman et *al*, 2008. Nature.[242]).

1.7.2.3.1 L'implication de ERK1/2 dans la translocation nucléaire de la Cyclin B1

L'entrée en mitose requiert la formation du complexe Cyclin B/Cdc2. Celui-ci est activé par la phosphorylation de la thréonine 161 par CAK et la déphosphorylation de la thréonine 14 et la tyrosine 15 par CDC25. Certains groupes ont proposé que ERK participe directement à la translocation nucléaire de la Cyclin B1. Il a été démontré, dans des extraits d'oeufs de *Xenopus*, que ERK phosphoryle deux des quatre sites de phosphorylation de la séquence de rétention cytoplasmique (CRS) de la Cyclin B1, soit les serines 94 et 96. Un troisième site est phosphorylé par la kinase Plx et le quatrième l'est par une kinase inconnue. La phosphorylation de ces quatre sites est nécessaire pour une entrée rapide dans

le noyau de la Cyclin B1 et pour la progression de la mitose. Il a été montré que l'inhibition de ERK par le U0126 engendre la rétention du complexe Cyclin B/Cdc2 dans le cytoplasme, ce qui empêche l'activation de Cdc2 et retarde l'entrée en mitose [243].

1.7.2.3.2 La régulation de RSK par ERK1/2

La kinase RSK, une cible cytoplasmique de ERK, phosphoryle et inactive Myt1 [244], une kinase à double spécificité qui régule négativement le complexe Cyclin B1/Cdc2 en phosphorylant la thréonine 14 et la tyrosine 15 de Cdc2 [245]. L'inhibition de ERK diminue l'activité de RSK, ce qui a pour conséquence l'activation de Myt1. Myt1 activé inhibe alors Cdc2 par la phosphorylation de ces deux résidus, ce qui mène à un arrêt à la transition G2/M.

Plus récemment, il a été montré que RSK2 participe à la maintenance et l'intégrité du checkpoint d'assemblage du fuseau mitotique (SAC) dans des cellules de mammifères. Le «knockdown» de RSK2 empêche la localisation adéquate aux kinétochores de MAD1, MAD2 et CENP-E, qui sont des membres essentiels du SAC. Leur localisation erronée entraîne un blocage des cellules en mitose [246].

1.7.2.3.3 La localisation de MEK/ERK1/2 actifs sur la tubuline mitotique

Un autre argument, en faveur du rôle de ERK1/2 dans la mitose, est que deux équipes ont rapporté que ERK1/2 [247, 248] et MEK1/2 [247] phosphorylés se localisent sur les kinétochores et la tubuline des cellules en mitose. Toutefois, il a été démontré que l'anticorps de phospho-MEK1/2 reconnaît un site de phosphorylation de la nucléophosmine/B23, une protéine qui est phosphorylée par Cdc2 en mitose [249, 250]. La présence de phospho-MEK sur les kinétochores a donc été considérée comme un artéfact de l'anticorps. Par la suite, la localisation MEK et ERK actifs sur les kinétochores et les microtubules du fuseau mitotique a été confirmée dans des NIH 3T3 [251].

La localisation de ERK activé sur les microtubules pourrait s'expliquer par le fait que CENP-E, une protéine moteur des kinétochores, est phosphorylée par ERK sur deux sites qui sont connus pour réguler son interaction avec les microtubules. Il a aussi été montré que CENP-E s'associe préférentiellement à ERK activé *in vivo* durant la mitose. Il est donc possible que ERK joue un rôle dans l'organisation de l'interaction des microtubules avec les chromosomes, au cours de la mitose, via son interaction avec CENP-E [248], mais cela reste à confirmer.

En conclusion, ERK semble impliqué dans la transition G2/M. Toutefois, la cascade d'événements en aval de l'activation de ERK, lors de la transition G2/M, n'est pas encore élucidée. De plus, il faut interpréter la littérature avec beaucoup de réserves car la plupart de ces expériences ont été effectuées sur des cellules synchronisées, soit par des privations de sérum, blocage avec la thymidine ou par des agents agissant sur les microtubules. Ces techniques, bien que fréquemment utilisées, ne sont pas physiologiques. Outre le fait que les cellules ont tendance à se désynchroniser après un certain temps, il est difficile de mesurer l'activité exacte de ERK à un temps donné. Car lorsque les cellules sont soumises à diverses synchronisations et stress, il devient compliqué de dissocier les effets directs et indirects de l'inhibition de ERK. Par exemple, une synchronisation avec le nocodazole, un agent dépolymérisant des microtubules qui bloque les cellules en prométaphase et qui est abondamment utilisé pour synchroniser les cellules en mitose, induit l'activation de ERK1/2 [252]. Donc, en ce qui a trait à l'implication de ERK dans la régulation de la mitose, à défaut d'expériences réellement convaincantes, il est difficile de prendre parti pour le moment.

1.7.3 La régulation de la différenciation cellulaire

Les MAP kinases ERK ont également été impliquées dans la différenciation cellulaire à différents niveaux. Soit en régulant directement la différenciation, comme dans le cas des cellules PC12 et K562 ou en régulant indirectement la différenciation, via la

stimulation de la prolifération comme dans le cas des myoblastes en culture C2C12.

Un des modèles le mieux documentés est celui des cellules de phéochromocytome de rat PC12 [253]. Il a été observé qu'une stimulation soutenue de la phosphorylation de ERK est requise pour la différenciation en PC12 car une stimulation à l'EGF, qui n'active que transitoirement ERK, n'est pas suffisante [161]. L'activation de ERK est aussi nécessaire pour que les cellules K562, une lignée pluripotente de cellules érythroleucémiques humaines, se différencient en mégacaryocyte à la suite d'une stimulation au phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA). Par ailleurs, il a été montré que l'expression d'un mutant constitutivement actif de MEK peut engendrer une différenciation des cellules K562, même en l'absence de PMA [254], via l'activation séquentielle de ERK, RSK1 et NF- κ B [255]

Par opposition, la différenciation des myoblastes en culture C2C12 requièrent l'inhibition de l'activité de ERK pour cesser de proliférer et se différencier. L'expression de la phosphatase MKP-1 ou l'utilisation du PD098059 est suffisante pour engager la différenciation des myoblastes [256]. Certains groupes ont également associé l'implication de la signalisation de ERK1/2 dans l'adipogenèse, mais les conclusions demeures controversées. Des études, menées principalement dans les lignées de préadipocytes 3T3-L1 ou 3T3-F442A, ont montré que l'activité de ERK n'est pas requise pour l'adipogenèse [257-259]. La différenciation des préadipocytes *in vitro* se caractérise par l'expression de PPAR γ et C/EBP α qui entraînent un arrêt définitif de la prolifération et induisent la différenciation [260]. Il y été rapporté que l'utilisation du PD098059, un inhibiteur de MEK1/2, bloque la phosphorylation de la serine 112 de PPAR γ 2, entraînant une perte de l'activité transcriptionnelle du récepteur nucléaire et permettant ainsi la différenciation [261]. Toutefois, il fut par la suite démontré avec des souris ERK1^{-/-}, que la signalisation de ERK est requise pour les premiers stades de différenciation en adipocytes dans des cellules souches embryonnaires. Les souris ERK1^{-/-} ont une diminution du taux d'adiposité et du nombre d'adipocyte par rapport aux souris de type sauvage. Plus encore, les souris ERK1^{-/-}

sont résistantes à l'obésité, même lorsque soumises à une diète riche en matière grasse [262].

1.7.4 La régulation de l'apoptose et de la survie cellulaire

L'activation de ERK est généralement associée à la survie des cellules, mais cette fonction peut varier selon le type et le contexte cellulaire. Plusieurs substrats de ERK ont été associés à la survie cellulaire, tels que RSK, qui inhibe l'apoptose en phosphorylant la sérine 136 de BAD. Cette phosphorylation facilite sa séquestration par 14-3-3 et empêche sa liaison à Bcl-2 et donc, ultimement, inhibe l'enclenchement de l'apoptose [263]. Il a aussi été montré chez la *Drosophila* que l'activation de la voie Ras-ERK1/2, par l'expression de RAS activé, favorise la survie des cellules en inhibant l'expression de la protéine pro-apoptique Hid [147]. Également, il a été rapporté que JunD, qui est une cible de ERK, protège les cellules de la sénescence ou de l'apoptose engendrée par des stress génotoxiques via un mécanisme d'inhibition de p53 [221].

L'induction de dommages à l'ADN par des agents génotoxiques, incluant l'étoposide, l'adriamycine, des rayons UV ou des radiations, active la phosphorylation de ERK dans une grande variété de types cellulaires, que ce soit dans les cellules primaires, immortalisées ou transformées. L'activation de ERK, en réponse à l'étoposide, est compromise dans des fibroblastes ATM^{-/-}, ce qui suggère que l'activation de ERK se fait en amont de ATM et qu'elle peut être indépendante de p53 [264]. Il a été montré que l'inhibition de ERK par le U0126 renverse les effets cytotoxiques de l'IFN γ [265]. Plus récemment, ERK a été directement impliqué dans la liaison avec Bik, un médiateur spécifique de l'apoptose induite par l'IFN γ . Grâce à des souris transgéniques IFN γ ^{-/-} ou Bik^{-/-}, il a été observé que Bik se lie directement à ERK phosphorylé et le séquestre dans le cytoplasme, ce qui empêche la translocation dans le noyau de ERK et l'enclenchement de l'apoptose [266]. Ceci, constituant un autre exemple que la régulation spatio-temporelle de ERK est essentielle dans la médiation de ses diverses fonctions.

CHAPITRE 2:

Implication de la voie de signalisation

Ras/Raf/MEK/ERK1/2 dans le cancer métastatique

2.1 Mise en situation

Le chapitre 2 est un article de revue qui se veut une mise à jour de la littérature concernant l'implication de la voie de signalisation de Ras-ERK1/2 dans le processus d'établissement des métastases. La pertinence de cibler la voie de MEK/ERK1/2 pour le traitement du cancer et les avancées cliniques sur les inhibiteurs de MEK1/2 y sont également discutés.

2.2 Contribution des auteurs

J'ai écrit près de 90% de l'article de revue et j'ai conçu les tableaux et schéma qui y sont présentés. L'autre portion du texte a été écrite par Dre Laure Voisin.

2.3 Résumé

La voie de signalisation de Ras/Raf/MEK/ERK1/2 constitue l'une des principales voies de transmission des signaux de prolifération induits par les facteurs de croissance. La voie des MAP kinases ERK1/2 est également associée à la régulation de l'apoptose, la transcription, la migration et la différenciation cellulaire. La dérégulation des membres de cette voie est associée à plusieurs pathologies, telles que les maladies inflammatoires, le diabète, les syndromes cardio-facio-cutané et le cancer. Cet article de revue présente les récentes évidences impliquant la voie de signalisation de ERK1/2 dans l'établissement des métastases, allant du détachement des cellules de la tumeur primaire jusqu'à la colonisation métastatique. Les membres de la voie de Raf/MEK/ERK1/2 apparaissent donc comme étant des cibles thérapeutiques intéressantes pour le traitement du cancer. La pertinence du développement d'inhibiteurs de la voie, de même que les plus récents résultats d'études cliniques y seront également discutés.

2.4 Article de revue 1

Targeting the ERK1/2 MAP Kinase Signaling Pathway in advanced metastatic cancer

Stéphanie Duhamel^{1,3}, Laure Voisin¹, and Sylvain Meloche^{1,2,3*}

¹Institut de Recherche en Immunologie et Cancérologie and Departments of ²Pharmacology and ³Molecular Biology, Université de Montréal, Montreal, Quebec H3C 3J7, Canada

*Corresponding author: Dr Sylvain Meloche
Institut de Recherche en Immunologie et Cancérologie
Université de Montréal
2950, Chemin de Polytechnique
Montreal (Quebec) Canada H3C 3J7
Tel.: (514) 343-6966

To be submitted to Pharmacological Reviews

Abstract

Mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathways are evolutionarily-conserved signaling modules by which cells transduce extracellular signals into intracellular responses. Dysregulated MAP kinase pathway components have been linked to many diseases, including inflammatory disorders, diabetes, cardio-facio-cutaneous syndromes and cancer. This review will present evidence suggesting that ERK1/2 signaling contributes to every step of the metastatic process, from the early escape of cancer cells from the primary tumor to the late step of metastatic colonization. The components of the Raf/MEK/ERK1/2 pathway are therefore attractive candidates for the development of small molecule inhibitors. The rationale to develop MEK inhibitors and the current research goals as well as the recent state of clinical evaluation of MEK1/2 inhibitors will be discussed.

Table of Contents

1. Introduction
2. Hyperactivation of the Ras-ERK1/2 MAP kinase pathway in cancer
3. The ERK1/2 MAP kinase pathway in cancer metastasis
 - 3.1. Loss of cellular contacts, detachment from the primary tumor and local invasion
 - 3.1.1. The epithelial-mesenchymal transition (EMT)
 - 3.1.2. Extracellular proteases and invasiveness
 - 3.1.3. Tumor cell motility
 - 3.2. Intravasation and dissemination to distant organ sites
 - 3.2.1. Intravasation
 - 3.2.2. Surviving anoikis
 - 3.2.3. Escape from immune response
 - 3.3. Extravasation, formation of micrometastases and outgrowth of secondary tumors
 - 3.3.1. Extravasation
 - 3.3.2. Establishment and outgrowth of micrometastases into macrometastases
4. Rationale for targeting the ERK-signaling pathway for cancer treatment
 - 4.1 Specific inhibitors of the ERK pathway
 - 4.1.1 Raf inhibitors
 - 4.1.2 MEK1/2 inhibitors
5. Current research goals and challenges
 - 5.1 Selecting patient population for clinical trial evaluation
 - 5.2 Combination of inhibitors
 - 5.3 Combination of MEK inhibitors with chemotherapy
 - 5.4 Combination of MEK inhibitors with radiotherapy
6. Concluding remarks

1. Introduction

Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways are evolutionarily conserved protein kinase cascades that play a key role in signal transduction [267]. These pathways process information from a wide variety of extracellular stimuli and cellular perturbations to control multiple physiological processes required to maintain normal cellular and tissue homeostasis [267-269]. Furthermore, deregulated activity of MAP kinase pathway components has been linked to many diseases, including cancer, inflammatory disorders, diabetes and cardio-facio-cutaneous syndromes [270]. These enzymes are therefore viewed as attractive targets for novel targeted therapies.

Among the best-characterized MAP kinase pathways is the Ras-dependent extracellular signal-regulated kinase (ERK) 1/2 pathway, which conveys signals from mitogenic factors, cytokines and differentiation cues. Typically, ligand binding to growth factor receptors leads to the activation of the small GTPase Ras, which allows the recruitment of Raf to the membrane and mediates the sequential phosphorylation and activation of Raf, MEK1/MEK2 and ERK1/ERK2 protein kinases [271]. Once activated, the multifunctional kinases ERK1/ERK2 phosphorylate a vast array of substrates, including membrane receptors, cytoskeletal proteins, transcriptional regulators and signaling enzymes, to impact on cell growth, cell cycle progression, survival, adhesion and motility [144]. Not surprisingly, the ERK1/2 MAP kinase pathway is found commonly deregulated in cancer.

2. Hyperactivation of the Ras-ERK1/2 MAP kinase pathway in cancer

Hyperactivation of the Ras/Raf/MEK/ERK1/2 pathway by aberrant activation of receptor tyrosine kinases or by gain-of-function mutations in *RAS* or *RAF* genes is a highly prevalent event in human cancer. Gene amplification and mutational activation of members

of the HER (human EGF receptor) family of receptors are frequently observed in human epithelial tumors and gliomas [272]. Activating mutations in *RAS* genes, most frequently in *KRAS*, occur in ~ 30% of cancers and are often acquired early in the tumorigenic process [1, 273]. Although Ras is known to regulate multiple effector pathways, the discovery that *BRAF* is mutated in ~ 20% of all cancers and in 44% of melanomas has provided genetic evidence for the involvement of the Raf/MEK/ERK1/2 effector branch in oncogenic signaling [273, 274]. Raf relays its oncogenic signals mainly via the MAP kinase kinases MEK1 and MEK2. Several studies have shown that expression of activated alleles of MEK1 or MEK2 is sufficient to deregulate the proliferation and transform immortalized fibroblast and epithelial cell lines [165, 275-278]. *In vivo*, orthotopic transplantation of mammary or intestinal epithelial cells expressing activated MEK1/MEK2 into mice induces the formation of metastatic tumors [277, 278]. Transgenic expression of activated MEK1 in mouse skin induces hyperproliferative and inflammatory lesions and inhibits epidermal differentiation, mimicking features of squamous cell carcinomas [123, 124]. Although mutations in *MEK1/MEK2* genes are rare in cancer [32], numerous studies have documented the hyperactivation of MEK1/MEK2 and ERK1/ERK2 in solid tumor and leukemia clinical specimens [31, 279].

The downregulation of negative signaling regulators of the pathway is also observed in cancer. Negative signaling regulators are feedback-induced mechanisms that are innate to the cell. Members of this group include Raf kinase inhibitor protein 1 (RKIP1), the MAPK phosphatases (MKPs), the SPROUTY and SPRED families and Sef. There is accumulating evidence that negative signaling regulators are implicated in tumor development and progression. RKIP1, which inhibits RAF activation of MEK, is frequently lost in cancer and its loss has been associated with metastatic progression in many epithelial tumors [280-284]. The modulation of MKPs in cancer has been reported to be differently regulated from tumor type and stage. In prostate cancer, MKP1 is increased in the early disease but progressively diminishes in higher histopathological grades [285, 286]. Studies

have also reported a marked downregulation of MKP3 in numerous pancreatic cell lines [287]. In clinical samples, the MKP3 level is significantly downregulated in invasive pancreatic tumors, ovarian cancer and in non-small cell lung cancer (NSCLC) [288-290]. Indeed, loss of SPROUTY has also been reported in various tumor types such as breast cancer, NSCLC and hepatocellular carcinoma [291-293]. Sef is a major spatial regulator that binds to MEK1/2 and tethers MEK1/2-ERK1/2 complexes to the Golgi apparatus and plasma membrane, thereby blocking ERK1/2 signaling to the nucleus [129]. Sef has been found to be downregulated in the majority of human prostate, breast, thyroid and ovarian carcinomas of intermediate to high grades [294, 295].

Consistent with its physiological involvement in the regulation of cell proliferation and survival, aberrant activation of the ERK1/2 pathway is expected to relax the growth factor dependency and enhance the survival of cancer cells. In addition, accumulating evidence suggest that this signaling pathway also contributes to the increased motility and invasiveness of tumor cells, another hallmark of cancer [296]. In this review, we relate the evidence of the role of ERK1/2 MAP kinase signaling in the pathogenesis of cancer metastasis and discuss the therapeutic potential of MEK1/2 inhibitors for cancer treatment.

3. The ERK1/2 MAP kinase pathway in cancer metastasis

Metastasis is a complex process by which tumor cells spread from a primary site to form new tumors in distant organs [297, 298]. The metastatic process consists of a series of sequential and rate limiting steps that can be defined as follows: 1) detachment from the primary tumor and local invasion; 2) intravasation into the lymphatic or blood circulation; 3) transport to distant anatomical sites and arrest in microvessels; 4) extravasation into the surrounding tissue; 5) formation of micrometastases; and 6) colonization and formation of large clinically detectable metastases. The outcome of the metastatic process is dependent on both the intrinsic properties of the cancer cells and the host response.

3.1. Loss of cellular contacts, detachment from the primary tumor and local invasion

3.1.1. The epithelial-mesenchymal transition (EMT)

One of the first steps in the metastasis process involves changes in the intercellular adhesion properties of cancer cells. Carcinoma cells undergo a drastic modification known as epithelial-mesenchymal transition (EMT), whereby epithelial cells switch to a fibroblast-like mesenchymal phenotype, enabling their detachment from epithelial sheets within the primary tumor and favoring their motility and invasiveness [299, 300]. EMT is characterized by morphological changes, loss of apical-basal polarity and alterations in gene expression profiles. A major determinant of the reduced intercellular adhesion observed during EMT is the loss of the epithelial adherens junction protein E-cadherin [301]. Various mechanisms can lead to silencing of E-cadherin expression during tumor progression, but transcriptional repression has emerged as a fundamental mechanism. Several transcriptional repressors, including Snail, ZEB and bHLH factors (E47/E2A, Twist), have been found to inhibit the expression of the E-cadherin gene and to induce EMT [302].

Multiple signaling pathways can induce EMT, including transforming growth factor- β (TGF- β), Wnt, NF- κ B, Notch, phosphoinositide 3-kinase and ERK1/2 MAP kinase [302, 303]. Early studies have shown that expression of activated MEK1 in MDCK cells results in morphological transformation and conversion to invasive mesenchymal-like cells [276, 304, 305]. Other studies also documented the essential role of the ERK1/2 pathway in hepatocyte growth factor (HGF)/scatter factor-induced scattering of epithelial cells [304, 306, 307]. Experiments revealed that hyperactivation of the ERK1/2 pathway cooperate with TGF- β to induce a full EMT in these cells [308]. Treatment with the MEK1/2 inhibitor PD98059 completely prevented and reversed EMT. More recently, we have reported that expression of activated forms of MEK1 or MEK2 induces a partial EMT in IEC-6 intestinal

epithelial cells, characterized by loss of epithelial polarity, adoption of a fibroblastoid morphology and downregulation of E-cadherin expression [278].

One mechanism by which ERK1/2 signaling contributes to EMT execution is through induction of the Snail family of transcriptional repressors. In MDCK cells, treatment with PD98059 was found to decrease basal Snail promoter activity and to abolish Snail induction in response to TGF- β or activated Ras [302]. HGF-induced Snail expression and cell scattering is also dependent on ERK1/2 activation in hepatocytes [309]. Notably, the upregulation of Snail by HGF requires the activity of the zinc finger transcription factor Egr-1, a known target of ERK1/2 MAP kinases. Activation of the ERK1/2 pathway by receptor tyrosine kinases also leads to the induction of Slug and to repression of E-cadherin transcription in colon carcinoma cells [310]. Another mechanism by which oncogenic Ras-mediated ERK1/2 activation decreases intercellular adhesion in lung epithelial cells is through induction of metalloproteinase (MMP)-9 and proteolytic cleavage of E-cadherin, resulting in partial disruption of adherens junctions [311]. Interestingly, a recent study has identified RSK1 and RSK2 as key effectors of the ERK1/2 pathway for eliciting cell scattering and mesenchymal gene expression in epithelial cell lines of diverse origins [312]. RSK activity is also important for Raf-induced secretion of TGF- β in MDCK cells.

3.1.2. Extracellular proteases and invasiveness

The most characteristic trait of malignant cells is their ability to invade normal adjacent tissues. Dissemination of cancer cells involves the breakdown and remodeling of extracellular matrix (ECM) components by extracellular proteases to allow movement of individual or collective mass of cells into new passage ways. Several classes of proteases contribute to ECM remodeling, but the most important are probably the MMPs, a family of zinc-dependent proteinases that can degrade all components of the ECM [313, 314]. The role of MMPs is not limited to tumor cell invasion, as these enzymes can proteolytically

process a large number of growth factors, cytokines, adhesion molecules and precursor of biologically active proteins to impact on tumor initiation, angiogenesis and immune surveillance [315]. Cancer cells frequently upregulate MMP expression, but the bulk of these proteases are secreted by host-derived cells like fibroblasts, endothelial cells or inflammatory cells that contribute to the tumor microenvironment. It should be noted that individual tumor cells can switch to an amoeboid mode of movement and invade local tissue in the absence of extracellular proteolysis [316].

The ERK1/2 MAP kinase pathway plays a major role in inducing proteolytic enzymes and promoting tumor cell invasiveness. Numerous studies have reported that pharmacological inhibition of MEK1/2 markedly decreases the invasiveness of various carcinoma cells in vitro [317-320]. Importantly, constitutive activation of MEK1 or MEK2 is sufficient to upregulate the expression of ECM proteases and to increase the invasive capacity of mammary and intestinal epithelial cells [277, 278]. Biochemical studies and transcriptional profiling experiments have revealed that the ERK1/2 pathway regulates the expression of several MMP genes, such as MMP-1, MMP-3, MMP-7, MMP-9, MMP-10, MMP-11, MMP-13, MMP-14, MMP-19 and MMP-25 [278, 312, 318, 321, 322]. ERK1/2 signaling also coordinately enhances the expression of $\alpha 2$ -integrin and CD44, which act as receptors for MMP-1 and MMP-9, respectively [312]. Compelling evidence that these MMPs regulate tumor progression and metastasis was provided by genetic studies employing engineered mouse models [313].

Another protease that plays a crucial role in tumor cell invasion and metastasis is the serine protease urokinase-type plasminogen activator (uPA) [323, 324]. Activated uPA bound to its cell surface receptor uPAR on tumor cells converts the zymogen plasminogen into the active protease plasmin, which in turn cleaves pro-MMPs into MMPs and latent TGF- β 1 into its active form. Hyperactivation of ERK1/2 MAP kinases was shown to upregulate the expression of uPA and of its receptor uPAR in a variety of stromal and

tumor cell types [277, 278, 312, 324, 325].

3.1.3. Tumor cell motility

The acquisition of cell motility is essential for tumor cells to invade surrounding tissues and enter into the blood or lymphatic circulation. Cancer cells can move by at least three distinct mechanisms: mesenchymal motility, amoeboid motility and collective motility [316]. Studies with cultured cells and gene expression profiling have provided strong evidence for the involvement of the ERK1/2 signaling pathway in mesenchymal motility of epithelial cells [159, 312]. The cell motility cycle consists of the following steps: formation of protrusions at the leading edge, integrin-mediated adhesion to the underlying substrate, cell contraction and disassembly of adhesions at the rear [326]. The Rho GTPases Cdc42 and Rac, which are key regulators of actin dynamics, control the formation of protrusions (filopodia and lamellipodia) at the front of the moving cell [327]. Rho, on the other hand, regulates the assembly of stress fibers and focal adhesions assembly and is required for cell body contraction.

One of the mechanisms by which the ERK1/2 pathway promotes cell motility is by regulating the activity of Rho family GTPases. In colon carcinoma cells, ERK1/2 signaling was shown to coordinately modulate the activity of Rho and Rac via transcriptional upregulation of the Fra-1 transcription factor and uPAR [328]. Induction of Fra-1 inactivates β 1-integrin signaling by an unknown mechanism, resulting in the repression of Rho-GTP levels and reduced activation of the Rho effector ROCK. This prevents the formation of excessive stress fibers and focal adhesions, allowing Rac-induced membrane ruffles to be extended into protrusions. Elevated expression of uPAR drives the activation of Rac and membrane ruffling by a Fra1-independent mechanism. Active ERK1/ERK2 MAP kinases localize to cell adhesions [329] and several studies have shown that local ERK1/2 activity is required for focal adhesion disassembly and migration [330-332].

Various molecular mechanisms have been proposed to explain how ERK1/2 signaling affects adhesion, including stimulation of calpain 2 activity and proteolysis of FAK, downregulation of ROCKI/II expression or activity, and induction of Rnd3 expression [330, 333-336]. A more recent study reported that oncogenic Ras-mediated ERK1/2 activation induces tyrosine dephosphorylation and inhibition of FAK activity, resulting in decreased adhesion and enhanced migration and metastasis [337].

Chen *et al* (2009) has reported that ERK-dependent gene expression, rather than direct ERK signaling, is essential for MDA-MB-231 cell migration. ERK activity was shown to promote the expression of Fra-1 and c-Jun, both of which were necessary for cell migration. U0126 treatments were shown to inhibit cell migration concomitant with reduction of Slug expression. Further experiments also reveal that Slug expression is required for *in vitro* cell invasion and *in vivo* metastasis [338].

Another target of ERK1/2 MAP kinases involved in the regulation of cell motility is myosin light chain kinase (MLCK). Together with ROCK, MLCK regulates actin-myosin contractility by phosphorylating the regulatory light chain of myosin II. A study showed that ERK1/2 directly phosphorylate MLCK leading to increased myosin light chain phosphorylation and enhanced cell migration [339]. It has been suggested that ERK1/2-mediated activation of MLCK is required to generate the traction force necessary for pseudopodial protrusion formation at the side of the cell facing the chemotactic gradient [340]. Rho activity, on the other hand, facilitates pseudopodia retraction. It should also be emphasized that mesenchymal motility is dependent upon proteolytic degradation of the ECM, which is regulated by the ERK1/2 pathway as discussed above.

3.2. Intravasation and dissemination to distant organ sites

3.2.1. Intravasation

Metastasising cells that detach from the primary tumor must enter into the bloodstream and survive in the circulation until they can arrest at a secondary site. Both active and passive mechanisms have been proposed to explain how tumor cells enter the vasculature [341]. Interestingly, a recent study reported that expression of the Raf/MEK/ERK1/2 pathway inhibitor RKIP in the metastatic breast cancer cell line MDA-MB-231 inhibits cell intravasation in a murine orthotopic model [342].

3.2.2. Surviving anoikis

Following intravasation, tumor cells undertake a dangerous voyage in the hostile environment of the blood circulation, where they are devoided of contact with the ECM and are threatened by high shear stress. Epithelial cells, as well as other cell types, that lose appropriate contact with the matrix or neighboring cells undergo a form of apoptosis known as anoikis [343]. Surviving anoikis, therefore, is a prerequisite for cancer progression and establishment of metastases. An early study revealed that transformation of MDCK epithelial cells with oncogenic Ras confers resistance to anoikis, although the downstream effectors mediating this response were not characterized at that time [344]. Subsequently, several studies reported that activation of the ERK1/2 MAP kinase pathway is both necessary and sufficient to protect against cell detachment-induced apoptosis in fibroblast, endothelial and epithelial cell models [345-350]. One of the main mechanisms by which ERK1/2 signal anoikis survival is by repressing the expression or activity of pro-apoptotic Bcl-2 family proteins such as Bim, and by inducing the expression of pro-survival members like Bcl-2 and Mcl-1 [351]. In a pioneer study, Reginato et al. [352] have shown that

expression of H-Ras^{V12}, Raf-CAAX or MEK2DD in the mammary epithelial cell line MCF-10A completely inhibits the upregulation of Bim expression in suspension and prevents anoikis. Other mechanisms such as upregulation of c-FLIP expression [345] or autocrine production of EGF receptor ligands [349] may also contribute to the survival effect of the ERK1/2 pathway.

3.2.3. Escape from immune response

In addition to surviving anoikis, tumor cells in the circulation must also escape recognition and destruction by the immune system. Although the role of the ERK1/2 MAP kinase pathway in immune-mediated antitumor responses has not been studied extensively, recent reports suggest that ERK1/2 may also control the escape of tumor cells from immune surveillance. The expression of major histocompatibility complex (MHC) class II genes is necessary for presentation of antigens to CD4+ lymphocytes and induction of an effective immune response. Both the constitutive and inducible expression of MHC class II proteins is regulated by the transcriptional activator class II transactivator (CIITA) [353]. Studies have shown that ERK1/2 signaling negatively regulates the expression and function of CIITA in dendritic cells and macrophages [354, 355]. Interestingly, a recent study identified the Ig superfamily membrane glycoprotein CD200 as a transcriptional target of the Raf/MEK/ERK1/2 pathway in melanoma cells [356]. Expression of CD200 mRNA is higher in melanoma than in other tumors and correlates with progression from nevi to melanoma. Importantly, the authors showed that melanoma cell lines expressing high CD200 repressed primary T cell activation by dendritic cells, an effect abrogated by RNAi silencing of CD200 expression. These findings suggest that hyperactivation of ERK1/2 in metastatic melanomas attenuates the host antitumor immune response.

Another study reported that stimulation of human keratinocytes with EGF or expression of oncogenic Ras activates ERK1/2 and markedly decreases expression of the

skin-associated chemokine CCL27, which regulates the recruitment of T cells to the skin during immune surveillance [357]. Treatment of keratinocytes with the MEK1/2 inhibitor U0126 was found to abrogate the suppression of CCL27 expression. This suggests that skin tumors may evade T cell-mediated antitumor response by downregulating CCL27 expression through activation of the Ras-ERK1/2 pathway.

3.3. Extravasation, formation of micrometastases and outgrowth of secondary tumors

3.3.1. Extravasation

Once at the secondary site, tumor cells must adhere to the endothelium and transmigrate across endothelial cells by a process known as diapedesis. Expression of the adhesion molecule E-selectin, which is induced by proinflammatory cytokines, appears to play an important role in the homing of cancer cells [358]. Early studies have shown that metastatic Ras-transformed NIH 3T3 fibroblasts and parental nontransformed cells extravasate with the same kinetics in the chick chorioallantoic membrane model or after injection in the mouse mesenteric vein [359, 360]. However, a recent study has suggested that the ERK1/2 MAP kinase pathway may play an active role in diapedesis [361]. Indeed, it has been reported that activation of E-selectin by the binding of circulating colon cancer cells triggers the activation of ERK1/2, and that inhibition of ERK1/2 signaling with PD98059 or by adenoviral expression of a dominant-negative ERK1/2 mutant inhibits E-selectin-mediated transendothelial migration.

3.3.2. Establishment and outgrowth of micrometastases into macrometastases

The outgrowth of single extravasated cells into micrometastases and eventually macrometastases is a very inefficient step of the metastatic cascade [297, 298]. Tumor cells must adapt to their new microenvironment, resist to immune attack, survive apoptosis, and

start proliferating. Early observations have shown that cancer cells do not colonize tissues randomly but have a predilection to form macrometastases in specific organs. This compatibility between disseminated tumor cells and host tissues has led to the formulation of the “seed and soil” hypothesis [362]. Several mechanisms have been proposed to explain the tropism of metastasizing cells.

Much evidence point to a role of the ERK1/2 MAP kinase pathway in the outgrowth of micrometastases. Cohort studies using breast carcinomas [363, 364], head and neck squamous cell carcinomas [365] report significant correlation between the level of activated ERK and enhancement of nodal metastasis. Webb *et al.* [366] compared the ability of Ras effector domain mutants expressed in NIH 3T3 fibroblasts to mediate tumorigenic and metastatic phenotypes in nude mice. While all Ras effector mutants displayed comparable tumorigenic properties, only the V12S35 mutant that activates the Raf/MEK/ERK1/2 pathway was able to induce the formation of lung metastases when injected intravenously. To confirm this finding, the authors further showed that expression of the Mos oncogene, a strong activator of MEK1/MEK2, or activated MEK1 also confer metastatic properties to the cells. These results suggest that constitutive activation of the ERK1/2 pathway is necessary and sufficient to promote the last steps of the metastatic cascade. High expression of uPAR, by interacting with and activating $\alpha 5\beta 1$ integrin, initiates a signaling cascade that leads to sustained activation of ERK1/2 and cell proliferation. High ERK1/2 activity is maintained by a positive feedback loop that induces uPA and uPAR expression (see above). Downregulation of uPAR expression decreases ERK1/2 activity and increases p38 activity, inducing dormancy of carcinoma cells.

ERK1/2 signaling may contribute to metastasis outgrowth via several molecular mechanisms. The central role of ERK1/2 in cell cycle progression and cellular survival is well documented and has been the subject of recent reviews [199, 230, 351, 367, 368]. In addition, growing metastases like primary tumors are critically dependent on the

recruitment of new blood vessels (angiogenesis) or on co-option of existing vessels to provide the cells with the nutrients and oxygen necessary to reach a clinically detectable size [369]. This angiogenic switch is controlled by a balance between pro-angiogenic factors, such as vascular endothelial growth factor (VEGF), and anti-angiogenic factors like thrombospondin. Activation of the ERK1/2 pathway can stimulate angiogenesis by upregulating VEGF expression through the regulation of Sp1 and HIF-1 transcription factors [370]. Finally, ERK1/2 signaling may also contribute to metastasis expansion by favoring immune-system evasion.

4. Rationale for targeting the ERK signaling pathway for cancer treatment

There is clearly a scientific rationale for the development of ERK1/2 pathway inhibitors for cancer treatment. The Ras/Raf/ERK/MEK1/2 pathway is frequently deregulated either by hyperactivation of the receptors, by gain-of-function mutations or by downregulation of negative signaling regulators. Due to the pleiotropic effect of the ERK1/2 signaling pathway in the acquisition of a complex malignant phenotype, specific blockading of the MEK/ERK pathway can induce inhibition of proliferation as well as reduction of invasion and angiogenesis in tumor cells.

MEK inhibitors differ from most other kinase inhibitors as they do not compete with ATP-binding, which confers a high specificity [371, 372]. Crystal structures analyses have revealed that both MEK1 and MEK2 have a unique binding site located on a hydrophobic pocket adjacent to, but not overlapping the ATP-binding site [21]. Furthermore, as Raf-1 is the major activator of MEK1/2, several other kinases, such as Mos, A-Raf, and B-Raf also activate MEK1/2. In comparison, no other substrates than ERK1 and ERK2 have been identified for MEK1/2 kinases. Another advantage of targeting the Raf/MEK/ERK1/2 pathway is that MEK1/2 stands at the focal point of numerous mitogenic signaling

pathways to integrate them into ERK pathway. In addition, the Raf/MEK/ERK1/2 pathway can be targeted without knowledge of the precise genetic mutation that is responsible for the aberrant activation. All these features highlight MEK1/2 as an excellent target for the development of inhibitors against the ERK1/2 signaling pathway [31, 373, 374].

4.1. Raf/MEK/ERK1/2 inhibitors in clinical studies

4.1.1 Raf inhibitors

The major cause of constitutive activation of the ERK pathway in human tumors is the presence of activating mutations in *RAS*, *RAF* or aberrant activation of receptor tyrosine kinases [1, 273]. Sorafenib (BAY43-9006) is a dual action RAF kinase inhibitor that targets tumor cell proliferation and tumor angiogenesis. However, Sorafenib is a multikinase inhibitor that also inhibits VEGF-R2, VEGF-R3, FGFR-1, the platelet-derived growth factor receptor tyrosine kinase PDGFR β , as well as Flt3 and c-Kit receptors [375]. Sorafenib was shown to exhibit broad-spectrum antitumor activity in human tumor xenograft models of colon, pancreas, breast and non-small-cell lung cancer (NSCLC) origin with mutation in *BRAF* or *KRAS* [20]. However, Sorafenib has been reported to be ineffective for metastasis treatment of malignant melanoma, whereas U0126 significantly decreased cellular proliferation and reduced the number and the size of lung metastases. Sorafenib was shown to inhibit principally angiogenesis, whereas U0126 can act on proliferation, survival, invasion and tumor angiogenesis [376]. Similar results were also obtained with CI-1040, another MEK inhibitor, for the treatment of lung adenocarcinoma [377].

Other Raf inhibitors are under development, such as RAF-265, an orally active agent that inhibits all three RAF isoforms (ARAF, BRAF and CRAF), VEGFR-2, c-Kit and PDGFR β [378]. RAF-265 is currently in a phase I clinical trial and has been shown to induce tumor regression and inhibit angiogenesis in various animal models. GSK2118436

(SB-590885) is a novel molecule that selectively inhibits RAF kinases with higher potency for BRAF. GSK2118436 has completed phase I studies and showed impressive inhibition of proliferation in human cancer cells lines bearing BRAF mutation. GSK2118436 is about to enter into phase II and III trials [378]. XL281 displayed high oral bioavailability and selectively inhibits the three RAF kinases. XL281 exhibited antitumor activity in various human xenograph tumor models. Further evaluations of XL281, which is in a phase II trial, are ongoing with colorectal, thyroid cancer, NSCLC and melanoma [379].

New selective inhibitors of active BRAF V600E have been developed, the PLX4720 and GDC-0879. Both were found to inhibit proliferation of cancer cell lines bearing activating BRAF mutation but, by opposition to the MEK inhibitor PD0325901, they have not been potent for the inhibition of the proliferation of BRAFWT or KRAS mutated cells lines [380, 381]. In addition, treatment-responsive patients ultimately relapse as a result of acquired resistance [382, 383]. However, PLX4720 is under clinical trial phases II and III.

4.1.2 MEK1/2 inhibitors

Many specific inhibitors of MEK1/2 have been developed (see Table I). Because of their pharmaceutical limitations, PD98059 and U0126 have not been clinically tested. Two other MEK inhibitors have gone to clinical trials; the PD184352 (CI-1040) and second-generation MEK inhibitor, PD0325901. They were all found to inhibit growth of human tumors in mouse xenografts and leukemia cells *in vitro* [20, 131]. However, their development has been stopped due to insufficient antitumor activity and low bioavailability.

Table I. Small molecule MEK1/2 inhibitors

MEK inhibitor	Cancer examined	Clinical trial	Status/Result	Company	References
CI-1040 (PD 184352)	Advanced colorectal, pancreatic, NSCLC, kidney, melanoma, breast	Phase I/II	Development stopped, Due to pharmacological problems	Pfizer	[20, 116-117, 131]
PD0325901	Colon, NSCLC, breast, melanoma	Phase I/II	Discontinued	Pfizer	[156-157]
AZD6244 (ARRY-142886)	Multiple melanoma, HCC, advanced solid tumors	Phase I/II	Ongoing	Astra Zeneca/ Array BioPharma	[120, 132, 135-143]
GDC-0973 (XL518)	Advanced solid tumors	Phase I	Ongoing	Exelixis/ Genentech	[144-145]
RDEA119 (BAY 869766)	Advanced Malignancies	Phase I/II	Ongoing	Ardea Biosciences/ Bayer	[146]
GSK1120212	Solid tumors, Leukemia, Lymphoma	Phase I/II	Ongoing	GlaxoSmithKline	[148, Internet GlaxoSmithKline]
RO4927350	-	No clinical trial	-	-	[133]
RO5068760 (AZD8330)	Advanced Malignancies	Phase I	Ongoing	Array BioPharma/ AstraZeneca	[133, 149, 150 Internet AstraZeneca]
RO4987655 (CH4987655)	Solid tumors	Phase I	Ongoing	Hoffmann La Roche	[133, 149, 151]
TAK-733	Advanced Non-hematologic Malignancies and advanced Metastatic Melanoma	Phase I	Ongoing	Millenium Phramaceuticals	[133, 149, 152, Internet Millenium Phramaceuticals]
AS703026 (MSC1936369B)	Solid tumors	Phase I/II	Ongoing	EMD Serono	[133, 149, 154, Internet EMD Serono]
RO5126766	Advanced solid tumors	Phase I	Ongoing	Hoffmann La Roche	[133, 149, Internet Hoffmann La Roche]

AZD6244 (ARRY-142886), a potent selective adenosine triphosphate-uncompetitive inhibitor of MEK1/2, was shown to exert excellent preclinical activity against many different tumors in cell-based growth assays and in human tumor mouse xenograft models, including colorectal, pancreatic, NSCLC, hepatocellular cancer and melanoma [374, 384-386]. AZD6244 has undergone clinical trial phases I and II. The use of AZD6244 as a single agent was studied in biliary cancers that carry a poor prognosis. Three patients (12%) had a confirmed positive response, another 17 patients (68%) experienced stable disease and overall patient survival was increased by 4 months [387]. However, a clinical trial with AZD6244 as a treatment for hepatocellular carcinoma (HCC), has not increased overall survival and no radiographic responses were observed after treatment, despite evidence of suppression of ERK1/2 phosphorylation [388].

Preliminary results from randomized phase II clinical trials have compared AZD6244 with: i) the alkylating agent temozolomide in patients with unresectable stage 3 or 4 malignant melanomas [389], ii) the antimetabolite pemetrexed in patients with NSCLC who have failed to respond to previous chemotherapy [390], iii) capecitabine in patients with colorectal cancer who failed to respond to one or two previous chemotherapy regimens [391], iv) in advanced or metastatic hepatocellular carcinoma [392] and v) in advanced or metastatic pancreatic cancer [393]. Unfortunately, initial results from those clinical trials have not yielded overwhelming support for the use of MEK inhibitors as a single therapeutic agent in cancer patients who are not pre-screened for pre-existing activation of the Ras/MEK/ERK pathway. However, other phase II clinical trials are currently ongoing in various tumor types and in combination with various drugs [391, 394, 395].

GDC-0973 (XL518) is a potent orally bioavailable inhibitor of MEK1, with an $IC_{50} < 1nM$. Potent inhibition of ERK phosphorylation in various xenograph models and colon and melanoma tumor xenografts bearing BRAF mutations was observed. In addition,

at highly efficacious doses, GDC-0973 does not significantly inhibit ERK phosphorylation in the mouse brain, suggesting reduced potential for CNS side effects [396]. In a phase I dose-escalation study in patients with advanced solid malignancies (CRC, pancreatic, NSCLC, neuroendocrine, sarcoma, esophageal, adenoid cystic, ovarian and cervical cancer), GDC-0973 was found to be very well tolerated and no serious side effects have been reported. MEK and ERK signaling in tumor samples was inhibited and no inhibition of MEK in peripheral blood cells was observed. Interestingly, one patient with progressing NSCLC has had a stable disease for 7 months and continues on XL518 treatment [397].

RDEA119 (BAY869766), another allosteric inhibitors of MEK1/2 has been reported to exert potent antitumor activity in xenograph models of human melanoma, colon and epidermal carcinoma. The effects of RDEA119 as a single agent and in combination with rapamycin in primary pancreatic cancer xenografts, grown orthotopically, showed promising results. RDE199 is currently being evaluated in phase I clinical trials in monotherapy for neoplasm treatment and in phase II trials in combination with Sorafenib in patients with advanced cancers [398].

GSK1120212, a potent and selective allosteric inhibitor of MEK, was reported to exert strong antitumor activity with solid tumors and lymphoma [399]. Potent cell growth inhibition was observed in xenograft tumor models with BRAF or Ras mutants. GSK1120212 combines high potency, selectivity, long circulating half-life and has reduced activity in the brain. These pharmacological properties offer promise for successfully targeting the narrow therapeutic window hoped for the clinical use of MEK inhibitors [400]. Phase I and II clinical trials are currently ongoing with patients with relapse or refractory leukemia and in patients with solid tumors in combination with everolimus, an mTOR inhibitor.

RO4927350 is a potent and highly selective non-ATP-competitive MEK1/2 inhibitor, with a novel chemical structure and unique mechanism of action. RO4927350, was found to exhibit significant *in vivo* antitumor activity in multiple xenograft tumor models including human melanoma, colorectal, breast, pancreas, and NSCLC. The tandem inhibition of both ERK1/2 and MEK1/2 phosphorylation by RO4927350 is unique compared with other MEK inhibitors such as PD0325901 and AZD6244, which only inhibit the phosphorylation of ERK1/2. In addition, RO4927350 prevents a feedback increase in MEK phosphorylation, which has been observed with other MEK inhibitors. The unique MAPK signaling blockade mediated by RO4927350 in cancer may reduce the risk of developing drug resistance [385].

RO5068760 is a part of a novel class of potent and selective non-ATP-competitive MEK1/2 inhibitors with a unique structure and mechanism of action. With equivalent *in vivo* systemic exposures, RO5068760 showed superior efficacy in tumors harboring BRAFV600E mutation. Moreover, the plasma concentration time profiles indicate that constant phospho-ERK suppression (>50%) may not be required for optimal efficacy, especially in highly responsive tumors [401]. A recent preclinical trial on healthy volunteers reported that RO5068760 is very well tolerated and no severe adverse effects were observed [402].

More recently, a new orally-available potent MEK inhibitor, CH4987655, possessing a unique 3-oxo-oxazinane ring structure at the 5-position of the benzamide core structure, was shown to exhibit slow dissociation from the MEK enzyme. CH4987655 exerted remarkable *in vivo* antitumor efficacy both in mono- and combination therapy with everolimus (mTOR inhibitor). In addition, insignificant MEK inhibition in mouse brains was observed, implying a reduced CNS-related side effects in humans [403]. A phase I clinical study with solid tumor patients is currently in progress.

TAK-733 is novel oral MEK1/2 inhibitor that has been developed using a structure-based drug design. TAK-733 is highly selective and potent (IC₅₀=3.2 nM) and showed strong anticancer activity in various mouse xenograph models [404]. TAK-733 was advanced to phase I clinical studies for the treatment of advanced nonhematologic malignancies and melanoma.

AS703026, a novel selective orally bioavailable MEK1/2 inhibitor, has been evaluated in human multiple myeloma (MM). AS703026 was shown to inhibit growth and survival of MM cells [405]. Phase I clinical trials of AS703026 in subjects with solid tumors are ongoing. Phase I dose-escalation trials of AS703026 combined with Temsirolimus (mTOR inhibitor) in subjects with advanced solid tumors is also in progress. Phase I and II clinical trials will soon begin to assess the anti-tumor activity of AS703026 combined with FOLFIRI as a second-line treatment in metastatic KRAS mutated colorectal cancer subjects. Interestingly, inhibition of MEK1/2 by AS703026 or AZD6244 was shown to suppress cetuximab-resistant colorectal cancer cells attributed to KRAS mutation both *in vitro* and *in vivo*. Those findings offer proof-of-concept for the use of MEK inhibitors as an effective therapy in KRAS-mutated CRC [406].

RO5126766 is a first-in-class of dual Raf and MEK inhibitor. Multicenter dose escalating phase I has been initiated in patients with advanced or metastatic tumors. To date, of the 18 evaluable patients, one melanoma patient has a partial response, and 6 patients have experienced stable disease, for at least 8 weeks. RO5126766 was generally well tolerated, favourable pharmacodynamic and pharmacokinetic profile and promising preliminary antitumor activity has been observed [407].

5. Current research goals and challenges

Despite strong rationale for the development of MEK inhibitors to treat cancer, results from the clinical trials are disappointing. MEK inhibitors are cytostatic as opposed to cytotoxic. Thus their effectiveness as an anticancer drug in a monotherapy is limited. However, new MEK inhibitors with improved pharmaceutical properties and reduced toxicity such as RO4927350 and CH4987655, are in ongoing clinical trials. Combination therapy of MEK inhibitors with chemotherapy or radiotherapy may be more effective.

5.1 Selecting patient population for clinical trial evaluation

A current challenge facing development of MEK inhibitors is the selection of an appropriate patient population for clinical trial evaluation. Preclinical studies suggest that patients harbouring activating mutations in *RAS* or *BRAF* genes are better candidates for treatment with MEK inhibitors. For example, the incidences of BRAF mutation in a large fraction of melanoma patients are consistent with the striking activity of PD0325901 observed against a panel of BRAF-mutated xenographs [408]. Similarly, three partial remissions were reported in patients with advanced cancer with BRAF and NRAS mutations in phase I trial with PD0325901 [409].

A recent study was initiated to develop and characterize predictive biomarkers of responses to the MEK1/2 inhibitor AZD6244 in colorectal cancer (CRC). Results indicate that resistance to AZD6244 may be mediated in part by the upregulation of the Wnt pathway, suggesting potential rational combination partners for AZD6244 in CRC [410]. PLX4720-induced hyperactivation of the MEK-ERK1/2 pathway promotes resistance to apoptosis in both non-invasive and invasive mutant NRAS melanoma cells. These findings underscore the need to genotypically stratify melanoma patients before enrollment on a

mutant BRAF inhibitor trial [411]. Thus, future clinical trials should choose an appropriate patient group, based on genetic lesions or validated biochemical markers.

5.2 Combination of inhibitors

As yet, Sorafenib is the only inhibitor of the ERK1/2 pathway that has received approval for the treatment of advanced renal cell carcinoma and for HCC [375]. Interestingly, pharmacological inhibition of the MEK/ERK1/2 pathway by AZD6244 was shown to enhance the antitumor effect of Sorafenib in both orthotopic and ectopic models of HCC. This suggests that the combination of Sorafenib and MEK inhibitors has the potential to be clinically effective as it would allow the inhibition of angiogenesis and tumor growth without feedback activation of ERK, and may therefore improve the current treatment with Sorafenib alone [386].

Dual pathway inhibition also showed interesting results. A preclinical study evaluating the combinatory effect of the inhibition of MEK (PD-0325901) and PI3K/mTOR (PF-04691502) pathways showed synergistic activity. Enhanced cytotoxicity leading to tumor growth inhibition and regression were observed in a mouse model of ovarian cancer driven by PTEN loss and mutant *KRAS* [412]. Similarly, treatment of inductible lung cancers containing *KRAS* and *PI3KCA* mutations with the PI3K/mTOR (NVP-BEZ235) and MEK (AZD6244) inhibitors has led to an enhanced response [413]. The combined effect of MEK (PD0329501 or RDEA119) and mTOR (rapamycin) inhibitors also generated a synergistic effect in inhibition of proliferation and protein translation in human NSCLC cell lines, as well as animal models of lung cancer and pancreatic cancer [414, 415].

Chronic treatment of BRAFV600E melanoma cells with the BRAF inhibitor SB-590885 was found to induce drug resistance and enhance IGF-1R/PI3K signaling [416].

Nazarian et al. (2010) also reported that melanomas escape BRAFV600E targeting not through secondary BRAF mutations, but via receptor tyrosine kinase (RTK)-mediated activation of alternative survival pathways, or by activated RAS-mediated reactivation of the MAPK pathway. Those observations suggest that additional therapeutic strategies may be beneficial [417]. Interestingly, combined treatment with IGF-1R/PI3K and MEK inhibitors were reported to induce death of BRAF inhibitor-resistant cells [416].

In addition, inhibition of ERK1/2 suppressed their ability to modulate the activity of MEK1. By inhibiting ERK1/2, the negative feedback loop of MEK phosphorylation is suppressed and hence there will be an accumulation of activated MEK. This feedback loop regulation may provide an additional rationale for combining MEK and RAF inhibitors in certain therapeutic situations. Interestingly, the new MEK inhibitor, RO4927350, locks MEK1/2 in an inactive state and prevents its phosphorylation. This novel mechanism of action may allow RO4927350 to prevent the feedback increase in phospho-MEK that has been observed in tumor cells treated with other MEK inhibitors. Thus, the mechanistic differentiation of RO4927350 may provide additional clinical benefits such as a reduced risk of developing drug resistance compared with existing MEK inhibitors [385]. A resistant *MEK1* mutant has recently been found in a metastatic tumor that emerged in melanoma patients treated with AZD6244 [418]. In this case, combining an MEK inhibitor with an Raf inhibitor may be a benefit and could slow down the emergence of resistance.

5.3 Combination of MEK inhibitors with chemotherapy

Classical chemotherapy has often remained the most prescribed anticancer therapy for many malignancy types. Chemotherapeutic drugs such as taxol, cisplatin or doxorubicin unfortunately lead to drug resistance. In addition, these drugs have been shown to activate the Raf/MEK/ERK1/2 pathway by diverse mechanisms [414, 419, 420]. Thus, combining

classical chemotherapy with MEK inhibitors may enhance the therapeutic effectiveness of treatment.

Combining taxol treatment with MEK inhibitors was shown to synergistically enhance apoptosis and inhibit tumor growth [421, 422]. Similarly, combining MEK inhibitor (U0126) with cisplatin increased cell death in squamous cells carcinoma that are normally refractory to cisplatin [423]. The MEK inhibitors also synergize with arsenic trioxide (ATO) to induce apoptosis in APL and AML cells [424-426] and with UCN-01 to induce apoptosis in myeloma cells [427]. However, it should be noted that the combination of MEK inhibitors with chemotherapeutic agents does not always result in positive interaction. Combining MEK inhibitor (U0126) with betulinic acid, a drug lethal for melanoma cells, was shown to antagonize the normal enhancing effects on apoptosis of betulinic acid [428]. The new MEK inhibitor, RO4927350, which locks MEK1/2 in an inactive state that prevents their phosphorylation, may prevent MAPK activation by exogenous stimuli such as chemotherapeutic agent [385].

5.4 Combination of MEK inhibitors with radiotherapy

Approximately half of all patients with cancer receive radiotherapy during the treatment of their disease. The identification of novel therapeutic approaches that can be combined with and are complementary to radiotherapy may therefore afford the potential to improve significantly on current clinical outcomes [429]. One of the undesirable effects of radiotherapy is the activation of the Ras/Raf/MEK/ERK1/2 pathway [430]. A preliminary preclinical study reported significant antitumor benefits from combining daily oral dosing of AZD6244 with radiotherapy protocol in human tumor xenograft models [429]. In a recent study evaluating diverse signal transduction inhibitors as radiosensitizers, the pre-treatment of lung, prostate and pancreatic cancer cells with AZD6244 was found to

radiosensitize the cell lines *in vitro* and *in vivo*. Similar positive results were also obtained with cell lines bearing activation mutation in *KRAS* [431].

6. Concluding remarks

The ERK1/2 MAP kinase-signaling pathway has gained notoriety for its role in cell cycle progression and cell proliferation. However, later work has provided convincing evidence for the involvement of this pathway in other cellular processes that are essential hallmarks of cancer. *In vitro* studies of cancer cell lines and *in vivo* findings from animal models have highlighted the role of ERK1/2 signaling in cell survival, motility, invasiveness and angiogenesis. Through its various effects, the ERK1/2 pathway may contribute to every step of the metastatic process, from the early escape of cancer cells from the primary tumor to the late step of metastatic colonization (figure 2.1). Indeed, expression of activated forms of MEK1 or MEK2 in intestinal epithelial cells is sufficient to induce the formation of intestinal tumors and to promote tumor progression and metastasis in a mouse orthotopic transplantation model [278]. Moreover, hyperactivation of the ERK1/2 pathway has been associated with CIN and aneuploidy [180]. These pre-clinical studies suggest that a blockade of the ERK1/2 pathway with small-molecule inhibitors of Raf or MEK1/2 should prove effective not only in shrinking the primary tumor but also in restraining metastatic dissemination, which is the major cause of cancer-associated mortality. Specific MEK inhibitors have been developed and certainly represent promising therapies for cancer treatment. The recent clinical trial data suggests that MEK inhibitors will be effective for tumor growth inhibition in combination with chemotherapeutic drugs or radiation.

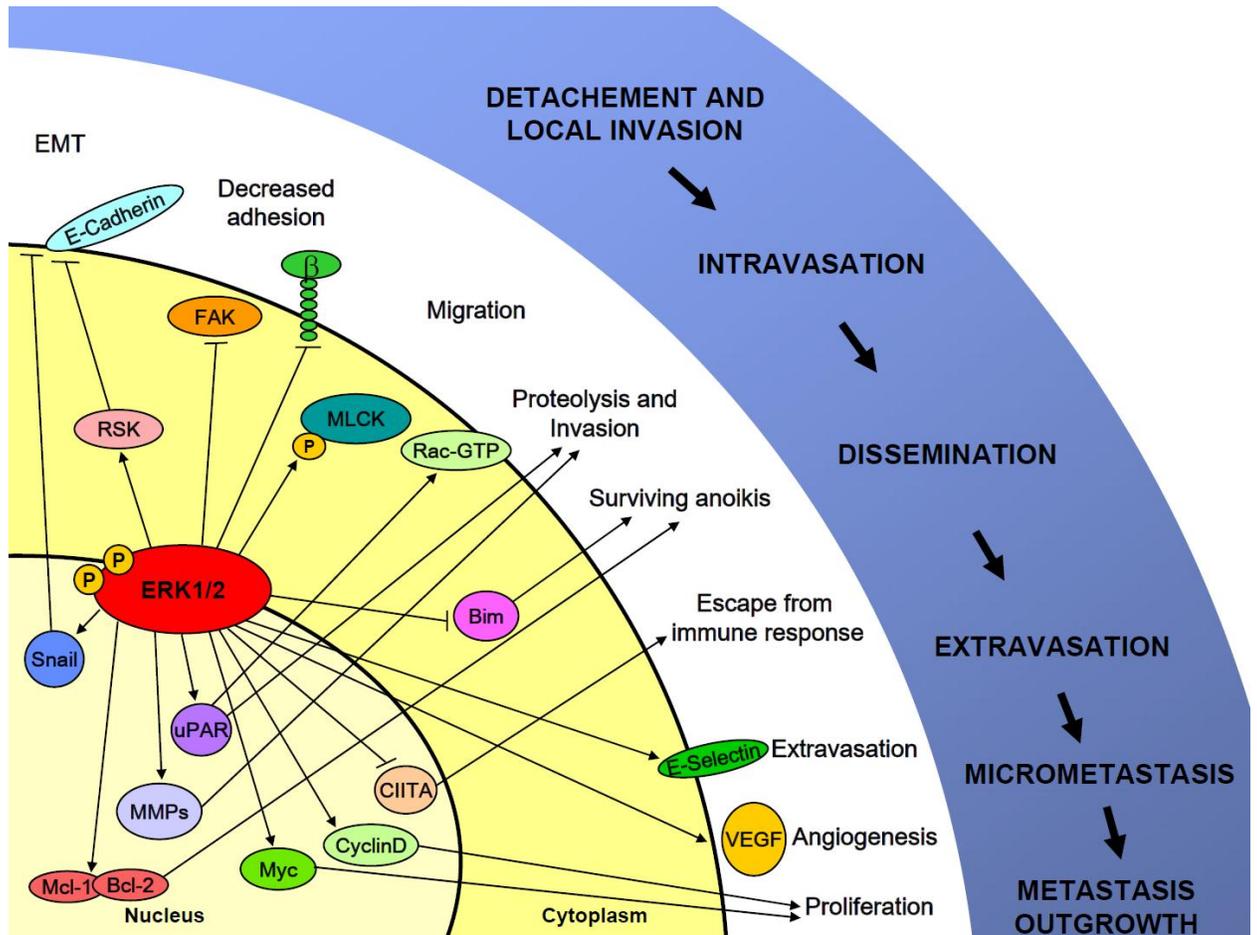


Figure 2.1. The ERK1/2 MAP kinase signaling pathway in cancer metastasis. Schematic diagram illustrating how ERK1/2 signaling may contribute to every step of the metastasis process, from the early escape of cells from the primary tumor to the late steps of metastatic colonization.

Acknowledgments

Work in the author's laboratory was supported by grants from the National Cancer Institute of Canada and the Cancer Research Society. S. Duhamel is recipient of a studentship from the Canadian Institutes for Health Research. S. Meloche holds the Canada Research Chair in Cellular Signaling.

Chapitre 3:

Le cancer colorectal

3.1 L'épidémiologie

À chaque année, plus d'un million de personnes, à travers le monde, développent un cancer colorectal; le taux de mortalité est d'ailleurs de plus de 33 % dans les pays développés [432]. Le cancer colorectal est le résultat d'une accumulation progressive d'altérations génétiques et post-traductionnelles qui vont transformer graduellement l'épithélium normal du côlon vers un stade adénomateux, celui-ci pouvant évoluer vers une dysplasie, un cancer, puis un carcinome métastatique.

La très grande majorité des cas de cancers du côlon surviennent sporadiquement. Les facteurs de risques qui y sont associés sont l'augmentation de l'âge, la présence de polypes intestinaux ou de cancer du côlon par le passé. Les maladies inflammatoires, telles que la maladie de Crohn et les colites ulcéreuses, peuvent augmenter l'incidence jusqu'à 66%, dépendamment de la durée et de la sévérité de l'inflammation [433, 434]. Seulement 6% des cancers colorectaux sont d'origines héréditaires; le syndrome de Lynch en représente la moitié. Quant aux autres types de cancers héréditaires, ils sont associés à une perte de fonction du gène MSH2, qui est impliqué dans la réparation des mésappariements des bases. Des délétions de EPCAM/TACSTD1, qui mènent à l'hyperméthylation du promoteur MSH2 et subséquemment, sont inactivation, sont observées [432].

L'impact des facteurs environnementaux, tels que le manque de fibre dans la diète, la consommation d'alcool ou la prise de suppléments de calcium, n'a pas été démontré de façon convaincante [435-437]. Cependant, il n'est pas exclu qu'un effet bénéfique puisse être obtenu dans certains types précis de cancers. Par exemple, il a été rapporté que l'administration d'acide acétylsalicylique (Aspirine) chez des patients atteints d'un cancer colorectal pouvait réduire jusqu' à 38% la mortalité par rapport aux patients non traités à l'Aspirine. Toutefois, des analyses subséquentes ont démontré que l'Aspirine réduit la mortalité seulement pour les cancers colorectaux COX-2 positif [438, 439].

3.2 La carcinogenèse colorectale

La carcinogenèse colorectale débute par une tumeur qui se développe à l'intérieur de la muqueuse intestinale. Si elle demeure non-traitée, elle peut alors s'étendre dans les couches musculaires, puis se loger en-dessous du muscle, pour éventuellement traverser les parois intestinales et potentiellement mener à la formation de métastases. La tumeur résulte d'une accumulation progressive d'altérations génétiques, tels que des mutations, l'amplification de gènes, ainsi que des altérations épigénétiques comme des modifications de la chromatine et des méthylations aberrantes. La somme de ces altérations transforme graduellement l'épithélium intestinal, engendrant des lésions pouvant évoluer du stade d'adénome bénin vers un adénocarcinome malin [434]. Ces mutations créent un avantage clonal qui permet la croissance de la tumeur, l'augmentation de sa malignité et peut éventuellement, lui conférer une capacité à intravaser, extravaser et former des métastases.

Les cancers colorectaux se classent en trois catégories : les MSI (instabilité microsatellite), les CIN (instabilité chromosomique) et les CIMP (phénotype de méthylation des îlots CpG). La séquence événementielle de la progression du cancer est semblable d'un type à l'autre mais les altérations génétiques qui y sont associées diffèrent.

D'abord, le cancer de type MSI (aussi nommé MIN) est associé à une perte de fonction du système de réparation des mésappariements de l'ADN (MMR). Le MSI est observé dans environ 15% à 20% des cancers du côlon sporadiques et dans 95% des cancers colorectaux de patient atteints du syndrome de Lynch [440]. La progression tumorale, avec le MSI, débute par la présence d'un polype précoce, qui est associé à une perte de fonction de MMR due à une hyperméthylation du promoteur de hMLH1. Ensuite, la voie de signalisation de Wnt est affectée. Bien que le mécanisme ne soit pas clairement connu, des mutations de CTNNB1, un gène codant pour la β -caténine, y ont été associés

chez des patients atteints du syndrome de Lynch. L'altération de la voie de Wnt enclenche l'évolution du cancer vers le stade d'adénome serrate. Puis, des mutations dans les gènes *TGFBR2*, *ACVR2*, *BAX*, *hMSH3*, *hMSH6* et *E2F-4* surviennent et permettent l'évolution du cancer vers un état de carcinome [203, 441]. Des mutations dans *BRAF*, qui surviennent plus tardivement, se retrouvent également dans les tumeurs sporadiques de type MSI qui ne sont pas associées au syndrome de Lynch [434, 442, 443] (figure 3.1).

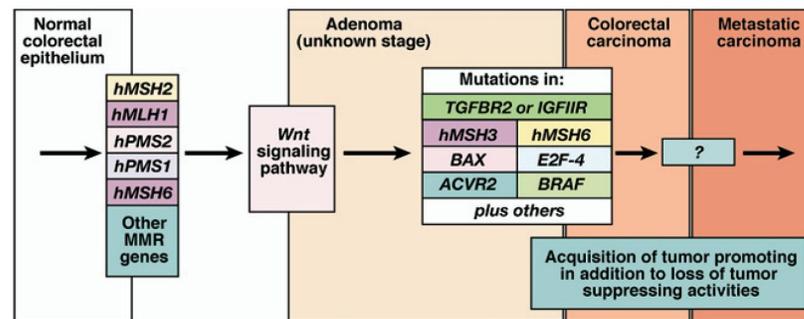


Figure 3.1. Schéma des mutations associées à la progression des cancers colorectaux de type MSI. (Gardy et Carethers, 2008. Gastroenterology. [434]).

La progression des tumeurs colorectales de type CIN survient quant à elle, d'une altération de la voie de Wnt, via des mutations du gène de l'APC, qui engendre une dysplasie de l'épithélium. Des mutations activatrices de *KRAS* mènent à un état d'adénome, puis les mutations inactivatrices de *TP53* surviennent [444, 445]. L'activation de *PIK3CA* peut également être observée dans certains cancers et mener à un état d'adénome avancé. Certains éléments associés à la signalisation de *TGF- β* sont aussi affectés et des mutations de *TGFBR2*, ainsi que de *SMAD2* et *SMAD4*, sont observées [443, 446]. L'évolution vers un état métastatique peut être associée à une amplification du gène *PRL3* [447] (figure 3.2).

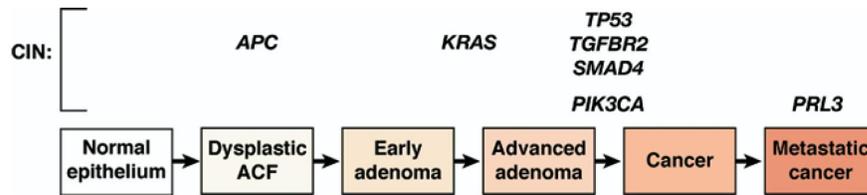


Figure 3.2. Schéma des mutations associées à la progression des cancers colorectaux de type CIN. (Gardy et Carethers, 2008. Gastroenterology. [434]).

La progression des cancers colorectaux caractérisée par la méthylation des îlots CpG (CIMP) est médiée par une séquence d'événements, qui recoupe celle des tumeurs sporadiques de type MSI, car l'hyperméthylation du gène hMLH1 fait partie de la séquence d'événement transformateur [448, 449]. Mais plutôt qu'une dysplasie générée par l'inactivation de la voie de Wnt, une dysplasie associée à la méthylation des promoteurs de MGMT, EVL, HLTF, SFRP2, SLC5A8 et MINT1 est observée. Ces méthylation surviennent durant la phase initiale de développement de la tumeur. Ensuite, l'hyperméthylation du promoteur hMLH1 est associée à l'évolution vers un adénome serrate. La méthylation subséquente de TSP1 et TIMP3 est reliée à la progression de l'adénome serrate vers un adénome serrate avancé, puis à un carcinome (figure 3.3) (revue dans [434]). Il est à noter que ces tumeurs comportent fréquemment la mutation activatrice de BRAF, V600E [450].

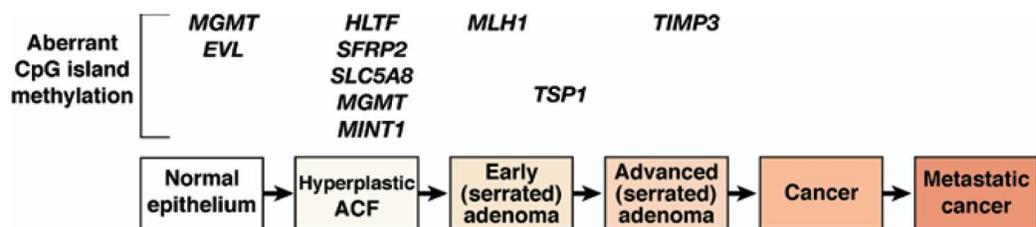


Figure 3.3. Schéma des mutations associées à la progression des cancers colorectaux de type CIMP. (Gardy et Carethers, 2008. Gastroenterology. [434]).

3.3 Les critères histologiques

Jusqu'à tout récemment, les polypes colorectaux épithéliaux se classaient en deux principales catégories : les polypes hyperplasiques et les adénomes. En raison de l'hétérogénéité des lésions hyperplasiques et des phénotypes particuliers des adénomes issus des cancers de type CIMP, des catégories telles que l'adénome sessile, serrate et mixte ont été ajoutées. Chacun de ces types comporte des critères histologiques particuliers [451].

Ainsi, le polype hyperplasique (HP), qui constitue de 80 à 90% des polypes, se caractérise par des cryptes allongées, une architecture serrate et non dysplasique. Le HP possède un diamètre inférieur à 5 mm et se situe généralement dans la partie gauche du côlon et dans le rectum. Le HP n'est pas associé à un risque d'évolution en carcinome (figure 3.4 A) [452].

L'adénome serrate traditionnel (TSA), une variation rare des lésions serrates, a une incidence de 1 à 6% [453]. Les TSAs sont des polypes pédonculés ou vilieux qui se situent, dans 60% des cas, dans le côlon descendant et le rectum. Les principales caractéristiques des TSAs sont la présence de polyploïdies, une serration proéminente, une éosinophilie cytoplasmique diffuse ainsi que la formation de cryptes ectopiques (figure 3.4 B). Ces lésions sont à haut risque d'évolution en carcinome [454].

L'adénome serrate sessile (SSA) est le second plus commun polype sessile, avec de 15% à 20% d'incidence. Celui-ci est une lésion plate ou légèrement surélevée de plus de 5 mm de diamètre et il se situe généralement dans la partie droite du côlon. Pour le diagnostiquer, deux des quatre critères doivent être présents : i) une hyperserration dans le tiers inférieur des cryptes; ii) une forme en T ou en L des cryptes en bordure de la muqueuse musculaire; iii) la présence de cryptes inversées sous la muqueuse musculaire et;

iv) une dilatation en colonne du tiers inférieur des cryptes. D'autres caractéristiques, telles que la présence de cellules à gobelet (ou à mucus) matures à la base des cryptes, ainsi que la présence de prolifération dans le milieu des cryptes et la détection de noyaux élargis peuvent être observées. Un risque d'évolution de la SSA en carcinome est également présent, mais à un degré incertain [455, 456] (figure 3.4 C).

Le polype mixte comprend les tumeurs qui sont constituées d'une combinaison d'adénomes conventionnels (AC) de type tubulaire, tubuvilleux ou vilieux et de lésion serrate. Différents types de polypes mixtes ont été décrits : une combinaison de SSA et TSA, de SSA et AC, de TSA et AC et une rare combinaison de HP et AC (figure 3.4 D). Les polypes mixte peuvent aussi évoluer en carcinome [451].

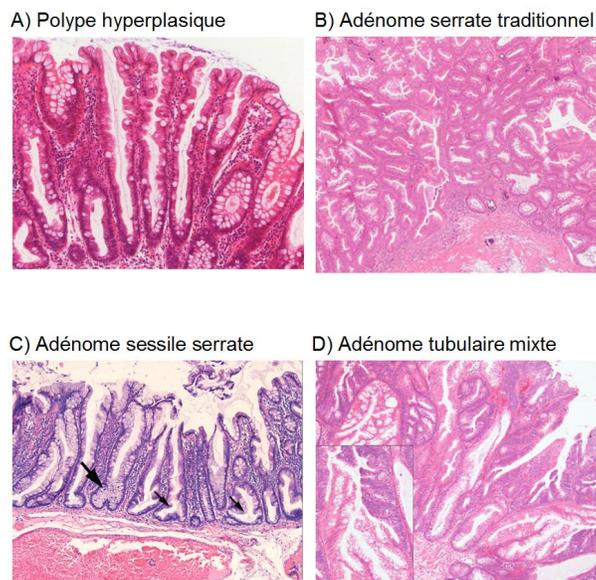


Figure 3.4 Critères histologiques des différents grades de tumeurs colorectales. (Modifié de Itzkowitz et *al*, 2004. Gastroenterology. [457]). A) Polype hyperplasique. B) Adénome serrate traditionnel. C) Adénome sessile serrate (la petite flèche indique une crypte en forme de T, la grosse flèche indique l'hyperserration dans le tiers inférieur de la crypte). D) Adénome tubulaire mixte.

3.4 Le traitement du cancer colorectal

Le traitement du cancer colorectal dépend du stade de la maladie. Les cancers confinés à l'intérieur de la paroi intestinale (stade I et II) sont souvent curables avec l'ablation de la tumeur par chirurgie, si bien que le taux de survie des patients, après 5 ans, est de 90%. Lorsqu'un cancer n'est pas traité, il peut s'étendre jusqu'aux ganglions lymphatiques (stade III) : le taux de survie de ces patients chute alors à 48%. Les cancers avancés, qui ont engendré des métastases dans d'autres organes (stade IV), ne sont pas curables et le taux de survie, après 5 ans, n'est que de 7% [458, 459].

La chirurgie demeure la première ligne de traitement pour le cancer du côlon, qu'elle soit curative ou palliative. Lorsque le cancer a atteint le stade III, l'addition d'une chimiothérapie est alors indiquée [460]. Depuis les vingt dernières années, la chimiothérapie, pour le traitement des cancers colorectaux, s'est nettement améliorée [461]. La thérapie standard, constituée de l'oxaliplatine, l'irinotecan (des camptothécines semi-synthétiques qui inhibent la topoisomérase I) et du 5-fluorouracil (un inhibiteur non compétitif de la thymidylate synthase), a permis de doubler le taux de survie des patients. Ainsi, l'espérance de vie des patients est passée de dix mois à près de deux ans grâce à cette combinaison de molécules.

Plus récemment s'est ajouté à l'arsenal thérapeutique les anticorps monoclonaux tels que le cetuximab, dirigé contre le récepteur de l'EGF et le bevacizumab, dirigé contre le VEGF, empêchant ainsi sa liaison avec son récepteur [462-465]. Le cetuximab est indiqué pour les patients atteints de cancer colorectal métastatique qui sont réfractaires à l'irinotecan [466]. En dépit de ces nouvelles molécules, qui permettent une thérapie mieux ciblée, le cancer du côlon demeure toujours la deuxième cause de mortalité par cancer dans les pays occidentaux [461]. Au Canada, en 2010, on estime à 22 500 le nombre de

personnes qui ont reçu un diagnostic de cancer colorectal, soit un homme sur 14 et une femme sur 15. Au total, neuf personnes sur 100 en mourront [467].

3.5 L'implication de la voie de Ras-ERK1/2 dans le cancer colorectal

La voie de signalisation de Ras/Raf/ERK/MEK1/2 est fréquemment dérégulée dans les cancers colorectaux. Les récepteurs de l'EGF sont surexprimés dans 60% à 80% des cancers du côlon [468, 469] et leur surexpression est associée avec l'émergence de métastase et une diminution de la survie des patients [470, 471]. Des mutations activatrices des trois gènes de *RAS* sont également retrouvées dans les cancers du côlon. L'oncogène *KRAS* est le plus fréquemment muté, avec des mutations activatrices observées dans 30% à 50% des adénomes et carcinomes colorectaux [1, 472-474]. Des mutations activatrices de *BRAF* ont également été relevées dans près de 15% des cancers du côlon [1, 19]. Bien que la voie de MEK/ERK1/2 soit fréquemment activée [475], la présence de mutations activatrices de MEK1/2 dans les cancers colorectaux est très rare, avec une incidence de 2,2% pour *MEK1* [34]. À ce jour, aucune mutation de ERK1/2, dans les tumeurs colorectales, n'a été répertoriée.

L'efficacité anti-tumorale du PD184352, un inhibiteur de MEK1/2, a été démontrée dans des modèles de xénogreffes de cancer colorectal. La croissance tumorale s'est vue inhibée de 80% à la suite de traitements oraux [319]. Toutefois, en raison d'une faible biodisponibilité, du métabolisme trop rapide et d'une activité anti-cancéreuse considérée insatisfaisante, le développement du PD184352 et des inhibiteurs de MEK1/2 de deuxième génération (PD0325901) a été abandonné [476]. Tel que décrit au chapitre 2, de nouveaux inhibiteurs de MEK1/2, avec des propriétés pharmacologiques nettement plus intéressantes, sont présentement en phase d'études cliniques. L'AZD6244 et, plus récemment, d'autres molécules inhibitrices de MEK1/2, telles que le BAY869766, le RO4927350 et le CH4987655, se sont avérées efficaces dans des modèles de cancer colorectaux chez la

souris [385, 398, 403]. Ces molécules font également l'objet d'études cliniques de phase I/II, en mono ou en thérapie combinée.

Cibler la voie de Ras-ERK1/2, dans le traitement du cancer colorectal, semble être une avenue intéressante. Il apparaît toutefois important de mieux caractériser l'implication de la signalisation des isoformes de MEK1 et MEK2 dans l'initiation et la progression des cancers colorectaux. Les quatre chapitres qui suivent, vont tenter de mieux définir ces rôles.

RÉSULTATS

Chapitre 4:

Le rôle de MEK1 et MEK2 dans l'initiation et la progression des cancers colorectaux

4.1 Mise en situation et objectif

L'objectif de ce deuxième article est d'évaluer l'impact de l'activation de MEK1 et MEK2 dans le processus de transformation tumorigénique de cellules intestinales épithéliales. La contribution exacte et la détermination d'un rôle spécifique de chacun des isoformes de MEK1 et MEK2 dans le processus de tumorigénèse colorectale étaient également recherchées.

4.2 Contribution des auteurs

J'ai effectué de 80 à 90% des expériences se rattachant à l'article. J'ai également fait plusieurs expériences complémentaires, qui ne sont pas publiés dans cet article, mais qui ont été nécessaires à la compréhension du projet.

4.3 Résumé

Une activation de la voie de signalisation de Ras/Raf/MEK/ERK1/2 est fréquemment observée dans les cancers colorectaux. À la suite d'une analyse extensive de biopsies de tumeurs colorectales humaines par micromatrices tissulaires (TMA), nous avons observé que 44% des tissus cancéreux exprimaient MEK1/2 phosphorylés, contre 10% des tissus normaux. Bien que la voie MEK/ERK1/2 soit fréquemment activée dans les cancers, la détermination du rôle précis de chacune des isoformes de MEK, dans la tumorigénèse colorectale, n'a jamais été clairement établie.

Nous avons démontré, pour la première fois, que l'expression de MEK1 ou MEK2 activé est suffisante pour transformer *in vitro* des cellules intestinales épithéliales de rat (IEC-6). L'expression des mutants actifs de MEK1 ou de MEK2 induit une altération

morphologique, une transition épithélio-mésenchymateuse, une dérégulation de la prolifération cellulaire et engendre la formation d'adénocarcinomes invasifs dans un modèle de greffe orthotopique du côlon chez la souris. De plus, nous avons démontré que l'inhibition de MEK2, par shRNA, supprime complètement la prolifération des lignées humaines de cancer colorectal, alors que la suppression de MEK1 a des effets minimes sur la prolifération.

En conclusion, les isoformes de MEK1 et de MEK2 sont tous deux habilités à induire la transformation et la formation de tumeurs intestinales métastatiques. Nos résultats suggèrent également que MEK2 pourrait jouer un rôle plus important que MEK1 dans la prolifération des cellules de cancer du côlon.

4.4 Article 2

Activation of MEK1 or MEK2 isoform is sufficient to fully transform intestinal epithelial cells and induce the formation of metastatic tumors

Laure Voisin¹, Catherine Julien¹, Stéphanie Duhamel^{1,2}, Kailesh Gopalbhai³, Isabelle Claveau^{1,2}, Marc K Saba-El-Leil¹, Ian Gaël Rodrigue-Gervais⁴, Louis Gaboury¹, Daniel Lamarre^{1,4}, Mark Basik⁵ and Sylvain Meloche^{1,2,3}

¹ Institut de Recherche en Immunologie et Cancérologie, Montreal, Quebec, Canada,
² Department of Molecular Biology, Université de Montréal, Montreal, Quebec, Canada,
³ Department of Pharmacology, Université de Montréal, Montreal, Quebec, Canada,
⁴ Laboratoire d'Immunovirologie, Centre de Recherche du CHUM, Université de Montréal, Montreal, Quebec, Canada, ⁵ Jewish General Hospital, McGill University, Montreal, Quebec, Canada

*Corresponding author: Dr Sylvain Meloche
Institut de Recherche en Immunologie et Cancérologie
Université de Montréal
2950, chemin de Polytechnique
Montreal (Quebec) Canada H3C 3J7
Tel.: (514) 343-6966

ABSTRACT

Background

The Ras-dependent ERK1/2 MAP kinase signaling pathway plays a central role in cell proliferation control and is frequently activated in human colorectal cancer. Small-molecule inhibitors of MEK1/MEK2 are therefore viewed as attractive drug candidates for the targeted therapy of this malignancy. However, the exact contribution of MEK1 and MEK2 to the pathogenesis of colorectal cancer remains to be established.

Methods

Wild type and constitutively active forms of MEK1 and MEK2 were ectopically expressed by retroviral gene transfer in the normal intestinal epithelial cell line IEC-6. We studied the impact of MEK1 and MEK2 activation on cellular morphology, cell proliferation, survival, migration, invasiveness, and tumorigenesis in mice. RNA interference was used to test the requirement for MEK1 and MEK2 function in maintaining the proliferation of human colorectal cancer cells.

Results

We found that expression of activated MEK1 or MEK2 is sufficient to morphologically transform intestinal epithelial cells, dysregulate cell proliferation and induce the formation of high-grade adenocarcinomas after orthotopic transplantation in mice. A large proportion of these intestinal tumors metastasize to the liver and lung. Mechanistically, activation of MEK1 or MEK2 up-regulates the expression of matrix metalloproteinases, promotes invasiveness and protects cells from undergoing anoikis. Importantly, we show that silencing of MEK2 expression completely suppresses the proliferation of human colon carcinoma cell lines, whereas inactivation of MEK1 has a much weaker effect.

Conclusion

MEK1 and MEK2 isoforms have similar transforming properties and are able to induce the formation of metastatic intestinal tumors in mice. Our results suggest that MEK2

plays a more important role than MEK1 in sustaining the proliferation of human colorectal cancer cells.

BACKGROUND

Colorectal cancer arises from intestinal epithelial cells in a multistep process that extend over several years and leads to the progression from a normal mucosa to aberrant crypt foci to benign adenomas up to invasive carcinomas [477]. Histo-pathological progression of colorectal tumors is associated with the progressive accumulation of genetic alterations in tumor suppressor genes and oncogenes [478]. The most frequently mutated oncogene in colorectal tumors is KRAS, a member of the RAS gene family. Activating mutations in the three RAS genes, most frequently in KRAS, have been found in ~30% of human neoplasias and are often an early event in tumor progression [1]. Specifically, KRAS mutations are detected in approximately 35% of all sporadic colorectal adenomas and carcinomas [1, 474]. Genetic and biochemical studies have firmly established the central role of Ras GTPases in regulating cell proliferation, growth and survival [479, 480]. More than ten distinct classes of Ras effectors have been identified to date, several of which are associated with oncogenic signaling pathways [481]. The best-characterized of the Ras effector pathways is the activation of the Raf family Ser/Thr kinases, leading to sequential phosphorylation and activation of MEK1/MEK2 and the mitogen-activated protein (MAP) kinases ERK1/ERK2 [267]. The importance of Raf in oncogenic signaling has been validated by the discovery of activating BRAF mutations in a variety of human tumors [274], including 14% of colorectal cancers [1].

Raf relays its oncogenic signals mainly via the MAP kinase kinases MEK1 and MEK2. Early studies have shown that expression of activated alleles of MEK1 is sufficient to deregulate the proliferation and trigger the morphological transformation of immortalized fibroblast [165, 275] and epithelial [276, 277, 305] cell lines. In vivo, orthotopic transplantation of mammary epithelial cells expressing activated MEK1 into syngeneic mice rapidly produced invasive adenocarcinomas [277]. Transgenic expression of active MEK1 in mouse skin induced hyperplasia, hyperkeratosis and perturbed

differentiation of the epidermis [123, 124]. Conversely, treatment with MEK1/2 inhibitors was shown to inhibit the proliferation of various carcinoma and leukemic cell lines [482, 483]. Notably, administration of an orally-available inhibitor of MEK1/2 elicited marked anti-tumor efficacy in mouse xenograft models of colon cancer and metastatic melanoma [319, 484]. In parallel, several studies using clinical specimens have documented the up-regulation and/or activation of MEK1/MEK2 and the MAP kinases ERK1/ERK2 in solid tumors and leukemias (see [31] and references therein). Collectively, these findings have provided strong rationale for the development of small-molecule inhibitors of MEK1/2 for chemotherapeutic intervention in cancer.

MEK1 and MEK2 display 85% amino acid identity overall and are expressed ubiquitously in cell lines and tissues. Although it is commonly assumed that the two isoforms are functionally equivalent, several lines of evidence, however, indicate that they are regulated differentially and may exert non-redundant functions [113, 485, 486]. Studies using RNA interference have suggested that both MEK1 and MEK2 are required for *in vitro* cell proliferation, and that they contribute to distinct cell cycle regulatory events [487]. However, the individual roles of MEK1 and MEK2 in tumorigenesis remain to be explored. Intriguingly, a recent report has shown that activated MEK1 but not MEK2 can promote epidermal hyperplasia in transgenic mice, even though both MEK proteins trigger ERK1/ERK2 phosphorylation [124].

Colorectal cancers often display activation of the ERK1/2 MAP kinase pathway and therefore represent potential targets for MEK1/2 inhibitors [475]. In this study, we have evaluated the ability of the two MEK isoforms to transform intestinal epithelial cells and to promote tumor formation and progression *in vivo*. Our results demonstrate that activation of either MEK1 or MEK2 is sufficient for full transformation of intestinal epithelial cells up to the invasive stage. Importantly, we show that MEK2 expression is essential for the proliferation of human colon cancer cells.

METHODS

Cell culture and infections

IEC-6 is a rat epithelial cell line with features of undifferentiated small intestinal crypt cells [488]. HCT116 [489], HT-29 [490] and SW480 [491] are human colorectal adenocarcinoma cell lines. MDA-MB-231 is a human breast adenocarcinoma cell line [492]. IEC-6, HCT116, HT-29 and MDA-MB-231 cells were cultured in DMEM containing 10% fetal bovine serum, 2 mM glutamine and antibiotics. SW480 cells were cultured in RPMI supplemented with 10% fetal bovine serum. IEC-6 cells were infected with retroviral vectors as previously described [493]. Populations of infected cells were selected with 4 µg/ml puromycine.

Mouse in vivo tumor studies

All animals were housed under pathogen-free conditions, and experiments were performed in accordance with CCAC guidelines and with Université de Montréal Institutional Animal Care and Use Committee approval. Female Balb/c athymic nude mice (nu/nu) were purchased from Harlan and used at 6–8 weeks of age. For subcutaneous tumor model studies, IEC-6 cells were harvested from sub-confluent cultures by brief exposure to 0.25% trypsin and 0.02% EDTA. The cells were washed once in PBS, and 3×10^4 cells in a final volume of 200 µl were injected subcutaneously in the flanks of the mouse. The mice were monitored regularly and the tumors were measured every 2–3 days using a caliper.

For orthotopic tumor model studies, 1×10^5 IEC-6 cells in a volume of 30 µl were implanted in the caecum of nude mice. Mice were anaesthetized with isoflurane during the surgical procedure. The caecum was exteriorized through a small midline laparotomy and cells were injected in the cecal wall. After implantation, the abdominal wall was closed and sutured, and the mice received a subcutaneous injection of 0.05 mg/kg buprenorphin for postoperative pain relief. The mice were monitored regularly and sacrificed when they

became moribund or manifested signs of disease. Following necropsy, the caecum, lungs and liver were excised, fixed in formalin and embedded in paraffin. Serial sections of the intestine and of lung and liver (0.3 mm apart) tissues were prepared and stained by H&E for histopathological evaluation.

Plasmids and antibodies

Human HA-tagged MEK1 and MEK2 cDNA constructs were used as templates for *in vitro* mutagenesis to generate the constitutively activated MEK1(S218D/S222D) (MEK1DD) and MEK2(S222D/S226D) (MEK2DD) mutants as previously reported [90]. All mutations were confirmed by DNA sequencing. All MEK constructs were subcloned into pBabe-puro vector for infection of IEC-6 cells.

Commercial antibodies were from the following sources: Bcl-2, Mcl-1 and GAPDH (FL-335) antibodies from Santa-Cruz Biotechnology; smooth muscle α -actin (clone 1A4), total actin (clone AC40) and α -tubulin (clone DM1A) from Sigma ; MEK1 (clone 25), MEK2 (clone 96), fibronectin (Clone 10) and E-cadherin (clone 36 for immunofluorescence and clone 34 for immunoblotting) from Transduction Laboratories; pan-cytokeratin (clone B311.1) and MMP-13 from Calbiochem ; vimentin from Chemicon (for immunofluorescence) and NeoMarkers (Ab-2; for immunoblotting); phospho-MEK1/2, Bcl-xL and Bim from Cell Signaling Technology.

Immunoblotting, protein kinase assays and immunofluorescence analysis

Cell lysis, immunoprecipitation and immunoblot analysis were performed as described previously [494]. The phosphotransferase activity of ectopically expressed MEK1 and MEK2 was assayed by measuring their ability to increase the myelin basic protein kinase activity of recombinant ERK2 *in vitro* as previously described [495].

Immunofluorescence staining was performed as described [496]. Cell samples were viewed by fluorescence microscopy on a Leica DM IRB microscope.

Real-time quantitative PCR analysis

Total RNA was isolated using the RNeasy Mini Kit (Qiagen) and was reversed transcribed and amplified using primers-probe set from Exiqon Universal ProbeLibrary. Real-time analysis of PCR product amplification was performed on the ABI PRISM 7900HT Sequence Detection System (Applied Biosystems). The mouse ribosomal 18S gene was used as endogenous control. The relative level of target gene expression was quantified using the $\Delta\Delta CT$ method.

Cell proliferation and transformation assays

Cell proliferation in vitro was measured by the colorimetric MTT assay. Briefly, exponentially growing cells were cultured in 24-well plates in complete DMEM medium. Cell proliferation was determined at 24 h intervals by replacing the culture medium with 0.05 ml of MTT solution (1 mg/ml MTT). The cells were then incubated at 37°C for 1 h prior to addition of 100 μ l of the solubilizer solution (DMSO with 2% (v/v) of glycine 0.1 M, pH 11). The absorbance was determined at 550 nm with reference at 620 nm.

Anchorage independence growth was evaluated as originally described [497]. Briefly, cells (2.5×10^4) were resuspended in 2 ml of top agar (0.4% Noble agar (Difco) in DMEM, 10% calf serum, 2 mM glutamine, and antibiotics) and overlaid on a solid layer of 5 ml of 0.7% agar in the same medium in 60-mm tissue culture plates. The cells were fed weekly with 1 ml of top agar in complete medium. The plates were examined for the presence of colonies after 21 days.

Migration and invasion assays

Cell migration and invasion were determined using a modified two-chamber migration assay. Membranes (8- μ m pore size; Neuro Probe) were either coated with 50 mg/ml collagen type I (migration assays) or with a layer of Matrigel extracellular matrix proteins (BD Bioscience) for invasion assays. The cells (5.5×10^4) were seeded in serum-free medium in the upper chamber and allowed to migrate to the lower chamber containing 10% fetal bovine serum as chemoattractant. After 6 h, the cells in the upper chamber were carefully removed using a wiper blade and the cells on the bottom side of the membrane were fixed and stained with Diff-Quick Stain Set (Fisher). The stained membrane was then digitally scanned and the density of cells was quantified using the NIH Image software. Essentially similar results were obtained when the stained cells were counted manually.

Detachment-induced apoptosis assay

Tissue culture plates were coated twice with 5 mg/ml Poly-HEMA (Sigma), allowed to dry at room temperature and rinsed with PBS. IEC-6 cells were added to the coated plates in complete growth medium at a density of 4×10^4 cells/cm² for the indicated times. The cells were then harvested, rinsed with PBS and counted. Apoptosis was measured on an aliquot of 104 cells using a cell death detection ELISA kit (Roche Diagnostics) according to the manufacturer's procedure.

Gelatin and casein zymography assays of MMPs

Conditioned medium harvested from IEC-6 cells was mixed with 2 \times Laemmli's sample buffer and incubated on ice for 10 min. The samples were analyzed by electrophoresis on a 10% SDS-acrylamide gel containing 1 mg/ml gelatin (Sigma) or on a Novex 12% Zymogram (casein) Gel (Invitrogen). The gel was washed twice in 2.5% Triton X-100 for 30 min to remove all traces of SDS, and then incubated overnight at 37°C in 50 mM Tris-HCl (pH 7.6), 10 mM CaCl₂, 100 mM NaCl and 0.05% Brij35. Then, the gel was stained with 0.05% Coomassie, destained and dried.

shRNA lentiviral infections

The shRNA constructs for human MEK1 (MAP2K1) and MEK2 (MAP2K2) genes were purchased from Open Biosystems. These constructs from The RNAi Consortium (TRC) library consist of 21 base stem and 6 base loop hairpins cloned in pLKO1 lentiviral vector. The HIV packaging (pMDLg/p REE and pRSV-REV) and VSV-G (pMD2-VSVG) plasmids were kindly provided by D. Trono (École Polytechnique Fédérale de Lausanne). For lentivirus production, 2×10^6 293T cells were cultured overnight in T25 flasks and co-transfected with 6 μg of plasmid vector, 1.5 μg of pMDLg/p REE, 3 μg of pMD2-VSVG and 1.5 μg of pRSV-REV using the calcium phosphate precipitation method. Viral supernatants were collected after 42 h. For infection of human carcinoma cell lines, cells were plated at a density of $1\text{--}4.5 \times 10^6$ cells per 10-cm Petri dish the day before, and were then incubated with viral supernatant in the presence of 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ polybrene for 5 h. After infection, the cells were washed twice with PBS, and cultured for 72 h before harvesting. The yield of infection was estimated by parallel infection of the cells with a GFP-encoding lentiviral vector. A similar efficiency of transduction was obtained in the colorectal and breast cancer cell lines used in this study.

Affymetrix GeneChip analysis

Total RNA was isolated from empty vector-, MEK1DD-, and MEK2DD-expressing IEC-6 cells (duplicate samples) using RNeasy RNA isolation kit (Qiagen). The quality of the RNA was assessed by determining the 260/280 nm absorbance ratios and by gel electrophoresis in agarose/formaldehyde gels. Reverse transcription, second-strand synthesis, and cRNA labeling were all performed using standard Affymetrix protocols. Biotinylated cRNAs were hybridized to rat Genome U34A GeneChips (Affymetrix) on an Affymetrix Fluidics Station at the McGill Genome Centre. After scanning of the gene chips, images were analyzed and the expression values were normalized using the

Affymetrix Microarray Analysis Suite (v5.0). The resulting expression values were analyzed using empirical Bayes methodology [498].

RESULTS

Constitutive activation of MEK1 or MEK2 is sufficient for transformation of intestinal epithelial cells and formation of tumors in vivo

Immunohistochemistry analysis of a colorectal cancer tissue microarray containing over 400 colorectal cancer and 50 normal colon tissue biopsies revealed that 44% of colorectal cancers display high cytoplasmic expression of phosphorylated MEK1/MEK2 as compared to 10% of normal tissues (analysis to be published elsewhere). To assess the functional significance of MEK1/MEK2 activation in colorectal cancer, we ectopically expressed wild type and constitutively active (DD mutant) versions of MEK1 and MEK2 by retroviral gene transfer in the normal undifferentiated intestinal epithelial cell line IEC-6 [488]. Polyclonal populations of infected clones were selected in puromycin and used for subsequent experiments. Immunoblot analysis confirmed that ectopic MEK isoforms are expressed at comparable levels in IEC-6 transduced populations (Figure 4.1A). Overexpression of wild type MEK1 or MEK2 did not affect the expression of endogenous MEK isoforms. However, ectopic expression of MEK2DD slightly increased the steady-state levels of endogenous MEK1, while overexpression of MEK1DD had a similar effect on MEK2 levels (Figure 4.1B). As expected, substitution of the activation loop Ser phosphorylation sites by Asp residues strongly potentiated the enzymatic activity of MEK1 and MEK2, but no reproducible difference in activity was observed between the two isoforms (Figure 4.1 C).

IEC-6 cells grow as a monolayer and display a typical epithelial morphology with organized cell-cell adhesions (Figure 4.1D). Overexpression of wild type MEK isoforms

had no noticeable effect on the morphology of IEC-6 cells. In contrast, expression of activated MEK1 or MEK2 led to drastic morphological changes accompanied by loss of cell-cell contacts; the cells adopted a spindle-like fibroblast morphology, were more refractile and formed multilayers. These changes are characteristic of epithelial-mesenchymal transitions (EMT) that play an important role in tumor progression [303]. To determine whether MEK1DD- and MEK2DD-expressing cells undergo an EMT, we examined the localization and measured the expression levels of various epithelial and mesenchymal markers. Parental and vector-infected IEC-6 cells showed a polarized basolateral membrane distribution of the epithelial marker E-cadherin, with basal expression of the fibroblast marker vimentin (Figure 4.1E). Ectopic expression of MEK1DD or MEK2DD resulted in the loss of E-cadherin staining at the plasma membrane (Figure 4.1E), concomitant with a marked reduction of E-cadherin protein and mRNA levels (Figure 4.1F and G). No significant change in the expression of keratins and no induction of the mesenchymal proteins vimentin and smooth muscle α -actin (we instead observed a decreased expression) were observed in these cells (Figure 4.1F). These results indicate that constitutive activation of MEK1 or MEK2, while disrupting normal epithelial morphology and polarization, is not sufficient to induce a full EMT in intestinal epithelial cells. This epithelial plasticity change has been referred to as scattering and is distinct from EMT [299].

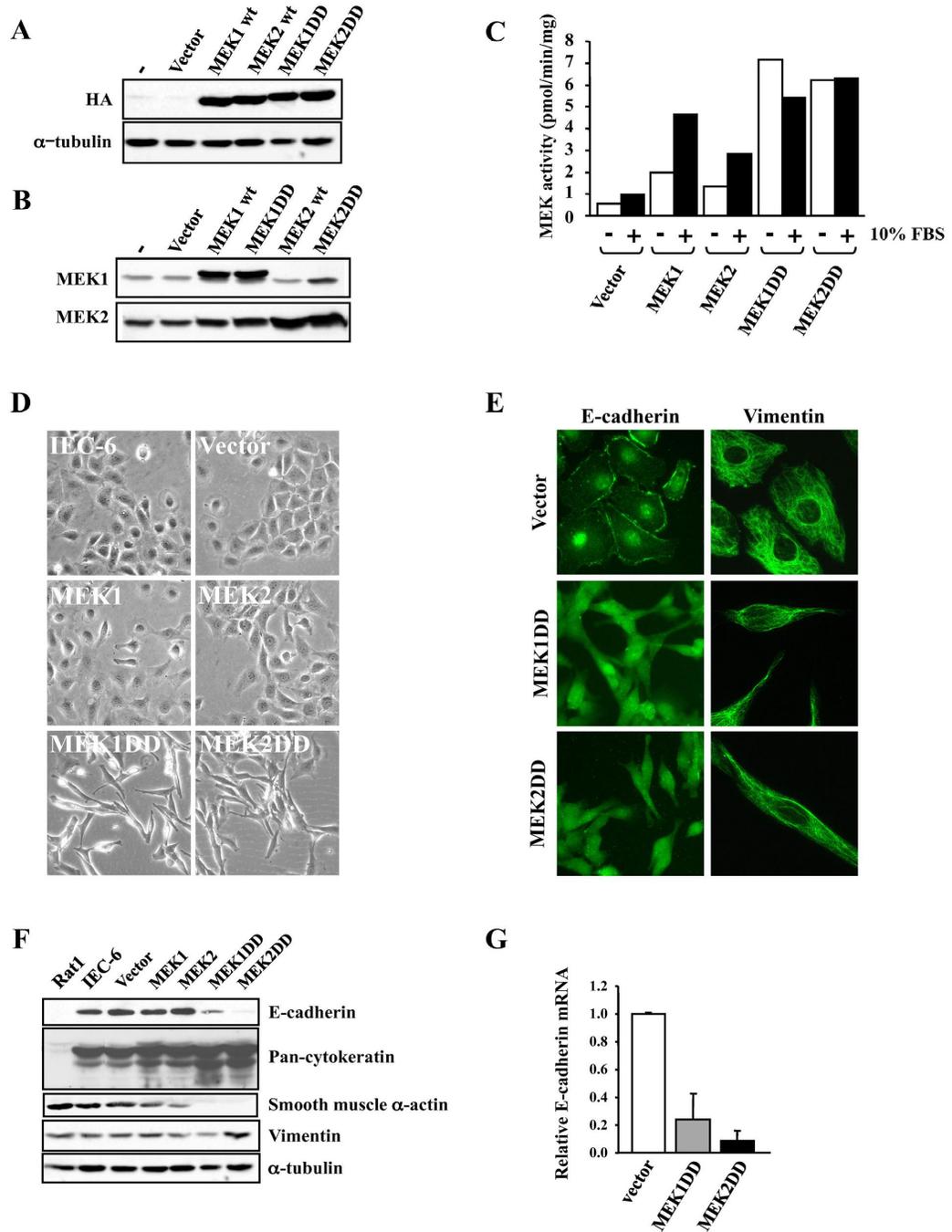


Figure 4.1 Expression of activated MEK1 or MEK2 morphologically transforms intestinal epithelial cells. IEC-6 cells were infected with retroviruses encoding the

indicated MEK constructs and populations of puromycin-resistant cells were selected for further analysis. (A) Expression of HA-tagged MEK1 and MEK2 was analyzed by immunoblotting with anti-HA antibody. (B) Expression of MEK1 and MEK2 was analyzed by immunoblotting with specific antibodies. (C) The ectopically expressed MEK proteins were immunoprecipitated with anti-HA antibody, and phosphotransferase activity was measured using an ERK2 reactivation assay. Results are representative of at least three independent experiments. (D) Morphology of exponentially proliferating IEC-6 cells stably expressing the indicated MEK constructs was examined by phase-contrast microscopy. (E) Immunofluorescence analysis of E-cadherin and vimentin expression. (F) Expression of E-cadherin, cytokeratins, vimentin and smooth muscle α -actin was analyzed by immunoblotting in the indicated cell lines. α -Tubulin was used as loading control. (G) Quantitative PCR analysis of E-cadherin mRNA levels. Expression levels are expressed as fold-increase relative to vector-infected cells.

We examined whether constitutive activation of MEK1 or MEK2 was conferring some proliferation advantage to intestinal epithelial cells. Ectopic expression of either activated MEK1 or MEK2 significantly increased the proliferation rate of IEC-6 cells grown in 10% serum containing-medium when compared to vector-infected cells or cells overexpressing wild type MEK isoforms (Figure 4.2A). This increase in proliferation was not observed in low serum (2%) containing-medium (data not shown). Both activated MEK1 and MEK2 conferred anchorage-independence growth to IEC-6 cells (Figure 4.2B). To test the tumorigenic potential of IEC-6 transduced cell populations *in vivo*, the cells were injected subcutaneously into athymic mice. Cells infected with vector or wild type MEK isoforms never formed any tumor (Figure 4.2C). In contrast, both MEK1DD- and MEK2DD-expressing cells generated rapidly growing tumors in all injected mice. Injection of as low as 3×10^4 cells produced tumors of $\sim 1,000 \text{ mm}^3$ after 2 weeks. No major difference was observed in the growth rate of tumors expressing activated MEK1 or MEK2 (Figure 4.2D).

To analyze the impact of active MEK isoforms on tumorigenesis in a more pathologically relevant model, IEC-6 transduced cells were orthotopically transplanted into the caecum of athymic mice. This model more closely recapitulates human colorectal cancer progression, in particular the spontaneous metastatic process that is highly dependent on the host environment [499]. Strikingly, 100% of the mice transplanted with 10^5 IEC-6 cells expressing either MEK1DD or MEK2DD developed massive intestinal tumors, while the control group remained tumor-free (Figure 4.2.C and E). The mice were sacrificed when they became moribund or presented symptoms of weight loss, respiratory distress, or a palpable abdominal mass. Microscopic examination of the tumors revealed a poorly differentiated morphology with occasional signet-ring cells (inset) corresponding to a high-grade adenocarcinoma (Figure 4.2E). The tumors are invasive and diffusely infiltrate the lamina propria and the underlying muscular layers (muscularis propria and muscularis mucosae). Together, these data demonstrate that constitutive activation of MEK1 or MEK2 is sufficient to transform intestinal epithelial cells and induce the formation of invasive colon adenocarcinomas.

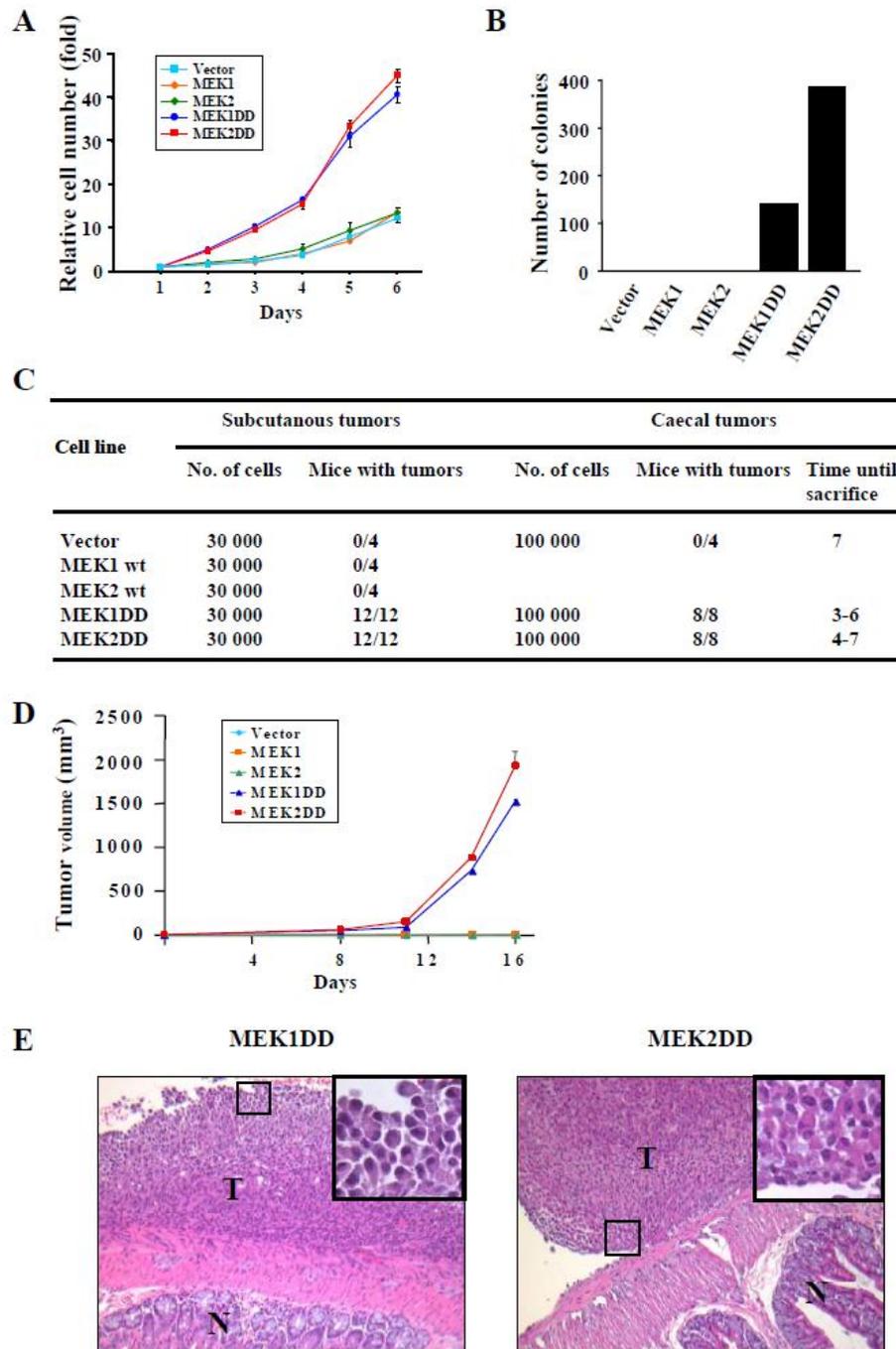


Figure 4.2 Expression of activated MEK1 or MEK2 enhances the proliferation of IEC-6 cells and induces the formation of intestinal tumors. (A) IEC-6 cells infected with the indicated constructs were plated in triplicate wells of 24-well plates in complete

medium containing 10% serum. Cell proliferation was measured each day using the MTT assay. (B) Anchorage-independent proliferation was assayed by measuring the formation of cell colonies in soft agar. Results indicate the number of colonies after 21 days and are representative of 3 independent experiments. (C) IEC-6 cell populations expressing the indicated MEK constructs were either injected subcutaneously (subcutaneous tumors) into the flanks of athymic mice or orthotopically transplanted into the cecal wall (cecal tumors) of the mice as described in Methods. The mice were monitored for tumor development. (D) Growth rate of subcutaneous tumors. Values represent the average volume +/- SEM of 8 tumors (4 mice). Data are representative of 3 independent experiments. (E) Representative pictures of intestinal tumors generated by orthotopic implantation of MEK1DD- or MEK2DD-expressing IEC-6 cells in the ceacum. N, normal mucosa; T, tumor. Note the poorly differentiated morphology of tumor cells typical of high-grade adenocarcinomas. Inset, signet-ring cells

Constitutive activation of MEK1 or MEK2 confers metastatic properties to transformed intestinal epithelial cells

Activation of the ERK1/2 MAP kinase pathway has been implicated in the regulation of cell motility and invasion [318]. Notably, treatment of colon carcinoma cells with the MEK1/2 inhibitor PD184352 was shown to inhibit HGF-induced cell scattering and to reduce their invasive properties [319]. We examined the impact of MEK1 or MEK2 activation on the motility of IEC-6 cells using two different cell migration assays. No difference in the migration rate of the different IEC-6 transduced populations was observed in a standard chemotaxis assay with serum as chemoattractant (Figure 4.3A). Similar results were obtained using a wound-healing assay (data not shown). We next analyzed the ability of the cells to migrate through a Matrigel-coated membrane as a reflection of their invasive properties. Ectopic expression of activated MEK1 or MEK2 significantly enhanced the invasive capacity of IEC-6 cells, while the wild type MEK isoforms had no effect (Figure

4.3B). Interestingly, the MEK2DD-transduced cells appeared more invasive than cells expressing MEK1DD in this assay.

The invasive properties of the cells in vitro and the histology of the intestinal tumors suggest that MEK1DD- and MEK2DD-expressing IEC-6 cells may have metastatic properties in vivo. Detailed histological examination of a subset of mice that develop orthotopic tumors revealed the presence of metastasis in the lymph nodes, the lungs and the liver in both the MEK1DD and MEK2DD groups (Figure 4.3 C and D). These observations indicate that constitutive activation of either MEK1 or MEK2 is sufficient to confer a metastatic phenotype to intestinal tumor cells. The acquisition of invasiveness does not result from changes in cellular motility.

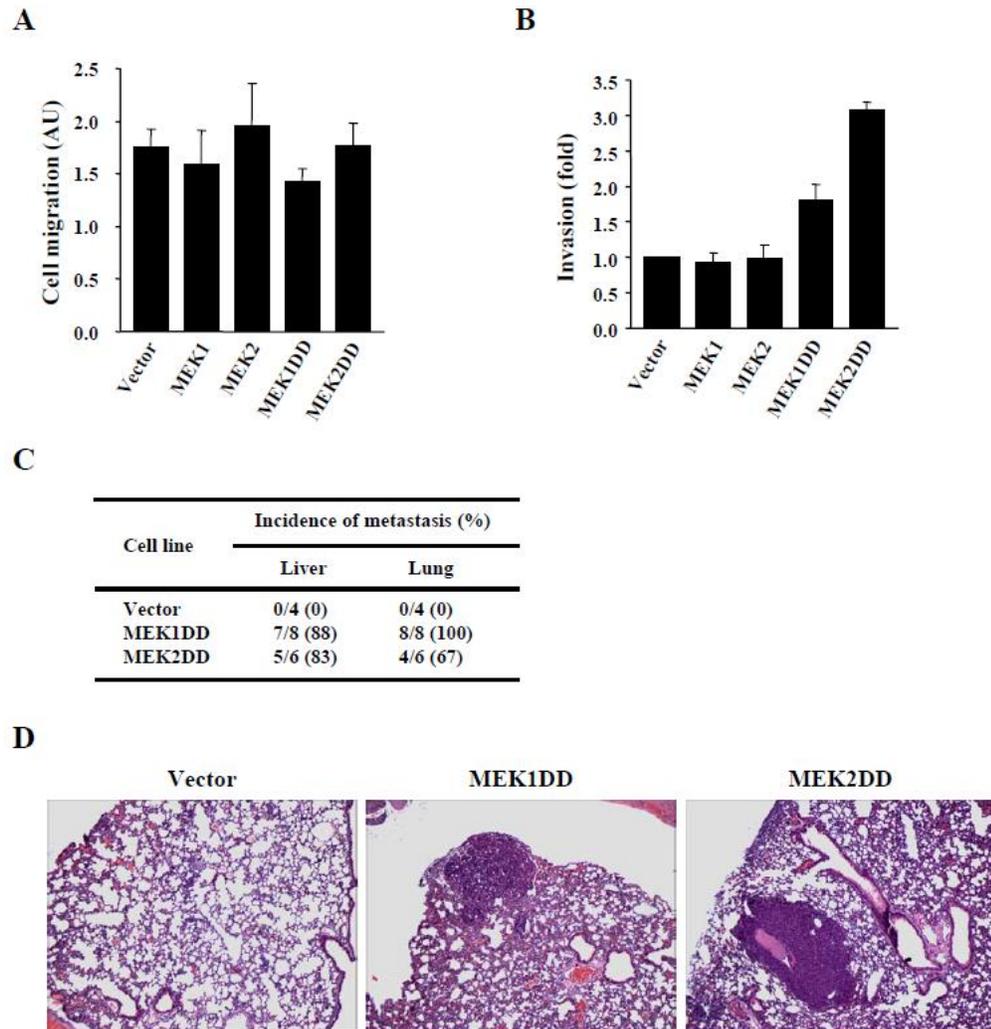


Figure 4.3 Constitutive activation of MEK1 or MEK2 promotes tumor metastasis to the liver and lung. (A) Motility of IEC-6 cell populations was assayed by measuring their migration through porous membranes coated with collagen type I in modified Boyden chambers. Cells on the bottom side of the membrane were fixed and stained. (B) Invasiveness of IEC-6 cell populations was assayed as in A except that membranes were coated with a layer of Matrigel extracellular matrix proteins. Results are expressed as fold-increase relative to vector-infected cells. (C) Incidence of metastasis following orthotopic transplantation of IEC-6 cell populations in the caecum of mice. (D) Representative

pictures of lung metastases derived from intestinal tumors expressing activated MEK1 or MEK2.

To identify downstream targets of MEK1/MEK2 involved in intestinal tumor progression, we analyzed the transcriptional profile of MEK1DD- and MEK2DD-expressing IEC-6 cells using Affymetrix GeneChip arrays. Analysis of the gene expression data identified several genes that were up-regulated or down-regulated in MEK1DD- and MEK2DD-expressing cells as compared to control IEC-6 cells (Table II and III). The list of modulated genes included growth factors, signaling molecules, drug metabolism enzymes and, interestingly, several proteases. The matrix metalloproteinases (MMPs) MMP-3 and MMP-13 were up-regulated in both MEK1DD- and MEK2DD-expressing cells, while up-regulation of MMP-10 reached significance only in MEK2DD cells. Expression of the urokinase receptor was also up-regulated in IEC-6 cells expressing activated MEK2. Because of the importance of MMPs and urokinase receptor in tumor progression [323, 500], we further validated the regulation of these genes by MEK1 and MEK2 signaling to confirm the data from the arrays. No expression or activity of MMPs could be detected in empty vector-infected IEC-6 cells. However, activation of either MEK1 or MEK2 markedly up-regulated the expression of MMP-13 protein (Figure 4.4A). Notably, higher levels of MMP-13 protein were detected in IEC-6 cells expressing the activated MEK2 isoform. The expression of MMP-3/10 was analyzed by measuring their activity by zymography in casein-containing gels. Again, we observed that MEK2DD increased MMP-3/10 enzymatic activity more robustly than MEK1DD (Figure 4.4A). Quantitative PCR analysis confirmed that constitutive activation of MEK1 or MEK2 induces the expression of urokinase receptor mRNA (Figure 4.4B). As observed for the MMPs, the extent of induction of the urokinase receptor gene was higher in MEK2DD-expressing cells.

Table II. List of up-regulated and down-regulated genes in IEC-6 cells expressing MEK1DD

Gene symbol	Gene name	Fold change	P-value	Function
Aldh3a1	aldehyde dehydrogenase family 3, member A1	17,01	<0,001	aldehyde dehydrogenase activity
LOC494499	LOC494499 protein	11,48	<0,001	NA
Cyp3a9	cytochrome P450, family 3, subfamily a, polypeptide 9	10,06	<0,001	monooxygenase activity
Serpine2	serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade E, member 2	9,12	<0,001	serine-type endopeptidase inhibitor activity
Aqp1	aquaporin 1	8,25	<0,001	transporter activity
Spp1	secreted phosphoprotein 1	7,14	<0,001	cytokine activity
Pla2g2a	phospholipase A2, group IIA (platelets, synovial fluid)	6,65	<0,001	phospholipase A2 activity
Mmp13	matrix metalloproteinase 13	5,56	<0,001	metalloendopeptidase activity
P2ry2	purinergic receptor P2Y, G-protein coupled 2	4,75	<0,001	rhodopsin-like receptor activity
LOC290595	hypothetical gene supported by AF152002	4,30	<0,001	NA
Gsta4	glutathione S-transferase, alpha 4	4,21	<0,001	glutathione transferase activity
Cpt1a	camitine palmitoyltransferase 1a, liver	3,78	<0,001	camitine O-palmitoyltransferase activity
Lgals4	lectin, galactose binding, soluble 4	3,78	<0,001	sugar binding
St6gal1	beta galactoside alpha 2,6 sialyltransferase 1	3,61	<0,001	sialyltransferase activity
Mmp3	matrix metalloproteinase 3	3,57	<0,001	metalloendopeptidase activity
Ca2	carbonic anhydrase 2	3,55	<0,001	carbonate dehydratase activity
Cd9	CD9 antigen	3,54	<0,001	protein binding
Agc1	aggrecan 1	3,45	<0,001	extracellular matrix structural constituent
Hmga1	high mobility group AT-hook 1	3,41	<0,001	NA
RGD1311155	similar to RIKEN cDNA 9230117N10	3,37	<0,001	NA
Pthlh	parathyroid hormone-like peptide	3,35	<0,001	hormone activity
Fosl1	fos-like antigen 1	3,30	<0,001	DNA binding
Adh1	alcohol dehydrogenase 1 (class I)	3,27	<0,001	alcohol dehydrogenase activity
Scd1	stearoyl-Coenzyme A desaturase 1	3,14	<0,001	stearoyl-CoA 9-desaturase activity
Gchfr	GTP cyclohydrolase I feedback regulator	3,07	<0,001	enzyme inhibitor activity
LOC682651	similar to Metallothionein-2 (MT-2)	3,06	<0,001	NA
Ctsl	cathepsin L	2,94	<0,001	cysteine-type endopeptidase activity
Foxq1	forkhead box Q1	2,92	<0,001	DNA binding
Pparg	peroxisome proliferator activated receptor gamma	2,83	<0,001	DNA binding
Adfp	Adipose differentiation related protein	2,81	<0,001	long-chain fatty acid transport
Tgfa	transforming growth factor alpha	2,75	<0,001	epidermal growth factor receptor binding
Aplp2	amyloid beta (A4) precursor-like protein 2	2,69	<0,001	DNA binding
Krt2-8	keratin complex 2, basic, gene 8	2,67	<0,001	protein kinase activity
Serpins2	serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade B, member 2	2,65	<0,001	serine-type endopeptidase inhibitor activity
Pfkfb	phosphofructokinase, platelet	2,54	<0,001	6-phosphofructokinase activity
Igfbp2	insulin-like growth factor binding protein 2	-11,20	<0,001	insulin-like growth factor binding
Tagln	transgelin	-9,92	<0,001	protein binding, bridging
Fbin5	fibulin 5	-7,76	<0,001	calcium ion binding
Edn1	endothelin 1	-6,75	<0,001	protein binding
Acta2	smooth muscle alpha-actin	-6,28	<0,001	protein binding
Ankrd1	ankyrin repeat domain 1 (cardiac muscle)	-5,80	<0,001	NA
Dcn	decorin	-5,00	<0,001	collagen binding
Plagl1	pleiomorphic adenoma gene-like 1	-4,43	<0,001	nucleic acid binding
Ddah1	dimethylarginine dimethylaminohydrolase 1	-4,37	<0,001	zinc ion binding
Bmp6	bone morphogenetic protein 6	-3,97	<0,001	cytokine activity
Hapln1	hyaluronan and proteoglycan link protein 1	-3,76	<0,001	hyaluronic acid binding
Col1a2	Procollagen, type I, alpha 2	-3,17	<0,001	structural molecule activity
LOC313672	similar to CG11206-PA	-2,98	<0,001	NA
Dusp1	dual specificity phosphatase 1	-2,94	<0,001	phosphoprotein phosphatase activity
Col12a1	procollagen, type XII, alpha 1	-2,87	<0,001	structural molecule activity
Vsnl1	visinin-like 1	-2,77	<0,001	calcium ion binding
Pak1	p21 (CDKN1A)-activated kinase 1	-2,70	<0,001	protein kinase activity
Cd200	Cd200 antigen	-2,70	<0,001	protein binding
Col3a1	procollagen, type III, alpha 1	-2,64	<0,001	structural molecule activity
Ptgis	prostaglandin I2 (prostacyclin) synthase	-2,62	<0,001	monooxygenase activity
Anxa3	annexin A3	-2,57	<0,001	phospholipase inhibitor activity

Table III. List of up-regulated and down-regulated genes in IEC-6 cells expressing MEK2DD.

Gene symbol	Gene name	Fold change	P-value	Function
Mmp13	matrix metalloproteinase 13	14,33	<0,001	metalloendopeptidase activity
Gchfr	GTP cyclohydrolase I feedback regulator	9,81	<0,001	enzyme inhibitor activity
Serpinh2	serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade B, member 2	9,00	<0,001	serine-type endopeptidase inhibitor activity
Spp1	secreted phosphoprotein 1	8,94	<0,001	cytokine activity
Mmp3	matrix metalloproteinase 3	8,46	<0,001	metalloendopeptidase activity
Serpine2	serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade E, member 2	8,19	<0,001	serine-type endopeptidase inhibitor activity
Aldh3a1	aldehyde dehydrogenase family 3, member A1	7,79	<0,001	aldehyde dehydrogenase activity
Mmp10	matrix metalloproteinase 10	7,76	<0,001	metalloendopeptidase activity
Aqp1	aquaporin 1	7,51	<0,001	transporter activity
RGD1311155	similar to RIKEN cDNA 9230117N10	5,88	<0,001	NA
Tgfa	transforming growth factor alpha	5,76	<0,001	epidermal growth factor receptor binding
Agc1	aggrecan 1	5,33	<0,001	extracellular matrix structural constituent
Prss22_predicted	protease, serine, 22 (predicted)	5,28	<0,001	NA
Fosl1	fos-like antigen 1	5,07	<0,001	DNA binding
Hmga1	high mobility group AT-hook 1	4,83	<0,001	NA
Areg	amphiregulin	4,75	<0,001	cytokine activity
Ca2	carbonic anhydrase 2	4,16	<0,001	carbonate dehydratase activity
Fst	folistatin	4,12	<0,001	activin binding
Cpe	carboxypeptidase E	4,07	<0,001	carboxypeptidase activity
Erc1_predicted	excision repair cross-complementing rodent repair deficiency	4,01	<0,001	NA
Rasa1	RAS p21 protein activator 1	3,95	<0,001	GTPase activator activity
Cyp3a9	cytochrome P450, family 3, subfamily a, polypeptide 9	3,91	<0,001	monooxygenase activity
G8b4	glutathione S-transferase, alpha 4	3,79	<0,001	glutathione transferase activity
Btg1	B-cell translocation gene 1, anti-proliferative	3,73	<0,001	transcription cofactor activity
ST6gal1	beta galactoside alpha 2,6 sialyltransferase 1	3,68	<0,001	sialyltransferase activity
Adfp	Adipose differentiation related protein	3,62	<0,001	NA
Cpt1a	camitine palmitoyltransferase 1a, liver	3,62	<0,001	camitine O-palmitoyltransferase activity
LOC494499	LOC494499 protein	3,56	<0,001	NA
Ptpn	protein tyrosine phosphatase, receptor type, N	3,34	<0,001	phosphoprotein phosphatase activity
Cd24	CD24 antigen	3,31	<0,001	NA
Pi1cd4	phospholipase C, delta 4	3,22	<0,001	phosphoinositide phospholipase C activity
Mgp	matrix Gla protein	3,13	<0,001	calcium ion binding
Nrn1	neurtin	3,07	<0,001	NA
Cd82	CD82 antigen	3,06	<0,001	NA
Cd9	CD9 antigen	3,06	<0,001	protein binding
Lnk	linker of T-cell receptor pathways	2,95	<0,001	protein binding
Ccr1	chemokine (C-C motif) receptor 1	2,94	<0,001	rhodopsin-like receptor activity
RGD1562618_predicted	similar to RIKEN cDNA 6030419C18 gene (predicted)	2,84	<0,001	NA
Fcgr3	Fc receptor, IgG, low affinity III	2,77	<0,001	receptor activity
Sc4mol	sterol-C4-methyl oxidase-like	2,75	<0,001	C-4 methylsterol oxidase activity
Sod3	superoxide dismutase 3, extracellular	2,72	<0,001	superoxide dismutase activity
Sl00a4	Sl00 calcium-binding protein A4	2,69	<0,001	calcium ion binding
Cst1	cathepsin 1	2,65	<0,001	cysteine-type endopeptidase activity
Pter	phosphotriesterase related	2,64	<0,001	aryldialkylphosphatase activity
Sh3kbp1	SH3-domain kinase binding protein 1	2,62	<0,001	protein binding
Scd1	stearoyl-Coenzyme A desaturase 1	2,61	<0,001	stearoyl-CoA 9-desaturase activity
Fkh18	forkhead-like 18 (Drosophila)	2,57	<0,001	transcription factor activity
Plaur	plasminogen activator, urokinase receptor	2,53	<0,001	receptor activity
Tagln	transgelin	-13,40	<0,001	protein binding, bridging
Igf2bp2	insulin-like growth factor binding protein 2	-11,83	<0,001	insulin-like growth factor binding
Fbln5	fibulin 5	-11,71	<0,001	calcium ion binding
Edn1	endothelin 1	-10,70	<0,001	protein binding
Ankrd1	ankyrin repeat domain 1 (cardiac muscle)	-9,01	<0,001	NA
Acta2	smooth muscle alpha-actin	-8,52	<0,001	protein binding
Dcn	decorin	-6,44	<0,001	collagen binding
Cryab	crystallin, alpha B	-5,36	<0,001	structural constituent of eye lens
Metnl	meteorin, glial cell differentiation regulator-like	-5,28	<0,001	NA
Bmp6	bone morphogenetic protein 6	-4,24	<0,001	cytokine activity
Dusp1	dual specificity phosphatase 1	-4,18	<0,001	phosphoprotein phosphatase activity
Hapln1	hyaluronan and proteoglycan link protein 1	-4,06	<0,001	hyaluronic acid binding
Ddah1	dimethylarginine dimethylaminohydrolase 1	-4,02	<0,001	zinc ion binding
C1u	clusterin	-4,02	<0,001	NA
Col12a1	procollagen, type XII, alpha 1	-4,00	<0,001	structural molecule activity
Pmp	prion protein	-3,99	<0,001	copper ion binding
Bmp4	bone morphogenetic protein 4	-3,94	<0,001	cytokine activity
LOC13672	similar to CG1206-PA	-3,91	<0,001	NA
Man1a_predicted	mannosidase 1, alpha (predicted)	-3,84	<0,001	calcium ion binding
Rhob	ras homolog gene family, member B	-3,43	<0,001	GTP binding
Vsnl1	visinin-like 1	-3,22	<0,001	calcium ion binding
Cald1	caldesmon 1	-3,21	<0,001	actin binding
Cmkor1	chemokine orphan receptor 1	-3,19	<0,001	rhodopsin-like receptor activity
Pawr	PRKC, apoptosis, WT1, regulator	-3,16	<0,001	protein binding
Vldlr	very low density lipoprotein receptor	-3,13	<0,001	receptor activity
Grib14	growth factor receptor bound protein 14	-3,10	<0,001	SH3/SH2 adaptor activity
My19_predicted	myosin, light polypeptide 9, regulatory (predicted)	-3,05	<0,001	calcium ion binding
Pak1	p21 (CDKN1A)-activated kinase 1	-2,99	<0,001	protein kinase activity
Lox1	lysyl oxidase-like 1	-2,98	<0,001	protein-lysine 6-oxidase activity
Anxa3	annexin A3	-2,95	<0,001	phospholipase inhibitor activity
App	amyloid beta (A4) precursor protein	-2,91	<0,001	serine-type endopeptidase inhibitor activity
Rgc32	response gene to complement 32	-2,81	<0,001	protein binding
Sparc	secreted acidic cysteine rich glycoprotein	-2,80	<0,001	calcium ion binding
Plagl1	pleiomorphic adenoma gene-like 1	-2,77	<0,001	nucleic acid binding
Lox	lysyl oxidase	-2,73	<0,001	protein-lysine 6-oxidase activity
Tmeff1	transmembrane protein with EGF-like and two follistatin-like domains 1	-2,73	<0,001	serine-type endopeptidase inhibitor activity
Fah	fumarylacetoacetate hydrolase	-2,70	<0,001	DNA binding
Rnd3	Rho family GTPase 3	-2,70	<0,001	GTP binding
Cd200	CD200 antigen	-2,60	<0,001	protein binding
Ptgis	prostaglandin I2 (prostacyclin) synthase	-2,57	<0,001	monooxygenase activity
Cdc42ep3_predicted	CD42 effector protein (Rho GTPase binding) 3 (predicted)	-2,53	<0,001	NA
Fyn	fyn proto-oncogene	-2,53	<0,001	protein kinase activity
Pdpn	podoplanin	-2,51	<0,001	water transporter activity

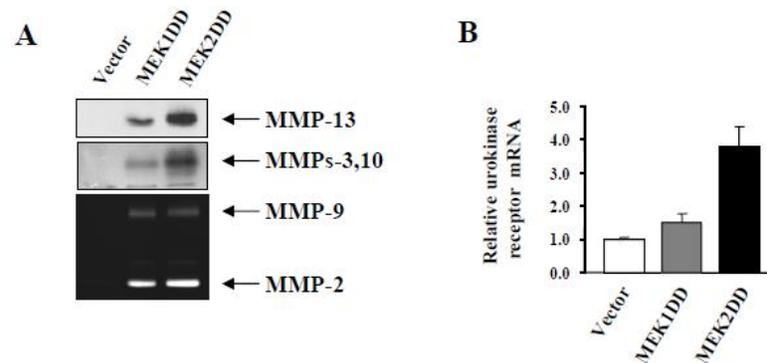


Figure 4.4 Expression of proteases in IEC-6 cell populations transduced with activated MEK isoforms. (A) Expression of MMP-13 was analyzed by immunoblotting. Induction of MMP activity was analyzed by zymography on acrylamide gels copolymerized with casein (MMP-3/10) or gelatin (MMP-2 and MMP-9) substrates. Photographs of the gels are shown. (B) Quantitative PCR analysis of urokinase receptor mRNA levels. Expression levels are expressed as fold-increase relative to vector-infected cells.

In a previous study, Komatsu *et al.* [321] have used oligonucleotide microarrays to analyze the gene expression profile of intestinal epithelial cells expressing a conditional allele of activated MEK1. We have compared the results of our transcriptional profiling analysis with this study. Of the 69 gene transcripts that showed altered expression in the study of Komatsu, 18 (26%) were found to be modulated in IEC-6 cells expressing constitutively active MEK1 or MEK2. Importantly, the two studies converge on a series of genes involved in cell proliferation, cell invasion, tumor suppression and drug metabolism.

Constitutive activation of MEK1 or MEK2 protects intestinal epithelial cells against anoikis

Epithelial cancer progression and metastasis is associated with the acquisition of resistance to anoikis [501]. To further explore the mechanism by which MEK1 and MEK2

promote tumor metastasis, we asked whether activated MEK isoforms protect intestinal epithelial cells from cell death induced by loss of adhesion. IEC-6-transduced populations were placed on poly-HEMA-coated plates in normal growth medium and the extent of apoptosis was measured at different times by TUNEL. Detachment from matrix induced high levels of apoptosis of control IEC-6 cells, which was already detectable at 6 h and increased up to 24 h (Figure 4.5A). Strikingly, expression of either MEK1DD or MEK2DD almost completely protected IEC-6 cells from undergoing anoikis.

As a step to understand the molecular mechanism by which activated MEK isoforms suppress anoikis, we monitored the expression of Bcl-2 anti-apoptotic and pro-apoptotic family proteins. Constitutive activation of MEK1 or MEK2 resulted in the up-regulation of the pro-survival proteins Mcl-1, Bcl-2 and, to a lesser extent, Bcl-xL in IEC-6 cells (Figure 4.5B). Our results confirm and extend previous observations [502, 503] by demonstrating that both MEK1 and MEK2 isoforms share the property to induce the accumulation of Bcl-2 family pro-survival members. Reciprocally, induction of the BH3-only pro-apoptotic protein Bim was completely suppressed in cells expressing MEK1DD or MEK2DD (Figure 4.5C). This finding is consistent with previous reports documenting the role of the ERK1/2 MAP kinase pathway in promoting the degradation of Bim [352, 504]. MEK1 or MEK2 activation had no significant effect on the expression of the pro-apoptotic proteins Bax and Bak in these cells (data not shown).

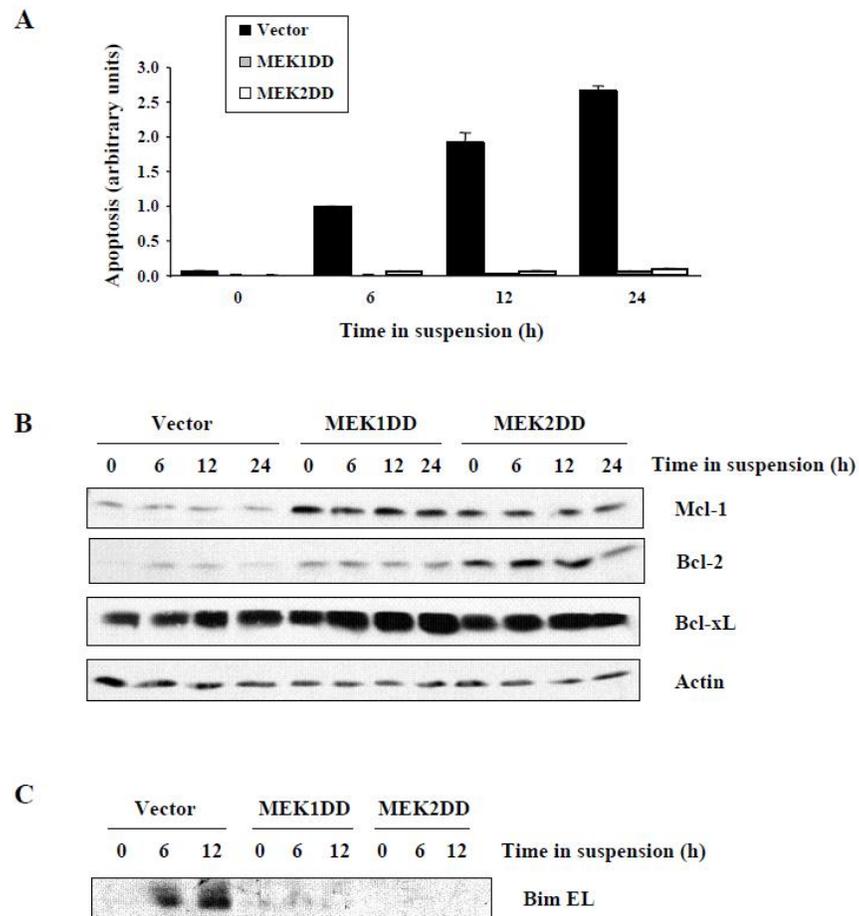


Figure 4.5 Constitutive activation of MEK1 or MEK2 confers intestinal epithelial cells resistance to anoikis. (A) IEC-6 cell populations infected with vector alone or activated MEK1 or MEK2 were cultured in suspension on poly-HEMA-coated plates for the indicated times. Apoptosis was evaluated by TUNEL assay. (B and C) Expression of Bcl-2 anti-apoptotic (B) and pro-apoptotic (C) family proteins was analyzed by immunoblotting in cell extracts from IEC-6 cell populations described in A. Total actin was used as loading control.

Silencing of MEK2 expression markedly inhibits the proliferation of human colon cancer cells

The results presented above clearly demonstrate that constitutive activation of either MEK isoform, MEK1 or MEK2, is sufficient to fully transform intestinal epithelial cells to the metastatic stage. We next wanted to determine if human colon cancer cells depend on the activity of MEK isoforms for cell proliferation. Several human colon carcinoma cell lines display constitutive phosphorylation of ERK1/ERK2 MAP kinases [20], likely resulting from activation of MEK1/MEK2. The HCT116 cell line, which represents one of the best studied model of colorectal cancer cells, display constitutive activation of the two MEK isoforms (Figure 4.6A). To assess the individual roles of MEK1 and MEK2, we expressed short-hairpin (sh) RNAs specifically targeting MEK1 or MEK2 gene in HCT116 cells using VSV-pseudotyped lentiviral vectors. We tested the effect of 5 distinct shRNAs for MEK1 and 3 shRNAs for MEK2, using as control a GFP-encoding vector. We selected the two most efficient shRNAs to MEK1 and MEK2 genes (Figure S4.3). A non-silencing inactive MEK1 shRNA was used as additional negative control in these experiments. The efficiency of transduction estimated by GFP immunofluorescence was over 90%, and therefore the experiments were performed without cellular selection. As shown by immunoblot analysis, lentivirus-mediated delivery of MEK1 shRNAs resulted in complete silencing of MEK1 expression with no effect on MEK2, whereas the two MEK2 shRNAs markedly knocked-down MEK2 expression without affecting MEK1 isoform (Figure 4.6B). We then analyzed the functional consequence of MEK1 or MEK2 silencing on the proliferation rate of the cells. Strikingly, lowering of MEK2 expression with the two shRNAs completely suppressed the proliferation of HCT116 cells, whereas MEK1 shRNAs exerted a significant but much weaker effect (Figure 4.6B). The extent of inhibition observed with MEK2 shRNAs was similar to that obtained by treating cells with the non-selective MEK1/2 inhibitor U0126. We also showed that silencing of MEK1 or MEK2

expression significantly reduces the extent of ERK1 and ERK2 activating phosphorylation (Figure 4.7).

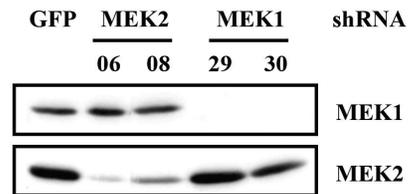


Figure S4.3. HCT116 cells were infected with lentiviruses encoding shRNAs to MEK1 or MEK2 gene. Expression of MEK isoforms was analyzed by immunoblotting 5 days after infection

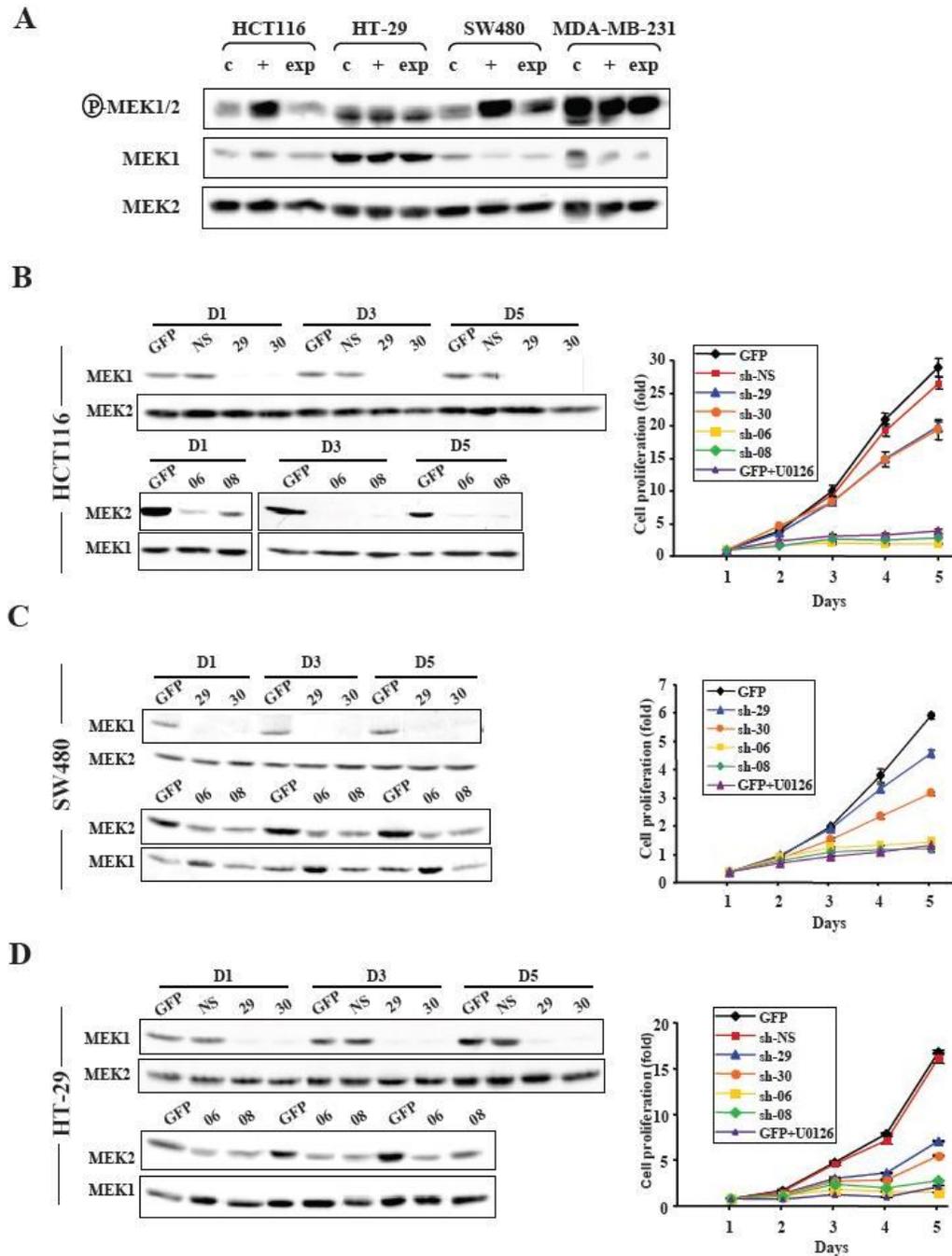


Figure 4.6 Impact of MEK1 or MEK2 silencing on the proliferation of human colon carcinoma cell lines. (A) Immunoblot analysis of MEK1, MEK2 and phospho-MEK1/2 expression in the human colon carcinoma cell lines HCT116, HT-29 and SW480, and in the

breast adenocarcinoma line MDA-MB-231. Lysates were prepared from cells deprived of serum for 24 h (c), restimulated with serum for 5 min (+), or proliferating exponentially (exp). (B to D) HCT116 (B), SW480 (C) and HT-29 (D) cells were infected with MEK1 or MEK2 shRNA-encoding lentiviruses. A non-silencing inactive MEK1 shRNA (NS) was used as negative control. The cells were replated 72 h (day 0) after infection to monitor the expression of MEK1 and MEK2 and to measure the rate of cell proliferation. Expression of MEK isoforms was analyzed by immunoblotting at day (D) 1, 3 and 5 (left). Cell proliferation was measured each day using the MTT assay (right). For experiments with small-molecule MEK1/2 inhibitor, the cells were treated with 10 μ M U0126 added at 48 h intervals.

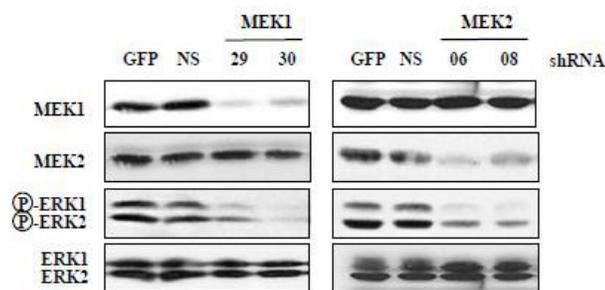


Figure 4.7 Silencing of MEK1 or MEK2 expression restrains activating phosphorylation of the MAP kinases ERK1/ERK2. HCT116 cells were infected with lentiviruses encoding shRNAs to MEK1 or MEK2 gene. The expression of MEK1/MEK2, ERK1/ERK2 and phospho-ERK1/2 was measured by immunoblotting at day 1 as described in the legend of Figure 6. NS, non-silencing inactive MEK1 shRNA.

To verify whether this differential contribution of MEK isoforms could be generalized to other colorectal cancer cells, we examined the impact of MEK1 or MEK2 silencing on the proliferation of two other human colon cancer cell lines. We specifically chose the human colon carcinoma cell lines SW480 (which harbors a KRAS mutation like HCT116) and HT-29 (harboring a BRAF mutation). SW480 cells display a comparable

expression pattern of MEK1 and MEK2 proteins as HCT116 cells (Figure 4.6A). Similar to HCT116 cells, knock-down of MEK2 expression dramatically suppressed the proliferation of SW480 cells, whereas MEK1 silencing induced a significant but much lower decrease of cell proliferation (Figure 4.6C). Similar results were obtained in HT-29 cells, except that the inhibitory effect of MEK1 shRNAs on proliferation was quantitatively more important than on HCT116 and SW480 cells (Figure 4.6D). This observation could be explained by the much higher expression of MEK1 in the HT-29 cell line as compared to HCT116 or SW480 cells (Figure 4.6A), which may have a more important contribution to total MEK1/2 signaling. However, the single inactivation of MEK2 was still capable of abolishing the proliferation of HT-29 cells even in the presence of high MEK1 levels. For all colorectal cancer cell lines tested, the inhibition of proliferation seen with MEK2 shRNAs was comparable to that achieved with the MEK1/2 inhibitor U0126.

To further extend our investigation to non-colorectal carcinomas, we tested the effect of MEK1 and MEK2 shRNAs on the human breast adenocarcinoma cell line MDA-MB-231, which exhibit strong constitutive activation of MEK1/MEK2 signaling (Figure 4.6A). Interestingly, the MEK2 shRNA-06 completely inhibited the proliferation of MDA-MB-231 cells to the same extent as the drug inhibitor U0126 (Figure 4.S4). The other MEK2 shRNA-08 also markedly but not completely inhibited cell proliferation, consistent with its lower silencing activity in these cells. Expression of MEK1 shRNAs suppressed cell proliferation by approximately 50%.

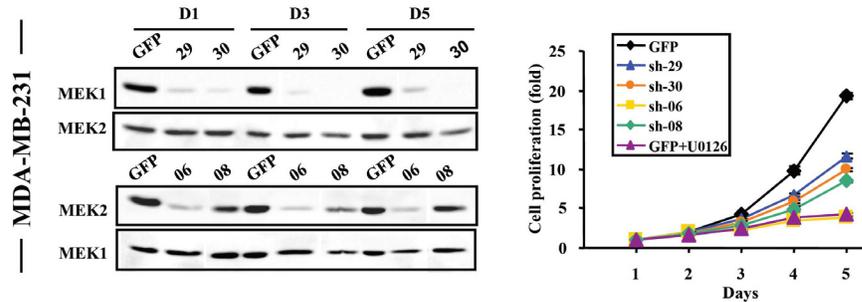


Figure 4.S4. Impact of MEK1 or MEK2 silencing on the proliferation of a breast carcinoma cell line. MDA-MB-231 cells were infected with MEK1 or MEK2 shRNA-encoding lentiviruses or treated with the MEK1/2 inhibitor U0126. Expression of MEK isoforms and cell proliferation were measured as described in the legend of Figure 6.

DISCUSSION

The ERK1/2 MAP kinase signaling pathway plays a central role in cell proliferation control. Activation of ERK1/ERK2 is essential for G1 to S phase progression and is associated with induction of cyclin Ds and inhibition of anti-proliferative genes [230]. Studies in various experimental models have also implicated the Raf-MEK1/2-ERK1/2 pathway in the control of cell survival [505]. Consistent with a role in cell cycle and survival signaling, there is growing evidence that activation of the ERK1/2 pathway is involved in the pathogenesis of human cancer (see Introduction). Specifically, several observations point towards a role of this pathway in colorectal cancer [475]. First, the EGF receptor, a known activator of the ERK1/2 pathway, is expressed in more than 70% of colorectal cancers [469]; treatment with the EGF receptor monoclonal antibody cetuximab improves overall survival in patients with colorectal cancer [506]. Second, KRAS and BRAF genes are mutated in approximately 50% of colorectal cancers [1]. Third, activating phosphorylation of ERK1/ERK2 MAP kinases is frequently observed in human colorectal cancer cell lines and tumor specimens. Finally, treatment with synthetic MEK1/2 inhibitors markedly attenuates the proliferation of colon carcinoma cells in vitro and in mouse

xenografts [319]. Despite such evidence, several important questions about the contribution of the ERK1/2 MAP kinase pathway to the initiation and progression of colorectal cancer remain unanswered.

In this study, we show that constitutive activation of MEK1 or MEK2 isoform, as observed in 44% of colorectal cancers, is sufficient to fully transform normal intestinal epithelial cells and that maintenance of MEK1/MEK2 activity is necessary to sustain the proliferation of human colon carcinoma cells. This is the first report to compare the ability of the two MEK isoforms to transform epithelial cells. Previous studies have shown that activated MEK1 can transform immortalized fibroblasts [165, 275] as well as epithelial cells [277, 507, 508]. Intriguingly, it was also reported that activated Ras, but not Raf-1, causes transformation of mammary and intestinal epithelial cells, suggesting that signaling events other than activation of MEK1/2 are essential for oncogenic Ras transformation [509]. Here, we clearly establish that expression of activated MEK1 is sufficient to morphologically transform intestinal epithelial cells, accelerate cell proliferation, and induce the rapid formation of aggressive tumors after orthotopic transplantation. Moreover, we reveal for the first time that the MEK2 isoform has similar transforming properties and is able to induce the formation of tumors in mice. This knowledge is important since both MEK1 and MEK2 are expressed in intestinal epithelial cells and immunohistochemistry analysis with phospho-specific MEK1/2 antibodies does not allow to discriminate between the two isoforms. Immunoblot analysis under electrophoresis conditions that partially resolve the two isoforms indicates that both MEK1 and MEK2 are phosphorylated in human colon carcinoma cell lines (Figure 4.6A).

The signaling pathways underlying the progression of colorectal cancer to advanced metastatic disease are poorly understood. The development of metastatic tumors is a complex process that consists of a series of cellular events that move neoplastic cells from the primary tumor to a distant location [297]. Cancer cells must detach from the tumor and

invade the surrounding tissue, degrade the basement membrane, disseminate and survive into the circulation systems, extravasate into a new tissue, and colonize their new microenvironment. During this process, tumor cells have to face different kinds of stress. Recent studies have suggested that Ras signaling may contribute to metastasis formation in colorectal cancer [510], although the downstream effector pathways involved remain unclear. Here, we show that expression of activated MEK1 or MEK2 not only induces the formation of intestinal tumors but also promotes later stages of tumor progression and metastasis to distant organs. To address the impact of MEK1/MEK2 signaling on tumor progression, we have used an orthotopic implantation model that provides a more accurate picture of the metastatic process [511]. A large proportion of the tumors expressing activated MEK1 or MEK2 metastasized to the liver and lung, the two most common sites of human colorectal cancer metastasis, thereby validating the pathological relevance of our model. The ability of activated MEK1- or MEK2-expressing tumor cells to colonize distant organs was associated with increased invasiveness, secretion of matrix proteases and resistance to anoikis. Interestingly, an early study reported that the enzymatic activity of ERK1/ERK2 is markedly up-regulated during late progression of carcinogen-induced colon carcinomas [512]. Together, these observations strengthen the idea that ERK1/2 MAP kinase signaling plays a critical role in colorectal cancer progression [475].

An important finding of this study is the observation that MEK1 and MEK2 may contribute differentially to the pathogenesis of colorectal cancer. While activation of a single MEK isoform was shown to be sufficient for full neoplastic transformation of intestinal epithelial cells, we observed that MEK2DD-expressing cells display a slightly more transformed morphology and are more invasive than cells expressing MEK1DD *in vitro*. This was associated with a more prominent down-regulation of E-cadherin and a stronger up-regulation of MMPs and urokinase receptor. The physiopathological relevance of these *in vitro* properties is unclear, however, since no difference in the metastatic behavior of the cells was observed upon orthotopic transplantation in mice. The simplest

explanation for this apparent discrepancy is that *in vitro* invasiveness assays do not replicate the complex and multistage process of tumor metastasis *in vivo*. Most importantly, we found that silencing of MEK2 expression (even if not total) completely suppressed the proliferation of human colon carcinoma cell lines, whereas complete knock-down of MEK1 had a much weaker effect. The extent of inhibition observed with MEK2 shRNAs was comparable to that obtained with the non-selective MEK1/2 inhibitor U0126. This differential impact of MEK1 and MEK2 on cell proliferation was observed in three different colon carcinoma cell lines (bearing activating mutations in either KRAS or BRAF), as well as in the breast adenocarcinoma cell line MDA-MB-231. The molecular basis for these differences remains to be established. One possibility is that MEK2 is expressed at higher levels than MEK1 in colon cancer cells. However, immunoblot analysis clearly indicates that HT-29 cells express more phosphorylated MEK1 (lower band in upper panel of Figure 4.6A) than MEK2, arguing that quantitative difference in expression levels does not explain everything. Our results rather suggest that the two MEK isoforms may be differentially regulated or may target distinct effector pathways in certain cellular and/or genetic contexts.

Conclusion

In conclusion, we demonstrate that the two MAP kinase kinase isoforms MEK1 and MEK2 have similar transforming properties and that activation of either isoform is sufficient for full transformation of intestinal epithelial cells up to the metastatic stage. Interestingly, our results indicate that MEK2 plays a more important role than MEK1 in sustaining the proliferation of human colorectal cancer cells, suggesting that the two MEK isoforms may contribute differentially to tumor pathogenesis in certain contexts.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grants from the Cancer Research Society and the National Cancer Institute of Canada to SM. S. Duhamel is recipient of a studentship from the Canadian Institutes for Health Research. S. Meloche holds the Canada Research Chair in Cellular Signaling. We thank Kim Lévesque for expert animal care and experimentation, Pierre Chagnon and Raphaële Lambert for qPCR analysis, and Patrick Gendron for help with microarray analysis.

Chapitre 5:

Implication de la localisation nucléaire de MEK1/2 activées dans la tumorigénèse colorectale

5.1 Mise en situation et objectif

Les analyses par TMA des tumeurs colorectales humaines avaient démontré que MEK1/2 phosphorylés étaient anormalement localisés dans le noyau dans 79% des tumeurs colorectales, par rapport à 4% pour les tissus normaux. L'objectif de l'étude était donc d'évaluer l'impact de cette localisation aberrante de MEK1/2 activés dans l'initiation et la progression du cancer colorectal, ainsi que de déterminer les mécanismes associés à cette localisation erronée de MEK1/2.

5.2 Contribution des auteurs

J'ai effectué plus de 95% des expériences et analyses présentées dans cet article. J'ai écrit entièrement le texte et conçu toutes les figures. Seul les marquages immunohistochimiques, les analyses des TMAs de tumeurs humaines ainsi que les karyotypages ont été effectués par les co-auteurs.

5.3 Résumé

La voie de Ras/Raf/MEK/ERK1/2 est fréquemment hyperactivée dans les cancers et des mutations activatrices de *KRAS* et *BRAF* sont observées dans 30% à 50% des adénomes colorectaux. Bien que la voie de MEK/ERK1/2 soit souvent dérégulée dans les tumeurs solides et les leucémies, des mutations activatrices de ces gènes sont rares. À la suite d'une analyse extensive de tumeurs colorectales humaines, nous avons observé que 79% de celles-ci arboraient un marquage nucléaire de MEK1/2 phosphorylés, contre 4 % pour les tissus normaux. L'impact de cette localisation aberrante est inconnu.

L'expression ectopique d'un mutant nucléaire de MEK1 transforme drastiquement les cellules. Une augmentation de la prolifération, un dérèglement du cycle cellulaire, de l'instabilité chromosomique et de la tétraploïdie sont observés. Il est intéressant de noter que l'augmentation de la localisation nucléaire de phospho-MEK1/2 est significativement corrélée avec le grade des tumeurs colorectales humaines. Nous avons également observé que l'expression d'une forme oncogénique de Ras (H-Ras^{V12}) inhibe l'expression de Sef, un régulateur spatial de MEK/ERK1/2, qui permet leur ancrage dans le cytoplasme. De même, l'accumulation de MEK1/2 phosphorylés dans le noyau est inversement corrélée avec le niveau d'expression de Sef. Plus encore, la réexpression de Sef dans les cellules exprimant Ras oncogénique est suffisante pour restaurer la localisation cytoplasmique de MEK1/2 activées et de renverser l'instabilité chromosomiques et la tumorigénèses induites par Ras actif.

En conclusion, nos résultats suggèrent que la perte de Sef est un événement oncogénique précoce qui contribue à la localisation nucléaire aberrante de MEK1/2 activées, permettant ainsi l'émergence de la transformation oncogénique, l'instabilité génétique et la progression tumorale, via une signalisation soutenue de ERK1/2.

5.4 Article 3

Sef downregulation by Ras causes MEK1/2 to become aberrantly nuclear localized leading to polyploidy and neoplastic transformation

Stéphanie Duhamel^{1,2}, Josée Hébert^{1,3,6}, Louis Gaboury^{1,4}, Amélie Bouchard⁷, Ronald Simon⁸, Guido Sauter⁸, Mark Basik⁷, Sylvain Meloche^{1,2,5*}

¹Institut de Recherche en Immunologie et Cancérologie, ²Program of Molecular Biology, ³Department of Medicine, ⁴Department of Pathology and Cell Biology, ⁵Department of Pharmacology, Université de Montréal, Montreal, Quebec H3C 3J7, Canada ; ⁶Division of Hematology and Leukemia Cell Bank of Quebec, Maisonneuve-Rosemont Hospital, Montreal, Quebec H1T 2M4, Canada; ⁷Department of Oncology, Lady Davis Institute, Sir Mortimer B. Davis Jewish General Hospital, McGill University, Montreal, Quebec H3T 1E2, Canada ⁸Department of Pathology, Eppendorf University, Hamburg, Germany.

*Corresponding author: Dr Sylvain Meloche
Institut de Recherche en Immunologie et Cancérologie
Université de Montréal
2950, chemin de Polytechnique
Montreal (Quebec) Canada H3C 3J7
Tel.: (514) 343-6966

ABSTRACT

The Ras-dependent Raf/MEK/ERK1/2 signaling pathway is frequently hyperactivated in human cancer as a result of receptor tyrosine kinase overexpression or gain-of-function mutations in *RAS* or *RAF* genes. How dysregulation of this pathway contributes to tumor progression is not well understood. We report here that phosphorylated MEK1/2 are aberrantly localized to the nucleus in primary colorectal tumors and in human colon cancer cell lines. We further show that oncogenic activation of Ras is sufficient to induce the nuclear accumulation of phosphorylated MEK1/2 and ERK1/2 in intestinal epithelial cells. To evaluate the biological impact of the mislocalization of MEK1/2, we have forced the localization of MEK1 in the nucleus of epithelial and fibroblast cells. Consistent with the importance of spatial control, we found that sustained nuclear MEK1 signaling leads to hyperactivation of ERK1/2 and to enhanced cell proliferation, polyploidization and tumorigenesis. Importantly, we show that oncogenic Ras downregulates the spatial regulator Sef, concomitant to nuclear accumulation of activated MEK1/2. Reexpression of Sef is sufficient to restore the normal localization of MEK1/2 and to revert the cell cycle defects and tumorigenesis induced by oncogenic Ras. Our results suggest that loss of Sef is an early oncogenic event that contributes to genetic instability and tumor progression by sustaining nuclear ERK1/2 signaling.

INTRODUCTION

The Ras-dependent Raf/MEK/ERK1/2 mitogen-activated protein (MAP) kinase signaling pathway is a key regulator of mammalian cell proliferation. Studies by various groups have demonstrated the absolute requirement for ERK1/2 signaling in promoting the progression of cells from G0/G1 to S phase [230, 513]. Activation of ERK1/2 MAP kinases is associated with the stabilization of c-Myc, the induction of cyclin Ds and the down-regulation of anti-proliferative genes throughout G1 phase [102, 213, 219, 514]. ERK1/2 signaling also promotes cell survival in certain cellular contexts [351].

The ERK1/2 pathway is activated in response to a wide array of mitogenic factors and cytokines. Typically, ligand binding to growth factor receptors leads to the activation of the small GTPase Ras, which allows the recruitment of Raf to the membrane and mediates the sequential phosphorylation and activation of Raf, MEK1/MEK2 and ERK1/ERK2 protein kinases [271]. Importantly, the activity of the pathway is modulated by a complex network of regulatory binding proteins and scaffolds, which control the magnitude, duration and compartmentalization of the signal [164, 168, 271, 515]. The nature of the signaling output, in turn, dictates the outcome of the cellular response. Thus, early studies have revealed that sustained activation of ERK1/2 in G1 phase is required for successful S phase entry [516]. Later work indicated that continuous ERK1/2 signaling is associated with the induction of cyclin D1 mRNA and the downregulation of antiproliferative genes such as Tob1 [219, 517]. The spatial distribution of ERK1/2 also impacts cell proliferation control. In quiescent cells, ERK1/2 are maintained in the cytoplasm through their interaction with MEK1/2, which contain an active nuclear export signal (NES) [28]. Upon mitogenic stimulation, ERK1/2 dissociate from MEK1/2 and translocate into the nucleus where they phosphorylate nuclear substrates. ERK1/2 also associate to other compartment-specific proteins that regulate their subcellular distribution. Among the best-characterized is the death effector domain-containing protein PEA-15 [173], which promotes the cytoplasmic localization of ERK1/2. Sequestration of ERK1/2 in

the cytoplasm by overexpression of PEA-15 or a catalytically inactive form of MAP kinase phosphatase 3 impairs nuclear Elk1-dependent transcription and inhibits mitogen-stimulated DNA synthesis [173, 518]. Reciprocally, genetic depletion of PEA-15 results in increased ERK1/2 nuclear localization and S phase entry in astrocytes [173].

Dysregulation of the Ras/Raf/MEK/ERK1/2 pathway is a common event in human cancer. Activating mutations in *RAS* and *RAF* genes are found in ~ 30% and 20% of tumors, respectively [273]. Although mutations in *MEK1/MEK2* genes are infrequent [32], numerous studies have documented the hyperactivation of MEK1/2 and ERK1/2 in tumors [31]. Carcinogenesis and mouse genetic studies support the view that oncogenic Ras or Raf expression is sufficient to initiate tumor formation in certain tissues, but that additional loss of tumor suppressor genes is required for progression of the tumor to advanced stages [1, 481, 519, 520]. In the multistep process of colorectal carcinogenesis, activating mutations of *KRAS* are acquired at the very early pre-malignant stage, consistent with a role in tumour initiation and/or progression [474]. There is also evidence that activated Ras contributes directly to cancer progression by promoting genomic instability [521, 522]. How the ERK1/2 MAP kinase pathway contributes to tumor initiation and progression remains unclear.

In this study, we found that activated MEK1/2 aberrantly localize to the nucleus in a high percentage of primary colorectal tumors and in colon cancer cell lines. The nuclear accumulation of MEK1/2 is associated with the oncogene-dependent downregulation of the spatial regulator Sef (similar expression to *fgf* genes). To evaluate the biological impact of this mislocalization, we have forced the localization of MEK1 in the nucleus of untransformed epithelial and fibroblast cells. We show that sustained nuclear localization of MEK1 is sufficient to induce polyploidization and full neoplastic transformation of cells. Our results suggest a potential mechanism by which early oncogenic activation of Ras may contribute to the acquisition of chromosomal instability (CIN) and tumor progression.

RESULTS

Aberrant Nuclear Localization of Phosphorylated MEK1/2 and ERK1/2 in Colorectal Cancer

To assess the clinical significance of the ERK1/2 MAP kinase pathway in colorectal cancer, we analyzed the activation status of MEK1/2 (as monitored by activating loop phosphorylation) by immunohistochemistry in a large colorectal cancer tissue microarray (TMA). We found that 44% of primary colorectal tumors display high levels of cytoplasmic phospho-MEK1/2 staining as compared to 10% of normal tissues (Figure 5.1A). Surprisingly, detailed analysis also revealed that 79% of colorectal cancers exhibit aberrant phospho-MEK1/2 staining in the nucleus, compared to only 4% of normal colon tissue (Figure 5.1B). MEK1/2 are known to shuttle into the nucleus, but are rapidly exported to the cytoplasm by their strong NES, resulting in their nearly exclusive cytoplasmic localization [30, 127, 523]. The role of MEK1/2 nuclear translocation has remained elusive.

To further document this observation, we examined the subcellular localization of phosphorylated MEK1/2 in a series of human colon carcinoma cell lines and in normal human intestinal epithelial cells (HIEC). As previously reported [278, 524], the three colon cancer lines display constitutive activation of MEK1/2 and ERK1/2 as a result of activating mutations in *KRAS* (HCT116 and SW480) or *BRAF* (COLO 205) genes (Figure 5.1C). Phospho-MEK1/2 staining was detected almost exclusively in the cytoplasm of HIEC. In sharp contrast, nuclear localization of activated MEK1/2 was observed in 65 to 90% of the cells in tumor cell cultures (Figure 5.1D). Analysis of total MEK1 localization also revealed that the protein is excluded from the nuclear compartment of HIEC, but readily accumulates in the nucleus of a significant fraction (16 to 18%) of colon cancer cells (Figure 5.1D). Importantly, the subcellular localization of ERK1/2 essentially mirrored that of MEK1/2. Thus, activation loop phosphorylated ERK1/2 were confined to the cytoplasm

of HIEC, but accumulated in the nucleus of a majority of cells (76-83%) in the tested colon carcinoma cell lines (Figure 5.1E).

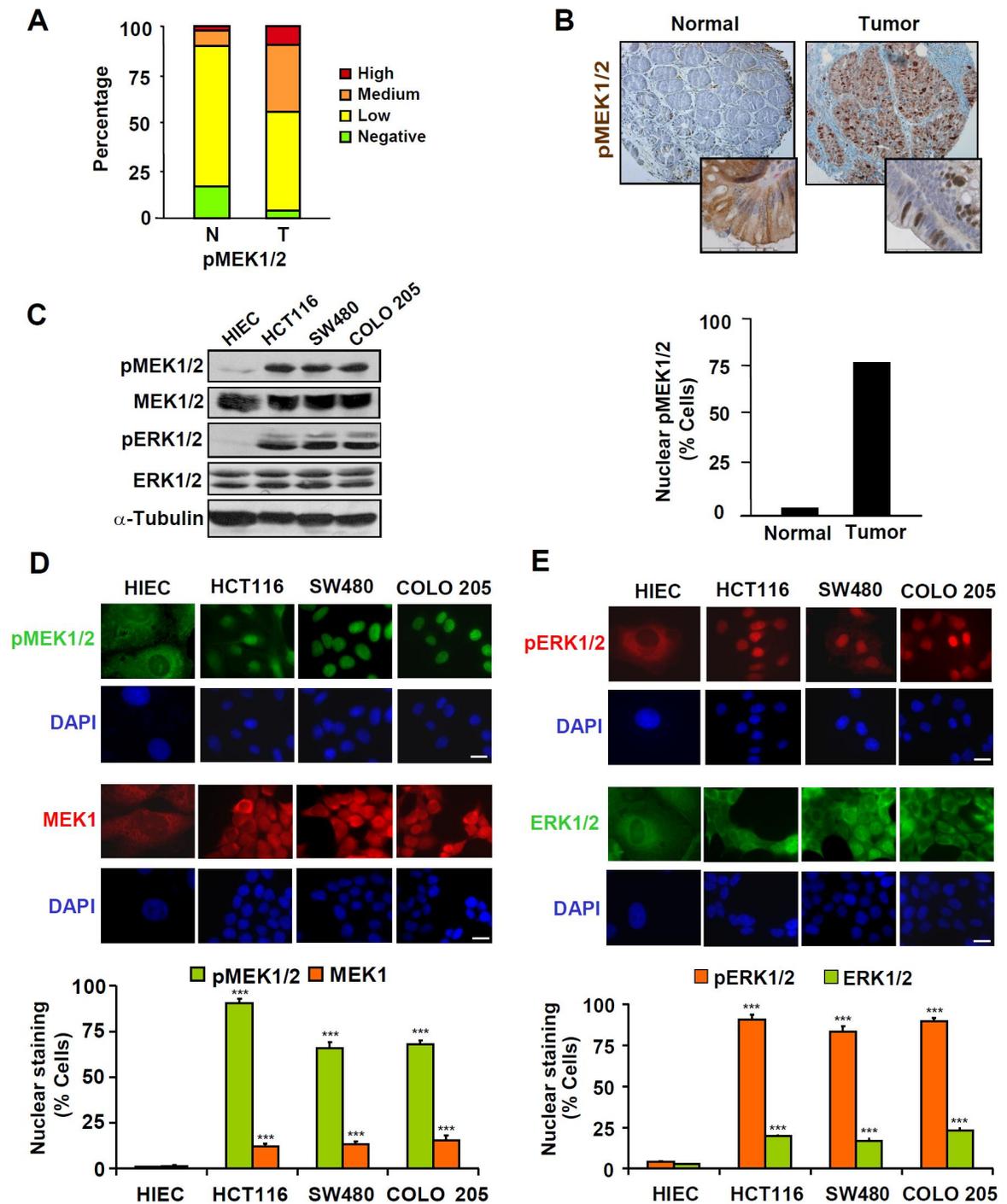


Figure 5.1. Phosphorylated MEK1/2 and ERK1/2 aberrantly localize to the nucleus in human colorectal cancer cells. (A) TMA analysis of cytoplasmic phospho-MEK1/2

(pMEK1/2) expression in clinical samples of normal (n=50) and colorectal cancer (n=408) tissues. Bars indicate the percentage of samples and colors correspond to the intensity of staining. (B) Representative pictures of normal colon and colorectal cancer tissues stained for phospho-MEK1/2 expression. Bar graph indicates the percentage of samples displaying nuclear localization of pMEK1/2. Positive nuclear staining corresponds to at least 5% of nuclei of tumor cells showing intense staining. (C) Immunoblot analysis of pMEK1/2 and phospho-ERK1/2 (pERK1/2) expression in exponentially proliferating HIEC and colon cancer cell lines. (D) Immunofluorescence staining of HIEC and colon cancer cells for pMEK1/2 (green), MEK2 (red) and DNA (DAPI, blue). Magnification 100X. Bar, 20 μ m. Quantification of pMEK1/2 nuclear localization is graphed as mean \pm SEM (n=5). (E) Immunofluorescence staining for pERK1/2 (red), ERK1/2 (green) and DNA (DAPI, blue). Results are graphed as mean \pm SEM (n=4).

To determine whether oncogenic activation of upstream regulators of the ERK1/2 pathway is sufficient to induce the nuclear mislocalization of MEK1/2, we infected the untransformed rat intestinal epithelial cell line IEC-6 [525] with a retrovirus encoding H-Ras^{V12}. As expected, expression of oncogenic Ras resulted in a marked increase in the activating phosphorylation of MEK1/2 and ERK1/2 (Figure 5.2A). Strikingly, hyperactivation of Ras induced the quantitative nuclear accumulation of phosphorylated MEK1/2 in 90% of IEC-6 cells, whereas infection with empty vector had no effect (Figure 5.2B). Similar observations were made for phosphorylated ERK1/2 (Figure 5.2B).

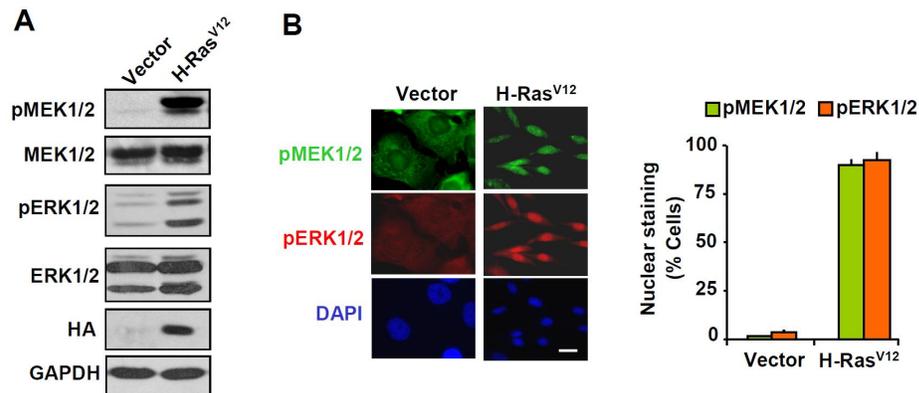


Figure 5.2. Oncogenic Ras induces the nuclear accumulation of phosphorylated MEK1/2 and ERK1/2. (A) Immunoblot analysis of pMEK1/2 and pERK1/2 levels in proliferating IEC-6 cells infected with HA-tagged H-Ras^{V12} or empty vector. (B) Immunofluorescence staining for pMEK1/2 (green), pERK1/2 (red) and DNA (DAPI, blue) in H-Ras^{V12}-expressing IEC-6 cells. Magnification 100X. Bar, 20 μ m. Quantification of pMEK1/2 and pERK1/2 nuclear localization is presented as mean \pm SEM (n=4).

Nuclear Accumulation of Phosphorylated MEK1/2 Correlates with the Malignancy of Colon Tumors

To assess the clinical relevance of nuclear MEK1/2 in colorectal cancer progression, we measured the staining intensity and subcellular distribution of phospho-MEK1/2 in normal human colonic mucosa and in specimens of hyperplastic, pre-malignant and malignant lesions of the colon (Figure 5.3). Normal mucosa displayed only faint cytoplasmic staining of phospho-MEK1/2 with a few positive nuclei limited to the base of the crypts. In sharp contrast, hyperplastic and adenomatous polyps, villous adenomas and invasive carcinomas displayed a coarsely granular staining comprising up to 10% of the nuclei located both in the deep and superficial aspects of the lesions. The observation that nuclear staining of phosphorylated MEK1/2 is detected early in pre-malignant lesions and

correlates with the malignancy of the tumor suggests that mislocalization of MEK1/2 may contribute to the progression of colorectal cancer.

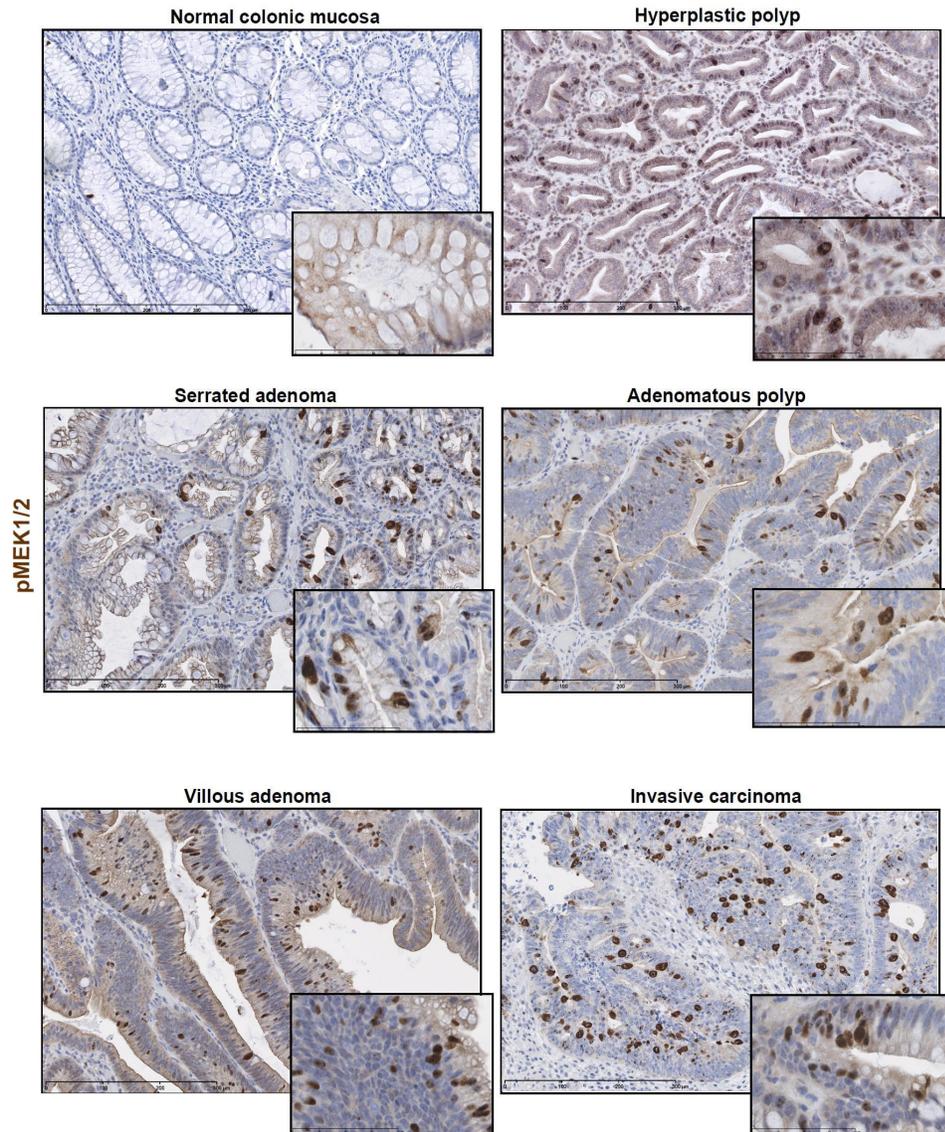


Figure 5.3. Nuclear staining of phosphorylated MEK1/2 increases with tumor malignancy. Immunohistochemical analysis of phospho-MEK1/2 in normal human colonic mucosa and in hyperplastic, pre-malignant and malignant lesions of the colon.

Nuclear Accumulation of MEK1 is Sufficient to Induce Morphological Changes and Accelerate Cell Proliferation

To evaluate the biological impact of the aberrant nuclear localization of MEK1/2, we forced the localization of MEK1 in the nucleus by generating a mutant in which 2 critical leucine residues in the NES were replaced by alanine (Δ NES) to prevent nuclear export [523]. We constructed another series of MEK1 mutants that contained a myristoylation signal (Myr) at the N-terminus to target the kinase to the plasma membrane and prevent its nuclear import (Figure 5.4A). These mutations were introduced in the otherwise wild type protein or constitutively active S218D/S222D (DD) mutant. The different MEK1 constructs were expressed in IEC-6 cells by retroviral-mediated gene transfer and polyclonal populations of puromycin-resistant clones were used for subsequent experiments. All MEK1 mutants were expressed at comparable levels in IEC-6 populations (Figure 5.4B). Immunofluorescence analysis confirmed that disruption of the NES causes the nuclear accumulation of MEK1 in proliferating cells, whereas addition of the myristoylation signal restricts the protein to the plasma membrane (Figure 5.4C). Of note, ectopic expression of MEK1DD also caused the nuclear accumulation of phosphorylated MEK1/2 and ERK1/2 (Figure 5.S1). Some nuclear staining of total MEK1DD was also detected by HA immunofluorescence, although the most intense staining was found in the cytoplasm (Figure 5.4C).

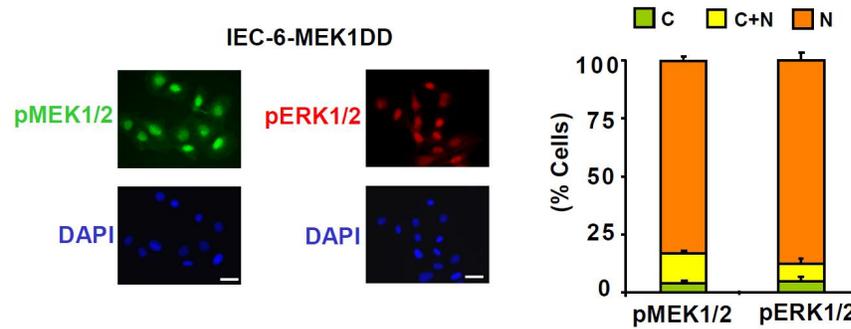


Figure 5.S1. Ectopic expression of MEK1DD induces the nuclear accumulation of phosphorylated MEK1/2 and ERK1/2. Immunofluorescence staining for pMEK1/2 (green), pERK1/2 (red) and DNA (DAPI, blue) in proliferating IEC-6 cells infected with HA-MEK1DD. Magnification 100X. Bar, 20 μ m. Quantification of pMEK1/2 and pERK1/2 nuclear localization is presented as mean \pm SEM (n=3).

Expression of activated MEK1 led to a drastic change of epithelial morphology, with the cells shrinking and adopting a spindle-like fibroblast morphology (Figure 5.4C). Notably, we found that nuclear targeting of MEK1 is sufficient to morphologically transform IEC-6 cells, while plasma membrane retention completely abrogates the transformed phenotype induced by MEK1DD activated mutant. We analyzed the proliferation rate of IEC-6 cells infected with the various MEK1 constructs. Ectopic expression of MEK1 Δ NES significantly increased the rate of cell proliferation (1.9-fold) as compared to control empty vector or wild type MEK1 (Figure 5.4D). This effect was abolished by treatment with the MEK1/2 inhibitor U0126, indicating that the kinase activity of MEK1 is necessary for enhancing cell proliferation. In agreement with this, expression of the nuclear-targeted but catalytically-inactive mutant MEK1K97A Δ NES failed to dysregulate cell proliferation or to induce changes in cell shape (data not shown). Expression of activated MEK1DD markedly accelerated the proliferation of IEC-6 cells and additional disruption of the NES (MEK1DD Δ NES) only slightly augmented this effect (Figure 5.4D). Remarkably, targeting of MEK1DD to the plasma membrane completely

antagonized its stimulatory effect on cell division. Essentially similar results were obtained with NIH 3T3 fibroblasts (Figure 5.S2A). These findings highlight the importance of the nuclear translocation of MEK1/2 in the regulation of cell proliferation.

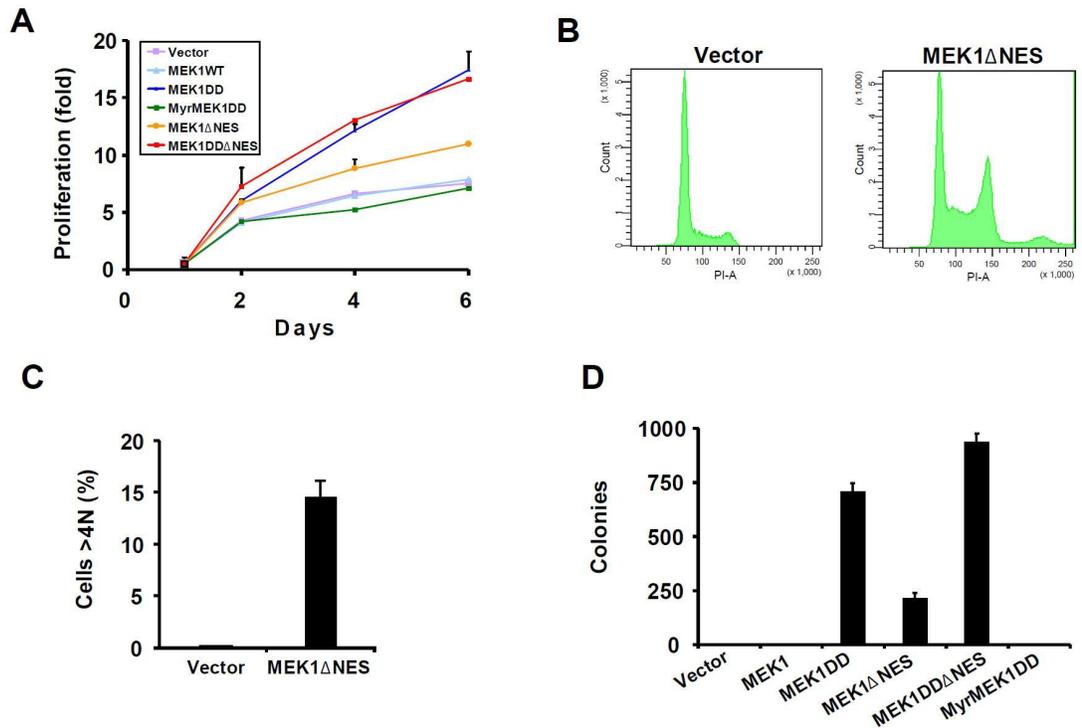


Figure 5.S2. Nuclear accumulation of MEK1 transforms fibroblastic cells. (A) Proliferation curves of NIH 3T3 populations infected with the indicated MEK1 constructs. Curves are graphed as mean \pm SEM of 3 experiments. (B) BrdU-PI flow cytometry profiles of NIH 3T3 populations infected for 14 days with vector or MEK1 Δ NES. (C) Proportion of NIH 3T3 cells with >4N DNA content. (D) Anchorage-independent proliferation assay of NIH 3T3 populations infected with MEK1 constructs. Quantification of the number of soft agar colonies (>50 cells) after 12 days. Bars represent the mean \pm SEM (n=3).

Flow cytometry analysis of the cell cycle showed that cells expressing nuclear-targeted MEK1 Δ NES accumulate in S phase concomitantly with a reduction in the percentage of G1 cells (Figures 5.4E and 5.4F). Expression of MEK1DD also caused an accumulation of cells in S phase, and this effect was repressed by restraining the activated kinase to the membrane. Overexpression of wild type MEK1 or MyrMEK1 had no effect on cell cycle kinetics. Interestingly, FACS profiles of cells expressing MEK1 Δ NES, MEK1DD and MEK1DD Δ NES also revealed an increase in the percentage of G2/M cells as well as a population of cells with >4N DNA content (Figures 5.4E, 5.4F, 5.S2B and 5.S2C; see below).

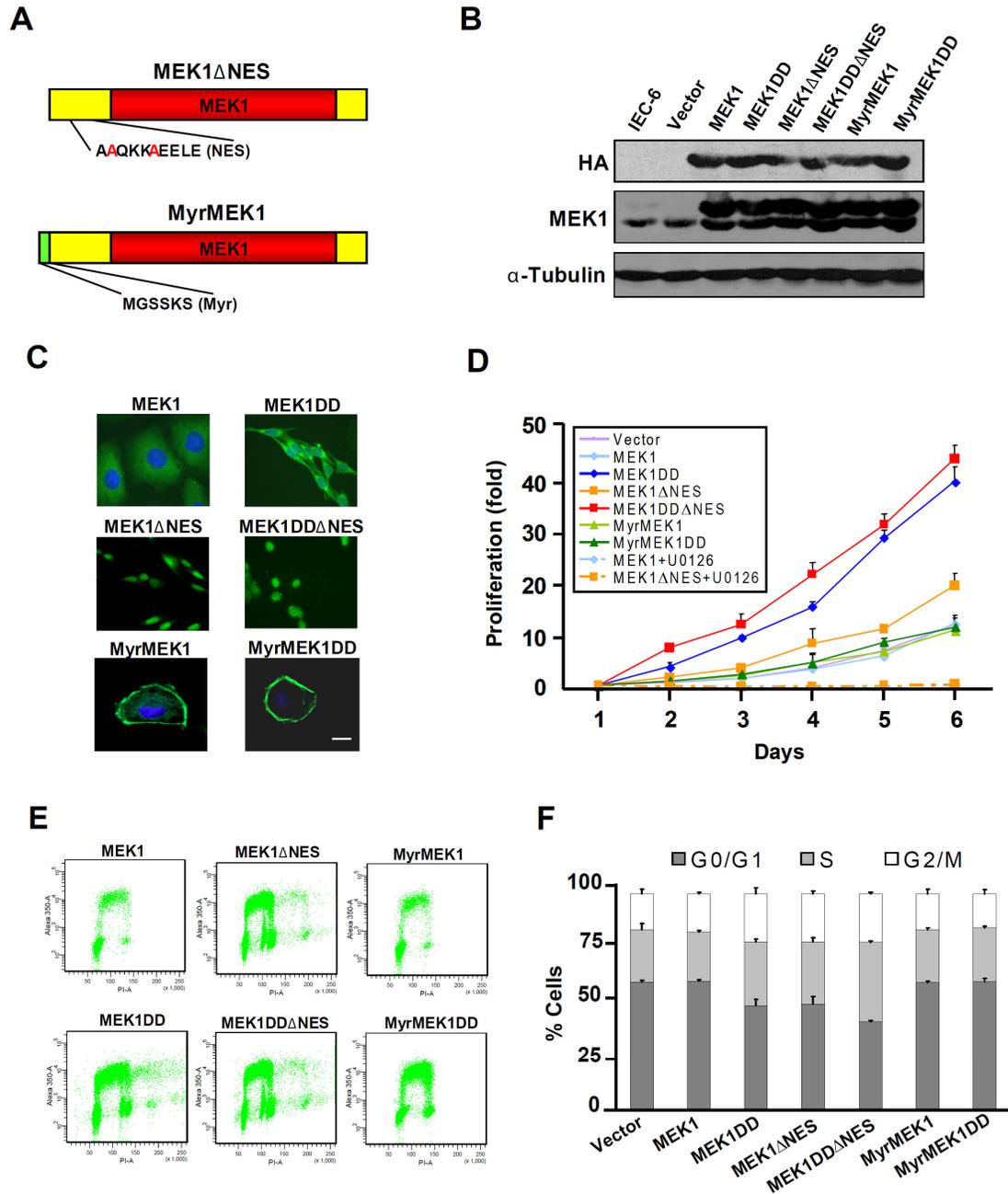


Figure 5.4. Nuclear accumulation of MEK1 dysregulates the cell cycle and accelerates the proliferation of intestinal epithelial cells. (A) Schematic representation of MEK1 constructs. (B) Immunoblot analysis of ectopic MEK1 expression in IEC-6 cells infected with the indicated constructs. (C) Immunofluorescence analysis of MEK1 mutants

localization by confocal microscopy. Cells were stained for HA (green) and DNA (DAPI, blue). Magnification 100X. Bar, 20 μm . (D) Proliferation curves of IEC-6 populations infected with indicated MEK1 constructs. Where indicated, cells were treated with 20 μM U0126. Curves are graphed as mean \pm SEM of 3 independent experiments. (E) BrdU-PI flow cytometry profiles of IEC-6 populations infected for 14 days with MEK1 constructs. (F) Quantification of the cell cycle distribution. Bars correspond to the mean \pm SEM (n=3).

To understand the molecular basis of the accelerated G1-to-S phase transition of MEK1 Δ NES-expressing cells, we asked if nuclear targeting of catalytically normal MEK1 modulates ERK1/2 activity. Unexpectedly, we observed that ERK1/2 become constitutively active in IEC-6-MEK1 Δ NES cells (Figure 5.S3A). We next monitored the expression of key G1 regulators during synchronous cell cycle progression. As shown in Figure 5.S3B, the expression of *cyclin D1*, *cyclin E1* and *E2f1* mRNAs was up-regulated, whereas expression of the anti-proliferative genes *p27^{Kip1}*, *p21^{Cip1}* and *Tob1* was markedly down-regulated in IEC-6-MEK1 Δ NES cells. The mitogen-dependent periodicity of expression of these genes was also lost. Immunoblot analysis confirmed that MEK1 Δ NES-expressing cells contain elevated levels of cyclin D1 and cyclin E1, and barely detectable levels of the cyclin-dependent kinase inhibitors p27 and p21 (Figure 5.S3C). These cell cycle regulators are known targets of the ERK1/2 MAP kinase pathway [230]. Thus, persistent localization of MEK1 in the nucleus causes the hyperactivation of ERK1/2, resulting in dysregulation of the cell cycle and increased cell proliferation rate.

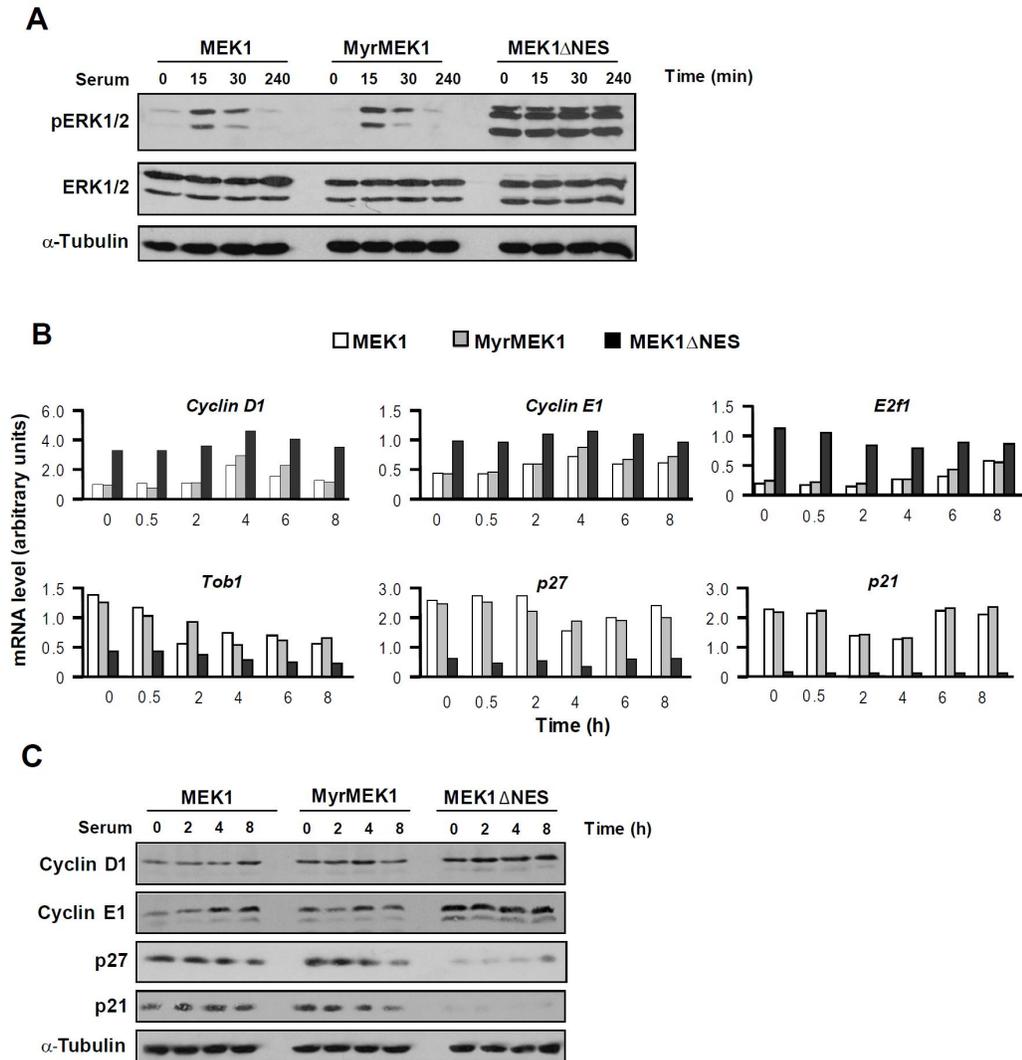


Figure 5.S3. Effect of MEK1 localization mutants on ERK1/2 activity and G1 cell cycle regulators. (A) Immunoblot analysis of ERK1/2 activation loop phosphorylation in IEC-6 cells infected with the indicated MEK1 constructs. The cells were synchronized in G0 by serum starvation and restimulated to enter the cell cycle with 10% serum (n=5). (B) Real-time qPCR analysis of cell cycle regulatory genes. IEC-6 cells infected with the indicated MEK1 constructs were synchronized in G0 and restimulated to enter the cell cycle with 10% serum. Results are representative of 3 experiments. (C) Immunoblot analysis of cell cycle regulatory proteins (n=5).

Nuclear Accumulation of MEK1 Induces Cell Transformation

We next asked whether nuclear targeting of MEK1 is sufficient to transform cells. Ectopic expression of MEK1DD conferred anchorage-independent growth to IEC-6 cells, and this property was completely abolished by restricting its localization to the plasma membrane (Figures 5.5A and 5.5B). Cells infected with MEK1 Δ NES also formed colonies in soft agar, albeit at lower frequency than MEK1DD-expressing cells. Similar results were obtained in NIH 3T3 cells (Figure 5.S2D). In all cases, anchorage-independent growth was prevented by treatment of cells with U0126. Cells expressing MEK1K97A Δ NES also failed to proliferate in soft agar (data not shown). Since anchorage-independence is associated with resistance to anoikis, we further examined the capacity of MEK1 mutants to protect IEC-6 cells from detachment-induced cell death. Expression of MEK1DD and MEK1 Δ NES almost completely protected IEC-6 cells from undergoing anoikis (Figure 5.5C). In contrast, cells infected with wild type MEK1 or membrane-targeted mutants of the kinase rapidly entered into apoptosis in suspension and failed to grow in soft agar.

To analyze the impact of nuclear MEK1 signaling on tumorigenesis *in vivo*, cells were injected subcutaneously into athymic mice. MEK1DD-expressing IEC-6 cells generated rapidly growing tumors that reached a volume of 1,000 mm³ in only two weeks (Figure 5.5D). Importantly, cells expressing MEK1 Δ NES also formed tumors of similar size but with a longer latency. Overexpression of wild type MEK1 never induced the formation of tumors. Thus, nuclear accumulation of MEK1 is sufficient to fully transform immortalized intestinal epithelial cells.

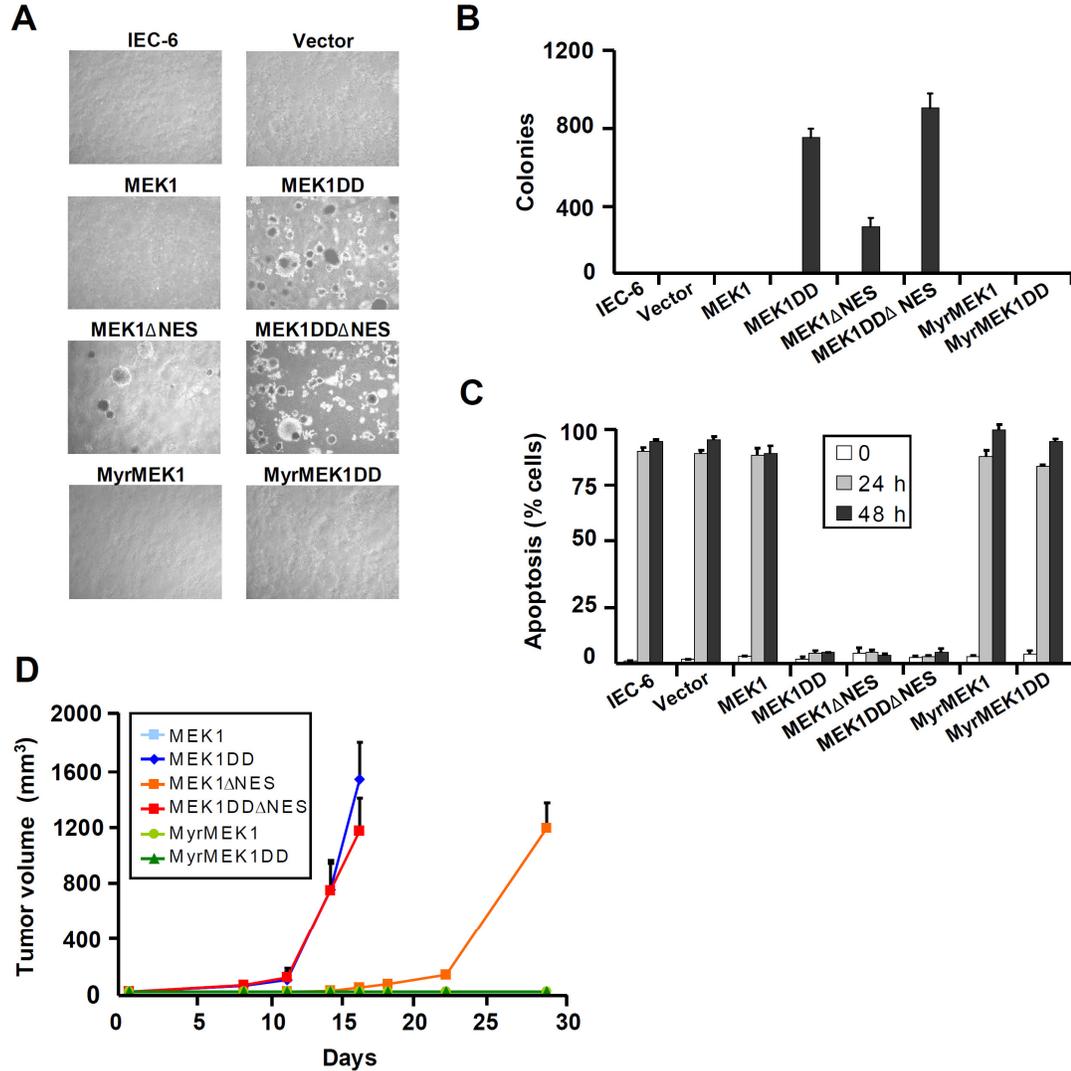


Figure 5.5. Nuclear accumulation of MEK1 leads to cell transformation. (A) Anchorage-independent proliferation assay of IEC-6 populations infected with MEK1 constructs. (B) Quantification of the number of soft agar colonies (>50 cells) after 10 days. Cells were treated or not with 20 μ M U0126. Bars represent the mean \pm SEM (n=4). (C) Anoikis assay. Bars represent the mean \pm SEM (n=4). (D) Tumorigenesis assay. IEC-6 populations transduced with MEK1 constructs were injected subcutaneously (3×10^4 cells) into the flanks of athymic mice. Tumor volumes represent the mean volume \pm SEM of 8 tumors.

Nuclear Accumulation of MEK1 Leads to CIN and Polyploidization

Quantitative analysis of flow cytometry profiles (see Figure 5.4E) revealed that a significant proportion of asynchronously proliferating MEK1^{DD}- and MEK1 Δ NES-expressing IEC-6 cells exhibit a >4N DNA content (Figure 5.6A). Time-course experiments showed that these polyploid/aneuploid cells are rapidly generated after expression of MEK1 Δ NES and that their percentage increases with the number of cell divisions (Figure 5.6B). Notably, infection of IEC-6, MCF-10A and NIH 3T3 cells with H-Ras^{V12} induces a similar accumulation of polyploid/aneuploid cells (Figure 5.S4). To further characterize the CIN induced by nuclear MEK1, we prepared metaphase spreads from IEC-6 cells infected for 14 days with either wild type MEK1 or MEK1 Δ NES and analyzed their chromosome numbers and karyotypes. Control IEC-6-MEK1 cells are pseudodiploid or near-diploid with chromosome numbers between 42 and 46 per cell (Figure 5.6C). However, examination of IEC-6-MEK1 Δ NES cells revealed the presence of two populations of cells. While most of the cells were near-diploid (37 to 48 chromosomes), 13% of cells (16 out of 122 Giemsa-stained metaphases) had a near-tetraploid modal number with 81 to 94 chromosomes (Figure 5.6C). Spectral karyotyping analysis confirmed the tetraploid karyotype of a subpopulation of IEC-6-MEK1 Δ NES cells with the presence of minute chromosomes in 6 cells and chromosomal deletions in 2 cells (29 metaphases analyzed) but did not reveal other structural rearrangements such as translocations (Figure 5.6D).

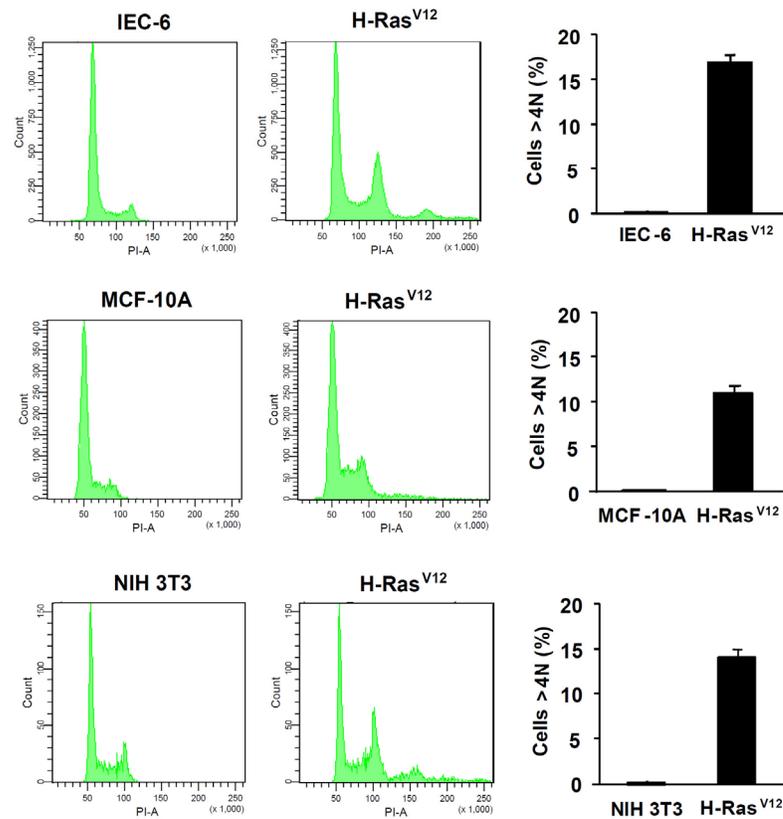


Figure 5.S4. Oncogenic Ras promotes chromosomal instability in epithelial and fibroblastic cells. Left, BrdU-PI flow cytometry profiles of intestinal epithelial (IEC-6), mammary epithelial (MCF-10A) and fibroblast (NIH 3T3) cell populations infected or not for 7 days with H-Ras^{V12} construct. Right, proportion of cells with >4N DNA content.

A previous study has reported that tetraploid p53^{-/-} mouse mammary epithelial cells produce tumors when injected into nude mice, whereas diploid cells do not [526]. To determine whether tetraploidy of IEC-6-MEK1ΔNES cells promotes their tumorigenic potential, diploid and polyploid cells were isolated by flow cytometry and injected immediately into the flanks of athymic mice. Tumors arising from tetraploid cells grew much faster than diploid or unsorted cells, reaching a mean volume of ~700 mm³ in two weeks (Figure 5.6E).

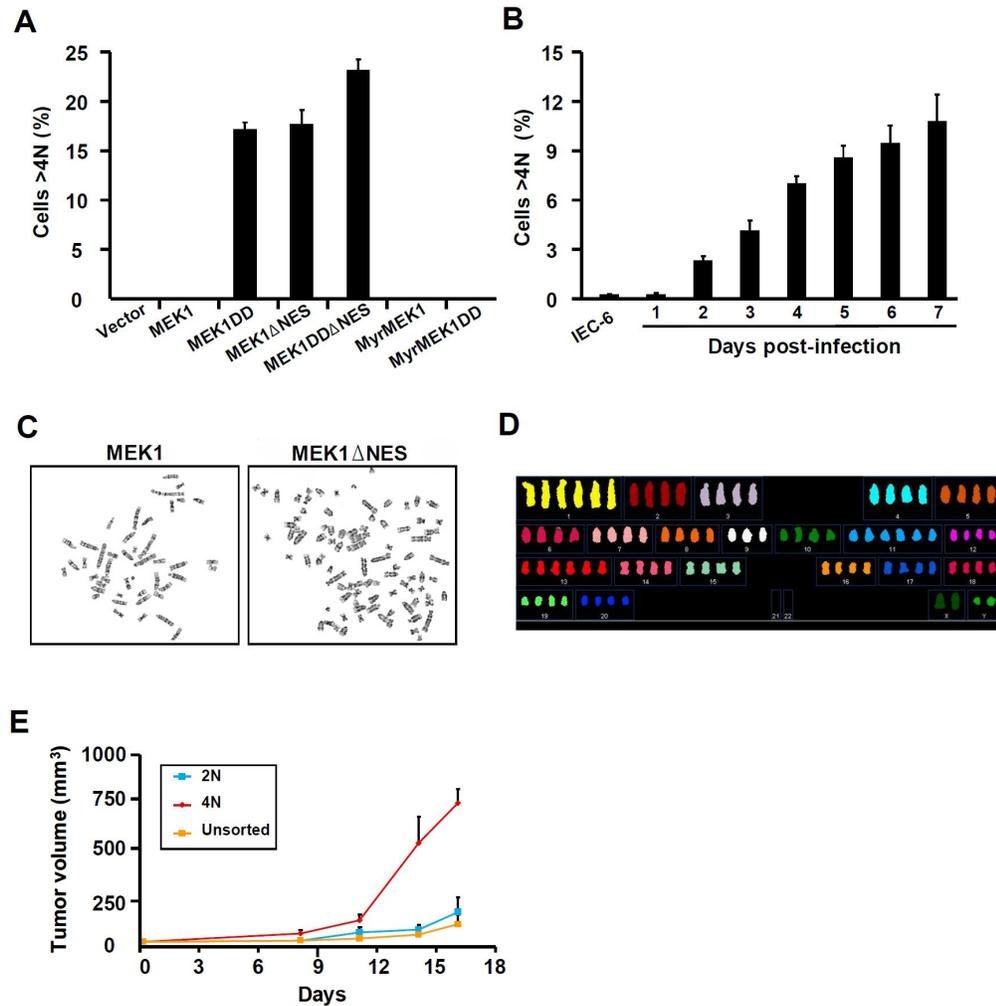


Figure 5.6. Nuclear accumulation of MEK1 induces chromosomal instability. (A) Proportion of cells with >4N DNA content 14 days after infection of IEC-6 cells with MEK1 constructs. (B) Kinetic analysis of polyploidy in IEC-6 cells following expression of MEK1ΔNES. (C) Representative GTG-banded metaphase spreads prepared from IEC-6 cells infected for 14 days with wild type MEK1 or MEK1ΔNES. (D) Spectral karyotyping analysis of IEC-6-MEK1ΔNES cells showing a near-tetraploid karyotype without structural rearrangements. (E) Hyperplod IEC-6-MEK1ΔNES cells generate faster growing tumors in mice. Cells with 2N and >4N DNA content were sorted by flow cytometry from the IEC-6-

MEK1 Δ NES population and injected (3×10^4 cells) into athymic mice. Tumor volumes represent the mean \pm SEM of 4 tumors.

Progressive Downregulation of Sef in Colorectal Carcinogenesis

The steady-state distribution of MEK1/2 between the cytoplasm and nucleus is controlled by the rates of nuclear import and export of the proteins, and is influenced by the expression and affinity of binding partners in each compartment. To investigate the mechanism responsible for the abnormal nuclear accumulation of activated MEK1/2, we first examined the impact of activation loop phosphorylation on the kinetics of nuclear entry. For these experiments, IEC-6 cells expressing HA-tagged wild type MEK1, MEK1DD or the non-phosphorylatable activation loop mutant S218A/S222A (AA) of MEK1 were treated for different times with leptomycin B (LMB), which inhibits the nuclear export of MEK1/2 [30]. The localization of MEK1 was monitored by immunofluorescence microscopy with anti-HA antibody. Mimicking the phosphorylation of MEK1 (S218D/S222D) markedly accelerated the nuclear translocation rate of MEK1 in proliferating cells (Figure 5.S5). By 2 h of LMB addition, MEK1 nuclear localization was detected in 76% of MEK1DD-expressing cells, as opposed to 27% of MEK1-infected cells. Nuclear uptake of the AA mutant was severely compromised, indicating that activation loop phosphorylation of MEK1 is necessary for efficient nuclear import. However, phosphorylation of S218/S222 is not sufficient to relocalize MEK1 predominantly to the nucleus in the absence of LMB (Figure 5.S5). These findings indicate that mechanisms other than activation loop hyperphosphorylation contribute to the nuclear accumulation of MEK1/2 in transformed intestinal epithelial cells.

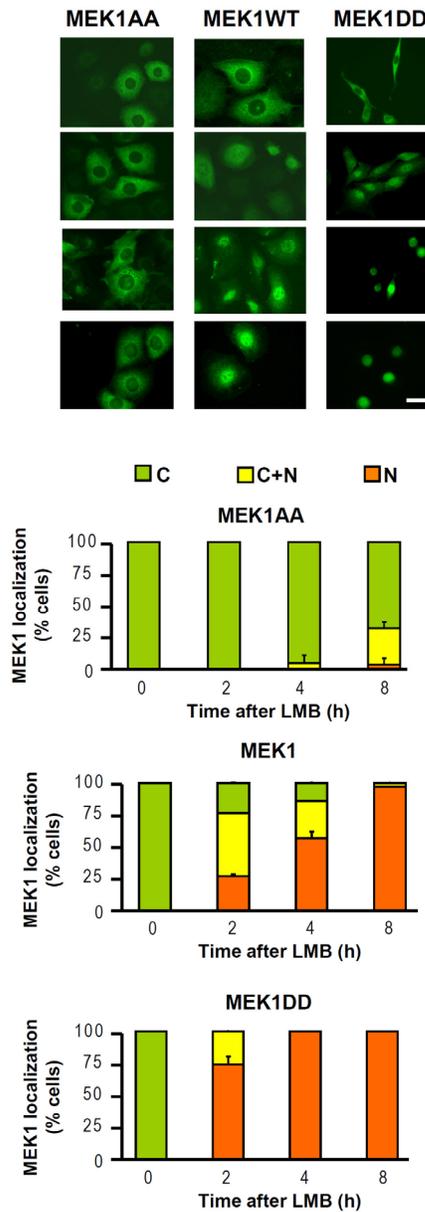


Figure 5.S5. Effect of activation loop mutations on the nuclear entry of MEK1. Immunofluorescence staining of ectopic MEK1 (green). IEC-6 cells were infected with HA-tagged MEK1, MEK1AA or MEK1DD mutant. The cells were treated with LMB (2 ng/ml) for the indicated times and stained with anti-HA antibody. Quantification of MEK1 subcellular localization is graphed as mean \pm SEM (n=3).

One spatial regulator of MEK1/2 is the membrane protein Sef, which was shown to bind MEK1/2 and tether MEK1/2-ERK1/2 complexes to the Golgi apparatus and plasma membrane, thereby blocking ERK1/2 signaling to the nucleus [129]. We found that the levels of Sef are markedly downregulated in human colon carcinoma cell lines, as compared to normal HIEC (Figure 5.7A). Oncogenic activation of Ras was sufficient to downregulate the expression of Sef in IEC-6 cells (Figure 5.7B). We next analyzed the expression pattern of Sef in colon tissue specimens by immunohistochemistry. Normal colonic mucosa displayed a strong and coarse granular staining of Sef (Figure 5.7C). Although small capillaries are also labelled, immunoreactivity was mainly observed in the cytoplasm of colonic epithelial cells. Benign adenomatous polyps also showed some cytoplasmic staining albeit at lower levels. In sharp contrast, the epithelial component of both dysplastic villous adenoma and malignant invasive carcinoma failed to express any significant immunoreactivity to Sef under conditions that maintain faint endothelial staining. Thus, Sef expression inversely correlates with the pattern of phospho-MEK1/2 nuclear staining and with tumor malignancy in the process of colorectal tumorigenesis.

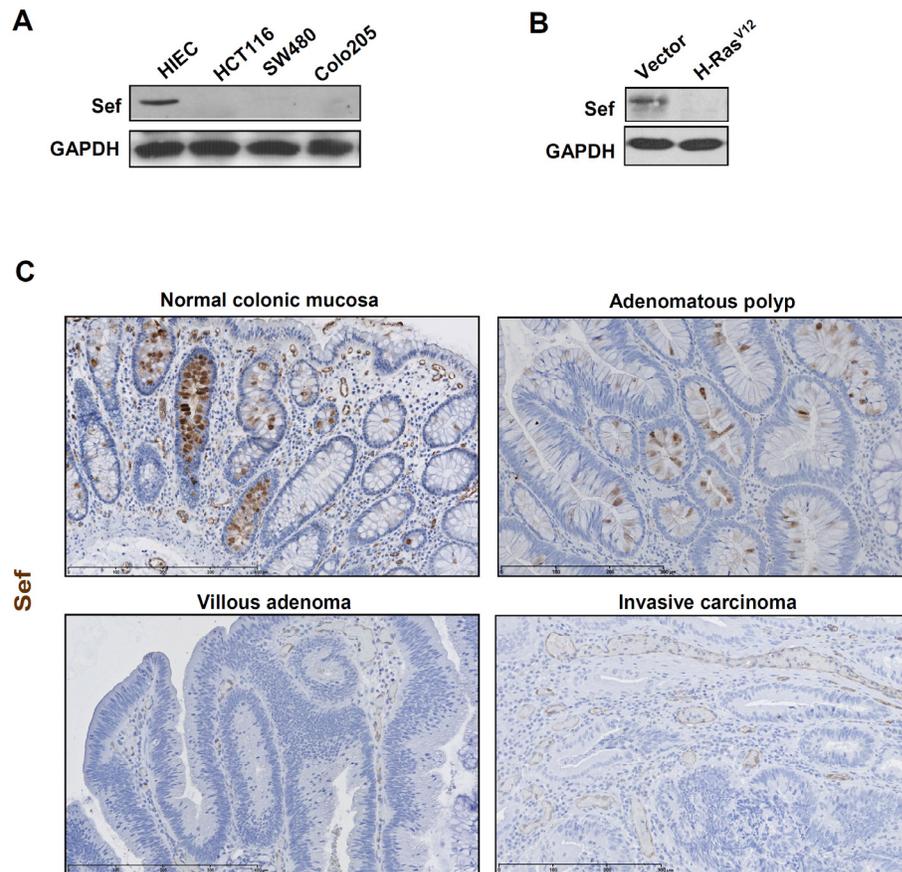


Figure 5.7. Sef is downregulated in human colorectal cancer. (A) Immunoblot analysis of Sef expression in proliferating HIEC and colon cancer cell lines. (B) Immunoblot analysis of Sef expression in proliferating IEC-6 cells infected with H-Ras^{V12} or empty vector. (C) Immunohistochemical examination of Sef in normal human colonic mucosa, pre-malignant and malignant tumors of the colon.

Expression of Sef Prevents CIN and Tumorigenesis

To directly test the hypothesis that Sef regulates the intracellular localization of MEK1/2 and the fate of intestinal epithelial cells, we ectopically expressed human Sef at close-to-physiological levels in Ras-transformed IEC-6 cells and in the colon cancer cell lines HCT116 and COLO 205 by retroviral-mediated gene transfer. Polyclonal populations

of infected cells were selected and used for subsequent studies. Quantitative immunoblotting analysis showed that HCT116-Sef and COLO 205-Sef populations express respectively 2.8-fold (n=3) and 2.5-fold (n=3) higher levels of Sef than HIEC (Figure 5.8A). To confirm that Sef binds to activated MEK1/2, HCT116-Sef and COLO 205-Sef cells were subjected to co-immunoprecipitation analysis. In agreement with previous observations [129], we found that HA-tagged Sef co-precipitates with the phosphorylated form of MEK1/2 in these cells (Figure 5.8B). Then, we examined if this interaction affects the subcellular localization of activated MEK1/2. Reexpression of Sef in Ras-transformed IEC-6 cells induced the cytoplasmic relocalization of phosphorylated MEK1/2 in 94% of the cells, accompanied by a morphological reversion of the transformed phenotype (Figure 5.8C). Noticeably, Sef expression also restored the normal cytoplasmic localization of phosphorylated MEK1/2 in the colon carcinoma lines HCT116 and COLO 205 (Figure 5.8D). In infected cells not expressing Sef, the abnormal nuclear localization of phosphorylated MEK1/2 was maintained. Reexpression of Sef markedly attenuated the activating phosphorylation of ERK1/2 while preserving the hyperactivation state of MEK1/2 (Figure 5.8E).

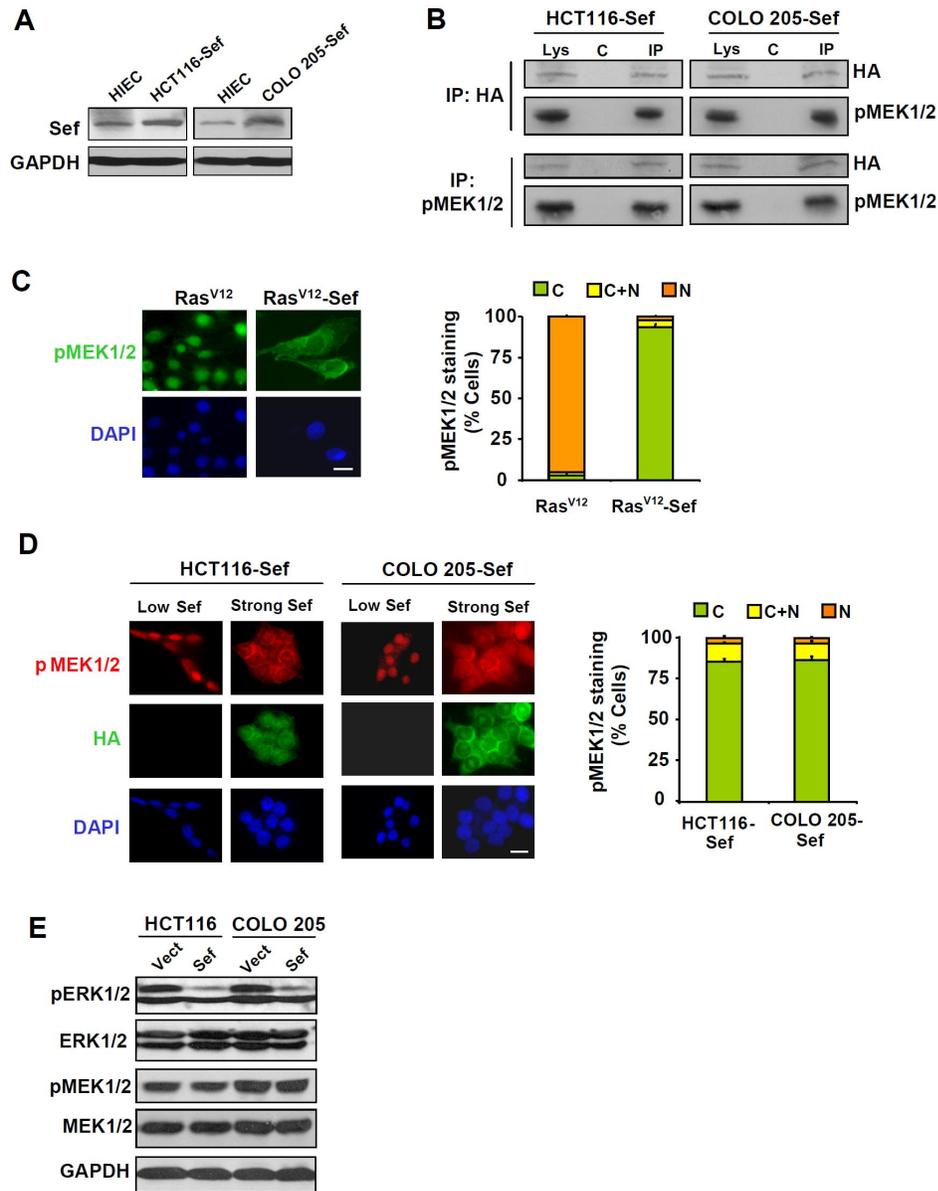


Figure 5.8. Reexpression of Sef prevents the nuclear accumulation of phosphorylated MEK1/2 and constitutive activation of ERK1/2. (A) HCT116 and COLO 205 cells were infected with human HA-tagged Sef construct. The comparative levels of Sef expression were analyzed by quantitative immunoblotting. (B) Sef co-immunoprecipitates with activated MEK1/2 in colon cancer cells. HCT116 and COLO 205 cells infected with HA-

Sef were subjected to immunoprecipitation with anti-HA (upper panels) or anti-phospho-MEK1/2 (lower panels). Bound proteins were analyzed by immunoblotting with the indicated antibodies (n=4). (C) Immunofluorescence staining for pMEK1/2 (green) and DNA (DAPI, blue) in IEC-6-H-Ras^{V12} cells infected or not with Sef. Magnification 100X. Bar, 20 μ m. Quantification of pMEK1/2 localization is presented as the mean \pm SEM (n=3). (D) Immunofluorescence staining for pMEK1/2 and DNA in colon cancer cells infected or not with Sef. Bar graph corresponds to the mean \pm SEM (n=3). (E) Immunoblot analysis of pERK1/2 and pMEK1/2 levels in HCT116 and COLO 205 cells infected or not Sef.

We next tested whether the reexpression of Sef is sufficient to attenuate the proliferation of colon cancer cells and to revert the CIN and tumorigenesis induced by oncogenic Ras. Expression of Sef slowed down the proliferation rate of both HCT116 and COLO 205 cancer cells (Figure 5.9A). Analysis of flow cytometry profiles showed that reexpression of Sef normalizes the cell cycle distribution of IEC-6-H-Ras^{V12} cells (Figure 5.9B). After 12 days, the proportion of cells with >4N DNA content was 22.8% (n=4) in IEC-6-H-Ras^{V12} cells as compared to only 4.6% (n=4) in cells infected with Sef (Figure 5.9B). To evaluate the impact of Sef on tumor development *in vivo*, cell populations were injected into athymic mice. IEC-6-H-Ras^{V12} cells formed rapidly growing tumors that reached a volume of ~ 600 mm³ (n=5 mice) in 21 days (Figure 5.9C). Reexpression of Sef dramatically inhibited Ras-induced tumor formation. No tumor was apparent in any of the experimental mice 34 days after transplantation. These results suggest that Sef expression antagonizes Ras-mediated CIN and tumorigenesis.

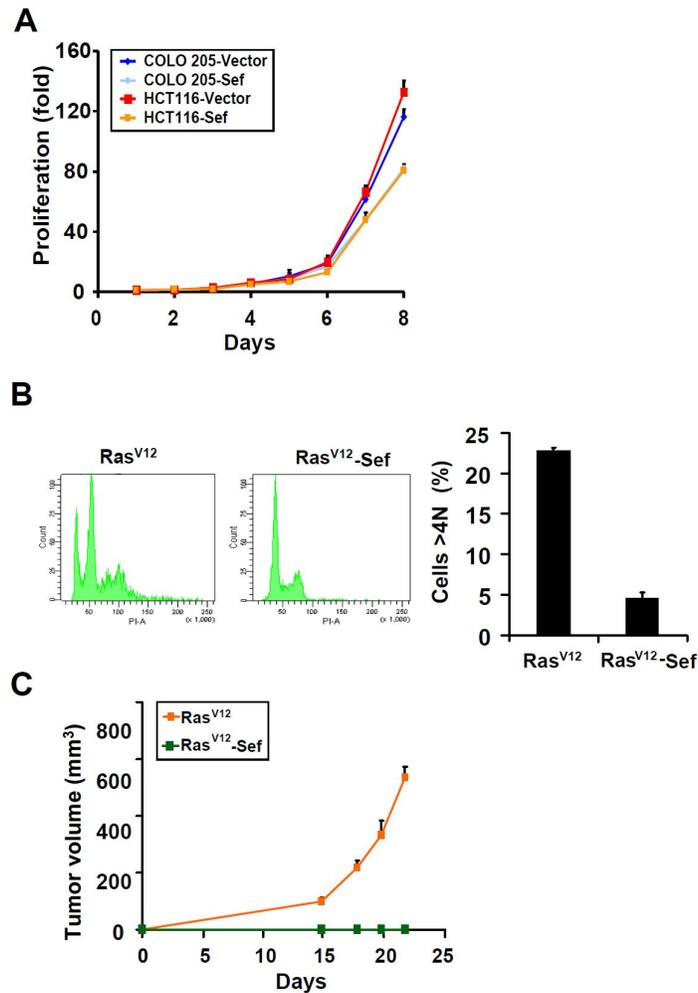


Figure 5.9. Reexpression of Sef normalizes the cell cycle and suppresses tumorigenesis induced by oncogenic Ras. (A) Proliferation curves of HCT116 and COLO 205 cells infected with human Sef. Curves are graphed as mean \pm SEM of 3 independent experiments. (B) Cell cycle profiles of IEC-6 cells infected with H-Ras^{V12} for 12 days together or not with Sef. Right panel, proportion of cells with >4N DNA content. Bars correspond to the mean \pm SEM (n=4). (C) Tumorigenesis assay. IEC-6 cells were infected with H-Ras^{V12} together or not with Sef and populations of puromycin-resistant cells were injected subcutaneously (3×10^4 cells) into athymic mice. Tumor volumes represent the mean \pm SEM of 5 tumors.

DISCUSSION

Faithful nucleocytoplasmic trafficking of signaling proteins is critical for normal gene expression and cell proliferation. This is particularly well exemplified by the MAP kinases ERK1 and ERK2. Sequestration of ERK1/2 in the cytoplasm by overexpression of the compartment-specific proteins MKP-3 [518] or PEA-15 [173] inhibits mitogen-stimulated immediate-early gene expression and DNA synthesis. Similarly, expression of the BH3-only protein Bik blocks nuclear translocation of ERK1/2 to mediate interferon- γ -induced death of airway epithelial cells [266]. Physiologically, the suppression of cell proliferation observed during retinoic acid-induced endoderm differentiation is associated with restriction of the nuclear entry of activated ERK1/2 [527]. Interestingly, the level of PEA-15 protein expression inversely correlates with the invasive behaviour of breast cancer [528], suggesting that mislocalization of ERK1/2 may contribute to cancer pathogenesis.

Much less is known about the regulation and impact of MEK1/2 subcellular localization. Early studies indicated that MEK1/2 are found exclusively in the cytoplasm during signal transmission. However, later work showed that MEK1/2 translocate to the nucleus, but are rapidly exported to the cytoplasm by virtue of a strong NES found at their N-terminus [30, 127, 523]. The mechanism underlying the nuclear transport of these kinases remains poorly understood. Previous studies have suggested that nuclear translocation of MEK1/2 is enhanced by mitogenic stimulation, and that phosphorylation of activation loop serines is required for this process [127, 529, 530]. In contrast, other studies have failed to observe the nuclear relocalization of MEK1/2 in response to agonist [30, 154]. The results presented here clearly demonstrate that nuclear localization of MEK1/2 is a regulated process and that dysregulation occurs in cancer. We found that activated MEK1/2 are aberrantly localized to the nucleus in primary colorectal tumors, and that expression of oncogenic Ras is sufficient to induce the nuclear accumulation of MEK1/2. The nuclear translocation of MEK1/2 is critically dependent on phosphorylation of the

activation loop, which is stimulated by oncogenic Ras. However, although necessary, activation loop phosphorylation is not sufficient to drive nuclear accumulation of MEK1/2 as the DD mutant of MEK1 fails to accumulate in the nucleus in the absence of LMB (Figure 5.S5). Therefore, other mechanisms must contribute to MEK1/2 mislocalization in cancer cells.

We show here that expression of oncogenic Ras dramatically downregulates the levels of Sef, a spatial regulator of MEK1/2, in intestinal epithelial cells. Accordingly, the expression of Sef protein is almost undetectable in colon carcinoma lines bearing activating mutations of *KRAS* or *BRAF*. Sef was originally identified as a feedback inhibitor of Ras-dependent fibroblast growth factor (FGF) signaling in zebrafish [531, 532]. Subsequent work showed that the inhibitory function of Sef is conserved in vertebrate species. However, the site of action of Sef has been the subject of contradictory reports. Some studies have suggested that Sef acts at the level of FGF receptor by interacting directly with the receptor to inhibit phosphorylation of FGF receptor substrate 2 and downstream signaling events [152, 532, 533]. On the other hand, other reports have suggested that Sef acts downstream of the FGF receptor at the level of MEK or its cognate MAP kinase [531, 534, 535]. Along this line, Torii et al. [129] have shown that Sef binds to MEK1/2 in the cytoplasm and inhibits the dissociation of MEK1/2-ERK1/2 complexes, thereby antagonizing nuclear ERK1/2 signaling. Our current findings further substantiate the idea that Sef is a major spatial regulator the ERK1/2 pathway. We first confirm that Sef interacts with phosphorylated MEK1/2 in epithelial cells. Then, we reveal the tight inverse relationship that exists between the expression of Sef and the nuclear localization of activated MEK1/2 in both cell lines and clinical tissue samples. Importantly, we show that reexpression of Sef at close-to-physiological levels is sufficient to restore the normal cytoplasmic localization of activated MEK1/2 in Ras-transformed IEC-6 cells and colon carcinoma cells.

Recent studies have shown that Sef levels are downregulated in a majority of human prostate, breast, thyroid and ovarian carcinomas of intermediate to high grades [294, 295, 536]. In this study, we found that Sef is strongly expressed in the normal colonic mucosa but that expression in the epithelial compartment progressively declines with the increasing malignancy of colon tumors. Thus, loss of Sef appears to be a common event during epithelial cancer progression. Importantly, our findings provide a molecular framework for understanding the potential role of Sef in tumorigenesis. We show that nuclear mislocalization of MEK1 has a dramatic impact on cellular behavior leading to enhanced proliferation, resistance to apoptosis, CIN and tumorigenesis. In a previous study, Fukuda et al. [537] have reported that disruption of the NES strongly potentiates the ability of constitutively activated *Xenopus* MAP kinase kinase to induce morphological changes and transform rodent fibroblasts *in vitro*. Since the kinase activity of NES mutants was comparable to that of wild type protein, their results suggested that the subcellular localization of MAP kinase kinase was a primary determinant of the cellular response. Our results further extend this observation. These findings are relevant to cancer pathogenesis as MEK1/MEK2 are very rarely mutated in epithelial cancers, but are activated by upstream oncoproteins and are frequently mislocalized as revealed in this study. Sustained nuclear MEK1 signaling causes cell cycle defects characterized by an acceleration of G1-to-S phase transition and an impairment of cell division. MEK1 Δ NES-expressing cells display elevated levels of *cyclin D1*, *cyclin E1* and *E2f1* genes, and decreased levels of the anti-proliferative genes *Tob1*, *p27^{Kip1}* and *p21^{Cip1}*. Notably, expression of the Cdk inhibitors *p27^{Kip1}* and *p21^{Cip1}* is markedly downregulated in these cells. All these cell cycle regulators are established downstream targets of the ERK1/2 MAP kinase pathway. The finding that nuclear targeting of MEK1 leads to the generation of tetraploid cells was unexpected. Accumulating evidence suggests that tetraploidy is a genetically unstable state that can serve as an intermediate on the path to aneuploidy and, ultimately, cancer [538]. Indeed, tetraploid *p53^{-/-}* mammary epithelial cells have an increased frequency of whole chromosome mis-segregation and are more tumorigenic than their diploid counterparts

[526]. In agreement with this, we found that tetraploid MEK1 Δ NES-expressing IEC-6 cells generate tumors much faster than diploid cells in mice.

An important finding from this study was the observation that nuclear targeting of catalytically normal MEK1 results in constitutive activation of ERK1/2 (Figure 5.S2D). This suggests that loss of Sef, and the resulting mislocalization of MEK1/2, may contribute to maintain the hyperactive state of ERK1/2 in epithelial tumors by a mechanism independent from mutational activation of upstream regulators. In support of this idea, reexpression of Sef in HCT116 or COLO 205 cells markedly attenuates the activating phosphorylation of ERK1/2 without compromising the hyperphosphorylation of MEK1/2 (Figure 5.8E). All these observations lead us to propose the following model to explain the frequent loss of Sef in epithelial tumors and its impact on tumor progression (Figure 5.S6). Mutational activation of Ras causes downregulation of Sef expression in epithelial cells, leading to nuclear accumulation of activated MEK1/2 and ERK1/2. Nuclear MEK1/2 signaling sustains the hyperactivation state of ERK1/2, by a mechanism that remains to be investigated, and synergizes with Ras-dependent activating phosphorylation. Prolonged nuclear ERK1/2 signaling dysregulates the cell cycle and inhibits apoptosis, leading to CIN and tumor progression. Collectively, our results suggest a tumor suppressor function for Sef in colorectal cancer. Therefore, preventing the downregulation of Sef would appear as a promising therapeutic scenario in this cancer type.

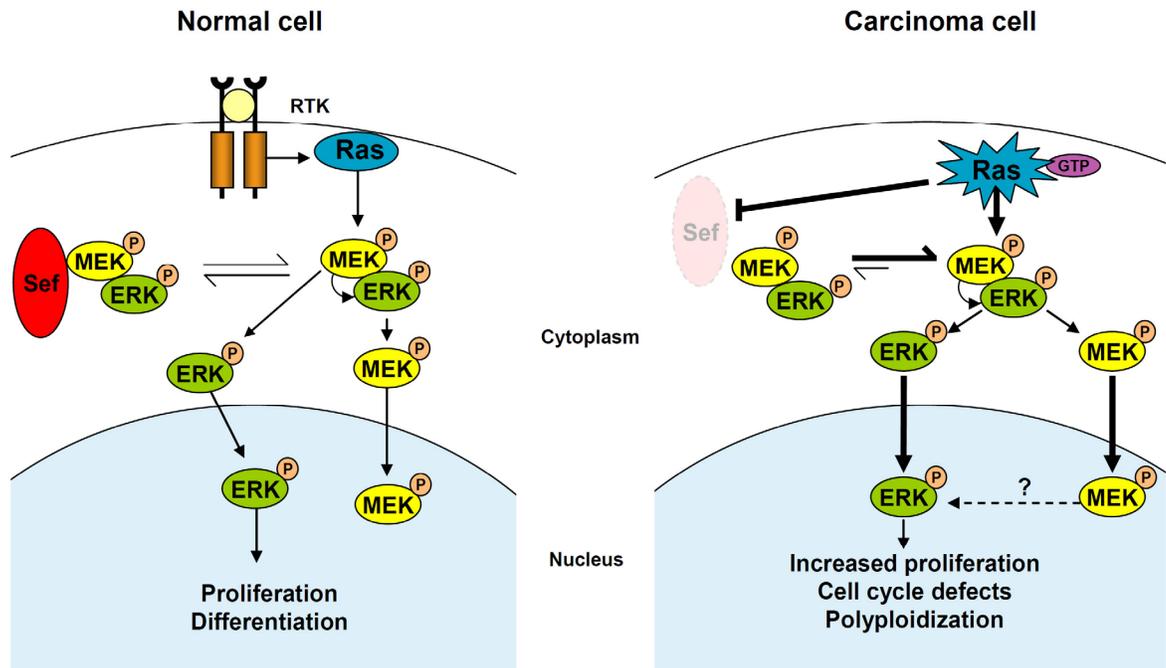


Figure 5.S6. Model of the proposed tumor suppressor function of Sef in epithelial cancers. (Left) In normal cells, Sef binds to phosphorylated MEK1/2 in the cytoplasm and inhibits the dissociation of MEK1/2-ERK1/2 complexes, thereby attenuating nuclear ERK1/2 signaling. (Right) In carcinoma cells, mutational activation of Ras leads to downregulation of Sef, resulting in the accumulation of activated MEK1/2 and ERK1/2 in the nucleus. Sustained nuclear MEK1/2 signaling synergizes with Ras-mediated activating phosphorylation to further amplify the hyperactivation of ERK1/2. Dysregulated ERK1/2 signaling impairs normal cell cycle progression and inhibits apoptosis, contributing to genetic instability and tumor progression.

MATERIALS AND METHODS

Immunohistochemistry

The colorectal cancer TMAs used in this study were kindly provided by the Department of Pathology, University of Basel. They contain a total of 455 tissue samples, including 406 colorectal cancers and 49 normal colon tissues. The use of these specimens and research data was approved by the Ethics Committee of the University Hospital Basel. For immunohistochemical staining, TMA slides were deparaffinized, rehydrated in graded ethanol and heated in a steamer with antigen retrieval solution. Endogenous peroxidase activity was blocked by incubation in 0.3% H₂O₂ in methanol for 30 min, and the slides were placed in blocking solution (10% goat serum in PBS/Tween 20) for 30 min at room temperature. After blocking, the sections were incubated with anti-phospho-MEK1/2 (1:100) antibody overnight at 4°C. Bound antibody was detected with biotin-conjugated anti-rabbit IgG secondary antibody at 1:200 dilution (Jackson ImmunoResearch Laboratories). After addition of the avidin and biotinylated HRP complex (ABC reagent; Vector Laboratories), the enzyme complex was visualized with 3,3'-diaminobenzidine tetrachloride. The slides were read blinded by two readers and only epithelial cells were scored. The staining intensity (high vs medium vs low vs none) was scored as well as the percentage of maximally stained tumor epithelial cells in each tissue microarray core. Nuclear staining was intense (2+ and 3+) in almost all cases. Nuclear staining was called "positive" if at least 5% of tumor cells stained at least 2+ in the nucleus. Each core was recorded separately.

Cell Culture and Retroviral Infections

The intestinal epithelial cell line IEC-6 and the human colon adenocarcinoma cell lines HCT116, SW480 and COLO 205 were cultured as previously described [278]. HIEC were kindly provided by J.F. Beaulieu (Université de Sherbrooke) and used as

described [539]. IEC-6 cells were synchronized in G0/G1 by starvation of serum for 30 h.

The cells were stably infected with retroviral vectors as previously described [493]. Transduced cells were selected for 3 days with 4 µg/ml puromycin and polyclonal populations of puromycin-resistant clones were used for all experiments. IEC-6 cell populations expressing H-Ras^{V12} and Sef constructs were obtained by infection with pBabe-HA-H-Ras^{V12} followed by selection with puromycin and subsequent infection with pBabe-HA-Sef.

Reagents, Antibodies and Plasmid Constructs

The MEK1/2 inhibitor U0126 and LMB were obtained from LC Laboratories. Commercial antibodies were from the following sources: MEK1/2 and ERK1/2 from Upstate Biotechnology; phospho-MEK1/2 and phospho-ERK1/2 from Cell Signaling Technology; HA, cyclin D1, cyclin E1, p27, p21, α-tubulin and GAPDH from Santa-Cruz Biotechnology; Sef from R&D Systems.

The human HA-tagged MEK1 cDNA was used as template for *in vitro* mutagenesis to generate the various MEK1 mutant constructs [90]. MEK1ΔNES was obtained by alanine substitution of two leucine residues in the NES of MEK1 (QKKLEEELD). MyrMEK1 was generated by addition of the avian sarcoma virus Src myristoylation signal (MGSSKSK) to the N-terminus of MEK1. Other MEK1 mutants have been previously described [90]. All HA-MEK1 constructs were subcloned into pBabe-puro vector for retroviral infections. Human H-Ras^{V12} plasmid was obtained from G. Ferbeyre (Université de Montréal). pBabe-HA-H-Ras^{V12} was generated by subcloning HA-tagged H-Ras^{V12} into pBabe-puro. Human Sef plasmid (hSef-a isoform) was kindly provided by Z. Chang (Tsinghua University, China) and subcloned into pBabe-puro.

Immunoblot Analysis and Immunofluorescence

Cell lysis and immunoblot analysis were performed as described previously [494].

For immunofluorescence staining, cells were processed as described [496]. Images were collected on a Zeiss LSM 510 laser-scanning confocal microscope. For quantification of phospho-MEK1/2 localization, cells were examined on a Leica DM IRB inverted microscope. At least 100 cells from 15 different fields were scored for each condition. The cellular localization was assigned to three categories: uniform distribution between the cytoplasm and nucleus (C+N), stronger and predominant staining in the nucleus (N), or stronger and predominant staining in the cytoplasm (C).

Real-Time Quantitative PCR

Total RNA was extracted from IEC-6 cells using the RNeasy Mini Kit (Qiagen) and reverse transcribed using the High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit with random primers (Applied Biosystems). Gene expression level was determined using TaqMan Gene Expression Assays primer and probe sets (Applied Biosystems). Analysis of PCR product amplification was performed on the ABI PRISM 7900HT Sequence Detection System (Applied Biosystems). All reactions were runned in triplicate and the average values were used for quantification. The rat hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase (HPRT) and 18S ribosomal RNA were used as endogenous controls. The relative level of target gene expression was quantified by using the $\Delta\Delta CT$ method.

Cell Proliferation, Transformation and Anoikis Assays

Proliferation rate was measured by the colorimetric MTT assay. Anchorage-independent proliferation was evaluated by culturing cells in soft agar medium. Detachment-induced apoptosis was monitored in tissue culture plates coated with Poly-HEMA (Sigma). The methodology for these assays has been described previously [278].

Cell Cycle Analysis and Cell Sorting

For cell cycle analysis, exponentially proliferating cells were pulsed with 10 μM BrdU for 2 h. The cells were scraped in PBS, fixed in cold 70% ethanol, and kept at $-20^{\circ}C$ until flow cytometry analysis. For staining, the cells were washed with blocking buffer

(0.5% bovine serum albumin in PBS), and DNA was denatured with 2 N HCl in PBS. The cells were washed again and incubated for 2 min in 0.1 M sodium borate (pH 8.5) to neutralize remaining HCl. After washing with dilution buffer (blocking buffer with 0.5% Tween 20), the cells were incubated with anti-BrdU antibody (2.5 mg/ml) for 15 min, followed by incubation with Alexa Fluor 350–conjugated anti-mouse IgG for 15 min. The cells were then washed with PBS and incubated on ice for 30 min in PI buffer (0.1% sodium citrate, 50 mg/ml PI, and 0.2 mg/ml RNase) in the dark. Fluorescence was recorded on a BD LSR II cytometer and the cell cycle distribution was determined using the FACSDiva software.

For cell sorting, IEC-6 cells were stained with 7.5 µg/ml of Hoescht 33342 for 30 min at 37°C, and then diploid (2N) and hyperploid (>4N) cells were sorted according to DNA content using the BD FACSAria flow cytometer.

Mouse Tumorigenesis Studies

All animals were housed under pathogen-free conditions, and experiments were performed in accordance with CCAC guidelines and with Université de Montréal Institutional Animal Care and Use Committee approval. Six-week-old female Balb/c athymic mice were injected subcutaneously with 3×10^4 IEC-6 cells suspended in 200 µl PBS. Tumor volume was monitored every 2 days and mice were euthanized when the tumor reached a volume larger than 1 cc³.

Cytogenetic Studies

Metaphase preparation and cytogenetic analysis with Giemsa-stained and trypsin-Giemsa banding techniques were performed according to standard cytogenetic procedures. For spectral karyotyping, slide pretreatment, hybridization with the SkyPaint™ probe mixture for rat chromosomes and detection were performed according to the supplier (Applied Spectral Imaging (ASI)) instructions with minor modifications. Spectral images were acquired with a SpectraCube® system (ASI) mounted on a Zeiss Axioplan II

microscope and analyzed using the SkyView version 1.6.1 software (ASI). A total of 27 and 29 metaphases were analyzed by spectral karyotyping for the IEC-6-MEK1 and IEC-6-MEK1 Δ NES cell lines. Clonal chromosomal abnormalities in rat cells are reported according to the recommendations of the International System for Human Cytogenetic Nomenclature 2005 [540] and to the Rat Genome and Nomenclature Committee [541].

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank G. Ferbeyre for reagent, Kim Lévesque for expert animal care and experimentation, Julie Hinsinger for immunohistochemistry, Danièle Gagné for FACS analyses and sorting, Raphaële Lambert for qPCR analysis, Sylvie Lavallée and Claude Rondeau for cytogenetic studies and spectral karyotyping. We also thank Marc Therrien for critical comments.

FUNDING

This work was supported by a grant from the Cancer Research Society to SM. SD is recipient of studentships from the Cole Foundation and the Canadian Institutes for Health Research. SM holds the Canada Research Chair in Cellular Signaling. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

COMPETING INTERESTS

The authors declare that no competing interests exist.

Chapitre 6:

L'implication de la voie Ras-ERK1/2 dans la tétraploïdie et l'instabilité chromosomique

6.1 Mise en situation et objectif

Lors du projet présenté précédemment, nous avons démontré, pour la première fois, que l'expression de Ras oncogénique ou l'activation soutenue de la signalisation de ERK1/2 par des mutants de MEK1, engendre de l'instabilité chromosomique et de la tétraploïdie. L'objectif du quatrième article est donc la caractérisation des mécanismes responsables de ces anomalies.

6.2 Contribution des auteurs

J'ai effectué 100% des expériences et analyses présentées dans cet article. J'ai rédigé entièrement le texte et conçu toutes les figures de l'article. Le Dr Jonas Dorn du laboratoire du Dr Paul Maddox a créé un logiciel dans MATLAB pour faciliter la compilation de mes analyses et j'ai utilisé le microscope Delta Vision du Dr Maddox.

6.3 Résumé

La progression des cancers colorectaux est associée à une accumulation progressive d'altérations génétiques des gènes suppresseurs de tumeurs et d'oncogènes. L'instabilité génétique la plus commune, dans les cancers du côlon, est l'instabilité chromosomique (CIN). Elle est observée dans 70% des tumeurs colorectales et est associée à un mauvais pronostic. Toutefois, les mécanismes associés à la CIN demeurent inconnus.

Nous avons montré que l'expression de Ras oncogénique, dans des cellules intestinales épithéliales de rat (IEC-6), engendre une altération du cycle cellulaire, de la CIN et de la tétra/aneuploïdie. Les cellules IEC-6-H-Ras^{V12} s'accumulent en cytotinèse et une régression du sillon de clivage, amenant à la binucléation, est observée dans 26% des mitoses. Une localisation aberrante et une surexpression des kinases Aurora A, des CPCs, Aurora B, Survivine et INCENP est également observée. La diminution partielle de l'activation de ERK1/2 des cellules IEC-6-H-Ras^{V12}, par l'utilisation du PD184352 à de faibles doses, est suffisante pour renverser la

localisation erronée et la surexpression de ces régulateurs de la mitose, permettre la correction des anomalies mitotiques et réduire l'aneuploïdie induite par Ras oncogénique.

En conclusion, nous avons démontré, pour la première fois, que la voie des MAP kinases ERK1/2 est impliquée dans la CIN et l'aneuploïdie. Ces informations sont capitales et suggèrent un nouveau rôle de la voie de signalisation Ras/Raf/MEK/ERK1/2 dans le processus de tumorigénèse colorectale.

6.4 Article 4**Activation of the Ras/Raf/MEK/ERK1/2 signaling pathway
leads to tetraploidy and chromosomal instability**

Stéphanie Duhamel,^{1,2} Jonas F. Dorn,¹ Paul S. Maddox,^{1,3} and Sylvain Meloche^{1,2,4,*}

¹Institut de Recherche en Immunologie et Cancérologie, ²Program of Molecular Biology,
³Department of Pathology and Cell Biology, ⁴Department of Pharmacology, Université de
Montréal, Montreal, Quebec, Canada H3C 3J7

*Corresponding author: Dr Sylvain Meloche
Institut de Recherche en Immunologie et Cancérologie
Université de Montréal
2950, chemin de Polytechnique
Montreal (Quebec) Canada H3C 3J7
Tel.: (514) 343-6966

To be submitted to Nature cell biology

SUMMARY

Hyperactivation of the Ras/Raf/MEK/ERK1/2 signaling pathway is a common event in human cancer and activating mutations in *RAS* genes are found in ~ 30-50% of colorectal cancer. Aneuploidy and chromosomal instability (CIN) are observed in the majority of colorectal cancers and are associated with a poorer prognosis. However, the molecular basis of CIN is not well understood. Here we report that hyperactivation of ERK1/2, by oncogenic Ras or sustained nuclear MEK-ERK1/2 signaling, induces mitotic defects that lead to tetraploidy, aneuploidy and CIN. We also found that dysregulation of Ras-ERK1/2 signaling alters expression and localization of Aurora A and the Chromosomal passenger complex proteins. Our results suggest that sustained ERK1/2 signaling may contribute to the initiation and progression of colorectal cancer by rapidly inducing aneuploidy and CIN.

INTRODUCTION

Dysregulation of the Ras/Raf/MEK/ERK1/2 pathway is a common event in human cancer and activating mutations in *RAS* genes are found in ~ 30% of tumor specimens and in 50% of intermediate colon adenomas [1, 542]. The vast majority of colorectal cancers display genomic instability either in the chromosomal instability (CIN; exclusively aneuploid) or microsatellite instability (MIN/MSI; mostly near diploid) form [543]. Aneuploidy is often associated with the malignant potential of tumors and poor prognosis [544]. The molecular basis of this CIN is not well understood but it has been proposed that it occurs very early during the tumorigenic process [545].

We previously reported that activated MEK1/2 kinases, which are exclusively localized to the cytoplasm in normal cells, are mislocalized to the nucleus in 79% of colorectal tumors. Interestingly, expression of oncogenic Ras (H-Ras^{V12}) was shown to induce nuclear accumulation of activated MEK1/2 and ERK1/2 in intestinal epithelial cells. We also showed that sustained MEK-ERK1/2 nuclear signaling leads to enhanced proliferation and tumorigenesis, associated with CIN and tetraploidy [546].

Tetraploidy has been proposed as an intermediate step toward aneuploidy in human cancer. Several mechanisms have been described to promote the genesis of tetraploid cells. i) Endoreplication of DNA without cell division, ii) a failure to complete mitosis (mitotic slippage), when cell escape spindle assembly checkpoint (SAC) and exit from mitosis without undergoing anaphase, thereby producing a tetraploid cell with a single nucleus and two centrosomes, iii) a failure to complete cytokinesis, due to defects in cleavage-furrow formation, vi) cell fusion (reviewed in [538]) and v) entosis, which is characterized by the internalisation of one cell into another [547].

Cytokinesis is a complex process requiring the coordinated actions of the cytoskeleton, plasma membrane, organelles and a plethora of regulators. Defective expression, localization or function of a large number of proteins can lead to cytokinesis

failure [548]. The Aurora kinase A and the chromosomal passenger proteins complex (CPC), which includes the enzymatic subunit Aurora B, the scaffold INCENP and the targeting subunits Survivin and Borealin, have emerged as crucial regulators of mitosis and cytokinesis [549-551]. Aurora A is involved in centrosome duplication, separation and maturation [552], progression through mitosis [553-555], kinetochore/chromatin associated microtubule assembly [556], successful cytokinesis [557] and genomic integrity [552, 558]. The Aurora A gene is frequently amplified in human malignancies including colorectal, breast, pancreatic and bladder cancers [552, 559-561]. Studies have shown that Aurora A and B are overexpressed in a multitude of tumors and cancer cell lines, independently of gene amplification [552, 562]. The expression of Aurora A and the CPC proteins is tightly regulated during cell cycle progression to ensure that the kinases perform their different functions accurately [563]. Notably, deregulated expression of Aurora A and B has been shown to impair mitosis execution and cytokinesis, and to lead to polypoidy [564-566].

Here we report that sustained activation of ERK1/2 signaling, by expression of oncogenic Ras or nuclear MEK1 mutant in IEC-6 cells, alters the cytokinesis and induces tetraploidy by furrow regression. The hyperactivation of ERK1/2 signaling also leads to overexpression and mislocalization of Aurora A and the CPC. Interestingly, partial inhibition of Aurora A by shRNA or by partial inhibition of ERK1/2 activation by the MEK1/2 inhibitor PD184352, is sufficient to reduce the mitotic defects and decrease the aneuploidy induced by activated Ras.

RESULTS

Sustained ERK1/2 signaling induces mitotic aberrations

We have previously reported that oncogenic Ras (H-Ras^{V12}) or sustained nuclear MEK-ERK1/2 (MEK1 Δ NES) signaling induces tetraploidy [546]. Tetraploid cells can be

generated by endoreplication during S phase, an abortive cell cycle or cytokinesis failure [567]. To investigate the mechanism, we stained proliferating IEC-6 cells, expressing H-Ras^{V12} or MEK1ΔNES (Figure 6.S1a), with anti-phospho-histone H3, which marks mitotic cells. Immunofluorescence analysis revealed an increased proportion of IEC-6-MEK1ΔNES and IEC-6-H-Ras^{V12} cells in mitosis (Figure 6.1a).

To carefully analyze progression through mitosis, IEC-6 cell populations were transduced with GFP-tagged histone H2B and imaged by time-lapse digital microscopy. Mitotic events were timed to score defects in chromosome movements, anaphase progression and cytokinesis with sub-cellular resolution. Interestingly, significant fractions of IEC-6-MEK1ΔNES and IEC-6-H-Ras^{V12} became binucleated (24.2% and 26.1% versus none in control cells) (Figure 6.S1b and 6.S1c). Cytokinetic furrow initiation and ingression occurred with normal kinetics, but we observed several regression/ingression cycles (in 57.3% and 65.2% versus 2.2% in control cells) (Figure 6.S1c) suggesting that binucleation arose from defects in cytokinesis [568]. In support of this idea, IEC-6-MEK1ΔNES and IEC-6-H-Ras^{V12} cells often exhibited long cytoplasmic bridges that persisted more than 8 times longer than those seen in control cells (154 min and 174 min versus 18 min) (Figure 6.1b-d; videos 1, 2 and 3). Therefore, we hypothesize that cytokinesis failure, via the tetraploid intermediate, is the major pathway to chromosomal instability (CIN) following ERK1/2 hyperactivation.

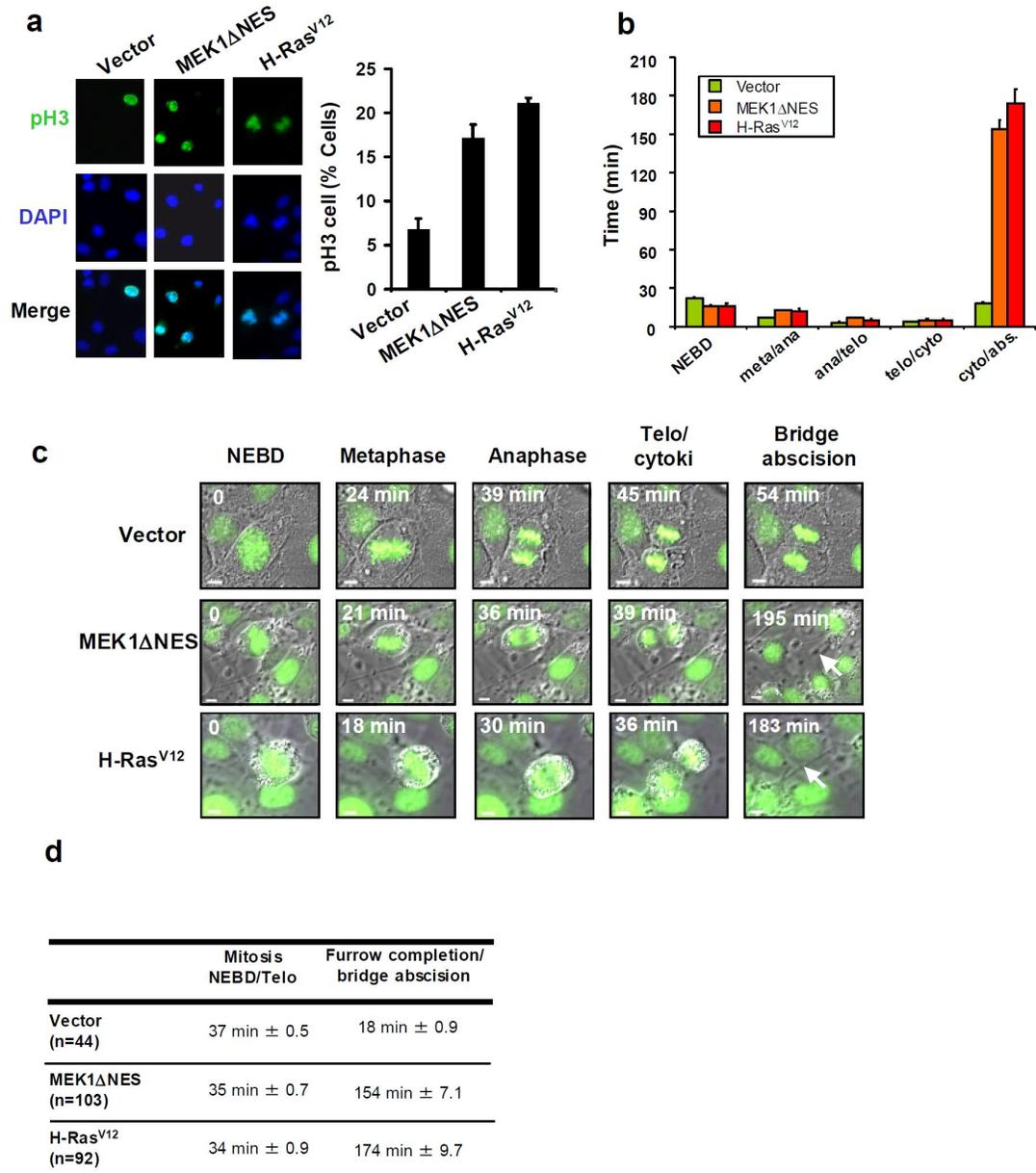


Figure 6.1. Sustained ERK1/2 signaling induces cytokinesis defects. (A) Immunofluorescence staining of phospho-histone H3 (pH3) in IEC-6 cells infected with Empty vector, MEK1ΔNES or H-Ras^{V12}. Magnification 100X. Scale bar, 20 μm. Quantification of pH3 is graphed as mean ± SEM (n=3). (B) Average duration of each step

of mitosis. Mean \pm SEM of 44 vector- , 103 MEK1 Δ NES- and 92 H-Ras^{V12}-expressing cells, two weeks post-infection. (C) Time-lapse video imaging of mitotic progression in IEC-6 cell populations expressing GFP-tagged histone H2B. Scale bar, 5 μ m. Arrow, intercellular bridge. (D) Average duration of mitosis and abscission.

In agreement with that hypothesis, careful analysis the cells at different times post-infection with oncogenic Ras by live cell imaging, revealed that two to three days post-infection, 5.9% of the infected cells are already binucleated. Then, three to four day post-infection, tripolar division occurs, but only in binucleated cells. CIN is also rapidly induced and two weeks after H-Ras^{V12} infection, several cells harboured micronuclei (5.2%). This number continues to increase, yielding 10.3% after one month and 19.8% after three months (Figure 6.S1d). These results demonstrate that tetraploidy and CIN can be rapidly induced upon hyperactivation of the Ras-ERK1/2 signaling pathway. In addition, these observations are in agreement with the idea that tetraploidy is a genetically unstable state that can serve as an intermediate on the path to aneuploidy [538].

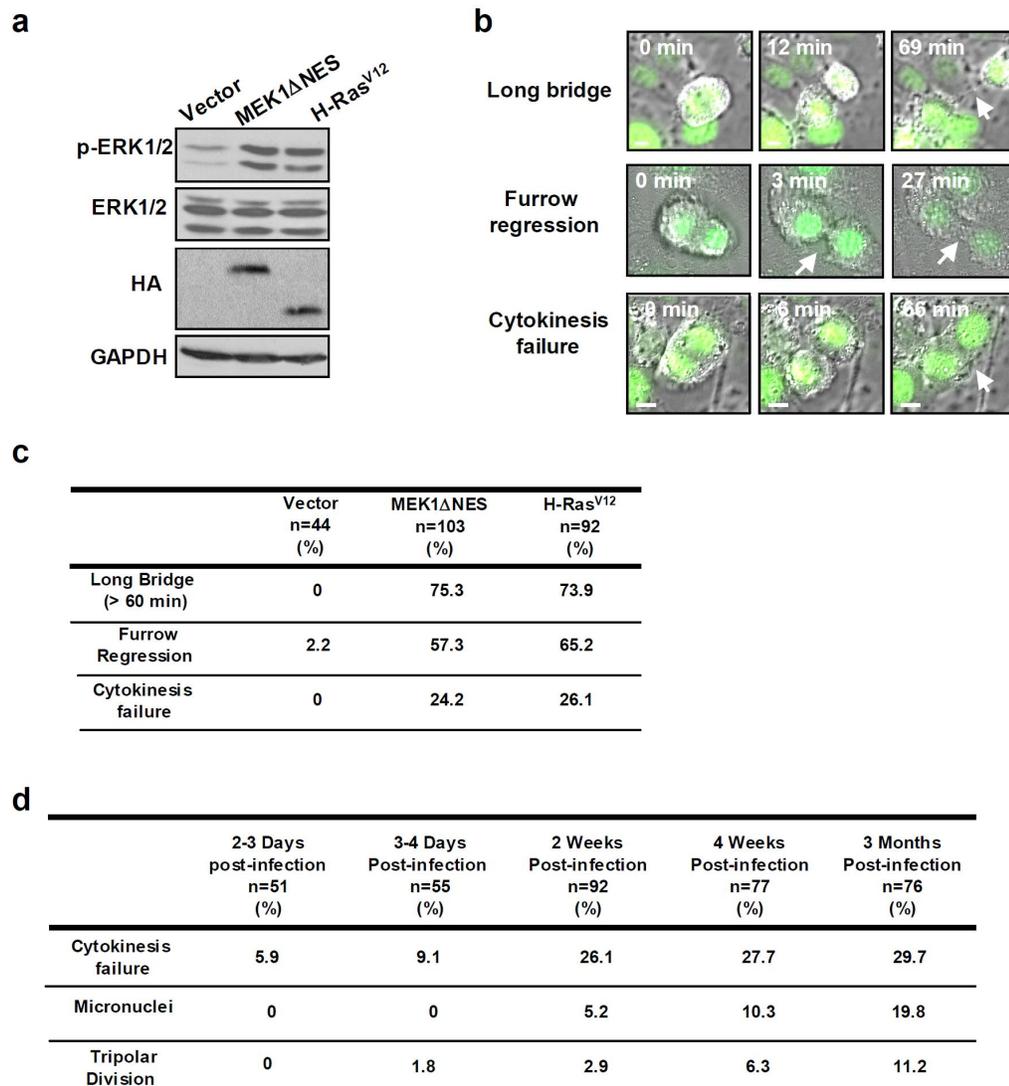


Figure 6.S1. Sustained ERK1/2 signaling dysregulates mitotic regulators and induces mitotic aberrations. (A) Immunoblot analysis of phospho-ERK1/2 expression in proliferating IEC-6 cells infected with Empty vector, HA-tagged MEK1 Δ NES or HA-tagged H-Ras^{V12}. (n=3). (B) Representative examples of abnormal mitoses in IEC-6 cells infected for two weeks MEK1 Δ NES or H-Ras^{V12}. (C) Quantification of cell division defects IEC-6 cells infected for two weeks with empty vector, MEK1 Δ NES or H-Ras^{V12}. (D) Quantification of cell division defects in IEC-6 cells at different times post-infection with

H-Ras^{V12}. Mean \pm SEM of 51 for 2-3 days, 55 for 3-4 days, 92 for 14 days, 77 for 4 weeks and 76 for 3 months post-infection.

Aurora A overexpression leads to cytokinesis defects

We next monitored the expression of key mitosis regulators during asynchronous cell cycle. As shown in Figure 6.2a, expression of Aurora A, Aurora B, INCENP and Survivin are up-regulated in H-Ras^{V12}-expressing cells compared to empty vector-expressing cells. Human colon carcinoma cell lines displaying activating mutations in *KRAS* (HCT116 and SW480) or *BRAF* (COLO 205 and HT29) genes also show an increased expression of these proteins in comparison to normal human intestinal epithelial cells (HIEC) (Figure 6.S2a). Relocalization of the CPCs from the chromosome arms in prophase, to the centromeres in prometaphase and to the midbody in telophase, is essential to proper function of the contractile ring and final abscission [569]. Remarkably, we observed that the CPCs are mislocalized in cytokinetic cells expressing H-Ras^{V12}. In addition to the normal midbody localization, a strong nuclear staining of Aurora B, INCENP and Survivin is observed in these cells (Figure 6.S2b). CPCs must be degraded at the end of telophase for cells to exist mitosis normally [570]. As the CPCs are still expressed at the midbody, we propose that when the required amount of CPCs is present at the midbody, the rest of the overexpressed proteins simply stay at the centomeres and on the chromosomes' arms.

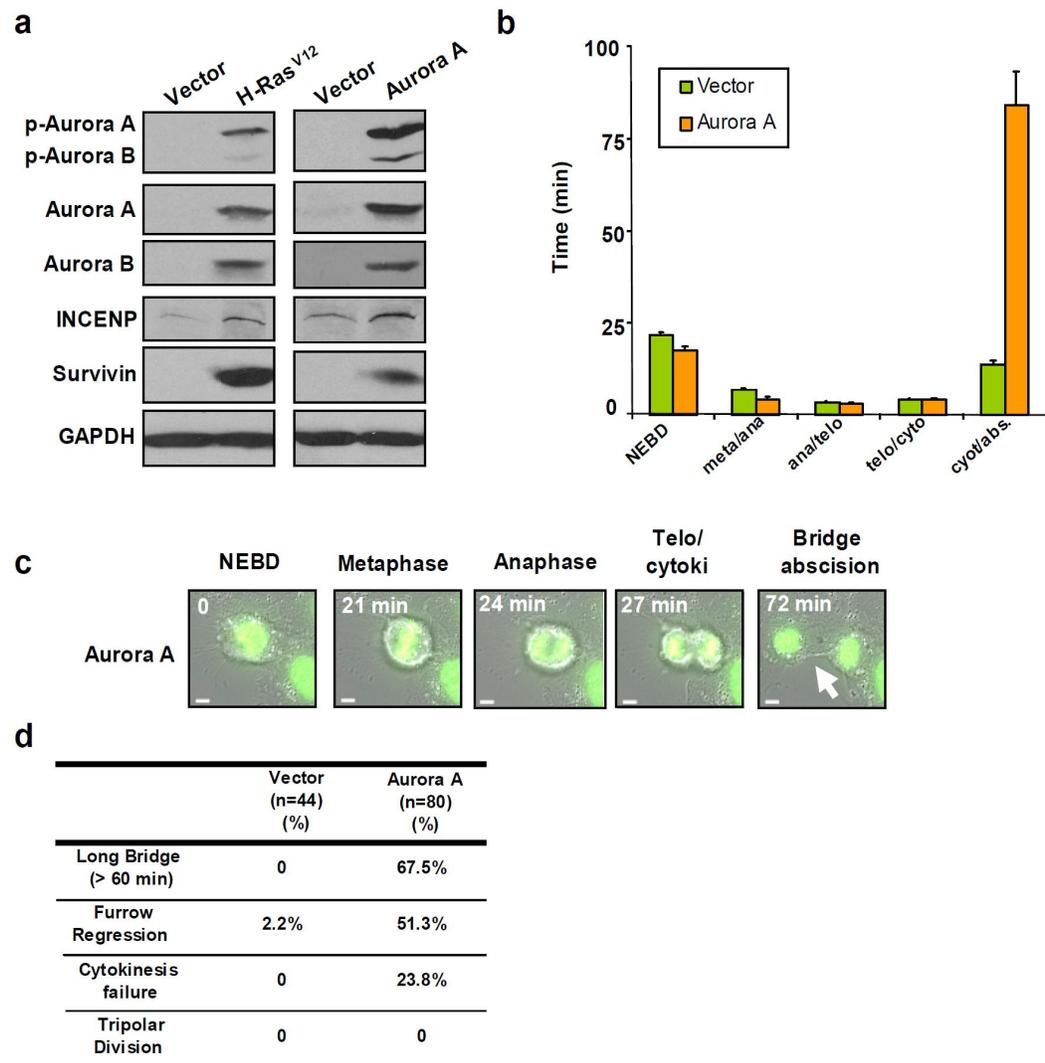


Figure 6.2. Overexpression of Aurora A induces cytokinesis defects. (A) Immunoblot analysis of mitotic regulators expression in proliferating IEC-6 cells infected with empty vector, H-Ras^{V12} and Aurora A. (n=4). (B) Average duration of each step of mitosis. Mean \pm SEM of 44 vector- and 80 Aurora A-expressing cells. (C) Time-lapse video imaging of mitotic progression in IEC-6 cell populations overexpressing Aurora A and GFP-tagged histone H2B. Scale bar, 5 μ m. Arrow, intercellular bridge. (D) Quantification of cell division defects in IEC-6-Aurora A cells.

We also noticed a nuclear accumulation of Aurora A in all the H-Ras^{V12}-expressing cells, from the interphase to the end of cytokinesis (Figure 6.S2c). Aurora A protein normally localizes on duplicated centrosomes in late S phase, and during early mitosis Aurora A remains associated with the centrosome and to both spindle poles and spindle microtubules until early G1 [571, 572]. At this cell stage, Aurora A is targeted by the APC/C and degraded by the proteasome in a Cdh1-dependent manner [573, 574]. Several cancers such as colorectal, pancreatic, bladder, ovarian, breast and squamous cells carcinoma display aberrant nuclear staining of Aurora A [575-578]. The overexpression of the protein could possibly explain this aberrant localization. In agreement with that, overexpression of Aurora A-GFP in HeLa cells was found to localize not only at the centrosome, but also in the cytoplasm and nucleus [579].

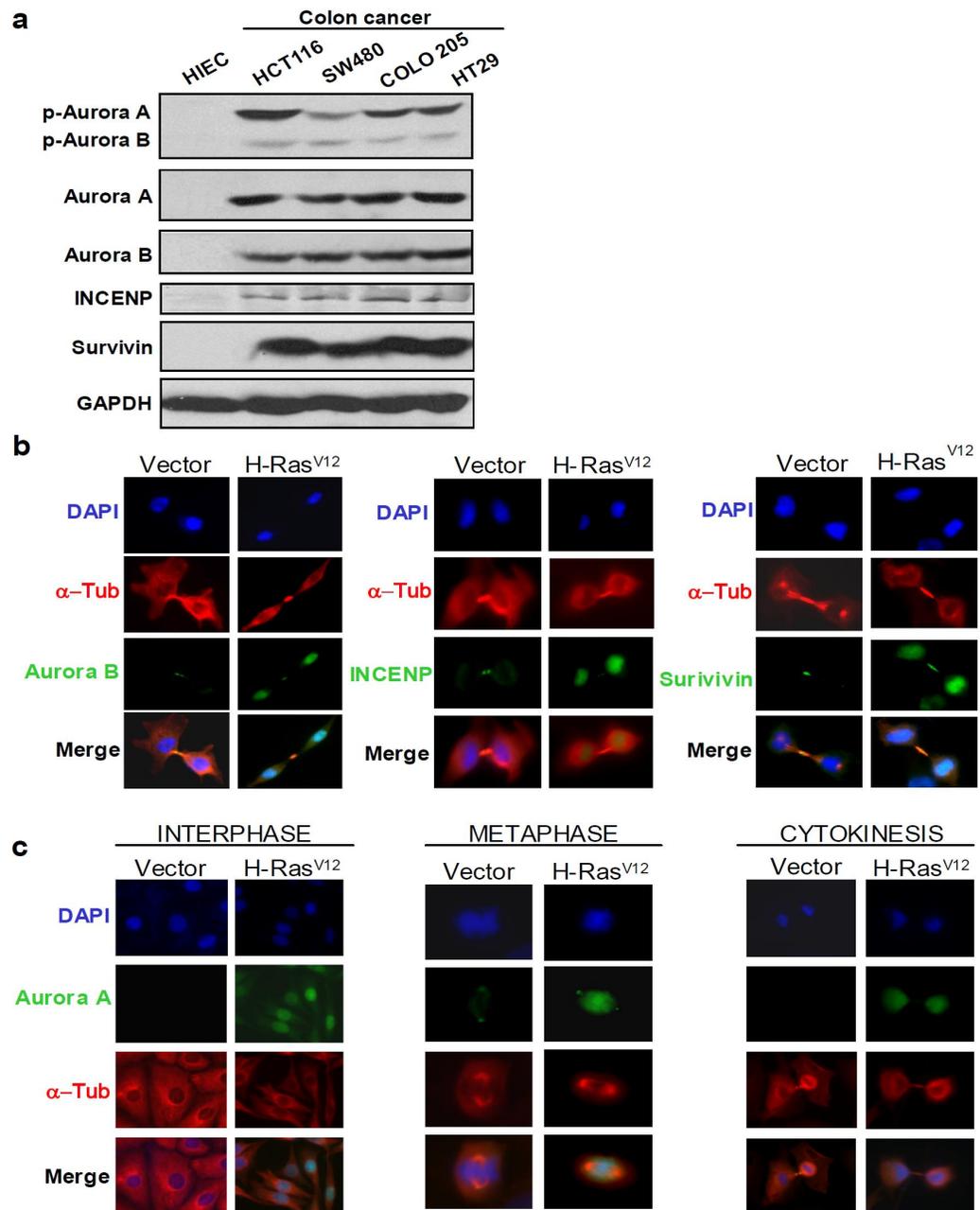


Figure 6.S2. Hyperactivation of ERK1/2 signaling dysregulates CPCs and Aurora A localization. (A) Immunoblot analysis of mitotic regulators expression in proliferating HIEC and colon cancer cells (n=4). (B) Immunofluorescence staining of Aurora B, INCENP and Survivin in IEC-6-H-Ras^{V12} cells. Magnification 100X. Scale bar, 20 μ m.

(n=3). (C) Immunofluorescence staining of Aurora A in IEC-6-H-Ras^{V12} cells. Magnification 100X. Scale bar, 20 μ m. (n=3).

Next we sought to investigate more specifically the role of Aurora A overexpression in our defective mitosis phenotype. Notably, a moderate overexpression of Aurora A in IEC-6 increases CPCs expression (Figure 6.2a) and induced mitotic aberration similar to H-Ras^{V12}. Cytokinesis of more than one hour with long intercellular bridge is observed in 67.5% of the IEC-6-Aurora A cells, as well as furrow regression (51.3%) and binucleation (23.8 %) (Figure 6.2b-d; video 4). These data suggest that Aurora A could be involved in the cytokinetic defect induced by oncogenic Ras.

Partial knockdown of Aurora A reduces the mitotic defect in H-Ras^{V12} expressing cells

To further evaluate the contribution of Aurora A, we expressed short-hairpin (sh) RNAs specifically targeting the Aurora A gene in IEC-6-H-Ras^{V12} cells using VSV-pseudotyped lentiviral vectors. We tested the effect of 3 distinct shRNAs for Aurora A (sh40, sh39 and sh41), and a non-silencing inactive shRNA (shNon-Target) was used as negative control in these experiments. We tried to downregulate the expression of Aurora A to levels similar to normal IEC-6 cells, because total inhibition of the kinase leads to abnormal spindle formation, mitotic catastrophe and multinucleation ([580] and our observations). As shown in Figure 6.3a, the partial knockdown of Aurora A by sh39 and sh 41, in IEC-6-H-Ras^{V12} cells reduced the expression of Aurora B, INCENP and Survivin to level similar to that of control IEC-6-Vector cells. Remarkably, live cell imaging reveals that partial knockdown of Aurora A not only reduces the cytokinesis length and the presence of intercellular bridges (Figure 6.3b-d; video 5), but also the mitotic abnormalities such as defective furrowing (Figure 6.3c-d) and binucleation (24.2% shNon-target, versus 5.3% sh39 and 5.9% sh41). Interestingly, adequate localization of Aurora B (as well as INCENP and Survivin, not shown) was restored upon partial knockdown of Aurora A and all the cytokinetic cells show an exclusive midbody staining of the CPCs (Figure 6.S3). The

restoration of proper localization is probably due to the reduction of expression level as we proposed.

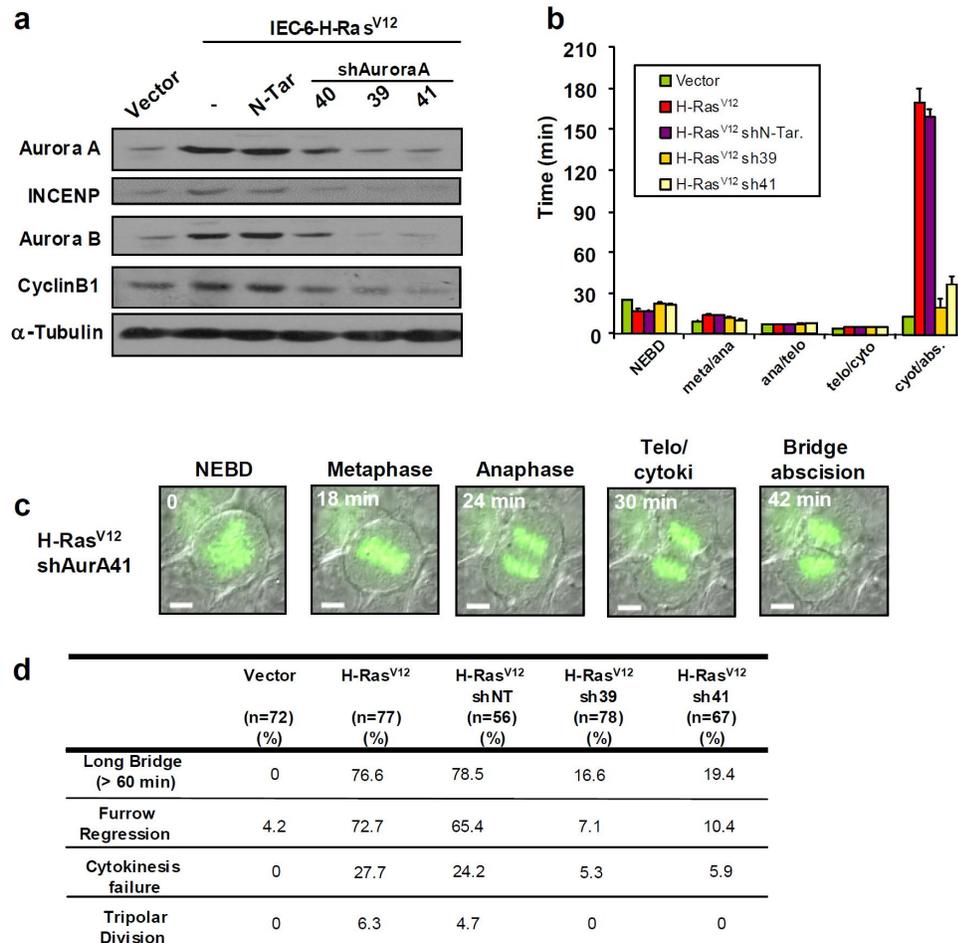


Figure 6.3. Aurora A partial knockdown reduces mitotic defects in IEC-6 cells expressing oncogenic Ras. (A) Immunoblot analysis of the mitotic regulators expression in proliferating IEC-6-H-Ras^{V12} cells infected with Non-Targeted shRNA and Aurora A shRNA (sh 40, sh39 and sh41) (n=3). (B) Average duration of each step of mitosis. Mean \pm SEM of n=72 for vector, n=77 for H-Ras^{V12}, n=56 for H-Ras^{V12} sh Non-Target, n=78 for H-Ras^{V12} sh39 and n=67 for H-Ras^{V12} sh41. (C) Time-lapse video imaging of a representative mitotic progression of IEC-6-H-Ras^{V12} populations expressing GFP-tagged

histone H2B infected with Aurora A targeting sh41. Scale bar, 5 μm . Arrow, intercellular bridge. (D) Quantification of cell division defects in IEC-6-H-Ras^{V12} shRNAs-infected cells.

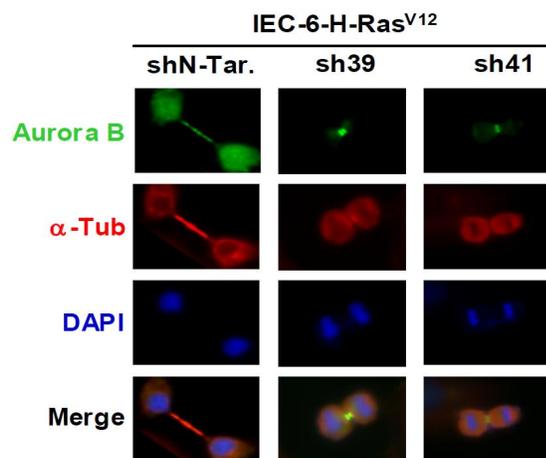


Figure 6.S3. Aurora A partial knockdown restores CPCs localization in IEC-6 cells expressing oncogenic Ras. Immunofluorescence staining of Aurora B in IEC-6-H-Ras^{V12} cells infected by non-silencing inactive shRNA or Aurora A shRNA (sh39 and sh41). Magnification 100X. Scale bar, 20 μm . (n=3).

Partial inhibition of ERK1/2 activity in H-Ras^{V12} expressing cells reduces mitotic aberration and diminishes aneuploidy

Since ERK1/2 hyperactivation increases the level of Aurora A, we next sought to treat IEC-6-H-Ras^{V12} with a low dose (1 μM) of the MEK1/2 inhibitor, PD184352, to partially reduce ERK1/2 activation. As shown in figure 6.4a, reduction of ERK1/2 phosphorylation to a level similar to non-transformed cells (IEC-6-Vector), reduces Aurora A overexpression. Interestingly, immunofluorescence of Aurora A revealed that the partial inhibition of ERK1/2 activation in IEC-6-H-Ras^{V12} cells restores the proper localization of the kinase. Instead of a strong nuclear Aurora A staining, a centrosomal staining is observed

in the mitotic cells. Proper localization of the CPCs Aurora B and Survivin is also reforced (not shown).

Live cell imaging of IEC-6-H-Ras^{V12} cells treated with PD184352 revealed that partial inhibition of ERK1/2 phosphorylation reduces the length of cytokinesis. Only 6.6% of the IEC-6-H-Ras^{V12} PD184352 treated cells had a cytokinesis of more than one hour, versus 76.6% of the IEC-6-H-Ras^{V12} DMSO control cells. The furrow regression is also reduced (13.4% versus 72.2%), as well as the binucleation (3.3% versus 27.7%), and multipolar divisions are completely abolished (Figure 6.4b-c).

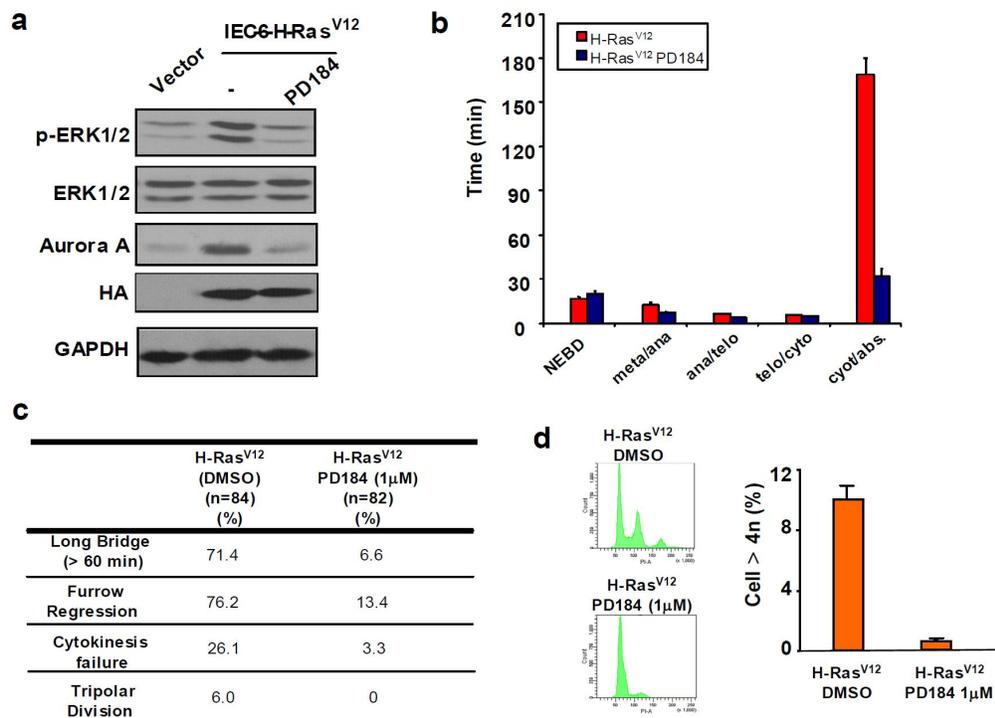


Figure 6.4. Partial reduction of ERK1/2 phosphorylation reduces mitotic defects and aneuploidy in IEC-6 cells expressing oncogenic Ras. (A) Immunoblot analysis of phospho-ERK1/2 and Aurora A in proliferating IEC-6-H-Ras^{V12} cells treated with

PD184352 (1 μ M) (n=4). (B) Average duration of each step of mitosis. Mean \pm SEM of n=84 for H-Ras^{V12} DMSO control, n=82 for H-Ras^{V12} treated with PD184352 (1 μ M). (C) Quantification of cell division defects in IEC-6-H-Ras^{V12} treated with PD184352 (1 μ M). (D) Proportion of cells with >4N DNA content 7 days after infection of IEC-6 cells with H-Ras^{V12} treated with PD184352 1 μ M or DMSO (n=3).

Since the partial inhibition of ERK1/2 activity can reduce mitotic defects, we wondered if long-term reduction of ERK1/2 hyperactivation can diminish aneuploidy. Following infection with H-Ras^{V12}, we treated or not, the IEC-6 cells with a low dose of PD184352 (1 μ M) for one week. Remarkably, FACS analysis of BrdU incorporation reveals that aneu/tetraploidy is observed in 0.9% of IEC-6-H-Ras^{V12} PD184353 treated cells versus 10.9% in IEC-6-H-Ras^{V12} (Figure 6.4d). Thus, partial reduction of ERK1/2 signaling is sufficient to reverse the mitotic aberrations that lead to CIN, tetraploidy and aneuploidy induced by oncogenic Ras.

DISCUSSION

We report for the first time that hyperactivation of ERK1/2 signaling by oncogenic Ras or sustained nuclear MEK-ERK1/2 signaling induces mitotic defects that lead to tetraploidy, aneuploidy and CIN. Genetic instability is a catalyst and defining characteristic of colorectal cancer [477]. The most prevalent form of genetic instability is CIN, which is observed in 70% of colorectal cancers and is associated with a poorer prognosis [581]. It has been proposed that tetraploidy is a genetically unstable state that can serve as an intermediate on the path to aneuploidy, CIN, and ultimately cancer [538]. Interestingly, we found that expression of H-Ras^{V12} or sustained nuclear-MEK1 signaling induces cytokinetic defects that lead to furrow regression and binucleation. Live cell imaging revealed that these aberrations appear very early in the transformation process. Following oncogenic Ras expression, the first and only mitotic defect observed in IEC-6-H-Ras^{V12} is

binucleation generated by furrow regression. Then, tripolar division, which induces aneuploidy, occurs (but only in tetraploid cells). After several days of infection with oncogenic Ras, other defects such as lagging chromosome, DNA bridge and micronuclei formation leading to CIN are observed and increase after each division (Figure 6.S1d).

Aurora A overexpression has been associated with CIN in colorectal cancer [582] and with a poor prognosis [583]. Here we report a marked increase in the expression and an aberrant nuclear localization of Aurora A in IEC-6-H-Ras^{V12} cells (Figure 6.S2b) and in colorectal cancer cell lines. Overexpression of Aurora A has been reported to induce tetraploidization *in vitro* [557] and *in vivo* [584], although the detailed mechanism remains unclear. We found that oncogenic Ras or Aurora A overexpression dysregulates CPC expression and localization in IEC-6 cells. Interestingly, nuclear accumulation of the CPCs has been associated with malignancy. Higher nuclear expression of INCENP is positively correlated with the grade of B-cell lymphomas [585]. Similarly, high expression of Survivin and Aurora-B in nuclear fraction of head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC), cell lines and tissues were associated with higher malignant behaviors [586].

We also showed that ectopic expression of Aurora A in IEC-6 is sufficient to induce mitotic defect such as furrow regression, long intercellular bridges and cytokinesis impairment (which are also observed in IEC-6-H-Ras^{V12} cells (Figure 6.2)). Reciprocally, Aurora A partial knockdown by shRNA significantly reduces these mitosis defects (Figure 6.3) and corrects the mislocalization of CPC induced by oncogenic Ras (Figure 6.S2a), suggesting that Aurora A contributes to this phenotype.

Finally, the reduction of ERK1/2 hyperphosphorylation by a low dose of the MEK1/2 inhibitor was also found to reduce mitotic aberrations (Figure 6.4) and to correct Aurora A nuclear mislocalization (not shown). In addition, the partial inhibition of ERK1/2 was shown to reduce aneuploidy induced by oncogenic Ras (Figure 6.4d). The implication

of the MEK/ERK1/2 signaling pathway in mitosis has always been controversial. The finding that sustained nuclear MEK-ERK1/2 signaling or oncogenic Ras expression impairs cytokinesis execution and yields tetraploid cells was unexpected. Few reports have implicated Ras in mitosis, and it has been proposed that the effects of Ras are mediated through the RalGEF effector pathway and the GTPases RalA and RalB [587]. But to our knowledge, the Raf/MEK/ERK1/2 pathway has never been implicated in cytokinesis, aneuploidy or CIN.

In conclusion, these observations suggest that hyperactivation of the Ras-ERK1/2 signaling pathway, as a result of activating mutations in upstream regulators or overexpression of receptor tyrosine kinases, impact the expression/activity of cytokinesis regulators such as Aurora A and the CPCs. These misregulation result in functional defects and the generation of tetra/aneuploidy and CIN as we observed in this study. Targeted therapy with small molecule MEK1/2 inhibitors may provide clinical benefits in patients with activated *KRAS* tumors or when administered at an earlier stage of the disease to reduce CIN and further progression of the tumor.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Cell Culture and Infections

The rat intestinal epithelial cell line IEC-6 and the human colorectal adenocarcinoma cell lines HCT116, SW480 and COLO 205 were cultured as previously described [278]. Human intestinal epithelial cells (HIEC) were kindly provided by JF Beaulieu (Université de Sherbrooke) and used as described [539].

IEC-6 cells were stably infected with retroviral vectors as previously described [493]. Populations of infected cells were selected for 2 days with 4 µg/ml puromycin. IEC-6 cell populations expressing MEK1 constructs and H2B-GFP were obtained by simultaneous infection with pBabe-MEK1 and pCLNR-H2B, followed by selection with puromycin and G418 (400 µg/ml). The shRNA constructs for Aurora A genes were purchased from Open Biosystems. The lentiviral infections were done as previously described [278].

Reagents, Antibodies and Plasmid Constructs

The MEK1/2 inhibitor PD184352 was obtained from LC Laboratories. Commercial antibodies were from the following sources: ERK1/2 from Upstate Biotechnology; phospho-ERK1/2 and phospho-Histone H3 from Cell Signaling Technology; INCENP, HA, p53, p21, α -tubulin and GAPDH from Santa-Cruz Biotechnology; Aurora A and Aurora B from BD Transduction Laboratories; Survivin from Abcam.

The human HA-tagged MEK1 Δ NES and HA-tagged H-Ras^{V12} constructs were previously described [6]. Briefly, MEK1 Δ NES was obtained by alanine substitution of two leucine residues in the NES of MEK1 (QKKLEELELD). All constructs were subcloned into pBabe-puro vector for retroviral infections. pBabe-puro-Aurora A and pCLNR-Neo-H2B-GFP retroviral construct were purchased from Addgene.

Immunoblot Analysis and Immunofluorescence

Cell lysis and immunoblot analysis were performed as described previously [494]. For immunofluorescence staining, cells were processed as described [496]. Images were collected on a Leica DM IRB inverted microscope.

Cell Cycle Analysis and Cell Sorting

For cell cycle analysis, exponentially proliferating cells were pulsed with 10 μ M BrdU for 2 h. The cells were scraped in PBS, fixed in cold 70% ethanol, and kept at -20°C until flow cytometry analysis. For staining, the cells were washed with blocking buffer (0.5% bovine serum albumin in PBS), and DNA was denatured with 2 N HCl in PBS. The cells were washed again and incubated for 2 min in 0.1 M sodium borate (pH 8.5) to neutralize remaining HCl. After washing with dilution buffer (blocking buffer with 0.5% Tween 20), the cells were incubated with anti-BrdU antibody (2.5 mg/ml) for 15 min, followed by incubation with Alexa Fluor 350–conjugated anti-mouse IgG for 15 min. The cells were then washed with PBS and incubated on ice for 30 min in PI buffer (0.1% sodium citrate, 50 mg/ml PI, and 0.2 mg/ml RNase) in the dark. Fluorescence was recorded on a BD LSR II cytometer and the cell cycle distribution was determined using the FACSDiva software.

Live Cell Imaging

IEC-6 cell populations co-expressing Nuclear-MEK1 or H-Ras^{V12} or Aurora A and H2B-GFP were plated on 3-cm clear plates (Greiner). After 24 h, the cells were washed twice with PBS and cultured in 2 ml of imaging medium (Gibco) supplemented with 5 mM Hepes (pH 7.4). All live images were acquired using an epifluorescence microscope (personalDV, Applied Precision). The cells were imaged using a 60X/1.42 NA plan Apo objective. For every field of cells, a stack 9 z-slice spaced 1.5 μ m was collected every 3 min using a 0.15 sec exposure at 10% neutral density filtering in the fluorescence channel

for 24 h, in addition to a DIC reference image. Image sequences were viewed and annotated as overlays between maximum intensity projections of the z-stacks with the DIC images using SoftWoRx 3.6.2 and custom written MATLAB programs.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Dr Amy Shaub Maddox and Dr Vincent Archambault for helpful discussions. This work was supported by grants from the Cancer Research Society to SM and the National Cancer Institute of Canada to PSM and SM. SD is recipient of studentships from the Cole Foundation and the Canadian Institutes for Health Research. JFD is a fellow of the Swiss National Science Foundation. PSM holds the Canada Research Chair in Cell Division and Chromosomal Organization. SM holds the Canada Research Chair in Cellular Signaling.

Chapitre 7:

L'implication de la signalisation de MEK/ERK1/2 dans l'initiation et la progression du cancer colorectal chez la souris

7.1 Mise en situation et objectif

Le chapitre 7 est un résumé des résultats préliminaires d'une étude en cours. L'objectif de ce projet est la détermination du rôle de la signalisation de MEK/ERK1/2 dans l'initiation, la progression et la maintenance du cancer colorectal *in vivo*. Afin de répondre à ces questions, une souris bitransgénique, exprimant MEK2 constitutivement activé dans l'intestin, de façon inductible, a été générée.

7.2 Contribution des auteurs

J'ai effectué 100% des expériences et analyses présentées dans ce chapitre. J'ai écrit entièrement le texte et conçu toutes les figures.

7.3 Introduction

Nous avons démontré dans les chapitres précédents, que l'hyperactivation de la voie de MEK/ERK1/2 est associée à la tumorigénèse colorectale. L'activation constitutive de MEK1 ou MEK2 est suffisante pour transformer des cellules intestinales épithéliales, déréguler la prolifération et induire la formation d'adénocarcinomes métastatiques de haut grade dans un modèle de transplantation orthotopique du côlon chez la souris (chapitre 4). La suractivation de l'activité de ERK1/2, par l'expression de Ras oncogénique ou de mutants de MEK1, engendre également des altérations du cycle cellulaire, une dérégulation de la mitose, en plus d'induire de l'aneuploïdie et de la CIN (chapitre 5). Plus encore, l'inhibition de l'hyperactivation de ERK1/2, à des niveaux s'approchant de ceux d'une cellule non transformée, corrige les aberrations mitotiques et réduit considérablement l'aneuploïdie induite par RAS activé (chapitre 6).

En dépit de ces évidences impliquant l'activité de MEK/ERK1/2 dans la tumorigénèse colorectale, leurs rôles *in vivo* n'ont pas encore été clairement établis. De plus, les modèles de souris transgéniques exprimant une forme oncogénique de RAS n'ont pas permis d'apporter une réponse claire car les résultats manquent de cohérence. Une étude avait d'abord démontré que l'expression de KRAS oncogénique (K-Ras^{V12}), sous le contrôle du promoteur Villin (ciblant l'intestin et le colon), était suffisante pour induire diverses lésions intestinales, allant de la formation de foyers de cryptes aberrantes (ACF) jusqu'à la formation d'adénocarcinomes invasifs [588]. Toutefois, des études subséquentes ont montré que l'expression de KRAS oncogénique induit une hyperplasie pré-néoplasique diffuse de l'épithélium, mais pas d'adénome du côlon [522, 589]. Puis, plus récemment, l'expression de KRAS activé dans l'intestin a été associée à la formation de ACF dans le côlon proximal. L'addition de traitement avec l'azoxyméthane (AOM), un puissant agent carcinogène, a été nécessaire pour favoriser la progression des ACFs en microadénomes dysplasiques [590]. Nonobstant ces différences, la voie de Ras peut mener à l'activation d'autres voies de signalisation, telles que la voie de PI-3 Kinase ou de RALGDS [2, 3]. La question de la potentielle implication de MEK/ERK1/2 dans la tumorigénèse colorectale *in vivo* demeure donc entière.

7.4 Matériels et méthodes

Génération du transgène

La construction tet-O-PhCMV-HA-MEK2DD a été générée à partir du vecteur tet-O-PhCMV qui a été fourni par N. Labreque [591]. Brièvement, le vecteur d'expression tet-O-PhCMV contient 7 copies de l'opérateur tetO, qui sont fusionnées à la boîte TATA du promoteur du cytomégalovirus (PhCMV). HA-MEK2DD (chapitre 4) a été cloné dans le vecteur tet-O-PhCMV en HindIII-XbaI.

Génération de la souris transgénique HA-MEK2DD

La construction a été linéarisée par digestion avec KpnI, purifiée par élution (QiaexII) et filtrée sur colonne Elutip-D (Schleicher&Schuell). Le transgène purifié a été microinjecté dans des ovules fertilisés, à la plate-forme de transgénèse de l'Institut de recherche en immunologie et cancérologie (IRIC), puis les ovules ont été implantés dans des femelles pseudo-gestantes de fond génétique FVB. Les souris obtenues ont été génotypées par PCR avec les amorces Tet-O 3¹-TGG ATC GGT CCC GGT GTC TTC TAT et Tet-O 5¹-TTT ACC ACT CCC TAT CAG TGA TAG dans les conditions de PCR suivantes; dénaturation 95°C, durant 2 min; hybridation, 57 °C durant 0,5 min; extension, 72 °C durant 0,75 min, pour un total de 35 cycles.

Maintenance et induction des souris transgéniques

Les souris ont été hébergées à l'animalerie de l'IRIC dans des conditions sans pathogène, tel que décrit dans Rousseau et al, 2010 PNAS. Les souris HA-MEK2DD ont été maintenues en fond mixte et ont été croisées ou non, avec la souris Villin-rtTA [592]. L'induction de l'expression de la protéine transgénique HA-MEK2DD s'est effectuée par l'ajout de 500µg/ml de doxycycline dans l'eau de breuvage des souris.

Analyses histologiques

Les différents tissus ont été prélevés et fixés à la formaline 10%, tel que décrit dans Rousseau et *al.* [593].

Marquage immunohistochimique et analyse par immunobuvardage

Tel que décrit au chapitre 5.

7.5 Résultats

7.5.1 Validation de la souris transgénique

La construction permettant de créer la souris transgénique a été produite en clonant le mutant MEK2DD (MEK2S222D/S226D), marqué de l'épitope HA, en aval de l'élément heptamérique *TetO*, fusionné à un promoteur CMV. La transfection du plasmide dans des cellules HEK293T, traitées subséquentement à la doxycycline durant 48 heures, a permis l'expression de la protéine HA-MEK2DD, tel qu'attendu (Figure 7.1).

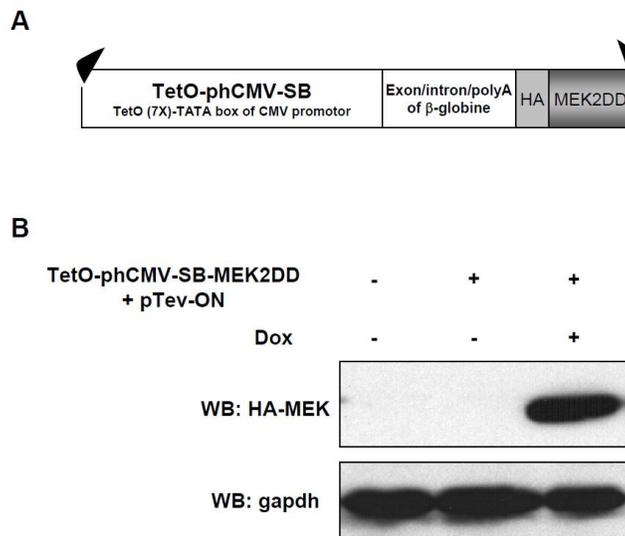


Figure 7.1. Expression de la construction TetO-HA-MEK2DD dans des HEK293T, induit à la doxycycline durant 48 heures.

La construction, validée et séquencée, a ensuite été injectée dans des ovules de souris fertilisés, à l'IRIC. Le génotypage par PCR des 112 souriceaux obtenus à la suite de l'implantation des ovules microinjectés, a démontré que quinze souris possédaient le transgène. De ces quinze clones, trois souriceaux de moins de deux mois ont dû être euthanasiés en raison de lésions hyperplasiques (figure 7.4). Des cohortes d'animaux ont été

générées afin de déterminer quels étaient les meilleurs clones parmi les douze animaux qui possédaient le transgène. Pour ce faire, chaque clone a été croisé, avec la lignée de souris Villin-rtTA, afin qu'une induction par la doxycycline de la protéine transgénique (HA-MEK2DD), soit possible. Les cinétiques de traitements à la doxycycline, sur ces souris HA-MEK2DD/Villin, ont révélé que seulement six des clones étaient habilités à exprimer HA-MEK2DD (clone 718, 721, 745, 725, 786 et 810). De ces six animaux, deux clones (810 et 725) exprimaient HA-MEK2DD à des niveaux satisfaisants et de manière dose-dépendante dans le côlon. Finalement, le clone 725 a été sélectionné pour la génération des cohortes d'expérimentations car son induction était entièrement répressible par le retrait de la doxycycline de l'eau de breuvage (figure 7.2), contrairement au clone 810 qui démontrait toujours une légère expression de HA-MEK2DD.

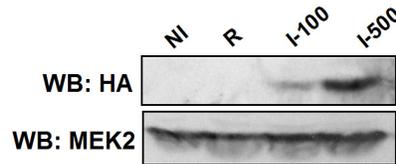


Figure 7.2 Induction de l'expression de la protéine transgénique HA-MEK2DD dans le colon du clone 725 par ajout de doxycycline. (NI= non induit, R= réprimé (induit à 500 µg/ml de doxycycline 2 semaines et réprimé 2 semaines), I-100= induit 2 semaines à 100 µg/ml de doxycycline et I-500= induit 2 semaines à 500 µg/ml de doxycycline)

La souris Villin-rtTA, que nous avons utilisée pour l'expression ciblée dans le côlon et l'intestin, a été générée par l'équipe du Dr Smith [592]. Lors de la caractérisation, ils ont croisé leur souris Villin-rtTA avec une souris exprimant l'histone H2B, couplé à la GFP (H2B-GFP), afin de s'assurer que la souris Villin-rtTA permette une expression ciblée uniquement dans l'intestin et le côlon. Ils ont observé que le promoteur Villin permet une expression spécifique dans le côlon et l'intestin mais, toutefois, ils ont observé un faible niveau d'expression dans l'estomac et le rein [592]. À la suite de l'analyse des divers tissus

de notre clone 725, nous avons observé une forte expression de HA-MEK2DD dans le côlon et l'intestin, tel qu'attendu mais, aussi, modérément dans l'estomac (figure 7.3).

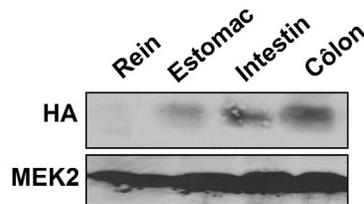


Figure 7.3 Expression de la protéine transgénique HA-MEK2DD dans les différents organes du clone 725 induit avec 500 µg/ml de doxycycline durant 2 semaines.

Il est à noter qu'avant même de pouvoir procéder au génotypage des souris, certains animaux, âgés d'à peine trois semaines, ont dû être euthanasiés en raison de diverses pathologies, telles que des faiblesses, des paralysies, des crises d'épilepsie et des tumeurs variées. De même, lors de la génération des cohortes pour la sélection des meilleurs clones, trois animaux ont dus être sacrifiés avant de pouvoir procéder à la génération des cohortes. Les trois souris euthanasiées étaient moribondes et arboraient plusieurs lésions sur le museau et les pieds (figure 7.4 A et B). (Ces animaux n'avaient pas encore été croisés avec la souris Villin-rtTA).

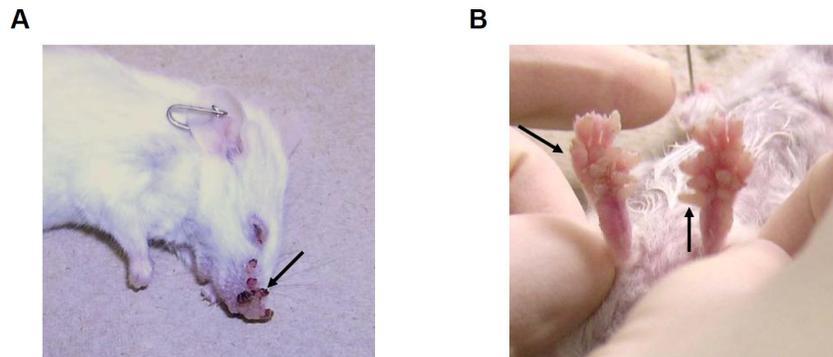


Figure 7.4. Lésions observées sur les souris transgéniques HA-MEK2DD âgées de 2 mois. A) Museau. B) Pied. (Les flèches indiquent les papillomes).

L'analyse histologique des tissus de ces souris par un pathologiste, a révélé une forte hyperplasie de l'épithélium squameux et la présence d'hyperkératose orthokératosique dans ces lésions. Un épaissement des couches épidermiques, d'un niveau dix fois supérieur à la normale, est observé. Les lésions sur le museau sont une forme de papillome malpighien bénin et quelques-uns des ces papillomes sont ulcérés (figure 7.5 A). La papillomatose des pieds présente des lésions d'hyperkératosées très marquées en forme de cloches d'église (figure 7.5 B). Ce type d'hyperplasie s'observe notamment lors d'infections virales avec le virus du papillome humain (HPV).

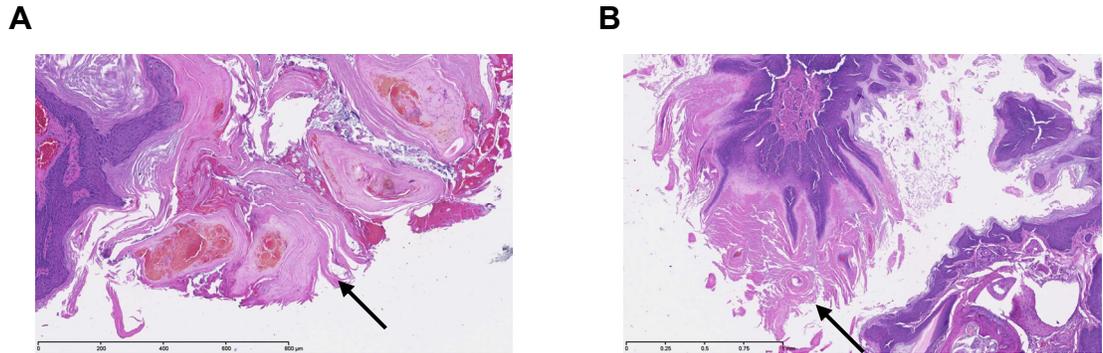


Figure 7.5 Analyse histologique par coloration Hématoxyline/Eosine (HE) des lésions observées chez les souris HA-MEK2DD. A) Papillome malpighien du museau avec ulcération. B) Papillomatose hyperkératosée du pied. (Les flèches indiquent l'hyperkératinisation).

Les lésions observées dans ces souris sont probablement dues à l'expression aberrante de la protéine transgénique HA-MEK2DD. Une insertion du transgène dans une région transcriptionnellement très active ou encore dans un locus conférant de nouvelles propriétés activatrices au promoteur inductible pourraient expliquer cette expression aberrante de la protéine transgénique, même si les souris HA-MEK2DD n'avaient pas encore été croisées avec les souris transgéniques possédant le promoteur villin-rtTA ni traitées à la doxycycline. Il est aussi possible que l'activité basale du promoteur du transgène permette une faible expression de la protéine transgénique. Les analyses d'immunobuvardages effectuées sur ces lésions ont d'ailleurs révélé une expression de HA dans ces tissus (non montré). Bien que ces résultats ne puissent pas être considérés pour une publication, il est très intéressant de savoir que l'expression de MEK2 actif peut engendrer de l'hyperplasie de l'épithélium.

7.5.2 L'expression de MEK2 constitutivement actif dans l'intestin engendre de l'hyperplasie lymphoïde

Les souris bi-transgéniques HA-MEK2DD/Villin inductibles à la doxycycline sont actuellement sous protocole depuis avril 2010. L'étude est constituée de cinq groupes de souris contenant de 15 à 20 animaux chacun :

- 1) HA-MEK2DD/doxycycline (contrôle négatif)
- 2) Villin/doxycycline (contrôle négatif)
- 3) HA-MEK2DD/Villin/doxycycline
- 4) HA-MEK2DD/Villin/doxycycline/retrait doxycycline (retrait de la doxycycline dès l'apparition des premières tumeurs)
- 5) HA-MEK2DD/Villin/doxycycline (euthanasie d'une souris par mois afin de suivre l'apparition des tumeurs)

Les analyses immunohistochimiques des souris HA-MEK2DD/Villin/dox ont révélé un marquage HA dans les villosités, tel qu'attendu. Une forte augmentation de la phosphorylation de ERK1/2, dans l'intestin et le côlon des souris HA-MEK2DD/Villin/dox par rapport aux souris contrôles Villin/dox, a également été observée en immunohistochimie et en immunobuvardage (figure 7.6).

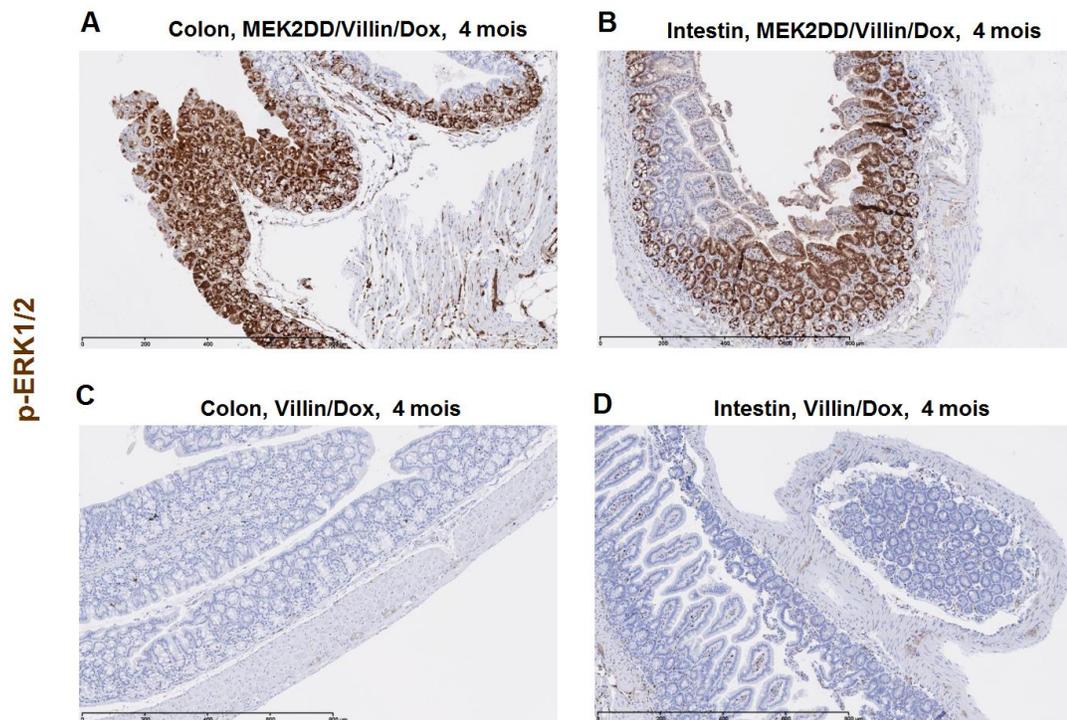


Figure 7.6. Marquage immunohistochimique de phospho-ERK1/2 dans le côlon et l'intestin des souris HA-MEK2DD/Villin et Villin induites à la doxycycline 500 µg/ml depuis 4 mois. Immunohistochimie phosph-ERK1/2. A) Côlon de la souris HA-MEK2DD/Villin/dox B) Intestin de la souris HA-MEK2DD/Villin/dox. C) Côlon de la souris Villin/dox. D) Intestin de la souris Villin/dox.

Parmi les animaux du groupe cinq et quelques-uns du groupe deux qui ont été sacrifiés jusqu'à présent, toutes les souris HA-MEK2DD/Villin/dox affichaient de l'hyperplasie lymphoïde bénigne dans le côlon et l'intestin. Les souris HA-MEK2DD/Villin/dox sacrifiées après seulement deux mois d'induction arboraient déjà de nombreux et volumineux foyers d'inflammation dans l'intestin et le côlon (figure 7.7 A et B). Il est possible que la doxycycline modifie la flore intestinale des souris, ce qui pourrait mener à l'inflammation des muqueuses intestinales et expliquer le phénotype inflammatoire

observé. Toutefois, les souris contrôles Villin/dox ont très peu d'inflammation et les quelques foyers détectables sont beaucoup plus petits et moins nombreux (figure 7.7 C et D). Selon le pathologiste, les souris HA-MEK2DD/Villin/dox sont affligées d'une importante hyperplasie des tissus lymphoïdes (plus que les souris contrôles), mais ce niveau d'inflammation ne peut toutefois pas être considéré pathologique car il n'y a aucune marque d'ulcération ou d'abcès dans l'épithélium.

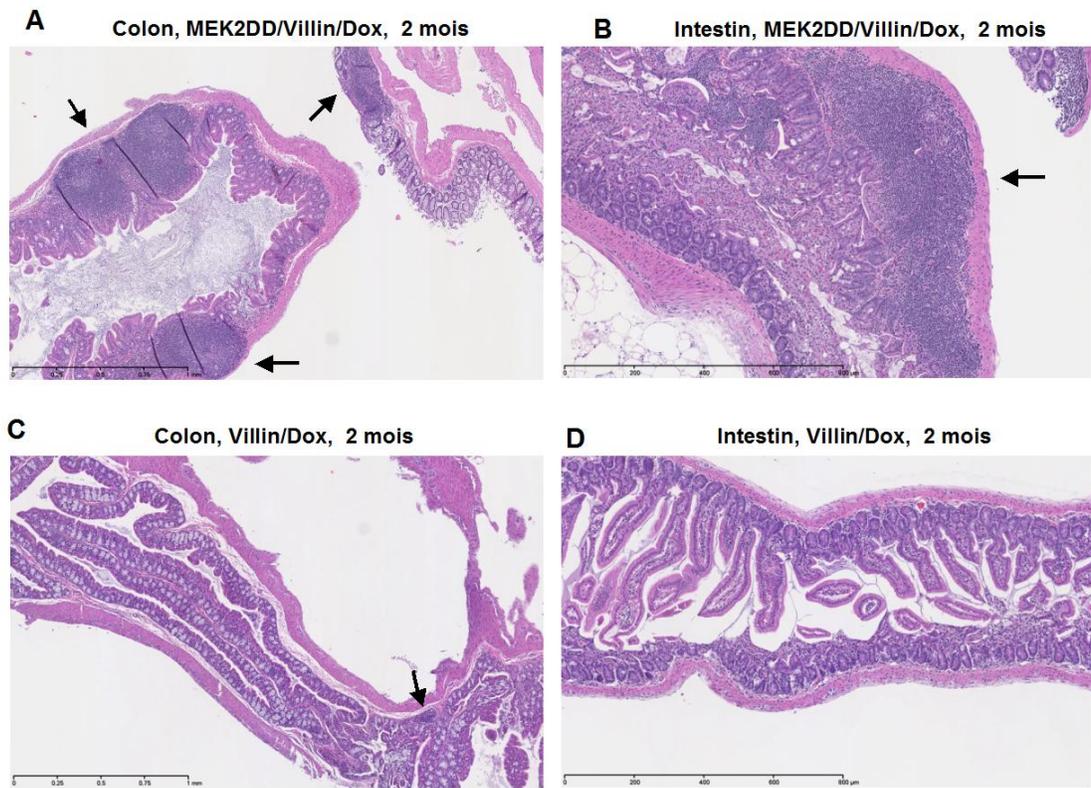


Figure 7.7 Côlon et intestin des souris HA-MEK2DD/Villin et Villin induites à la doxycycline 500 µg/ml depuis 2 mois. Coloration H-E. A) Côlon de la souris HA-MEK2DD/Villin/dox B) Intestin de la souris HA-MEK2DD/Villin/dox. C) Côlon de la souris Villin/dox. D) Intestin de la souris Villin/dox. (Les flèches indiquent les foyers lymphoïdes).

Après huit mois d'induction à la doxycycline, la muqueuse du côlon des souris HA-MEK2DD/Villin/dox s'est amincie à plusieurs endroits et un important œdème de la sous-muqueuse a été observé (figure 7.8 A), ce qui contraste avec la souris contrôle (figure 7.8 B). L'épaississement anormal de la sous-muqueuse semble être un phénomène vasculaire et ne présente pas de signe d'ulcération. Il est à noter que l'œdème pourrait être associé à une mucinose car une infiltration de cellules à mucus est observée dans l'œdème (figure 7.8 C). Après huit mois, les foyers d'hyperplasie lymphoïde présents dans le côlon de la souris HA-MEK2DD/Villin/dox ont augmenté en taille (figure 7.8 D). La présence d'œdèmes et de foyers d'inflammation lymphoïde sont des phénotypes observés dans les maladies inflammatoires de l'intestin, telles que la maladie de Crohn et les colites ulcéreuses [594]. Toutefois, les manifestations que nous observons dans notre souris transgénique HA-MEK2DD sont, à ce stade-ci, beaucoup plus bénignes que les lésions observées dans les maladies inflammatoires de l'intestin.

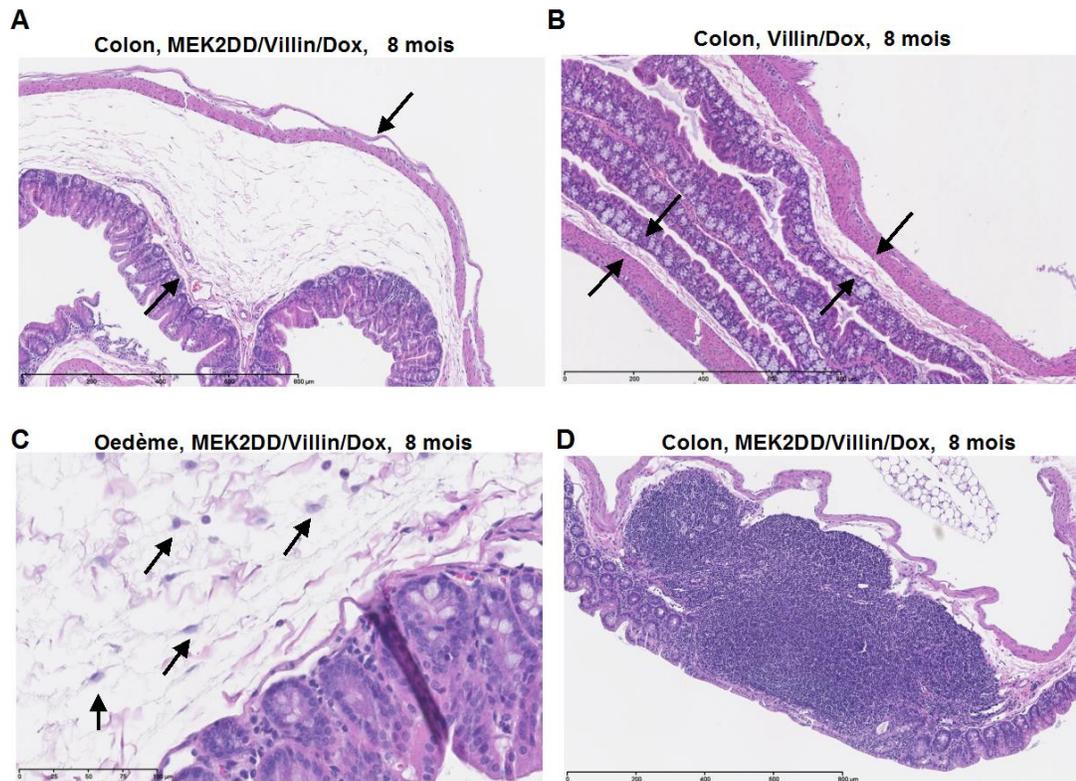


Figure 7.8 Côlon des souris HA-MEK2DD/Villin et Villin induite à la doxycycline 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ depuis 8 mois. Coloration H-E. A) Côlon de la souris HA-MEK2DD/Villin/dox B) Côlon de la souris Villin/dox. (Les flèches en A et B indiquent l'épaisseur de la sous-muqueuse). C) Oedème du côlon de la souris HA-MEK2DD/Villin/dox (Les flèches indiquent les cellules à mucus). D) Volumineux foyer d'hyperplasie lymphoïdes dans le côlon de la souris HA-MEK2DD/Villin/dox.

L'épithélium de l'estomac de la souris HA-MEK2DD/Villin a également été affecté. Après quatre mois d'induction à la doxycycline, un processus de kératinisation bénin est observé (figure 7.9 A), alors que la souris contrôle Villin/dox n'a démontré aucun signe d'anomalie (figure 7.9 B). Après huit mois d'induction, des squames d'hyperplasie focale de l'estomac sont observés et le revêtement stomacal est irisé, l'épithélium est papillomateux, à

la limite de la transformation hyperplasique (figure 7.9 C). L'estomac de la souris contrôle n'a démontré aucun phénotype, même après huit mois de doxycycline (figure 7.9 D).

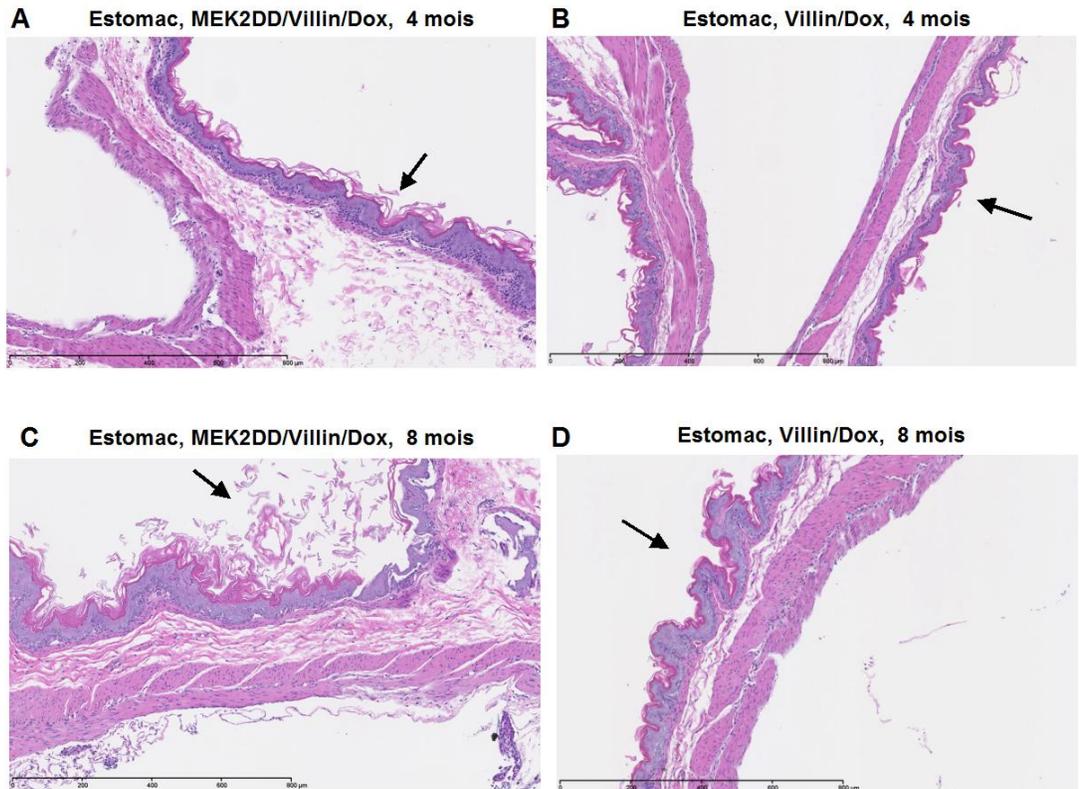


Figure 7.9 Estomac des souris HA-MEK2DD/Villin et Villin induite à la doxycycline 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ depuis 4 et 8 mois. Coloration H-E. A) Estomac de la souris HA-MEK2DD/Villin/dox, 4 mois d'induction. B) Estomac de la souris Villin/dox, 4 mois d'induction. C) Estomac de la souris HA-MEK2DD/Villin/dox, 8 mois d'induction. D) Estomac de la souris Villin/dox, 8 mois d'induction (Les flèches indiquent la kératinisation).

7.6 Discussion

La présence d'hyperplasie de l'épithélium squameux et d'hyperkératose orthokératosique dans les lésions observées dans les souris HA-MEK2DD (figure 7.5 A et B) est très intéressante. Il est encourageant de savoir que l'expression de MEK2 actif peut engendrer de l'hyperplasie, car il avait été précédemment rapporté que l'expression de MEK1 actif dans l'épithélium, était suffisante pour induire une hyperplasie bénigne, alors que l'expression de MEK2 activé n'avait pas réussi à engendrer de phénotype [124]. Ainsi, la présence d'hyperplasie et d'hyperkératose dans les lésions des tissus épithéliaux de ces souris laisse présager qu'il serait possible que l'expression de MEK2 actif, dans l'intestin et le côlon, puisse mener à une transformation l'épithélium et peut-être engendrer de l'hyperplasie.

Actuellement, après 12 mois d'induction, les souris HA-MEK2DD/Villin/dox n'ont toujours pas développé d'hyperplasie de l'épithélium intestinal, de cryptes aberrantes ou de polypes intestinaux. Par contre, une hyperplasie des tissus lymphoïdes intestinaux, ainsi que de l'œdème de la sous-muqueuse du côlon et de l'hyperkératinisation de l'estomac, à la limite de la normale, sont observés. Nous pouvons conclure pour le moment, que l'activation de la voie MEK/ERK1/2, n'est pas suffisante, à elle seule, pour engendrer la tumorigénèse intestinale. Toutefois, cela reste à suivre.

Il n'est pas exclu que plus de temps soit requis pour l'émergence d'hyperplasie et de polypes. À titre d'exemple, les souris transgéniques p75 et p110, des modèles pour le cancer du sein, ont une latence moyenne de 20,5 mois avant l'émergence des premières tumeurs des glandes mammaires [595]. Similairement, le modèle de souris transgénique exprimant une forme tronquée du domaine intracellulaire de Notch4/Int3 (h-Int3sh), développe des tumeurs mammaires avec une latence pouvant aller jusqu'à 24 mois, selon les fonds génétiques des souris [596]. Plus près de nous, les souris transgéniques exprimant KRAS

oncogénique dans le colon, selon les modèles, peuvent prendre plus de 12 mois avant l'apparition des premières cryptes aberrantes [588]. Nous avons d'ailleurs au laboratoire des souris qui exprime K-Ras^{V12} dans l'épithélium intestinal et nous avons dû attendre plus de 15 mois avant d'observer un premier polype intestinal pré-néoplasique.

Il est aussi possible que le niveau d'expression de MEK2DD ne soit tout simplement pas suffisant pour engendrer la formation de polype. La dose de doxycycline que nous utilisons est de 500 µg/ml, contrairement à la plupart des protocoles similaires, où une dose de 2 mg/ml est employée [592, 597]. Il est tout à fait possible qu'une induction de la protéine MEK2DD à des niveaux supérieurs, soit requise pour initier une transformation de l'épithélium intestinal.

Ceci étant dit, sachant que les maladies inflammatoires intestinales augmentent jusqu'à 66% l'incidence de cancer colorectal, le fait d'avoir une inflammation chronique pourrait être une prémisse à la transformation et à la tumorigénèse subséquente [433, 434]. D'ailleurs, l'inflammation chronique de l'intestin fait partie des trois facteurs de risques associés aux cancers colorectaux [598]. Similairement aux cancers sporadiques, la carcinogénèse du côlon, associée aux maladies inflammatoires, est une conséquence d'événements séquentiels reliés à des mutations génétiques et à une expansion clonale de ces cellules aberrantes (figure 7.10) [457, 598].

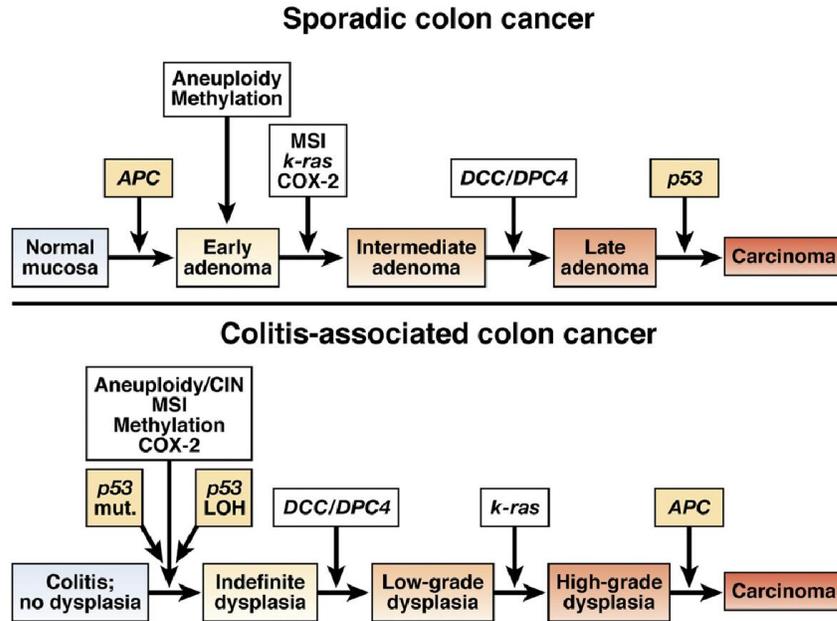


Figure 7.10. Schéma de la tumorigénèse colorectale induite par une inflammation chronique. (Tiré de Ullman et Itzkowitz. 2011. *Gastroenterology*. [599]).

En effet, la séquence d'altérations génétiques associées à la tumorigénèse des cancers colorectaux sporadiques et celle associée aux maladies inflammatoires est semblable. L'hyperméthylation de hMLH1 est observée dans les néoplasies émergent des cancers colorectaux associés aux colites (CCAC) [600]. Et tout comme pour les cancers colorectaux sporadiques, de la CIN (85%) et de la MIS (15%) y sont retrouvées dans des proportions similaires [601-603]. Les CCACs affichent également une perte de fonction de p53 dans 50% à 85% des cas [604, 605]. D'ailleurs, une forte fréquence de mutation de p53 est observée dans la muqueuse enflammée des patients atteints de colite ulcéreuse qui n'ont pas de cancer, indiquant qu'une inflammation chronique prédispose à des mutations de p53 [606]. D'ailleurs, une perte de p53 est fréquemment détectée dans la muqueuse enflammée mais non-dysplasique [605, 607]. Fait intéressant, dans la majorité des cas de cancers associés aux maladies inflammatoires de l'intestin, les lésions néoplasiques émergent d'une

zone d'inflammation chronique [608], similaire à celles que nous observons dans nos souris HA-MEK2DD/Villin/dox.

Divers modèles de souris ont aussi clairement corrélé l'inflammation chronique et la tumorigénèse colorectale [609, 610]. La souris Stat3, qui possède une déplétion conditionnelle de Stat3 (signal de transduction et d'activation de la transcription 3) dans les macrophages, est un modèle pour les maladies inflammatoires de l'intestin (IBD). Ces animaux Stat3^{-/-} produisent de plus grandes quantités des cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-1, le TNF α et l'IFN γ et développent rapidement des colites spontanées, qui se caractérisent par une infiltration de lymphocytes et une augmentation de l'épaisseur de la muqueuse intestinale [611]. Le degré de dysplasie est directement corrélé au degré d'inflammation et 68% des souris développent une hyperplasie, 63% une dysplasie et 16% un carcinome colorectal. Ces proportions sont d'ailleurs similaires à ce qui est observé chez les patients atteints de IBD [612]. D'autres modèles, comme la souris avec une inactivation du gène de l'IL-10, développent des colites avec des lésions s'apparentant à la maladie de Crohn. Plus de 60% des souris IL-10^{-/-} développent un carcinome du côlon [613]. Il est donc possible que notre modèle de souris HA-MEK2DD/Villin/dox donne un phénotype s'apparentant davantage aux IBDs, qu'à un phénotype de tumorigénèse colorectale.

Certains travaux ont d'ailleurs corrélé une augmentation de la phosphorylation des MAPKs ERK1/2, p38 et JNK dans les IBDs [614-616]. L'une des caractéristiques de l'inflammation intestinale associée aux IBDs, est la présence d'une infiltration de lymphocytes dans la muqueuse intestinale [617]. Récemment, un rôle de ERK1/2 dans la régulation de l'adhésion et la migration des lymphocytes dans les IBDs a été mis en relief. L'utilisation du PD98059, un inhibiteur de MEK1/2, a engendré une diminution de l'adhésion des lymphocytes à la surface des cellules endothéliales microvasculaires de l'intestin (IMEC). L'inhibition de l'activation de ERK1/2 a été associée à une réduction de ICAM-1 et FKN, qui sont requis pour l'adhésion des lymphocytes aux IMECs. Une

inhibition de la migration des lymphocytes à la surface des IMECs, de même que l'inhibition de l'IL-8 et MCP-1, qui sont des chémokines chimioattractantes pour les lymphocytes, ont aussi été observées [614].

Également, l'expression de MEK2DD dans les cellules IEC-6 a notamment été associée à une augmentation de TGF- α et du récepteur de chémokine, CCR1 (tableau II). Des études menées dans des modèles de cancer du sein chez la souris, ont rapporté que les récepteurs CCR1, -2, 3 et -5 sont exprimés par les lymphocytes T qui ont infiltré les tumeurs [618, 619]. Robinson et *al.* [618], ont aussi démontré qu'un traitement avec un antagoniste de CCR1/CCR5 (Met-CCL5) chez ces souris, engendre une réduction de la taille des tumeurs et de l'infiltration des macrophages et augmente la nécrose tumorale. La forte activation de ERK1/2 dans l'intestin des souris HA-MEK2DD/Villin pourrait potentiellement favoriser l'expression de CCR1 et augmenter l'infiltration des lymphocytes. Une augmentation de TGF- α est observée dans les muqueuses de l'intestin des patients atteints de colites ulcéreuses (active ou inactive) ou de la maladie de Crohn. L'augmentation de l'expression de TGF- α a par ailleurs été corrélée avec la durée de la maladie. L'expression de TGF- α a été associées à une hyperprolifération épithéliale et à une augmentation du risque de développer une malignité associée au colites ulcéreuses de longue durée [620]. Il est donc possible que l'expression de HA-MEK2DD induise une augmentation de CCR1 et TGF- α dans l'intestin des souris transgéniques, ce qui pourrait mener à une pathologie s'apparentant aux IBDs. Cela reste à déterminer.

7.7 Perspectives

Afin de déterminer si l'inflammation observée dans l'intestin et le côlon de la souris HA-MEK2DD/Villin/dox pourrait s'apparenter à une quelconque pathologie de l'intestin, il faudrait procéder à la caractérisation du type d'inflammation présent. Dans un premier temps, il faudrait déterminer si l'inflammation est engendrée par une infiltration de

macrophages, de neutrophiles ou d'éosinophiles, par le biais de marquages immunohistochimiques ou des analyses par immunobuvardage. Par exemple, la présence d'une eosinophilie est associée à un haut risque d'évolution en carcinome [454]. Également, il faudrait déterminer si la réaction d'inflammation est médiée par des réponses de type Th1, Th2, Th17 ou Treg et évaluer la modulation des cytokines. Ces données permettraient de déterminer si nous avons une inflammation s'approchant d'une pathologie inflammatoire, telle que la colite ulcéreuse ou si nous avons simplement une inflammation bénigne, non spécifique.

À moyen terme, il serait intéressant d'ajouter des cohortes d'animaux qui recevraient des traitements à l'AOM. Étant donné la présence d'inflammation dès les premiers mois suivant l'induction de MEK2DD, l'ajout de l'AOM pourrait être l'élément déclencheur qui permettrait l'apparition de tumeur chez les souris HA-MEK2DD/Villin/dox.

Ceci étant dit, à la lumière des résultats obtenus après huit mois d'induction, nous avons décidé de lancer des groupes d'expérimentation supplémentaires avec des souris triples transgéniques. Des cohortes avec les modèles de souris p53 knockout et APC^{min}, croisées avec nos souris HA-MEK2DD/Villin, ont été ajoutés; la génération des cohortes est actuellement en cours et non complétée. Ainsi, quatre groupes supplémentaires ont été additionnés au protocole de base :

- 6) p53^{-/-}/Villin/doxycycline
- 7) APC^{min}/Villin/doxycycline
- 8) HA-MEK2DD/p53^{-/-}/Villin/doxycycline
- 9) HA-MEK2DD/APC^{min} /Villin/doxycycline

La souche de souris APC^{min} est une lignée hautement sensible aux adénomes intestinaux spontanés. Les souris hétérozygotes élevées avec une diète riche en gras

développent plus d'une trentaine d'adénomes dans l'intestin en seulement quelques mois [621]. Les animaux APC^{min} décèdent habituellement vers quatre ou cinq mois en raison d'anémie, de cachexie et d'occlusion intestinale [622]. Les souris $p53^{-/-}$ homozygotes, quant à elles, développent des tumeurs (principalement des sarcomes et des lymphomes) aux alentours de quatre à six mois. Quant aux souris hétérozygotes (celles que nous utiliseront), l'émergence de tumeurs variées s'observe aux alentours de dix mois [623].

L'ajout de ces groupes d'expérimentation permettra peut-être de démontrer un rôle de potentialisation de l'activité de MEK/ERK1/2 dans la tumorigénèse intestinale. Cela reste à suivre.

Chapitre 8:

La découverte de nouveaux rôles de MEK/ERK1/2 dans l'induction de l'aneuploïdie et l'instabilité chromosomique

8.1 Mise en situation et objectif

Le chapitre 8 rend compte des résultats préliminaires d'études présentement en cours. La caractérisation des mécanismes associés à la CIN, la tétraploïdie et l'aneuploïdie induits par la voie de Ras-ERK1/2, de même que la détermination d'un rôle potentiel de MEK/ERK1/2 dans la régulation de la mitose, y sont abordés.

8.2 Contribution des auteurs

J'ai effectué 100% des expériences et analyses présentées dans ce chapitre. J'ai écrit entièrement le texte et conçu toutes les figures.

8.3 Introduction

L'aneuploïdie est une des caractéristiques majeures qui distingue les cellules tumorales des cellules normales. Chaque tumeur possède un réarrangement anormal de chromosomes qui lui est propre et qui lui confère des caractéristiques particulières. Deux routes peuvent mener à l'aneuploïdie : i) une accumulation du nombre de chromosomes intacts dans une cellule (ces chromosomes surnuméraires proviendraient de défauts de la mitose) et; ii) des réarrangements dans la structure des chromosomes, tels que des délétions, des translocations et des amplifications, qui surviennent à la suite de bris dans l'ADN. Plusieurs évidences ont démontré, que de tels réarrangements, sont directement associés au développement tumoral. Par contre, la contribution de l'aneuploïdie, induite par la présence de chromosomes surnuméraires intacts, demeure controversée [624].

Il a été proposé que les cellules aneuploïdes pourraient provenir, dans certains cas, d'un intermédiaire tétraploïde. La division défectueuse de ces cellules tétraploïdes instables

engendrerait alors des cellules aneuploïdes [538]. Toutefois, les évidences directes permettant d'étayer cette hypothèse manquent toujours. Une autre interrogation subsiste également, à savoir si l'aneuploïdie est une cause ou une conséquence de la transformation maligne [625]. Les résultats préliminaires que nous avons obtenus dans le laboratoire, grâce au modèle des cellules IEC-6-H-Ras^{V12}, nous amènent quelques pistes de réflexions.

La découverte d'un nouveau rôle de la voie de signalisation de Ras-ERK1/2 dans la CIN, la tétraploïdie et l'aneuploïdie était inattendue (chapitre 5 et 6). Plus de 70 gènes ont été associés à l'intégrité du génome et à la CIN. Parmi ceux-ci se retrouvent les gènes de réparation de mésappariement des bases (MSH2 et MLH1), de recombinaison non-homologue (XRCC5, LIG4, XRCC4 et PRKDC) et des voies de signalisation associées aux dommages à l'ADN (ATM, ATR, CHEK1, CHEK2, TP53, BRCA1, BRCA2, BLM et NBS1 (revue dans [626])). Leur dérégulation contribue à l'instabilité génétique via des altérations du génome et, en l'absence de checkpoints efficaces, les cellules entrent en mitose avec des bris dans l'ADN, ce qui peut directement mener à des erreurs de ségrégation des chromosomes [627].

La dérégulation ou l'inactivation de p53 [628, 629] et BRCA2 [630] a également été associée à l'augmentation du nombre de centrosomes. L'amplification du nombre de centrosomes engendre des erreurs de ségrégation des chromosomes qui peuvent, à leur tour, générer la formation de micronoyaux et, par conséquent, mener à la CIN. Un nombre anormal de centrosomes altère également la formation du fuseau mitotique, ce qui peut conduire à des catastrophes mitotiques, telles que les divisions multipolaires (qui mènent à l'aneuploïdie) [631, 632]. De plus, la présence d'aneu/polyploïdie dans une cellule déstabilise davantage les chromosomes, ce qui contribue à accentuer les erreurs de ségrégation des chromosomes et à amplifier les aberrations mitotiques [627].

La dérégulation des régulateurs du cycle cellulaire, tels que la suractivation des complexes CDK4/6/Cyclin D1 [633] et de la Cycline E [634], la perte de Rb [635, 636], de

même que la dérégulation de Cdc25 [554, 637], ont aussi été associés à l'augmentation du nombre de centrosomes. La surexpression et/ou amplification de régulateurs mitotiques, tel qu'Aurora A, a été directement liée avec l'augmentation du nombre de centrosomes [552] et la formation de cellules binucléées [638]. La surexpression ou l'amplification de PLK1 [638], ainsi que KIF11 et Aurora B, ont aussi été associés à des échecs de la cytokinèse et à la tétraploïdie [639]. L'altération des membres du SAC, tels que MAD2L1 et BUB1B, peuvent mener à des échecs de la mitose et à la génération de cellules tétraploïdes [638, 640]. La dérégulation de PLK4, associée à la duplication des centrosomes et de LATS1, requis pour l'activation du SAC, ont également été associés à la tétraploïdisation [641, 642].

De nombreux mécanismes ont été associés avec la génération de cellules tétraploïdes dans la littérature. Premièrement, un phénomène d'endoreplication de l'ADN, où les cellules dupliquent leur ADN durant la phase S sans qu'il n'y ait de division subséquente, engendre des cellules tétraploïdes mononucléées. Ce processus physiologique est notamment observé dans les mégacaryocytes [643]. Un dommage persistant des télomères a également été associé à un arrêt des cellules à la transition G2/M et à une absence de division. Après un certain laps de temps, les cellules entrent dans un nouveau cycle et une deuxième phase S (sans qu'il n'y ait eu de mitose au cycle précédent), suivie d'une division, engendre alors la tétraploïdie [644]. Deuxièmement, un échec de la cytokinèse est aussi une voie vers la tétraploïdie, générant alors une cellule binucléée et tétraploïde. Ce phénomène peut survenir via une régression du sillon de clivage, lors de la télophase [548]. Troisièmement, un autre mécanisme, nommé « mitotic slippage », moins bien caractérisé, a aussi été proposé. Il semblerait que des défauts dans la réplication de l'ADN ou dans les mécanismes de réparation de l'ADN puissent produire un signal qui bloque les cellules en cytokinèse, engendrant subséquemment la tétraploïdie. Il a été observé que l'Orc6, une composante du complexe d'initiation de réplication de l'ADN et BRCA2, un supresseur de tumeur et un facteur de réparation de l'ADN, doivent absolument être localisés au sillon de clivage et au midbody pour que la cytokinèse puisse être

complétée [645, 646]. Quatrièmement, un phénomène de pont d'ADN en anaphase et en télophase, formé par un chromosome non ségrégué en anaphase, a été associé à une régression du sillon de clivage en cytokinèse et à la génération de cellules tétraploïdes binucléées [647]. Cinquièmement, une fusion des membranes plasmiques, phénomène physiologique normal au cours du développement [648] et également observé lors d'infections virales [649], notamment par les virus HPV, de l'immunodéficience humaine (HIV), du virus lymphotrope des cellules T (HTLV-1), de l'hépatite B (HBV), de l'hépatite C (HCV) et du virus d'Epstein-Barr (EBV), permet la formation de cellule binucléées et tétraploïdes (revue dans [650]). Sixièmement, un nouveau processus, nommé «entosis», par lequel une cellule viable est internalisée par une cellule avoisinante, a été décrit. Ce phénomène engendre l'internalisation d'une cellule à l'intérieur d'une autre cellule, constituant alors un ensemble binucléé et tétraploïde. Certaines de ces structures ont été observées dans des tumeurs mammaires primaires [651].

8.4 Résultats

8.4.1 La découverte d'un nouveau mécanisme menant à la tétraploïdie

Il a été intéressant de découvrir un nouveau mécanisme menant à la tétraploïdie. Le modèle des cellules IEC-6-H-Ras^{V12} nous a permis d'observer une nouvelle voie menant à la tétraploïdie, jamais décrite à ce jour, soit un arrêt en prométaphase, suivi d'une reformation de l'enveloppe nucléaire. Ce phénomène est observé dans 11,9% des divisions des cellules IEC-6- H-Ras^{V12} (de même que dans les cellules IEC-6-MEK1DD et -MEK1-nucléaire, dans des proportions semblables). Ce phénomène est aussi observé dans les lignées de cancer du côlon HCT116, COLO 205 et SW480, dans des proportions variant de 5% à 15,5%. Dans les faits, une fois l'enveloppe nucléaire rompue en prométaphase, une incapacité d'alignement des chromosomes en métaphase et de séparation en anaphase mène

à la fin de la mitose, sans qu'il y ait eu séparation des chromatides sœurs (figure 8.1). La mitose avortée engendre ainsi une cellule mononucléée tétraploïde.

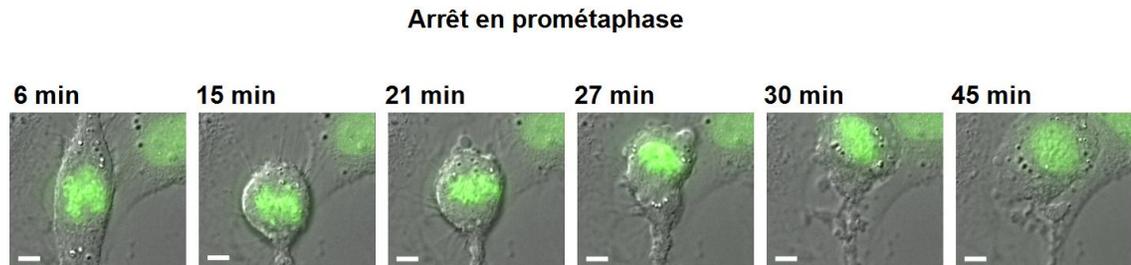


Figure 8.1 Tétraploïdie générée par un arrêt en prométaphase des cellules IEC-6-H-Ras^{V12}-H2B-GFP. Imagerie en temps réel de cellules IEC-6-H-Ras^{V12} exprimant l'histone H2B couplé à la GFP, photos prises aux 3 minutes, objectif 60X, Bar 20µm.

8.4.2 La découverte de potentielles interactions de MEK1 avec des régulateurs de la mitose

Tel que décrit au chapitre 6, Aurora A semble être un acteur majeur dans l'induction des aberrations mitotiques engendrées par l'hyperactivation de la voie Ras-ERK1/2. Dans le but de mieux définir la relation de MEK/ERK1/2 avec Aurora A et de découvrir de potentielles interactions avec des régulateurs mitotiques, des immunoprécipitations sur les protéines endogènes ont été réalisées. Nous avons observé que MEK1 (ainsi que MEK2 et ERK1/2, non montrés) immunoprécipitent avec Aurora A, Aurora B, INCENP, Survivine, Anillin et Cyclin B1 dans les IEC-6 contrôles (Vecteur vide) et exprimant H-Ras^{V12} (figure 8.2). Ces résultats préliminaires suggèrent de potentielles interactions de MEK1 avec des régulateurs de la mitose qui n'ont jamais été décrits à ce jour.

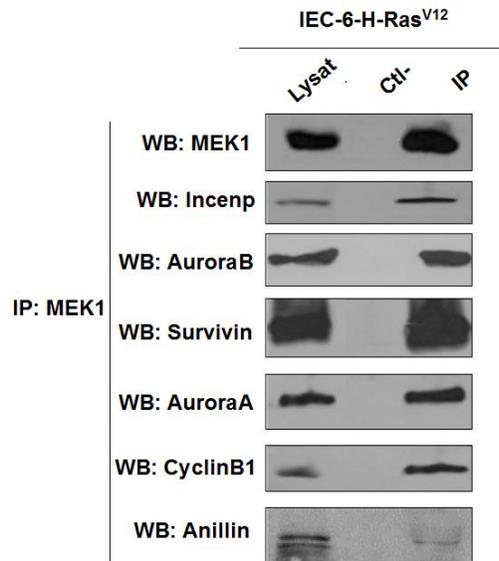


Figure 8.2 Interaction de MEK1 avec divers régulateurs mitotiques révélés par immunoprécipitation de MEK1 endogène dans les cellules IEC-6-H-Ras^{V12}. Sur gel, 50 µg de lysat, contrôle négatif réalisé avec un anticorps pré-immun de lapin et immunoprécipitations effectuées avec 700 µg de protéine. (n=4).

8.4.3 L'implication potentielle de la voie de MEK/ERK1/2 dans la régulation de la mitose

Les conséquences majeures engendrées par l'hyperactivation de la voie de signalisation de Ras-ERK1/2 sur l'expression et la localisation des régulateurs mitotiques Aurora A, Aurora B, INCENP et Survivine (chapitre 6), de même que les résultats d'immunoprécipitations (figure 8.2), suggèrent un rôle potentiel de la voie de ERK1/2 dans la régulation mitotique. L'étude du rôle de MEK/ERK1/2 dans le déroulement de la mitose, dans un contexte de cellules normales, a donc été initié. Des analyses préliminaires d'imagerie cellulaire en temps réel (exécutées telles que décrites au chapitre 6), avec des

cellules non transformées telles que les IEC-6, les fibroblastes NIH3T3 et les cellules épithéliales mammaires humaines MCF10A, traitées avec l'inhibiteur de MEK1/2, le PD184352, ont donné des résultats intéressants.

L'ajout du PD184352 (5 μ M) a un effet sans équivoque sur le déroulement de la mitose. Les mitoses des cellules IEC-6 traitées au PD184352 durent deux fois plus longtemps que celles des cellules contrôles traitées au DMSO (Tableau IV). Un accroissement de la durée de l'ingression du sillon de clivage en télophase est observé, passant de 4,0 min \pm 0,2 min, pour les cellules contrôles, à 7,1 min \pm 0,8 min, pour les cellules traitées moins d'une heure avec le PD184352. Toutefois, c'est l'étape de la cytokinèse qui est la plus fortement affectée, avec une augmentation de sa durée de près de cinq fois (13,4 min pour les cellules contrôles versus 70,1 min pour les cellules traitées au PD184352). L'inhibition de l'activité de MEK/ERK1/2, sur une période plus longue, n'augmente pas significativement la durée de la cytokinèse (81,4 min).

Tableau IV. Durée des phases de la mitose des cellules IEC-6-H2B-GFP traitées au PD184352, 5 μ M

	DMSO n=72 (min)	PD184352 0-1h n=61 (min)	PD184352 2-20h n=51 (min)
Bris enveloppe nucléaire (NEBD)	16,8 \pm 0,5	17,3 \pm 1,6	21,8 \pm 1,8
Métaphase/Anaphase	6,6 \pm 0,4	6,2 \pm 0,9	6,42 \pm 0,8
Anaphase/Télophase	3,4 \pm 0,1	3,1 \pm 0,2	4,28 \pm 0,3
Télophase/Midbody (début cytokinèse)	4,0 \pm 0,2	7,1 \pm 0,8	11,3 \pm 1,9
Midbody/Abscission (fin cytokinèse)	13,4 \pm 1,1	63,0 \pm 2,5	70,1 \pm 5,4
Mitose totale	54,2 \pm 2,4	96,7 \pm 4,4	113,9 \pm 10,0

Dès les 15 premières minutes suivant l'ajout de l'inhibiteur de MEK1/2, d'importants défauts sont observés dans toutes les cellules mitotiques (Tableau V). (Il est à noter qu'une inhibition partielle de la phosphorylation de ERK1/2 est observée dès les cinq premières minutes suivant l'ajout du PD184352 et une inhibition complète est obtenue après 10 minutes, non montré). Les principales aberrations observées sont associées au déroulement de la cytokinèse. Durant la première heure suivant l'ajout du PD184352, des difficultés d'ingression du sillon de clivage en télophase, de même que des cycles d'ingressions/régressions répétés qui mènent, dans 22,9%, à la binucléation, ont été relevés (figure 8.3 A-B, D). La formation de ponts intercellulaires (figure 8.3 C), signe de difficultés d'abscission, a aussi été observée. Normalement, lors de la télophase, l'enveloppe nucléaire se reforme et les chromosomes sont rapidement décondensés [239, 240, 242] (figure 8.3 A). Toutefois, à la suite de l'ajout du PD184352, les chromosomes demeurent condensés plusieurs heures suivant la complétion de la cytokinèse.

Tableau V. Anomalies de la mitose observée dans les cellules IEC-6-H2B-GFP traitées au PD184352, 5 μ M

	DMSO n=72 (%)	PD184352 0-1h n=61 (%)	PD184352 2-20h n=51 (%)
Mauvais alignement chromosome (métaphase)	5,5	24,6	29,4
Erreur de ségrégation chromosome (anaphase)	0	13,1	25,4
Micronoyau	0	1,6	9,8
Division tripolaire	0	1,6	7,8
Pont ADN (cytokinèse)	0	1,6	3,9
Régression sillon de clivage (télophase)	8,3	42,6	45,3
Binucléation (tétraploïdie)	0	22,9	25,4
Arrêt prométaphase (tétraploïdie)	0	0	2
Arrêt anaphase (tétraploïdie)	0	0	10
Hypercondensation chromosome (post-cytokinèse)	0	22,9	21,5

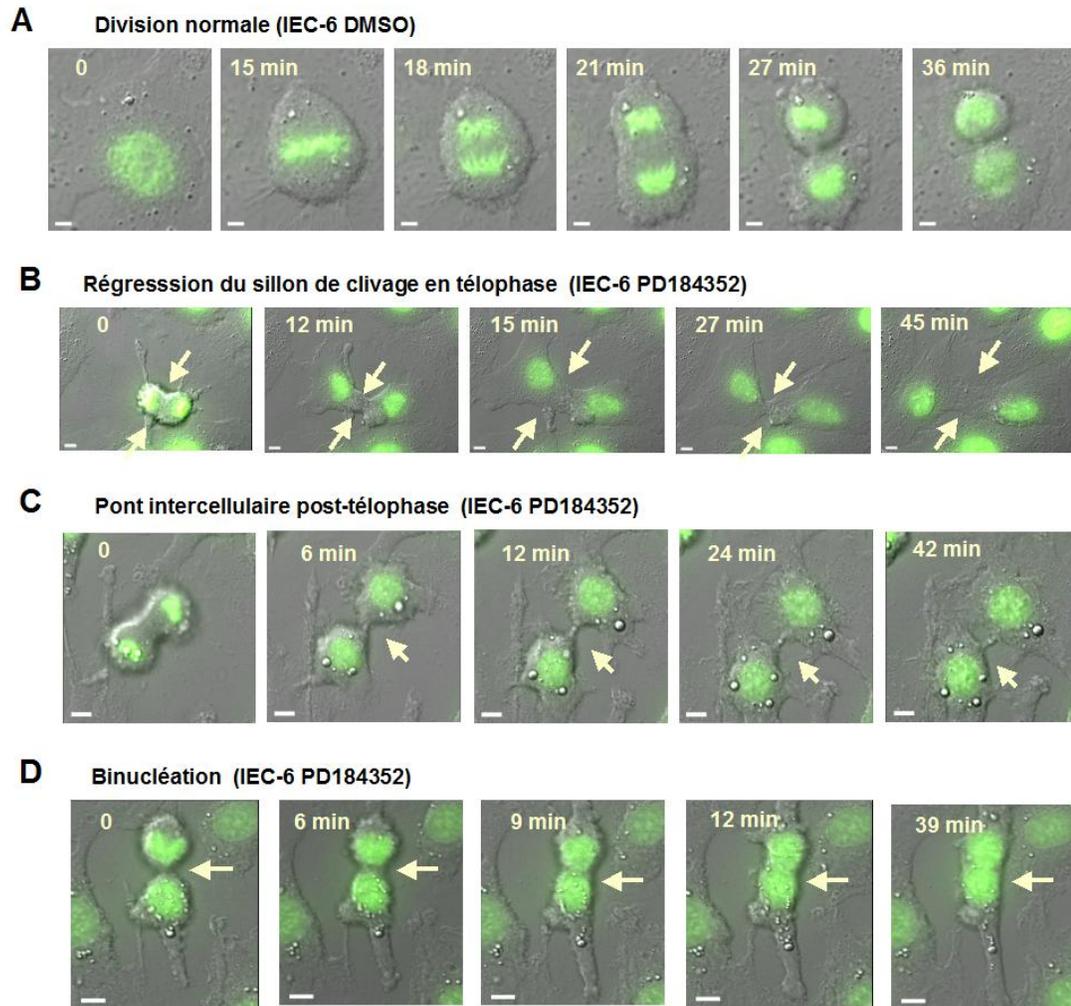


Figure 8.3. Anomalies de la cytokinèse observée dans les cellules IEC-6-H2B-GFP traitées au PD184352, 5 μ M. Imagerie en temps réel, photos prises aux 3 minutes, objectif 60X, Bar 20 μ m. A) Cellules IEC-6-H2B-GFP traitées au DMSO (contrôle négatif) B) Cycles de d'ingression/régression du sillon de clivage répétés. C) Formation d'un pont intercellulaire en cytokinèse. D) Binucléation par régression du sillon de clivage.

Des défauts d'alignements des chromosomes sur la plaque équatoriale, en métaphase, sont également observés dans 24,6 % des mitoses suivant la première heure de traitement au PD184352. Avec le temps, les divers défauts s'accroissent en nombre et en

durée. De six à huit heures suivant le traitement au PD184352, la formation de micronoyaux et de ponts d'ADN augmentent et des divisions tripolaires apparaissent (figure 8.4 A-D). Une accumulation de défauts au niveau du fuseau mitotique, de l'intégrité des microtubules ou des aberrations au niveau des kinétochores pourraient être associées à ces anomalies. Il est donc possible que ces défauts, observés plus tardivement, soient une conséquence indirecte de l'inhibition de l'activité de ERK1/2.

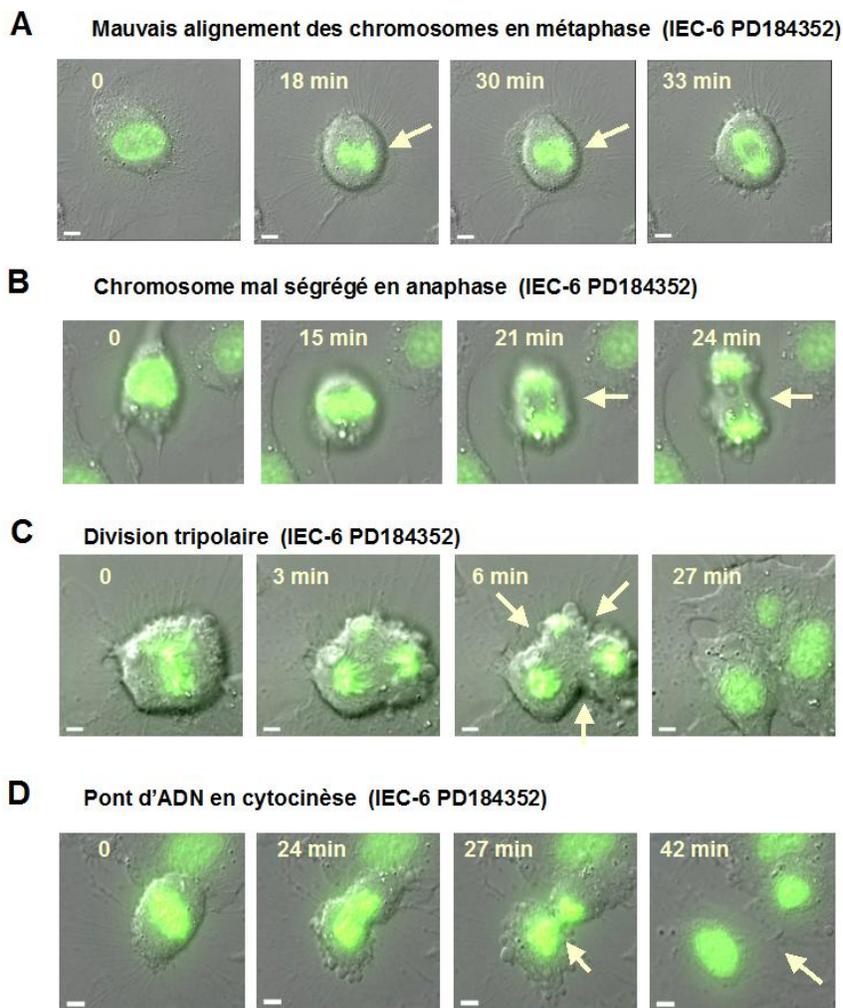


Figure 8.4. Anomalies mitotiques observées dans les cellules IEC-6-H2B-GFP traitées au PD184352, 5 μ M. Imagerie en temps réel, photos prises aux 3 minutes, objectif 60X,

Bar 20 μ m. A) Défaut d'alignement des chromosomes sur la plaque équatoriale en métaphase. B) Chromosome mal ségrégé en anaphase. C) Division tripolaire. D) Pont d'ADN en télophase/cytocinèse.

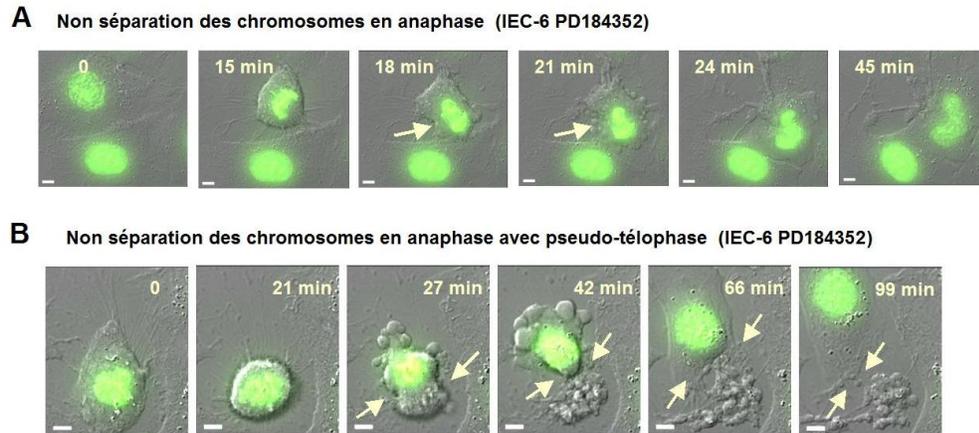


Figure 8.5. Anomalies en anaphase observées dans les cellules IEC-6-H2B-GFP traitées au PD184352, 5 μ M. Imagerie en temps réel, photos prises aux 3 minutes, objectif 60X, Bar 20 μ m. A) Pseudo-anaphase. B) Non séparation des chromosomes en anaphase avec ingression d'un sillon de clivage.

Un défaut intéressant, observé à la transition méta/anaphase, apparaît également de six à huit heures suivant le traitement au PD184352 : de la tétraploïdie (mononucléée) qui est générée par une non séparation des chromosomes en anaphase. Ce défaut est observé dans 10,2% des mitoses. Lors de ces divisions avortées, un semblant d'ingression du sillon de clivage est parfois observé, mais les chromosomes demeurent amalgamés ensemble et les chromosomes se dirigent alors dans une seule des deux «pseudo-cellules» (figure 8.5 A-B). Les mécanismes associés à ces défauts restent à clarifier. Une accumulation de défauts du fuseau mitotique ou, encore, une dérégulation de la condensation des chromosomes pourraient en être la cause.

8.5 Discussion

Bien que ces résultats soient préliminaires, ils suggèrent que l'activité de MEK/ERK1/2 pourrait être requise pour un déroulement adéquat de la mitose. Des analyses d'imagerie en temps réel avaient précédemment été effectuées par l'équipe de Rieder et *al.* (2006) [652]. Ils avaient alors conclu que l'activité de ERK n'était pas requise pour la mitose. Leurs analyses de microscopie en temps réel, sur des cellules NIH 3T3 et Hela prétraitées avec le U0126 à 50 μ M durant 15 minutes, ne semblaient pas montrer de différences significatives entre les cellules contrôles et les cellules traitées avec l'inhibiteur de MEK1/2. Cependant, en s'y attardant, il est difficile d'interpréter leurs résultats car la méthodologie utilisée est discutable. D'une part, le nombre de n varie beaucoup d'une analyse à l'autre (donnant des barres d'erreur de plus ou moins 27 % dans certain cas). D'autre part, l'acquisition d'images s'est effectuée aux 5 ou 10 minutes (leur protocole n'est pas clair), ce qui est tout à fait insuffisant pour analyser les différentes phases de la mitose : des captations d'image aux deux ou trois minutes sont absolument nécessaires pour une analyse efficace. De plus, ils ont utilisé une magnification de 10X, en contraste de phase. Une si faible résolution est insuffisante pour observer la structure des chromosomes et les suivre adéquatement afin de relever les erreurs de ségrégation, la présence de ponts d'ADN et de micronoyaux.

Mais indépendamment de ces considérations, le temps requis pour la complétion de la cytokinèse et l'abscission du pont intercellulaire n'a pas été compilé dans leurs analyses. C'est justement cette étape qui est la plus affectée selon notre étude. La cytokinèse est une étape extrêmement complexe qui requiert l'orchestration de nombreux acteurs. La cytokinèse se divise en trois étapes : i) tout d'abord, l'initiation du sillon de clivage (en début de la télophase), qui requiert la présence des CPCs, RhoA et ECT2 afin d'initier l'ingression du sillon [653, 654]; ii) Ensuite, la formation du midbody (en fin de télophase), qui nécessite l'élaboration d'une structure contractile efficace. Les principales molécules

requis pour cette étape sont les syntaxines et les dynamines, de même que les septines et Anillin [655-659]; iii) L'étape finale de la complétion de la cytokinèse, est l'abscission du pont intercellulaire et la séparation des deux cellules. Cette étape critique requiert notamment la réorganisation des membranes plasmiques. Bien que tous les mécanismes s'y rattachant ne soient pas encore entièrement caractérisés, la présence au midbody du complexe des centralspindlines, des CPCs, de même que de MgcRacGAP, RhoA, PLK1, MKLP1, MKPL2, centrioline, t- et v-SNARE, est essentielle à l'aboutissement de cette dernière étape [660-668].

Il est intéressant de relever que des données récentes suggèrent également une implication de MEK/ERK1/2 dans la cytokinèse. Il a été observé que le U0126 inhibe la phosphorylation de ERK1/2 au midbody et que cette inhibition engendre un échec de l'abscission [669]. Il a également été rapporté que BRUCE immunoprécipite avec MEK1. BRUCE est une protéine multifonctionnelle essentielle à la formation du midbody, de l'anneau contractile de la midzone de même qu'à l'abscission du pont intercellulaire à la fin de la cytokinèse [670].

La machinerie nécessaire à l'accomplissement de la cytokinèse requiert donc la parfaite orchestration de nombreux effecteurs. Ces éléments sont requis pour la formation du fuseau central et de l'anneau contractile, de même que pour le transport vésiculaire et les interactions avec l'actine, la myosine et les microtubules. La dérégulation d'une seule de ces protéines est suffisante pour faire échouer la cytokinèse [671]. Il pourrait être envisageable que la présence de MEK/ERK1/2 soit requise à la midzone et au midbody pour interagir avec l'un ou l'autre de ces régulateurs, tel que le suggèrent les résultats d'immunoprécipitation, précédemment présentés (figure 8.2) et les défauts mitotiques, observés à la suite de l'inhibition de l'activation de ERK1/2 par le PD184352 (figure 8.3 à 8.5). Il est intéressant de noter que la suractivation de MEK/ERK1/2 engendre également des défauts à cette étape. L'expression de RAS activé ou de mutants de MEK1 génère de la

tétraploïdie (chapitre 5), qui est principalement engendrée par une régression du sillon de clivage en fin de cytokinèse (chapitre 6).

8.6 Perspective

Afin de poursuivre la caractérisation des interactions de MEK1 avec les régulateurs mitotiques, des analyses de spectrométrie de masse, ainsi que des essais kinases, seront initiés. En ce qui a trait au rôle potentiel de MEK/ERK1/2 dans la régulation de la mitose, les analyses préliminaires que nous avons effectuées sur les cellules NIH3T3 et MCF10A vont dans le même sens que celles menées sur les IEC-6. Il serait intéressant de confirmer ces résultats dans des cellules non immortalisées, telles que des MEFs primaires, en espérant que ces cellules puissent supporter la phototoxicité engendrée par la microscopie. Également, des MEFs ERK1^{-/-}, ERK2^{-/-} et ERK1/2^{-/-} ont été générés dans le laboratoire, ces précieux outils permettraient de répondre à la fameuse question de l'implication de ERK1/2 dans la régulation de la mitose.

CONCLUSION

Chapitre 9:

Conclusions, perspectives et directions futures

9. Conclusions, perspectives et futures directions

La voie de signalisation de Ras-ERK1/2 est l'une des voies les plus étudiées et les mieux caractérisées. Depuis la découverte de ERK par Ray et Sturgill, en 1988 [672], la voie des MAP kinases ERK1/2 a fait l'objet de près de 20 000 publications. Les présents travaux de doctorat ont mis en relief l'importance de la voie de signalisation de MEK/ERK1/2 dans la tumorigénèse colorectale. D'abord, en démontrant la contribution importante de l'isoforme de MEK2 dans la prolifération des cellules de cancer du côlon. Puis, en illustrant l'importance de la régulation spatiale de MEK/ERK1/2 dans le processus de transformation oncogénique. L'implication de la voie de MEK/ERK1/2 dans la tétraploïdie, l'aneuploïdie et la CIN fut également démontrée. Ces découvertes étayent l'idée que la dérégulation de l'activité, de même que la localisation de MEK/ERK1/2, jouent un rôle prépondérant dans le processus de tumorigénèse colorectale. Le chapitre neuf est une discussion sur la pertinence des résultats obtenus et sur les perspectives amenées par ce projet de doctorat.

9.1 L'importance de la régulation spatiale de la voie ERK1/2 dans la tumorigénèse

La régulation subcellulaire de MEK/ERK1/2 est un élément clé pour la génération de réponses cellulaires appropriées. Tel qu'illustré au chapitre cinq, une localisation adéquate de la kinase s'avère également être un élément clé dans le processus de transformation oncogénique. Cibler MEK1 dans le noyau (MEK1 Δ NES) est suffisant pour transformer les cellules, engendrer une augmentation de prolifération et induire la formation de tumeurs dans un modèle de greffe sur des souris athymiques. La localisation nucléaire de MEK génère également de la CIN, de la tétraploïdie et de l'aneuploïdie. Inversement, cibler le mutant de MEK1 constitutivement actif à la membrane plasmique (Myr-MEK1DD), inhibe toutes les capacités de transformation qui sont engendrées par l'expression de la protéine constitutivement activée (MEK1DD), tel que démontré aux

chapitres quatre et cinq [278].

Également, l'inactivation de Sef, une protéine d'ancrage qui séquestre MEK1/2 et le complexe MEK/ERK/1/2 dans le cytoplasme, à la membrane plasmique et à l'appareil de Golgi [129, 158], est observé dans les lignées des cancers colorectaux. L'analyse de tumeurs colorectales humaines a permis de corrélér significativement la diminution de l'expression de Sef avec l'augmentation du grade des tumeurs (figure 5.7). De plus, tel que démontré par les analyses immunohistochimiques, l'augmentation de l'accumulation de phospho-MEK1/2 dans le noyau corrèle avec la diminution d'expression de Sef (figure 9.1). Les cellules de l'épithélium intestinal normal exprimant Sef n'ont pas de marquage nucléaire de phospho-MEK1/2 et, par opposition, une absence de Sef est associée à une accumulation nucléaire de MEK1/2 phosphorylés. Ces observations suggèrent que l'accumulation, dans le noyau de MEK1/2 phosphorylés, est facilitée par la perte d'expression de Sef.

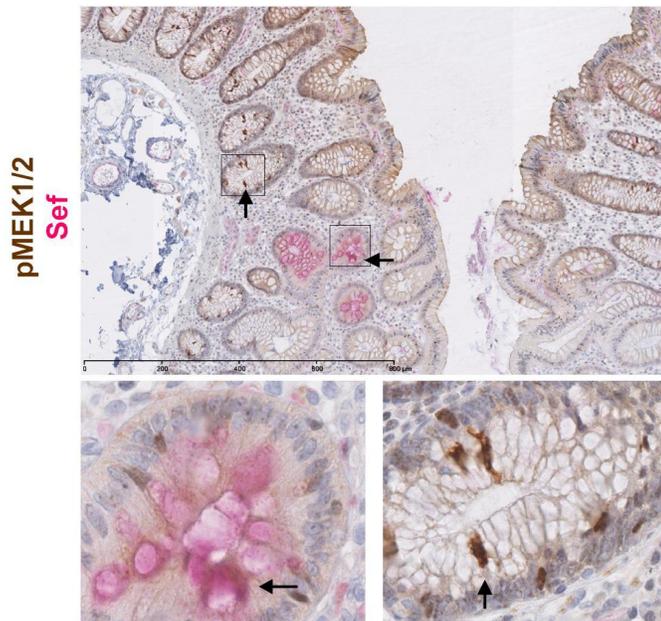


Figure 9.1 Marquage immunohistochimique de Sef (rose) et phospho-MEK1/2 (brun) de l'épithélium normal de côlon humain.

Ainsi, nous proposons que l'inhibition de Sef, via un mécanisme qui demeure toutefois à caractériser, permette l'accumulation de MEK dans le noyau. Bien que MEK soit toujours habilité à sortir du noyau (grâce à son NES intact), Sef n'étant plus présent pour le retenir au cytoplasme, MEK retourne rapidement au noyau, où il peut phosphoryler ERK1/2 à nouveau. L'activation soutenue de ERK dans le noyau enclenche alors l'activation exacerbée de ses diverses cibles nucléaires, stimulant ainsi la transformation oncogénique. Cette hypothèse est étayée par le fait que la réexpression de Sef dans des cellules IEC-6-H-Ras^{V12} corrige la localisation anormale de phospho-MEK et phospho-ERK dans le noyau, réduit la prolifération et diminue l'aneuploïdie. Plus encore, la réexpression de Sef inhibe complètement la capacité de former des tumeurs, dans des modèles de greffe sous-cutanée, chez des souris athymiques (figure 5.6).

Outre l'inhibition de Sef, l'accumulation nucléaire de phospho-ERK, qui est observée dans les tumeurs colorectales, pourrait être engendrée par d'autres mécanismes. Par exemple, une diminution de l'expression de PEA-15, tel qu'observé dans les lignées de cancer du côlon et les cellules IEC-6 exprimant H-Ras^{V12} et MEK1-nucléaire (figure 9.2 A et B), pourrait expliquer l'accumulation de ERK dans le noyau [173]. Une inhibition de PEA-15 dans les glioblastomes [673] et le cancer du sein est d'ailleurs observée. L'expression de PEA-15 a même été inversement corrélée à un comportement invasif dans des tumeurs mammaires [528].

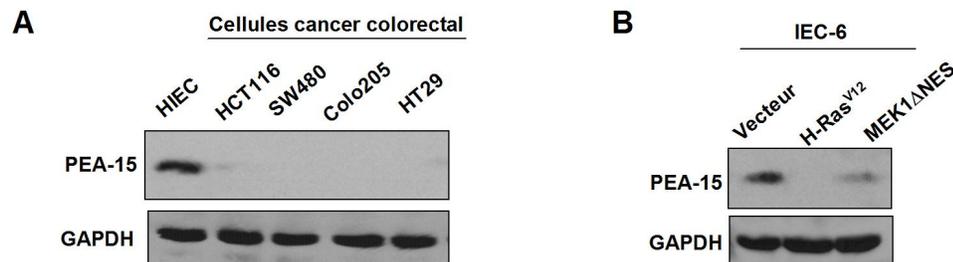


Figure 9.2 Analyse par immunobuvardage de l'expression de PEA-15. A) PEA-15 dans les lignées humaines de cancer colorectal, les cellules contrôles sont les HIEC (intestinale

épithéliale humaine normale) B) PEA-15 dans les cellules IEC-6 exprimant Ras oncogénique et MEK1 nucléaire.

La modulation de l'expression des phosphatases pourrait également expliquer la localisation erronée et/ou l'augmentation de phosphorylation dans le noyau de MEK et ERK. Il a été démontré que la séquestration de ERK dans le cytoplasme, par la surexpression de la phosphatase MKP-3, empêche la transcription nucléaire de Elk1 et inhibe la synthèse de l'ADN [211]. L'expression de MKP3, dans les lignées IEC-6 exprimant les mutants de MEK, a également été associée à une réduction de la durée de la phase S (non montré). MKP-3 est inhibé dans des lignées cellulaires de cancer pancréatique [287] et dans le cancer de l'ovaire [289]. Son inhibition est d'ailleurs un marqueur prédictif de la survie chez les patients atteints de NSCLC [288]. Il serait intéressant d'évaluer le niveau d'expression des différentes phosphatases associées à la régulation de MEK et ERK.

Une augmentation de l'expression des nucléoporines pourrait aussi expliquer une accumulation de ERK dans le noyau. Il a été démontré que ERK interagit avec les nucléoporines Nup153 et Nup214 via leur séquence de répétition FG (FG-repeat sequence) [149, 153]. Une analyse par TMA de tumeurs mammaires et ovariennes avait révélé une augmentation de l'expression de plusieurs nucléoporines dans les tissus tumoraux. L'inhibition de Nup153, par siRNA, dans des lignées de cancer du sein et de l'ovaire a d'ailleurs été associée à une diminution de l'activité de ERK1/2 dans le noyau et à une réduction de l'activation de c-Fos [674]. Fait à noter, nous avons également observé une augmentation de l'expression de Nup153 et Nup214 dans les lignées de cancer colorectales et les IEC-6 exprimant divers mutants (figure 9.3 A et B).

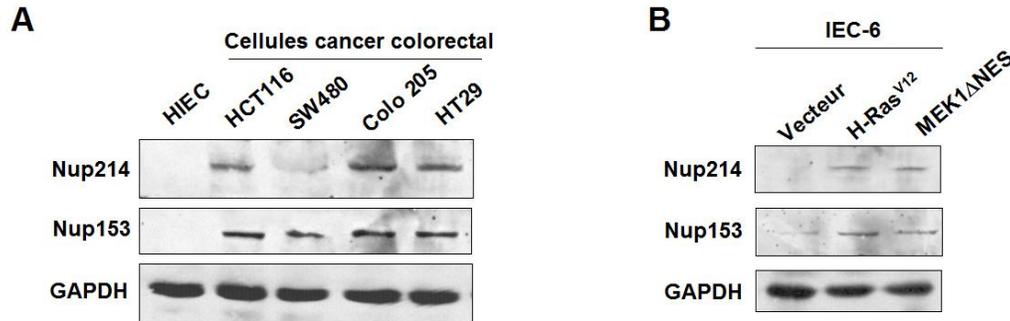


Figure 9.3 Analyse par immunobuvardage de l'expression des nucléoporines Nup153 et Nup214. A) Expression dans les lignées de cancer colorectal B) Dans les cellules IEC-6 exprimant divers mutants.

En conclusion, bien que la perte de Sef semble fortement associée à la localisation aberrante de MEK1/2 et ERK1/2 activés dans le noyau, il n'est pas exclu que d'autres mécanismes puissent également contribuer à une localisation erronée dans le noyau ou à une suractivation des kinases MEK/ERK1/2.

9.2 La découverte de nouveaux rôles de MEK/ERK1/2 dans l'induction de la tétraploïdie, l'aneuploïdie et l'instabilité chromosomique

La découverte d'un nouveau rôle de la voie de signalisation de Ras-ERK1/2 dans la CIN et l'aneuploïdie était inattendue. À ce jour, aucune étude n'avait réussi à démontrer un lien direct entre *RAS* et la tétra/aneuploïdie dans un modèle de cancer colorectal (encore moins un lien avec MEK/ERK1/2 spécifiquement). Il avait été proposé que des mutations de *KRAS* puissent être impliquées dans l'établissement de la CIN observée dans les cancers colorectaux [543, 626, 675-679]. Un certain nombre d'études *in vitro*, menées principalement dans des fibroblastes NIH 3T3, avaient rapporté que des mutations de *RAS*

pouvaient mener à une amplification du nombre de centrosomes et une altération de l'interaction des chromosomes avec les microtubules [680-684] (ce qui pourrait éventuellement mener à la CIN). Il avait également été suggéré que la CIN et l'instabilité génétique médiées par *KRAS* pourraient être dues à des anomalies des checkpoints du cycle cellulaire. Il avait été observé, dans les NIH 3T3, que la surexpression d'oncogènes, tels que Ras et c-Myc, engendrent des dommages à l'ADN. Les auteurs avaient alors proposé que l'inactivation de la voie de p53, dans certaines cellules, pouvait engendrer une accumulation d'altérations génomiques, pouvant ultimement mener à l'instabilité génétique [685].

Des évidences indirectes avec des tumeurs colorectales ont aussi associé *RAS* à la CIN, notamment par l'analyse d'adénomes colorectaux sporadiques, où une certaine proportion de tumeurs comportant une mutation activatrice de *RAS* arboraient de la CIN [677, 678, 686]. Par contre, une autre étude, avec des spécimens de tumeurs colorectales, n'a pas réussi à établir de corrélation entre des mutations de *KRAS* et la CIN [687]. Toutefois, ces résultats négatifs sont peut-être dus au trop petit nombre de tumeurs analysées (seulement 12) et/ou à l'hétérogénéité du grade des tumeurs.

Outre la confirmation d'un lien direct entre *RAS* et la CIN et la tétra/aneuploïdie dans un modèle de cancer colorectal, un lien direct avec l'activité de MEK/ERK1/2 a aussi été mis en relief. Plus encore, une nouvelle voie menant à la tétraploïdie a été observée (figure 8.1). Un arrêt en prométaphase, suivi d'une reformation de l'enveloppe nucléaire, est observé dans les lignées de cellules IEC-6 (H-Ras^{V12} et les mutants de MEK1), de même que dans les lignées de cancers du côlon humain. Les mécanismes impliqués dans ce phénotype demeurent à caractériser. Plusieurs pistes sont à explorer : la présence de chromosomes ou de centrosomes surnuméraires qui engendreraient la formation d'un fuseau mitotique défectueux, pourraient expliquer ce phénotype. Des défauts de l'attachement des microtubules aux kinétochores, pourraient aussi être en cause. Les attachements mérotéliques sont d'ailleurs difficilement reconnus par le SAC [688]. Une inactivation du SAC pourrait également être associée au phénomène. Un problème de

condensation des chromosomes pourrait interférer avec l'alignement de ces derniers en métaphase et, après un arrêt prolongé, la cellule recevrait tout simplement un signal de complétion de la mitose, même si ses chromosomes n'ont pas été séparés.

Le modèle des cellules IEC-6-H-Ras^{V12} a également permis de confirmer une hypothèse qui, bien que généralement acceptée dans la littérature, n'avait jamais été directement démontrée dans un modèle de cellule exponentielle. Plus précisément, que la tétraploïdie est une prémisse à l'aneuploïdie. De façon éloquente, l'imagerie en temps réel des cellules IEC-6, fraîchement infectées par H-Ras^{V12}, montre que les premières divisions anormales sont exclusivement des échecs de la cytokinèse par régression du sillon de clivage, qui mène directement à la formation de cellules tétraploïdes binucléées. Par la suite, des divisions tripolaires, menant à l'aneuploïdie surviennent et ce, exclusivement sur les cellules binucléées (figure 9.4 C) : ce phénomène est d'ailleurs nommé mitose réductionnelle [567]. Après plusieurs divisions, la formation de micronoyaux et de ponts d'ADN en télophase émergent et contribuent à la CIN. De une à quatre semaines suivant l'infection, les échecs de cytokinèse s'accroissent en fréquence, pour finalement arriver à un plateau après quatre semaines. Les cellules demeurent alors, avec une proportion relativement stable, de cellule binucléée via un échec de la cytokinèse, se situant autour de 25 à 30%. Certaines de ces cellules binucléées se divisent via des divisions «normales», donnant alors deux cellules mononucléées, mais avec un contenu tétraploïde. Toutefois, la plupart des cellules binucléées se séparent via des divisions tripolaires et même tétrapolaires, donnant alors lieu à des cellules «presque diploïdes», mais ne possédant probablement pas une paire de chaque chromosome. Ceci pourrait expliquer la stabilisation du nombre de cellules tétraploïdes qui est observé après un certain laps de temps (figure 9.4 A-B-C).

Toutefois, les autres anomalies mitotiques continuent de s'accumuler et une augmentation du nombre de cellules possédant des micronoyaux est toujours observée trois mois post-infection. Ceci peut s'expliquer par le fait que la polyploïdisation augmente la

complexité du processus mitotique. Il devient alors extrêmement difficile, pour la cellule, de gérer un si grand nombre de chromosomes. Par conséquent, des erreurs de ségrégation des chromosomes, des défauts du fuseau mitotique et des aberrations du nombre de centrosome s'accumulent, de division en division et génèrent des micronoyaux et de la CIN. Ces cellules anormales se divisent à leur tour et perpétuent les aberrations mitotiques. Il aurait été intéressant de procéder à des analyses de caryotype spectral (SKY) sur ces populations afin d'évaluer l'évolution de la CIN au cours du temps (figure 9.4).

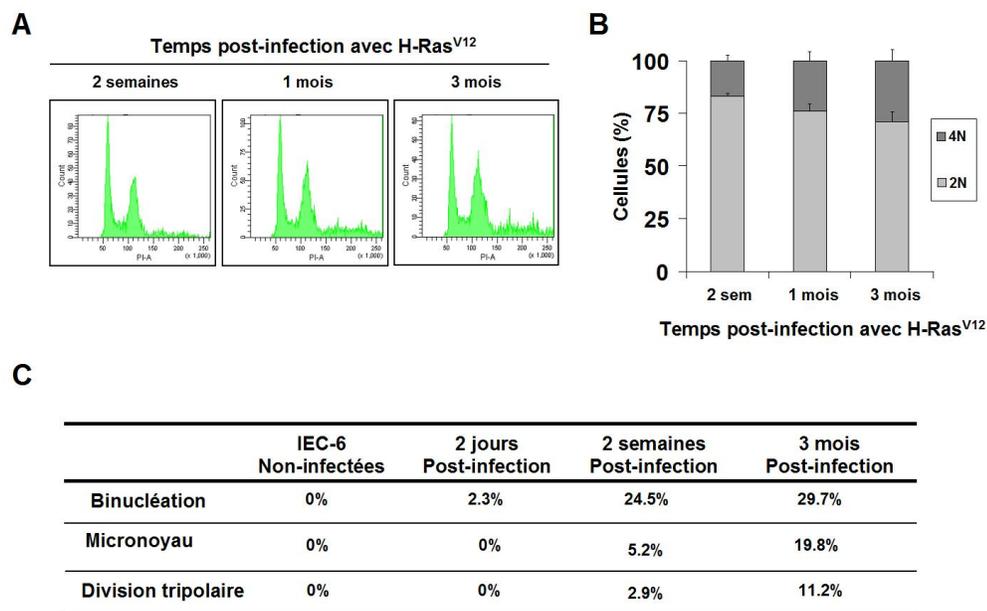


Figure 9.4. Aberrations mitotiques des cellules IEC-6-H-Ras^{V12} à différents temps post-infection. A) Analyse d'incorporation de BrdU par FACS des cellules IEC-6-H-Ras^{V12} à différents temps post-infection. B) Quantification de la ploïdie des IEC-6-H-Ras^{V12}. C) Quantification des défauts des IEC-6-H-Ras^{V12}-H2B-GFP à différents temps post-infection par imagerie en temps réel, photos prises aux 3 minutes, objectif 60X.

L'existence d'un «checkpoint tétraploïde» en G1 avait été proposé par Margolis et *al.* (2003) [689]. Les divers travaux en faveur de ce modèle ont suggéré la nécessité d'avoir un p53 fonctionnel afin éliminer les cellules tétraploïdes en début de phase G1, avant

l'initiation d'un nouveau cycle [526, 647]. De façon intéressante, suivant l'infection avec MEK1 nucléaire (figure 9.5 A) ou H-Ras^{V12} (non montré), les cellules IEC-6 ont une induction de la phosphorylation de p53. Ceci pourrait-être dû à l'activation de ce checkpoint tétraploïde en G1, en réponse à la génération de cellules tétraploïdes qui émergent dès les premiers jours suivant l'infection. Toutefois, après quelques jours, les cellules semblent perdre cette capacité d'activation de la voie de p53. En fait, deux semaines post-infection, les cellules montrent une diminution d'activation de la voie de p53. Suivant les traitements au 4-nitroquinoline 1-oxide (4-NQO), un agent mimétique des rayons UV (figure 9.5 B), une très faible induction de la phosphorylation de la sérine 15 de p53 et de p21 est observée dans les cellules IEC-6-MEK1 nucléaire en comparaison aux cellules contrôles.

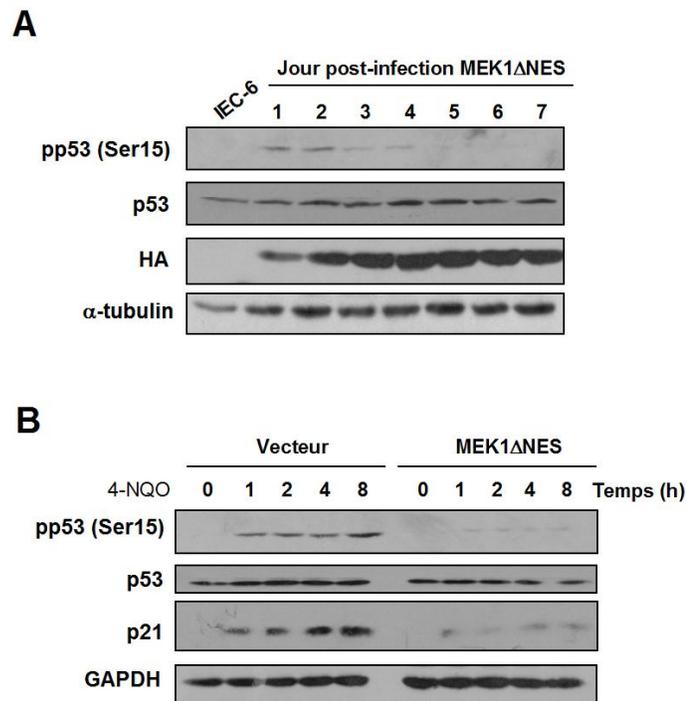


Figure 9.5. Diminution de la phosphorylation de la sérine de 15 p53 dans les cellules IEC-6-MEK1-nucléaire. A) Immunobuvardage des cellules IEC-6 à différents jours post-infection avec la construction MEK1ΔNES. B) Immunobuvardage des cellules contrôles et IEC-6-MEK1-nucléaire traitées au 4-NQO (1μM) à différent temps.

Ainsi, nos résultats ont également illustré l'implication de l'hyperactivation de la voie de signalisation de MEK/ERK1/2 dans la diminution de l'activité de p53. La dérégulation de la voie de RAS avait précédemment été associée avec l'inactivation de p53 dans des cellules SW480 [690]. La diminution de l'activation de la voie de p53 dans les cellules exprimant MEK1-nucléaire et IEC-6-H-Ras^{V12}, est par ailleurs tout à fait cohérente avec la survie et la propagation des cellules tétra/aneuploïdes que nous observons dans notre modèle. Les mécanismes qui y sont associés demeurent toutefois à caractériser.

9.3 L'implication potentielle de MEK/ERK1/2 dans la régulation de la mitose

Les défauts mitotiques qui sont observés dès les 15 premières minutes suivant l'inhibition de ERK1/2 par le PD184352 sont impressionnants. Le phénotype le plus marqué est celui des défauts de la cytokinèse, mais un mauvais alignement des chromosomes en métaphase, ainsi qu'une absence de décondensation des chromosomes, suivant la complétion de la mitose, sont aussi observés. Afin de découvrir de nouveaux substrats de ERK1/2 impliqués dans la régulation de la mitose, des analyses phosphoprotéomiques par spectrométrie de masse ont été initiées. Les analyses préliminaires de spectrométrie de masse, sur les cellules IEC-6 exponentielles et traitées au PD184352 (5 μ M) durant une heure, ont permis d'identifier certains candidats. Bien sûr, ce projet en est à ses balbutiements, mais des régulateurs associés à l'alignement des chromosomes en métaphase, la formation du fuseau mitotique, des centrosomes, la nucléation des microtubules, la condensation et décondensation des chromosomes, la séparation des chromatides sœurs, de même que l'ingression et l'abscission du sillon de clivage ont été mis en relief.

Parmi ces candidats, la Topoisomérase II (Topo II) ainsi que la sous-unité H2 des complexes des condensines non-SMC (Ncaph2), ont été mis en mis en relief lors des

analyses phosphoprotéomiques. Tel que décrit à la figure 8,5, suivant le traitement avec le PD184352, de la tétraploïdie est générée par une non-séparation des chromosomes en anaphase. Ceci pourrait être dû à des défauts du fuseau mitotique ou, encore, à un mauvais attachement des microtubules aux kinétochores. Toutefois, le problème semble davantage associé à un défaut de condensation/décondensation des chromosomes. Il est possible que l'inhibition soutenue de ERK1/2 interfère directement avec la régulation des condensines et de la Topoisomérase. Il a été rapporté que lors de défauts de la prométaphase, la condensine I engendre une hyper condensation des chromosomes qui perdure au-delà de la terminaison de la mitose [691], un défaut que nous observons d'ailleurs dans plus de 20% des cellules ayant complété leur division. D'autres travaux ont par la suite associé la modification de l'acétylation des histones avec des catastrophes mitotiques. L'inhibition des acétyltrasférases des histones (HAT) par shRNA a réduit les niveaux des sous-unités des condensines, engendrant alors des aberrations à la transition métaphase/anaphase [692]. Également, il a été montré, à l'aide de mutants de la Topoisomérase II, qu'une dérégulation de son activité engendre des erreurs et même une absence de ségrégation en anaphase. Les chromosomes demeuraient condensés, durant plusieurs heures suivant la pseudo-anaphase [693] : un phénotype très semblable à ce que nous observons. Des interactions directes de ERK avec la Topo II, dans un contexte de réorganisation de la chromatine, ont déjà été décrites [204]. La Topo II et Ncaph2, font partis des candidats mis en évidence lors de nos analyses de spectrométrie de masse. Il serait donc possible que l'inhibition de l'activation de ERK1/2 par le PD184352 ait un effet sur la condensation des chromosomes via ces deux régulateurs; cela reste à vérifier.

En résumé, plusieurs travaux avaient précédemment montré que l'activation soutenue de ERK1/2 est associée à la stabilisation de c-myc, l'induction de la Cyclin D1 et à la diminution des gènes anti-prolifératifs tels que Tob1 et JunD [230, 513]. Nous avons observé que l'expression de mutants constitutivement actif ou nucléaire de MEK1 ou de H-Ras^{V12} dans les cellules IEC-6, induit une augmentation de la phosphorylation de ERK1/2 (figure 5.S3). Une élévation de l'expression de Cyclin D1, Cyclin E1 et de c-myc de même

qu'une diminution de Tob1 et des inhibiteurs du cycle cellulaire, p21 et p27, ont également été observées dans ces lignées. Ces modulations ont été associées à une augmentation de la prolifération cellulaire et à l'initiation de la transformation tumorigénique, tel qu'illustré dans les chapitres précédents.

La dérégulation de c-myc a été associée à l'aneuploïdie et l'instabilité génomique. Il a été montré que la surexpression de c-myc est suffisante pour outrepasser l'arrêt du cycle cellulaire induit par p53, inhiber p21 et p27 et augmenter l'expression des complexes Cyclin E/cdk2 et Cyclin D/cdk4 (revue dans [694]). La surexpression de c-myc que nous observons dans les cellules IEC-6-H-Ras^{V12}, -MEK1DD, -MEK1ΔNES (non montré) pourrait donc être associée à l'instabilité génomique et à la tétraploïdie. L'augmentation d'expression de Cyclin E pourrait également contribuer à la l'aneuploïdie que nous observons. Il a été montré que la surexpression de Cycline E affecte également le déroulement de la prométaphase, engendre des alignements incomplets des chromosomes sur la plaque équatoriale et des erreurs de ségrégations des chromosomes. Ces aberrations mitotiques peuvent mener à l'aneuploïdie et à la CIN [695].

Ceci étant dit, tel que décrit au chapitre six, Aurora A semble être l'acteur principal du phénotype d'aneuploïdie et de la CIN que nous observons dans les cellules IEC-6-H-Ras^{V12}. Une réduction partielle du niveau d'expression de Aurora A par shRNA ou par l'inhibiteur MEK1/2, le PD184352, est suffisante pour réduire les aberrations mitotiques et l'aneuploïdie induites par H-Ras^{V12}. Tel que décrit dans les sections précédentes, l'implication de ERK1/2 dans la régulation de la mitose demeure controversé. Il a toutefois été démontré que l'expression ectopique de E2F3, une cible de ERK1/2, induit l'expression de Aurora A en G2/M. Inversement, le knockdown de E2F3 a été associé à une diminution de l'ARNm et une inhibition de l'expression de Aurora A [696]. Nous avons observé une augmentation de l'expression de E2F3 dans les cellules IEC-6-Ras^{V12} -MEK1DD et -MEK1ΔNES (non montré), ceci pourrait peut-être expliquer la surexpression de Aurora A.

9.4 Perspectives

9.4.1 Le développement d'inhibiteurs de MEK/ERK1/2 pour le traitement du cancer

À la lumière des résultats présentés dans cette thèse, l'idée de développer des inhibiteurs de MEK1/2, pour le traitement du cancer, apparaît être un choix rationnel et judicieux. Tel que décrit dans le chapitre deux, la voie de signalisation de Ras/Raf/MEK/ERK1/2 joue un rôle central dans le contrôle de la prolifération, de la survie cellulaire, de la motilité, de l'invasion, de l'angiogénèse et de l'établissement des métastases. Également, une activation aberrante des récepteurs tyrosine kinases, tels que le récepteur de l'EGF, résultat d'une amplification du gène ou de mutations gains de fonction, est observée dans plusieurs carcinomes et tumeurs cérébrales [272, 697]. Les mutations activatrices de RAS et RAF [1, 19], aussi observées dans plusieurs cancers, mènent à l'activation de MEK et ERK. Et bien que MEK1/2 soient rarement mutés dans les cancers et qu'aucune mutation de ERK n'ait encore été observée, l'hyperactivation de MEK et ERK dans les tumeurs solides et les leucémies est largement documentée (revue dans [31]).

Outre l'hyperactivation de la voie de signalisation, une inhibition des régulateurs négatifs est également observée dans les malignités. Par exemple, RKIP1 (Raf kinase inhibitor protein1) qui inhibe l'activation de MEK par RAF, est considéré comme un suppresseur de tumeurs [698]. La perte d'expression de RKIP a été rapportée dans plusieurs types de cancers et son inhibition est d'ailleurs associée à la progression métastatique de plusieurs tumeurs épithéliales [280-284]. La diminution d'expression de RKIP, dans les cancers colorectaux, est même un prédictateur indépendant de la récurrence des métastases et de la survie à court terme des patients [280, 282]. La perte de SPROUTY, un autre régulateur négatif des MAP kinases ERK1/2, est aussi un événement commun à plusieurs types de cancer [291-293]. La protéine SPRED (SPROUTY-related enabled/vasodilator-stimulated phosphoprotein homology 1 domain-containing), qui forme un complexe entre RAS et RAF, prévient l'accès de RAF à MEK et, par conséquent, empêche son activation [699]. SPRED est un puissant régulateur négatif de la signalisation des MAP kinases

ERK1/2 et régule plusieurs fonctions biologiques, tels que, la croissance, la différenciation et la migration cellulaire [700]. La diminution de l'expression de SPRED dans les cancers hépatiques est associée avec la malignité, une augmentation de l'invasion et la formation de métastases. Il a d'ailleurs été démontré que la réexpression de SPRED, dans des lignées de cancer du foie, inhibe leur capacité à former des tumeurs *in vivo* [701].

Actuellement, les inhibiteurs de MEK1/2 inhibent MEK de façon non compétitive à l'ATP ou à ERK1/2. Des études structurelles ont révélé que le PD184532, ainsi que ses analogues, se lie à une poche hydrophobique adjacente (sans empiéter sur cette région) au site de liaison Mg-ATP de MEK1 et MEK2. La liaison de la molécule inhibitrice induit alors un changement de conformation de MEK1/2 non phosphorylés, qui bloque ainsi les kinases sous une forme catalytiquement inactive [21]. Cette séquence se situe dans une région très peu similaire aux autres kinases (excepté MEK5), rendant donc l'inhibition de MEK1 et MEK2 très spécifique [319].

Un autre avantage à cibler MEK1/2 est que ERK1 et ERK2 sont les deux seules cibles connues de MEK1/2: l'inhibition de la voie est donc très spécifique. Également, l'inhibition du sentier Raf/MEK/ERK, par des inhibiteurs spécifiques à MEK1/2, ne requiert pas la détermination précise des altérations génétiques responsables de l'activation de la voie, que se soit des mutations activatrices de RAS ou RAF, toutes deux convergent vers MEK1/2. De plus, le sentier de Raf/MEK/ERK est un point de convergence de plusieurs autres voies de signalisation. L'inhibition de MEK, à elle seule, permet donc de bloquer plus d'une voie à la fois [374, 384, 702].

L'idée de cibler la voie de MEK/ERK1/2 pour le traitement du cancer apparaît donc prometteuse. De nombreuses études pré-cliniques ont démontré que l'inhibition de la voie de signalisation de ERK1/2, par des inhibiteurs de MEK1/2, permet la réduction de la prolifération de cellules leucémiques et d'une variété de carcinomes en arrêtant le cycle cellulaire et en induisant l'apoptose [319, 408, 482, 703]. À titre d'exemple, l'AZD6244, un inhibiteur de MEK1/2 de deuxième génération, a démontré des propriétés anti-tumorales

dans de nombreux modèles de xénogreffes, tels que des tumeurs du côlon, du pancréas, du foie, du poumon et de la peau [374, 384]. L'AZD6244 est actuellement en étude clinique phase II chez des patients atteints de cancers avancés [388]. L'utilisation de l'AZD6244, pour le traitement de cancers de la vésicule biliaire avancés, a donné des réponses positives chez 12 % des patients et a permis de stabiliser la progression de la maladie dans 68% des cas. Une augmentation de la survie globale de quatre mois a d'ailleurs été observée [387].

Le RO5068760, un inhibiteur de MEK1/2, non compétitif à l'ATP, fait partie d'une nouvelle classe. Le RO5068760 possède une structure unique qui bloque MEK, sous une forme inactive et prévient son activation subséquente. Ce composé a montré des effets antitumoraux dans de multiples modèles de xénogreffe, tels que les cancers du côlon, du sein, du pancréas et de mélanome, arborant des mutations activatrices de *BRAF* [385, 401]. Le CH4987655 est un tout nouvel inhibiteur de MEK, possédant des propriétés pharmacocinétiques particulièrement intéressantes, dont une grande stabilité métabolique et une dissociation lente de MEK. Le CH4987655 a démontré des effets antitumoraux remarquables dans plusieurs modèles de xénogreffes humaines, tels que les cancers colorectal, pancréatique et pulmonaire, arborant des mutations activatrices de *BRAF* ou *KRAS*. De plus, aucune inhibition de MEK1/2 n'a été observée dans le cerveau des souris, ce qui signifie une faible toxicité au niveau du système nerveux central. Des effets secondaires importants ont été rapportés avec d'autres inhibiteurs de MEK1/2. Une étude clinique de phase I avec le CH4987655 est actuellement en cours avec des patients atteints de tumeurs solides [403].

En résumé, une cible thérapeutique de choix doit : i) jouer un rôle prépondérant dans le processus de tumorigénèse; ii) être surexprimée ou suractivée et cet état doit être associé avec un mauvais pronostic pour la survie du patient; iii) l'inhibition de cette cible doit être associée avec une diminution de la croissance tumorale ou l'induction de l'apoptose; iv) elle doit être facile à cibler, c'est-à-dire facile à inhiber par de petites molécules ou des anticorps, comme par exemple une enzyme ou un récepteur de surface; v) elle doit être très peu ou pas du tout exprimée dans des cellules normales, afin que son

inhibition ait un minimum d'effet sur les fonctions des cellules saines [704] vi) et finalement, son inhibition ne doit pas engendrer de résistance. Ainsi, MEK1/2 correspondent aux nombreuses caractéristiques de la cible parfaite, exception faite du cinquième point. Voici des suggestions qui pourraient permettre de surmonter ce défaut.

9.4.2 Le développement d'inhibiteurs de l'import nucléaire de MEK

Le présent projet de doctorat a mis en relief un autre aspect de la signalisation des MAP kinases ERK1/2, soit l'importance de la localisation subcellulaire de MEK dans le processus de tumorigénèse. La localisation aberrante de MEK dans le noyau est suffisante pour induire la transformation oncogénique, la CIN et l'aneuploïdie. Nous suggérons donc que le développement d'inhibiteurs de l'import nucléaire de MEK pourrait être une avenue thérapeutique intéressante.

Tel que démontré par la surexpression de PEA-15 [173] ou de Sef [129, 158], la séquestration de ERK dans le cytoplasme n'empêche pas l'activation de ses cibles cytoplasmiques. Étant donnée l'implication des MAP kinases ERK1/2 dans une pléthore de processus physiologiques, leur inhibition est associée à l'altération de nombreux processus biologiques et engendre plusieurs effets secondaires, tels que la fatigue, la diarrhée, la nausée, le vomissement, le prurit et les éruptions cutanées. L'AZD6244 et le PD325901 ont aussi été associés à des troubles de la vision [372]. Bien que les nouveaux inhibiteurs, tels que le RO5068760 et le CH4987655, permettent une réduction des effets secondaires graves, des effets indésirables persistent [401, 403]. L'inhibition de l'activité de MEK, au niveau du noyau plutôt que dans toute la cellule, pourrait peut-être s'avérer une solution. L'idée de développer des inhibiteurs de l'import nucléaire de MEK/ERK1/2, plutôt que de leur activité totale, pourrait s'avérer moins dévastatrice et toxique.

9.4.2.1 L'utilisation de molécules bloquant la dégradation de Sef

L'utilisation de molécules capables de stabiliser les niveaux de Sef pourrait être une avenue thérapeutique intéressante dans le traitement du cancer colorectal. Tel que décrit au chapitre cinq, la réexpression de Sef, dans les lignées de cancer du côlon ou des cellules

exprimant une forme oncogénique de RAS, restaure la localisation cytoplasmique de MEK et ERK activés, réduit la prolifération, diminue l'aneuploïdie et inhibe même la capacité de former des tumeurs.

L'approbation du Velcade (bortezomib), pour le traitement des myélomes multiples, a suscité un engouement pour la création de molécules ciblant la voie de dégradation dépendante de l'ubiquitine par le protéasome (USP). Toutefois, le traitement au bortezomib est associé à une importante toxicité en raison de son action à large spectre [705]. Les ligases E3 représentent un meilleur choix que le protéasome en raison du nombre plus restreint de leurs substrats. Développer un inhibiteur d'une E3 spécifique à Sef pourrait donc s'avérer pertinent pour le traitement du cancer colorectal.

Ceci étant dit, quelles que soient les molécules inhibitrices de MEK1/2 utilisées pour le traitement du cancer colorectal (inhibition de l'activité de MEK ou de son entrée au noyau), l'utilisation en thérapie combinée s'avèrerait avantageuse. Tel que décrit au chapitre deux, les molécules inhibitrices des signaux de transduction sont cytostatiques plutôt que cytotoxiques et, de plus, les cellules cancéreuses peuvent être affublées de dérégulation de plusieurs voies de signalisation. La combinaison d'inhibiteurs de MEK avec d'autres chimiothérapies ou radiothérapie pourrait être la solution. Des résultats probants ont récemment été rapportés dans un modèle de xéno greffe de cancer colorectal avec des cellules HCT116. La combinaison d'inhibiteurs de MEK (CH4987655) et de mTOR (everolimus), en traitements oraux, a engendré un effet synergique très impressionnant sur la régression tumorale [403].

9.5 Conclusion

En conclusion, ces travaux de doctorat ont permis une meilleure compréhension de l'implication de la voie de signalisation de Ras/Raf/MEK/ERK1/2 dans la tumorigénèse colorectale. Nous avons mis en évidence, pour la première fois, que l'expression de MEK1

ou MEK2 activés est suffisante pour induire la transformation de cellules intestinales épithéliales. Par ailleurs, nous avons démontré que l'inhibition de l'isoforme de MEK2 réduit considérablement la prolifération de lignées cellulaires de cancer du côlon, alors que l'inhibition de MEK1 a peu d'effet sur la prolifération.

Nous avons également démontré l'importance de la régulation spatiale de MEK/ERK1/2 dans la transformation oncogénique. Une analyse, de plus de 400 tumeurs colorectales humaines, a révélé une localisation aberrante de MEK1/2 phosphorylés dans le noyau dans 79% des tumeurs, par rapport à 4% dans les tissus normaux. Le projet de doctorat a démontré que cette localisation anormale de phospho-MEK1/2 est un élément majeur du processus de tumorigénèse colorectale. Nous avons montré que la localisation forcée de MEK1 dans le noyau engendre une augmentation de prolifération, une capacité à induire des tumeurs, une dérégulation du cycle cellulaire ainsi que de la tétraploïdie, de l'aneuploïdie et de la CIN.

La caractérisation des mécanismes responsables de cette localisation aberrante de MEK1/2 phosphorylés a permis d'identifier la protéine Sef, un régulateur de la localisation cytoplasmique de MEK1/2 et du complexe MEK/ERK1/2. L'analyse immunohistochimique de tumeurs colorectales humaines a d'ailleurs permis d'établir que l'accumulation nucléaire de phospho-MEK1/2 corrèle avec le grade des tumeurs. Plus encore, l'augmentation de phospho-MEK1/2 dans le noyau est inversement corrélée avec l'expression de Sef. Nous avons aussi démontré que l'expression d'une forme oncogénique de Ras (H-Ras^{V12}) inhibe l'expression de Sef, engendrant alors une accumulation nucléaire de MEK1/2 activés. De plus, la réexpression de Sef, dans les cellules IEC-6-H-Ras^{V12}, est suffisante pour restaurer la localisation cytoplasmique de MEK1/2, diminuer les propriétés tumorigéniques ainsi que l'aneuploïdie induite par Ras activé.

Finalement, la caractérisation des mécanismes menant à l'aneuploïdie a révélé que l'activation soutenue de la signalisation de MEK/ERK1/2, par l'expression de Ras

oncogénique ou des mutants de MEK, dérégule l'expression et la localisation de Aurora A et des CPCs, qui sont d'importants régulateurs mitotiques. Ces dérégulations interfèrent avec le déroulement de la mitose, produisent des défauts au niveau de la prométaphase et de la cytokinèse et engendrent la formation de micronoyaux, de cellules binucléées et d'autres aberrations mitotiques. L'inhibition partielle de l'activation de ERK1/2 dans les cellules IEC-6-H-Ras^{V12}, par de faibles doses de PD184352, réduit les anomalies mitotiques et l'aneuploïdie. Ces découvertes ont démontré, pour la première fois, un lien direct entre la signalisation de MEK/ERK1/2, la CIN ainsi que l'aneuploïdie dans un modèle de cancer colorectal. Ces résultats renforcent l'idée que la dérégulation de l'activité MEK/ERK1/2 joue un rôle prépondérant dans la tumorigénèse colorectale et mettent en relief l'importance de la localisation des membres du sentier MEK/ERK1/2 dans la transformation oncogénique.

En conclusion, ces découvertes ont non seulement permis de répondre aux questions et objectifs proposés pour le présent projet de doctorat, mais ouvrent également la voie à de nouveaux projets de recherche. D'abord, l'étude des mécanismes associés à l'inhibition de Sef, qui est observée dans les tumeurs colorectales, serait pertinente. Également, la détermination d'une potentielle implication de la voie de signalisation de MEK/ERK1/2 dans la régulation de la mitose serait intéressante, de même que la caractérisation des mécanismes associés à la dérégulation de Aurora A et d'autres régulateurs de la mitose, par la voie de MEK/ERK1/2. Des analyses de spectrométrie de masse ont d'ailleurs été initiées dans ce sens. La caractérisation du phénotype inflammatoire du colon et de l'hyperkératinisation stomacale observée dans les souris transgéniques MEK2DD/Villin sont également à compléter. Et, à plus long terme, le développement d'inhibiteurs de l'import nucléaire de MEK1/2, plutôt que de son activité, pour le traitement du cancer colorectal, pourrait s'avérer prometteur.

BIBLIOGRAPHIE

1. Schubbert, S., Shannon, K., and Bollag, G. (2007). Hyperactive Ras in developmental disorders and cancer. *Nat Rev Cancer* 7, 295-308.
2. Mitin, N., Rossman, K.L., and Der, C.J. (2005). Signaling interplay in Ras superfamily function. *Curr Biol* 15, R563-574.
3. Repasky, G.A., Chenette, E.J., and Der, C.J. (2004). Renewing the conspiracy theory debate: does Raf function alone to mediate Ras oncogenesis? *Trends Cell Biol* 14, 639-647.
4. Downward, J. (2003). Targeting RAS signalling pathways in cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 3, 11-22.
5. Barbacid, M. (1987). ras genes. *Annu Rev Biochem* 56, 779-827.
6. Ehrhardt, A., Ehrhardt, G.R., Guo, X., and Schrader, J.W. (2002). Ras and relatives- job sharing and networking keep an old family together. *Exp Hematol* 30, 1089-1106.
7. Bos, J.L. (1989). ras oncogenes in human cancer: a review. *Cancer Res* 49, 4682-4689.
8. Trahey, M., and McCormick, F. (1987). A cytoplasmic protein stimulates normal N-ras p21 GTPase, but does not affect oncogenic mutants. *Science* 238, 542-545.
9. Bentires-Alj, M., Kontaridis, M.I., and Neel, B.G. (2006). Stops along the RAS pathway in human genetic disease. *Nat Med* 12, 283-285.
10. Narumi, Y., Aoki, Y., Niihori, T., Neri, G., Cave, H., Verloes, A., Nava, C., Kavamura, M.I., Okamoto, N., Kurosawa, K., et al. (2007). Molecular and clinical characterization of cardio-facio-cutaneous (CFC) syndrome: overlapping clinical manifestations with Costello syndrome. *Am J Med Genet A* 143A, 799-807.
11. Zhu, K., Hamilton, A.D., and Sebt, S.M. (2003). Farnesyltransferase inhibitors as anticancer agents: current status. *Curr Opin Investig Drugs* 4, 1428-1435.

12. Van Cutsem, E., van de Velde, H., Karasek, P., Oettle, H., Vervenne, W.L., Szawlowski, A., Schoffski, P., Post, S., Verslype, C., Neumann, H., et al. (2004). Phase III trial of gemcitabine plus tipifarnib compared with gemcitabine plus placebo in advanced pancreatic cancer. *J Clin Oncol* 22, 1430-1438.
13. Ma, W.W., and Adjei, A.A. (2009). Novel agents on the horizon for cancer therapy. *CA Cancer J Clin* 59, 111-137.
14. Bonner, T.I., Kerby, S.B., Sutrave, P., Gunnell, M.A., Mark, G., and Rapp, U.R. (1985). Structure and biological activity of human homologs of the raf/mil oncogene. *Mol Cell Biol* 5, 1400-1407.
15. Udell, C.M., Rajakulendran, T., Sicheri, F., and Therrien, M. (2011). Mechanistic principles of RAF kinase signaling. *Cell Mol Life Sci* 68, 553-565.
16. Plowman, S.J., Ariotti, N., Goodall, A., Parton, R.G., and Hancock, J.F. (2008). Electrostatic interactions positively regulate K-Ras nanocluster formation and function. *Mol Cell Biol* 28, 4377-4385.
17. Storm, S.M., Cleveland, J.L., and Rapp, U.R. (1990). Expression of raf family proto-oncogenes in normal mouse tissues. *Oncogene* 5, 345-351.
18. Clark, G.J., Drugan, J.K., Rossman, K.L., Carpenter, J.W., Rogers-Graham, K., Fu, H., Der, C.J., and Campbell, S.L. (1997). 14-3-3 zeta negatively regulates raf-1 activity by interactions with the Raf-1 cysteine-rich domain. *J Biol Chem* 272, 20990-20993.
19. Schreck, R., and Rapp, U.R. (2006). Raf kinases: oncogenesis and drug discovery. *Int J Cancer* 119, 2261-2271.
20. Wilhelm, S.M., Carter, C., Tang, L., Wilkie, D., McNabola, A., Rong, H., Chen, C., Zhang, X., Vincent, P., McHugh, M., et al. (2004). BAY 43-9006 exhibits broad spectrum oral antitumor activity and targets the RAF/MEK/ERK pathway and receptor tyrosine kinases involved in tumor progression and angiogenesis. *Cancer Res* 64, 7099-7109.
21. Ohren, J.F., Chen, H., Pavlovsky, A., Whitehead, C., Zhang, E., Kuffa, P., Yan, C., McConnell, P., Spessard, C., Banotai, C., et al. (2004). Structures of human MAP

- kinase kinase 1 (MEK1) and MEK2 describe novel noncompetitive kinase inhibition. *Nat Struct Mol Biol* *11*, 1192-1197.
22. Alessi, D.R., Saito, Y., Campbell, D.G., Cohen, P., Sithanandam, G., Rapp, U., Ashworth, A., Marshall, C.J., and Cowley, S. (1994). Identification of the sites in MAP kinase kinase-1 phosphorylated by p74raf-1. *EMBO J* *13*, 1610-1619.
 23. Schaeffer, H.J., and Weber, M.J. (1999). Mitogen-activated protein kinases: specific messages from ubiquitous messengers. *Mol Cell Biol* *19*, 2435-2444.
 24. Sontag, E., Fedorov, S., Kamibayashi, C., Robbins, D., Cobb, M., and Mumby, M. (1993). The interaction of SV40 small tumor antigen with protein phosphatase 2A stimulates the map kinase pathway and induces cell proliferation. *Cell* *75*, 887-897.
 25. Nantel, A., Mohammad-Ali, K., Sherk, J., Posner, B.I., and Thomas, D.Y. (1998). Interaction of the Grb10 adapter protein with the Raf1 and MEK1 kinases. *J Biol Chem* *273*, 10475-10484.
 26. Slack-Davis, J.K., Eblen, S.T., Zecevic, M., Boerner, S.A., Tarcasfalvi, A., Diaz, H.B., Marshall, M.S., Weber, M.J., Parsons, J.T., and Catling, A.D. (2003). PAK1 phosphorylation of MEK1 regulates fibronectin-stimulated MAPK activation. *J Cell Biol* *162*, 281-291.
 27. 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.
 28. Fukuda, M., Gotoh, Y., and Nishida, E. (1997). Interaction of MAP kinase with MAP kinase kinase: its possible role in the control of nucleocytoplasmic transport of MAP kinase. *EMBO J* *16*, 1901-1908.
 29. Rubinfeld, H., Hanoch, T., and Seger, R. (1999). Identification of a cytoplasmic-retention sequence in ERK2. *J Biol Chem* *274*, 30349-30352.
 30. Adachi, M., Fukuda, M., and Nishida, E. (2000). Nuclear export of MAP kinase (ERK) involves a MAP kinase kinase (MEK)-dependent active transport mechanism. *J Cell Biol* *148*, 849-856.

31. Sebolt-Leopold, J.S., and Herrera, R. (2004). Targeting the mitogen-activated protein kinase cascade to treat cancer. *Nat Rev Cancer* 4, 937-947.
32. Marks, J.L., Gong, Y., Chitale, D., Golas, B., McLellan, M.D., Kasai, Y., Ding, L., Mardis, E.R., Wilson, R.K., Solit, D., et al. (2008). Novel MEK1 mutation identified by mutational analysis of epidermal growth factor receptor signaling pathway genes in lung adenocarcinoma. *Cancer Res* 68, 5524-5528.
33. Estep, A.L., Palmer, C., McCormick, F., and Rauen, K.A. (2007). Mutation analysis of BRAF, MEK1 and MEK2 in 15 ovarian cancer cell lines: implications for therapy. *PLoS One* 2, e1279.
34. Murugan, A.K., Dong, J., Xie, J., and Xing, M. (2009). MEK1 mutations, but not ERK2 mutations, occur in melanomas and colon carcinomas, but none in thyroid carcinomas. *Cell Cycle* 8, 2122-2124.
35. Senawong, T., Phuchareon, J., Ohara, O., McCormick, F., Rauen, K.A., and Tetsu, O. (2008). Germline mutations of MEK in cardio-facio-cutaneous syndrome are sensitive to MEK and RAF inhibition: implications for therapeutic options. *Hum Mol Genet* 17, 419-430.
36. Nava, C., Hanna, N., Michot, C., Pereira, S., Pouvreau, N., Niihori, T., Aoki, Y., Matsubara, Y., Arveiler, B., Lacombe, D., et al. (2007). Cardio-facio-cutaneous and Noonan syndromes due to mutations in the RAS/MAPK signalling pathway: genotype-phenotype relationships and overlap with Costello syndrome. *J Med Genet* 44, 763-771.
37. Ray, L.B., and Sturgill, T.W. (1987). Rapid stimulation by insulin of a serine/threonine kinase in 3T3-L1 adipocytes that phosphorylates microtubule-associated protein 2 in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84, 1502-1506.
38. Boulton, T.G., Yancopoulos, G.D., Gregory, J.S., Slaughter, C., Moomaw, C., Hsu, J., and Cobb, M.H. (1990). An insulin-stimulated protein kinase similar to yeast kinases involved in cell cycle control. *Science* 249, 64-67.
39. 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.

40. Yung, Y., Yao, Z., Hanoch, T., and Seger, R. (2000). ERK1b, a 46-kDa ERK isoform that is differentially regulated by MEK. *J Biol Chem* 275, 15799-15808.
41. 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.
42. Payne, D.M., Rossomando, A.J., Martino, P., Erickson, A.K., Her, J.H., Shabanowitz, J., Hunt, D.F., Weber, M.J., and Sturgill, T.W. (1991). Identification of the regulatory phosphorylation sites in pp42/mitogen-activated protein kinase (MAP kinase). *EMBO J* 10, 885-892.
43. Chuderland, D., and Seger, R. (2005). Protein-protein interactions in the regulation of the extracellular signal-regulated kinase. *Mol Biotechnol* 29, 57-74.
44. 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.
45. Chang, C.I., Xu, B.E., Akella, R., Cobb, M.H., and Goldsmith, E.J. (2002). Crystal structures of MAP kinase p38 complexed to the docking sites on its nuclear substrate MEF2A and activator MKK3b. *Mol Cell* 9, 1241-1249.
46. Jacobs, D., Glossip, D., Xing, H., Muslin, A.J., and Kornfeld, K. (1999). Multiple docking sites on substrate proteins form a modular system that mediates recognition by ERK MAP kinase. *Genes Dev* 13, 163-175.
47. Robbins, D.J., and Cobb, M.H. (1992). Extracellular signal-regulated kinases 2 autophosphorylates on a subset of peptides phosphorylated in intact cells in response to insulin and nerve growth factor: analysis by peptide mapping. *Mol Biol Cell* 3, 299-308.
48. Ui, M., and Katada, T. (1990). Bacterial toxins as probe for receptor-Gi coupling. *Adv Second Messenger Phosphoprotein Res* 24, 63-69.

49. Gutkind, J.S. (1998). The pathways connecting G protein-coupled receptors to the nucleus through divergent mitogen-activated protein kinase cascades. *J Biol Chem* 273, 1839-1842.
50. van Biesen, T., Luttrell, L.M., Hawes, B.E., and Lefkowitz, R.J. (1996). Mitogenic signaling via G protein-coupled receptors. *Endocr Rev* 17, 698-714.
51. Crespo, P., Xu, N., Simonds, W.F., and Gutkind, J.S. (1994). Ras-dependent activation of MAP kinase pathway mediated by G-protein beta gamma subunits. *Nature* 369, 418-420.
52. Lopez-Illasaca, M., Crespo, P., Pellici, P.G., Gutkind, J.S., and Wetzker, R. (1997). Linkage of G protein-coupled receptors to the MAPK signaling pathway through PI 3-kinase gamma. *Science* 275, 394-397.
53. Burgering, B.M., de Vries-Smits, A.M., Medema, R.H., van Weeren, P.C., Tertoolen, L.G., and Bos, J.L. (1993). Epidermal growth factor induces phosphorylation of extracellular signal-regulated kinase 2 via multiple pathways. *Mol Cell Biol* 13, 7248-7256.
54. Berra, E., Diaz-Meco, M.T., Lozano, J., Frutos, S., Municio, M.M., Sanchez, P., Sanz, L., and Moscat, J. (1995). Evidence for a role of MEK and MAPK during signal transduction by protein kinase C zeta. *EMBO J* 14, 6157-6163.
55. Daub, H., Weiss, F.U., Wallasch, C., and Ullrich, A. (1996). Role of transactivation of the EGF receptor in signalling by G-protein-coupled receptors. *Nature* 379, 557-560.
56. Vossler, M.R., Yao, H., York, R.D., Pan, M.G., Rim, C.S., and Stork, P.J. (1997). cAMP activates MAP kinase and Elk-1 through a B-Raf- and Rap1-dependent pathway. *Cell* 89, 73-82.
57. Schlessinger, J. (2000). Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* 103, 211-225.
58. Plotnikov, A.N., Hubbard, S.R., Schlessinger, J., and Mohammadi, M. (2000). Crystal structures of two FGF-FGFR complexes reveal the determinants of ligand-receptor specificity. *Cell* 101, 413-424.

59. Pawson, T., Gish, G.D., and Nash, P. (2001). SH2 domains, interaction modules and cellular wiring. *Trends Cell Biol* *11*, 504-511.
60. Li, N., Batzer, A., Daly, R., Yajnik, V., Skolnik, E., Chardin, P., Bar-Sagi, D., Margolis, B., and Schlessinger, J. (1993). Guanine-nucleotide-releasing factor hSos1 binds to Grb2 and links receptor tyrosine kinases to Ras signalling. *Nature* *363*, 85-88.
61. Kolch, W. (2000). Meaningful relationships: the regulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by protein interactions. *Biochem J* *351 Pt 2*, 289-305.
62. Humphries, M.J. (2000). Integrin structure. *Biochem Soc Trans* *28*, 311-339.
63. Hynes, R.O. (2002). Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell* *110*, 673-687.
64. Aplin, A.E., Short, S.M., and Juliano, R.L. (1999). Anchorage-dependent regulation of the mitogen-activated protein kinase cascade by growth factors is supported by a variety of integrin alpha chains. *J Biol Chem* *274*, 31223-31228.
65. Lin, T.H., Chen, Q., Howe, A., and Juliano, R.L. (1997). Cell anchorage permits efficient signal transduction between ras and its downstream kinases. *J Biol Chem* *272*, 8849-8852.
66. Miyamoto, S., Teramoto, H., Gutkind, J.S., and Yamada, K.M. (1996). Integrins can collaborate with growth factors for phosphorylation of receptor tyrosine kinases and MAP kinase activation: roles of integrin aggregation and occupancy of receptors. *J Cell Biol* *135*, 1633-1642.
67. Renshaw, M.W., Ren, X.D., and Schwartz, M.A. (1997). Growth factor activation of MAP kinase requires cell adhesion. *EMBO J* *16*, 5592-5599.
68. Schlaepfer, D.D., Hanks, S.K., Hunter, T., and van der Geer, P. (1994). Integrin-mediated signal transduction linked to Ras pathway by GRB2 binding to focal adhesion kinase. *Nature* *372*, 786-791.
69. Wary, K.K., Mariotti, A., Zurzolo, C., and Giancotti, F.G. (1998). A requirement for caveolin-1 and associated kinase Fyn in integrin signaling and anchorage-dependent cell growth. *Cell* *94*, 625-634.

70. Schlaepfer, D.D., Jones, K.C., and Hunter, T. (1998). Multiple Grb2-mediated integrin-stimulated signaling pathways to ERK2/mitogen-activated protein kinase: summation of both c-Src- and focal adhesion kinase-initiated tyrosine phosphorylation events. *Mol Cell Biol* 18, 2571-2585.
71. Lin, T.H., Aplin, A.E., Shen, Y., Chen, Q., Schaller, M., Romer, L., Aukhil, I., and Juliano, R.L. (1997). Integrin-mediated activation of MAP kinase is independent of FAK: evidence for dual integrin signaling pathways in fibroblasts. *J Cell Biol* 136, 1385-1395.
72. Howe, A.K., and Juliano, R.L. (1998). Distinct mechanisms mediate the initial and sustained phases of integrin-mediated activation of the Raf/MEK/mitogen-activated protein kinase cascade. *J Biol Chem* 273, 27268-27274.
73. Bagrodia, S., and Cerione, R.A. (1999). Pak to the future. *Trends Cell Biol* 9, 350-355.
74. del Pozo, M.A., Price, L.S., Alderson, N.B., Ren, X.D., and Schwartz, M.A. (2000). Adhesion to the extracellular matrix regulates the coupling of the small GTPase Rac to its effector PAK. *EMBO J* 19, 2008-2014.
75. Howe, A.K., and Juliano, R.L. (2000). Regulation of anchorage-dependent signal transduction by protein kinase A and p21-activated kinase. *Nat Cell Biol* 2, 593-600.
76. Aplin, A.E., Stewart, S.A., Assoian, R.K., and Juliano, R.L. (2001). Integrin-mediated adhesion regulates ERK nuclear translocation and phosphorylation of Elk-1. *J Cell Biol* 153, 273-282.
77. Farooq, A., and Zhou, M.M. (2004). Structure and regulation of MAPK phosphatases. *Cell Signal* 16, 769-779.
78. Theodosiou, A., and Ashworth, A. (2002). MAP kinase phosphatases. *Genome Biol* 3, REVIEWS3009.
79. Wu, J.J., Zhang, L., and Bennett, A.M. (2005). The noncatalytic amino terminus of mitogen-activated protein kinase phosphatase 1 directs nuclear targeting and serum response element transcriptional regulation. *Mol Cell Biol* 25, 4792-4803.

80. Mandl, M., Slack, D.N., and Keyse, S.M. (2005). Specific inactivation and nuclear anchoring of extracellular signal-regulated kinase 2 by the inducible dual-specificity protein phosphatase DUSP5. *Mol Cell Biol* 25, 1830-1845.
81. Karlsson, M., Mathers, J., Dickinson, R.J., Mandl, M., and Keyse, S.M. (2004). Both nuclear-cytoplasmic shuttling of the dual specificity phosphatase MKP-3 and its ability to anchor MAP kinase in the cytoplasm are mediated by a conserved nuclear export signal. *J Biol Chem* 279, 41882-41891.
82. Muda, M., Theodosiou, A., Gillieron, C., Smith, A., Chabert, C., Camps, M., Boschert, U., Rodrigues, N., Davies, K., Ashworth, A., et al. (1998). The mitogen-activated protein kinase phosphatase-3 N-terminal noncatalytic region is responsible for tight substrate binding and enzymatic specificity. *J Biol Chem* 273, 9323-9329.
83. Camps, M., Nichols, A., Gillieron, C., Antonsson, B., Muda, M., Chabert, C., Boschert, U., and Arkinstall, S. (1998). Catalytic activation of the phosphatase MKP-3 by ERK2 mitogen-activated protein kinase. *Science* 280, 1262-1265.
84. Brondello, J.M., Pouyssegur, J., and McKenzie, F.R. (1999). Reduced MAP kinase phosphatase-1 degradation after p42/p44MAPK-dependent phosphorylation. *Science* 286, 2514-2517.
85. Douville, E., and Downward, J. (1997). EGF induced SOS phosphorylation in PC12 cells involves P90 RSK-2. *Oncogene* 15, 373-383.
86. Dougherty, M.K., Muller, J., Ritt, D.A., Zhou, M., Zhou, X.Z., Copeland, T.D., Conrads, T.P., Veenstra, T.D., Lu, K.P., and Morrison, D.K. (2005). Regulation of Raf-1 by direct feedback phosphorylation. *Mol Cell* 17, 215-224.
87. Brunet, A., Pages, G., and Pouyssegur, J. (1994). Growth factor-stimulated MAP kinase induces rapid retrophosphorylation and inhibition of MAP kinase kinase (MEK1). *FEBS Lett* 346, 299-303.
88. Eblen, S.T., Slack-Davis, J.K., Tarcsafalvi, A., Parsons, J.T., Weber, M.J., and Catling, A.D. (2004). Mitogen-activated protein kinase feedback phosphorylation regulates MEK1 complex formation and activation during cellular adhesion. *Mol Cell Biol* 24, 2308-2317.

89. Sundberg-Smith, L.J., Doherty, J.T., Mack, C.P., and Taylor, J.M. (2005). Adhesion stimulates direct PAK1/ERK2 association and leads to ERK-dependent PAK1 Thr212 phosphorylation. *J Biol Chem* 280, 2055-2064.
90. Gopalbhai, K., Jansen, G., Beauregard, G., Whiteway, M., Dumas, F., Wu, C., and Meloche, S. (2003). Negative regulation of MAPKK by phosphorylation of a conserved serine residue equivalent to Ser212 of MEK1. *J Biol Chem* 278, 8118-8125.
91. Sharma, P., Veeranna, Sharma, M., Amin, N.D., Sihag, R.K., Grant, P., Ahn, N., Kulkarni, A.B., and Pant, H.C. (2002). Phosphorylation of MEK1 by cdk5/p35 down-regulates the mitogen-activated protein kinase pathway. *J Biol Chem* 277, 528-534.
92. Naujokat, C., and Hoffmann, S. (2002). Role and function of the 26S proteasome in proliferation and apoptosis. *Lab Invest* 82, 965-980.
93. Debigare, R., and Price, S.R. (2003). Proteolysis, the ubiquitin-proteasome system, and renal diseases. *Am J Physiol Renal Physiol* 285, F1-8.
94. Kerscher, O., Felberbaum, R., and Hochstrasser, M. (2006). Modification of proteins by ubiquitin and ubiquitin-like proteins. *Annu Rev Cell Dev Biol* 22, 159-180.
95. Liu, Z., Haas, A.L., Diaz, L.A., Conrad, C.A., and Giudice, G.J. (1996). Characterization of a novel keratinocyte ubiquitin carrier protein. *J Biol Chem* 271, 2817-2822.
96. Hartmann-Petersen, R., Seeger, M., and Gordon, C. (2003). Transferring substrates to the 26S proteasome. *Trends Biochem Sci* 28, 26-31.
97. Sun, Y. (2006). E3 ubiquitin ligases as cancer targets and biomarkers. *Neoplasia* 8, 645-654.
98. Sobko, A., Ma, H., and Firtel, R.A. (2002). Regulated SUMOylation and ubiquitination of DdMEK1 is required for proper chemotaxis. *Dev Cell* 2, 745-756.

99. Lu, Z., Xu, S., Joazeiro, C., Cobb, M.H., and Hunter, T. (2002). The PHD domain of MEKK1 acts as an E3 ubiquitin ligase and mediates ubiquitination and degradation of ERK1/2. *Mol Cell* 9, 945-956.
100. Pages, G., Guerin, S., Grall, D., Bonino, F., Smith, A., Anjuere, F., Auberger, P., and Pouyssegur, J. (1999). Defective thymocyte maturation in p44 MAP kinase (Erk 1) knockout mice. *Science* 286, 1374-1377.
101. Fischer, A.M., Katayama, C.D., Pages, G., Pouyssegur, J., and Hedrick, S.M. (2005). The role of erk1 and erk2 in multiple stages of T cell development. *Immunity* 23, 431-443.
102. 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.
103. Agrawal, A., Dillon, S., Denning, T.L., and Pulendran, B. (2006). ERK1^{-/-} mice exhibit Th1 cell polarization and increased susceptibility to experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 176, 5788-5796.
104. 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.
105. Rossant, J. (2001). Stem cells from the Mammalian blastocyst. *Stem Cells* 19, 477-482.
106. Burdon, T., Stracey, C., Chambers, I., Nichols, J., and Smith, A. (1999). Suppression of SHP-2 and ERK signalling promotes self-renewal of mouse embryonic stem cells. *Dev Biol* 210, 30-43.
107. Cestari, V., Costanzi, M., Castellano, C., and Rossi-Arnaud, C. (2006). A role for ERK2 in reconsolidation of fear memories in mice. *Neurobiol Learn Mem* 86, 133-143.
108. Satoh, Y., Endo, S., Ikeda, T., Yamada, K., Ito, M., Kuroki, M., Hiramoto, T., Imamura, O., Kobayashi, Y., Watanabe, Y., et al. (2007). Extracellular signal-

- regulated kinase 2 (ERK2) knockdown mice show deficits in long-term memory; ERK2 has a specific function in learning and memory. *J Neurosci* 27, 10765-10776.
109. Brott, B.K., Alessandrini, A., Largaespada, D.A., Copeland, N.G., Jenkins, N.A., Crews, C.M., and Erikson, R.L. (1993). MEK2 is a kinase related to MEK1 and is differentially expressed in murine tissues. *Cell Growth Differ* 4, 921-929.
 110. 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.
 111. Russell, M., Lange-Carter, C.A., and Johnson, G.L. (1995). Regulation of recombinant MEK1 and MEK2b expressed in *Escherichia coli*. *Biochemistry* 34, 6611-6615.
 112. Catling, A.D., Schaeffer, H.J., Reuter, C.W., Reddy, G.R., and Weber, M.J. (1995). A proline-rich sequence unique to MEK1 and MEK2 is required for raf binding and regulates MEK function. *Mol Cell Biol* 15, 5214-5225.
 113. Eblen, S.T., Slack, J.K., Weber, M.J., and Catling, A.D. (2002). Rac-PAK signaling stimulates extracellular signal-regulated kinase (ERK) activation by regulating formation of MEK1-ERK complexes. *Mol Cell Biol* 22, 6023-6033.
 114. Papin, C., Denouel, A., Calothy, G., and Eychene, A. (1996). Identification of signalling proteins interacting with B-Raf in the yeast two-hybrid system. *Oncogene* 12, 2213-2221.
 115. Giroux, S., Tremblay, M., Bernard, D., Cardin-Girard, J.F., Aubry, S., Larouche, L., Rousseau, S., Huot, J., Landry, J., Jeannotte, L., et al. (1999). Embryonic death of Mek1-deficient mice reveals a role for this kinase in angiogenesis in the labyrinthine region of the placenta. *Curr Biol* 9, 369-372.
 116. Belanger, L.F., Roy, S., Tremblay, M., Brott, B., Steff, A.M., Mourad, W., Hugo, P., Erikson, R., and Charron, J. (2003). Mek2 is dispensable for mouse growth and development. *Mol Cell Biol* 23, 4778-4787.

117. Scholl, F.A., Dumesic, P.A., Barragan, D.I., Harada, K., Bissonauth, V., Charron, J., and Khavari, P.A. (2007). Mek1/2 MAPK kinases are essential for Mammalian development, homeostasis, and Raf-induced hyperplasia. *Dev Cell* 12, 615-629.
118. Bueno, O.F., De Windt, L.J., Tymitz, K.M., Witt, S.A., Kimball, T.R., Klevitsky, R., Hewett, T.E., Jones, S.P., Lefer, D.J., Peng, C.F., et al. (2000). The MEK1-ERK1/2 signaling pathway promotes compensated cardiac hypertrophy in transgenic mice. *EMBO J* 19, 6341-6350.
119. Hunter, J.J., Tanaka, N., Rockman, H.A., Ross, J., Jr., and Chien, K.R. (1995). Ventricular expression of a MLC-2v-ras fusion gene induces cardiac hypertrophy and selective diastolic dysfunction in transgenic mice. *J Biol Chem* 270, 23173-23178.
120. Gong, X., Wang, X., Han, J., Niesman, I., Huang, Q., and Horwitz, J. (2001). Development of cataractous macrophthalmia in mice expressing an active MEK1 in the lens. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 42, 539-548.
121. Reneker, L.W., Xie, L., Xu, L., Govindarajan, V., and Overbeek, P.A. (2004). Activated Ras induces lens epithelial cell hyperplasia but not premature differentiation. *Int J Dev Biol* 48, 879-888.
122. Murakami, S., Balmes, G., McKinney, S., Zhang, Z., Givol, D., and de Crombrughe, B. (2004). Constitutive activation of MEK1 in chondrocytes causes Stat1-independent achondroplasia-like dwarfism and rescues the Fgfr3-deficient mouse phenotype. *Genes Dev* 18, 290-305.
123. Hobbs, R.M., Silva-Vargas, V., Groves, R., and Watt, F.M. (2004). Expression of activated MEK1 in differentiating epidermal cells is sufficient to generate hyperproliferative and inflammatory skin lesions. *J Invest Dermatol* 123, 503-515.
124. Scholl, F.A., Dumesic, P.A., and Khavari, P.A. (2004). Mek1 alters epidermal growth and differentiation. *Cancer Res* 64, 6035-6040.
125. Tarutani, M., Cai, T., Dajee, M., and Khavari, P.A. (2003). Inducible activation of Ras and Raf in adult epidermis. *Cancer Res* 63, 319-323.

126. Fukuda, M., Gotoh, I., Gotoh, Y., and Nishida, E. (1996). Cytoplasmic localization of mitogen-activated protein kinase kinase directed by its NH₂-terminal, leucine-rich short amino acid sequence, which acts as a nuclear export signal. *J Biol Chem* 271, 20024-20028.
127. Jaaro, H., Rubinfeld, H., Hanoch, T., and Seger, R. (1997). Nuclear translocation of mitogen-activated protein kinase kinase (MEK1) in response to mitogenic stimulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 3742-3747.
128. Yu, W., Fantl, W.J., Harrowe, G., and Williams, L.T. (1998). Regulation of the MAP kinase pathway by mammalian Ksr through direct interaction with MEK and ERK. *Curr Biol* 8, 56-64.
129. Torii, S., Kusakabe, M., Yamamoto, T., Maekawa, M., and Nishida, E. (2004). Sef is a spatial regulator for Ras/MAP kinase signaling. *Dev Cell* 7, 33-44.
130. Hagel, M., George, E.L., Kim, A., Tamimi, R., Opitz, S.L., Turner, C.E., Imamoto, A., and Thomas, S.M. (2002). The adaptor protein paxillin is essential for normal development in the mouse and is a critical transducer of fibronectin signaling. *Mol Cell Biol* 22, 901-915.
131. Ishibe, S., Joly, D., Liu, Z.X., and Cantley, L.G. (2004). Paxillin serves as an ERK-regulated scaffold for coordinating FAK and Rac activation in epithelial morphogenesis. *Mol Cell* 16, 257-267.
132. Takekawa, M., Tatebayashi, K., and Saito, H. (2005). Conserved docking site is essential for activation of mammalian MAP kinase kinases by specific MAP kinase kinases. *Mol Cell* 18, 295-306.
133. Cha, H., Lee, E.K., and Shapiro, P. (2001). Identification of a C-terminal region that regulates mitogen-activated protein kinase kinase-1 cytoplasmic localization and ERK activation. *J Biol Chem* 276, 48494-48501.
134. Lenormand, P., Sardet, C., Pages, G., L'Allemain, G., Brunet, A., and Pouyssegur, J. (1993). Growth factors induce nuclear translocation of MAP kinases (p42mapk and p44mapk) but not of their activator MAP kinase kinase (p45mapkk) in fibroblasts. *J Cell Biol* 122, 1079-1088.

135. Perry, R.L., Parker, M.H., and Rudnicki, M.A. (2001). Activated MEK1 binds the nuclear MyoD transcriptional complex to repress transactivation. *Mol Cell* 8, 291-301.
136. Burgermeister, E., Chuderland, D., Hanoch, T., Meyer, M., Liscovitch, M., and Seger, R. (2007). Interaction with MEK causes nuclear export and downregulation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *Mol Cell Biol* 27, 803-817.
137. Reszka, A.A., Bulinski, J.C., Krebs, E.G., and Fischer, E.H. (1997). Mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase 2 regulates cytoskeletal organization and chemotaxis via catalytic and microtubule-specific interactions. *Mol Biol Cell* 8, 1219-1232.
138. Reszka, A.A., Seger, R., Diltz, C.D., Krebs, E.G., and Fischer, E.H. (1995). Association of mitogen-activated protein kinase with the microtubule cytoskeleton. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 8881-8885.
139. Zuniga, A., Torres, J., Ubeda, J., and Pulido, R. (1999). Interaction of mitogen-activated protein kinases with the kinase interaction motif of the tyrosine phosphatase PTP-SL provides substrate specificity and retains ERK2 in the cytoplasm. *J Biol Chem* 274, 21900-21907.
140. Perlson, E., Michaelievski, I., Kowalsman, N., Ben-Yaakov, K., Shaked, M., Seger, R., Eisenstein, M., and Fainzilber, M. (2006). Vimentin binding to phosphorylated Erk sterically hinders enzymatic dephosphorylation of the kinase. *J Mol Biol* 364, 938-944.
141. Wolf, I., Rubinfeld, H., Yoon, S., Marmor, G., Hanoch, T., and Seger, R. (2001). Involvement of the activation loop of ERK in the detachment from cytosolic anchoring. *J Biol Chem* 276, 24490-24497.
142. Lee, T., Hoofnagle, A.N., Kabuyama, Y., Stroud, J., Min, X., Goldsmith, E.J., Chen, L., Resing, K.A., and Ahn, N.G. (2004). Docking motif interactions in MAP kinases revealed by hydrogen exchange mass spectrometry. *Mol Cell* 14, 43-55.
143. Luttrell, L.M., Roudabush, F.L., Choy, E.W., Miller, W.E., Field, M.E., Pierce, K.L., and Lefkowitz, R.J. (2001). Activation and targeting of extracellular signal-

- regulated kinases by beta-arrestin scaffolds. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 2449-2454.
144. Yoon, S., and Seger, R. (2006). The extracellular signal-regulated kinase: multiple substrates regulate diverse cellular functions. *Growth Factors* 24, 21-44.
 145. Nigg, E.A. (1997). Nucleocytoplasmic transport: signals, mechanisms and regulation. *Nature* 386, 779-787.
 146. Adachi, M., Fukuda, M., and Nishida, E. (1999). Two co-existing mechanisms for nuclear import of MAP kinase: passive diffusion of a monomer and active transport of a dimer. *EMBO J* 18, 5347-5358.
 147. Kurada, P., and White, K. (1998). Ras promotes cell survival in *Drosophila* by downregulating hid expression. *Cell* 95, 319-329.
 148. Lorenzen, J.A., Baker, S.E., Denhez, F., Melnick, M.B., Brower, D.L., and Perkins, L.A. (2001). Nuclear import of activated D-ERK by DIM-7, an importin family member encoded by the gene moleskin. *Development* 128, 1403-1414.
 149. Matsubayashi, Y., Fukuda, M., and Nishida, E. (2001). Evidence for existence of a nuclear pore complex-mediated, cytosol-independent pathway of nuclear translocation of ERK MAP kinase in permeabilized cells. *J Biol Chem* 276, 41755-41760.
 150. Whitehurst, A.W., Wilsbacher, J.L., You, Y., Luby-Phelps, K., Moore, M.S., and Cobb, M.H. (2002). ERK2 enters the nucleus by a carrier-independent mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 7496-7501.
 151. Chuderland, D., Konson, A., and Seger, R. (2008). Identification and characterization of a general nuclear translocation signal in signaling proteins. *Mol Cell* 31, 850-861.
 152. Kovalenko, D., Yang, X., Nadeau, R.J., Harkins, L.K., and Friesel, R. (2003). Sef inhibits fibroblast growth factor signaling by inhibiting FGFR1 tyrosine phosphorylation and subsequent ERK activation. *J Biol Chem* 278, 14087-14091.

153. Yazicioglu, M.N., Goad, D.L., Ranganathan, A., Whitehurst, A.W., Goldsmith, E.J., and Cobb, M.H. (2007). Mutations in ERK2 binding sites affect nuclear entry. *J Biol Chem* *282*, 28759-28767.
154. Burack, W.R., and Shaw, A.S. (2005). Live Cell Imaging of ERK and MEK: simple binding equilibrium explains the regulated nucleocytoplasmic distribution of ERK. *J Biol Chem* *280*, 3832-3837.
155. Lenormand, P., Brondello, J.M., Brunet, A., and Pouyssegur, J. (1998). Growth factor-induced p42/p44 MAPK nuclear translocation and retention requires both MAPK activation and neosynthesis of nuclear anchoring proteins. *J Cell Biol* *142*, 625-633.
156. Fujioka, A., Terai, K., Itoh, R.E., Aoki, K., Nakamura, T., Kuroda, S., Nishida, E., and Matsuda, M. (2006). Dynamics of the Ras/ERK MAPK cascade as monitored by fluorescent probes. *J Biol Chem* *281*, 8917-8926.
157. Seger, R., and Krebs, E.G. (1995). The MAPK signaling cascade. *FASEB J* *9*, 726-735.
158. Torii, S., Nakayama, K., Yamamoto, T., and Nishida, E. (2004). Regulatory mechanisms and function of ERK MAP kinases. *J Biochem* *136*, 557-561.
159. Viala, E., and Pouyssegur, J. (2004). Regulation of tumor cell motility by ERK mitogen-activated protein kinases. *Ann N Y Acad Sci* *1030*, 208-218.
160. Nguyen, T.T., Scimeca, J.C., Filloux, C., Peraldi, P., Carpentier, J.L., and Van Obberghen, E. (1993). Co-regulation of the mitogen-activated protein kinase, extracellular signal-regulated kinase 1, and the 90-kDa ribosomal S6 kinase in PC12 cells. Distinct effects of the neurotrophic factor, nerve growth factor, and the mitogenic factor, epidermal growth factor. *J Biol Chem* *268*, 9803-9810.
161. Traverse, S., Seedorf, K., Paterson, H., Marshall, C.J., Cohen, P., and Ullrich, A. (1994). EGF triggers neuronal differentiation of PC12 cells that overexpress the EGF receptor. *Curr Biol* *4*, 694-701.

162. Woods, D., Parry, D., Cherwinski, H., Bosch, E., Lees, E., and McMahon, M. (1997). Raf-induced proliferation or cell cycle arrest is determined by the level of Raf activity with arrest mediated by p21Cip1. *Mol Cell Biol* *17*, 5598-5611.
163. Murphy, L.O., Smith, S., Chen, R.H., Fingar, D.C., and Blenis, J. (2002). Molecular interpretation of ERK signal duration by immediate early gene products. *Nat Cell Biol* *4*, 556-564.
164. Murphy, L.O., and Blenis, J. (2006). MAPK signal specificity: the right place at the right time. *Trends Biochem Sci* *31*, 268-275.
165. Mansour, S.J., Matten, W.T., Hermann, A.S., Candia, J.M., Rong, S., Fukasawa, K., Vande Woude, G.F., and Ahn, N.G. (1994). Transformation of mammalian cells by constitutively active MAP kinase kinase. *Science* *265*, 966-970.
166. Sabbagh, W., Jr., Flatauer, L.J., Bardwell, A.J., and Bardwell, L. (2001). Specificity of MAP kinase signaling in yeast differentiation involves transient versus sustained MAPK activation. *Mol Cell* *8*, 683-691.
167. Jaeschke, A., Czech, M.P., and Davis, R.J. (2004). An essential role of the JIP1 scaffold protein for JNK activation in adipose tissue. *Genes Dev* *18*, 1976-1980.
168. Kolch, W. (2005). Coordinating ERK/MAPK signalling through scaffolds and inhibitors. *Nat Rev Mol Cell Biol* *6*, 827-837.
169. Muller, J., Ory, S., Copeland, T., Piwnicka-Worms, H., and Morrison, D.K. (2001). C-TAK1 regulates Ras signaling by phosphorylating the MAPK scaffold, KSR1. *Mol Cell* *8*, 983-993.
170. Ishibe, S., Joly, D., Zhu, X., and Cantley, L.G. (2003). Phosphorylation-dependent paxillin-ERK association mediates hepatocyte growth factor-stimulated epithelial morphogenesis. *Mol Cell* *12*, 1275-1285.
171. Warne, P.H., Viciano, P.R., and Downward, J. (1993). Direct interaction of Ras and the amino-terminal region of Raf-1 in vitro. *Nature* *364*, 352-355.
172. Chen, R.H., Sarnecki, C., and Blenis, J. (1992). Nuclear localization and regulation of erk- and rsk-encoded protein kinases. *Mol Cell Biol* *12*, 915-927.

173. Formstecher, E., Ramos, J.W., Fauquet, M., Calderwood, D.A., Hsieh, J.C., Canton, B., Nguyen, X.T., Barnier, J.V., Camonis, J., Ginsberg, M.H., et al. (2001). PEA-15 mediates cytoplasmic sequestration of ERK MAP kinase. *Dev Cell* 1, 239-250.
174. Whitehurst, A.W., Robinson, F.L., Moore, M.S., and Cobb, M.H. (2004). The death effector domain protein PEA-15 prevents nuclear entry of ERK2 by inhibiting required interactions. *J Biol Chem* 279, 12840-12847.
175. Brown, M.D., and Sacks, D.B. (2006). IQGAP1 in cellular signaling: bridging the GAP. *Trends Cell Biol* 16, 242-249.
176. Briggs, M.W., and Sacks, D.B. (2003). IQGAP1 as signal integrator: Ca²⁺, calmodulin, Cdc42 and the cytoskeleton. *FEBS Lett* 542, 7-11.
177. Roy, M., Li, Z., and Sacks, D.B. (2004). IQGAP1 binds ERK2 and modulates its activity. *J Biol Chem* 279, 17329-17337.
178. Roy, M., Li, Z., and Sacks, D.B. (2005). IQGAP1 is a scaffold for mitogen-activated protein kinase signaling. *Mol Cell Biol* 25, 7940-7952.
179. Wunderlich, W., Fialka, I., Teis, D., Alpi, A., Pfeifer, A., Parton, R.G., Lottspeich, F., and Huber, L.A. (2001). A novel 14-kilodalton protein interacts with the mitogen-activated protein kinase scaffold mp1 on a late endosomal/lysosomal compartment. *J Cell Biol* 152, 765-776.
180. Manser, E., Leung, T., Salihuddin, H., Zhao, Z.S., and Lim, L. (1994). A brain serine/threonine protein kinase activated by Cdc42 and Rac1. *Nature* 367, 40-46.
181. 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.
182. Zheng, C.F., and Guan, K.L. (1993). Properties of MEKs, the kinases that phosphorylate and activate the extracellular signal-regulated kinases. *J Biol Chem* 268, 23933-23939.
183. Bhunia, A.K., Han, H., Snowden, A., and Chatterjee, S. (1996). Lactosylceramide stimulates Ras-GTP loading, kinases (MEK, Raf), p44 mitogen-activated protein

- kinase, and c-fos expression in human aortic smooth muscle cells. *J Biol Chem* *271*, 10660-10666.
184. Setalo, G., Jr., Singh, M., Guan, X., and Toran-Allerand, C.D. (2002). Estradiol-induced phosphorylation of ERK1/2 in explants of the mouse cerebral cortex: the roles of heat shock protein 90 (Hsp90) and MEK2. *J Neurobiol* *50*, 1-12.
 185. Winston, B.W., Remigio, L.K., and Riches, D.W. (1995). Preferential involvement of MEK1 in the tumor necrosis factor-alpha-induced activation of p42mapk/erk2 in mouse macrophages. *J Biol Chem* *270*, 27391-27394.
 186. Seufferlein, T., Withers, D.J., and Rozengurt, E. (1996). Reduced requirement of mitogen-activated protein kinase (MAPK) activity for entry into the S phase of the cell cycle in Swiss 3T3 fibroblasts stimulated by bombesin and insulin. *J Biol Chem* *271*, 21471-21477.
 187. Jelinek, T., Catling, A.D., Reuter, C.W., Moodie, S.A., Wolfman, A., and Weber, M.J. (1994). RAS and RAF-1 form a signalling complex with MEK-1 but not MEK-2. *Mol Cell Biol* *14*, 8212-8218.
 188. Teis, D., Taub, N., Kurzbauer, R., Hilber, D., de Araujo, M.E., Erlacher, M., Offterdinger, M., Villunger, A., Geley, S., Bohn, G., et al. (2006). p14-MP1-MEK1 signaling regulates endosomal traffic and cellular proliferation during tissue homeostasis. *J Cell Biol* *175*, 861-868.
 189. Guihard, S., Clay, D., Cocault, L., Saulnier, N., Opolon, P., Souyri, M., Pages, G., Pouyssegur, J., Porteu, F., and Gaudry, M. (2010). The MAPK ERK1 is a negative regulator of the adult steady-state splenic erythropoiesis. *Blood* *115*, 3686-3694.
 190. Fremin, C., Ezan, F., Boisselier, P., Bessard, A., Pages, G., Pouyssegur, J., and Baffet, G. (2007). ERK2 but not ERK1 plays a key role in hepatocyte replication: an RNAi-mediated ERK2 knockdown approach in wild-type and ERK1 null hepatocytes. *Hepatology* *45*, 1035-1045.
 191. Fremin, C., Bessard, A., Ezan, F., Gailhouste, L., Regard, M., Le Seyec, J., Gilot, D., Pages, G., Pouyssegur, J., Langouet, S., et al. (2009). Multiple division cycles

- and long-term survival of hepatocytes are distinctly regulated by extracellular signal-regulated kinases ERK1 and ERK2. *Hepatology* 49, 930-939.
192. Vantaggiato, C., Formentini, I., Bondanza, A., Bonini, C., Naldini, L., and Brambilla, R. (2006). ERK1 and ERK2 mitogen-activated protein kinases affect Ras-dependent cell signaling differentially. *J Biol* 5, 14.
 193. Lloyd, A.C. (2006). Distinct functions for ERKs? *J Biol* 5, 13.
 194. Yung, Y., Yao, Z., Aebersold, D.M., Hanoch, T., and Seger, R. (2001). Altered regulation of ERK1b by MEK1 and PTP-SL and modified Elk1 phosphorylation by ERK1b are caused by abrogation of the regulatory C-terminal sequence of ERKs. *J Biol Chem* 276, 35280-35289.
 195. Aebersold, D.M., Shaul, Y.D., Yung, Y., Yarom, N., Yao, Z., Hanoch, T., and Seger, R. (2004). Extracellular signal-regulated kinase 1c (ERK1c), a novel 42-kilodalton ERK, demonstrates unique modes of regulation, localization, and function. *Mol Cell Biol* 24, 10000-10015.
 196. 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.
 197. Colanzi, A., and Corda, D. (2007). Mitosis controls the Golgi and the Golgi controls mitosis. *Curr Opin Cell Biol* 19, 386-393.
 198. Cha, H., and Shapiro, P. (2001). Tyrosine-phosphorylated extracellular signal-regulated kinase associates with the Golgi complex during G2/M phase of the cell cycle: evidence for regulation of Golgi structure. *J Cell Biol* 153, 1355-1367.
 199. Chambard, J.C., Lefloch, R., Pouyssegur, J., and Lenormand, P. (2007). ERK implication in cell cycle regulation. *Biochim Biophys Acta* 1773, 1299-1310.
 200. Jorgensen, P., and Tyers, M. (2004). How cells coordinate growth and division. *Curr Biol* 14, R1014-1027.
 201. 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.

202. Graves, L.M., Guy, H.I., Kozlowski, P., Huang, M., Lazarowski, E., Pope, R.M., Collins, M.A., Dahlstrand, E.N., Earp, H.S., 3rd, and Evans, D.R. (2000). Regulation of carbamoyl phosphate synthetase by MAP kinase. *Nature* *403*, 328-332.
203. Rampino, N., Yamamoto, H., Ionov, Y., Li, Y., Sawai, H., Reed, J.C., and Perucho, M. (1997). Somatic frameshift mutations in the BAX gene in colon cancers of the microsatellite mutator phenotype. *Science* *275*, 967-969.
204. Shapiro, P.S., Whalen, A.M., Tolwinski, N.S., Wilsbacher, J., Froelich-Ammon, S.J., Garcia, M., Osheroff, N., and Ahn, N.G. (1999). Extracellular signal-regulated kinase activates topoisomerase IIalpha through a mechanism independent of phosphorylation. *Mol Cell Biol* *19*, 3551-3560.
205. Waskiewicz, A.J., Johnson, J.C., Penn, B., Mahalingam, M., Kimball, S.R., and Cooper, J.A. (1999). Phosphorylation of the cap-binding protein eukaryotic translation initiation factor 4E by protein kinase Mnk1 in vivo. *Mol Cell Biol* *19*, 1871-1880.
206. Ma, L., Chen, Z., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., and Pandolfi, P.P. (2005). Phosphorylation and functional inactivation of TSC2 by Erk implications for tuberous sclerosis and cancer pathogenesis. *Cell* *121*, 179-193.
207. Roux, P.P., Ballif, B.A., Anjum, R., Gygi, S.P., and Blenis, J. (2004). Tumor-promoting phorbol esters and activated Ras inactivate the tuberous sclerosis tumor suppressor complex via p90 ribosomal S6 kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* *101*, 13489-13494.
208. Servant, M.J., Giasson, E., and Meloche, S. (1996). Inhibition of growth factor-induced protein synthesis by a selective MEK inhibitor in aortic smooth muscle cells. *J Biol Chem* *271*, 16047-16052.
209. Stefanovsky, V.Y., Langlois, F., Bazett-Jones, D., Pelletier, G., and Moss, T. (2006). ERK modulates DNA bending and enhancesome structure by phosphorylating HMG1-boxes 1 and 2 of the RNA polymerase I transcription factor UBF. *Biochemistry* *45*, 3626-3634.

210. Stefanovsky, V., Langlois, F., Gagnon-Kugler, T., Rothblum, L.I., and Moss, T. (2006). Growth factor signaling regulates elongation of RNA polymerase I transcription in mammals via UBF phosphorylation and r-chromatin remodeling. *Mol Cell* 21, 629-639.
211. Brunet, A., Roux, D., Lenormand, P., Dowd, S., Keyse, S., and Pouyssegur, J. (1999). Nuclear translocation of p42/p44 mitogen-activated protein kinase is required for growth factor-induced gene expression and cell cycle entry. *EMBO J* 18, 664-674.
212. Kong, Q. (2003). Cell brain: a new focus in the postgenomic era. *Med Hypotheses* 61, 114-119.
213. 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.
214. Weber, J.D., Raben, D.M., Phillips, P.J., and Baldassare, J.J. (1997). Sustained activation of extracellular-signal-regulated kinase 1 (ERK1) is required for the continued expression of cyclin D1 in G1 phase. *Biochem J* 326 (Pt 1), 61-68.
215. Albanese, C., Johnson, J., Watanabe, G., Eklund, N., Vu, D., Arnold, A., and Pestell, R.G. (1995). Transforming p21ras mutants and c-Ets-2 activate the cyclin D1 promoter through distinguishable regions. *J Biol Chem* 270, 23589-23597.
216. Burch, P.M., Yuan, Z., Loonen, A., and Heintz, N.H. (2004). An extracellular signal-regulated kinase 1- and 2-dependent program of chromatin trafficking of c-Fos and Fra-1 is required for cyclin D1 expression during cell cycle reentry. *Mol Cell Biol* 24, 4696-4709.
217. Seth, A., Alvarez, E., Gupta, S., and Davis, R.J. (1991). A phosphorylation site located in the NH2-terminal domain of c-Myc increases transactivation of gene expression. *J Biol Chem* 266, 23521-23524.
218. 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.

219. Yamamoto, T., Ebisuya, M., Ashida, F., Okamoto, K., Yonehara, S., and Nishida, E. (2006). Continuous ERK activation downregulates antiproliferative genes throughout G1 phase to allow cell-cycle progression. *Curr Biol* *16*, 1171-1182.
220. Yoshida, Y., Nakamura, T., Komoda, M., Satoh, H., Suzuki, T., Tsuzuku, J.K., Miyasaka, T., Yoshida, E.H., Umemori, H., Kunisaki, R.K., et al. (2003). Mice lacking a transcriptional corepressor Tob are predisposed to cancer. *Genes Dev* *17*, 1201-1206.
221. Weitzman, J.B., Fiette, L., Matsuo, K., and Yaniv, M. (2000). JunD protects cells from p53-dependent senescence and apoptosis. *Mol Cell* *6*, 1109-1119.
222. Bottazzi, M.E., Zhu, X., Bohmer, R.M., and Assoian, R.K. (1999). Regulation of p21(cip1) expression by growth factors and the extracellular matrix reveals a role for transient ERK activity in G1 phase. *J Cell Biol* *146*, 1255-1264.
223. Liu, Y., Martindale, J.L., Gorospe, M., and Holbrook, N.J. (1996). Regulation of p21WAF1/CIP1 expression through mitogen-activated protein kinase signaling pathway. *Cancer Res* *56*, 31-35.
224. Cheng, M., Olivier, P., Diehl, J.A., Fero, M., Roussel, M.F., Roberts, J.M., and Sherr, C.J. (1999). The p21(Cip1) and p27(Kip1) CDK 'inhibitors' are essential activators of cyclin D-dependent kinases in murine fibroblasts. *EMBO J* *18*, 1571-1583.
225. Abbas, T., and Dutta, A. (2009). p21 in cancer: intricate networks and multiple activities. *Nat Rev Cancer* *9*, 400-414.
226. Hwang, C.Y., Lee, C., and Kwon, K.S. (2009). Extracellular signal-regulated kinase 2-dependent phosphorylation induces cytoplasmic localization and degradation of p21Cip1. *Mol Cell Biol* *29*, 3379-3389.
227. Greulich, H., and Erikson, R.L. (1998). An analysis of Mek1 signaling in cell proliferation and transformation. *J Biol Chem* *273*, 13280-13288.
228. Rivard, N., Boucher, M.J., Asselin, C., and L'Allemain, G. (1999). MAP kinase cascade is required for p27 downregulation and S phase entry in fibroblasts and epithelial cells. *Am J Physiol* *277*, C652-664.

229. Delmas, C., Manenti, S., Boudjelal, A., Peyssonnaud, C., Eychene, A., and Darbon, J.M. (2001). The p42/p44 mitogen-activated protein kinase activation triggers p27Kip1 degradation independently of CDK2/cyclin E in NIH 3T3 cells. *J Biol Chem* 276, 34958-34965.
230. 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.
231. Cheng, M., Sexl, V., Sherr, C.J., and Roussel, M.F. (1998). Assembly of cyclin D-dependent kinase and titration of p27Kip1 regulated by mitogen-activated protein kinase kinase (MEK1). *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 1091-1096.
232. Donovan, J.C., Milic, A., and Slingerland, J.M. (2001). Constitutive MEK/MAPK activation leads to p27(Kip1) deregulation and antiestrogen resistance in human breast cancer cells. *J Biol Chem* 276, 40888-40895.
233. 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 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.
234. 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.
235. 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.
236. 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.

237. Rieder, C.L. (2011). Mitosis in vertebrates: the G2/M and M/A transitions and their associated checkpoints. *Chromosome Res* 19, 291-306.
238. Sauer, G., Korner, R., Hanisch, A., Ries, A., Nigg, E.A., and Sillje, H.H. (2005). Proteome analysis of the human mitotic spindle. *Mol Cell Proteomics* 4, 35-43.
239. Musacchio, A., and Salmon, E.D. (2007). The spindle-assembly checkpoint in space and time. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 379-393.
240. Santaguida, S., and Musacchio, A. (2009). The life and miracles of kinetochores. *EMBO J* 28, 2511-2531.
241. Walczak, C.E., and Heald, R. (2008). Mechanisms of mitotic spindle assembly and function. *Int Rev Cytol* 265, 111-158.
242. Cheeseman, I.M., and Desai, A. (2008). Molecular architecture of the kinetochore-microtubule interface. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9, 33-46.
243. 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.
244. 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.
245. 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.
246. Vigneron, S., Brioudes, E., Burgess, A., Labbe, J.C., Lorca, T., and Castro, A. (2010). RSK2 is a kinetochore-associated protein that participates in the spindle assembly checkpoint. *Oncogene* 29, 3566-3574.
247. 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.

248. 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.
249. 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.
250. 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.
251. 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.
252. 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.
253. Greene, L.A., and Tischler, A.S. (1976). Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 73, 2424-2428.
254. Whalen, A.M., Galasinski, S.C., Shapiro, P.S., Nahreini, T.S., and Ahn, N.G. (1997). Megakaryocytic differentiation induced by constitutive activation of mitogen-activated protein kinase kinase. *Mol Cell Biol* 17, 1947-1958.
255. Kim, K.W., Kim, S.H., Lee, E.Y., Kim, N.D., Kang, H.S., Kim, H.D., Chung, B.S., and Kang, C.D. (2001). Extracellular signal-regulated kinase/90-KDA ribosomal S6 kinase/nuclear factor-kappa B pathway mediates phorbol 12-myristate 13-acetate-induced megakaryocytic differentiation of K562 cells. *J Biol Chem* 276, 13186-13191.

256. Bennett, A.M., and Tonks, N.K. (1997). Regulation of distinct stages of skeletal muscle differentiation by mitogen-activated protein kinases. *Science* 278, 1288-1291.
257. Hu, E., Kim, J.B., Sarraf, P., and Spiegelman, B.M. (1996). Inhibition of adipogenesis through MAP kinase-mediated phosphorylation of PPARgamma. *Science* 274, 2100-2103.
258. Font de Mora, J., Porras, A., Ahn, N., and Santos, E. (1997). Mitogen-activated protein kinase activation is not necessary for, but antagonizes, 3T3-L1 adipocytic differentiation. *Mol Cell Biol* 17, 6068-6075.
259. Kim, S.W., Muise, A.M., Lyons, P.J., and Ro, H.S. (2001). Regulation of adipogenesis by a transcriptional repressor that modulates MAPK activation. *J Biol Chem* 276, 10199-10206.
260. Rosen, E.D., and Spiegelman, B.M. (2000). Molecular regulation of adipogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol* 16, 145-171.
261. Adams, M., Reginato, M.J., Shao, D., Lazar, M.A., and Chatterjee, V.K. (1997). Transcriptional activation by peroxisome proliferator-activated receptor gamma is inhibited by phosphorylation at a consensus mitogen-activated protein kinase site. *J Biol Chem* 272, 5128-5132.
262. Bost, F., Aouadi, M., Caron, L., Even, P., Belmonte, N., Prot, M., Dani, C., Hofman, P., Pages, G., Pouyssegur, J., et al. (2005). The extracellular signal-regulated kinase isoform ERK1 is specifically required for in vitro and in vivo adipogenesis. *Diabetes* 54, 402-411.
263. Shimamura, A., Ballif, B.A., Richards, S.A., and Blenis, J. (2000). Rsk1 mediates a MEK-MAP kinase cell survival signal. *Curr Biol* 10, 127-135.
264. 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.

265. Horiuchi, M., Itoh, A., Pleasure, D., and Itoh, T. (2006). MEK-ERK signaling is involved in interferon-gamma-induced death of oligodendroglial progenitor cells. *J Biol Chem* *281*, 20095-20106.
266. Mebratu, Y.A., Dickey, B.F., Evans, C., and Tesfaigzi, Y. (2008). The BH3-only protein Bik/Blk/Nbk inhibits nuclear translocation of activated ERK1/2 to mediate IFNgamma-induced cell death. *J Cell Biol* *183*, 429-439.
267. Pearson, G., Robinson, F., Beers Gibson, T., Xu, B.E., Karandikar, M., Berman, K., and Cobb, M.H. (2001). Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocr Rev* *22*, 153-183.
268. Coulombe, P., and Meloche, S. (2007). Atypical mitogen-activated protein kinases: structure, regulation and functions. *Biochim Biophys Acta* *1773*, 1376-1387.
269. 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.
270. Lawrence, M.C., Jivan, A., Shao, C., Duan, L., Goad, D., Zaganjor, E., Osborne, J., McGlynn, K., Stippec, S., Earnest, S., et al. (2008). The roles of MAPKs in disease. *Cell Res* *18*, 436-442.
271. Raman, M., Chen, W., and Cobb, M.H. (2007). Differential regulation and properties of MAPKs. *Oncogene* *26*, 3100-3112.
272. Hynes, N.E., and Lane, H.A. (2005). ERBB receptors and cancer: the complexity of targeted inhibitors. *Nat Rev Cancer* *5*, 341-354.
273. Forbes, S., Clements, J., Dawson, E., Bamford, S., Webb, T., Dogan, A., Flanagan, A., Teague, J., Wooster, R., Futreal, P.A., et al. (2006). Cosmic 2005. *Br J Cancer* *94*, 318-322.
274. 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.

275. Cowley, S., Paterson, H., Kemp, P., and Marshall, C.J. (1994). Activation of MAP kinase kinase is necessary and sufficient for PC12 differentiation and for transformation of NIH 3T3 cells. *Cell* 77, 841-852.
276. Montesano, R., Soriano, J.V., Hosseini, G., Pepper, M.S., and Schramek, H. (1999). Constitutively active mitogen-activated protein kinase kinase MEK1 disrupts morphogenesis and induces an invasive phenotype in Madin-Darby canine kidney epithelial cells. *Cell Growth Differ* 10, 317-332.
277. Pinkas, J., and Leder, P. (2002). MEK1 signaling mediates transformation and metastasis of EpH4 mammary epithelial cells independent of an epithelial to mesenchymal transition. *Cancer Res* 62, 4781-4790.
278. Voisin, L., Julien, C., Duhamel, S., Gopalbhai, K., Claveau, I., Saba-El-Leil, M.K., Rodrigue-Gervais, I.G., Gaboury, L., Lamarre, D., Basik, M., et al. (2008). Activation of MEK1 or MEK2 isoform is sufficient to fully transform intestinal epithelial cells and induce the formation of metastatic tumors. *BMC Cancer* 8, 337.
279. Hoshino, R., Chatani, Y., Yamori, T., Tsuruo, T., Oka, H., Yoshida, O., Shimada, Y., Ari-i, S., Wada, H., Fujimoto, J., et al. (1999). Constitutive activation of the 41-/43-kDa mitogen-activated protein kinase signaling pathway in human tumors. *Oncogene* 18, 813-822.
280. Al-Mulla, F., Hagan, S., Behbehani, A.I., Bitar, M.S., George, S.S., Going, J.J., Garcia, J.J., Scott, L., Fyfe, N., Murray, G.I., et al. (2006). Raf kinase inhibitor protein expression in a survival analysis of colorectal cancer patients. *J Clin Oncol* 24, 5672-5679.
281. Hagan, S., Al-Mulla, F., Mallon, E., Oien, K., Ferrier, R., Gusterson, B., Garcia, J.J., and Kolch, W. (2005). Reduction of Raf-1 kinase inhibitor protein expression correlates with breast cancer metastasis. *Clin Cancer Res* 11, 7392-7397.
282. Minoo, P., Zlobec, I., Baker, K., Tornillo, L., Terracciano, L., Jass, J.R., and Lugli, A. (2007). Loss of raf-1 kinase inhibitor protein expression is associated with tumor progression and metastasis in colorectal cancer. *Am J Clin Pathol* 127, 820-827.

283. Schuierer, M.M., Bataille, F., Hagan, S., Kolch, W., and Bosserhoff, A.K. (2004). Reduction in Raf kinase inhibitor protein expression is associated with increased Ras-extracellular signal-regulated kinase signaling in melanoma cell lines. *Cancer Res* 64, 5186-5192.
284. Lee, H.C., Tian, B., Sedivy, J.M., Wands, J.R., and Kim, M. (2006). Loss of Raf kinase inhibitor protein promotes cell proliferation and migration of human hepatoma cells. *Gastroenterology* 131, 1208-1217.
285. Rauhala, H.E., Porkka, K.P., Tolonen, T.T., Martikainen, P.M., Tammela, T.L., and Visakorpi, T. (2005). Dual-specificity phosphatase 1 and serum/glucocorticoid-regulated kinase are downregulated in prostate cancer. *Int J Cancer* 117, 738-745.
286. Loda, M., Capodieci, P., Mishra, R., Yao, H., Corless, C., Grigioni, W., Wang, Y., Magi-Galluzzi, C., and Stork, P.J. (1996). Expression of mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 in the early phases of human epithelial carcinogenesis. *Am J Pathol* 149, 1553-1564.
287. Furukawa, T., Yatsuoka, T., Youssef, E.M., Abe, T., Yokoyama, T., Fukushige, S., Soeda, E., Hoshi, M., Hayashi, Y., Sunamura, M., et al. (1998). Genomic analysis of DUSP6, a dual specificity MAP kinase phosphatase, in pancreatic cancer. *Cytogenet Cell Genet* 82, 156-159.
288. Chen, H.Y., Yu, S.L., Chen, C.H., Chang, G.C., Chen, C.Y., Yuan, A., Cheng, C.L., Wang, C.H., Terng, H.J., Kao, S.F., et al. (2007). A five-gene signature and clinical outcome in non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 356, 11-20.
289. Chan, D.W., Liu, V.W., Tsao, G.S., Yao, K.M., Furukawa, T., Chan, K.K., and Ngan, H.Y. (2008). Loss of MKP3 mediated by oxidative stress enhances tumorigenicity and chemoresistance of ovarian cancer cells. *Carcinogenesis* 29, 1742-1750.
290. Furukawa, T., Sunamura, M., Motoi, F., Matsuno, S., and Horii, A. (2003). Potential tumor suppressive pathway involving DUSP6/MKP-3 in pancreatic cancer. *Am J Pathol* 162, 1807-1815.

291. Sutterluty, H., Mayer, C.E., Setinek, U., Attems, J., Ovtcharov, S., Mikula, M., Mikulits, W., Micksche, M., and Berger, W. (2007). Down-regulation of Sprouty2 in non-small cell lung cancer contributes to tumor malignancy via extracellular signal-regulated kinase pathway-dependent and -independent mechanisms. *Mol Cancer Res* 5, 509-520.
292. Fong, C.W., Chua, M.S., McKie, A.B., Ling, S.H., Mason, V., Li, R., Yusoff, P., Lo, T.L., Leung, H.Y., So, S.K., et al. (2006). Sprouty 2, an inhibitor of mitogen-activated protein kinase signaling, is down-regulated in hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* 66, 2048-2058.
293. Lo, T.L., Yusoff, P., Fong, C.W., Guo, K., McCaw, B.J., Phillips, W.A., Yang, H., Wong, E.S., Leong, H.F., Zeng, Q., et al. (2004). The ras/mitogen-activated protein kinase pathway inhibitor and likely tumor suppressor proteins, sprouty 1 and sprouty 2 are deregulated in breast cancer. *Cancer Res* 64, 6127-6136.
294. Zisman-Rozen, S., Fink, D., Ben-Izhak, O., Fuchs, Y., Brodski, A., Kraus, M.H., Bejar, J., and Ron, D. (2007). Downregulation of Sef, an inhibitor of receptor tyrosine kinase signaling, is common to a variety of human carcinomas. *Oncogene* 26, 6093-6098.
295. Darby, S., Murphy, T., Thomas, H., Robson, C.N., Leung, H.Y., Mathers, M.E., and Gnanapragasam, V.J. (2009). Similar expression to FGF (Sef) inhibits fibroblast growth factor-induced tumorigenic behaviour in prostate cancer cells and is downregulated in aggressive clinical disease. *Br J Cancer* 101, 1891-1899.
296. Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* 100, 57-70.
297. Chambers, A.F., Groom, A.C., and MacDonald, I.C. (2002). Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. *Nat Rev Cancer* 2, 563-572.
298. Geiger, T.R., and Peeper, D.S. (2009). Metastasis mechanisms. *Biochim Biophys Acta* 1796, 293-308.
299. Grunert, S., Jechlinger, M., and Beug, H. (2003). Diverse cellular and molecular mechanisms contribute to epithelial plasticity and metastasis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4, 657-665.

300. Kalluri, R., and Weinberg, R.A. (2009). The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest* *119*, 1420-1428.
301. Perl, A.K., Wilgenbus, P., Dahl, U., Semb, H., and Christofori, G. (1998). A causal role for E-cadherin in the transition from adenoma to carcinoma. *Nature* *392*, 190-193.
302. Peinado, H., Olmeda, D., and Cano, A. (2007). Snail, Zeb and bHLH factors in tumour progression: an alliance against the epithelial phenotype? *Nat Rev Cancer* *7*, 415-428.
303. Thiery, J.P. (2002). Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nat Rev Cancer* *2*, 442-454.
304. Herrera, R. (1998). Modulation of hepatocyte growth factor-induced scattering of HT29 colon carcinoma cells. Involvement of the MAPK pathway. *J Cell Sci* *111* (Pt 8), 1039-1049.
305. Schramek, H., Feifel, E., Healy, E., and Pollack, V. (1997). Constitutively active mutant of the mitogen-activated protein kinase kinase MEK1 induces epithelial dedifferentiation and growth inhibition in madin-darby canine kidney-C7 cells. *J Biol Chem* *272*, 11426-11433.
306. Potempa, S., and Ridley, A.J. (1998). Activation of both MAP kinase and phosphatidylinositide 3-kinase by Ras is required for hepatocyte growth factor/scatter factor-induced adherens junction disassembly. *Mol Biol Cell* *9*, 2185-2200.
307. Tanimura, S., Chatani, Y., Hoshino, R., Sato, M., Watanabe, S., Kataoka, T., Nakamura, T., and Kohno, M. (1998). Activation of the 41/43 kDa mitogen-activated protein kinase signaling pathway is required for hepatocyte growth factor-induced cell scattering. *Oncogene* *17*, 57-65.
308. Janda, E., Lehmann, K., Killisch, I., Jechlinger, M., Herzig, M., Downward, J., Beug, H., and Grunert, S. (2002). Ras and TGF[beta] cooperatively regulate epithelial cell plasticity and metastasis: dissection of Ras signaling pathways. *J Cell Biol* *156*, 299-313.

309. Grotegut, S., von Schweinitz, D., Christofori, G., and Lehenbre, F. (2006). Hepatocyte growth factor induces cell scattering through MAPK/Egr-1-mediated upregulation of Snail. *EMBO J* 25, 3534-3545.
310. Conacci-Sorrell, M., Simcha, I., Ben-Yedidia, T., Blechman, J., Savagner, P., and Ben-Ze'ev, A. (2003). Autoregulation of E-cadherin expression by cadherin-cadherin interactions: the roles of beta-catenin signaling, Slug, and MAPK. *J Cell Biol* 163, 847-857.
311. Wang, X.Q., Li, H., Van Putten, V., Winn, R.A., Heasley, L.E., and Nemenoff, R.A. (2009). Oncogenic K-Ras regulates proliferation and cell junctions in lung epithelial cells through induction of cyclooxygenase-2 and activation of metalloproteinase-9. *Mol Biol Cell* 20, 791-800.
312. Doehn, U., Hauge, C., Frank, S.R., Jensen, C.J., Duda, K., Nielsen, J.V., Cohen, M.S., Johansen, J.V., Winther, B.R., Lund, L.R., et al. (2009). RSK is a principal effector of the RAS-ERK pathway for eliciting a coordinate promotile/invasive gene program and phenotype in epithelial cells. *Mol Cell* 35, 511-522.
313. Deryugina, E.I., and Quigley, J.P. (2006). Matrix metalloproteinases and tumor metastasis. *Cancer Metastasis Rev* 25, 9-34.
314. Jodele, S., Blavier, L., Yoon, J.M., and DeClerck, Y.A. (2006). Modifying the soil to affect the seed: role of stromal-derived matrix metalloproteinases in cancer progression. *Cancer Metastasis Rev* 25, 35-43.
315. Egeblad, M., and Werb, Z. (2002). New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat Rev Cancer* 2, 161-174.
316. Sahai, E. (2005). Mechanisms of cancer cell invasion. *Curr Opin Genet Dev* 15, 87-96.
317. Janulis, M., Silberman, S., Ambegaokar, A., Gutkind, J.S., and Schultz, R.M. (1999). Role of mitogen-activated protein kinases and c-Jun/AP-1 trans-activating activity in the regulation of protease mRNAs and the malignant phenotype in NIH 3T3 fibroblasts. *J Biol Chem* 274, 801-813.

318. Reddy, K.B., Nabha, S.M., and Atanaskova, N. (2003). Role of MAP kinase in tumor progression and invasion. *Cancer Metastasis Rev* 22, 395-403.
319. Sebolt-Leopold, J.S., Dudley, D.T., Herrera, R., Van Becelaere, K., Wiland, A., Gowan, R.C., Teclé, H., Barrett, S.D., Bridges, A., Przybranowski, S., et al. (1999). Blockade of the MAP kinase pathway suppresses growth of colon tumors in vivo. *Nat Med* 5, 810-816.
320. Simon, C., Juarez, J., Nicolson, G.L., and Boyd, D. (1996). Effect of PD 098059, a specific inhibitor of mitogen-activated protein kinase kinase, on urokinase expression and in vitro invasion. *Cancer Res* 56, 5369-5374.
321. Komatsu, K., Buchanan, F.G., Otaka, M., Jin, M., Odashima, M., Horikawa, Y., Watanabe, S., and Dubois, R.N. (2006). Gene expression profiling following constitutive activation of MEK1 and transformation of rat intestinal epithelial cells. *Mol Cancer* 5, 63.
322. Vincenti, M.P., and Brinckerhoff, C.E. (2007). Signal transduction and cell-type specific regulation of matrix metalloproteinase gene expression: can MMPs be good for you? *J Cell Physiol* 213, 355-364.
323. Blasi, F., and Carmeliet, P. (2002). uPAR: a versatile signalling orchestrator. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3, 932-943.
324. Laufs, S., Schumacher, J., and Allgayer, H. (2006). Urokinase-receptor (u-PAR): an essential player in multiple games of cancer: a review on its role in tumor progression, invasion, metastasis, proliferation/dormancy, clinical outcome and minimal residual disease. *Cell Cycle* 5, 1760-1771.
325. Aguirre-Ghiso, J.A., Alonso, D.F., Farias, E.F., Gomez, D.E., and de Kier Joffe, E.B. (1999). Deregulation of the signaling pathways controlling urokinase production. Its relationship with the invasive phenotype. *Eur J Biochem* 263, 295-304.
326. Ridley, A.J., Schwartz, M.A., Burridge, K., Firtel, R.A., Ginsberg, M.H., Borisy, G., Parsons, J.T., and Horwitz, A.R. (2003). Cell migration: integrating signals from front to back. *Science* 302, 1704-1709.

327. Raftopoulou, M., and Hall, A. (2004). Cell migration: Rho GTPases lead the way. *Dev Biol* 265, 23-32.
328. Vial, E., Sahai, E., and Marshall, C.J. (2003). ERK-MAPK signaling coordinately regulates activity of Rac1 and RhoA for tumor cell motility. *Cancer Cell* 4, 67-79.
329. Fincham, V.J., James, M., Frame, M.C., and Winder, S.J. (2000). Active ERK/MAP kinase is targeted to newly forming cell-matrix adhesions by integrin engagement and v-Src. *Embo J* 19, 2911-2923.
330. Klein, R.M., Spofford, L.S., Abel, E.V., Ortiz, A., and Aplin, A.E. (2008). B-RAF regulation of Rnd3 participates in actin cytoskeletal and focal adhesion organization. *Mol Biol Cell* 19, 498-508.
331. Webb, D.J., Donais, K., Whitmore, L.A., Thomas, S.M., Turner, C.E., Parsons, J.T., and Horwitz, A.F. (2004). FAK-Src signalling through paxillin, ERK and MLCK regulates adhesion disassembly. *Nat Cell Biol* 6, 154-161.
332. Xie, H., Pallero, M.A., Gupta, K., Chang, P., Ware, M.F., Witke, W., Kwiatkowski, D.J., Lauffenburger, D.A., Murphy-Ullrich, J.E., and Wells, A. (1998). EGF receptor regulation of cell motility: EGF induces disassembly of focal adhesions independently of the motility-associated PLCgamma signaling pathway. *J Cell Sci* 111 (Pt 5), 615-624.
333. Carragher, N.O., Westhoff, M.A., Fincham, V.J., Schaller, M.D., and Frame, M.C. (2003). A novel role for FAK as a protease-targeting adaptor protein: regulation by p42 ERK and Src. *Curr Biol* 13, 1442-1450.
334. Glading, A., Chang, P., Lauffenburger, D.A., and Wells, A. (2000). Epidermal growth factor receptor activation of calpain is required for fibroblast motility and occurs via an ERK/MAP kinase signaling pathway. *J Biol Chem* 275, 2390-2398.
335. Pawlak, G., and Helfman, D.M. (2002). Post-transcriptional down-regulation of ROCK1/Rho-kinase through an MEK-dependent pathway leads to cytoskeleton disruption in Ras-transformed fibroblasts. *Mol Biol Cell* 13, 336-347.

336. Sahai, E., Olson, M.F., and Marshall, C.J. (2001). Cross-talk between Ras and Rho signalling pathways in transformation favours proliferation and increased motility. *Embo J* 20, 755-766.
337. Zheng, Y., Xia, Y., Hawke, D., Halle, M., Tremblay, M.L., Gao, X., Zhou, X.Z., Aldape, K., Cobb, M.H., Xie, K., et al. (2009). FAK phosphorylation by ERK primes ras-induced tyrosine dephosphorylation of FAK mediated by PIN1 and PTP-PEST. *Mol Cell* 35, 11-25.
338. Chen, H., Zhu, G., Li, Y., Padia, R.N., Dong, Z., Pan, Z.K., Liu, K., and Huang, S. (2009). Extracellular Signal-Regulated Kinase Signaling Pathway Regulates Breast Cancer Cell Migration by Maintaining slug Expression. *Cancer Res.*
339. Klemke, R.L., Cai, S., Giannini, A.L., Gallagher, P.J., de Lanerolle, P., and Cheresh, D.A. (1997). Regulation of cell motility by mitogen-activated protein kinase. *J Cell Biol* 137, 481-492.
340. Brahmabhatt, A.A., and Klemke, R.L. (2003). ERK and RhoA differentially regulate pseudopodia growth and retraction during chemotaxis. *J Biol Chem* 278, 13016-13025.
341. Bockhorn, M., Jain, R.K., and Munn, L.L. (2007). Active versus passive mechanisms in metastasis: do cancer cells crawl into vessels, or are they pushed? *Lancet Oncol* 8, 444-448.
342. Dangi-Garimella, S., Yun, J., Eves, E.M., Newman, M., Erkeland, S.J., Hammond, S.M., Minn, A.J., and Rosner, M.R. (2009). Raf kinase inhibitory protein suppresses a metastasis signalling cascade involving LIN28 and let-7. *Embo J* 28, 347-358.
343. Gilmore, A.P. (2005). Anoikis. *Cell Death Differ* 12 Suppl 2, 1473-1477.
344. Frisch, S.M., and Francis, H. (1994). Disruption of epithelial cell-matrix interactions induces apoptosis. *J Cell Biol* 124, 619-626.
345. Aoudjit, F., and Vuori, K. (2001). Matrix attachment regulates Fas-induced apoptosis in endothelial cells: a role for c-flip and implications for anoikis. *J Cell Biol* 152, 633-643.

346. Jost, M., Huggett, T.M., Kari, C., and Rodeck, U. (2001). Matrix-independent survival of human keratinocytes through an EGF receptor/MAPK-kinase-dependent pathway. *Mol Biol Cell* *12*, 1519-1527.
347. Le Gall, M., Chambard, J.C., Breitmayer, J.P., Grall, D., Pouyssegur, J., and Van Obberghen-Schilling, E. (2000). The p42/p44 MAP kinase pathway prevents apoptosis induced by anchorage and serum removal. *Mol Biol Cell* *11*, 1103-1112.
348. Rosen, K., Rak, J., Leung, T., Dean, N.M., Kerbel, R.S., and Filmus, J. (2000). Activated Ras prevents downregulation of Bcl-X(L) triggered by detachment from the extracellular matrix. A mechanism of Ras-induced resistance to anoikis in intestinal epithelial cells. *J Cell Biol* *149*, 447-456.
349. Schulze, A., Lehmann, K., Jefferies, H.B., McMahon, M., and Downward, J. (2001). Analysis of the transcriptional program induced by Raf in epithelial cells. *Genes Dev* *15*, 981-994.
350. Welch, D.R., Sakamaki, T., Pioquinto, R., Leonard, T.O., Goldberg, S.F., Hon, Q., Erikson, R.L., Rieber, M., Rieber, M.S., Hicks, D.J., et al. (2000). Transfection of constitutively active mitogen-activated protein/extracellular signal-regulated kinase confers tumorigenic and metastatic potentials to NIH3T3 cells. *Cancer Res* *60*, 1552-1556.
351. Balmanno, K., and Cook, S.J. (2009). Tumour cell survival signalling by the ERK1/2 pathway. *Cell Death Differ* *16*, 368-377.
352. Reginato, M.J., Mills, K.R., Paulus, J.K., Lynch, D.K., Sgroi, D.C., Debnath, J., Muthuswamy, S.K., and Brugge, J.S. (2003). Integrins and EGFR coordinately regulate the pro-apoptotic protein Bim to prevent anoikis. *Nat Cell Biol* *5*, 733-740.
353. Steimle, V., Otten, L.A., Zufferey, M., and Mach, B. (1993). Complementation cloning of an MHC class II transactivator mutated in hereditary MHC class II deficiency (or bare lymphocyte syndrome). *Cell* *75*, 135-146.
354. Voong, L.N., Slater, A.R., Kratovac, S., and Cressman, D.E. (2008). Mitogen-activated protein kinase ERK1/2 regulates the class II transactivator. *J Biol Chem* *283*, 9031-9039.

355. Yao, Y., Xu, Q., Kwon, M.J., Matta, R., Liu, Y., Hong, S.C., and Chang, C.H. (2006). ERK and p38 MAPK signaling pathways negatively regulate CIITA gene expression in dendritic cells and macrophages. *J Immunol* 177, 70-76.
356. Petermann, K.B., Rozenberg, G.I., Zedek, D., Groben, P., McKinnon, K., Buehler, C., Kim, W.Y., Shields, J.M., Penland, S., Bear, J.E., et al. (2007). CD200 is induced by ERK and is a potential therapeutic target in melanoma. *J Clin Invest* 117, 3922-3929.
357. Pivarcsi, A., Muller, A., Hippe, A., Rieker, J., van Lierop, A., Steinhoff, M., Seeliger, S., Kubitza, R., Pippirs, U., Meller, S., et al. (2007). Tumor immune escape by the loss of homeostatic chemokine expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 19055-19060.
358. Witz, I.P. (2008). The selectin-selectin ligand axis in tumor progression. *Cancer Metastasis Rev* 27, 19-30.
359. Koop, S., Schmidt, E.E., MacDonald, I.C., Morris, V.L., Khokha, R., Grattan, M., Leone, J., Chambers, A.F., and Groom, A.C. (1996). Independence of metastatic ability and extravasation: metastatic ras-transformed and control fibroblasts extravasate equally well. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 11080-11084.
360. Varghese, H.J., Davidson, M.T., MacDonald, I.C., Wilson, S.M., Nadkarni, K.V., Groom, A.C., and Chambers, A.F. (2002). Activated ras regulates the proliferation/apoptosis balance and early survival of developing micrometastases. *Cancer Res* 62, 887-891.
361. Tremblay, P.L., Huot, J., and Auger, F.A. (2008). Mechanisms by which E-selectin regulates diapedesis of colon cancer cells under flow conditions. *Cancer Res* 68, 5167-5176.
362. Fidler, I.J. (2003). The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited. *Nat Rev Cancer* 3, 453-458.
363. Sivaraman, V.S., Wang, H., Nuovo, G.J., and Malbon, C.C. (1997). Hyperexpression of mitogen-activated protein kinase in human breast cancer. *J Clin Invest* 99, 1478-1483.

364. Adeyinka, A., Nui, Y., Cherlet, T., Snell, L., Watson, P.H., and Murphy, L.C. (2002). Activated mitogen-activated protein kinase expression during human breast tumorigenesis and breast cancer progression. *Clin Cancer Res* 8, 1747-1753.
365. Albanell, J., Codony-Servat, J., Rojo, F., Del Campo, J.M., Sauleda, S., Anido, J., Raspall, G., Giralt, J., Rosello, J., Nicholson, R.I., et al. (2001). Activated extracellular signal-regulated kinases: association with epidermal growth factor receptor/transforming growth factor alpha expression in head and neck squamous carcinoma and inhibition by anti-epidermal growth factor receptor treatments. *Cancer Res* 61, 6500-6510.
366. Webb, C.P., Van Aelst, L., Wigler, M.H., and Woude, G.F. (1998). Signaling pathways in Ras-mediated tumorigenicity and metastasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 8773-8778.
367. Ballif, B.A., and Blenis, J. (2001). Molecular mechanisms mediating mammalian mitogen-activated protein kinase (MAPK) kinase (MEK)-MAPK cell survival signals. *Cell Growth Differ* 12, 397-408.
368. Torii, S., Yamamoto, T., Tsuchiya, Y., and Nishida, E. (2006). ERK MAP kinase in G cell cycle progression and cancer. *Cancer Sci* 97, 697-702.
369. Bergers, G., and Benjamin, L.E. (2003). Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nat Rev Cancer* 3, 401-410.
370. Pages, G., and Pouyssegur, J. (2005). Transcriptional regulation of the Vascular Endothelial Growth Factor gene--a concert of activating factors. *Cardiovasc Res* 65, 564-573.
371. Delaney, A.M., Printen, J.A., Chen, H., Fauman, E.B., and Dudley, D.T. (2002). Identification of a novel mitogen-activated protein kinase kinase activation domain recognized by the inhibitor PD 184352. *Mol Cell Biol* 22, 7593-7602.
372. Rinehart, J., Adjei, A.A., Lorusso, P.M., Waterhouse, D., Hecht, J.R., Natale, R.B., Hamid, O., Varterasian, M., Asbury, P., Kaldjian, E.P., et al. (2004). Multicenter phase II study of the oral MEK inhibitor, CI-1040, in patients with advanced non-small-cell lung, breast, colon, and pancreatic cancer. *J Clin Oncol* 22, 4456-4462.

373. English, J.M., and Cobb, M.H. (2002). Pharmacological inhibitors of MAPK pathways. *Trends Pharmacol Sci* 23, 40-45.
374. Davies, B.R., Logie, A., McKay, J.S., Martin, P., Steele, S., Jenkins, R., Cockerill, M., Cartlidge, S., and Smith, P.D. (2007). AZD6244 (ARRY-142886), a potent inhibitor of mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase kinase 1/2 kinases: mechanism of action in vivo, pharmacokinetic/pharmacodynamic relationship, and potential for combination in preclinical models. *Mol Cancer Ther* 6, 2209-2219.
375. Wilhelm, S., Carter, C., Lynch, M., Lowinger, T., Dumas, J., Smith, R.A., Schwartz, B., Simantov, R., and Kelley, S. (2006). Discovery and development of sorafenib: a multikinase inhibitor for treating cancer. *Nat Rev Drug Discov* 5, 835-844.
376. Sharma, A., Tran, M.A., Liang, S., Sharma, A.K., Amin, S., Smith, C.D., Dong, C., and Robertson, G.P. (2006). Targeting mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase kinase in the mutant (V600E) B-Raf signaling cascade effectively inhibits melanoma lung metastases. *Cancer Res* 66, 8200-8209.
377. Kramer, B.W., Gotz, R., and Rapp, U.R. (2004). Use of mitogenic cascade blockers for treatment of C-Raf induced lung adenoma in vivo: CI-1040 strongly reduces growth and improves lung structure. *BMC Cancer* 4, 24.
378. King, A.J., Patrick, D.R., Batorsky, R.S., Ho, M.L., Do, H.T., Zhang, S.Y., Kumar, R., Rusnak, D.W., Takle, A.K., Wilson, D.M., et al. (2006). Demonstration of a genetic therapeutic index for tumors expressing oncogenic BRAF by the kinase inhibitor SB-590885. *Cancer Res* 66, 11100-11105.
379. Shepherd, C., Puzanov, I., and Sosman, J.A. (2010). B-RAF inhibitors: an evolving role in the therapy of malignant melanoma. *Curr Oncol Rep* 12, 146-152.
380. Hansen, J.D., Grina, J., Newhouse, B., Welch, M., Topalov, G., Littman, N., Callejo, M., Gloor, S., Martinson, M., Laird, E., et al. (2008). Potent and selective pyrazole-based inhibitors of B-Raf kinase. *Bioorg Med Chem Lett* 18, 4692-4695.

381. Hoeflich, K.P., Herter, S., Tien, J., Wong, L., Berry, L., Chan, J., O'Brien, C., Modrusan, Z., Seshagiri, S., Lackner, M., et al. (2009). Antitumor efficacy of the novel RAF inhibitor GDC-0879 is predicted by BRAFV600E mutational status and sustained extracellular signal-regulated kinase/mitogen-activated protein kinase pathway suppression. *Cancer Res* 69, 3042-3051.
382. O'Hare, T., Eide, C.A., and Deininger, M.W. (2007). Bcr-Abl kinase domain mutations, drug resistance, and the road to a cure for chronic myeloid leukemia. *Blood* 110, 2242-2249.
383. Engelman, J.A., and Settleman, J. (2008). Acquired resistance to tyrosine kinase inhibitors during cancer therapy. *Curr Opin Genet Dev* 18, 73-79.
384. Yeh, T.C., Marsh, V., Bernat, B.A., Ballard, J., Colwell, H., Evans, R.J., Parry, J., Smith, D., Brandhuber, B.J., Gross, S., et al. (2007). Biological characterization of ARRY-142886 (AZD6244), a potent, highly selective mitogen-activated protein kinase kinase 1/2 inhibitor. *Clin Cancer Res* 13, 1576-1583.
385. Daouti, S., Wang, H., Li, W.H., Higgins, B., Kolinsky, K., Packman, K., Specian, A., Jr., Kong, N., Huby, N., Wen, Y., et al. (2009). Characterization of a novel mitogen-activated protein kinase kinase 1/2 inhibitor with a unique mechanism of action for cancer therapy. *Cancer Res* 69, 1924-1932.
386. Huynh, H., Ngo, V.C., Koong, H.N., Poon, D., Choo, S.P., Toh, H.C., Thng, C.H., Chow, P., Ong, H.S., Chung, A., et al. (2009). AZD6244 enhances the anti-tumor activity of sorafenib in ectopic and orthotopic models of human hepatocellular carcinoma (HCC). *J Hepatol*.
387. Bekaii-Saab, T., Phelps, M.A., Li, X., Saji, M., Goff, L., Kauh, J.S., O'Neil, B.H., Balsom, S., Balint, C., Liersemann, R., et al. (2011). Multi-Institutional Phase II Study of Selumetinib in Patients With Metastatic Biliary Cancers. *J Clin Oncol* 29, 2357-2363.
388. O'Neil, B.H., Goff, L.W., Kauh, J.S., Strosberg, J.R., Bekaii-Saab, T.S., Lee, R.M., Kazi, A., Moore, D.T., Learoyd, M., Lush, R.M., et al. (2011). Phase II Study of the

Mitogen-Activated Protein Kinase 1/2 Inhibitor Selumetinib in Patients With Advanced Hepatocellular Carcinoma. *J Clin Oncol*.

389. Dummer, R., Robert, C., Chapman, P. B., Sosman, J. A., Middleton, M., Bastholt, L., Kemsley, K., Cantarini, M.V., Morris, C and Kirkwood, J.M. (2008). AZD6244 (ARRY-142886) vs temozolomide (TMZ) in patients (pts) with advanced melanoma: An open-label, randomized, multicenter, phase II study. *J Clin Oncol* (abstract) 26, 9033.
390. Hainsworth, J.D., Cebotaru, C.L., Kanarev, V., Ciuleanu, T.E., Damyanov, D., Stella, P., Ganchev, H., Pover, G., Morris, C., and Tzekova, V. (2010). A phase II, open-label, randomized study to assess the efficacy and safety of AZD6244 (ARRY-142886) versus pemetrexed in patients with non-small cell lung cancer who have failed one or two prior chemotherapeutic regimens. *J Thorac Oncol* 5, 1630-1636.
391. Bennouna, J., Lang, I., Valladares-Ayerbes, M., Boer, K., Adenis, A., Escudero, P., Kim, T.Y., Pover, G.M., Morris, C.D., and Douillard, J.Y. (2010). A Phase II, open-label, randomised study to assess the efficacy and safety of the MEK1/2 inhibitor AZD6244 (ARRY-142886) versus capecitabine monotherapy in patients with colorectal cancer who have failed one or two prior chemotherapeutic regimens. *Invest New Drugs*.
392. O'Neil, B. H., Williams-Goff, L. W., Kauh, J., Bekaii-Saab, T., Strosberg, J. R., Lee, R., Deal, A. M., Sullivan, D. and Sebti, S. M. (2009). A phase II study of AZD6244 in advanced or metastatic hepatocellular carcinoma. *J Clin oncol* (abstract) 27, 15574.
393. Bodoky, G., Timcheva, C., Spigel, D.R., La Stella, P.J., Ciuleanu, T.E., Pover, G., and Tebbutt, N.C. (2011). A phase II open-label randomized study to assess the efficacy and safety of selumetinib (AZD6244 [ARRY-142886]) versus capecitabine in patients with advanced or metastatic pancreatic cancer who have failed first-line gemcitabine therapy. *Invest New Drugs*.

394. Dhomen, N., and Marais, R. (2009). BRAF signaling and targeted therapies in melanoma. *Hematol Oncol Clin North Am* 23, 529-545, ix.
395. Garber, K. (2009). Trial offers early test case for personalized medicine. *J Natl Cancer Inst* 101, 136-138.
396. Johnston S. (2007). XL518, a potent, selective, orally bioavailable MEK1 inhibitor, downregulates the Ras/Raf/MEK/ERK pathway in vivo, resulting in tumor growth inhibition and regression in preclinical models. 19th AACR-NCI-EORTC Symposium on Molecular Targets and Cancer Therapeutics. Abstract C209.
397. L. S. Rosen, P. Galatin, J. M. Fehling, I. Laux, M. Dinolfo, J. Frye, D. Laird, B. I. Sikic (2008). A phase 1 dose-escalation study of XL518, a potent MEK inhibitor administered orally daily to subjects with solid tumors. *J Clin Oncol (abstract)* 26, 14585.
398. Iverson, C., Larson, G., Lai, C., Yeh, L.T., Dadson, C., Weingarten, P., Appleby, T., Vo, T., Maderna, A., Vernier, J.M., et al. (2009). RDEA119/BAY 869766: a potent, selective, allosteric inhibitor of MEK1/2 for the treatment of cancer. *Cancer Res* 69, 6839-6847.
399. Thompson, G.N., Chochinov, H.M., Wilson, K.G., McPherson, C.J., Chary, S., O'Shea, F.M., Kuhl, D.R., Fainsinger, R.L., Gagnon, P.R., and Macmillan, K.A. (2009). Prognostic acceptance and the well-being of patients receiving palliative care for cancer. *J Clin Oncol* 27, 5757-5762.
400. Gilmartin, A.G., Bleam, M.R., Groy, A., Moss, K.G., Minthorn, E.A., Kulkarni, S.G., Rominger, C.M., Erskine, S., Fisher, K.E., Yang, J., et al. (2011). GSK1120212 (JTP-74057) is an inhibitor of MEK activity and activation with favorable pharmacokinetic properties for sustained in vivo pathway inhibition. *Clin Cancer Res* 17, 989-1000.
401. Daouti, S., Higgins, B., Kolinsky, K., Packman, K., Wang, H., Rizzo, C., Moliterni, J., Huby, N., Fotouhi, N., Liu, M., et al. (2010). Preclinical in vivo evaluation of efficacy, pharmacokinetics, and pharmacodynamics of a novel MEK1/2 kinase inhibitor RO5068760 in multiple tumor models. *Mol Cancer Ther* 9, 134-144.

402. Lee, L., Niu, H., Goelzer, P., Rueger, R., Deutsch, J., Busse-Reid, R., DeSchepper, S., Blotner, S., Barrett, J., Weissgerber, G., et al. (2010). The safety, tolerability, pharmacokinetics, and pharmacodynamics of single oral doses of RO5068760, an MEK inhibitor, in healthy volunteers: assessment of target suppression. *J Clin Pharmacol* *50*, 1397-1405.
403. Isshiki, Y., Kohchi, Y., Iikura, H., Matsubara, Y., Asoh, K., Murata, T., Kohchi, M., Mizuguchi, E., Tsujii, S., Hattori, K., et al. (2011). Design and synthesis of novel allosteric MEK inhibitor CH4987655 as an orally available anticancer agent. *Bioorg Med Chem Lett* *21*, 1795-1801.
404. Dong, Q., Dougan, D.R., Gong, X., Halkowycz, P., Jin, B., Kanouni, T., O'Connell, S.M., Scolah, N., Shi, L., Wallace, M.B., et al. (2011). Discovery of TAK-733, a potent and selective MEK allosteric site inhibitor for the treatment of cancer. *Bioorg Med Chem Lett* *21*, 1315-1319.
405. Kim, K., Kong, S.Y., Fulciniti, M., Li, X., Song, W., Nahar, S., Burger, P., Rumizen, M.J., Podar, K., Chauhan, D., et al. (2010). Blockade of the MEK/ERK signalling cascade by AS703026, a novel selective MEK1/2 inhibitor, induces pleiotropic anti-myeloma activity in vitro and in vivo. *Br J Haematol* *149*, 537-549.
406. Yoon, J., Koo, K.H., and Choi, K.Y. (2011). MEK1/2 inhibitors AS703026 and AZD6244 may be potential therapies for KRAS mutated colorectal cancer that is resistant to EGFR monoclonal antibody therapy. *Cancer Res* *71*, 445-453.
407. Garcia-Martinez, J.M., Moran, J., Clarke, R.G., Gray, A., Cosulich, S.C., Chresta, C.M., and Alessi, D.R. (2009). Ku-0063794 is a specific inhibitor of the mammalian target of rapamycin (mTOR). *Biochem J* *421*, 29-42.
408. Solit, D.B., Garraway, L.A., Pratilas, C.A., Sawai, A., Getz, G., Basso, A., Ye, Q., Lobo, J.M., She, Y., Osman, I., et al. (2006). BRAF mutation predicts sensitivity to MEK inhibition. *Nature* *439*, 358-362.
409. Sebolt-Leopold, J.S. (2008). Advances in the development of cancer therapeutics directed against the RAS-mitogen-activated protein kinase pathway. *Clin Cancer Res* *14*, 3651-3656.

410. Tentler, J.J., Nallapareddy, S., Tan, A.C., Spreafico, A., Pitts, T.M., Morelli, M.P., Selby, H.M., Kachaeva, M.I., Flanigan, S.A., Kulikowski, G.N., et al. (2010). Identification of predictive markers of response to the MEK1/2 inhibitor selumetinib (AZD6244) in K-ras-mutated colorectal cancer. *Mol Cancer Ther* 9, 3351-3362.
411. Kaplan, F.M., Shao, Y., Mayberry, M.M., and Aplin, A.E. (2011). Hyperactivation of MEK-ERK1/2 signaling and resistance to apoptosis induced by the oncogenic B-RAF inhibitor, PLX4720, in mutant N-RAS melanoma cells. *Oncogene* 30, 366-371.
412. Kinross, K.M., Brown, D.V., Kleinschmidt, M., Jackson, S., Christensen, J., Cullinane, C., Hicks, R.J., Johnstone, R.W., and McArthur, G.A. (2011). In vivo activity of combined PI3K/mTOR and MEK-inhibition in a KrasG12D;Pten deletion mouse model of ovarian cancer. *Mol Cancer Ther*.
413. Engelman, J.A., Chen, L., Tan, X., Crosby, K., Guimaraes, A.R., Upadhyay, R., Maira, M., McNamara, K., Perera, S.A., Song, Y., et al. (2008). Effective use of PI3K and MEK inhibitors to treat mutant Kras G12D and PIK3CA H1047R murine lung cancers. *Nat Med* 14, 1351-1356.
414. Legrier, M.E., Yang, C.P., Yan, H.G., Lopez-Barcons, L., Keller, S.M., Perez-Soler, R., Horwitz, S.B., and McDaid, H.M. (2007). Targeting protein translation in human non small cell lung cancer via combined MEK and mammalian target of rapamycin suppression. *Cancer Res* 67, 11300-11308.
415. Chang, Q., Chapman, M.S., Miner, J.N., and Hedley, D.W. (2010). Antitumour activity of a potent MEK inhibitor RDEA119/BAY 869766 combined with rapamycin in human orthotopic primary pancreatic cancer xenografts. *BMC Cancer* 10, 515.
416. Villanueva, J., Vultur, A., Lee, J.T., Somasundaram, R., Fukunaga-Kalabis, M., Cipolla, A.K., Wubbenhorst, B., Xu, X., Gimotty, P.A., Kee, D., et al. (2010). Acquired resistance to BRAF inhibitors mediated by a RAF kinase switch in

- melanoma can be overcome by cotargeting MEK and IGF-1R/PI3K. *Cancer Cell* *18*, 683-695.
417. Nazarian, R., Shi, H., Wang, Q., Kong, X., Koya, R.C., Lee, H., Chen, Z., Lee, M.K., Attar, N., Sazegar, H., et al. (2010). Melanomas acquire resistance to B-RAF(V600E) inhibition by RTK or N-RAS upregulation. *Nature* *468*, 973-977.
 418. Emery, C.M., Vijayendran, K.G., Zipser, M.C., Sawyer, A.M., Niu, L., Kim, J.J., Hatton, C., Chopra, R., Oberholzer, P.A., Karpova, M.B., et al. (2009). MEK1 mutations confer resistance to MEK and B-RAF inhibition. *Proc Natl Acad Sci U S A* *106*, 20411-20416.
 419. Andrieux, L.O., Fautrel, A., Bessard, A., Guillouzo, A., Baffet, G., and Langouet, S. (2007). GATA-1 is essential in EGF-mediated induction of nucleotide excision repair activity and ERCC1 expression through ERK2 in human hepatoma cells. *Cancer Res* *67*, 2114-2123.
 420. Haass, N.K., Sproesser, K., Nguyen, T.K., Contractor, R., Medina, C.A., Nathanson, K.L., Herlyn, M., and Smalley, K.S. (2008). The mitogen-activated protein/extracellular signal-regulated kinase kinase inhibitor AZD6244 (ARRY-142886) induces growth arrest in melanoma cells and tumor regression when combined with docetaxel. *Clin Cancer Res* *14*, 230-239.
 421. Mabuchi, S., Ohmichi, M., Kimura, A., Hisamoto, K., Hayakawa, J., Nishio, Y., Adachi, K., Takahashi, K., Arimoto-Ishida, E., Nakatsuji, Y., et al. (2002). Inhibition of phosphorylation of BAD and Raf-1 by Akt sensitizes human ovarian cancer cells to paclitaxel. *J Biol Chem* *277*, 33490-33500.
 422. Brognard, J., and Dennis, P.A. (2002). Variable apoptotic response of NSCLC cells to inhibition of the MEK/ERK pathway by small molecules or dominant negative mutants. *Cell Death Differ* *9*, 893-904.
 423. Aoki, K., Ogawa, T., Ito, Y., and Nakashima, S. (2004). Cisplatin activates survival signals in UM-SCC-23 squamous cell carcinoma and these signal pathways are amplified in cisplatin-resistant squamous cell carcinoma. *Oncol Rep* *11*, 375-379.

424. Lunghi, P., Tabilio, A., Lo-Coco, F., Pelicci, P.G., and Bonati, A. (2005). Arsenic trioxide (ATO) and MEK1 inhibition synergize to induce apoptosis in acute promyelocytic leukemia cells. *Leukemia* *19*, 234-244.
425. Lunghi, P., Costanzo, A., Salvatore, L., Noguera, N., Mazzer, L., Tabilio, A., Lo-Coco, F., Levrero, M., and Bonati, A. (2006). MEK1 inhibition sensitizes primary acute myelogenous leukemia to arsenic trioxide-induced apoptosis. *Blood* *107*, 4549-4553.
426. Lunghi, P., Giuliani, N., Mazzer, L., Lombardi, G., Ricca, M., Corradi, A., Cantoni, A.M., Salvatore, L., Riccioni, R., Costanzo, A., et al. (2008). Targeting MEK/MAPK signal transduction module potentiates ATO-induced apoptosis in multiple myeloma cells through multiple signaling pathways. *Blood* *112*, 2450-2462.
427. Dai, Y., Landowski, T.H., Rosen, S.T., Dent, P., and Grant, S. (2002). Combined treatment with the checkpoint abrogator UCN-01 and MEK1/2 inhibitors potently induces apoptosis in drug-sensitive and -resistant myeloma cells through an IL-6-independent mechanism. *Blood* *100*, 3333-3343.
428. Rieber, M., and Rieber, M.S. (2006). Signalling responses linked to betulinic acid-induced apoptosis are antagonized by MEK inhibitor U0126 in adherent or 3D spheroid melanoma irrespective of p53 status. *Int J Cancer* *118*, 1135-1143.
429. Shannon, A.M., Telfer, B.A., Smith, P.D., Babur, M., Logie, A., Wilkinson, R.W., Debray, C., Stratford, I.J., Williams, K.J., and Wedge, S.R. (2009). The mitogen-activated protein/extracellular signal-regulated kinase kinase 1/2 inhibitor AZD6244 (ARRY-142886) enhances the radiation responsiveness of lung and colorectal tumor xenografts. *Clin Cancer Res* *15*, 6619-6629.
430. McCubrey, J.A., Steelman, L.S., Chappell, W.H., Abrams, S.L., Wong, E.W., Chang, F., Lehmann, B., Terrian, D.M., Milella, M., Tafuri, A., et al. (2007). Roles of the Raf/MEK/ERK pathway in cell growth, malignant transformation and drug resistance. *Biochim Biophys Acta* *1773*, 1263-1284.

431. Chung, E.J., Brown, A.P., Asano, H., Mandler, M., Burgan, W.E., Carter, D., Camphausen, K., and Citrin, D. (2009). In vitro and in vivo radiosensitization with AZD6244 (ARRY-142886), an inhibitor of mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase 1/2 kinase. *Clin Cancer Res* 15, 3050-3057.
432. Cunningham, D., Atkin, W., Lenz, H.J., Lynch, H.T., Minsky, B., Nordlinger, B., and Starling, N. (2010). Colorectal cancer. *Lancet* 375, 1030-1047.
433. Eaden, J.A., Abrams, K.R., and Mayberry, J.F. (2001). The risk of colorectal cancer in ulcerative colitis: a meta-analysis. *Gut* 48, 526-535.
434. Grady, W.M., and Carethers, J.M. (2008). Genomic and epigenetic instability in colorectal cancer pathogenesis. *Gastroenterology* 135, 1079-1099.
435. Wactawski-Wende, J., Kotchen, J.M., Anderson, G.L., Assaf, A.R., Brunner, R.L., O'Sullivan, M.J., Margolis, K.L., Ockene, J.K., Phillips, L., Pottern, L., et al. (2006). Calcium plus vitamin D supplementation and the risk of colorectal cancer. *N Engl J Med* 354, 684-696.
436. Fuchs, C.S., Giovannucci, E.L., Colditz, G.A., Hunter, D.J., Stampfer, M.J., Rosner, B., Speizer, F.E., and Willett, W.C. (1999). Dietary fiber and the risk of colorectal cancer and adenoma in women. *N Engl J Med* 340, 169-176.
437. Baron, J.A. (2005). Dietary fiber and colorectal cancer: an ongoing saga. *JAMA* 294, 2904-2906.
438. Chan, A.T., Ogino, S., and Fuchs, C.S. (2009). Aspirin use and survival after diagnosis of colorectal cancer. *JAMA* 302, 649-658.
439. Chan, A.T., Ogino, S., and Fuchs, C.S. (2007). Aspirin and the risk of colorectal cancer in relation to the expression of COX-2. *N Engl J Med* 356, 2131-2142.
440. Boland, C.R., Thibodeau, S.N., Hamilton, S.R., Sidransky, D., Eshleman, J.R., Burt, R.W., Meltzer, S.J., Rodriguez-Bigas, M.A., Fodde, R., Ranzani, G.N., et al. (1998). A National Cancer Institute Workshop on Microsatellite Instability for cancer detection and familial predisposition: development of international criteria for the

- determination of microsatellite instability in colorectal cancer. *Cancer Res* 58, 5248-5257.
441. Yamamoto, H., Sawai, H., and Perucho, M. (1997). Frameshift somatic mutations in gastrointestinal cancer of the microsatellite mutator phenotype. *Cancer Res* 57, 4420-4426.
442. Watanabe, T., Wu, T.T., Catalano, P.J., Ueki, T., Satriano, R., Haller, D.G., Benson, A.B., 3rd, and Hamilton, S.R. (2001). Molecular predictors of survival after adjuvant chemotherapy for colon cancer. *N Engl J Med* 344, 1196-1206.
443. Chittenden, T.W., Howe, E.A., Culhane, A.C., Sultana, R., Taylor, J.M., Holmes, C., and Quackenbush, J. (2008). Functional classification analysis of somatically mutated genes in human breast and colorectal cancers. *Genomics* 91, 508-511.
444. Eshleman, J.R., Casey, G., Kochera, M.E., Sedwick, W.D., Swinler, S.E., Veigl, M.L., Willson, J.K., Schwartz, S., and Markowitz, S.D. (1998). Chromosome number and structure both are markedly stable in RER colorectal cancers and are not destabilized by mutation of p53. *Oncogene* 17, 719-725.
445. Sieber, O.M., Heinimann, K., Gorman, P., Lamlum, H., Crabtree, M., Simpson, C.A., Davies, D., Neale, K., Hodgson, S.V., Roylance, R.R., et al. (2002). Analysis of chromosomal instability in human colorectal adenomas with two mutational hits at APC. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 16910-16915.
446. Wood, L.D., Parsons, D.W., Jones, S., Lin, J., Sjoblom, T., Leary, R.J., Shen, D., Boca, S.M., Barber, T., Ptak, J., et al. (2007). The genomic landscapes of human breast and colorectal cancers. *Science* 318, 1108-1113.
447. Liang, F., Liang, J., Wang, W.Q., Sun, J.P., Udho, E., and Zhang, Z.Y. (2007). PRL3 promotes cell invasion and proliferation by down-regulation of Csk leading to Src activation. *J Biol Chem* 282, 5413-5419.
448. Kane, M.F., Loda, M., Gaida, G.M., Lipman, J., Mishra, R., Goldman, H., Jessup, J.M., and Kolodner, R. (1997). Methylation of the hMLH1 promoter correlates with lack of expression of hMLH1 in sporadic colon tumors and mismatch repair-defective human tumor cell lines. *Cancer Res* 57, 808-811.

449. Veigl, M.L., Kasturi, L., Olechnowicz, J., Ma, A.H., Lutterbaugh, J.D., Periyasamy, S., Li, G.M., Drummond, J., Modrich, P.L., Sedwick, W.D., et al. (1998). Biallelic inactivation of hMLH1 by epigenetic gene silencing, a novel mechanism causing human MSI cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 8698-8702.
450. Weisenberger, D.J., Siegmund, K.D., Campan, M., Young, J., Long, T.I., Faasse, M.A., Kang, G.H., Widschwendter, M., Weener, D., Buchanan, D., et al. (2006). CpG island methylator phenotype underlies sporadic microsatellite instability and is tightly associated with BRAF mutation in colorectal cancer. *Nat Genet* 38, 787-793.
451. Aust, D.E., and Baretton, G.B. (2010). Serrated polyps of the colon and rectum (hyperplastic polyps, sessile serrated adenomas, traditional serrated adenomas, and mixed polyps)-proposal for diagnostic criteria. *Virchows Arch* 457, 291-297.
452. Torlakovic, E., Skovlund, E., Snover, D.C., Torlakovic, G., and Nesland, J.M. (2003). Morphologic reappraisal of serrated colorectal polyps. *Am J Surg Pathol* 27, 65-81.
453. Longacre, T.A., and Fenoglio-Preiser, C.M. (1990). Mixed hyperplastic adenomatous polyps/serrated adenomas. A distinct form of colorectal neoplasia. *Am J Surg Pathol* 14, 524-537.
454. Torlakovic, E.E., Gomez, J.D., Driman, D.K., Parfitt, J.R., Wang, C., Benerjee, T., and Snover, D.C. (2008). Sessile serrated adenoma (SSA) vs. traditional serrated adenoma (TSA). *Am J Surg Pathol* 32, 21-29.
455. Jass, J.R. (2007). Classification of colorectal cancer based on correlation of clinical, morphological and molecular features. *Histopathology* 50, 113-130.
456. Kudo, S., Lambert, R., Allen, J.I., Fujii, H., Fujii, T., Kashida, H., Matsuda, T., Mori, M., Saito, H., Shimoda, T., et al. (2008). Nonpolypoid neoplastic lesions of the colorectal mucosa. *Gastrointest Endosc* 68, S3-47.
457. Itzkowitz, S.H., and Harpaz, N. (2004). Diagnosis and management of dysplasia in patients with inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology* 126, 1634-1648.
458. Rachet, B., Maringe, C., Nur, U., Quaresma, M., Shah, A., Woods, L.M., Ellis, L., Walters, S., Forman, D., Steward, J., et al. (2009). Population-based cancer survival

- trends in England and Wales up to 2007: an assessment of the NHS cancer plan for England. *Lancet Oncol* 10, 351-369.
459. Monnet, E., Faivre, J., Raymond, L., and Garau, I. (1999). Influence of stage at diagnosis on survival differences for rectal cancer in three European populations. *Br J Cancer* 81, 463-468.
 460. Parker, M.C., Wilson, M.S., Menzies, D., Sunderland, G., Clark, D.N., Knight, A.D., and Crowe, A.M. (2005). The SCAR-3 study: 5-year adhesion-related readmission risk following lower abdominal surgical procedures. *Colorectal Dis* 7, 551-558.
 461. Jemal, A., Siegel, R., Ward, E., Hao, Y., Xu, J., and Thun, M.J. (2009). Cancer statistics, 2009. *CA Cancer J Clin* 59, 225-249.
 462. Cunningham, D., Humblet, Y., Siena, S., Khayat, D., Bleiberg, H., Santoro, A., Bets, D., Mueser, M., Harstrick, A., Verslype, C., et al. (2004). Cetuximab monotherapy and cetuximab plus irinotecan in irinotecan-refractory metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* 351, 337-345.
 463. Hurwitz, H., Fehrenbacher, L., Novotny, W., Cartwright, T., Hainsworth, J., Heim, W., Berlin, J., Baron, A., Griffing, S., Holmgren, E., et al. (2004). Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* 350, 2335-2342.
 464. Mayer, R.J. (2009). Targeted therapy for advanced colorectal cancer--more is not always better. *N Engl J Med* 360, 623-625.
 465. Saltz, L.B., Meropol, N.J., Loehrer, P.J., Sr., Needle, M.N., Kopit, J., and Mayer, R.J. (2004). Phase II trial of cetuximab in patients with refractory colorectal cancer that expresses the epidermal growth factor receptor. *J Clin Oncol* 22, 1201-1208.
 466. Van Cutsem, E., Kohne, C.H., Hitre, E., Zaluski, J., Chang Chien, C.R., Makhson, A., D'Haens, G., Pinter, T., Lim, R., Bodoky, G., et al. (2009). Cetuximab and chemotherapy as initial treatment for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* 360, 1408-1417.

467. Statistique Canada. (2011). Statistiques canadiennes sur le cancer 2011. Section spéciale sur le cancer colorectale. Société canadienne du cancer. Agence de la santé publique du Canada.
468. Porebska, I., Harlozinska, A., and Bojarowski, T. (2000). Expression of the tyrosine kinase activity growth factor receptors (EGFR, ERB B2, ERB B3) in colorectal adenocarcinomas and adenomas. *Tumour Biol* 21, 105-115.
469. Salomon, D.S., Brandt, R., Ciardiello, F., and Normanno, N. (1995). Epidermal growth factor-related peptides and their receptors in human malignancies. *Crit Rev Oncol Hematol* 19, 183-232.
470. Goldstein, N.S., and Armin, M. (2001). Epidermal growth factor receptor immunohistochemical reactivity in patients with American Joint Committee on Cancer Stage IV colon adenocarcinoma: implications for a standardized scoring system. *Cancer* 92, 1331-1346.
471. Mayer, A., Takimoto, M., Fritz, E., Schellander, G., Kofler, K., and Ludwig, H. (1993). The prognostic significance of proliferating cell nuclear antigen, epidermal growth factor receptor, and mdm gene expression in colorectal cancer. *Cancer* 71, 2454-2460.
472. Bos, J.L., Fearon, E.R., Hamilton, S.R., Verlaan-de Vries, M., van Boom, J.H., van der Eb, A.J., and Vogelstein, B. (1987). Prevalence of ras gene mutations in human colorectal cancers. *Nature* 327, 293-297.
473. Forrester, K., Almoguera, C., Han, K., Grizzle, W.E., and Perucho, M. (1987). Detection of high incidence of K-ras oncogenes during human colon tumorigenesis. *Nature* 327, 298-303.
474. Andreyev, H.J., Norman, A.R., Cunningham, D., Oates, J.R., and Clarke, P.A. (1998). Kirsten ras mutations in patients with colorectal cancer: the multicenter "RASCAL" study. *J Natl Cancer Inst* 90, 675-684.
475. Fang, J.Y., and Richardson, B.C. (2005). The MAPK signalling pathways and colorectal cancer. *Lancet Oncol* 6, 322-327.

476. Fremin, C., and Meloche, S. (2010). From basic research to clinical development of MEK1/2 inhibitors for cancer therapy. *J Hematol Oncol* 3, 8.
477. Markowitz, S.D., Dawson, D.M., Willis, J., and Willson, J.K. (2002). Focus on colon cancer. *Cancer Cell* 1, 233-236.
478. Fearon, E.R., and Vogelstein, B. (1990). A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 61, 759-767.
479. Coleman, M.L., Marshall, C.J., and Olson, M.F. (2004). RAS and RHO GTPases in G1-phase cell-cycle regulation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5, 355-366.
480. Massague, J. (2004). G1 cell-cycle control and cancer. *Nature* 432, 298-306.
481. Malumbres, M., and Barbacid, M. (2003). RAS oncogenes: the first 30 years. *Nat Rev Cancer* 3, 459-465.
482. Dudley, D.T., Pang, L., Decker, S.J., Bridges, A.J., and Saltiel, A.R. (1995). A synthetic inhibitor of the mitogen-activated protein kinase cascade. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 7686-7689.
483. Hoshino, R., Tanimura, S., Watanabe, K., Kataoka, T., and Kohno, M. (2001). Blockade of the extracellular signal-regulated kinase pathway induces marked G1 cell cycle arrest and apoptosis in tumor cells in which the pathway is constitutively activated: up-regulation of p27(Kip1). *J Biol Chem* 276, 2686-2692.
484. Collisson, E.A., De, A., Suzuki, H., Gambhir, S.S., and Kolodney, M.S. (2003). Treatment of metastatic melanoma with an orally available inhibitor of the Ras-Raf-MAPK cascade. *Cancer Res* 63, 5669-5673.
485. Wu, X., Noh, S.J., Zhou, G., Dixon, J.E., and Guan, K.L. (1996). Selective activation of MEK1 but not MEK2 by A-Raf from epidermal growth factor-stimulated Hela cells. *J Biol Chem* 271, 3265-3271.
486. Xu, S., Khoo, S., Dang, A., Witt, S., Do, V., Zhen, E., Schaefer, E.M., and Cobb, M.H. (1997). Differential regulation of mitogen-activated protein/ERK kinase (MEK)1 and MEK2 and activation by a Ras-independent mechanism. *Mol Endocrinol* 11, 1618-1625.

487. 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.
488. Quaroni, A., Wands, J., Trelstad, R.L., and Isselbacher, K.J. (1979). Epithelioid cell cultures from rat small intestine. Characterization by morphologic and immunologic criteria. *J Cell Biol* 80, 248-265.
489. Brattain, M.G., Marks, M.E., McCombs, J., Finely, W., and Brattain, D.E. (1983). Characterization of human colon carcinoma cell lines isolated from a single primary tumour. *Br J Cancer* 47, 373-381.
490. Fogh, J., Fogh, J.M., and Orfeo, T. (1977). One hundred and twenty-seven cultured human tumor cell lines producing tumors in nude mice. *J Natl Cancer Inst* 59, 221-226.
491. Leibovitz, A., Stinson, J.C., McCombs, W.B., 3rd, McCoy, C.E., Mazur, K.C., and Mabry, N.D. (1976). Classification of human colorectal adenocarcinoma cell lines. *Cancer Res* 36, 4562-4569.
492. Cailleau, R., Young, R., Olive, M., and Reeves, W.J., Jr. (1974). Breast tumor cell lines from pleural effusions. *J Natl Cancer Inst* 53, 661-674.
493. 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.
494. 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.
495. Gopalbhai, K., and Meloche, S. (1998). Repression of mitogen-activated protein kinases ERK1/ERK2 activity by a protein tyrosine phosphatase in rat fibroblasts transformed by upstream oncoproteins. *J Cell Physiol* 174, 35-47.
496. 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.

497. Macpherson, I., and Montagnier, L. (1964). Agar Suspension Culture for the Selective Assay of Cells Transformed by Polyoma Virus. *Virology* 23, 291-294.
498. Smyth, G.K. (2004). Linear models and empirical bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments. *Stat Appl Genet Mol Biol* 3, Article3.
499. Morikawa, K., Walker, S.M., Nakajima, M., Pathak, S., Jessup, J.M., and Fidler, I.J. (1988). Influence of organ environment on the growth, selection, and metastasis of human colon carcinoma cells in nude mice. *Cancer Res* 48, 6863-6871.
500. Fingleton, B. (2006). Matrix metalloproteinases: roles in cancer and metastasis. *Front Biosci* 11, 479-491.
501. Reed, J.C. (1999). Mechanisms of apoptosis avoidance in cancer. *Curr Opin Oncol* 11, 68-75.
502. Leu, C.M., Chang, C., and Hu, C. (2000). Epidermal growth factor (EGF) suppresses staurosporine-induced apoptosis by inducing mcl-1 via the mitogen-activated protein kinase pathway. *Oncogene* 19, 1665-1675.
503. Liu, Y.Z., Boxer, L.M., and Latchman, D.S. (1999). Activation of the Bcl-2 promoter by nerve growth factor is mediated by the p42/p44 MAPK cascade. *Nucleic Acids Res* 27, 2086-2090.
504. Luciano, F., Jacquet, A., Colosetti, P., Herrant, M., Cagnol, S., Pages, G., and Auberger, P. (2003). Phosphorylation of Bim-EL by Erk1/2 on serine 69 promotes its degradation via the proteasome pathway and regulates its proapoptotic function. *Oncogene* 22, 6785-6793.
505. Chang, F., Steelman, L.S., Shelton, J.G., Lee, J.T., Navolanic, P.M., Blalock, W.L., Franklin, R., and McCubrey, J.A. (2003). Regulation of cell cycle progression and apoptosis by the Ras/Raf/MEK/ERK pathway (Review). *Int J Oncol* 22, 469-480.
506. Jonker, D.J., O'Callaghan, C.J., Karapetis, C.S., Zalcberg, J.R., Tu, D., Au, H.J., Berry, S.R., Krahn, M., Price, T., Simes, R.J., et al. (2007). Cetuximab for the treatment of colorectal cancer. *N Engl J Med* 357, 2040-2048.

507. Boucher, M.J., Jean, D., Vezina, A., and Rivard, N. (2004). Dual role of MEK/ERK signaling in senescence and transformation of intestinal epithelial cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 286, G736-746.
508. Komatsu, K., Buchanan, F.G., Katkuri, S., Morrow, J.D., Inoue, H., Otaka, M., Watanabe, S., and DuBois, R.N. (2005). Oncogenic potential of MEK1 in rat intestinal epithelial cells is mediated via cyclooxygenase-2. *Gastroenterology* 129, 577-590.
509. Oldham, S.M., Clark, G.J., Gangarosa, L.M., Coffey, R.J., Jr., and Der, C.J. (1996). Activation of the Raf-1/MAP kinase cascade is not sufficient for Ras transformation of RIE-1 epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 6924-6928.
510. Smakman, N., Borel Rinkes, I.H., Voest, E.E., and Kranenburg, O. (2005). Control of colorectal metastasis formation by K-Ras. *Biochim Biophys Acta* 1756, 103-114.
511. Robertson, J.H., Yang, S.Y., Iga, A.M., Seifalian, A.M., and Winslet, M.C. (2008). An in vivo rat model for early development of colorectal cancer metastasis to liver. *Int J Exp Pathol* 89, 447-457.
512. Licato, L.L., Keku, T.O., Wurzelmann, J.I., Murray, S.C., Woosley, J.T., Sandler, R.S., and Brenner, D.A. (1997). In vivo activation of mitogen-activated protein kinases in rat intestinal neoplasia. *Gastroenterology* 113, 1589-1598.
513. Roovers, K., and Assoian, R.K. (2000). Integrating the MAP kinase signal into the G1 phase cell cycle machinery. *Bioessays* 22, 818-826.
514. 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.
515. Ebisuya, M., Kondoh, K., and Nishida, E. (2005). The duration, magnitude and compartmentalization of ERK MAP kinase activity: mechanisms for providing signaling specificity. *Journal of Cell Science* 118, 2997-3002.
516. 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.

517. Weber, J.D., Raben, D.M., Phillips, P.J., and Baldassare, J.J. (1997). Sustained activation of extracellular-signal-regulated kinase 1 (ERK1) is required for the continued expression of cyclin D1 in G1 phase. *Biochem J* 326, 61-68.
518. Brunet, A., Roux, D., Lenormand, P., Dowd, S., Keyse, S., and Pouyssegur, J. (1999). Nuclear translocation of p42/p44 mitogen-activated protein kinase is required for growth factor-induced gene expression and cell cycle entry. *Embo J* 18, 664-674.
519. Dhomen, N., Reis-Filho, J.S., da Rocha Dias, S., Hayward, R., Savage, K., Delmas, V., Larue, L., Pritchard, C., and Marais, R. (2009). Oncogenic Braf induces melanocyte senescence and melanoma in mice. *Cancer Cell* 15, 294-303.
520. Karreth, F.A., and Tuveson, D.A. (2009). Modelling oncogenic Ras/Raf signalling in the mouse. *Curr Opin Genet Dev* 19, 4-11.
521. Castagnola, P., and Giaretti, W. (2005). Mutant KRAS, chromosomal instability and prognosis in colorectal cancer. *Biochim Biophys Acta* 1756, 115-125.
522. Guerra, C., Mijimolle, N., Dhawahir, A., Dubus, P., Barradas, M., Serrano, M., Campuzano, V., and Barbacid, M. (2003). Tumor induction by an endogenous K-ras oncogene is highly dependent on cellular context. *Cancer Cell* 4, 111-120.
523. Fukuda, M., Gotoh, I., Gotoh, Y., and Nishida, E. (1996). Cytoplasmic localization of mitogen-activated protein kinase kinase directed by its NH₂-terminal, leucine-rich short amino acid sequence, which acts as a nuclear export signal. *J Biol Chem* 271, 20024-20028.
524. Sebolt-Leopold, J.S., Dudley, D.T., Herrera, R., Van Becelaere, K., Wiland, A., Gowan, R.C., Teclé, H., Barrett, S.D., Bridges, A., Przybranowski, S., et al. (1999). Blockade of the MAP kinase pathway suppresses growth of colon tumors in vivo. *Nat Med* 5, 810-816.
525. Quaroni, A., Wands, J., Trelstad, R.L., and Isselbacher, K.J. (1979). Epithelioid cell cultures from rat small intestine: Characterization by morphologic and immunologic criteria. *Journal of Cell Biology* 80, 248-265.

526. Fujiwara, T., Bandi, M., Nitta, M., Ivanova, E.V., Bronson, R.T., and Pellman, D. (2005). Cytokinesis failure generating tetraploids promotes tumorigenesis in p53-null cells. *Nature* 437, 1043-1047.
527. Smith, E.R., Smedberg, J.L., Rula, M.E., and Xu, X.X. (2004). Regulation of Ras-MAPK pathway mitogenic activity by restricting nuclear entry of activated MAPK in endoderm differentiation of embryonic carcinoma and stem cells. *J Cell Biol* 164, 689-699.
528. Glading, A., Koziol, J.A., Krueger, J., and Ginsberg, M.H. (2007). PEA-15 inhibits tumor cell invasion by binding to extracellular signal-regulated kinase 1/2. *Cancer Res* 67, 1536-1544.
529. Tolwinski, N.S., Shapiro, P.S., Goueli, S., and Ahn, N.G. (1999). Nuclear localization of mitogen-activated protein kinase kinase 1 (MKK1) is promoted by serum stimulation and G2-M progression. Requirement for phosphorylation at the activation lip and signaling downstream of MKK. *J Biol Chem* 274, 6168-6174.
530. Yao, Z., Flash, I., Raviv, Z., Yung, Y., Asscher, Y., Pleban, S., and Seger, R. (2001). Non-regulated and stimulated mechanisms cooperate in the nuclear accumulation of MEK1. *Oncogene* 20, 7588-7596.
531. Furthauer, M., Lin, W., Ang, S.L., Thisse, B., and Thisse, C. (2002). Sef is a feedback-induced antagonist of Ras/MAPK-mediated FGF signalling. *Nat Cell Biol* 4, 170-174.
532. Tsang, M., Friesel, R., Kudoh, T., and Dawid, I.B. (2002). Identification of Sef, a novel modulator of FGF signalling. *Nat Cell Biol* 4, 165-169.
533. Xiong, S., Zhao, Q., Rong, Z., Huang, G., Huang, Y., Chen, P., Zhang, S., Liu, L., and Chang, Z. (2003). hSef inhibits PC-12 cell differentiation by interfering with Ras-mitogen-activated protein kinase MAPK signaling. *J Biol Chem* 278, 50273-50282.
534. Preger, E., Ziv, I., Shabtay, A., Sher, I., Tsang, M., Dawid, I.B., Altuvia, Y., and Ron, D. (2004). Alternative splicing generates an isoform of the human Sef gene

- with altered subcellular localization and specificity. *Proc Natl Acad Sci U S A* *101*, 1229-1234.
535. Yang, R.B., Ng, C.K., Wasserman, S.M., Komuves, L.G., Gerritsen, M.E., and Topper, J.N. (2003). A novel interleukin-17 receptor-like protein identified in human umbilical vein endothelial cells antagonizes basic fibroblast growth factor-induced signaling. *J Biol Chem* *278*, 33232-33238.
536. Murphy, T., Darby, S., Mathers, M.E., and Gnanapragasam, V.J. (2010). Evidence for distinct alterations in the FGF axis in prostate cancer progression to an aggressive clinical phenotype. *J Pathol* *220*, 452-460.
537. Fukuda, M., Gotoh, I., Adachi, M., Gotoh, Y., and Nishida, E. (1997). A novel regulatory mechanism in the mitogen-activated protein (MAP) kinase cascade. Role of nuclear export signal of MAP kinase kinase. *J Biol Chem* *272*, 32642-32648.
538. Ganem, N.J., Storchova, Z., and Pellman, D. (2007). Tetraploidy, aneuploidy and cancer. *Curr Opin Genet Dev* *17*, 157-162.
539. Perreault, N., and Jean-Francois, B. (1996). Use of the dissociating enzyme thermolysin to generate viable human normal intestinal epithelial cell cultures. *Exp Cell Res* *224*, 354-364.
540. Shaffer, L.G., Tommerup, N., eds. (2005). *An International System for Human Cytogenetic Nomenclature*, (Basel, Switzerland: S. Karger).
541. Levan, G., Hedrich, H.J., Remmers, E.F., Serikawa, T., and Yoshida, M.C. (1995). Standardized rat genetic nomenclature. *Mamm Genome* *6*, 447-448.
542. Kinzler, K.W., and Vogelstein, B. (1996). Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell* *87*, 159-170.
543. Fodde, R., Smits, R., and Clevers, H. (2001). APC, signal transduction and genetic instability in colorectal cancer. *Nat Rev Cancer* *1*, 55-67.
544. Lengauer, C., Kinzler, K.W., and Vogelstein, B. (1997). Genetic instability in colorectal cancers. *Nature* *386*, 623-627.

545. Shih, I.M., Zhou, W., Goodman, S.N., Lengauer, C., Kinzler, K.W., and Vogelstein, B. (2001). Evidence that genetic instability occurs at an early stage of colorectal tumorigenesis. *Cancer Res* *61*, 818-822.
546. Duhamel, M.B., Hirnle, C., Karvonen, C., Sayre, C., Wyant, S., Colobong Smith, N., Keener, S., Barrett, S., and Whitney, J.D. (2011). Enhancing Medical-Surgical Nursing Practice: Using Practice Tests and Clinical Examples to Promote Active Learning and Program Evaluation. *J Contin Educ Nurs*, 1-6.
547. Krajcovic, M., Johnson, N.B., Sun, Q., Normand, G., Hoover, N., Yao, E., Richardson, A.L., King, R.W., Cibas, E.S., Schnitt, S.J., et al. (2011). A non-genetic route to aneuploidy in human cancers. *Nat Cell Biol* *13*, 324-330.
548. Eggert, U.S., Mitchison, T.J., and Field, C.M. (2006). Animal cytokinesis: from parts list to mechanisms. *Annu Rev Biochem* *75*, 543-566.
549. Ruchaud, S., Carmena, M., and Earnshaw, W.C. (2007). The chromosomal passenger complex: one for all and all for one. *Cell* *131*, 230-231.
550. Ruchaud, S., Carmena, M., and Earnshaw, W.C. (2007). Chromosomal passengers: conducting cell division. *Nat Rev Mol Cell Biol* *8*, 798-812.
551. Vader, G., and Lens, S.M. (2008). The Aurora kinase family in cell division and cancer. *Biochim Biophys Acta* *1786*, 60-72.
552. Zhou, H., Kuang, J., Zhong, L., Kuo, W.L., Gray, J.W., Sahin, A., Brinkley, B.R., and Sen, S. (1998). Tumour amplified kinase STK15/BTAK induces centrosome amplification, aneuploidy and transformation. *Nat Genet* *20*, 189-193.
553. 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.
554. 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.

555. Dutertre, S., and Prigent, C. (2003). Aurora-A overexpression leads to override of the microtubule-kinetochore attachment checkpoint. *Mol Interv* 3, 127-130.
556. Katayama, H., Sasai, K., Kloc, M., Brinkley, B.R., and Sen, S. (2008). Aurora kinase-A regulates kinetochore/chromatin associated microtubule assembly in human cells. *Cell Cycle* 7, 2691-2704.
557. Meraldi, P., Honda, R., and Nigg, E.A. (2002). Aurora-A overexpression reveals tetraploidization as a major route to centrosome amplification in p53^{-/-} cells. *EMBO J* 21, 483-492.
558. Miyoshi, Y., Iwao, K., Egawa, C., and Noguchi, S. (2001). Association of centrosomal kinase STK15/BTAK mRNA expression with chromosomal instability in human breast cancers. *Int J Cancer* 92, 370-373.
559. Bischoff, J.R., Anderson, L., Zhu, Y., Mossie, K., Ng, L., Souza, B., Schryver, B., Flanagan, P., Clairvoyant, F., Ginther, C., et al. (1998). A homologue of *Drosophila* aurora kinase is oncogenic and amplified in human colorectal cancers. *EMBO J* 17, 3052-3065.
560. Li, D., Zhu, J., Firozi, P.F., Abbruzzese, J.L., Evans, D.B., Cleary, K., Friess, H., and Sen, S. (2003). Overexpression of oncogenic STK15/BTAK/Aurora A kinase in human pancreatic cancer. *Clin Cancer Res* 9, 991-997.
561. Sen, S., Zhou, H., Zhang, R.D., Yoon, D.S., Vakar-Lopez, F., Ito, S., Jiang, F., Johnston, D., Grossman, H.B., Ruifrok, A.C., et al. (2002). Amplification/overexpression of a mitotic kinase gene in human bladder cancer. *J Natl Cancer Inst* 94, 1320-1329.
562. Sakakura, C., Hagiwara, A., Yasuoka, R., Fujita, Y., Nakanishi, M., Masuda, K., Shimomura, K., Nakamura, Y., Inazawa, J., Abe, T., et al. (2001). Tumour-amplified kinase BTAK is amplified and overexpressed in gastric cancers with possible involvement in aneuploid formation. *Br J Cancer* 84, 824-831.
563. Carmena, M., Ruchaud, S., and Earnshaw, W.C. (2009). Making the Auroras glow: regulation of Aurora A and B kinase function by interacting proteins. *Curr Opin Cell Biol* 21, 796-805.

564. Anand, S., Penrhyn-Lowe, S., and Venkitaraman, A.R. (2003). AURORA-A amplification overrides the mitotic spindle assembly checkpoint, inducing resistance to Taxol. *Cancer Cell* 3, 51-62.
565. Nguyen, H.G., Makitalo, M., Yang, D., Chinnappan, D., St Hilaire, C., and Ravid, K. (2009). Deregulated Aurora-B induced tetraploidy promotes tumorigenesis. *FASEB J* 23, 2741-2748.
566. Nguyen, H.G., and Ravid, K. (2006). Tetraploidy/aneuploidy and stem cells in cancer promotion: The role of chromosome passenger proteins. *J Cell Physiol* 208, 12-22.
567. Storchova, Z., and Pellman, D. (2004). From polyploidy to aneuploidy, genome instability and cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5, 45-54.
568. Barr, F.A., and Gruneberg, U. (2007). Cytokinesis: placing and making the final cut. *Cell* 131, 847-860.
569. Vader, G., Medema, R.H., and Lens, S.M. (2006). The chromosomal passenger complex: guiding Aurora-B through mitosis. *J Cell Biol* 173, 833-837.
570. Vagnarelli, P., and Earnshaw, W.C. (2004). Chromosomal passengers: the four-dimensional regulation of mitotic events. *Chromosoma* 113, 211-222.
571. Bischoff, J.R., and Plowman, G.D. (1999). The Aurora/Ipl1p kinase family: regulators of chromosome segregation and cytokinesis. *Trends Cell Biol* 9, 454-459.
572. Giet, R., and Prigent, C. (1999). Aurora/Ipl1p-related kinases, a new oncogenic family of mitotic serine-threonine kinases. *J Cell Sci* 112 (Pt 21), 3591-3601.
573. 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.
574. Castro, A., Arlot-Bonnemains, Y., Vigneron, S., Labbe, J.C., Prigent, C., and Lorca, T. (2002). APC/Fizzy-Related targets Aurora-A kinase for proteolysis. *EMBO Rep* 3, 457-462.
575. Burum-Auensen, E., Deangelis, P.M., Schjolberg, A.R., Roislien, J., Andersen, S.N., and Clausen, O.P. (2007). Spindle proteins Aurora A and BUB1B, but not

- Mad2, are aberrantly expressed in dysplastic mucosa of patients with longstanding ulcerative colitis. *J Clin Pathol* 60, 1403-1408.
576. Denzinger, S., Stoehr, R., Schwarz, S., Eichenseher, N., Brockhoff, G., Obermann, E.C., Knuechel, R., Blaszyk, H., Hartmann, A., and Wild, P.J. (2007). Low level STK15 amplification in histologically benign urothelium of patients with bladder cancer adversely predicts patient outcome following cystectomy. *Int J Oncol* 31, 793-802.
577. Gritsko, T.M., Coppola, D., Paciga, J.E., Yang, L., Sun, M., Shelley, S.A., Fiorica, J.V., Nicosia, S.V., and Cheng, J.Q. (2003). Activation and overexpression of centrosome kinase BTAK/Aurora-A in human ovarian cancer. *Clin Cancer Res* 9, 1420-1426.
578. Tanaka, T., Kimura, M., Matsunaga, K., Fukada, D., Mori, H., and Okano, Y. (1999). Centrosomal kinase AIK1 is overexpressed in invasive ductal carcinoma of the breast. *Cancer Res* 59, 2041-2044.
579. Rannou, Y., Troadec, M.B., Petretti, C., Hans, F., Dutertre, S., Dimitrov, S., and Prigent, C. (2008). Localization of aurora A and aurora B kinases during interphase: role of the N-terminal domain. *Cell Cycle* 7, 3012-3020.
580. Marumoto, T., Honda, S., Hara, T., Nitta, M., Hirota, T., Kohmura, E., and Saya, H. (2003). Aurora-A kinase maintains the fidelity of early and late mitotic events in HeLa cells. *J Biol Chem* 278, 51786-51795.
581. Walther, A., Johnstone, E., Swanton, C., Midgley, R., Tomlinson, I., and Kerr, D. (2009). Genetic prognostic and predictive markers in colorectal cancer. *Nat Rev Cancer* 9, 489-499.
582. Baba, Y., Noshu, K., Shima, K., Irahara, N., Kure, S., Toyoda, S., Kirkner, G.J., Goel, A., Fuchs, C.S., and Ogino, S. (2009). Aurora-A expression is independently associated with chromosomal instability in colorectal cancer. *Neoplasia* 11, 418-425.

583. Kao, S.Y., Chen, Y.P., Tu, H.F., Liu, C.J., Yu, A.H., Wu, C.H., and Chang, K.W. (2010). Nuclear STK15 expression is associated with aggressive behaviour of oral carcinoma cells in vivo and in vitro. *J Pathol* 222, 99-109.
584. Zhang, D., Hirota, T., Marumoto, T., Shimizu, M., Kunitoku, N., Sasayama, T., Arima, Y., Feng, L., Suzuki, M., Takeya, M., et al. (2004). Cre-loxP-controlled periodic Aurora-A overexpression induces mitotic abnormalities and hyperplasia in mammary glands of mouse models. *Oncogene* 23, 8720-8730.
585. Barbanis, S., Ioannou, M., Kouvaras, E., Karasavvidou, F., Nakou, M., Papamichali, R., and Koukoulis, G. (2009). INCENP (inner centromere protein) is overexpressed in high grade non-Hodgkin B-cell lymphomas. *Pathol Oncol Res* 15, 11-17.
586. Qi, G., Kudo, Y., Ando, T., Tsunematsu, T., Shimizu, N., Siriwardena, S.B., Yoshida, M., Keikhaee, M.R., Ogawa, I., and Takata, T. (2010). Nuclear Survivin expression is correlated with malignant behaviors of head and neck cancer together with Aurora-B. *Oral Oncol* 46, 263-270.
587. Cascone, I., Selimoglu, R., Ozdemir, C., Del Nery, E., Yeaman, C., White, M., and Camonis, J. (2008). Distinct roles of RalA and RalB in the progression of cytokinesis are supported by distinct RalGEFs. *EMBO J* 27, 2375-2387.
588. Janssen, K.P., el-Marjou, F., Pinto, D., Sastre, X., Rouillard, D., Fouquet, C., Soussi, T., Louvard, D., and Robine, S. (2002). Targeted expression of oncogenic K-ras in intestinal epithelium causes spontaneous tumorigenesis in mice. *Gastroenterology* 123, 492-504.
589. Tuveson, D.A., Shaw, A.T., Willis, N.A., Silver, D.P., Jackson, E.L., Chang, S., Mercer, K.L., Grochow, R., Hock, H., Crowley, D., et al. (2004). Endogenous oncogenic K-ras(G12D) stimulates proliferation and widespread neoplastic and developmental defects. *Cancer Cell* 5, 375-387.
590. Calcagno, S.R., Li, S., Colon, M., Kreinest, P.A., Thompson, E.A., Fields, A.P., and Murray, N.R. (2008). Oncogenic K-ras promotes early carcinogenesis in the mouse proximal colon. *Int J Cancer* 122, 2462-2470.

591. Labrecque, N., Whitfield, L.S., Obst, R., Waltzinger, C., Benoist, C., and Mathis, D. (2001). How much TCR does a T cell need? *Immunity* 15, 71-82.
592. Roth, S., Franken, P., van Veelen, W., Blondin, L., Raghoebir, L., Beverloo, B., van Drunen, E., Kuipers, E.J., Rottier, R., Fodde, R., et al. (2009). Generation of a tightly regulated doxycycline-inducible model for studying mouse intestinal biology. *Genesis* 47, 7-13.
593. 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 nonredundant functions of Erk3/Erk4 subfamily mitogen-activated protein kinases. *Mol Cell Biol* 30, 5752-5763.
594. Podolsky, D.K. (2002). Inflammatory bowel disease. *N Engl J Med* 347, 417-429.
595. Cadieux, C., Kedinger, V., Yao, L., Vadnais, C., Drossos, M., Paquet, M., and Nepveu, A. (2009). Mouse mammary tumor virus p75 and p110 CUX1 transgenic mice develop mammary tumors of various histologic types. *Cancer Res* 69, 7188-7197.
596. Raafat, A., Bargo, S., Anver, M.R., and Callahan, R. (2004). Mammary development and tumorigenesis in mice expressing a truncated human Notch4/Int3 intracellular domain (h-Int3sh). *Oncogene* 23, 9401-9407.
597. Tremblay, P., Meiner, Z., Galou, M., Heinrich, C., Petromilli, C., Lisse, T., Cayetano, J., Torchia, M., Mobley, W., Bujard, H., et al. (1998). Doxycycline control of prion protein transgene expression modulates prion disease in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 12580-12585.
598. Itzkowitz, S.H., and Yio, X. (2004). Inflammation and cancer IV. Colorectal cancer in inflammatory bowel disease: the role of inflammation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 287, G7-17.
599. Ullman, T.A., and Itzkowitz, S.H. (2011). Intestinal inflammation and cancer. *Gastroenterology* 140, 1807-1816.

600. Fleisher, A.S., Esteller, M., Harpaz, N., Leytin, A., Rashid, A., Xu, Y., Liang, J., Stine, O.C., Yin, J., Zou, T.T., et al. (2000). Microsatellite instability in inflammatory bowel disease-associated neoplastic lesions is associated with hypermethylation and diminished expression of the DNA mismatch repair gene, hMLH1. *Cancer Res* 60, 4864-4868.
601. Aust, D.E., Terdiman, J.P., Willenbacher, R.F., Chang, C.G., Molinaro-Clark, A., Baretton, G.B., Loehrs, U., and Waldman, F.M. (2002). The APC/beta-catenin pathway in ulcerative colitis-related colorectal carcinomas: a mutational analysis. *Cancer* 94, 1421-1427.
602. Redston, M.S., Papadopoulos, N., Caldas, C., Kinzler, K.W., and Kern, S.E. (1995). Common occurrence of APC and K-ras gene mutations in the spectrum of colitis-associated neoplasias. *Gastroenterology* 108, 383-392.
603. Tarmin, L., Yin, J., Harpaz, N., Kozam, M., Noordzij, J., Antonio, L.B., Jiang, H.Y., Chan, O., Cymes, K., and Meltzer, S.J. (1995). Adenomatous polyposis coli gene mutations in ulcerative colitis-associated dysplasias and cancers versus sporadic colon neoplasms. *Cancer Res* 55, 2035-2038.
604. Yin, J., Harpaz, N., Tong, Y., Huang, Y., Laurin, J., Greenwald, B.D., Hontanosas, M., Newkirk, C., and Meltzer, S.J. (1993). p53 point mutations in dysplastic and cancerous ulcerative colitis lesions. *Gastroenterology* 104, 1633-1639.
605. Burner, G.C., Rabinovitch, P.S., Haggitt, R.C., Crispin, D.A., Brentnall, T.A., Kolli, V.R., Stevens, A.C., and Rubin, C.E. (1992). Neoplastic progression in ulcerative colitis: histology, DNA content, and loss of a p53 allele. *Gastroenterology* 103, 1602-1610.
606. Hussain, S.P., Amstad, P., Raja, K., Ambs, S., Nagashima, M., Bennett, W.P., Shields, P.G., Ham, A.J., Swenberg, J.A., Marrogi, A.J., et al. (2000). Increased p53 mutation load in noncancerous colon tissue from ulcerative colitis: a cancer-prone chronic inflammatory disease. *Cancer Res* 60, 3333-3337.

607. Brentnall, T.A., Crispin, D.A., Rabinovitch, P.S., Haggitt, R.C., Rubin, C.E., Stevens, A.C., and Burner, G.C. (1994). Mutations in the p53 gene: an early marker of neoplastic progression in ulcerative colitis. *Gastroenterology* *107*, 369-378.
608. Willenbacher, R.F., Aust, D.E., Chang, C.G., Zelman, S.J., Ferrell, L.D., Moore, D.H., 2nd, and Waldman, F.M. (1999). Genomic instability is an early event during the progression pathway of ulcerative-colitis-related neoplasia. *Am J Pathol* *154*, 1825-1830.
609. Wirtz, S., and Neurath, M.F. (2007). Mouse models of inflammatory bowel disease. *Adv Drug Deliv Rev* *59*, 1073-1083.
610. Lang, R. (2005). Tuning of macrophage responses by Stat3-inducing cytokines: molecular mechanisms and consequences in infection. *Immunobiology* *210*, 63-76.
611. Xiao, H., Gulen, M.F., Qin, J., Yao, J., Bulek, K., Kish, D., Altuntas, C.Z., Wald, D., Ma, C., Zhou, H., et al. (2007). The Toll-interleukin-1 receptor member SIGIRR regulates colonic epithelial homeostasis, inflammation, and tumorigenesis. *Immunity* *26*, 461-475.
612. Deng, L., Zhou, J.F., Sellers, R.S., Li, J.F., Nguyen, A.V., Wang, Y., Orlofsky, A., Liu, Q., Hume, D.A., Pollard, J.W., et al. (2010). A novel mouse model of inflammatory bowel disease links mammalian target of rapamycin-dependent hyperproliferation of colonic epithelium to inflammation-associated tumorigenesis. *Am J Pathol* *176*, 952-967.
613. Berg, D.J., Davidson, N., Kuhn, R., Muller, W., Menon, S., Holland, G., Thompson-Snipes, L., Leach, M.W., and Rennick, D. (1996). Enterocolitis and colon cancer in interleukin-10-deficient mice are associated with aberrant cytokine production and CD4(+) TH1-like responses. *J Clin Invest* *98*, 1010-1020.
614. Scaldaferrì, F., Sans, M., Vetrano, S., Correale, C., Arena, V., Pagano, N., Rando, G., Romeo, F., Potenza, A.E., Repici, A., et al. (2009). The role of MAPK in governing lymphocyte adhesion to and migration across the microvasculature in inflammatory bowel disease. *Eur J Immunol* *39*, 290-300.

615. Waetzig, G.H., Seegert, D., Rosenstiel, P., Nikolaus, S., and Schreiber, S. (2002). p38 mitogen-activated protein kinase is activated and linked to TNF-alpha signaling in inflammatory bowel disease. *J Immunol* *168*, 5342-5351.
616. Mitsuyama, K., Suzuki, A., Tomiyasu, N., Tsuruta, O., Kitazaki, S., Takeda, T., Satoh, Y., Bennett, B.L., Toyonaga, A., and Sata, M. (2006). Pro-inflammatory signaling by Jun-N-terminal kinase in inflammatory bowel disease. *Int J Mol Med* *17*, 449-455.
617. Papadakis, K.A., and Targan, S.R. (2000). The role of chemokines and chemokine receptors in mucosal inflammation. *Inflamm Bowel Dis* *6*, 303-313.
618. Robinson, S.C., Scott, K.A., Wilson, J.L., Thompson, R.G., Proudfoot, A.E., and Balkwill, F.R. (2003). A chemokine receptor antagonist inhibits experimental breast tumor growth. *Cancer Res* *63*, 8360-8365.
619. Owen, J.L., Criscitiello, M.F., Libreros, S., Garcia-Areas, R., Guthrie, K., Torroella-Kouri, M., and Iragavarapu-Charyulu, V. (2011). Expression of the inflammatory chemokines CCL2, CCL5 and CXCL2 and the receptors CCR1-3 and CXCR2 in T lymphocytes from mammary tumor-bearing mice. *Cell Immunol* *270*, 172-182.
620. Babyatsky, M.W., Rossiter, G., and Podolsky, D.K. (1996). Expression of transforming growth factors alpha and beta in colonic mucosa in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* *110*, 975-984.
621. Moser, A.R., Pitot, H.C., and Dove, W.F. (1990). A dominant mutation that predisposes to multiple intestinal neoplasia in the mouse. *Science* *247*, 322-324.
622. Su, L.K., Kinzler, K.W., Vogelstein, B., Preisinger, A.C., Moser, A.R., Luongo, C., Gould, K.A., and Dove, W.F. (1992). Multiple intestinal neoplasia caused by a mutation in the murine homolog of the APC gene. *Science* *256*, 668-670.
623. Jacks, T., Remington, L., Williams, B.O., Schmitt, E.M., Halachmi, S., Bronson, R.T., and Weinberg, R.A. (1994). Tumor spectrum analysis in p53-mutant mice. *Curr Biol* *4*, 1-7.
624. Pellman, D. (2007). Cell biology: aneuploidy and cancer. *Nature* *446*, 38-39.

625. Sotillo, R., Hernando, E., Diaz-Rodriguez, E., Teruya-Feldstein, J., Cordon-Cardo, C., Lowe, S.W., and Benezra, R. (2007). Mad2 overexpression promotes aneuploidy and tumorigenesis in mice. *Cancer Cell* *11*, 9-23.
626. Albertson, D.G., Collins, C., McCormick, F., and Gray, J.W. (2003). Chromosome aberrations in solid tumors. *Nat Genet* *34*, 369-376.
627. Levine, D.S., Sanchez, C.A., Rabinovitch, P.S., and Reid, B.J. (1991). Formation of the tetraploid intermediate is associated with the development of cells with more than four centrioles in the elastase-simian virus 40 tumor antigen transgenic mouse model of pancreatic cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* *88*, 6427-6431.
628. Fukasawa, K., Choi, T., Kuriyama, R., Rulong, S., and Vande Woude, G.F. (1996). Abnormal centrosome amplification in the absence of p53. *Science* *271*, 1744-1747.
629. Fukasawa, K., Wiener, F., Vande Woude, G.F., and Mai, S. (1997). Genomic instability and apoptosis are frequent in p53 deficient young mice. *Oncogene* *15*, 1295-1302.
630. Tutt, A., Gabriel, A., Bertwistle, D., Connor, F., Paterson, H., Peacock, J., Ross, G., and Ashworth, A. (1999). Absence of Brca2 causes genome instability by chromosome breakage and loss associated with centrosome amplification. *Curr Biol* *9*, 1107-1110.
631. D'Assoro, A.B., Lingle, W.L., and Salisbury, J.L. (2002). Centrosome amplification and the development of cancer. *Oncogene* *21*, 6146-6153.
632. Fukasawa, K. (2005). Centrosome amplification, chromosome instability and cancer development. *Cancer Lett* *230*, 6-19.
633. Nelsen, C.J., Kuriyama, R., Hirsch, B., Negron, V.C., Lingle, W.L., Goggin, M.M., Stanley, M.W., and Albrecht, J.H. (2005). Short term cyclin D1 overexpression induces centrosome amplification, mitotic spindle abnormalities, and aneuploidy. *J Biol Chem* *280*, 768-776.
634. Kawamura, K., Izumi, H., Ma, Z., Ikeda, R., Moriyama, M., Tanaka, T., Nojima, T., Levin, L.S., Fujikawa-Yamamoto, K., Suzuki, K., et al. (2004). Induction of

- centrosome amplification and chromosome instability in human bladder cancer cells by p53 mutation and cyclin E overexpression. *Cancer Res* 64, 4800-4809.
635. Balsitis, S.J., Sage, J., Duensing, S., Munger, K., Jacks, T., and Lambert, P.F. (2003). Recapitulation of the effects of the human papillomavirus type 16 E7 oncogene on mouse epithelium by somatic Rb deletion and detection of pRb-independent effects of E7 in vivo. *Mol Cell Biol* 23, 9094-9103.
636. Iovino, F., Lentini, L., Amato, A., and Di Leonardo, A. (2006). RB acute loss induces centrosome amplification and aneuploidy in murine primary fibroblasts. *Mol Cancer* 5, 38.
637. Boutros, R., Lobjois, V., and Ducommun, B. (2007). CDC25 phosphatases in cancer cells: key players? Good targets? *Nat Rev Cancer* 7, 495-507.
638. Meraldi, P., Honda, R., and Nigg, E.A. (2004). Aurora kinases link chromosome segregation and cell division to cancer susceptibility. *Curr Opin Genet Dev* 14, 29-36.
639. Castillo, A., Morse, H.C., 3rd, Godfrey, V.L., Naeem, R., and Justice, M.J. (2007). Overexpression of Eg5 causes genomic instability and tumor formation in mice. *Cancer Res* 67, 10138-10147.
640. Hernando, E., Nahle, Z., Juan, G., Diaz-Rodriguez, E., Alaminos, M., Hemann, M., Michel, L., Mittal, V., Gerald, W., Benezra, R., et al. (2004). Rb inactivation promotes genomic instability by uncoupling cell cycle progression from mitotic control. *Nature* 430, 797-802.
641. Rosario, C.O., Ko, M.A., Haffani, Y.Z., Gladdy, R.A., Paderova, J., Pollett, A., Squire, J.A., Dennis, J.W., and Swallow, C.J. (2010). Plk4 is required for cytokinesis and maintenance of chromosomal stability. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 6888-6893.
642. Iida, S., Hirota, T., Morisaki, T., Marumoto, T., Hara, T., Kuninaka, S., Honda, S., Kosai, K., Kawasuji, M., Pallas, D.C., et al. (2004). Tumor suppressor WARTS ensures genomic integrity by regulating both mitotic progression and G1 tetraploidy checkpoint function. *Oncogene* 23, 5266-5274.

643. Zimmet, J., and Ravid, K. (2000). Polyploidy: occurrence in nature, mechanisms, and significance for the megakaryocyte-platelet system. *Exp Hematol* 28, 3-16.
644. Davoli, T., Denchi, E.L., and de Lange, T. (2010). Persistent telomere damage induces bypass of mitosis and tetraploidy. *Cell* 141, 81-93.
645. Prasanth, S.G., Prasanth, K.V., and Stillman, B. (2002). Orc6 involved in DNA replication, chromosome segregation, and cytokinesis. *Science* 297, 1026-1031.
646. Daniels, M.J., Wang, Y., Lee, M., and Venkitaraman, A.R. (2004). Abnormal cytokinesis in cells deficient in the breast cancer susceptibility protein BRCA2. *Science* 306, 876-879.
647. Shi, Q., and King, R.W. (2005). Chromosome nondisjunction yields tetraploid rather than aneuploid cells in human cell lines. *Nature* 437, 1038-1042.
648. Ogle, B.M., Cascalho, M., and Platt, J.L. (2005). Biological implications of cell fusion. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6, 567-575.
649. Duelli, D.M., Hearn, S., Myers, M.P., and Lazebnik, Y. (2005). A primate virus generates transformed human cells by fusion. *J Cell Biol* 171, 493-503.
650. Gao, P., and Zheng, J. (2011). Oncogenic virus-mediated cell fusion: new insights into initiation and progression of oncogenic viruses--related cancers. *Cancer Lett* 303, 1-8.
651. Overholtzer, M., Mailleux, A.A., Mouneimne, G., Normand, G., Schnitt, S.J., King, R.W., Cibas, E.S., and Brugge, J.S. (2007). A nonapoptotic cell death process, entosis, that occurs by cell-in-cell invasion. *Cell* 131, 966-979.
652. 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.
653. Echard, A., and O'Farrell, P.H. (2003). The degradation of two mitotic cyclins contributes to the timing of cytokinesis. *Curr Biol* 13, 373-383.

654. Martineau-Thuillier, S., Andreassen, P.R., and Margolis, R.L. (1998). Colocalization of TD-60 and INCENP throughout G2 and mitosis: evidence for their possible interaction in signalling cytokinesis. *Chromosoma* *107*, 461-470.
655. Jantsch-Plunger, V., and Glotzer, M. (1999). Depletion of syntaxins in the early *Caenorhabditis elegans* embryo reveals a role for membrane fusion events in cytokinesis. *Curr Biol* *9*, 738-745.
656. Conner, S.D., and Wessel, G.M. (1999). Syntaxin is required for cell division. *Mol Biol Cell* *10*, 2735-2743.
657. Thompson, H.M., Skop, A.R., Euteneuer, U., Meyer, B.J., and McNiven, M.A. (2002). The large GTPase dynamin associates with the spindle midzone and is required for cytokinesis. *Curr Biol* *12*, 2111-2117.
658. Zhang, L., and Maddox, A.S. (2010). Anillin. *Curr Biol* *20*, R135-136.
659. Oegema, K., Savoian, M.S., Mitchison, T.J., and Field, C.M. (2000). Functional analysis of a human homologue of the *Drosophila* actin binding protein anillin suggests a role in cytokinesis. *J Cell Biol* *150*, 539-552.
660. Hirose, K., Kawashima, T., Iwamoto, I., Nosaka, T., and Kitamura, T. (2001). MgcRacGAP is involved in cytokinesis through associating with mitotic spindle and midbody. *J Biol Chem* *276*, 5821-5828.
661. Toure, A., Dorseuil, O., Morin, L., Timmons, P., Jegou, B., Reibel, L., and Gacon, G. (1998). MgcRacGAP, a new human GTPase-activating protein for Rac and Cdc42 similar to *Drosophila* rotundRacGAP gene product, is expressed in male germ cells. *J Biol Chem* *273*, 6019-6023.
662. Minoshima, Y., Kawashima, T., Hirose, K., Tonozuka, Y., Kawajiri, A., Bao, Y.C., Deng, X., Tatsuka, M., Narumiya, S., May, W.S., Jr., et al. (2003). Phosphorylation by aurora B converts MgcRacGAP to a RhoGAP during cytokinesis. *Dev Cell* *4*, 549-560.
663. Adams, R.R., Tavares, A.A., Salzberg, A., Bellen, H.J., and Glover, D.M. (1998). pavarotti encodes a kinesin-like protein required to organize the central spindle and contractile ring for cytokinesis. *Genes Dev* *12*, 1483-1494.

664. Carmena, M., Riparbelli, M.G., Minestrini, G., Tavares, A.M., Adams, R., Callaini, G., and Glover, D.M. (1998). *Drosophila* polo kinase is required for cytokinesis. *J Cell Biol* *143*, 659-671.
665. Zhou, T., Aumais, J.P., Liu, X., Yu-Lee, L.Y., and Erikson, R.L. (2003). A role for Plk1 phosphorylation of NudC in cytokinesis. *Dev Cell* *5*, 127-138.
666. Low, S.H., Li, X., Miura, M., Kudo, N., Quinones, B., and Weimbs, T. (2003). Syntaxin 2 and endobrevin are required for the terminal step of cytokinesis in mammalian cells. *Dev Cell* *4*, 753-759.
667. Gromley, A., Jurczyk, A., Sillibourne, J., Halilovic, E., Mogensen, M., Groisman, I., Blomberg, M., and Doxsey, S. (2003). A novel human protein of the maternal centriole is required for the final stages of cytokinesis and entry into S phase. *J Cell Biol* *161*, 535-545.
668. Neef, R., Preisinger, C., Sutcliffe, J., Kopajtich, R., Nigg, E.A., Mayer, T.U., and Barr, F.A. (2003). Phosphorylation of mitotic kinesin-like protein 2 by polo-like kinase 1 is required for cytokinesis. *J Cell Biol* *162*, 863-875.
669. Kasahara, K., Nakayama, Y., Nakazato, Y., Ikeda, K., Kuga, T., and Yamaguchi, N. (2007). Src signaling regulates completion of abscission in cytokinesis through ERK/MAPK activation at the midbody. *J Biol Chem* *282*, 5327-5339.
670. Pohl, C., and Jentsch, S. (2008). Final stages of cytokinesis and midbody ring formation are controlled by BRUCE. *Cell* *132*, 832-845.
671. Glotzer, M. (2005). The molecular requirements for cytokinesis. *Science* *307*, 1735-1739.
672. Ray, L.B., and Sturgill, T.W. (1988). Characterization of insulin-stimulated microtubule-associated protein kinase. Rapid isolation and stabilization of a novel serine/threonine kinase from 3T3-L1 cells. *J Biol Chem* *263*, 12721-12727.
673. Eckert, A., Bock, B.C., Tagscherer, K.E., Haas, T.L., Grund, K., Sykora, J., Herold-Mende, C., Ehemann, V., Hollstein, M., Chneiweiss, H., et al. (2008). The PEA-15/PED protein protects glioblastoma cells from glucose deprivation-induced apoptosis via the ERK/MAP kinase pathway. *Oncogene* *27*, 1155-1166.

674. Smith, E.R., Cai, K.Q., Smedberg, J.L., Ribeiro, M.M., Rula, M.E., Slater, C., Godwin, A.K., and Xu, X.X. (2010). Nuclear entry of activated MAPK is restricted in primary ovarian and mammary epithelial cells. *PLoS One* 5, e9295.
675. Fodde, R., Kuipers, J., Rosenberg, C., Smits, R., Kielman, M., Gaspar, C., van Es, J.H., Breukel, C., Wiegant, J., Giles, R.H., et al. (2001). Mutations in the APC tumour suppressor gene cause chromosomal instability. *Nat Cell Biol* 3, 433-438.
676. Giaretti, W., Molinu, S., Ceccarelli, J., and Prevosto, C. (2004). Chromosomal instability, aneuploidy, and gene mutations in human sporadic colorectal adenomas. *Cell Oncol* 26, 301-305.
677. Giaretti, W., Pujic, N., Rapallo, A., Nigro, S., Di Vinci, A., Geido, E., and Risio, M. (1995). K-ras-2 G-C and G-T transversions correlate with DNA aneuploidy in colorectal adenomas. *Gastroenterology* 108, 1040-1047.
678. Giaretti, W., Rapallo, A., Geido, E., Sciutto, A., Merlo, F., Risio, M., and Rossini, F.P. (1998). Specific K-ras2 mutations in human sporadic colorectal adenomas are associated with DNA near-diploid aneuploidy and inhibition of proliferation. *Am J Pathol* 153, 1201-1209.
679. Giaretti, W., Venesio, T., Prevosto, C., Lombardo, F., Ceccarelli, J., Molinu, S., and Risio, M. (2004). Chromosomal instability and APC gene mutations in human sporadic colorectal adenomas. *J Pathol* 204, 193-199.
680. de Vries, J.E., Kornips, F.H., Marx, P., Bosman, F.T., Geraedts, J.P., and ten Kate, J. (1993). Transfected c-Ha-ras oncogene enhances karyotypic instability and integrates predominantly in aberrant chromosomes. *Cancer Genet Cytogenet* 67, 35-43.
681. Hagag, N., Diamond, L., Palermo, R., and Lyubsky, S. (1990). High expression of ras p21 correlates with increased rate of abnormal mitosis in NIH3T3 cells. *Oncogene* 5, 1481-1489.
682. Nigro, S., Geido, E., Infusini, E., Orecchia, R., and Giaretti, W. (1996). Transfection of human mutated K-ras in mouse NIH-3T3 cells is associated with increased cloning efficiency and DNA aneuploidization. *Int J Cancer* 67, 871-875.

683. Orecchia, R., Infusini, E., Sciutto, A., Rapallo, A., Di Vinci, A., Nigro, S., Geido, E., and Giaretti, W. (2000). Ki-ras activation in vitro affects G1 and G2M cell-cycle transit times and apoptosis. *J Pathol* *190*, 423-429.
684. Denko, N.C., Giaccia, A.J., Stringer, J.R., and Stambrook, P.J. (1994). The human Ha-ras oncogene induces genomic instability in murine fibroblasts within one cell cycle. *Proc Natl Acad Sci U S A* *91*, 5124-5128.
685. Vafa, O., Wade, M., Kern, S., Beeche, M., Pandita, T.K., Hampton, G.M., and Wahl, G.M. (2002). c-Myc can induce DNA damage, increase reactive oxygen species, and mitigate p53 function: a mechanism for oncogene-induced genetic instability. *Mol Cell* *9*, 1031-1044.
686. Hermsen, M., Postma, C., Baak, J., Weiss, M., Rapallo, A., Sciutto, A., Roemen, G., Arends, J.W., Williams, R., Giaretti, W., et al. (2002). Colorectal adenoma to carcinoma progression follows multiple pathways of chromosomal instability. *Gastroenterology* *123*, 1109-1119.
687. Bartos, J.D., Stoler, D.L., Matsui, S., Swede, H., Willmott, L.J., Sait, S.N., Petrelli, N.J., and Anderson, G.R. (2004). Genomic heterogeneity and instability in colorectal cancer: spectral karyotyping, glutathione transferase-M1 and ras. *Mutat Res* *568*, 283-292.
688. Cimini, D. (2008). Merotelic kinetochore orientation, aneuploidy, and cancer. *Biochim Biophys Acta* *1786*, 32-40.
689. Margolis, R.L., Lohez, O.D., and Andreassen, P.R. (2003). G1 tetraploidy checkpoint and the suppression of tumorigenesis. *J Cell Biochem* *88*, 673-683.
690. Halaschek-Wiener, J., Wacheck, V., Kloog, Y., and Jansen, B. (2004). Ras inhibition leads to transcriptional activation of p53 and down-regulation of Mdm2: two mechanisms that cooperatively increase p53 function in colon cancer cells. *Cell Signal* *16*, 1319-1327.
691. Hirota, T., Gerlich, D., Koch, B., Ellenberg, J., and Peters, J.M. (2004). Distinct functions of condensin I and II in mitotic chromosome assembly. *J Cell Sci* *117*, 6435-6445.

692. Ha, G.H., Kim, H.S., Lee, C.G., Park, H.Y., Kim, E.J., Shin, H.J., Lee, J.C., Lee, K.W., and Lee, C.W. (2009). Mitotic catastrophe is the predominant response to histone acetyltransferase depletion. *Cell Death Differ* *16*, 483-497.
693. Nakazawa, N., Mehrotra, R., Ebe, M., and Yanagida, M. (2011). Condensin phosphorylated by the Aurora-B-like kinase Ark1 is continuously required until telophase in a mode distinct from Top2. *J Cell Sci* *124*, 1795-1807.
694. Prochownik, E.V., and Li, Y. (2007). The ever expanding role for c-Myc in promoting genomic instability. *Cell Cycle* *6*, 1024-1029.
695. Keck, J.M., Summers, M.K., Tedesco, D., Ekholm-Reed, S., Chuang, L.C., Jackson, P.K., and Reed, S.I. (2007). Cyclin E overexpression impairs progression through mitosis by inhibiting APC(Cdh1). *J Cell Biol* *178*, 371-385.
696. He, L., Yang, H., Ma, Y., Pledger, W.J., Cress, W.D., and Cheng, J.Q. (2008). Identification of Aurora-A as a direct target of E2F3 during G2/M cell cycle progression. *J Biol Chem* *283*, 31012-31020.
697. Grandis, J.R., and Sok, J.C. (2004). Signaling through the epidermal growth factor receptor during the development of malignancy. *Pharmacol Ther* *102*, 37-46.
698. Yeung, K., Seitz, T., Li, S., Janosch, P., McFerran, B., Kaiser, C., Fee, F., Katsanakis, K.D., Rose, D.W., Mischak, H., et al. (1999). Suppression of Raf-1 kinase activity and MAP kinase signalling by RKIP. *Nature* *401*, 173-177.
699. Wakioka, T., Sasaki, A., Kato, R., Shouda, T., Matsumoto, A., Miyoshi, K., Tsuneoka, M., Komiya, S., Baron, R., and Yoshimura, A. (2001). Spred is a Sprouty-related suppressor of Ras signalling. *Nature* *412*, 647-651.
700. Bundschu, K., Knobloch, K.P., Ullrich, M., Schinke, T., Amling, M., Engelhardt, C.M., Renne, T., Walter, U., and Schuh, K. (2005). Gene disruption of Spred-2 causes dwarfism. *J Biol Chem* *280*, 28572-28580.
701. Yoshida, T., Hisamoto, T., Akiba, J., Koga, H., Nakamura, K., Tokunaga, Y., Hanada, S., Kumemura, H., Maeyama, M., Harada, M., et al. (2006). Spreds, inhibitors of the Ras/ERK signal transduction, are dysregulated in human

- hepatocellular carcinoma and linked to the malignant phenotype of tumors. *Oncogene* 25, 6056-6066.
702. Huynh, H., Soo, K.C., Chow, P.K., and Tran, E. (2007). Targeted inhibition of the extracellular signal-regulated kinase kinase pathway with AZD6244 (ARRY-142886) in the treatment of hepatocellular carcinoma. *Mol Cancer Ther* 6, 138-146.
703. Milella, M., Kornblau, S.M., Estrov, Z., Carter, B.Z., Lapillonne, H., Harris, D., Konopleva, M., Zhao, S., Estey, E., and Andreeff, M. (2001). Therapeutic targeting of the MEK/MAPK signal transduction module in acute myeloid leukemia. *J Clin Invest* 108, 851-859.
704. Sun, Y. (2003). Targeting E3 ubiquitin ligases for cancer therapy. *Cancer Biol Ther* 2, 623-629.
705. Chauhan, D., Singh, A., Brahmandam, M., Podar, K., Hideshima, T., Richardson, P., Munshi, N., Palladino, M.A., and Anderson, K.C. (2008). Combination of proteasome inhibitors bortezomib and NPI-0052 trigger in vivo synergistic cytotoxicity in multiple myeloma. *Blood* 111, 1654-1664.

ANNEXE 1.

PUBLICATIONS ET RÉSUMÉS DE COMMUNICATION

Articles publiés

Duhamel S, Hébert J, Gaboury L, Bouchard A, Simon R, Sauter G, Basik M and Meloche, S. (2011). Sef downregulation by Ras causes MEK1/2 to become aberrantly nuclear localized leading to polyploidy and neoplastic transformation. *Cancer research*. (Sous-presse).

Voisin L, Julien C, **Duhamel S**, Gopalbhai K, Claveau I, Saba-El-Leil M K, Rodrigue-Gervais I G, Gaboury L, Lamarre D, Basik M and Meloche S. (2008). Activation of MEK1 or MEK2 isoform is sufficient to fully transform intestinal epithelial cells and induce the formation of metastatic tumors. *BMC Cancer*. Vol 17, 8-337.

Duhamel S, Merianne M, Lejeune L, Galipeault J and Annabi B. (2006). Cooperation of matrix metalloproteinases with the RhoA/ROCK and MEK/ERK pathways in the regulation of sphingosine-1-phosphate-induced migration and actin cytoskeleton remodelling of marrow-derived stromal cells. *Stem Cells*. Vol 24, p.2557-65.

Articles en révision

Duhamel S, Mc Nabb F-A, Larguet F, Legault P, Rassart É and Édouard E. (2011). Mutagenic oligonucleotides targeting the integrase coding sequence of the provirus abolish Cas-Br-E murine leukemia virus replication. (PNAS).

Articles (en préparation)

Duhamel S, Dorn J, Maddox P and Meloche S. (2011). Implication of the Ras/Raf/MEK/ERK1/2 pathway in tetraploidy and chromosomal instability. (en voie de soumission à Nature Cell Biology).

Duhamel S, Voisin L and Meloche S. (2011). Targeting the ERK1/2 MAP Kinase Signaling Pathway in advanced metastatic cancer. (en voie de soumission à Pharmacological Reviews).

CHAPITRE DE LIVRE

Duhamel S*, Voisin L* and Meloche S. The ERK1/2 MAP kinase signaling pathway in tumor progression and metastasis. In: Wu W-S, Hu C-T, eds. *Signal Transduction in Cancer Metastasis*. Berlin Heidelberg: Springer, 2010: sous-presse (*co-first authors).

PRÉSENTATIONS ORALES

Duhamel S, Dorn J, Maddox P and Meloche S. (2011). Implication of the Ras/Raf/MEK/ERK1/2 pathway in mitosis regulation, tetraploidy and chromosomal instability. XVII^e JOURNÉE SCIENTIFIQUE, CRCHUM, Hôpital Notre-Dame, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada.

Duhamel S, Maddox P and Meloche S. (2010). Implication of the Ras/Raf/MEK/ERK1/2 pathway in tetraploidy. IIIe Journée Scientifique de l'IRIC. IRIC, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada.

Duhamel S, Hébert J, Dorn J, Maddox P and Meloche S. (2010). Sustained nuclear localization of MEK1 induces neoplastic transformation and tetraploidy. Progress Report, IRIC, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada.

Duhamel S, Dorn J, Maddox P, Hébert J and Meloche S. (2008). Nuclear localization of MEK transforms epithelial intestinal cells and induces genomic instability. Iie Journée Scientifique de l'IRIC. IRIC, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada.

Duhamel S, Édouard E, Mc Nabb F-A, Larguet F, Legault P, Rassart É. 2008. Inhibition of Cas-Br-E murine leukemia virus replication using mutagenic oligonucleotides targeting the integrase coding sequence. XXth International Workshop on Retroviral Pathogenesis, Toronto, Canada.

Duhamel S, Dorn J, Maddox P, Hébert J and Meloche S. (2008) Implication of MEK in genomic instability. Progress Report, IRIC, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada.

Duhamel S and Meloche S. (2007). Impact of nuclear localization of MEK1 on tumorigenesis. Progress Report, IRIC, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada.

Duhamel S, Merianne M, Lejeune L et Annabi B. (2006). La Sphingosine-1 phosphate, un facteur plaquettaire, induit le remodelage du cytosquelette d'actine et la migration des cellules souches mésenchymateuses. Séminaire de Recherche en Biochimie. Laboratoire d'Oncologie Moléculaire, Département de Chimie, UQAM, Montréal, Québec, Canada.

Duhamel, S. (2005). Nouvelle approche anti-rétrovirale : altération du génome viral à l'intérieur de la cellule hôte. Séminaire de Recherche, Département des Sciences Biologiques, UQAM, Montréal, Québec, Canada.

PRÉSENTATIONS PAR AFFICHE

Duhamel S, Hébert J, Gaboury L, Basik M and Meloche S. (2011). Sustained nuclear localization of MEK1 induces neoplastic transformation, tetraploidy and chromosomal instability. 1ST International symposium on the physiology and diseases of the digestive tract (PDGI 2011). Orford, Québec, Canada.

Duhamel S, Dorn J, Maddox P et Meloche S. (2011). Implication of the Ras/Raf/MEK/ERK1/2 pathway in mitosis regulation, tetraploidy and chromosomal instability. Journée du département de Biochimie de l'Université de Montréal, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada.

Duhamel S, Dorn J, Hébert J, Maddox P et Meloche S. (2010). Implication de la voie Ras/Raf/MEK/ERK1/2 dans l'instabilité chromosomique et la tétraploïdie. Colloque Signalisation Québec 2010, Orford, Québec, Canada.

Duhamel S, Hébert J, Gaboury L, Basik M and Meloche S. (2010). Sustained Nuclear Localization of MEK1 Induces Chromosomal Instability and Transformation of Intestinal Epithelial Cells. Vesicular trafficking and cellular signalling. IRIC. Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada.

Duhamel S, Dorn J, Maddox P et Meloche S. (2010). Implication de la voie Ras/Raf/MEK/ERK1/2 dans l'instabilité chromosomique et la tétraploïdie. XVI^e JOURNÉE SCIENTIFIQUE, Programmes de biologie moléculaire, Faculté de médecine, IRCM, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada.

Duhamel S, Voisin L, Julien C, Gopalbhai K, Claveau I, Saba-El-Leil MK, Rodrigue-Gervais IG, Gaboury L, Lamarre D, Basik M et Meloche, S. (2009). L'activation de MEK1 ou MEK2 transforme les cellules intestinales épithéliales et induit la formation de tumeur.

XV^e JOURNÉE SCIENTIFIQUE, Programmes de biologie moléculaire, Faculté de médecine, IRIC, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada.

Duhamel S and Meloche S. (2008). New role of MEK : Implication in genomic instability and tetraploidy. The Cole Foundation poster day, McIntyre Medical Centre of McGill University, Montréal, Québec, Canada.

Duhamel S, Hébert J et Meloche S. (2008). Nouveau rôle de MEK : Implication de MEK dans l'instabilité génomique et la tétraploïdie. Journée de la recherche G.L. Plaa, Faculté de pharmacologie, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada.

Duhamel S, Hébert J et Meloche S. (2008). Implication de MEK/ERK dans l'instabilité génomique et la tétraploïdie. XIV^e JOURNÉE SCIENTIFIQUE, Programmes de biologie moléculaire, Faculté de médecine, CHUM, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada.

Duhamel S, Voisin L and Meloche, S. (2007). Nuclear localization of MEK1 transforms intestinal epithelial cells. Cell Molecular and Developmental Biology Research Retreat, Mont-Grabriel, Ste-Adèle, Québec, Canada.

Duhamel S et Meloche S. (2007). Impact de la localisation de MEK1 sur la tumorigénèse. XIII^e JOURNÉE SCIENTIFIQUE, Programmes de biologie moléculaire, Faculté de médecine, IRIC, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada.

Duhamel S, Meriane M, et Annabi B. (2006). La Sphingosine-1 phosphate induit la migration des cellules souches mésenchymateuses par un mécanisme MMP dépendant. 2^e Colloque de Biomed, UQAM, Montréal, Québec, Canada.

Duhamel S, Édouard E et Rassart, É. (2005). Nouvelle approche anti-rétrovirale ciblant l'intégrase du rétrovirus Cas-Br-E MuLV. 1^e Colloque de Biomed, UQAM, Montréal, Québec, Canada.

BREVETS

- 1) Édouard E, Rassart E and **Duhamel S**. *"Oligonucleotides and uses thereof "*. Patent Cooperation Treaty international Application. SSS/13234.95. Deposit Dec 2006.
- 2) Édouard E, Rassart E and **Duhamel S**. *"Oligonucleotides and uses thereof "*. US provisional patent application N° 60/752,875. Deposit 23 Dec 2005.

ANNEXE 2.

PRIX, MENTIONS, BOURSES

BOURSES

Bourse de rédaction du département de biologie moléculaire 8,000\$, 1 an	2011
IRSC 22,000\$/an, 3 ans	2008-2010
Fondation Cole 22,000\$/an, 18 mois	2007-2008
CRSNG Bourse en milieu industriel 20,000\$/an, 3 ans	(déclinée) 2006-2008

PRIX

Nomination meilleure présentation par affiche Dans le cadre de la Journée de présentation par affiche du département de Biochimie de l'Université de Montréal, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada.	2011
1 ^{er} prix meilleure présentation par affiche, de l'Institut du Cancer de Montréal Dans le cadre de la XVI ^e JOURNÉE SCIENTIFIQUE, IRCM, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada.	2010
1 ^{er} prix meilleure présentation par affiche Dans le cadre du Colloque Signalisation Québec 2010, Orford, Québec, Canada.	2010

