

Université de Montréal

**Régulation du métabolisme des ARNm par les voies de  
signalisation MAPK et mTOR**

par

Marie Cargnello

Programmes de Biologie Moléculaire

Faculté de Médecine

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

Mars, 2014

© Marie Cargnello, 2014



## Résumé

Il est à ce jour bien établi que la régulation de l'expression génique dépend en grande partie des événements post-transcriptionnels et que la traduction des ARNm tient un rôle de premier plan dans ces processus. Elle est particulièrement importante pour définir le protéome, maintenir l'homéostasie et contrôler la croissance et la prolifération cellulaire. De nombreuses pathologies humaines telles que le cancer découlent de dérèglements de la synthèse protéique. Ceci souligne l'importance d'une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires contribuant au contrôle de la traduction des ARNm. Le facteur d'initiation eIF4E est essentiel à la traduction et son activité est régulée par ses partenaires protéiques dont font partie les protéines 4E-BP et 4E-T. Les voies de signalisation PI3K/mTOR et MAPK qui sont fortement impliquées dans l'étiologie du cancer, contrôlent la traduction en modulant l'activité d'eIF4E *via* l'inhibition des protéines 4E-BP et la localisation de 4E-T. Afin d'améliorer notre compréhension des mécanismes régulant la traduction des ARNm, nous avons utilisé plusieurs approches. Tout d'abord, nous avons caractérisé les mécanismes par lesquels le complexe mTORC1 est activé en réponse aux facteurs de croissance et avons déterminé que la kinase RSK, en aval de la voie Ras/ERK, contrôle directement l'activité de mTORC1 en phosphorylant Raptor, la sous-unité régulatrice du complexe mTORC1. Par ailleurs, nous nous sommes intéressés au rôle joué par mTORC1 dans l'initiation de la traduction. Pour cela, nous avons réalisé un criblage protéomique dans le but d'identifier de nouveaux facteurs sous le contrôle de mTORC1 qui participent activement à la traduction. Ces travaux ont ainsi permis l'identification de la protéine de liaison à l'ARN LARP1 comme effecteur majeur de la traduction des ARNm et de la croissance cellulaire en aval de mTORC1. Finalement, notre étude de l'effet du stress oxydant dans la répression de la traduction nous a permis de montrer que la kinase JNK contrôle la localisation du répresseur 4E-T au sein des P-bodies, qui sont des granules cytoplasmiques concentrant des ARNm non traduits et des facteurs de la dégradation des ARNm. Nos travaux ont donc abouti à la découverte de mécanismes moléculaires cruciaux impliqués dans la régulation de la traduction des ARNm et de la synthèse protéique. Ces derniers étant largement impliqués dans la prolifération cellulaire et la croissance tumorale, nos recherches ouvrent sur un champ d'investigation plus large pour le développement de nouvelles molécules anti-cancéreuses.

**Mots-clés** : signalisation, mTORC1, MAPK, traduction des ARNm, eIF4E, P-bodies

## **Abstract**

It is now well established that gene expression is predominantly regulated by post-transcriptional events and that mRNA translation plays an essential role in this process. Translation of mRNAs is especially important in defining the proteome, maintaining homeostasis and controlling cell growth and cell proliferation. Several human diseases such as cancer are associated with aberrant regulation of protein synthesis highlighting the need to better understand the molecular mechanisms contributing to translational control. The translation initiation factor eIF4E is a key component of the translational machinery whose activity is controlled by its partners, the 4E-BP and 4E-T proteins. The PI3K/mTOR and MAPK signaling pathways, which are strongly implicated in cancer etiology, control mRNA translation by modulating eIF4E activity through the inhibition of the 4E-BPs and the regulation of eIF4E localization by 4E-T. In order to better understand how mRNA translation is regulated we used several approaches. First, we characterized the mechanisms contributing to mTORC1 activation in response to growth factor. We found that the kinase RSK, that lies downstream of the Ras/ERK pathway, directly controls mTORC1 activity by phosphorylating Raptor, the regulatory sub-unit of the complex. This provides evidence of an additional mechanism by which MAPK pathway regulates mTORC1. We next performed a proteomic screen to identify novel mTOR-regulated factors that actively participate in translation. This approach led to the identification of several candidate proteins which included the RNA-binding protein LARP1 that we found to be a major effector of mTORC1-mediated mRNA translation, cell growth and proliferation. Finally we investigated the impact of oxidative stress on translation inhibition and found that the JNK kinase controls 4E-T localization in P-bodies that are cytoplasmic granules containing non-translating mRNAs and proteins from the mRNA decay and silencing machineries. Together this work provides important novel insights into the regulation of mRNA translation and protein synthesis that represent processes strongly connected to tumorigenesis and brings precious information on the mechanisms by which signaling pathways control cell growth and proliferation.

**Keywords** : signaling pathways, mTORC1, MAPK, mRNA translation, eIF4E, P-bodies

# Table des matières

Résumé.....	ii
Abstract.....	iv
Table des matières.....	v
Liste des tableaux.....	x
Liste des figures.....	xi
Liste des abréviations.....	xiv
Remerciements.....	xx
Avant-propos.....	xxi
<b>Chapitre 1 : Introduction</b> .....	1
1. Mécanismes de contrôle de l'expression génique dans le cytoplasme.....	1
1.1. Traduction dépendante de la coiffe des ARNm chez les eucaryotes.....	3
1.1.1. Éléments <i>cis</i> de l'ARNm influant sur la traduction.....	3
1.1.1.1. La coiffe des ARNm.....	3
1.1.1.2. La région 5'UTR.....	5
1.1.1.2.1. Caractéristiques générales.....	5
1.1.1.2.2. Contexte du codon d'initiation.....	5
1.1.1.2.3. Séquence TOP.....	5
1.1.1.2.4. Structures secondaires : IRES.....	6
1.1.1.3. La région 3'UTR.....	7
1.1.1.4. La queue poly(A).....	8
1.1.2. Initiation de la traduction.....	10
1.1.2.1. Assemblage du complexe de pré-initiation.....	10
1.1.2.2. Formation du complexe eIF4F et recrutement du ribosome.....	11
1.1.2.3. Reconnaissance du codon d'initiation.....	13
1.1.3. Élongation de la traduction.....	13
1.1.4. Terminaison de la traduction et recyclage des ribosomes.....	15
1.2. Répression de la traduction et dégradation des ARNm.....	16
1.2.1. Mécanisme général de dégradation des ARNm.....	17

1.2.1.1.	Déadénylation des ARNm .....	18
1.2.1.2.	Décoiffage et dégradation de 5' en 3' .....	19
1.2.2.	Voies spécifiques de dégradation des ARNm.....	19
1.2.2.1.	Dégradation induite par les microARN .....	20
1.2.2.2.	Dégradation induite par les codons stop précoces .....	20
1.2.2.3.	Dégradation induite par les éléments riches en AU .....	21
1.2.3.	Localisation subcellulaire des ARNm .....	22
1.2.3.1.	P-bodies.....	22
1.2.3.1.1.	Composition et mécanismes d'assemblage .....	22
1.2.3.1.2.	Fonction proposée .....	24
1.2.3.2.	Granules de stress.....	24
1.2.3.2.1.	Composition et mécanismes d'assemblage .....	24
1.2.3.2.2.	Fonction proposée .....	25
2.	Voies de signalisation impliquées dans la régulation de la traduction et des ARNm... 26	
2.1.	La voie PI3K/mTOR.....	26
2.1.1.	Description du complexe mTORC1.....	27
2.1.2.	Mécanismes de régulation de mTORC1 .....	30
2.1.2.1.	Régulation de mTORC1 par les facteurs de croissance.....	30
2.1.2.1.1.	Voie PI3K/Akt.....	30
2.1.2.1.2.	Voie Ras/MAPK .....	32
2.1.2.2.	Régulation de mTORC1 par les acides aminés.....	33
2.1.2.3.	Régulation par les niveaux en énergie et le stress cellulaire.....	34
2.1.3.	Contrôle de la traduction des ARNm par mTORC1 .....	35
2.1.3.1.	Les 4E-BP et l'assemblage du complexe eIF4F .....	35
2.1.3.1.1.	Contrôle du complexe eIF4F par les 4E-BP.....	35
2.1.3.1.2.	Traduction globale et spécifique : rôle des 4E-BP.....	36
2.1.3.2.	Les S6K et la synthèse protéique globale .....	37
2.1.4.	mTOR, une cible thérapeutique privilégiée dans les cancers .....	38
2.1.4.1.	Activation de mTORC1 dans les cancers .....	38
2.1.4.2.	La rapamycine et les rapalogues comme traitements anticancéreux .....	38
2.1.4.3.	Développement d'inhibiteurs de deuxième génération de mTOR.....	39

2.2.	La voie MAPK .....	40
2.2.1.	Le module Ras/ERK .....	40
2.2.1.1.	La petite GTPase Ras .....	41
2.2.1.2.	Les kinases Raf/MEK/ERK .....	42
2.2.1.3.	La famille des kinases RSK .....	44
2.2.1.4.	Contrôle de la traduction par les kinases ERK et RSK .....	45
2.2.2.	Le module JNK .....	46
2.2.2.1.	Mécanismes d'activation .....	47
2.2.2.2.	Rôle des JNK dans le métabolisme cytoplasmique des ARNm .....	48
3.	Objectifs de la thèse .....	50
<b>Chapitre 2:</b>	<b>Oncogenic MAPK Signaling Stimulates mTORC1 Activity by Promoting RSK-</b>	
	<b>Mediated Raptor Phosphorylation .....</b>	<b>51</b>
	Mise en contexte .....	52
	Summary .....	54
	Introduction .....	55
	Results .....	57
	Discussion .....	63
	Experimental Procedures .....	65
	Acknowledgments .....	67
	References .....	68
	Figures .....	72
	Supplemental Information .....	83
	Supplementary Experimental Procedures .....	83
	Supplemental References .....	84
	Supplemental Figures .....	86
<b>Chapitre 3:</b>	<b>Proteomic analysis of cap-dependent translation identifies LARP1 as a key</b>	
	<b>regulator of 5'TOP mRNA translation .....</b>	<b>91</b>
	Mise en contexte .....	92
	Abstract .....	93



Introduction.....	95
Results.....	97
Discussion.....	105
Materials and Methods.....	109
Acknowledgments.....	112
References.....	113
Tables.....	117
Figures.....	119
Supplemental Information .....	132
Supplemental Materials and Methods.....	132
Supplemental References.....	136
Supplemental Figures.....	137
<b>Chapitre 4:</b> Phosphorylation of the eukaryotic translation initiation factor 4E-transporter (4E-T) by c-Jun N-terminal kinase promotes stress-dependent P-body assembly .....	147
Mise en contexte .....	148
Abstract.....	150
Introduction.....	151
Materials and Methods.....	153
Results.....	160
Discussion.....	166
Acknowledgments.....	169
References.....	170
Figures.....	174
Supplemental Figures.....	188
<b>Chapitre 5:</b> Discussion .....	192
1. Régulation de mTORC1 par les kinases RSK .....	192
<i>Phosphorylation de Raptor et activation du complexe mTORC1</i> .....	192
<i>Raptor, une protéine d'échafaudage cruciale pour l'activité de mTORC1</i> .....	193
<i>Potentiel thérapeutique des kinases RSK dans le cancer</i> .....	194

2.	LARP1, un nouveau point de contact entre mTORC1 et la traduction des ARNm....	195
	<i>LARP1 régule la traduction des ARNm en aval de mTORC1</i> .....	195
	<i>Mécanismes potentiels d'activation directe de LARP1 par mTORC1</i> .....	196
	<i>Mécanismes potentiels du contrôle de la traduction par LARP1</i> .....	198
	<i>Une fonction potentielle de LARP1 dans la stabilité des ARNm?</i> .....	199
3.	Contrôle du métabolisme des ARNm cytoplasmiques par 4E-T.....	200
	<i>4E-T est un répresseur de la traduction des ARNm</i> .....	200
	<i>L'activité de 4E-T est modulée par les de voies de signalisation JNK et Ras/MAPK</i> ...	202
<b>Chapitre 6: Conclusion</b> .....		205
<b>Bibliographie</b> .....		206

## Liste des tableaux

**Table I:** Insulin-regulated candidate proteins identified in the proteomic screen..... 117

**Table II:** PI-103-regulated candidate proteins identified in the proteomic screen ..... 118

# Liste des figures

## Chapitre 1 :

Figure 1: Maturation des ARNm .....	2
Figure 2: Structure de la coiffe .....	4
Figure 3: Machinerie de clivage et de polyadénylation .....	9
Figure 4: Formation du complexe de pré-initiation .....	11
Figure 5: Formation du complexe eIF4F et recrutement du PIC .....	12
Figure 6: Étapes de l'élongation de la traduction chez les eucaryotes .....	14
Figure 7: Étapes de la terminaison de la traduction et du recyclage des ribosomes .....	16
Figure 8: Voie de dégradation générale des ARNm .....	18
Figure 9: Modèle d'assemblage des P-bodies .....	23
Figure 10: Organisation des complexes mTORC1 et mTORC2 .....	28
Figure 11: Activation du complexe mTORC1 par les facteurs de croissance et les acides aminés .....	31
Figure 12: Contrôle du complexe mTORC1 par les acides aminés .....	33
Figure 13: Activation de la voie Ras/MAPK et des kinases RSK .....	43
Figure 14. Activation de la voie JNK .....	48

## Chapitre 2:

Figure 1. RSK Phosphorylates Raptor In Vitro and In Cells Stimulated with Agonists of the Ras/MAPK Pathway .....	72
Figure 2. Oncogenic Activation of the Ras/MAPK Pathway Promotes Constitutive Raptor Phosphorylation .....	74
Figure 3. Quantitative Mass Spectrometry Identifies and Profiles the Phosphorylation of Raptor upon Stimulation of the Ras/MAPK Pathway .....	76
Figure 4. Ser719, Ser721 and Ser722 are the Primary RSK-dependent Phosphorylation Sites in Raptor .....	78
Figure 5. RSK-mediated Phosphorylation of Raptor Promotes mTORC1 Activity without Altering Raptor Interaction with mTOR or its Substrates .....	80

Figure 6. The Ras/MAPK and PI3K/Akt Pathways Regulate mTORC1 Activation Using a Twofold Mechanism .....	82
Figure S1. Raptor is Phosphorylated on RXXRXXpS/T Consensus Motifs Following Activation of the Ras/MAPK Pathway, but not the PI3K/Akt Pathway .....	86
Figure S2. Overexpression of the Four RSK Isoforms and BI-D1870 Treatment Highlight the Positive Role of RSK-mediated Raptor Phosphorylation in mTORC1 Activation .....	88
Figure S3. RSK-mediated Phosphorylation of Raptor does not Affect Interaction with S6K1	89
Figure S4. mTORC1 Kinase Activity is Sensitive to Rapamycin Treatment and Requires a Functional mTOR Kinase Domain .....	90

### Chapitre 3:

Figure 1. Global Quantitative Assessment of Proteins that Associate with the mRNA 5' cap. .....	119
Figure 2. mTOR-Dependent Regulation of the 5' Cap-Binding Complex.....	121
Figure 3. Identification of Novel Components of the 5' Cap-Binding Complex. ....	123
Figure 4. mTOR Regulates LARP1 Association to Polysomes via PABP.....	125
Figure 5. LARP1 Regulates Protein Synthesis, Cell Cycle Progression and Proliferation. ...	128
Figure 6. LARP1 associates with and regulates 5'TOP mRNA translation. ....	129
Figure 7. Schematic representation of the role of LARP1 in mRNA translation. ....	131
Figure S1. Interaction Network Analysis of RNA-Independent Candidates.....	137
Figure S2. Quantitative MS/MS Data of Selected Cap-Binding Complex Components Purified from 4E-BP1/2 DKO Cells. ....	139
Figure S3. LARP1 specifically associates with actively translating ribosomes and individual factors of the eIF4F complex. ....	140
Figure S4. LARP1 Silencing Affects Global Protein Synthesis, G1-Phase Progression, and Cell Proliferation.....	141
Figure S5. PABP and Raptor associate with LARP1 in a noncompetitive manner.....	143
Figure S6. mTOR inhibition and LARP1 Silencing Affects Global Protein Synthesis.....	144
Figure S7. Partial restoration of polysome assembly by a non-shRNA-cleavable LARP1 construct.....	146

## Chapitre 4:

Figure 1. 4E-T Becomes Phosphorylated in Response to Oxidative Stress. ....	174
Figure 2. 4E-T is a target of JNK signalling. ....	176
Figure 3. JNK phosphorylates 4E-T in vitro and in vivo. ....	177
Figure 4. JNK interacts and colocalizes with 4E-T upon induction of oxidative stress. ....	178
Figure 5. Identification of 4E-T phosphorylation sites regulated by JNK. ....	179
Figure 6. JNK phosphorylates 4E-T on six serine residues. ....	181
Figure 7. JNK contributes to 4E-T complex assembly upon oxidative stress. ....	182
Figure 8. 4E-T phosphorylation promotes PB assembly in response to oxidative stress. ....	183
Figure 9. S6A mutation of 4E-T does not affect global protein synthesis, and loading of eIF4E-sensitive transcripts on polysomes. ....	185
Figure 10. 4E-T phosphorylation stimulates PB growth upon stress. ....	187
Figure S1. Specificity of the antibody against endogenous 4E-T. ....	188
Figure S2. Tandem mass spectra of the six precursor ions corresponding to tryptic phosphopeptides regulated by JNK in 4E-T. ....	189
Figure S3. Conservation of the JNK-dependent 4E-T phosphorylation sites amongst vertebrate species. ....	190
Figure S4. Frequency of Q/N/P residues in 4E-T. ....	191

## Chapitre 5:

Figure 1: mTOR phosphoryle LARP1 <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i> . ....	197
Figure 2: RSK phosphoryle 4E-T sur la thréonine 257 et la sérine 259. ....	204

## Liste des abréviations

40S; 60S; 80S: Sous-unités du ribosome (S: Svedberg)  
4E-BP: eIF4E-Binding Protein  
4E-HP: eIF4E-Homologous Protein  
4E-T: eIF4E-Transporter  
AGC: Protein kinases A, G and C  
AGO: Argonaute  
AMD: ARE-Mediated Decay  
AMP: Adenosine Monophosphate  
AMPK: AMP-activated Protein Kinase  
ARE: AU-Rich Element  
ARN: Acide Ribonucléique  
ARNm: ARN messenger  
ARNr: ARN ribosomique  
ARNt: ARN de transfert  
ASK1: Apoptosis Signal-regulated Kinase 1  
ATP: Adenosine Triphosphate  
AUF1: AU-rich element RNA-binding protein 1  
BRF1-2: Butyrate Response Factor 1-2  
Caf1: Ccr4-associated factor 1  
CBP : Cap Binding Protein  
Ccr4: Carbon catabolite repressor protein 4  
CDK1: Cyclin-Dependent Kinase 1  
CK1: Caseine Kinase 1  
CPEB: Cytoplasmic Polyadenylation Element Binding protein  
CPSF: Cleavage and Polyadenylation Specificity Factor  
CstF: Cleavage stimulating Factor  
CTD: C-Terminal Domain  
CTKD: carboxy-Terminal Kinase Domain  
Dcp: Decapping protein

DcpS: Decapping Scavenger protein  
DDX: DEAD Box proteins  
DEAD: D-E-A-D (asp-glu-ala-asp)  
Deptor: DEP-domain-containing mTOR-interacting protein  
DSE: Downstream Sequence Element  
EDC3: Enhancer of Decapping 3  
eEF: eukaryotic translation Elongation Factor  
eEF2K: eEF2 Kinase  
EGF: Epidermal Growth Factor  
eIF: eukaryotic translation Initiation Factor  
EJC: Exon Junction Complex  
eRF: eukaryotic translation Release Factor  
ERK: Extracellular signal-Regulated Kinase  
FAK: Focal Adhesion Kinase  
FKBP12: FK504-binding protein of 12 kDa  
FRB: FKBP12-Rapamycin Binding domain  
GAP: GTPase Activating Protein  
GATOR: GAP Activity TOWard Rags  
GCN2: General Control Nonrepressed 2  
GDP: Guanosine Diphosphate  
GEF: Guanine nucleotide Exchange Factor  
GM-CSF: Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor  
GMP: Guanosine monophosphate  
GPCR: G-Protein Coupled Receptor  
GSK3 $\beta$ : Glycogen Synthase Kinase 3 $\beta$   
GST: Glutathion S-Transferase  
Grb2: Growth factor receptor bound protein 2  
m<sup>7</sup>GTP: 7-methylguanosine Triphosphate  
GTP: Guanosine Triphosphate  
GW182: Glycine-Tryptophan protein of 182 kDa  
HCC: Hepatocellular Carcinoma



HEAT: Huntingtin, Elongation factor 3, a subunit of protein phosphatase 2A, TOR1  
HITS-CLIP: High ThroughPut Sequencing-CrossLinking ImmunoPrecipitation  
HRI: Heme-Regulated eIF2 $\alpha$  kinase  
HuR: Hu antigen R  
IGF: Insulin-like Growth Factor  
IL: InterLeukine  
iNOS: inducible Nitric Oxide Synthase  
IPA: Ingenuity Pathway Analysis  
IRES: Internal Ribosome Entry Site  
IRS1: Insulin Receptor Substrate 1  
JIP: JNK Interacting Protein  
JNK: c-Jun N-terminal Kinase  
KSR: Kinase Suppressor of Ras  
LA: La Antigen  
LAM: La Motif  
LARP: LA-Related Protein  
LC: Liquid Chromatography  
LDL: Low Density Lipoprotein  
LKB1: Liver Kinase B1  
LRS: Leucyl-tRNA Synthetase  
MAPK: Mitogen-Activated Protein Kinase  
MAPKAPK: MAPK-Activated Kinase  
MAPKK: MAPK Kinase  
MAPKKK: MAPK Kinase Kinase  
MEF: Mouse Embryonic Fibroblast  
MEK: MAPK/ERK Kinase  
MLK: Mixed Lineage Kinase  
mLST8: mammalian Lethal with Sec13 protein 8  
mRNP: messenger RiboNucleoParticule  
MS: Mass Spectrometry  
mSIN1: mammalian SAPK Interacting protein 1

mTOR: mammalian/mechanistic Target of Rapamycin  
mTORC: mTOR Complex  
NAC: N-Acetyl-L-Cysteine  
NF-1: Neurofibromatosis-related protein 1  
NGF: Nerve Growth Factor  
NMD: Nonsense Mediated Decay  
NPC: Nuclear Pore Complex  
NTKD: amino-Terminal Kinase Domain  
ORF: Open Reading Frame  
PABP: Poly(A) Binding Protein  
PABPN1: Nuclear Poly(A) Binding Protein 1  
Pan: Poly(A) Nuclease  
PAP: Poly(A) Polymerase  
PAS: PolyAdenylation Signal  
PB: Processing Bodies  
PDCD4: Programmed Cell Death 4  
PDGF: Platelet-Derived Growth Factor  
PDK1: Phosphoinositide-Dependent protein Kinase 1  
PERK: PRKR-like Endoplasmic Reticulum Kinase  
PH: Pleckstrin Homology  
PI3K: Phosphatidylinositol 3 Kinase  
PIC: Pre-Initiation Complex  
PIKK: Phosphatidylinositol-3 Kinase related-Kinase  
PIP2: Phosphatidylinositol-(4-5)-biPhosphate  
PIP3: Phosphatidylinositol-(3-4-5)-triPhosphate  
PKB: Protein Kinase B (Akt)  
PKC: Protein Kinase C  
PKR: Protein Kinase RNA-activated  
*PMA: Phorbol-12-Myristate-13-Acetate*  
PRAS40: Proline-Rich AKT Substrate 40 kDa  
PRTE: Pyrimidine-Rich Translational Element

Protor: Protein observed with Rictor  
PTC: Peptidyl Transferase Center  
PTEN: Phosphatase and TENsin homolog  
RACK1: Receptor for Activated C Kinase 1  
Raf: Rapidly accelerated fibrosarcoma  
Rag: Ras-related GTP-binding protein  
Raptor: Regulatory-Associated Protein of mTOR  
Ras: Rat sarcoma  
RBD: Ras Binding Domain  
RBP: RNA Binding Protein  
REDD1: Regulated in Development and DNA damage response 1  
Rheb: Ras homolog enriched in brain  
Rictor: Rapamycin-insensitive companion of mTOR  
RIP: RNA-Immunoprecipitation  
RISC: RNA-Induced Silencing Complex  
RNAi: RNA interference  
RNMT: RNA (guanine-N7-) methyltransferase  
RRM: RNA Recognition Motif  
RSK: p90 Ribosomal S6-Kinase  
RTK: Receptor Tyrosine Kinase  
S6: 40S ribosomal protein S6  
S6K: 70 kDa ribosomal S6 Kinase  
SAPK: Stress-Activated Protein Kinase  
SG: Stress Granule  
shRNA: small hairpin RNA  
siRNA: small interfering RNA  
SKAR: S6K1 Aly/REF-like substrate  
SMG: Suppressor of Morphogenetic effect on Genitalia  
SOS: Son Of Sevenless  
STRING: Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes  
SURF: SMG1-UPF1-eRF

TAK1: TGF $\beta$ -Activated Kinase 1  
TC: Ternary Complex  
TIA1: T-cell-restricted Intracellular Antigen 1  
TIAR: TIA-Related protein  
TIF1A: Transcription Intermediary Factor 1A  
TMT: Tandem Mass Tag  
TNF $\alpha$ : Tumour Necrosis Factor  $\alpha$   
TOP: Terminal Oligopyrimidine Tract  
TOS: TOR-Signaling  
 $\beta$ TrCP:  $\beta$ -Transducin repeat-Containing Protein  
TSC2: Tuberous Sclerosis Complex  
TTP: TrisTetraPolin  
UPF1: UP Frameshift suppressor 1  
UTR: UnTranslated Region  
VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor  
WT: Wild Type  
Xrn1: eXoribonuclease 1

## Remerciements

Mes plus profonds remerciements vont au Dr Philippe Roux. Je te remercie Philippe d'avoir accepté de diriger mon travail de thèse et de m'avoir soutenue et encouragée tout au long de mon cheminement en vue de l'obtention de mon doctorat. Évoluer à tes côtés fut une expérience très enrichissante. J'ai pu grâce à toi m'émanciper progressivement dans mes démarches scientifiques et dans l'élaboration des expériences. Je te remercie pour la confiance que tu m'as accordée tout au long de l'évolution de ce travail. Merci de m'avoir permis de participer à nombreux colloques scientifiques nationaux et internationaux. Merci de m'avoir permis de me diversifier en évoluant sur plusieurs projets et en participant à des collaborations avec d'autres équipes. Enfin, je te remercie de m'avoir transmis tes connaissances et ta rigueur scientifiques. Pour toutes ces raisons, je t'adresse ma plus sincère reconnaissance.

Je remercie Audrey Carrière et Joseph Johnny Tcherkezian pour m'avoir encadrée et soutenue pendant ma thèse et pour m'avoir permis de contribuer à l'avancement de leurs projets.

Je remercie chaleureusement les membres passés et présents du laboratoire pour leurs aides tant techniques qu'intellectuelles et pour avoir contribué à mon apprentissage, chacun à leur manière. Je remercie plus particulièrement Louis, Jacob Tortilla, Yves, Yasmine, Julie, Alexia, Wayne, Jérôme et Tic Tac pour m'avoir supportée pendant toutes ces années et pour avoir égayé mes journées au laboratoire.

Je tiens à remercier les Fonds de Recherche du Québec en Santé, la Fondation Cole ainsi que les programmes de Biologie Moléculaire de l'Université de Montréal pour avoir financé mon travail de thèse.

Finalement je tiens à remercier les membres de mon jury pour avoir accepté d'évaluer cette thèse ainsi que Dr Luc Desgroseillers et Dr Marc Therrien pour leurs commentaires positifs et leurs remarques constructives lors de mes comités de suivi.

## Avant-propos

La synthèse protéique est fondamentale pour le fonctionnement de la cellule et de l'organisme. Les protéines catalysent la plupart des réactions biochimiques dans la cellule, agissent en tant qu'éléments de structure et de régulation et contribuent à tous les aspects de la machinerie macromoléculaire dont dépend la vie. La synthèse protéique est l'étape ultime de l'expression des gènes et correspond à la traduction de l'information génétique, portée par les ARN messagers (ARNm), en polypeptides, processus exécuté par les ribosomes et les ARN de transfert (ARNt). L'importance de la traduction des ARNm est soulignée par la part énorme des ressources de la cellule consacrée à la synthèse des composants de la machinerie traductionnelle et au processus de traduction. En effet celle-ci représente la plus grande dépense énergétique de la cellule (Warner 1999). Les ARN ribosomiques (ARNr) et les ARNt, qui sont codés par environ 900 gènes chez l'homme, représentent plus de 95% des ARN totaux dans la cellule, et parmi les ARNm, environ un tiers codent pour les protéines ribosomiques (qui représentent seulement 1% du génome). Il est maintenant bien établi que la régulation de l'expression des gènes dépend en grande partie des événements post-transcriptionnels, et que la traduction tient un rôle majeur dans cette régulation (Schwanhausser et al. 2011). Afin de fonctionner correctement, la cellule doit synthétiser des protéines au bon moment, au bon endroit et dans les bonnes proportions. En effet, une synthèse non nécessaire de protéine épuise les stocks de nutriments et acides aminés, alors qu'une synthèse insuffisante perturbe l'homéostasie ainsi que la croissance cellulaire et la prolifération. Comparé à la transcription, le contrôle au niveau de la traduction des ARNm est un moyen de changer plus directement et plus rapidement l'expression des protéines. Il devient alors assez clair que la traduction des ARNm est un processus hautement contrôlé dont la dérégulation est associée à de nombreuses pathologies, dont le cancer.

Chez les eucaryotes, la traduction s'effectue en quatre étapes distinctes : l'initiation, l'élongation, la terminaison et le recyclage des ribosomes. L'initiation permet le recrutement de la sous-unité 40S du ribosome au transcrit, son positionnement au codon d'initiation et la formation du ribosome fonctionnel; l'élongation correspond à l'étape de synthèse du polypeptide par l'ajout des acides aminés apportés par les ARNt et la terminaison se fait lors

de la reconnaissance du codon stop sur l'ARNm par le ribosome, conduisant au relargage du polypeptide nouvellement synthétisé. Finalement le recyclage des ribosomes représente le désassemblage des sous-unités 40S et 60S du ribosome et de l'ARNm. Bien que toutes les étapes de la traduction soient hautement régulées, l'initiation est de loin l'étape la plus contrôlée et est à ce titre décrite comme l'étape limitante de la traduction (Sonenberg and Hinnebusch 2009; Jackson et al. 2010). De nombreux stimuli tels que le stress environnemental (choc thermique et rayonnements UV), les signaux extracellulaires (nutriments, hormones et facteurs de croissance) et intracellulaires (statut énergétique de la cellule et disponibilité intracellulaire en acide aminé) induisent des changements considérables, autant sur le plan qualitatif que quantitatif, sur le translatome, c'est-à-dire la fraction des ARNm totaux qui sont engagés activement dans la traduction (Wek et al. 2006; Ma and Blenis 2009; Sonenberg and Hinnebusch 2009). En effet, la régulation de la traduction influence la synthèse protéique globale mais peut également agir de façon sélective en contrôlant la traduction de certaines classes de transcrits. Ceci est rendu possible par la présence de caractéristiques structurelles spécifiques dans l'ARNm et par les altérations de l'expression ou de modifications post-traductionnelles (PTM : Post-Translational Modifications) de protéines de liaisons à l'ARN. Ces changements sont orchestrés par des voies de signalisation qui phosphorylent des facteurs d'initiation ainsi que des régulateurs de la traduction et modulent leur activité (Spriggs et al. 2010; Roux and Topisirovic 2012).

Finalement la localisation d'ARNm à des sites spécifiques du cytoplasme permet également de contrôler l'expression de certains transcrits dans le temps (lors des étapes du développement embryonnaire par exemple) et dans l'espace (distribution asymétrique dans les cellules polarisées). C'est le cas des ARNm présents dans les sites de stockage et de dégradation des ARNm appelés Processing-Bodies (P-Bodies) qui concentrent des ARNm non traduits et des facteurs impliqués dans la dégradation des ARN.

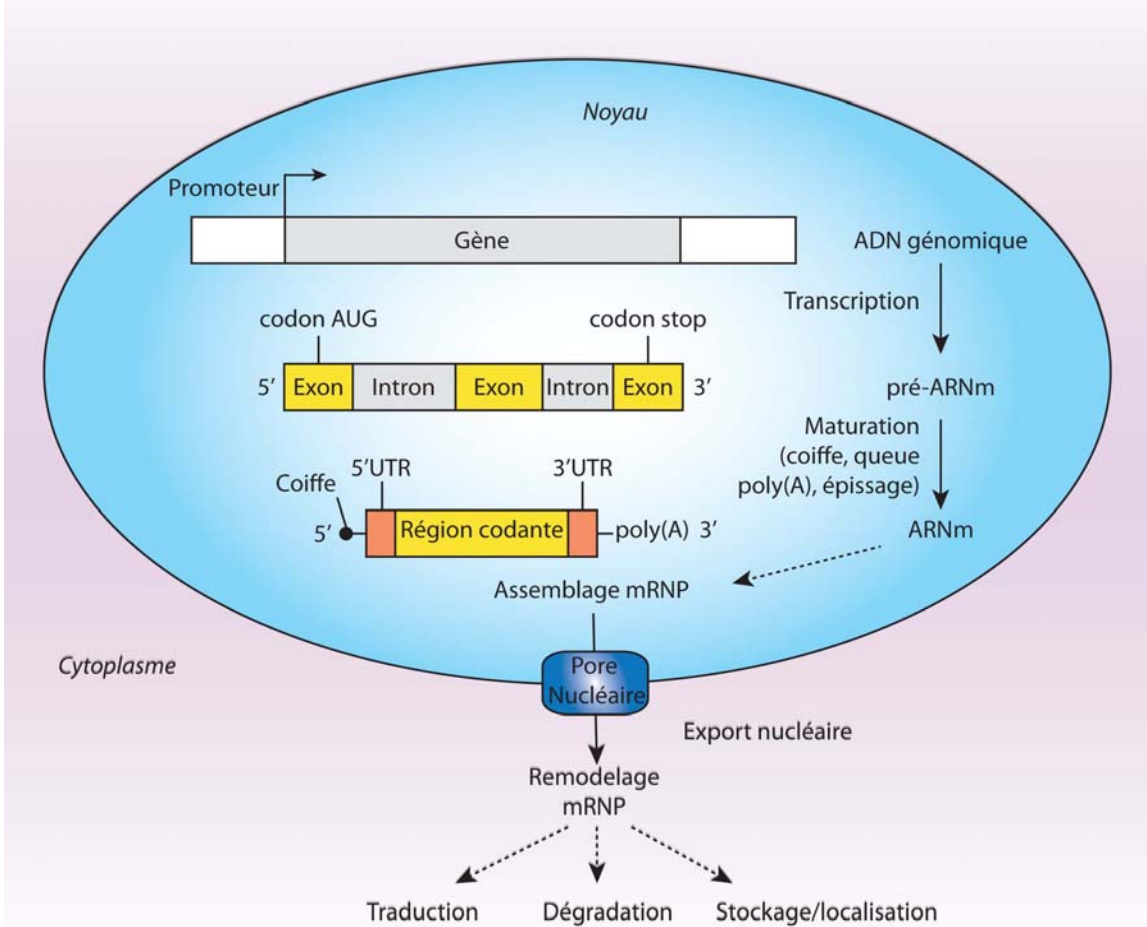
# Chapitre 1 : Introduction

## 1. Mécanismes de contrôle de l'expression génique dans le cytoplasme

Après leur synthèse dans le noyau par l'ARN polymérase II, les transcrits primaires (également appelés pré-ARNm) subissent plusieurs modifications co-transcriptionnelles qui conduisent à leur maturation avant d'être transportés dans le cytoplasme et d'y être traduits. Dès le début de la synthèse du transcrit, l'extrémité 5' du pré-ARNm est modifiée par l'ajout d'une guanosine triphosphate méthylée en position N7 ( $m^7GTP$ ) qui constitue la coiffe. Les introns (régions non codantes) des pré-ARNm sont excisés lors de l'épissage ce qui forme un transcrit avec un cadre de lecture ouvert (ORF, Open Reading Frame). Finalement, l'extrémité 3' est clivée et reçoit une queue de polyadénosines (appelée queue poly(A)). Parallèlement à ces modifications du transcrit, les ARNm sont compactés et assemblés avec des protéines de transport nucléaire et forment des particules ribonucléoprotéiques (mRNP messenger RiboNucleoParticule) (Figure 1). Cet assemblage permet de prévenir l'appariement de l'ARNm avec l'ADN nouvellement transcrit et facilite son export par le complexe du pore nucléaire (NPC, nuclear pore complex). Toutes ces étapes sont dépendantes les unes des autres et sont finement couplées à la transcription (Moore and Proudfoot 2009).

L'ARNm cytoplasmique mature est donc composé de plusieurs caractéristiques spécifiques que sont la coiffe, la région non traduite en 5' (5'UTR, UnTranslated Region), la région codante, la région non traduite en 3' (3'UTR) et la queue poly(A). Les structures primaires et secondaires présentes dans le 5' et 3'UTR sont reconnues par des protéines de liaison à l'ARN (RBP :RNA Binding Protein) et leur combinaison spécifique dicte les événements que va subir l'ARNm et détermine son devenir dans le cytoplasme, à savoir la traduction, le stockage et la dégradation (McCarthy and Kollmus 1995; Keene and Tenenbaum 2002).





### **Figure 1: Maturation des ARNm**

*La transcription des gènes dans le noyau conduit à la synthèse d'un pré-ARNm composé d'exons et d'introns. Au cours de la transcription le pré-ARNm est mûré par l'ajout d'une coiffe en 5', par l'épissage des introns et l'ajout de la queue poly(A) lorsque l'ARN polymérase II a fini la transcription. L'ARNm alors produit est mature et va être associé à des protéines formant une particule ribonucléoprotéique (mRNP) prise en charge par le pore nucléaire pour permettre le transport de l'ARNm dans le cytoplasme. Une fois dans le cytoplasme les mRNP sont remodelées et l'association de nouvelles protéines va orienter l'ARNm vers la traduction, le stockage ou la dégradation.*

## 1.1. Traduction dépendante de la coiffe des ARNm chez les eucaryotes

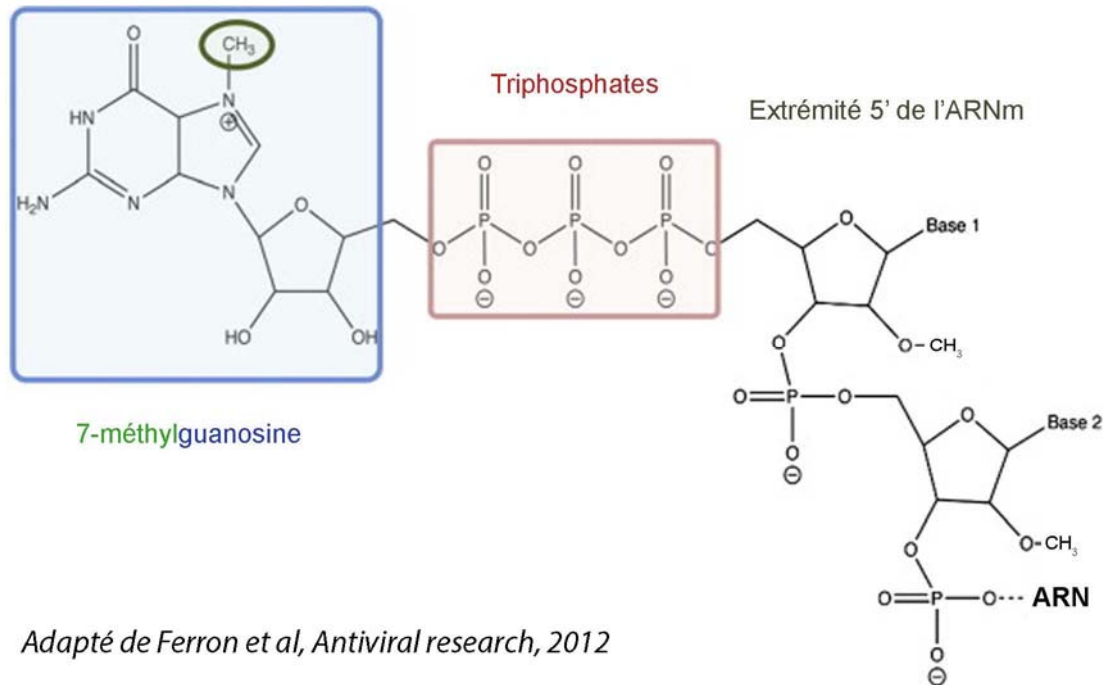
### 1.1.1. Éléments *cis* de l'ARNm influant sur la traduction

La régulation de l'initiation de la traduction requiert plusieurs éléments localisés au sein de la séquence des ARNm. Ces éléments en *cis* dictent la voie et le site de recrutement du ribosome sur l'ARNm, et de ce fait, leur perturbation influe sur l'efficacité et la fidélité de la traduction. Le rôle des éléments qui contrôlent la traduction dépendante de la coiffe est décrit dans les paragraphes qui suivent.

#### 1.1.1.1. La coiffe des ARNm

La coiffe joue un rôle crucial dans le métabolisme des ARNm. Elle est présente chez les eucaryotes mais aussi dans certains ARN viraux et est essentielle pour l'épissage, l'export, la stabilité et l'initiation de la traduction (Topisirovic et al. 2011). La coiffe, qui est une guanosine méthylée en position 7 ( $m^7GTP$ ), est ajoutée à l'extrémité 5' du transcrit nouvellement synthétisé lorsque celui-ci atteint 20-25 nucléotides par une série de trois réactions enzymatiques coordonnées par le recrutement séquentiel des enzymes de coiffage par le domaine C-terminal (CTD, C-terminal domain) de l'ARN polymérase II (Shatkin and Manley 2000; Ferron et al. 2012).

Les deux premières étapes du coiffage sont réalisées par l'enzyme bi-fonctionnelle MCE1 (mRNA-capping enzyme 1) qui possède à la fois une activité ARN triphosphatase (RTase) et guanyltransférase (GTase). Tout d'abord, le phosphate ( $\gamma$ ) situé sur le premier nucléotide du pré-ARNm est hydrolysé par le domaine RTase de MCE1. S'ensuit le transfert d'une guanosine monophosphate (GMP) sur l'extrémité diphosphate en 5' du pré-ARNm par le domaine GTase de MCE1 qui produit la structure GpppN où p représente un phosphate, G la guanosine et N le premier nucléotide du transcrit (Yamada-Okabe et al., 1998). Finalement la guanosine est méthylée en position N7 par l'ARN (guanine-N7-) méthyltransférase (RNMT) pour former la structure complète de la coiffe, le  $m^7GTP$  (Figure 2) (Shuman 2002).



**Figure 2: Structure de la coiffe**

La structure coiffe (fond bleu) est composée d'un résidu guanosine méthylé en position N7 (encerclé en vert) qui est lié par une liaison 5'-5' triphosphate (cadre rose) au premier nucléotide en 5' de l'ARNm. Figure issue de (Ferron et al. 2012).

La coiffe tient un rôle important dans différents aspects du métabolisme des ARNm. Dans le noyau, la coiffe est reconnue par le complexe de liaison à la coiffe composé de CBP20 et CBP80 (CBP : cap binding protein) qui est requis pour l'épissage, l'export et le programme de surveillance de l'ARNm NMD (NMD : Nonsense Mediated Decay) qui conduit à la dégradation des ARNm comportant un codon stop prématuré (Kervestin and Jacobson 2012). Une fois dans le cytoplasme, CBP20 et CBP80 sont remplacés par le facteur d'initiation de la traduction eIF4E (eukaryotic Initiation Factor 4E) qui stimule la traduction et empêche la dégradation du transcrit en prévenant la liaison des enzymes de décoiffage Dcp1 et Dcp2 (Gu and Lima 2005).

### 1.1.1.2. La région 5'UTR

#### 1.1.1.2.1. Caractéristiques générales

La région comprise entre la coiffe et le codon d'initiation de la traduction est seulement balayée par le ribosome et est de ce fait décrite comme la région non traduite en 5' ou 5'UTR. Néanmoins, cette séquence influence grandement l'efficacité de traduction d'un ARNm donné grâce à ses éléments structuraux agissant en *cis* et par le recrutement d'éléments *trans*. Chez l'homme, la longueur moyenne du 5'UTR est de 210 nucléotides avec des extrêmes allant de 20 à 2800 nucléotides (Pesole et al. 2001). De manière générale, plus le 5'UTR est court, plus l'efficacité de traduction de l'ARNm est grande (Kozak 1987a). En effet les ARNm possédant des 5'UTR de 20 à 50 nucléotides sont les mieux initiés tandis que les UTR de moins de 12 nucléotides ne permettent pas une initiation efficace (Kozak 1991). De plus, les 5'UTR longs ont tendance à former des structures secondaires qui peuvent faire obstacle au ribosome et aux facteurs d'initiation lors de l'étape du balayage de l'ARNm. Les effets inhibiteurs de ces structures secondaires, introduites dans les régions 5'UTR des ARNm, dépendent de leur stabilité et de leur position (Pelletier and Sonenberg 1985; Kozak 1986; Kozak 1989).

#### 1.1.1.2.2. Contexte du codon d'initiation

Dans le cas des ARNm dont la traduction est dépendante de la coiffe, le codon initiateur est localisé dans une séquence favorable appelée séquence Kozak. Celle-ci est définie selon le consensus suivant : GCC(A/G)CCAAUGG avec une préférence nette pour une purine en -3 et un G en +4 du premier nucléotide du codon initiateur (Kozak 1987a; Kozak 1987b). Cette séquence permet de stabiliser la sous-unité 40S du ribosome à proximité du codon initiateur et permet une reconnaissance optimale de l'ARNt-met sur le codon. La position du codon initiateur AUG par rapport aux autres AUG est également importante. En effet, la traduction est préférentiellement initiée sur le premier codon initiateur compris dans un environnement favorable, sauf si celui-ci est localisé dans les 12 premiers nucléotides de l'ARNm (Kozak 1991).

#### 1.1.1.2.3. Séquence TOP

Un autre élément important des ARNm dans le contrôle de la traduction est la présence d'une séquence TOP (Terminal Oligopyrimidine Tract) localisée juste en aval de la coiffe.

Elle consiste en une succession ininterrompue de 4 à 14 bases pyrimidiques commençant par une cytosine et se retrouve dans les transcrits codant pour les protéines ribosomiques et pour les facteurs de la machinerie traductionnelle (Meyuhas 2000). La traduction des ARNm possédant une séquence TOP est sensible aux conditions de stress et de croissance cellulaire et répond à un phénomène de tout-ou-rien. En mitose ou lors de stress comme en l'absence de nutriments ou de facteurs de croissance, c'est-à-dire lorsque la traduction est réprimée, leur traduction est complètement abolie et, à l'inverse, est stimulée et optimale en condition de croissance cellulaire (Levy et al. 1991; Avni et al. 1997). Afin d'expliquer le contrôle sélectif de la traduction des ARNm TOP, l'existence de facteurs additionnels aux facteurs d'initiation qui reconnaîtraient directement la séquence TOP a été proposée (Gentilella and Thomas 2012). Ainsi les protéines TIA1 (T-cell-restricted Intracellular Antigen-1) et AUF1 (AU-rich element RNA-binding protein 1) ont été impliquées dans la répression de la traduction des ARNm TOP tandis que LA (La Antigen), qui appartient à la famille des protéines de liaison à l'ARN LARP (LA-Related Protein), interviendrait positivement dans leur traduction (Crosio et al. 2000; Cardinali et al. 2003; Kakegawa et al. 2007; Damgaard and Lykke-Andersen 2011). Finalement la kinase mTOR (mammalian Target Of Rapamycin) participe au contrôle de la traduction des ARNm comportant une séquence TOP mais les mécanismes moléculaires contribuant à cet effet ne sont pas connus (Jefferies et al. 1994).

#### 1.1.1.2.4. Structures secondaires : IRES

La région 5'UTR peut également contenir des séquences IRES (Internal Ribosome Entry Site) qui forment des structures secondaires complexes et permettent le recrutement du ribosome sur le transcrit indépendamment de certains facteurs et mécanismes de l'initiation de la traduction classique. Dans ce cas on parle de traduction indépendante de la coiffe car le facteur d'initiation eIF4E n'est pas requis pour la traduction de ces ARNm. Ces séquences, initialement identifiées dans les ARNm viraux (Pelletier and Sonenberg 1988), sont présentes dans de nombreux ARNm cellulaires bien que ceux-ci possèdent une coiffe. La plupart des IRES se retrouvent dans des ARNm qui codent pour des protéines impliquées dans le contrôle de la croissance et de la prolifération et dans la réponse au stress et à l'apoptose (Stoneley and Willis 2004). Ces éléments IRES permettent de s'assurer que la traduction est maintenue pour les transcrits les contenant même lorsque la traduction dépendante de la coiffe est inhibée, par

exemple lors de la mitose (Pyronnet et al. 2000), de l'apoptose (Holcik and Korneluk 2000) ou lors de stress cellulaire comme l'hypoxie (Stein et al. 1998) et l'insuffisance en acides aminés (Fernandez et al. 2001).

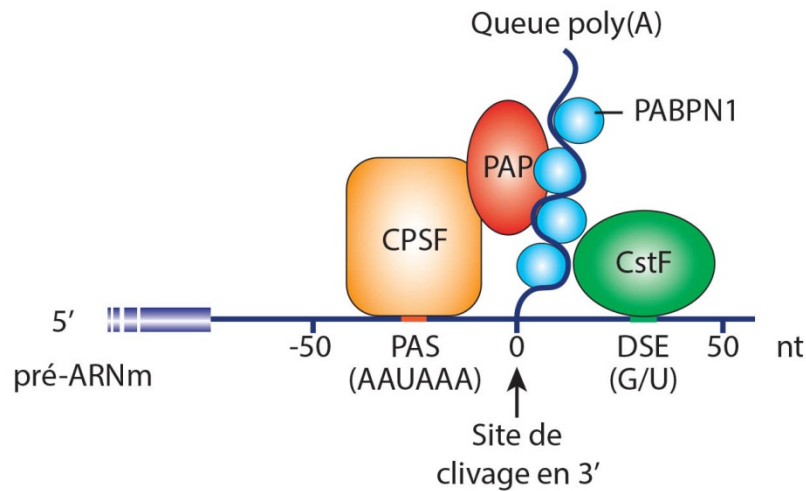
#### 1.1.1.3. La région 3'UTR

La région 3'UTR correspond à la partie de l'ARNm qui suit le codon stop et qui inclue la queue poly(A). Contrairement à la région non codante en 5', la région 3'UTR est plus longue, avec une longueur moyenne de 1000 nucléotides pouvant atteindre jusque 8500 nucléotides (Pesole et al. 2001). Elle présente de nombreux éléments agissant dans la régulation de la traduction, de la localisation et de la stabilité de l'ARNm. En effet la longueur de la queue poly(A), l'élément de polyadénylation cytoplasmique (CPE : Cytoplasmic Polyadenylation Element), et la présence de séquences régulatrices en *cis* reconnues par des protéines *trans*-régulatrices interviennent dans ces mécanismes. À l'exception de la protéine de liaison de la queue poly(A) (PABP : Poly(A) Binding Protein) qui stimule la traduction, la reconnaissance des éléments *cis* de la région 3'UTR par les protéines régulatrices réprime la traduction des transcrits et/ou stimule leur dégradation. C'est le cas des séquences ARE (AU-Rich Elements) présentes dans les transcrits codant pour des proto-oncogènes (c-myc, c-fos et c-jun) et cytokines (GM-CSF, IL3) qui stimulent la dégradation rapide des ARNm (Schoenberg and Maquat 2012).

De plus la région 3'UTR est la cible de régulation par les micro-ARNs qui contrôlent l'expression de presque 50% des gènes chez l'homme. Les micro-ARNs sont des petits ARN non-codant de 21 à 23 nucléotides, résultant du clivage d'un précurseur pré-miARN par les enzymes Drosha et Dicer (Di Leva et al. 2013). Dans le cytoplasme, ils sont associés aux protéines Argonautes (AGO) et forment le complexe RISC (RNA-induced Silencing Complex). Le miRNA reconnaît une séquence présente dans la région 3'UTR de l'ARNm cible et dirige ainsi le complexe RISC au transcrit. Il s'ensuit la répression de l'ARNm par deux mécanismes que sont l'inhibition de la traduction et la déstabilisation/dégradation des ARNm. Il a été suggéré que la complémentarité entre le micro-ARN et l'ARNm déterminerait le mode de répression emprunté à savoir que la complémentarité imparfaite induirait le blocage de la traduction tandis que l'appariement parfait conduirait quant à lui à la dégradation du transcrit (Krol et al. 2010).

#### 1.1.1.4. La queue poly(A)

À l'exception des ARNm codant pour les histones, tous les transcrits de l'ARN polymérase II contiennent une chaîne d'adénosines (entre 200 et 300) à leur extrémité 3' avant la terminaison de la transcription. L'ajout de la queue poly(A) a lieu dans le noyau lors de la maturation des pré-ARNm et requiert deux réactions enzymatiques successives qui correspondent à un clivage endonucleolytique couplé à une polymérisation de résidus adénosine. Contrairement à la synthèse de la coiffe qui nécessite seulement deux enzymes, la synthèse de la queue poly(A) est orchestrée par la liaison de plusieurs complexes protéiques sur des éléments spécifiques présents dans le 3'UTR. La localisation du site poly(A) est déterminée par deux séquences de part et d'autre du site poly(A), le signal de polyadénylation (PAS) AAUAAA situé de 10 à 30 nucléotides en amont du site de clivage, et la séquence riche en G/U, appelée DSE (Downstream Sequence Element), située 10 à 30 nucléotides en aval. L'hexanucléotide AAUAAA est reconnu par le facteur de clivage et de polyadénylation CPSF (Cleavage and Polyadenylation Specificity Factor) (Bienroth et al. 1991) et le DSE est lié par le facteur de stimulation du clivage CstF (Cleavage stimulating Factor) (MacDonald et al. 1994) qui comme son nom l'indique stimule le clivage du transcrit par le complexe CPSF. Une fois l'extrémité 3' clivée, la PAP (Poly(A) Polymerase), qui est recrutée par le complexe CPSF, catalyse l'ajout d'environ 200 à 300 résidus adénosines qui sont liés par la protéine PABPN1 (Figure 3) (Nuclear Poly(A) Binding Protein 1) (Danckwardt et al. 2008; Yang and Double 2011).



Adapté de Elkon et al, Nature Review Genetics, 2013

### **Figure 3: Machinerie de clivage et de polyadénylation**

*Le clivage et la polyadénylation de l'extrémité 3' des ARNm requièrent l'action des facteurs CPSF (en orange) et CstF (en vert) qui reconnaissent respectivement des éléments primaires de séquence situés en amont et en aval du site de clivage appelés PAS et DES. L'addition de la queue poly(A) est catalysée par la PAP (en rouge) et permet le recrutement des protéines PABPN1 (en bleu) qui protègent l'extrémité 3' du transcrit. Figure adaptée d'après (Elkon et al. 2013).*

Dans le cytoplasme, la protéine PABPN1 est échangée pour la protéine cytoplasmique PABP qui interagit avec le facteur d'initiation de la traduction eIF4G et permet la circularisation de l'ARNm nécessaire pour la traduction (Wells et al. 1998). Cette conformation facilite le recyclage des ribosomes et leur ré-initiation (Sachs and Varani 2000). La queue poly(A) tient un rôle important dans l'expression des gènes en intervenant à différents niveaux, elle est requise pour l'épissage et l'export des ARNm (Hilleren et al. 2001), elle protège les transcrits de la dégradation et comme mentionné précédemment elle stimule l'initiation de la traduction.



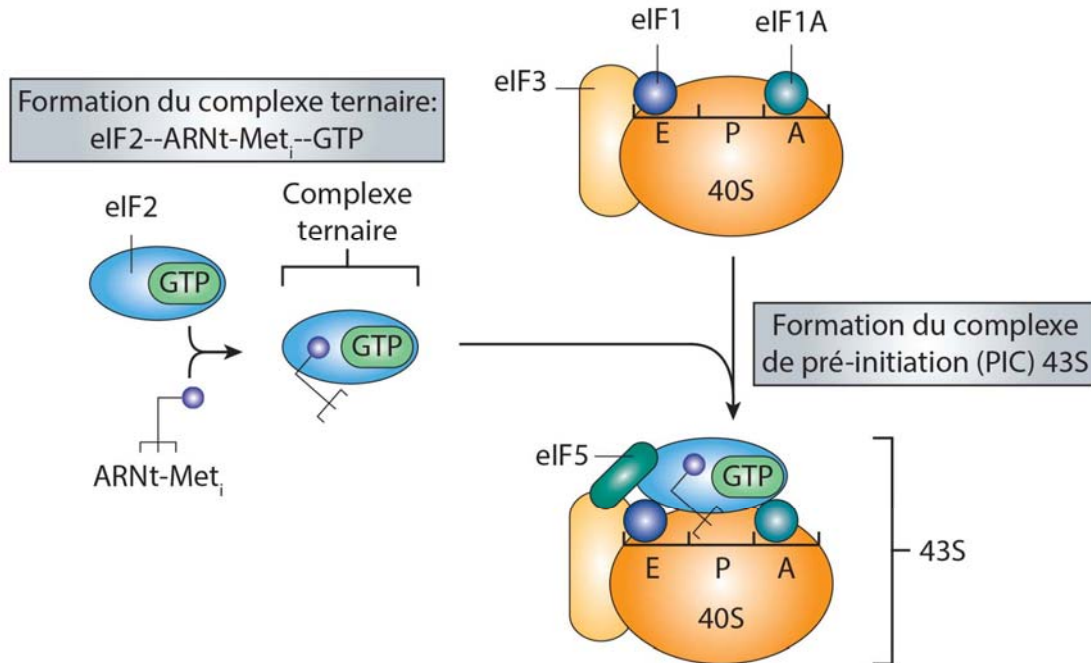
### 1.1.2. Initiation de la traduction

L'initiation de la traduction est le processus qui consiste en l'assemblage du ribosome fonctionnel, compétent pour l'élongation, le 80S. Elle fait intervenir au moins neuf facteurs d'initiation composés de quelques 30 sous-unités et comprend trois étapes : l'activation du transcrit par son association au complexe d'initiation eIF4F, la liaison du complexe de pré-initiation (PIC : Pre-Initiation Complex) 43S sur le transcrit et son alignement au codon d'initiation, et l'association de la sous-unité 60S à celui-ci. Dans la majorité des cas, la liaison du PIC a lieu à la coiffe et requiert le complexe eIF4F, on parle alors de traduction dépendante de la coiffe. Le recrutement du 43S peut également se faire indépendamment d'eIF4F et fait intervenir des structures secondaires du 5'UTR, les IRES (voir section 1.1.1.2). Les mécanismes de traduction dépendante des IRES ne sont pas d'intérêt dans cette thèse et ne sont donc pas décrits.

#### 1.1.2.1. Assemblage du complexe de pré-initiation

L'initiation de la traduction commence avec l'assemblage du PIC qui est composé de la petite sous-unité du ribosome (40S), de l'ARNt-met initiateur et des facteurs d'initiation eIF1, eIF1A, eIF3 et eIF5. L'ARNt-met initiateur lie avec une grande affinité le facteur d'initiation eIF2 lorsque celui-ci est associé au GTP et forme le complexe ternaire (TC : Ternary Complex) (Kapp and Lorsch 2004). Le facteur eIF2 est composé de trois sous-unités :  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$ ; la sous-unité eIF2 $\gamma$  lie directement le GTP et l'ARNt-met et les sous-unités eIF2 $\alpha$  et eIF2 $\beta$  stabilisent la liaison de l'ARNt-met (Naveau et al. 2010). L'association du TC à la sous-unité 40S du ribosome nécessite l'action des facteurs eIF1, eIF1A, eIF3 et eIF5 formant ainsi le complexe 43S. Les facteurs eIF1 et eIF1A se lient respectivement à proximité du site peptidyl (P) et du site aminoacyl (A) et stabilisent la sous-unité 40S du ribosome dans une conformation permissive au chargement du TC tandis que le facteur eIF3 empêche l'association de la sous-unité 60S et maintient cette conformation (Figure 4) (Passmore et al. 2007; Jackson et al. 2010). Le facteur eIF5 interagit avec eIF2 $\beta$  et stimule l'activité GTPase d'eIF2 $\gamma$  lors de la reconnaissance du codon d'initiation (Paulin et al. 2001). Une fois le PIC formé, il est recruté à l'extrémité 5' de l'ARNm par le complexe d'initiation eIF4F. Ce

recrutement est assuré par la liaison d'eIF3 à eIF4G, une des sous-unités du complexe eIF4F (Aitken and Lorsch 2012).



Adapté de Jackson et al, Nature Review Molecular Cell Biology, 2010

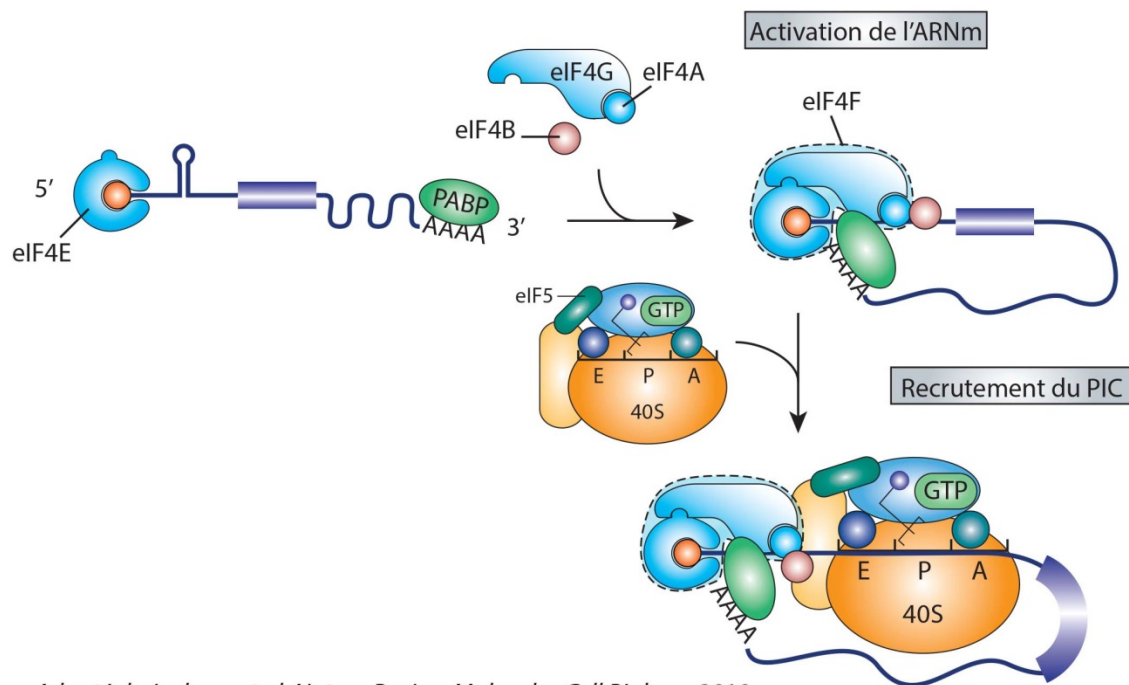
#### **Figure 4: Formation du complexe de pré-initiation**

Lors du recyclage des ribosomes, les facteurs d'initiation eIF1, eIF1A et eIF3 sont recrutés à la sous-unité 40S et préviennent une nouvelle association de la sous-unité 60S. Le complexe ternaire (en bleu) est recruté à son tour à la sous-unité 40S du ribosome grâce à son interaction avec les facteurs eIF1, eIF1A et eIF3 et mène à la formation du complexe de pré-initiation 43S. Figure adaptée d'après (Jackson et al. 2010).

##### 1.1.2.2. Formation du complexe eIF4F et recrutement du ribosome

La grande majorité des ARNm possède des 5'UTR structurés qui nécessitent d'être déroulés pour permettre le recrutement du 43S et le balayage du transcrit. Ceci est rendu possible par l'action du complexe eIF4F, composé de trois polypeptides, eIF4A, eIF4E et eIF4G, chacun tenant un rôle crucial dans l'initiation de la traduction (Gingras et al. 1999b). eIF4E, la petite sous-unité du complexe eIF4F, reconnaît spécifiquement la coiffe en 5' des

ARNm (Sonenberg et al. 1978). C'est le facteur le moins abondant dans l'initiation et il est hautement régulé. eIF4A est une hélicase de l'ARN qui fait partie de la famille des protéines DEAD box (DEAD représente la séquence asp-glu-ala-asp conservée entre les membres de la famille) et dont l'activité dépend de l'ARN et de l'ATP. Son activité hélicase est stimulée par sa liaison avec eIF4G et eIF4B et permet le déroulement des structures du 5'UTR nécessaire au chargement du PIC (Marintchev 2013). eIF4G est une grosse protéine sur laquelle se lient de façon simultanée eIF4E, eIF4A, eIF3 et PABP. Elle assure la connexion de l'ARNm au ribosome par sa liaison avec eIF4E et eIF3 et de la coiffe à la queue poly(A) avec eIF4E et PABP qui permet de circulariser le transcrite et de faciliter l'initiation (Gingras et al. 1999b). Tout ce réseau d'interaction permet à eIF4G de coordonner l'assemblage de l'ARNm en particule ribonucléoprotéique circulaire stable communément décrite structure en boucle fermée (closed-loop) (Figure 5). Le recrutement du PIC à la coiffe des ARNm conduit à la formation du complexe d'initiation 48S et représente l'étape limitante de la traduction qui est la cible de nombreux mécanismes de contrôle traductionnel détaillés dans les sections suivantes (Figure 5) (Roux and Topisirovic 2012).



Adapté de Jackson et al, Nature Review Molecular Cell Biology, 2010

**Figure 5: Formation du complexe eIF4F et recrutement du PIC**

*L'assemblage du complexe d'initiation eIF4F à la coiffe de l'ARNm ainsi que l'interaction entre les protéines PABP et eIF4G permettent à l'ARNm d'adopter une conformation en boucle favorable au recrutement du PIC. Ce dernier s'associe à l'ARNm grâce à l'interaction entre eIF3 et eIF4G et mène à la formation du complexe 48S qui peut alors assurer le balayage de la région 5'UTR. Figure adaptée d'après (Jackson et al. 2010).*

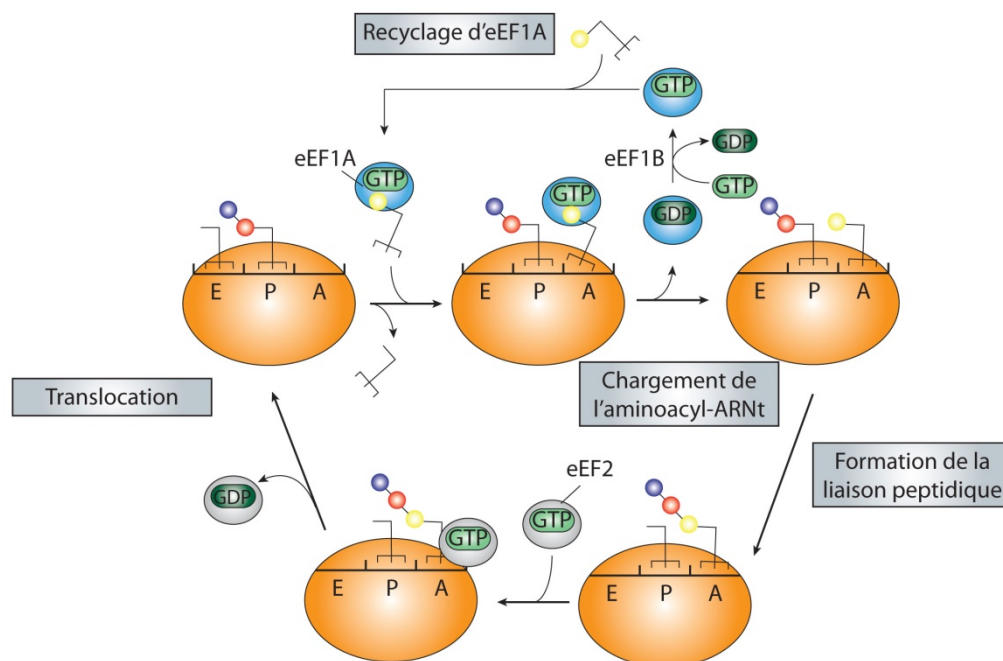
### 1.1.2.3. Reconnaissance du codon d'initiation

Une fois lié à la coiffe, le complexe d'initiation balaye l'ARNm dans le sens 5'→3' jusqu'à ce que le codon initiateur AUG se retrouve au niveau du site peptidyl de la sous-unité 40S du ribosome. La complémentarité parfaite entre l'anticodon de l'ARNt-met et le codon AUG induit le relargage du facteur eIF1 et indique la fin du balayage (Maag et al. 2005). Le groupement phosphate provenant de l'hydrolyse du GTP lié à eIF2 en GDP+Pi lors du balayage est relargué et mène à la formation du complexe d'initiation 48S stable. L'hydrolyse du GTP par eIF2 est dépendante du facteur eIF5 qui exerce une activité GAP (GTPase Activating Protein) sur eIF2. Lorsqu'associé au GDP, celui-ci a une faible affinité pour l'ARNt-met et est dissocié du complexe ternaire. Afin de permettre à nouveau l'initiation, le facteur eIF2B, qui possède une activité GEF (Guanine nucleotide Exchange Factor) échange le GDP lié à eIF2 pour le GTP et permet la formation d'un nouveau complexe ternaire. La phosphorylation d'eIF2 $\alpha$  sur la sérine 51 par différentes kinases inhibe l'activité d'eIF2B et représente le mécanisme majeur d'inhibition de la traduction en condition de stress. Une fois le complexe 48S formé, le facteur eIF5B est recruté et permet la liaison de la sous-unité 60S du ribosome et la formation du complexe 80S (Hinnebusch 2011). L'élongation peut alors commencer.

### 1.1.3. Élongation de la traduction

La liaison de la sous-unité 60S du ribosome au complexe 48S marque la fin de l'initiation et le début de la synthèse du peptide. Le ribosome compétent pour l'élongation présente 3 sites de liaison pour l'ARNt : le site A (pour Aminoacyl) dans lequel se fixe le complexe aminoacyl-ARNt porteur de l'acide aminé en attente d'être lié à la chaîne polypeptidique, le site P (pour Peptidyl) occupé par l'ARNt porteur de la chaîne peptidique et le site E (pour Exit) qui reçoit l'ARNt déacylé. La phase d'élongation est un processus

hautement conservé entre les procaryotes et les eucaryotes qui est composé de la répétition de 3 étapes que sont la sélection de l'ARNt avec l'appariement du codon et de l'anticodon de l'aminoacyl-ARNt, la formation de la liaison peptidique et la translocation de l'ARNm et de l'ARNt (Dever and Green 2012). La première étape implique la liaison d'un complexe ternaire, composé de l'aminoacyl-ARNt, du facteur d'élongation eEF1 et du GTP, au site A du ribosome. Lorsque l'interaction codon/anticodon, qui permet de sélectionner l'aminoacyl-ARNt adéquat, est optimale, la conformation du ribosome change et conduit à l'hydrolyse du GTP par eEF1A suivie de la dissociation d'eEF1A-GDP du site A. La réactivation d'eEF1A est assurée par eEF1B qui stimule l'échange du GDP pour le GTP et permet la formation d'un nouveau complexe eEF1A-GTP-aminoacyl-ARNt.



Adapté de Li et al, *Microbiology and Molecular Biology Rev*, 2013

### **Figure 6: Étapes de l'élongation de la traduction chez les eucaryotes**

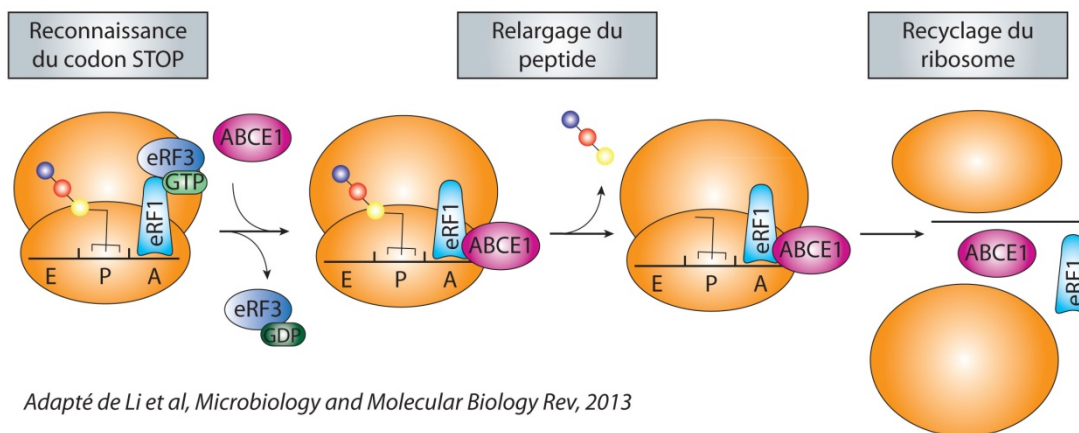
*La reconnaissance du bon aminoacyl-ARNt grâce à l'appariement codon/anti-codon induit l'hydrolyse du GTP par eEF1A et positionne l'aminoacyl-ARNt correctement dans le site A. La liaison peptidique est catalysée rapidement et la translocation qui nécessite l'action du*

*facteur eEF2 peut alors avoir lieu. Pour plus de clarté la sous-unité 60S du ribosome n'est pas représentée. Figure adaptée d'après (Dever and Green 2012).*

Une fois l'aminoacyl-ARNt localisé dans le site A du ribosome, la formation de la liaison peptidique a lieu rapidement. La liaison covalente du peptide porté par l'ARNt du site P sur l'acide aminé associé à l'ARNt présent dans le site A est catalysée par le site actif du ribosome appelé PTC (Peptidyl Transferase Center) qui est composé d'éléments conservés des ARNr de la grande sous-unité du ribosome. La translocation de l'ARNt déacylé au site E et de l'ARNt lié au peptide au site P peut alors avoir lieu et implique la formation d'une conformation hybride E/P et A/P des ARNt suivie de l'action du facteur l'élongation eEF2. Ce dernier stabilise cet état hybride et permet l'apport d'énergie nécessaire à la translocation par l'hydrolyse et la dissociation du GTP. Suite à la translocation, le site E est occupé par un ARNt-déacylé, le site P par l'ARNt couplé au peptide et le site A est vacant. Le ribosome est alors prêt pour un autre cycle d'élongation avec le relargage de l'ARNt du site E et la liaison du complexe eEF1-aminoacyl-ARNt-GTP adéquat au site A (Figure 6) (Ramakrishnan 2002).

#### 1.1.4. Terminaison de la traduction et recyclage des ribosomes

Le processus de terminaison commence avec la reconnaissance d'un codon stop (UGA, UAA ou UAG) par le ribosome dans le site A et termine avec l'hydrolyse et la dissociation du peptide nouvellement synthétisé de l'ARNt ainsi qu'avec le relargage du transcrit. La terminaison chez les eucaryotes est catalysée par deux facteurs, eRF1 (eukaryotic Release Factor 1) et eRF3 qui forment un complexe ternaire avec le GTP et lient le site A du ribosome (Frolova et al. 1996). Le facteur eRF1 est responsable de la reconnaissance du codon stop et de l'hydrolyse de l'ARNt couplé au peptide, tandis que eRF3, une GTPase dépendante du ribosome, stimule, grâce à l'hydrolyse du GTP, le relargage du peptide par eRF1 (Alkalaeva et al. 2006). Suite à l'hydrolyse du GTP, le facteur eRF3 est dissocié et laisse un complexe, composé du ribosome, d'eRF1 et de l'ARNt, prêt à être recyclé (Figure 7) (Jackson et al. 2012).



### **Figure 7: Étapes de la terminaison de la traduction et du recyclage des ribosomes**

*Le complexe eRF1-eRF3-GTP s'associe au site A lors de la reconnaissance d'un codon STOP. L'hydrolyse du GTP par eRF3 s'accompagne de son relargage et de celui du peptide. La protéine ABCE1 est recrutée au ribosome et assure la dissociation des sous-unités 40S et 60S. Figure adaptée d'après (Dever and Green 2012).*

Les sous-unités du ribosome doivent alors être dissociées, l'ARNm et l'ARNt relâchés pour régénérer les composants nécessaires à de nouveaux cycles de traduction. Le recyclage du ribosome requiert la présence d'eRF1 au site A et l'action de l'ATPase ABCE1 pour dissocier les sous-unités 60S et 40S (Figure 7). L'énergie résultant de l'hydrolyse d'ATP par ABCE1 est convertie en énergie mécanique pour permettre la séparation des sous-unités du ribosome (Pisarev et al. 2010; Barthelme et al. 2011). La sous-unité 40S est toujours associée à l'ARNt-déacylé ainsi qu'à l'ARNm, et le relargage de ces derniers est assuré par les facteurs d'initiation eIF1 et eIF1A qui permettent le détachement de l'ARNt du site P, et par eIF3 qui permet de dissocier l'ARNm du 40S (Pisarev et al. 2007).

#### 1.2. Répression de la traduction et dégradation des ARNm

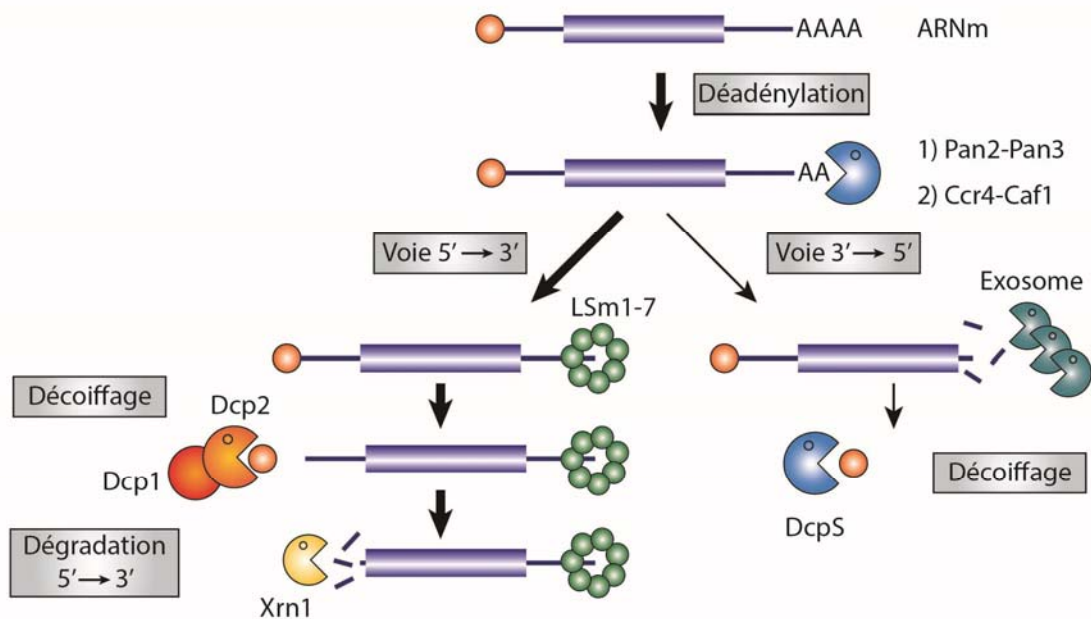
Tous les ARNm exportés dans le cytoplasme ne sont pas traduits immédiatement, certains sont maintenus dans un état réprimé alors que d'autres sont transportés à des sites spécifiques de la cellule pour y être ensuite traduits. D'autres encore sont soumis à des mécanismes de régulation et de contrôle de qualité qui induisent leur dégradation ou répriment

leur traduction. Les voies de surveillance des ARNm détectent des erreurs sur le transcrit lors de la traduction et induisent la dégradation de ceux-ci pour prévenir la synthèse de protéines dont l'expression pourrait potentiellement être délétère pour la cellule. La répression de la traduction et la dégradation des ARNm peuvent être stimulées par des protéines liant l'ARN et par des petits ARN non codants qui agissent de manière globale mais peuvent aussi réguler spécifiquement certains transcrits. Dans certains cas, la dégradation des ARNm est spatialement et fonctionnellement associée à des granules cytoplasmiques appelés processing bodies (P-Bodies) qui sont des sites d'accumulation de protéines impliquées dans le métabolisme des ARNm non traduits. Les mécanismes de contrôle de qualité, de répression traductionnelle ainsi que la dégradation constitutive et régulée des ARNm normaux participent activement à la régulation de l'expression des gènes et sont fortement connectés à la traduction.

#### 1.2.1. Mécanisme général de dégradation des ARNm

Chez les métazoaires, la machinerie de dégradation des ARNm consiste en cinq activités ribonucléolytiques dont l'utilisation combinatoire et ordonnée varie selon l'ARNm et les conditions cellulaires. Ces activités regroupent le clivage de la coiffe, la digestion exonucléolytique dans le sens 5' → 3', la déadénylation, la digestion exonucléolytique dans le sens 3' → 5' et finalement la digestion endonucléolytique (Schoenberg and Maquat 2012). La dégradation des ARNm est presque toujours initiée par le raccourcissement de la queue poly(A) suivie du clivage de la coiffe et de la dégradation du transcrit de l'extrémité 5' vers l'extrémité 3' (Figure 8). Dans le cytoplasme, les ARNm sont protégés de l'action d'exonucléases par la liaison des protéines eIF4E et PABP respectivement à la coiffe et à la queue poly(A). Par conséquent, pour initier la dégradation d'un ARNm, ces deux structures doivent être déstabilisées et la particule ribonucléoprotéique remaniée afin de déplacer eIF4E et PABP et de recruter les enzymes et activateurs de la dégradation.





Adapté de Garneau et al, Nature Review Molecular Cell Biology, 2007

### **Figure 8: Voie de dégradation générale des ARNm**

La dégradation de la majorité des ARNm commence par le raccourcissement de la queue poly(A). Cette dernière est hydrolysée successivement par deux complexes, Pan2-Pan3 puis Ccr4-Caf1. Lorsque la queue est suffisamment courte, le complexe LSM1-7 s'associe à l'extrémité 3' libre et stimule le clivage de la coiffe du transcrit par le complexe Dcp1-Dcp2. Cette hydrolyse expose l'extrémité 5' de l'ARNm à l'exoribonucléase Xrn1 qui dégrade alors le transcrit. Dans certains cas, l'ARNm déadénylé peut être dégradé depuis l'extrémité 3' par l'exosome et la coiffe restante hydrolysée par l'enzyme DcpS (Decapping scavenger). Figure adaptée d'après (Garneau et al. 2007).

#### 1.2.1.1. Déadénylation des ARNm

Les voies majeures de la dégradation cytoplasmique des ARNm, c'est-à-dire la dégradation lente des ARNm stables, celles induites par les éléments riches en AU (AMD : ARE-mediated decay), les microARN et les codons stop précoces (NMD), débutent par le raccourcissement de la queue poly(A). Cette étape, appelée déadénylation, se déroule en deux phases et représente l'étape limitante de la dégradation des ARNm. Dans le cytoplasme, deux

complexes protéiques exercent une activité de déadénylation : les complexes Pan2/Pan3 (Poly(A) Nucleases 2/3) et Ccr4 (Carbon catabolite repressor protein 4)/Caf1 (Ccr4-associated factor 1) (Yamashita et al. 2005). Le complexe Pan2/Pan3 intervient dans les étapes précoces de déadénylation et permet le raccourcissement de la queue poly(A) de ~200 à ~110 nucléotides. Cette hydrolyse n'induit pas de déstabilisation du transcrit et celui-ci peut éventuellement être polyadénylé de nouveau ou, dans certains cas être stabilisé par des protéines spécifiques. Lors de la deuxième phase de déadénylation, le complexe Ccr4-Caf1 hydrolyse rapidement les nucléotides restants jusqu'à laisser quelques résidus adénosine (Figure 8). Cette étape s'accompagne de la déstabilisation du transcrit qui est rapidement dégradé dans le sens 5' → 3'. Il peut également être dégradé dans le sens 3' → 5' par l'exosome qui représente une voie mineure de dégradation induite par l'hydrolyse de la queue poly(A) (Chen and Shyu 2011).

#### 1.2.1.2. Décoiffage et dégradation de 5' en 3'

Lorsque la déadénylation est achevée, la queue oligo(A) restante devient trop courte pour permettre la circularisation du transcrit et stimuler la traduction. L'extrémité déadénylée de l'ARNm est liée par le complexe LSm 1-7 (Like-Sm1-7) qui permet le recrutement du complexe de décoiffage composé du cofacteur Dcp1 (Decapping protein 1) et de la sous-unité catalytique Dcp2 et stimule le clivage de la coiffe (Bouveret et al. 2000; Nissan et al. 2010). Cette dernière catalyse l'hydrolyse du m<sup>7</sup>GTP en m<sup>7</sup>GDP et génère un ARNm monophosphate en 5' (Li and Kiledjian 2010). Le clivage de la coiffe nécessite un accès direct de la coiffe par ces enzymes et est rendue possible par le déplacement d'eIF4E de la coiffe. En effet il existe un mécanisme de compétition entre eIF4E et le complexe Dcp1/2 pour leur association à la coiffe, la transition de traduction à dégradation ayant lieu lorsque le complexe eIF4F est dissocié de la coiffe (von der Haar et al. 2004). L'hydrolyse de la coiffe interrompt l'initiation de la traduction et dans le même temps expose l'ARNm à l'exoribonucléase Xrn1 qui dégrade le transcrit depuis son extrémité 5' qui n'est plus protégée (Figure 8) (Garneau et al. 2007).

#### 1.2.2. Voies spécifiques de dégradation des ARNm

Les protéines de liaison à l'ARNm et les ARN non codants influencent la vitesse et l'efficacité de dégradation des ARNm en modulant la localisation cellulaire et/ou la traduction

du transcrit. Les composants des particules ribonucléoprotéiques déterminent ainsi le devenir d'un ARNm par leur association ou dissociation de l'ARNm en réponse à différentes conditions cellulaires telles que le cycle cellulaire ou des stimuli externes. Certaines classes de transcrits, ceux possédant des erreurs ou d'autres présentant des éléments spécifiques dans leur séquence, le plus souvent dans la région 3'UTR, utilisent la voie générale de dégradation avec des mécanismes alternatifs de recrutement des acteurs de la dégradation.

#### 1.2.2.1. Dégradation induite par les microARN

Les microARNs sont de puissants acteurs de la répression de la traduction et de la dégradation des ARNm. Alors qu'ils exercent un contrôle significatif sur les niveaux globaux des protéines et des ARNm, la contribution relative de la dégradation versus la répression de la traduction n'est pas encore clairement établie. Les microARN déstabilisent les transcrits en premier lieu par déadénylation puis par décoiffage. Ces deux étapes requièrent l'action des protéines Argonaute (AGO) et GW182 (Glycine-tryptophan protein of 182 kDa) qui sont des composantes du complexe miRISC. La protéine AGO est chargée par le microARN et permet de reconnaître l'ARNm cible. Au sein du complexe miRISC, la protéine AGO s'associe à différents cofacteurs lui permettant d'induire la dégradation ou la répression du transcrit selon plusieurs mécanismes. Elle interagit avec GW182 qui tient un rôle central dans la dégradation du transcrit induite par les microARNs. En effet GW182 interagit avec le complexe Ccr4-Caf1 et permet de diriger les ARNm vers la déadénylation puis le décoiffage et la dégradation 5' vers 3' par l'enzyme Xrn1 (Fabian et al. 2011; Fabian and Sonenberg 2012).

#### 1.2.2.2. Dégradation induite par les codons stop précoces

La présence de codon stop précoce dans la région codante d'un ARNm conduit à sa reconnaissance et à son élimination par un mécanisme appelé NMD (Nonsense-Mediated Decay). Ce mécanisme permet de supprimer les transcrits défectueux qui sont potentiellement toxiques pour la cellule. Une caractéristique qui différencie un ARNm normal d'un ARNm aberrant est la présence du complexe EJC (Exon Junction Complex) qui est déposé lors de l'épissage à 20-24 nucléotides en amont d'une jonction exon-exon. Normalement ce complexe est déplacé par les ribosomes et le facteur PYM (Partner of Y14 and mago) lors du premier cycle de traduction (Gehring et al., 2009). En effet les ARNm nouvellement synthétisés et

exportés dans le cytoplasme subissent un remodelage de leur particule ribonucléoprotéique lors de ce premier cycle de traduction avec l'échange du complexe de liaison à la coiffe CBP20/CBP80 pour eIF4E et la dissociation de l'EJC. En présence d'un codon stop précoce, l'EJC reste associé à l'ARNm et est reconnu par la machinerie du NMD. Le facteur UPF1 (Up Frameshift suppressor 1) et la kinase SMG1 (Suppressor of Morphogenetic effect on Genitalia 1) sont alors recrutés au complexe de terminaison par les facteurs eRF1/eRF3 formant le complexe SURF (SMG1-UPF1-eRFs). L'association de l'EJC au complexe SURF via les facteurs UPF2/UPF3 induit la phosphorylation d'UPF1 par SMG1 et permet le recrutement des protéines SMG6/SMG5/SMG7. Ces dernières vont conduire à la dégradation de l'ARNm par clivage endonucléolytique (SMG6) ou par le recrutement des enzymes de déadénylation et de décoiffage (SMG5/SMG7) (Schweingruber et al. 2013). Alors que le NMD semblait être restreint au premier cycle de traduction, c'est-à-dire lorsque les ARNm nouvellement exportés du noyau sont associés au complexe de liaison de la coiffe CBP80/CBP20, il a récemment été montré que les ARNm associés à eIF4E sont aussi reconnus et dégradés par le NMD (Durand and Lykke-Andersen 2013; Rufener and Muhlemann 2013). Ceci suggère l'existence d'autres mécanismes permettant la reconnaissance des ARNm défectueux indépendamment de l'EJC.

#### 1.2.2.3. Dégradation induite par les éléments riches en AU

Les éléments riches en Adénine et Uridine (ARE : AU-Rich Element) sont des séquences présentes dans les régions 3'UTR de nombreux ARNm instables. Ils sont généralement organisés en répétition et/ou chevauchement du motif AUUUA et se retrouvent dans les ARNm codant pour les proto-oncogènes (c-FOS) ainsi que les médiateurs de l'inflammation (TNF $\alpha$  : Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ , interleukines IL1-IL2-IL3, GM-CSF : Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor). Leur présence induit la dégradation rapide des ARNm les présentant mais permet également de stabiliser et de stimuler la traduction de ces ARNm en réponse à divers signaux extracellulaires (Schoenberg and Maquat 2012). Ces effets sur la stabilité des ARNm dépendent de l'interaction de protéines *trans*-régulatrices appelées ARE-BPs (ARE-Binding Proteins) qui sont elles-mêmes régulées par des kinases et phosphatases activées par le stress et les stimuli de l'inflammation. Par exemple les protéines TTP (Tristetrapolin) et BRF1-2 (Butyrate Response Factor 1-2) lient les ARE et induisent la dégradation rapide des ARNm en recrutant les acteurs de la dégradation

(déadénylation, décoiffage et exonucléases des extrémités 5' et 3' de l'ARNm) (Lykke-Andersen and Wagner 2005). La stabilisation des ARNm contenant un ARE découle de la dissociation de ces protéines du mRNP et/ou l'association de facteur de stabilisation comme la protéine HuR (Hu antigen R) (von Roretz et al. 2011) .

### 1.2.3. Localisation subcellulaire des ARNm

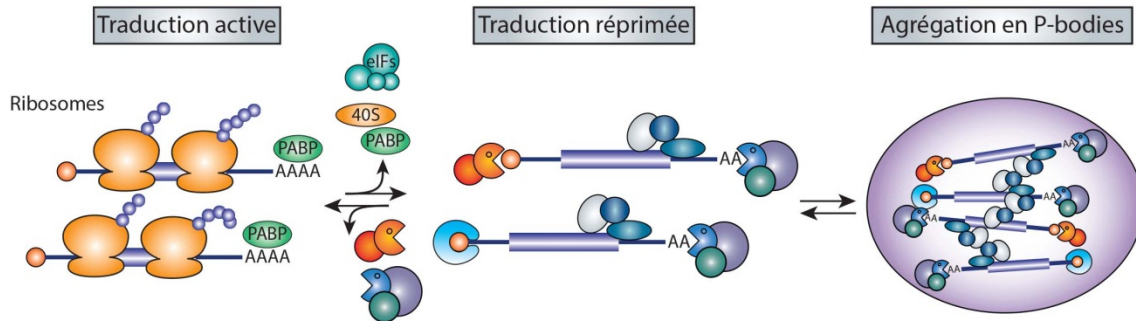
La localisation subcellulaire des ARNm peut contrôler leur devenir dans le cytoplasme. Elle joue un rôle important lors de l'embryogenèse (Lecuyer et al. 2007) et participe également à des mécanismes de traduction localisée pour répondre à des besoins cellulaires particuliers, au niveau des synapses des neurones notamment (Sossin and DesGroseillers 2006). Il a été observé que certains ARNm dont la traduction est réprimée se trouvent stockés dans des sites spécifiques appelés Processing-Bodies (P-Bodies) et granules de stress qui participent à la régulation de la traduction et de la dégradation des ARNm. L'accumulation d'ARNm non engagés dans la traduction dans ces structures permet de contrôler le moment mais également l'endroit où l'ARNm est traduit, ajoutant un niveau supplémentaire de contrôle de l'expression des gènes.

#### 1.2.3.1. P-bodies

##### 1.2.3.1.1. Composition et mécanismes d'assemblage

De nombreuses études ont mis en évidence dans le cytoplasme des cellules eucaryotes des sites d'accumulation d'ARNm non traduits et de protéines impliquées dans la dégradation des ARNm. Ces sites appelés Processing-Bodies (ou P-bodies) contiennent en particulier les acteurs de la voie de dégradation 5'→3' (Dcp1/Dcp2, Xrn1, Lsm1-7) et de déadénylation (Crr4-Caf1). En plus des facteurs impliqués dans la dégradation, les P-bodies concentrent des régulateurs de la traduction (CPEB : Cytoplasmic Polyadenylation Element Binding protein, 4E-T : eIF4E-Transporter), de la machinerie de l'interférence à ARN (Ago, GW182), de l'AMD (TTP) et du NMD (UPF1-2-3, SMG5-7) (Eulalio et al. 2007a). Les acteurs de la machinerie traductionnelle (facteurs d'initiation, protéines ribosomiques et PABP) à l'exception d'eIF4E, sont absents des P-bodies ce qui implique un remodelage de la particule ribonucléoprotéique lors de la transition entre traduction active et répression (Parker and Sheth 2007). Le facteur eIF4E n'est cependant pas engagé dans la traduction puisque dans ce

contexte il est associé à 4E-T et ne peut donc pas lier eIF4G pour initier la traduction (Andrei et al. 2005; Ferraiuolo et al. 2005).



Adapté de Eulalio et al, Nature Review Molecular Cell Biology, 2007

### **Figure 9: Modèle d'assemblage des P-bodies**

*Le devenir des ARNm dans le cytoplasme est déterminé par la nature des protéines qui leur sont associées. Ils peuvent ainsi être engagés dans la traduction ou gardés dans un état inactif, non associé aux ribosomes. La transition des ARNm d'un état actif à inactif pour la traduction nécessite le remodelage de la particule ribonucléoprotéique avec la dissociation des facteurs impliqués dans la traduction (facteurs d'initiation, sous-unités des ribosomes, PABP) et le recrutement de répresseurs de la traduction et de facteurs de la machinerie de dégradation. Cette transition est réversible et les ARNm réprimés peuvent éventuellement être ré-engagés dans la traduction. Les ARNm réprimés peuvent s'agréger et former des P-bodies grâce à l'action de protéines qui leur sont associées et qui possèdent des domaines d'interaction protéine-protéine. Figure adaptée d'après (Eulalio et al. 2007a)*

Les P-bodies sont présents dans les cellules de façon constitutive mais leur taille et leur nombre augmentent dans des conditions où la traduction est inhibée (Kedersha et al. 2005). Ces sites d'accumulation d'ARN et de protéines sont hautement dynamiques et leur formation est directement dépendante de la fraction d'ARNm non engagés dans la traduction (Teixeira et al. 2005). Cette dépendance vis-à-vis de la traduction suggère que l'assemblage des P-bodies requiert tout d'abord la sortie de l'ARNm de la traduction avec l'échange des facteurs de la traduction pour les protéines associées aux P-bodies (Figure 9). Lorsque ce remodelage a eu lieu, les particules ribonucléoprotéiques s'agrègent par des mécanismes d'interaction

protéine/protéine comme c'est le cas avec EDC3 (Enhancer of Decapping 3) et Lsm4 (Decker et al. 2007; Decker and Parker 2012).

#### 1.2.3.1.2. Fonction proposée

Le rôle exact des P-bodies dans la régulation des ARNm n'est pas bien établi néanmoins de nombreuses évidences montrent que les P-bodies sont des sites de dégradation des ARNm. La machinerie de dégradation ainsi que des ARNm partiellement dégradés s'accumulent dans les P-bodies et leur assemblage requiert l'entrée des ARNm dans la dégradation (Sheth and Parker 2003). En effet lorsque la dégradation est bloquée à des stades précoces, c'est-à-dire au niveau de la déadénylation, les P-bodies sont désassemblés. Au contraire le blocage du complexe Dcp1/Dcp2 et de Xrn1 conduit à une augmentation en taille et en nombre des P-bodies (Cougot et al. 2004; Andrei et al. 2005). Les ARNm présents dans les P-bodies ne sont pas nécessairement dégradés, ils peuvent être stockés ou réengagés dans la traduction (Bregues et al. 2005; Bhattacharyya et al. 2006). Alors que les protéines associées aux P-bodies assurent des fonctions essentielles dans la dégradation générale mais également spécifique des ARNm, l'importance de leur accumulation pour former des P-bodies visibles au microscope est moins claire. Il a été montré que ce processus d'agrégation n'est nécessaire ni au décoiffage ni à la répression de la traduction lors de stress (Decker et al. 2007). Les mécanismes de répression par les microARNs, l'AMD et le NMD ne sont pas affectés lorsque les P-bodies ne sont pas visibles (Chu and Rana 2006). Il a ainsi été proposé que l'assemblage des P-bodies serait la conséquence, plutôt que la cause, de l'engagement des ARNm dans ces voies (Eulalio et al. 2007b). Finalement il semblerait que l'agrégation des P-bodies soit importante pour la survie des cellules lors de la phase stationnaire chez la levure (Ramachandran et al. 2011) suggérant un rôle dans le stockage à long terme des ARNm.

#### 1.2.3.2. Granules de stress

##### 1.2.3.2.1. Composition et mécanismes d'assemblage

Les granules de stress représentent un autre type de granule à ARN dans le cytoplasme qui possèdent des caractéristiques communes avec les P-bodies. En effet ces deux types de granules sont présents chez les eucaryotes, ils nécessitent la sortie des ARNm de la traduction, autrement dit leur dissociation des polysomes, pour leur assemblage et certaines protéines,

comme eIF4E, Xrn1, TTP et BRF1/2, s'accumulent à la fois au sein des P-bodies et des granules de stress (Buchan and Parker 2009). À la différence des P-bodies qui sont observés à l'état basal, l'assemblage des granules de stress est déclenché par une variété de stress environnementaux comprenant le stress oxydatif, le choc thermique, l'infection virale et l'hyperosmolarité, qui conduisent à l'inhibition de la traduction (Anderson and Kedersha 2009). Les granules de stress sont typiquement composés des ARNm associés au complexe 48S qui sont la conséquence du désassemblage des polysomes. Ils contiennent les facteurs d'initiation eIF2, eIF3, le complexe eIF4F (eIF4E, eIF4G et eIF4A), PABP et la sous-unité 40S des ribosomes. En plus de ces facteurs, les granules de stress renferment des répresseurs de la traduction (TIA1 : T-cell-restricted Intracellular Antigen-1 et TIAR : TIA-Related protein), des hélicases à ARN (DDX1 et DDX3: DEAD Box proteins 1-3) et des protéines impliquées dans la signalisation cellulaire (FAK : Focal Adhesion Kinase, RACK1 : Receptor of Activated Protein Kinase C 1) (Buchan and Parker 2009).

L'assemblage des granules de stress est initié par la phosphorylation du facteur d'initiation eIF2 $\alpha$ . Cet événement de phosphorylation prévient la formation du complexe ternaire et empêche l'initiation de la traduction. Plusieurs kinases, chacune activée par un stress différent, ont été impliquées dans la phosphorylation d'eIF2 $\alpha$  : PKR (Protein Kinase RNA-activated) est activée par les ARN double brin, PERK (PRKR-like Endoplasmic Reticulum Kinase) par le stress du reticulum endoplasmique, HRI (Heme-regulated eIF2 $\alpha$  kinase) par le stress oxydant et GCN2 (General Control Nonrepressed 2) en absence de nutriments (Dalton et al. 2012). Les interactions protéines-protéines entre les facteurs associés aux granules de stress contribuent également à la formation de ces structures, notamment grâce aux domaines riches en glutamine et asparagine (domaines Q/N) présents dans les protéines TIA1 et TIAR (Kedersha et al. 1999).

#### 1.2.3.2.2. Fonction proposée

Tout comme les P-bodies, la fonction des granules de stress n'est pas claire à ce jour. Il a été proposé que ces derniers participent à la répression de la traduction de certains ARNm en réponse au stress. En effet, alors que les ARNm codant pour les gènes classiques de maintenance (« housekeeping ») sont associés aux granules de stress, les ARNm codant pour



les protéines de réponse au choc thermique en sont exclus (Kedersha and Anderson 2002). Les granules de stress pourraient également être impliqués dans les décisions de survie ou d'apoptose des cellules soumises à différents stress en régulant sélectivement l'expression de protéines nécessaires à la survie cellulaire. Ils joueraient le rôle de centre décisionnel entre stockage, dégradation ou ré-initiation de la traduction (Anderson and Kedersha 2009). Ce mécanisme de stockage d'ARNm permettrait ainsi à la cellule de répondre rapidement et spécifiquement en condition de stress en reprogrammant l'expression de protéines afin de faire face au stress.

## 2. Voies de signalisation impliquées dans la régulation de la traduction et des ARNm

La cellule est capable d'intégrer les signaux intracellulaires et extracellulaires afin de contrôler la synthèse protéique qui représente le processus cellulaire le plus coûteux énergétiquement. Ce contrôle est exercé par différentes voies de signalisation qui ciblent en grande majorité l'étape de l'initiation de la traduction. En condition favorable à la croissance, l'assemblage du complexe eIF4F est stimulé et la synthèse protéique activée. Les voies de signalisation PI3K (Phosphatidylinositol 3 Kinase) / mTOR (mammalian/mechanistic Target of Rapamycin) et MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase) tiennent un rôle essentiel dans ce processus. Elles sont spécifiquement activées par les facteurs de croissance, les mitogènes, la suffisance énergétique et les nutriments et interviennent lors de la phase G1 du cycle cellulaire pour permettre à la cellule de doubler son contenu avant l'entrée en mitose. Au contraire, lorsque les nutriments et l'énergie sont insuffisants ou lors de stress, la synthèse protéique globale est inhibée pour permettre à la cellule de répondre rapidement aux changements de son environnement et favoriser sa survie. Ce mécanisme est assuré par des voies de signalisation spécifiquement induites par le stress métabolique qui freinent la traduction et plus précisément qui bloquent l'assemblage du complexe ternaire. En plus du contrôle au niveau de la traduction, les voies de signalisation régulent aussi la stabilité de certains ARNm en contrôlant leur dégradation spécifique.

### 2.1. La voie PI3K/mTOR

La protéine mTOR est une sérine/thréonine kinase de 290 kDa hautement conservée chez les eucaryotes qui appartient à la superfamille des PIKK (Phosphatidylinositol-3 Kinase

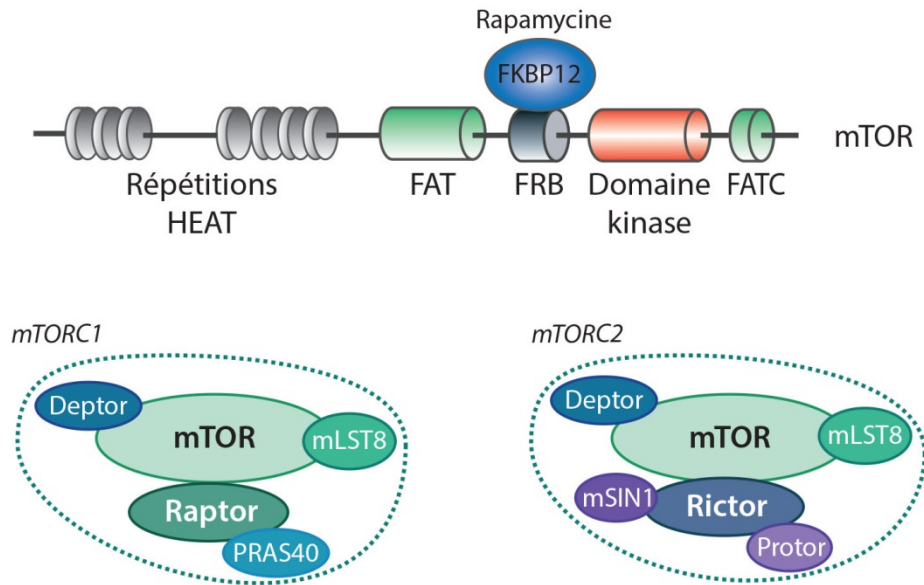
related-Kinases). Elle fût identifiée comme la cible de la rapamycine, un macrolide antifongique produit par la bactérie *Streptomyces hydropiscus* (Vezina et al. 1975). La rapamycine lie son récepteur cellulaire FKBP12 (FK504-binding protein of 12 kDa) et inhibe mTOR en interagissant avec le domaine FRB (FKBP12-Rapamycin Binding domain) de mTOR (Figure 10) (Brown et al. 1994; Sabatini et al. 1994; Chen et al. 1995). mTOR contrôle la croissance cellulaire et la prolifération et sa dérégulation est présente dans de nombreuses pathologies humaines comme le cancer, le diabète et l'obésité. De nombreuses études ont mené à la découverte d'autres processus biologiques essentiels contrôlés par mTOR que sont le métabolisme, la survie cellulaire, la synthèse des protéines et des lipides et l'autophagie.

L'organisation de mTOR est proche des autres kinases de la famille des PIKK. Dans la partie N-terminale, on retrouve des répétitions HEAT (Huntingtin, Elongation factor 3, a subunit of protein phosphatase 2A, TOR1) qui sont impliquées dans des interactions protéine-protéine. Ces répétitions sont suivies d'un domaine FAT (FRAP, ATM, TRRAP), d'un domaine FRB qui est la cible du complexe rapamycine-FKBP12, du domaine catalytique ser/thr kinase et finalement d'un domaine FATC (FAT Carboxy-terminal) (Figure 10) (Zoncu et al. 2011b). mTOR fait partie de deux complexes, appelés mTORC1 et mTORC2, qui diffèrent par leurs fonctions, leur composition protéique et leurs mécanismes d'activation (Laplanche and Sabatini 2012). Des deux complexes contenant mTOR, mTORC1 est celui qui contribue à la régulation de la synthèse protéique. Ses composants, mécanismes d'activation et fonctions sont décrits dans les sections suivantes.

#### 2.1.1. Description du complexe mTORC1

Le complexe mTORC1 est composé de la sous-unité catalytique mTOR, de la protéine d'échafaudage Raptor (Regulatory-Associated Protein of mTOR), de mLST8 (mammalian Lethal with Sec13 protein 8), de PRAS40 (Proline-Rich AKT Substrate 40 kDa) et Deptor (DEP-domain-containing mTOR-interacting protein). Le complexe mTORC2 est défini par la présence de Rictor (Rapamycin-insensitive companion of mTOR), mSIN1 (mammalian Stress-activated protein kinase (SAPK) Interacting protein 1) et Protor (Protein observed with Rictor). Il contient également mLST8, DEPTOR et PRAS40 qui sont présentes dans les deux complexes (Figure 10) (Zoncu et al. 2011b). mTORC1 était initialement décrit comme le complexe sensible à la rapamycine mais pas mTORC2. Néanmoins, cette description est

désormais plus nuancée puisque certaines fonctions de mTORC1 sont résistantes à la rapamycine (Choo et al. 2008) et que l'activité de mTORC2 est inhibée dans certains types cellulaires par des traitements prolongés à la rapamycine (Sarbasov et al. 2006).



Adapté de Ma and Blenis, Nature Reviews, 2009

**Figure 10: Organisation des complexes mTORC1 et mTORC2**

La région N-terminale de mTOR est composée de répétitions HEAT impliquées dans des interactions protéine/protéine. Le domaine kinase est entouré des domaines FAT, FRB (reconnu par le complexe rapamycine/FKBP12) et FATC. La kinase mTOR se retrouve dans deux complexes définis par la présence de Raptor pour mTORC1 et de Rictor pour mTORC2. Figure adaptée d'après (Ma and Blenis 2009).

Raptor est une large protéine de 150 kDa composée de plusieurs répétitions HEAT et WD-40 qui sont impliquées dans les interactions protéine-protéine. Raptor lie directement la partie N-terminale de mTOR et permet de recruter les substrats du complexe mTORC1 tels que les S6K (70 kDa ribosomal S6 kinases 1 and 2) et les 4E-BP (eIF4E-binding proteins 1 and 2) (Hara et al. 2002; Kim et al. 2002) grâce à un motif TOS (TOR-signaling) présent dans

la plupart des substrats de mTORC1 (Schalm and Blenis 2002; Schalm et al. 2003). Raptor est également requis pour la localisation appropriée de mTORC1 au lysosome qui est nécessaire à son activation (Sancak et al. 2008).

mLST8 est une petite protéine de 36 kDa associée au domaine kinase de mTOR qui présente sept répétitions du domaine WD-40 assurant des interactions protéine-protéine (Kim et al. 2003). Sa fonction au sein du complexe mTORC1 n'est pas claire, alors que des travaux utilisant l'interférence à ARN montrent que mLST8 est requise pour l'activation de mTORC1 par les acides aminés (Kim et al. 2003), son invalidation génétique par « Knock-out » n'a pas montré d'effet sur l'activité de mTORC1 (Guertin et al. 2006). Néanmoins, d'après la structure du complexe mTOR-mLST8 cristallisé récemment, mLST8 permettrait de stabiliser le domaine kinase de mTOR dans une conformation active (Yang et al. 2013).

Deptor est une protéine de 48 kDa qui interagit avec mTOR, elle est présente à la fois dans les complexes mTORC1 et mTORC2 et son expression est réprimée aux niveaux transcriptionnel et post-traductionnel par mTORC1. Deptor n'est pas un composant essentiel à ces complexes, néanmoins il module l'activité de mTOR et conduit à l'inhibition partielle de mTORC1 et mTORC2 (Peterson et al. 2009).

PRAS40 est une protéine de 28 kDa qui interagit avec Raptor et est associée seulement au complexe mTORC1. PRAS40 est un régulateur négatif de mTORC1, son association au complexe, induite en absence d'insuline et de nutriments, conduit à l'inhibition de mTORC1 (Sancak et al. 2007; Vander Haar et al. 2007). Comme son nom l'indique, PRAS40 est un substrat de la kinase Akt (également appelée PKB) (Kovacina et al. 2003), sa phosphorylation par Akt conduit à l'inhibition et la dissociation de PRAS40 du complexe mTORC1, permettant l'activation de ce dernier.

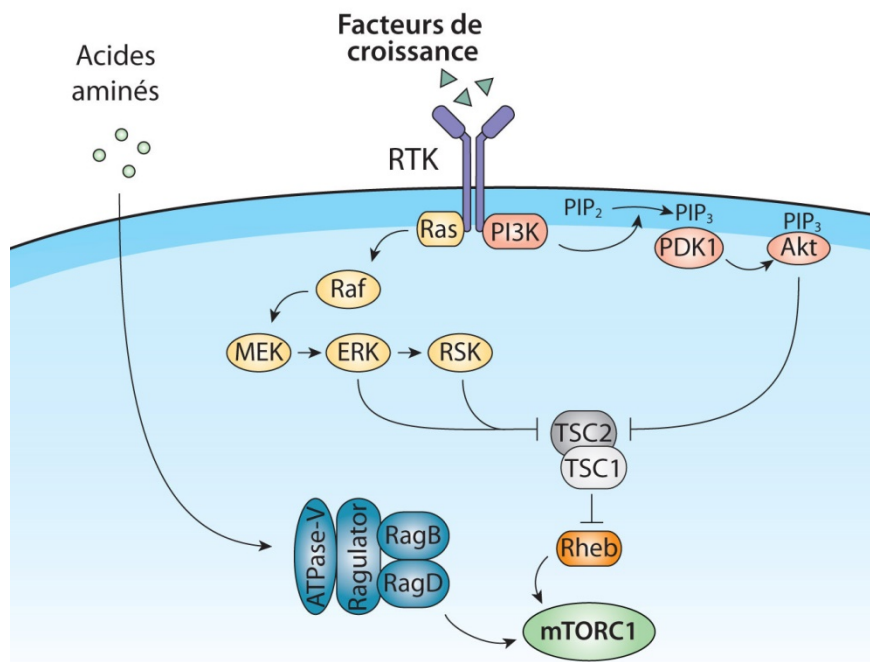
## 2.1.2. Mécanismes de régulation de mTORC1

Une multitude de signaux régulent l'activité du complexe mTORC1 tels que les facteurs de croissance et les hormones, les nutriments, le glucose et les niveaux d'oxygène. Ces signaux peuvent coopérer ou au contraire avoir des effets opposés permettant à la cellule de contrôler finement l'activité de mTORC1. L'activation de mTORC1 intervient selon deux types de mécanismes que sont d'une part la modification directe de certains composants du complexe et d'autre part la régulation de la petite GTPase Rheb (Ras homolog enriched in brain) par les complexes TSC1/TSC2 (Tuberous Sclerosis Complex 1 and 2) et les petites GTPases Rag (Ras-related GTP-binding protein) (Zoncu et al. 2011b).

### 2.1.2.1. Régulation de mTORC1 par les facteurs de croissance

#### 2.1.2.1.1. Voie PI3K/Akt

Les facteurs de croissance comme l'insuline ou l'IGF (Insulin-like Growth Factor 1) exercent de forts effets anaboliques et jouent des rôles essentiels dans la survie cellulaire, la croissance cellulaire et le métabolisme. L'activation des récepteurs à activité tyrosine kinase par les facteurs de croissance mène à l'activation de la protéine kinase PI3K par son recrutement direct au récepteur ou par le biais de protéine adaptatrice telle que IRS1 (Insulin Receptor Substrate 1). PI3K phosphoryle le phosphatidylinositol-(4,5)-biphosphate (PIP2) pour générer du phosphatidylinositol (3-4-5)-triphosphate (PIP3), une réaction qui est atténuée par l'activité phosphatase du suppresseur de tumeur PTEN (Phosphatase and TENSin homolog) (Manning and Cantley 2007). La production de PIP3 entraîne le recrutement et l'activation de la kinase PDK1 (3-Phosphoinositide-Dependent protein Kinase 1) à la membrane qui phosphoryle la kinase Akt, elle-même recrutée à la membrane grâce à son domaine PH (Pleckstrin Homology), sur sa boucle d'activation au résidu thréonine 308 (Figure 11) (Pearce et al. 2010). Akt est également phosphorylée sur le résidu sérine 473 du motif hydrophobique par mTORC2, cet évènement conduisant à l'activation complète de la kinase (Sarbasov et al. 2005).



Adapté de Laplante et Sabatini, Cell 2012

**Figure 11: Activation du complexe mTORC1 par les facteurs de croissance et les acides aminés**

Les facteurs de croissance stimulent l'activité de mTORC1 en activant les voies PI3K/AKT et MAPK/RSK grâce à la dimérisation et l'autophosphorylation des RTK. Ces dernières phosphorylent et inactivent le complexe TSC1/TSC2 qui exerce un contrôle négatif sur Rheb, la GTPase activatrice de mTORC1, et stimulent de cette manière l'activité mTORC1. Les acides aminés quant à eux activent mTORC1 en induisant sa relocalisation au lysosome grâce aux protéines Rag qui sont activées par le complexe Ragulator. Avec l'action de la pompe ATPase-v ce dernier détecte les niveaux d'acides aminés présents à la lumière du lysosome et contribue à l'activation spécifique de mTORC1 en présence des acides aminés. Figure adaptée d'après (Roux and Topisirovic 2012).

Akt stimule l'activité de mTORC1 de deux façons, la première en réduisant l'interaction du répresseur PRAS40 avec mTORC1 (Sancak et al. 2007; Vander Haar et al. 2007), la seconde en phosphorylant et inactivant la sous-unité TSC2 du complexe TSC1/TSC2 (Inoki et al. 2002; Manning et al. 2002; Potter et al. 2002). Ce dernier est composé de la protéine d'échafaudage TSC1 (également appelée hamartine) et de la protéine à activité GAP,

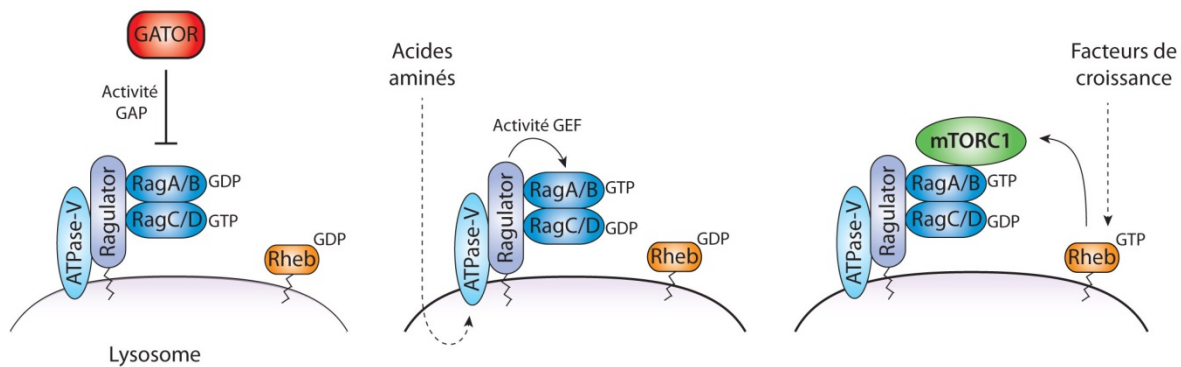
TSC2 (également appelée tubérine) (Kwiatkowski and Manning 2005). Le complexe TSC1/TSC2 est un régulateur négatif essentiel de mTORC1 qui possède une activité GAP et bloque l'activité de la GTPase Rheb (Inoki et al. 2003a; Tee et al. 2003). Lorsqu'associée au GTP, Rheb interagit directement avec mTORC1 et stimule son activité kinase. En tant que GAP de Rheb, le complexe TSC1/TSC2 empêche l'activation de mTORC1 en stimulant l'hydrolyse du GTP par Rheb qui est alors inactive dans sa forme associée au GDP (Figure 11).

#### 2.1.2.1.2. Voie Ras/MAPK

Les facteurs de croissance peuvent également stimuler l'activité mTORC1 par l'activation de la voie Ras/MAPK. En effet l'inactivation du gène suppresseur de tumeur NF1 (Neurofibromatosis-related protein 1), qui code pour une protéine à activité GAP pour Ras et stimule ainsi l'hydrolyse du GTP par Ras, conduit à l'hyperactivation du complexe mTORC1 et participe à la tumorigenèse (Johannessen et al. 2005; Johannessen et al. 2008). Ras est un oncogène qui active plusieurs voies de signalisation, notamment la voie MAPK qui consiste en l'activation séquentielle des kinases Raf, MEK et ERK (détaillées dans la section 2.2) (Figure 11) (Cargnello and Roux 2011). Les mécanismes exacts contribuant à la régulation de mTORC1 par la voie Ras/MAPK ne sont pas connus néanmoins la kinase effectrice de la voie, ERK, ainsi que RSK (p90 Ribosomal S6-Kinase), elle-même directement activée par ERK (détaillée dans la section 2.2), ont été impliquées dans le contrôle de l'activité de mTORC1. En effet ERK et RSK phosphorylent TSC2 ce qui conduit à l'inhibition du complexe TSC1/TSC2 et à l'activation de mTORC1 (Figure 11) (Roux et al. 2004; Ma et al. 2005). Ces kinases régulent également l'activité de mTORC1 en phosphorylant Raptor. Les événements de phosphorylation de Raptor par ERK et RSK corrént avec une augmentation de l'activité de mTORC1 (Carriere et al. 2008; Carriere et al. 2011). Finalement la kinase RSK1 phosphoryle Deptor au sein d'un signal de dégradation (dégron) qui est reconnu par l'ubiquitine ligase E3  $\beta$ TrCP ( $\beta$ -Transducin repeat-Containing Protein), ceci induisant la dégradation de Deptor par le protéasome et l'augmentation de l'activation de mTORC1 (Zhao et al. 2011).

### 2.1.2.2. Régulation de mTORC1 par les acides aminés

Les acides aminés, plus particulièrement la leucine, l'arginine et la glutamine, sont indispensables à l'activation de mTORC1 (Hara et al. 1998; Wang et al. 1998; Nicklin et al. 2009). Les mécanismes contribuant à leur détection par mTORC1 dans la cellule restent encore incomplètement connus, toutefois des données récentes montrent que ces mécanismes ont lieu à la surface du lysosome et font intervenir un vaste ensemble de protéines qui orchestrent l'activation des petites GTPases appelées Rag (Ras-related GTP-binding protein). Au nombre de quatre (RagA, B, C et D), les protéines Rag agissent sous forme d'hétérodimère avec RagA ou RagB associé à RagC ou RagD (Sekiguchi et al. 2001). Lorsqu'elles sont sous forme active (RagA/B<sup>GTP</sup>/RagC/D<sup>GDP</sup>), elles interagissent avec Raptor et induisent le recrutement de mTORC1 au lysosome où localise également Rheb qui peut alors l'activer (Kim et al. 2008; Sancak et al. 2008). Celle-ci intègre les signaux provenant des facteurs de croissance et permet l'activation de mTORC1 lorsque les conditions sont favorables, c'est-à-dire en présence à la fois d'acides aminés et de facteurs de croissance (Figure 12).



Adapté de Jewell et al, Nature Review Molecular Cell Biology, 2013

### **Figure 12: Contrôle du complexe mTORC1 par les acides aminés**

Le complexe Ragulator est associé à la membrane du lysosome et s'associe aux protéines Rag en présence d'acide aminé. Ce mécanisme est dépendant de l'activité de la pompe ATPase-v et contribue à l'activation des protéines RagA/B qui sont capables d'interagir directement avec Raptor, la sous-unité du complexe mTORC1. Ce dernier se retrouve recruté au lysosome où réside également Rheb qui peut alors activer mTORC1. À l'opposé du complexe Ragulator,



*le complexe GATOR réprime l'activité de mTORC1 en empêchant l'activation des protéines RagA/B. Figure adaptée d'après (Jewell et al. 2013)*

L'activité des Rag est sous le contrôle de deux complexes protéiques appelés Ragulator et GATOR qui agissent respectivement en facteur d'échange nucléotidique (GEF : Guanine Exchange Factor) et en protéine à activité GAP pour les Rag (Bar-Peled et al. 2012; Bar-Peled et al. 2013). En présence d'acides aminés, le complexe Ragulator interagit avec les protéines Rag et les active en induisant le chargement du GTP sur RagA/RagB. Ce mécanisme requiert l'activité et l'association de la pompe ATPase vacuolaire aux complexes Rag et Ragulator et serait responsable de la détection des acides aminés dans la lumière du lysosome (Figure 12) (Zoncu et al. 2011a). Par ailleurs, la protéine d'échafaudage p62 interagit à la fois avec Raptor et les protéines Rag et contribue ainsi à la translocation et activation de mTORC1 au lysosome (Duran et al. 2011). Finalement l'inactivation de mTORC1 est assurée par le recrutement du complexe TSC1/TSC2 à la lumière du lysosome grâce aux protéines Rag, ce recrutement conduisant au blocage de l'activité de Rheb et à l'inhibition de mTORC1 en absence d'acide aminé et de stimulation par les facteurs de croissance (Demetriades et al. 2014; Menon et al. 2014).

#### 2.1.2.3. Régulation par les niveaux en énergie et le stress cellulaire

En plus des acides aminés, les niveaux de glucose et d'oxygène influent sur l'activation du complexe mTORC1. Des déficits en apport énergétique (hypoglycémie, hypoxie, excès de consommation énergétique) mènent à l'activation de la kinase AMPK (AMP-activated Protein Kinase) qui constitue un véritable « senseur » de l'état nutritionnel de la cellule et freine les voies anaboliques (biosynthèse lipidique, protéique et ribosomique) ainsi que la croissance et la prolifération cellulaire (Hardie et al. 2012). L'AMPK est composée d'une sous-unité catalytique  $\alpha$  et de deux sous-unités régulatrices  $\beta$  et  $\gamma$ , la sous-unité  $\gamma$  liant directement l'AMP lorsque le rapport AMP/ATP est élevé pour faciliter la phosphorylation de la sous-unité  $\alpha$  par LKB1 (Liver Kinase B1) et l'activation complète de la kinase (Shaw 2009). Une fois activée, AMPK inhibe mTORC1 par deux mécanismes, le premier par la phosphorylation et l'activation de TSC2 (Inoki et al. 2003b), le second par la phosphorylation de Raptor et le recrutement des protéines 14-3-3 qui préviennent l'activité du complexe (Gwinn et al. 2008). Ces données placent ainsi les voies mTOR/AMPK au centre de la régulation de la balance

énergétique intracellulaire et du contrôle de la prolifération cellulaire. En plus d'activer l'AMPK, l'hypoxie conduit à l'inhibition de mTORC1 par un mécanisme faisant intervenir la protéine REDD1 (Regulated in Development and DNA damage response 1) (Brugarolas et al. 2004). L'expression de REDD1 est accrue lors d'hypoxie et permet sa liaison aux protéines 14-3-3 qui ne peuvent alors plus interagir avec TSC2 et inhiber le complexe TSC1/TSC2 (DeYoung et al. 2008).

### 2.1.3. Contrôle de la traduction des ARNm par mTORC1

En intégrant les signaux mitogènes émis par les facteurs de croissance et la disponibilité des nutriments dans la cellule, mTORC1 contrôle la synthèse protéique, plus particulièrement à l'étape d'initiation de la traduction. mTORC1 stimule la traduction des ARNm à la fois de façon globale mais aussi de manière sélective pour certains types d'ARNm. Ce contrôle de mTORC1 s'exerce de façon coordonnée par des événements de phosphorylation directe ou indirecte des composantes de la machinerie traductionnelle (Ma and Blenis 2009; Roux and Topisirovic 2012) et cible principalement ses deux substrats les mieux caractérisés à ce jour, les protéines 4E-BP (eIF4E-Binding Proteins) et les ser/thr kinases S6K (p70 ribosomal S6 Kinases).

#### 2.1.3.1. Les 4E-BP et l'assemblage du complexe eIF4F

##### 2.1.3.1.1. Contrôle du complexe eIF4F par les 4E-BP

La régulation du facteur de liaison à la coiffe des ARNm, eIF4E, est directement assurée par mTORC1 qui phosphoryle et prévient l'action des protéines 4E-BP. Ces dernières (4E-BP1, 2 et 3 chez les mammifères) sont des protéines de petits poids moléculaires dont la fonction est de réprimer la traduction des ARNm en bloquant l'assemblage du complexe eIF4F à la coiffe des ARNm (Lin et al. 1994; Pause et al. 1994). Dans les cellules quiescentes, les 4E-BP sont hypophosphorylées et sont associées avec une forte affinité à eIF4E, prévenant la liaison de la protéine d'échafaudage eIF4G et l'assemblage du complexe eIF4F. Lorsqu'il est activé, mTORC1 phosphoryle les résidus correspondant aux thréonines 37 et 46 de 4E-BP1 chez l'homme qui sont nécessaires à la phosphorylation de la sérine 65 et de la thréonine 70 (Gingras et al. 1999a; Gingras et al. 2001). La phosphorylation de ces quatre sites mène à la dissociation des 4E-BP d'eIF4E qui peut alors être engagé dans la formation du complexe

eIF4F et le recrutement de la sous-unité 40S du ribosome pour initier la traduction (voir section 1.1.2.2).

#### 2.1.3.1.2. Traduction globale et spécifique : rôle des 4E-BP

Bien que le facteur d'initiation eIF4E soit nécessaire à la traduction de la grande majorité des ARNm, il a été montré que des changements dans l'expression ou l'activation d'eIF4E n'ont pas un grand impact sur la traduction globale. Au contraire, seuls certains ARNm voient leur traduction fortement modulée par l'activité d'eIF4E. C'est le cas des ARNm qui possèdent une structure secondaire complexe de leur région 5'UTR et qui codent en grande majorité pour des protéines impliquées dans la survie cellulaire et la prolifération comme les cyclines, c-myc, le VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) ou Bcl-XL (Graff and Zimmer 2003). Ainsi l'hyperactivation ou la surexpression d'eIF4E stimule spécifiquement l'expression de protéines au potentiel oncogénique et explique l'implication d'eIF4E dans des mécanismes de transformation cellulaire et de tumorigenèse (De Benedetti and Graff 2004).

Les 4E-BP en régulant l'activité traductionnelle d'eIF4E contrôlent spécifiquement l'expression de protéines impliquées dans la prolifération et la survie cellulaire. (Petroulakis et al. 2009; Dowling et al. 2010). Étant donné que l'activité des 4E-BP est elle-même sous le contrôle de mTORC1, ceci implique que mTORC1 est particulièrement requis pour la traduction de ces ARNm. Ainsi, il a été proposé que mTORC1 stimule la prolifération cellulaire via les 4E-BP, tandis que le contrôle de la croissance cellulaire par mTORC1 est assuré par les S6K (Dowling et al. 2010).

Le « ribosome profiling », une technique permettant d'identifier grâce au séquençage à grande échelle les régulations traductionnelles au niveau d'un génome (Ingolia et al. 2009), a montré que mTORC1 régule de façon sélective la traduction des ARNm qui possèdent un motif TOP (voir section 1.1.1.2.3) (Hsieh et al. 2012; Thoreen et al. 2012). L'effet de mTORC1 sur la traduction des ARNm TOP est dépendant de la présence des 4E-BP puisque leur traduction devient résistante à l'inhibition de mTOR dans des cellules dont les gènes 4E-BP1 et 4E-BP2 ont été inactivés. Ces données placent les 4E-BP comme effecteurs principaux voire uniques de mTORC1 dans le contrôle de la traduction des ARNm.

### 2.1.3.2. Les S6K et la synthèse protéique globale

En plus des 4E-BP, mTORC1 contrôle la traduction des ARNm en activant les kinases S6K qui sont au nombre de deux chez les mammifères (S6K1 et S6K2) (Ma and Blenis 2009). Les S6K appartiennent à la famille des kinases AGC et sont activées par PDK1 et mTORC1 qui phosphorylent respectivement la boucle d'activation (thréonine 329 pour p70S6K1 chez l'homme) et le motif hydrophobique (thréonine 389 pour p70S6K1 chez l'homme) (Magnuson et al. 2012). De nombreux substrats des S6K ont été impliqués dans l'initiation de la traduction ainsi que dans d'autres étapes contribuant à la synthèse protéique comme la protéine ribosomique S6 de la petite sous-unité des ribosomes (Banerjee et al. 1990; Kozma et al. 1990), le facteur d'initiation eIF4B (Raught et al. 2004; Shahbazian et al. 2006), la protéine PDCD4 (Programmed Cell Death 4) (Dorrello et al. 2006), SKAR (S6K1 Aly/REF-like substrate) (Ma et al. 2008) et finalement la kinase eEF2K (Wang et al. 2001a).

S6K régule la traduction en modulant l'activité de l'hélicase eIF4A de deux façons, la première en inhibant le répresseur PDCD4 et la seconde en stimulant l'activité d'eIF4B, le cofacteur d'eIF4A. La fonction d'eIF4B est d'accroître l'affinité d'eIF4A pour l'ATP et ainsi de favoriser le déroulement des 5'UTR des ARNm lors de l'initiation de la traduction (voir section 1.1.2.2) (Rogers et al. 2002). S6K phosphoryle eIF4B sur la sérine 422 et induit le recrutement d'eIF4B au complexe d'initiation où il peut stimuler l'activité d'eIF4A (Raught et al. 2004; Shahbazian et al. 2006). Le suppresseur de tumeur PDCD4 lie eIF4A et empêche ainsi la formation du complexe d'initiation eIF4F (Yang et al. 2003). Lorsque S6K est activée, elle phosphoryle PDCD4 sur la sérine 67 conduisant à sa dégradation par le protéasome et à l'activation d'eIF4A (Dorrello et al. 2006).

S6K phosphoryle et inhibe la kinase eEF2K qui est responsable de la phosphorylation et de l'inhibition du facteur d'élongation eEF2. Ce dernier catalyse la translocation de l'ARNm et de l'ARNt lors de l'élongation et est ainsi régulé positivement par S6K (Wang et al. 2001a). SKAR est un autre substrat de S6K1 qui est impliqué dans le contrôle de la traduction. SKAR est associé spécifiquement aux jonctions exon/exon des ARNm nouvellement synthétisés et permet le recrutement de S6K1 et de mTORC1 aux ARNm. S6K1 phosphoryle SKAR sur les sérines 383 et 385 ce qui a pour conséquence de stimuler le premier cycle de traduction des ARNm (Ma et al. 2008). Finalement S6K1 phosphoryle la

protéine ribosomique S6 sur plusieurs résidus (sérines 235, 236, 240 et 244) (Bandi et al. 1993) mais l'impact de ces événements de phosphorylation sur la fonction de S6 et sur la traduction n'est pas clairement établi (Meyuhas 2008; Meyuhas and Drazzen 2009; Ruvinsky et al. 2009).

#### 2.1.4. mTOR, une cible thérapeutique privilégiée dans les cancers

##### 2.1.4.1. Activation de mTORC1 dans les cancers

La voie mTOR joue un rôle essentiel dans la croissance et la prolifération en coordonnant des processus anaboliques, synthèse des protéines, des lipides et des nucléotides, en fonction du statut énergétique de la cellule, des signaux extracellulaires et de la disponibilité des nutriments. Une caractéristique propre aux cellules cancéreuses réside dans leur capacité à déconnecter les signaux prolifératifs de leur perception par la cellule. Ce court-circuit est assuré par des événements génétiques qui mènent dans une grande majorité des cas à l'activation inadéquate du complexe mTORC1. En effet celui-ci se retrouve en aval des voies pro-prolifératives Ras/ERK et PI3K/Akt dont l'activation oncogénique, assurée par des mutations activatrices d'oncogènes (Ras, Raf, PI3K, Akt) et par l'inactivation de gènes suppresseurs de tumeurs (NF-1 (NeuroFibromatosis-related protein-1), PTEN (Phosphatase and TENsin homolog), TSC) est présente dans près de 80% des cancers (Menon Manning Oncogene 2009). Ces événements conduisent à l'hyperactivation de mTORC1 indépendamment des facteurs de croissance qui peut alors stimuler des processus anaboliques nécessaires à la croissance et la prolifération accrues des cellules cancéreuses. L'importance de mTOR dans le développement des cancers est aujourd'hui largement reconnue et de nombreux efforts sont faits pour mieux comprendre comment mTOR agit au sein de la cellule et pour mettre au point de nouvelles stratégies thérapeutiques ciblant mTOR.

##### 2.1.4.2. La rapamycine et les rapalogues comme traitements anticancéreux

Étant donné que mTORC1 se retrouve hyperactivé dans un grand nombre de cancers et participe à la croissance des cellules cancéreuses, des molécules ciblant spécifiquement mTORC1, comme la rapamycine, un inhibiteur allostérique naturel du complexe, ont le potentiel de freiner la progression tumorale et représentent ainsi des thérapies anticancéreuses prometteuses. Les propriétés pharmacocinétiques ainsi que la solubilité de la rapamycine

n'étant pas optimales, des analogues de la rapamycine communément appelés rapalogues ont été développés. Deux de ces rapalogues, le temsirolimus et l'everolimus, ont été approuvés par la FDA (Food and Drug Administration) pour le traitement du carcinome rénal à des stades avancés (Wander et al. 2011). Ces rapalogues ont également fait l'objet d'essais cliniques dans le cadre de traitement de cancers spécifiques tels que l'ostéosarcome, le cancer de l'estomac, le carcinome hépatocellulaire et le carcinome non à petites cellules du poumon (Li et al. 2014). Néanmoins de façon globale les rapalogues ont eu des effets modestes dans le traitement de tumeurs solides fréquentes. Bien que répondant au traitement, les tumeurs se redéveloppent dès l'arrêt de l'utilisation de ces molécules, en lien avec l'action cytostatique plutôt que cytotoxique des rapalogues (Bissler et al. 2008). Ces effets limités s'expliquent de plusieurs manières, tout d'abord les rapalogues n'affectent pas complètement l'activité de mTORC1, notamment sa capacité à promouvoir la synthèse protéique par la phosphorylation des 4E-BP qui sont impliquées dans la tumorigenèse (Thoreen et al. 2009). L'existence de nombreux mécanismes de rétrocontrôles négatifs sous le contrôle de mTORC1 qui répriment l'activité de RTK (Receptor Tyrosine Kinase) en aval des voies PI3K/Akt et Ras/ERK représente une autre raison des effets peu concluants des rapalogues (Harrington et al. 2004; Shah et al. 2004; Hsu et al. 2011; Yu et al. 2011). Finalement ces derniers en se liant à leur récepteur cellulaire FKBP12, n'inhibent pas l'activité du complexe mTORC2 qui contribue au développement des tumeurs en activant la kinase Akt (Guertin et al. 2009).

#### 2.1.4.3. Développement d'inhibiteurs de deuxième génération de mTOR

Dans le but de dépasser les limitations observées avec les rapalogues, des stratégies alternatives ont été développées ces dernières années et ont mené à la mise au point de nouveaux inhibiteurs de mTOR qui ciblent le domaine kinase et bloquent ainsi les complexes mTORC1 et mTORC2. Étant donné que les domaines kinases de mTOR et PI3K sont relativement similaires, ces inhibiteurs compétitifs de l'ATP sont également capables d'inhiber PI3K dans les mêmes proportions que mTOR ou à des degrés moindres (Benjamin et al. 2011). Ces molécules inhibent mTORC2 et montrent une plus grande efficacité à bloquer l'activité de mTORC1, notamment la phosphorylation des 4E-BP (Thoreen et al. 2009). Des données précliniques indiquent que les inhibiteurs catalytiques de mTOR préviennent la croissance et la prolifération cellulaire *in vitro* ainsi que le développement de tumeurs *in vivo*

avec une efficacité nettement supérieure à celle de la rapamycine (Garcia-Martinez et al. 2009; Yu et al. 2010; Falcon et al. 2011). La majorité des inhibiteurs catalytiques de mTOR sont actuellement testés en essais cliniques de phase I en monothérapie ou en combinaison avec d'autres agents anti-tumoraux pour différents types de cancers comme le cancer du sein, de l'endomètre, le lymphome non Hodgkinien et des tumeurs solides aux stades avancés (Benjamin et al. 2011). L'efficacité de ces molécules dans le traitement du cancer chez l'homme n'est pas encore établie mais il y a de fortes chances que ces inhibiteurs de mTOR de deuxième génération montrent des bénéfices plus importants que les rapalogues.

## 2.2. La voie MAPK

La voie des MAPK représente une des principales voies de signalisation mitogène activée en aval des RTK. Cette voie, présente chez tous les eucaryotes, est l'une des plus conservée au cours de l'évolution (Widmann et al. 1999) et régule de nombreux processus biologiques tels que l'expression des gènes, la mitose, le métabolisme, la survie cellulaire, l'apoptose et la différenciation. Les MAPK sont composées de trois familles principales que sont les ERK (Extracellular signal-Regulated Kinase), les JNK (c-Jun N-terminal Kinase, également appelées SAPK (Stress-Activated Protein Kinase)) et les p38 (Cargnello and Roux 2011). Chaque groupe de MAPK est activée selon le même schéma qui correspond à l'activation séquentielle de trois kinases, la MAPKKK qui phosphoryle et active la MAPKK phosphorylant et activant à son tour la MAPK. Ces dernières représentent les kinases effectrices du module et assurent la phosphorylation de nombreux substrats intervenant dans diverses fonctions biologiques. Parmi ces substrats figure la famille des kinases activées par les MAPK (MAPKAPK), dont font partie les kinases RSK (p90 Ribosomal S6 Kinase), qui représentent une étape supplémentaire dans la cascade de signalisation et permettent d'élargir le champ d'action des MAPK.

### 2.2.1. Le module Ras/ERK

Le module Ras/ERK est activé par les facteurs de croissance tels que le PDGF (Platelet-Derived Growth Factor), l'EGF (Epidermal Growth Factor), le NGF (Nerve Growth Factor) et l'insuline mais aussi par le sérum, les ligands des GPCR (G-Protein Coupled Receptors) et les cytokines (Raman Chen oncogene 2007). Il est composé des MAPKKK Raf

(Rapidly accelerated fibrosarcoma, A-Raf, B-Raf et Raf-1), des MAPKK MEK1 et MEK2 et enfin des MAPK ERK1 et ERK2. Ces dernières jouent un rôle central dans le contrôle de la prolifération cellulaire et leur activation est nécessaire à la progression du cycle cellulaire de la phase G1 à la phase S. L'activation constitutive de Ras/ERK est associée avec la transformation des cellules et la progression du cancer et touche principalement les étapes précoces de la voie à savoir la surexpression ou la mutation activatrice des RTK, la production accrue de ligands pour les RTK et finalement les mutations des protéines Ras et Raf.

#### 2.2.1.1. La petite GTPase Ras

Il existe trois protéines Ras (Rat sarcoma) homologues, K-Ras, N-Ras et H-Ras dont l'expression diffère selon le tissu. Elles appartiennent à la famille des petites GTPases qui fonctionnent comme des interrupteurs moléculaires, sous forme actives lorsque liées au GTP, inactives liées au GDP. L'échange du GDP pour le GTP est régulé par des facteurs d'échange GEF et des facteurs activateurs GAP, les GEF activent Ras en favorisant le relargage du GDP et donc la liaison du GTP tandis que les GAP inactivent Ras en stimulant l'activité intrinsèque d'hydrolyse du GTP de Ras et son retour dans un état lié au GDP (Ahearn et al. 2012). Les protéines Ras transmettent le signal en interagissant avec leurs effecteurs seulement dans leur conformation liée au GTP (Schlichting et al. 1990). Ras est ancrée à la membrane plasmique grâce à l'ajout d'un groupement hydrophobe farnésyl ce qui la localise à proximité des récepteurs tyrosine kinase (Wright and Philips 2006).

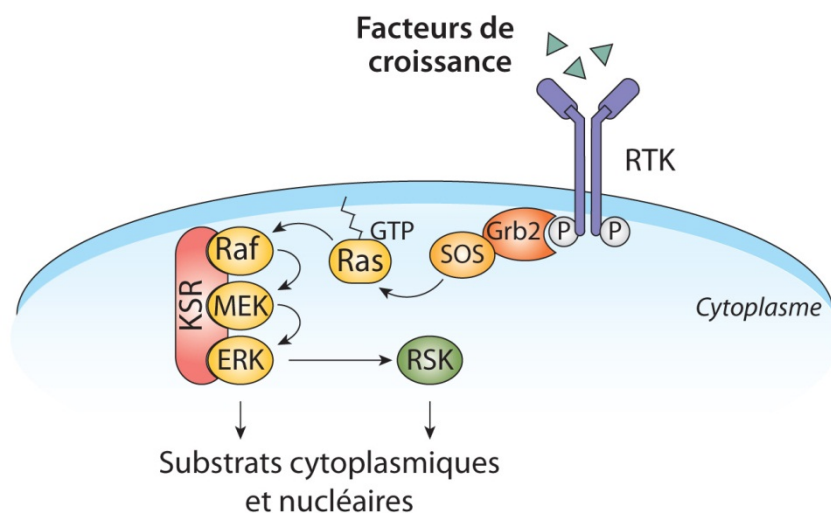
L'activation des RTK tels que l'EGFR conduit à leur dimérisation et à l'autophosphorylation sur tyrosine de leur queue cytoplasmique qui est suivie du recrutement de la protéine adaptatrice Grb2 (Growth factor Receptor Bound protein 2) via son domaine SH2 (Src Homology 2). Celle-ci est associée à la protéine SOS (Son Of Sevenless) qui possède une activité GEF spécifique pour Ras (Figure 12) (Vigil et al. 2010). Dans ce contexte SOS induit l'activation de Ras qui peut alors interagir avec ses effecteurs dont font partie les kinases Raf (Dickson et al. 1992) et PI3K (Ong et al. 2001). Des mutations activatrices de Ras sont retrouvées dans 30% des cancers chez l'homme et affectent pour la plupart la capacité de Ras à hydrolyser le GTP, et résultent en l'accumulation de la forme active de Ras associée au GTP. Les mutations les plus fréquentes touchent K-Ras qui est muté dans les cancers du pancréas (70-90%), du colon (~40%) et du poumon (15-40%). Les mutations de N-Ras et H-



Ras sont moins fréquentes et se retrouvent principalement dans les mélanomes (20-30% pour N-Ras). Ces mutations induisent les cascades de signalisation en aval de Ras de façon indépendante de la présence des stimuli extracellulaires résultant dans une prolifération incontrôlée et une survie cellulaire anormale (Takashima and Faller 2013).

#### 2.2.1.2. Les kinases Raf/MEK/ERK

La cible directe de Ras lorsqu'elle est liée au GTP dans la voie des MAPK est la famille des sérine/thréonine kinases Raf qui est composée de trois membres que sont A-Raf, B-Raf et C-Raf (également appelée Raf1). En absence de stimulation de la voie, Raf localise dans le cytosol et adopte une conformation fermée dans laquelle l'extrémité N-terminale régulatrice bloque le domaine catalytique présent à l'extrémité C-terminale (Cutler et al. 1998). L'interaction de Raf avec Ras qui se fait grâce au domaine RBD (Ras Binding Domain) présent à l'extrémité N-terminale de Raf mène à sa translocation à la membrane plasmique et à l'adoption d'une conformation ouverte qui expose alors la boucle d'activation de Raf (Terai and Matsuda 2005). Les mécanismes exacts d'activation de Raf sont complexes et font intervenir des événements de phosphorylation (Mason et al. 1999) et de dimérisation des protéines Raf (Luo et al. 1996). L'activation de Ras par les facteurs de croissance induit la translocation à la membrane plasmique de la protéine d'échafaudage KSR (Kinase Suppressor of Ras) qui lie les kinases Raf, MEK et ERK (Figure 12). Alors que l'interaction entre KSR et MEK est constitutive, l'association de Raf et ERK avec KSR nécessite l'activation de la voie. Dans ce contexte KSR permet d'amener les trois kinases du module à proximité et de favoriser leur activation (Figure 12) (Udell et al. 2011). En plus d'agir comme protéine d'échafaudage, KSR induit l'activation directe de Raf grâce à la formation d'un dimère avec son domaine catalytique (Rajakulendran et al. 2009).



Adapté de Kolch, *Nature Review Molecular Cell Biology*, 2005

### **Figure 13: Activation de la voie Ras/MAPK et des kinases RSK**

*La stimulation de récepteur tyrosine kinase conduit à leur autophosphorylation et au recrutement de la protéine adaptatrice Grb2. Celle-ci permet la translocation de SOS à la membrane plasmique et l'activation de la petite GTPase Ras qui a son tour recrute et active la kinase Raf du module Raf/ERK/MEK. Il s'ensuit l'activation séquentielle des kinases MEK, ERK et RSK, ces deux dernières contribuant à la phosphorylation de nombreux substrats et au contrôle de la croissance et de la prolifération cellulaire. Figure adaptée d'après (Kolch 2005).*

Les protéines MEK sont des kinases à double spécificité qui sont capables de phosphoryler à la fois des résidus tyrosine et sérine/thréonine. Leur phosphorylation sur deux sérines du domaine catalytique par les protéines Raf induit leur activation (Kyriakis et al. 1992; Alessi et al. 1994), B-Raf présentant la plus forte activité kinase envers MEK1 et MEK2 (Pritchard et al. 1995). À leur tour, les protéines MEK1 et MEK2 activent les kinases ERK, leurs seuls substrats, en phosphorylant le motif Thr-Glu-Tyr de leur boucle d'activation. Une fois activées, les MAPK ERK1/2 phosphorylent de nombreux substrats cytoplasmiques et nucléaires sur les résidus sérine/thréonine du motif consensus Thr/Ser-Pro, comme la famille des kinases RSK qui sont décrites dans la section suivante. À ce jour plus de 150 substrats des kinases ERK ont été identifiés, parmi ces substrats figurent des kinases, des facteurs de

transcription, des protéines du cytosquelette, des régulateurs de l'apoptose et d'autres qui contribuent à l'effet de la voie Ras/MAPK sur la prolifération et la survie cellulaire (Cargnello and Roux 2011).

La protéine B-Raf est une des kinases les plus mutées du génome humain, la grande majorité des mutations ont lieu dans le domaine kinase de Raf et induisent son activation constitutive. Ces mutations sont présentes dans de nombreux types de cancer, particulièrement dans les mélanomes (50-60%), les cancers de la thyroïde (30-50%) et les cancers colorectaux (5-20%) (Rahman et al. 2013). Jusqu'à présent plus de 65 mutations de B-Raf ont été rapportées, la plus fréquente étant la substitution de la valine 600 en acide glutamique qui représente plus de 90% des mutations observées de B-Raf (Cantwell-Dorris et al. 2011).

#### 2.2.1.3. La famille des kinases RSK

La famille des sérine/thréonine kinases RSK est composée de quatre isoformes (RSK1-2-3-4) qui partagent entre 70 et 80% d'homologie et présentent une structure atypique puisqu'elles possèdent deux domaines kinases fonctionnels et distincts, le NTKD (amino-Terminal Kinase Domain) et le CTKD (carboxy-Terminal Kinase Domain) (Jones et al. 1988; Fisher and Blenis 1996). Alors que le CTKD reçoit les signaux d'activation provenant de ERK et est nécessaire à l'activation du NTKD, seul ce dernier assure la phosphorylation des substrats de RSK et contribue aux fonctions biologiques associées à RSK (Cargnello and Roux 2011). Le domaine NTKD appartient à la famille des kinases AGC (protein kinase A, G, C) dont font partie Akt, PKC et S6K. Ces kinases phosphorylent des séquences identiques qui présentent le motif basique Arg-X-X-Ser/Thr (où X représente n'importe quel acide aminé) et de ce fait de nombreux substrats de RSK sont également phosphorylés par les kinases Akt, PKC et S6K.

L'activation des RSK a lieu de manière séquentielle et nécessite l'action des kinases ERK et PDK1 ainsi que du domaine kinase CTKD. Dans les cellules quiescentes, les kinases RSK et ERK interagissent ensemble grâce au domaine de liaison présent à l'extrémité C-terminale de RSK (Hsiao et al. 1994). Lors de stimulation par des mitogènes, ERK phosphoryle RSK sur le domaine CTKD ce qui conduit à l'activation de ce dernier. À son tour le CTKD phosphoryle RSK dans la région présente entre les deux domaines kinases ce qui

permet le recrutement de PDK1 qui phosphoryle alors le domaine NTKD et mène à l'activation complète de RSK et à la dissociation de ERK (Romeo et al. 2012). La kinase RSK peut alors phosphoryler ses substrats.

#### 2.2.1.4. Contrôle de la traduction par les kinases ERK et RSK

En plus de leur rôle dans l'activation du complexe mTORC1 présenté dans la section 2.1.2.1.2, de nombreuses études ont mis en évidence la participation des kinases RSK dans le contrôle de la traduction et du métabolisme des ARNm. La contribution des kinases ERK dans ces mécanismes tient quant à elle de leur capacité à activer les kinases RSK et à stimuler la voie mTOR elle-même impliquée dans le contrôle de la traduction. ERK régule également la traduction en activant les kinases Mnk (MAPK-interacting kinases) qui phosphorylent la sérine 209 sur eIF4E (Waskiewicz et al., 1999). L'impact de cet événement de phosphorylation sur la traduction globale n'est pas clairement établi, néanmoins des données récentes indiquent que la phosphorylation d'eIF4E affecte de manière sélective la traduction d'ARNm impliqués dans l'inflammation et la tumorigenèse (Furic et al., 2010).

Les premières données impliquant RSK dans la régulation de la synthèse protéique viennent de l'identification de RSK1 en tant que kinase *in vitro* de la protéine ribosomique S6 (Erikson and Maller 1985; Erikson and Maller 1986). Par la suite il a été montré que l'activation de RSK induit son recrutement aux polysomes où elle phosphoryle plusieurs protéines associées aux ribosomes (Angenstein et al. 1998). La capacité des RSK à phosphoryler S6 *in vivo* a été démontrée grâce à l'utilisation de cellules murines dont les gènes codant pour S6K1 et S6K2 ont été inactivés et à l'utilisation de la rapamycine (Pende et al. 2004; Roux et al. 2007). RSK phosphoryle S6 sur les sérines 235 et 236, ces événements de phosphorylation corrélant avec un assemblage du complexe eIF4F accru et la stimulation de la traduction dépendante de la coiffe (Roux et al. 2007). Ces données suggèrent ainsi que RSK est un régulateur additionnel de la synthèse protéique indépendant de la voie mTOR.

En plus de S6, RSK phosphoryle d'autres protéines de la machinerie traductionnelle comme le facteur d'initiation eIF4B (Shahbazian et al. 2006). Celui-ci permet de stimuler l'activité hélicase d'eIF4A (Rozen et al. 1990) et de faciliter la liaison du ribosome à l'ARNm lors de l'initiation de la traduction. La phosphorylation d'eIF4B par RSK stimule la traduction

dépendante de la coiffe en favorisant l'interaction d'eIF4B avec la sous-unité eIF3 du PIC (Holz et al. 2005; Shahbazian et al. 2006). RSK stimule également la traduction indirectement en phosphorylant et inhibant l'activité de deux kinases qui répriment la synthèse protéique : GSK3 $\beta$  et eEF2K. La kinase GSK3 $\beta$  inhibe l'activité GEF du facteur eIF2B en le phosphorylant sur la sérine 535. Cet évènement de phosphorylation conduit à l'inhibition du recyclage d'eIF2 et par conséquent à la répression de l'initiation de la traduction (Wang et al. 2001b). RSK en phosphorylant GSK3 $\beta$  sur la sérine 9, qui est également ciblée par les kinases AKT et S6K, bloque l'activité de GSK3 $\beta$  et lève ainsi l'inhibition d'eIF2B (Cohen and Frame 2001). La kinase eEF2K quant à elle phosphoryle le facteur d'élongation eEF2 sur la thréonine 56 et inhibe l'étape d'élongation (Kaul et al. 2011). En réponse aux mitogènes, RSK phosphoryle et inhibe eEF2K ce qui a, une fois de plus, pour effet de stimuler la traduction (Wang et al. 2001a).

Finalement, en collaboration avec ERK1/2, RSK2 a été impliquée dans la synthèse des ARNr et dans la croissance cellulaire. RSK stimule l'activité du facteur de transcription TIF1A qui est requis pour l'activité de l'ADN polymérase 1 et contribue par ce biais à la transcription des ARNr (Zhao et al. 2003). Tous ces exemples démontrent l'importance de RSK dans le contrôle à différents niveaux de l'expression des gènes et de la synthèse protéique.

### 2.2.2. Le module JNK

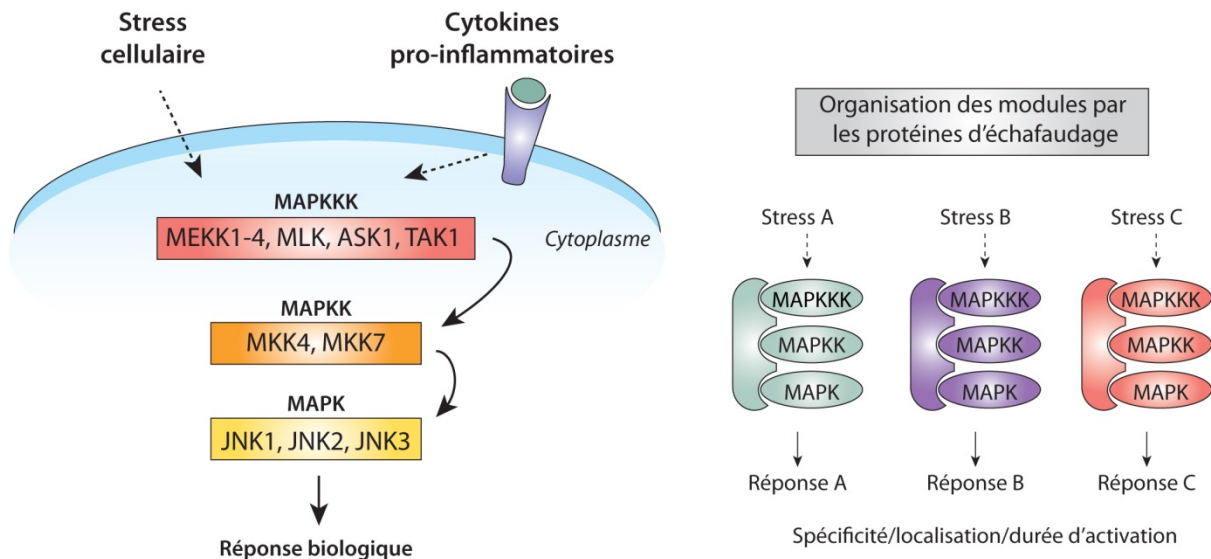
À la différence de la voie Ras/ERK, les modes d'activation et les fonctions des kinases JNK sont moins bien connus. La kinase JNK fut initialement identifiée comme kinase activée par le cycloheximide, une drogue bloquant la synthèse protéique chez les eucaryotes (Kyriakis and Avruch 1990). La famille des kinases JNK est composée de trois membres JNK1, JNK2 et JNK3 qui sont codés par trois gènes et qui partagent ensemble plus de 85% d'homologie de séquence (Derijard et al. 1994; Kallunki et al. 1994; Sluss et al. 1994). Chaque kinase est exprimée sous deux formes, une courte de 46 kDa et une longue de 54 kDa, s'ajoute à cela l'épissage alternatif des transcrits des JNK qui génère au moins dix isoformes se distinguant dans leur capacité à lier et à phosphoryler leurs substrats (Gupta et al. 1996). Alors que l'expression de JNK1/JNK2 se retrouve dans tous les tissus, l'expression de JNK3 est quant à elle restreinte au cerveau (Davis 2000). L'inactivation ciblée de chaque kinase JNK a permis

d'identifier les processus cellulaires auxquels elles participent comme la réponse à l'inflammation, l'apoptose, la différenciation et la prolifération cellulaire (Johnson and Nakamura 2007).

#### 2.2.2.1. Mécanismes d'activation

Les kinases JNK sont activées par de nombreux stimuli tels que le stress cellulaire (choc thermique, stress oxydant, radiations ionisantes, agents causant des dommages à l'ADN, inhibiteurs de synthèse protéique) et les cytokines pro-inflammatoires (TNF : Tumor Necrosis Factor, IL-1 : InterLeukin 1) (Bogoyevitch et al. 2010). Tout comme les ERK, l'activation des JNK requiert la phosphorylation des résidus thréonine et tyrosine du motif Thr-Pro-Tyr situé dans le domaine kinase (Derijard et al. 1994). Ces événements de phosphorylation sont assurés par les kinases MKK4 et MKK7 qui coopèrent dans l'activation des JNK (Lawler et al. 1998; Fleming et al. 2000). Les kinases MKK4 et MKK7 sont également exprimées sous plusieurs isoformes qui possèdent des activités basales différentes et qui ne sont pas activées par les mêmes kinases en amont de la voie (Tournier et al. 1999). Alors que les MKK7 sont responsables de l'activation de JNK en réponse aux cytokines pro-inflammatoires, les MKK4 activent JNK préférentiellement dans des conditions de stress cellulaire.

L'activité des kinases MKK4 et MKK7 est stimulée par la phosphorylation des résidus sérine et thréonine du motif Ser-X-Ala-Lys-Thr de leur boucle d'activation. À ce jour quatorze MAPKKK telles que MEKK1-4, MLK (Mixed Lineage Kinase), ASK1 (Apoptosis Signal-regulated Kinase 1) et TAK1 (TGF $\beta$ -Activated Kinase 1) ont été impliquées dans l'activation des kinases MKK4 et MKK7 (Haeusgen et al. 2011). Certaines d'entre elles sont capables d'activer à la fois MKK4 et MKK7, d'autres au contraire sont restreintes à l'activation d'une des deux. Le module JNK est donc composé de plusieurs kinases ou isoformes à chaque niveau (MAPKKK, MAPKK, MAPK) qui sont activées par une grande variété de stimuli (Figure 13). L'activation sélective de JNK est rendue possible grâce à l'action coordonnée de protéines d'échafaudage et de domaines d'interaction entre JNK et ses kinases activatrices. Les protéines d'échafaudage de la voie telles que les JIP (JNK Interacting Protein) facilitent l'activation des JNK et contrôlent la localisation cellulaire du module (Haeusgen et al. 2011).



Adapté de Wagner and Nebreda, Nature Review Cancer 2009

### **Figure 14. Activation de la voie JNK**

Les kinases JNK sont activées par le stress cellulaire (UV, agents génotoxiques, chocs thermique et osmotique, stress oxydant) et les cytokines pro-inflammatoires. Une multitude de MAPKKK est alors engagée de façon spécifique dans l'activation des kinases MKK4-MKK7 qui phosphorylent et activent directement les kinases JNK. La spécificité d'activation et de réponse cellulaire selon le type de stress engagé dans la cellule est assurée par des protéines d'échafaudage qui interagissent avec les kinases du module. Figure adaptée d'après (Wagner and Nebreda 2009).

#### 2.2.2.2. Rôle des JNK dans le métabolisme cytoplasmique des ARNm

Les kinases JNK ont été impliquées dans le contrôle de la stabilité de certains messagers. Le premier exemple est le cas de l'ARNm de l'IL-2. En réponse à l'activation des cellules T, l'ARNm de l'IL-2 est stabilisé par JNK grâce à la présence d'un élément dans le 5'UTR qui est reconnu par les protéines nucléolin et YB-1 (Chen et al. 1998; Chen et al. 2000). JNK contrôle également la stabilité d'autres ARNm, notamment ceux qui présentent des éléments ARE dans leur 3'UTR (voir section 1.2.1.2.3). L'ARNm du VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) est stabilisé par les kinases JNK et p38 (Pages et al. 2000), l'ARNm de l'IL-3 est stabilisé par JNK dans les mastocytes (Ming et al. 1998) et celui d'iNOS (inducible Nitric Oxide Synthase) dans les cellules épithéliales de poumon par un

mécanisme qui fait intervenir la protéine TTP (Korhonen et al. 2007). Finalement JNK stabilise l'ARNm du LDL (Low Density Lipoprotein) par un mécanisme indépendant des éléments ARE (Vargas et al. 2009). Les mécanismes qui contribuent à l'effet de JNK sur la stabilité de ces ARNm ne sont pas connus mais il est très possible qu'ils interviennent à plusieurs niveaux, de la modulation de l'expression de protéines de liaison à l'ARN impliquées dans la stabilisation des ARNm au contrôle de la localisation des ARNm en passant par l'activation/inhibition de facteurs de la machinerie de dégradation des ARNm.

Des études récentes ont établi un lien entre JNK et la localisation des ARNm au sein des P-bodies (voir section 1.2.2.1). L'inhibition de JNK par le SP600125 affecte l'assemblage des P-bodies tandis que l'activation de la voie par le stress oxydant et les cytokines favorise leur formation (Rzeczkowski et al. 2011; Cargnello et al. 2012). JNK qui localise aux P-bodies dans de telles conditions, régule directement l'activité de facteurs impliqués dans la répression de la traduction et dans la dégradation des ARNm en phosphorylant les protéines 4E-T et Dcp1a. La protéine 4E-T est un répresseur de la traduction qui séquestre eIF4E aux P-bodies (Andrei et al. 2005; Ferraiuolo et al. 2005; Kamenska et al. 2013). La phosphorylation de 4E-T par JNK est requise pour la formation des P-bodies en réponse au stress (Cargnello et al. 2012) ce qui suggère que JNK participe à la répression de la traduction des ARNm associés à 4E-T en contrôlant la localisation de 4E-T. La protéine Dcp1a qui est le cofacteur du complexe de décoiffage Dcp1/Dcp2 (voir section 1.2.1.1.2) participe à la dégradation globale des ARNm. La phosphorylation de Dcp1 par JNK contrôle quant à elle sa localisation et potentiellement son activité de dégradation (Rzeczkowski et al. 2011).



### 3. Objectifs de la thèse

Comme nous venons de le voir, le contrôle de la synthèse protéique est crucial dans le maintien de l'homéostasie cellulaire et sa dérégulation est associée à de nombreuses pathologies humaines telles que le diabète, l'obésité et le cancer. Ce contrôle est assuré en grande partie par des voies de signalisation qui agissent au niveau de la traduction mais aussi de la stabilité des ARNm. La coiffe des ARNm est un élément central dans ces deux processus, son association avec le facteur d'initiation de la traduction eIF4E permettant d'engager les ARNm dans la traduction dépendante de la coiffe et de prévenir la dégradation des transcrits. eIF4E est donc une cible majeure dans la régulation du métabolisme des ARNm cytoplasmiques dont l'activité traductionnelle est réprimée par son interaction avec les protéines 4E-BP, elles-mêmes régulées par la protéine kinase mTOR. En plus des 4E-BP, eIF4E est également régulé par son association avec la protéine 4E-T mais peu de choses sont connues quant au rôle de 4E-T dans la modulation de l'activité d'eIF4E. **Mon projet de thèse s'est articulé autour de deux objectifs principaux, le premier consistant à déterminer de nouveaux mécanismes moléculaires qui participent au contrôle de la traduction et plus particulièrement à la régulation du complexe d'initiation de la traduction et le second en l'étude de la régulation d'eIF4E par 4E-T.**

Le premier objectif nous a amené à caractériser par quels mécanismes les facteurs de croissance contribuent à l'activation du complexe mTORC1. Dans cette optique nous avons montré que la voie Ras/ERK, par le biais des kinases RSK, stimule directement l'activité de mTORC1. Dans un deuxième temps, nous nous sommes intéressés au rôle joué par mTORC1 dans l'initiation de la traduction et avons identifié de nouveaux facteurs sous le contrôle de mTORC1 qui participent à ce processus. La protéine LARP1 a ainsi été identifiée comme effecteur majeur de mTORC1 dans la traduction des ARNm.

Le second objectif nous a amené à étudier l'effet des voies de signalisation induites par le stress, plus particulièrement la voie JNK, sur l'activité de 4E-T. Nos travaux ont montré que JNK contrôle la localisation de 4E-T, et par conséquent celle d'eIF4E, en réponse au stress et contribue ainsi à la répression de la traduction.

# **Chapitre 2: Oncogenic MAPK Signaling Stimulates mTORC1 Activity by Promoting RSK-Mediated Raptor Phosphorylation**

**Running title:** RSK stimulates mTORC1 activity by phosphorylating Raptor

**Audrey Carrière,<sup>1</sup> Marie Cargnello,<sup>1</sup> Louis-André Julien,<sup>1</sup> Huanhuan Gao,<sup>1</sup> Éric Bonneil,<sup>2</sup> Pierre Thibault,<sup>2</sup> and Philippe P. Roux<sup>1,\*</sup>**

<sup>1</sup>Department of Pathology and Cell Biology, Faculty of Medicine

<sup>2</sup>Department of Chemistry, Faculty of Arts and Sciences, Université de Montréal, Institute for Research in Immunology and Cancer (IRIC), P.O. Box 6128, Station Centre-ville, Montréal, QC, H3C 3J7, Canada

**Keywords:** signal transduction; cancer; mRNA translation; mTOR; Raptor; phosphorylation; MAPK; RSK; protein kinases

Article publié dans: **Current Biology, 2008 Sep; 18(17): 1269–77**

## Mise en contexte

Au moment où nous avons commencé notre étude, la protéine Raptor avait été identifiée comme partenaire nécessaire à l'activité du complexe mTORC1 (Hara et al. 2002; Kim et al. 2002) qui agit comme protéine d'échafaudage pour recruter les substrats du complexe (Nojima et al. 2003; Schalm et al. 2003). Bien qu'essentielle à l'activité de mTOR, les mécanismes régulant la fonction de Raptor n'étaient pas connus.

Le Dr Philippe Roux avait précédemment montré que les kinases RSK, qui sont directement activées par ERK, stimulaient l'activité de mTORC1 en phosphorylant et inhibant la protéine TSC2 (Roux et al. 2004) démontrant ainsi que les voies Ras/MAPK et mTOR n'étaient pas indépendantes. De plus la phosphorylation de Raptor sur des sites potentiellement ciblés par RSK avait été rapportée lors d'un criblage protéomique cherchant à identifier de nouveaux substrats de la voie Ras/MAPK (données du laboratoire non publiées). Ensemble, ces données nous ont amenés à émettre l'hypothèse que RSK pouvait réguler l'activité du complexe mTORC1 en phosphorylant directement une de ses composantes, Raptor.

Nous avons montré dans cette étude que Raptor est un substrat de la voie Ras/MAPK et grâce à l'utilisation d'inhibiteurs pharmacologiques et de l'interférence à l'ARN, nous avons démontré que les kinases RSK phosphorylent directement Raptor en réponse à l'activation de la voie Ras/MAPK. Par des études de spectrométrie de masse quantitative et par la génération de mutants non-phosphorylables, nous avons montré que les protéines RSK phosphorylent Raptor sur les Sérine 719, 721 et 722. La mutation de ces trois serines en alanine prévient l'activation de mTORC1 par la voie Ras/MAPK et démontre ainsi que la phosphorylation de Raptor par RSK est cruciale pour l'activité catalytique de mTOR.

## **Contribution des auteurs**

Audrey Carrière a participé à la conception du projet, à la génération et l'analyse des résultats, à la conception des figures et à la rédaction de l'article.

Marie Cargnello a participé à la préparation des constructions Raptor (figure 4), à l'analyse de la phosphorylation de Raptor (figures 2 et 5) et de l'interaction entre Raptor et 4E-BP (figure 5).

Louis-André Julien a participé à l'analyse de la phosphorylation de Raptor (figures 2 et 5).

Huanhuan Gao a participé à la préparation des constructions Raptor (figure 4).

Eric Bonneil a réalisé les analyses de spectrométrie de masse (figure 3).

Pierre Thibault a participé à l'analyse des données de spectrométrie de masse (figure 3) et a commenté le manuscrit.

Philippe Roux a supervisé le projet, analysé les résultats et rédigé l'article.

## Summary

**Background:** The mammalian target of rapamycin (mTOR) is a Ser/Thr kinase that controls cell growth in response to mitogens, and amino acid and energy sufficiency. The scaffolding protein Raptor binds to mTOR and recruits substrates to the rapamycin-sensitive mTOR complex 1 (mTORC1). Although Raptor was shown to be essential for mTORC1 activity, the mechanisms regulating Raptor function remain unknown.

**Results:** Here, we demonstrate that Raptor becomes highly phosphorylated on RXXpS/T consensus motifs following activation of the Ras/mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway. Using pharmacological inhibitors and RNA interference, we show that the p90 ribosomal S6 kinases (RSKs) 1 and 2 are required for Raptor phosphorylation in vivo, and directly phosphorylate Raptor in vitro. Quantitative mass spectrometry and site-directed mutagenesis revealed that RSK specifically phosphorylates Raptor within an evolutionarily conserved region with no previously known function. Interestingly, expression of oncogenic forms of Ras and MEK that elevate mTORC1 activity induced strong and constitutive phosphorylation of Raptor on these residues. Importantly, we demonstrate that expression of Raptor mutants lacking RSK-dependent phosphorylation sites markedly reduced mTOR phosphotransferase activity, demonstrating that RSK-mediated phosphorylation of Raptor is important for mTORC1 activation by the Ras/MAPK pathway.

**Conclusions:** We propose a unique mode of mTOR regulation in which RSK-mediated phosphorylation of Raptor regulates mTORC1 activity, suggesting a means by which the Ras/MAPK pathway promotes rapamycin-sensitive signaling independently of the PI3K/Akt pathway.

## Introduction

The mammalian target of rapamycin (mTOR) is a conserved Ser/Thr kinase that integrates signals from nutrients, energy sufficiency and growth factors to regulate mammalian cell growth as well as organ and body size in a variety of organisms [1, 2]. mTOR was discovered as the molecular target of rapamycin, an antifungal agent used clinically as an immunosuppressant and more recently, as an anti-cancer drug [3]. Emerging evidence indicates that deregulation of the mTOR pathway occurs in many types of cancer [4, 5], underscoring the importance of understanding how this pathway is regulated by oncogenic and mitogenic cues.

mTOR forms two distinct multiprotein complexes, the rapamycin-sensitive and -insensitive mTOR complex (mTORC) 1 and 2, respectively [6]. mTORC1 consists of the mTOR catalytic subunit and three associated proteins, Raptor, mLST8 and PRAS40. Activated mTORC1 phosphorylates two main regulators of mRNA translation and ribosome biogenesis, S6K1 and 4E-BP1, thus stimulating protein synthesis [7, 8]. The molecular functions of most mTOR-associated proteins are not understood, but Raptor has been proposed to work as a scaffolding protein that recruits mTOR substrates through their TOR signaling (TOS) motif [9, 10]. Inhibition of Raptor expression using RNA interference (RNAi) decreases mTORC1 activity and reduces cell size, indicating that Raptor is an essential mediator of mTORC1 action in vivo and plays a crucial role in mTOR activation [11-13]. However, the molecular mechanisms by which Raptor regulates mTORC1 activity and how Raptor function is modulated by growth factors and oncogenes remain unknown.

The mechanisms underlying mTORC1 regulation are not fully understood, but the key upstream player appears to be the small GTPase Rheb, which is negatively regulated by the dimeric TSC1-TSC2 GTPase-activating protein (GAP) complex [14]. It is now appreciated that several pathways in addition to the insulin-stimulated PI3K/Akt pathway signal to mTORC1 by modulating TSC1-TSC2 activity toward Rheb. For example, energy deprivation sensed by AMPK [15] and hypoxia [16] regulate TSC1-TSC2 activity and Rheb GTP loading. Moreover, the Ras/mitogen-activated protein kinase (MAPK) signaling pathway positively regulates mTORC1 activity through extracellular signal-regulated kinase (ERK)- and p90 ribosomal S6 kinase (RSK)-mediated phosphorylation and inactivation of TSC2 [17-21].

Herein, we describe a novel link between the Ras/MAPK pathway and mTORC1 signaling. We demonstrate that Raptor is phosphorylated mainly on three serine residues by the RSK1 and RSK2 protein kinases *in vitro* and *in vivo*. We find that RSK-mediated phosphorylation of Raptor positively regulates mTORC1 kinase activity stimulated by the Ras/MAPK pathway. Our findings propose a unique mode of mTOR regulation by which Raptor acts as a molecular sensor that integrates growth signals and promotes mTORC1 signaling.

## Results

### **An Approach Using a Phospho-Motif Antibody Identifies Raptor as a Substrate of Ras/MAPK Signaling**

Raptor phosphorylation was analyzed using an antibody that recognizes the phosphorylated consensus motif Arg/Lys-*X*-Arg/Lys-*X-X*-pSer/Thr (R*X*R*X*XpS/T, where *X* is any aa), which is found in substrates of many AGC family kinases, including RSK [20], Akt and S6K1 [22]. HEK293 cells transfected with myc-tagged Raptor were stimulated with different mitogens and growth factors, and immunoprecipitated Raptor was analyzed for phosphorylation by immunoblotting using the R*X*R*X*XpS/T phospho-motif antibody. Using this method, we found that potent agonists of the Ras/MAPK pathway, such as the phorbol ester PMA and epidermal growth factor (EGF), robustly stimulated Raptor phosphorylation at R*X*R*X*XpS/T consensus sites in HEK293 cells (Figure 1A), as well as in HeLa and NIH-3T3 cells (data not shown). This antibody specifically recognized Raptor when phosphorylated, as phosphatase treatment of immunoprecipitated Raptor resulted in a complete loss of immunoreactivity (Figure S1A). Because EGF also weakly stimulates the PI3K/Akt pathway, we tested serum and insulin which are potent stimulators of Akt phosphorylation at Ser473 and found that these agonists did not promote Raptor phosphorylation (Figure 1A). To further assess the role of PI3K signaling in Raptor phosphorylation, cells were treated with increasing concentrations of insulin or transfected with a constitutively-activated form of Akt (myristoylated Akt). As shown in Figure S1B, whereas PMA strongly stimulated the Ras/MAPK pathway and Raptor phosphorylation, no phosphorylation was detected under conditions where Akt phosphorylation was potently stimulated. Together, these data strongly implicate Raptor as a phosphorylation target of the Ras/MAPK pathway.

### **RSK1 and RSK2 Phosphorylate Raptor In Vivo and In Vitro**

We next wanted to identify the kinase(s) responsible for Raptor phosphorylation on R*X*R*X*XpS/T consensus motifs following activation of the Ras/MAPK pathway. Cells were pre-treated with the inhibitor U0126 to block MEK1/2 downstream signaling. Interestingly, Raptor phosphorylation was almost completely abrogated by U0126 treatment (Figure 1B), suggesting that a kinase located downstream of MEK1/2 is involved in Raptor



phosphorylation. RSK and S6K represent two potential kinases stimulated by MEK1/2 signaling capable of phosphorylating Raptor at RXXpS/T consensus motifs. To test their implication in Raptor phosphorylation, cells were pre-treated with the mTORC1 inhibitor rapamycin to inhibit mTOR-mediated S6K activation. While rapamycin treatment efficiently inhibited S6K-mediated S6 phosphorylation at Ser240/44 (Figure 1B), Raptor phosphorylation remained unaltered. Consistent with a role for RSK, we found that treatment of cells with BI-D1870, a recently identified pan-RSK inhibitor [23], completely abolished Raptor phosphorylation upon PMA (Figure 1C) and EGF treatments (data not shown). The specificity of this RSK1-4 ATP antagonist has recently been tested against a panel of over 60 protein kinases and remarkably, was found to be very selective against RSK family members when used on cells in the low  $\mu\text{M}$  range [24].

To confirm the direct involvement of RSK in Raptor phosphorylation, we used small interfering RNA (siRNA)-mediated RNAi to specifically reduce expression of RSK1 and RSK2, the two predominantly expressed isoforms of RSK in HEK293 cells [25]. Importantly, siRNA-mediated knockdown of RSK1 and RSK2 resulted in complete inhibition of Raptor phosphorylation (Figure 1D), demonstrating that endogenous RSK1 and RSK2 mediate Raptor phosphorylation in cells. To further assess the role of RSK, HEK293 cells were cotransfected with Raptor and different RSK mutants. Compared to control, expression of wt RSK1 (Figure 1E), as well as RSK2, RSK3 and RSK4 (Figure S2A), specifically increased Raptor phosphorylation following PMA stimulation, suggesting that Raptor is a common RSK family substrate. Moreover, expression of a constitutively-activated form of RSK1 (myristoylated RSK1) induced Raptor phosphorylation even in the absence of serum and PMA stimulation (Figure 1E), consistent with the idea that RSK is required and sufficient to stimulate Raptor phosphorylation in cells. RSK1 phosphotransferase activity was found to be required to stimulate Raptor phosphorylation, as a RSK1 mutant with inactivating mutations in both kinase domains (K112/464R)[18] did not increase Raptor phosphorylation over the level already stimulated by endogenous RSK activity (Figure 1E).

To verify whether RSK could directly phosphorylate Raptor, we performed *in vitro* kinase assays using purified proteins. HEK293 cells were transiently transfected with wt or kinase-inactive HA-tagged RSK1, and purified RSK1 from unstimulated or PMA-treated cells

were incubated with full length Raptor immuno-purified from serum-deprived cells. While no incorporation of [<sup>32</sup>P] label was seen in purified Raptor incubated with unstimulated RSK1 or the kinase-inactive RSK1, we found that activated RSK1 robustly increased [<sup>32</sup>P] incorporation in purified Raptor (Figure 1F). In a similar experiment performed without radioactivity, we found that wt, but not kinase-inactive RSK1, robustly stimulated the phosphorylation of purified Raptor at RXXpS/T consensus sites (Figure 1G). These experiments were also performed using recombinant GST-Raptor as substrate, and consistent with aforementioned data, was found to be an excellent in vitro substrate for RSK (Figure S1C). Together, our data indicate that RSK directly promotes Raptor phosphorylation in vivo and in vitro at RXXpS/T consensus sites.

### **Constitutive Phosphorylation of Raptor in Cells with Oncogenic Activation of the Ras/MAPK Signaling Cascade**

Ras proteins are often mutated in human cancers to constitutively activate growth signaling cascades, including the MAPK, PI3K and mTOR pathways [26]. To determine if oncogenic forms of Ras and its downstream effector kinase MEK stimulate Raptor phosphorylation, cells were transfected with active (G12V) and inactive (S17N) mutants of H-Ras, or a constitutively-activated form of MEK1 (MEK1-DD)(Figure 2A). Interestingly, we found that transient (Figure 2B and 2C) or stable (data not shown) expression of either RasG12V or MEK1-DD strongly stimulated Raptor phosphorylation in the absence of serum or growth factors. We also found that overexpression of wt ERK2 increased Raptor phosphorylation upon PMA stimulation (Figure 2D), demonstrating that oncogenic and mitogenic stimulations of the Ras/MAPK pathway promote Raptor phosphorylation. Importantly, we show that activated MEK-induced Raptor phosphorylation was drastically inhibited by the BI-D1870 inhibitor or RSK1/2 RNAi (Figure 2E), demonstrating the requirement for RSK in Raptor phosphorylation induced by oncogenic Ras/MAPK signaling.

## **Ser719, Ser721 and Ser722 are the Predominant RSK-Dependent Phosphorylation Sites in Raptor**

To identify RXXpS/T phosphorylation sites in Raptor, quantitative mass spectrometry (MS) analyses were performed on immunoprecipitated myc-tagged Raptor derived from unstimulated and PMA stimulated cells. Combined ion profiling and MS/MS peptide sequencing analyses were performed to correlate abundance changes of identified phosphopeptides across the different experimental paradigms (Figure 3A). Using this approach, we identified two phosphopeptides corresponding to phosphorylated Ser719 and Ser722, showing more than 10-fold change in phosphorylation upon PMA stimulation (Figure 3B). In contrast to these findings, another phosphopeptide (Ser877) identified in this study showed no statistically significant change in phosphorylation upon PMA stimulation. Importantly, treatment of cells with either U0126 or BI-D1870 significantly decreased the relative abundance of the observed Ser719/722 phosphopeptides (Figure 3B), thereby confirming that phosphorylation of these sites requires MEK- and RSK- dependent signaling. Identification of Ser719 and Ser722 as phosphorylation sites was obtained using MS/MS sequencing and the assignment is shown for these residues in the corresponding tryptic peptides (Figure 3C and 3D). Importantly, similar findings were obtained when endogenous Raptor was immunoprecipitated from cells and analyzed using this method (data not shown). Ser719 and Ser722 are located close to the HEAT repeats of Raptor (Figure 3E), suggesting that this region integrates upstream signals that may regulate Raptor function.

To determine if RSK targets Ser719 and Ser722 for phosphorylation, these sites were mutated to unphosphorylatable alanine residues (S719A and S722A). Although not reproducibly identified by MS, we also mutated nearby Ser721 as this residue lies within an optimal RSK consensus sequence (Figure 4A). Interestingly, all three serine residues are conserved from *Drosophila* to humans (Figure 4B), suggesting that they play an important and evolutionarily conserved function. While mutation of Ser721 only slightly but reproducibly reduced Raptor phosphorylation, we found that mutation of either Ser719 or Ser722 drastically decreased the phosphorylation of Raptor following PMA stimulation (Figure 4C). Importantly, when combined into a single Raptor mutant (S719/721/722A, from here on termed 3A), mutation of all three serine residues completely inhibited Raptor phosphorylation upon

stimulation of the Ras/MAPK pathway. We also analyzed the potential involvement of additional putative RXXpS/T phosphorylation sites in Raptor. Importantly, mutagenesis of Ser59 and Ser791 did not reduced Raptor phosphorylation following PMA stimulation (Figure 4D), indicating that RSK does not phosphorylate these residues in cells. The specificity of RSK towards Ser719, Ser721 and Ser722 was also confirmed in vitro. Mutation of all three residues almost completely inhibited RSK-mediated [<sup>32</sup>P] incorporation in immuno-purified full length Raptor (Figure 4E) and in recombinant GST-Raptor (Figure S1C), confirming that RSK predominantly phosphorylates Raptor at these residues both in vitro and in vivo.

### **Raptor Phosphorylation Regulates mTORC1 Activity**

To assess whether Raptor phosphorylation regulates its association with mTOR or the recruitment of mTOR substrates, cells were transfected with Raptor wt or 3A, and association of mTOR, S6K1 and 4E-BP1 was assessed following immunoprecipitation. Interestingly, we found that the Raptor 3A mutant bound as efficiently as wt Raptor to 4E-BP1 (Figure 5A) and S6K1 (Figure S3), indicating that Raptor phosphorylation does not regulate TOS motif-mediated binding. To determine if Raptor phosphorylation affected its interaction with mTOR, cells were transfected with mTOR and Raptor wt or 3A, and the presence of mTOR within Raptor immunoprecipitates was determined by immunoblotting. As shown in Figure 5B, we found that the Raptor 3A mutant bound as efficiently as wt Raptor to mTOR, indicating that phosphorylation of these residues does not regulate Raptor-mTOR interactions.

Next, we determined whether Raptor phosphorylation regulates mTORC1 activity using an in vitro mTOR phosphotransferase activity assay using recombinant GST-4E-BP1 as substrate. Our assay specifically monitored mTORC1 activity as 4E-BP1 phosphorylation was exclusively detected within Raptor immunoprecipitates (Figure 5C), was sensitive to rapamycin treatment (Figure S4A), and required a functional mTOR kinase domain (Figure S4B). Under these conditions, activation of the Ras/MAPK pathway using PMA robustly stimulated mTORC1 activity (Figure 5D). Importantly, we found that mTOR kinase activity associated to the 3A mutant of Raptor was dramatically lower than that associated to wt Raptor, suggesting that Raptor phosphorylation by RSK positively stimulates mTORC1 activity. Since we found that insulin did not stimulate Raptor phosphorylation, we were

interested in determining whether insulin-stimulated mTORC1 activity was affected by mutation of Raptor. Interestingly, we found that insulin stimulation led to comparable activation of mTORC1 in cells expressing wt or the 3A mutant of Raptor (Figure 5E). The role of RSK in Ras/MAPK-dependent activation of mTORC1 was confirmed by the finding that overexpression of all RSK isoforms increases the phosphorylation of S6K and 4E-BP1 on Thr389 and Thr37/46, respectively, sites known to be exclusively phosphorylated by activated mTOR (Figure S2A). Consistent with a positive role for RSK in mTORC1 activation, we found that BI-D1870 treatment decreased PMA-induced activation of mTORC1 as reflected by a reduction in phosphorylation of S6K and 4E-BP1 (Figure S2B), as well as S6 on Ser240/44 (Figure 1C, 2E and S2B), residues that are exclusively phosphorylated by activated S6K as previously reported [25].

These data support a novel and specific role for the Ras/MAPK pathway in mTORC1 activation, whereby RSK-mediated phosphorylation of Raptor promotes mTORC1 activity independently of the PI3K/Akt pathway (Figure 6).

## Discussion

Our findings demonstrate that the Ras/MAPK pathway regulates mTOR signaling using a twofold mechanism. While previous studies indicated that both ERK and RSK stimulate Rheb GTP-loading through the inactivation of TSC2 [17-19], we show herein that RSK also directly targets the mTORC1 complex by phosphorylating Raptor and thereby promoting mTORC1 kinase activity (Figure 6). RSK phosphorylates three evolutionarily conserved serine residues on Raptor that lie within a region with no homology to known functional domains. Our findings suggest that this region may play a novel function in conferring the capacity to respond to upstream signaling. While Ser721 lies within a classical RSK consensus sequence (RXRXXpS/T), Ser719 is located within a minimal phosphoacceptor sequence (RXXpS) which was found to be sufficient in other RSK substrates, such as DAPK, c-Fos and CREB [20, 21]. Interestingly, Ser722 is located at the +1 position of the classical RSK consensus motif, suggesting that under some circumstances, RSK efficiently phosphorylates residues located just outside of its consensus. We have previously found that RSK promotes phosphorylation of TSC2 at both Ser1798 and Ser1799, which represents another situation where RSK specificity can extend to the +1 serine residue (P. Roux, B. Ballif, unpublished observation)[18].

Whereas mutation of Raptor at RSK-dependent phosphorylation sites did not reduce its ability to interact with mTOR or TOS motif-containing substrates (4E-BP1 and S6K1), our data indicate that these phosphorylation events strongly and positively regulate mTORC1 kinase activity. These findings suggest that Raptor phosphorylation modulates mTORC1 activity without altering the scaffolding function between mTOR and at least some of its substrates. Recent structural evidence indicate that the C-terminal region of the yeast analog of Raptor (named KOG-1), including the HEAT and WD40 repeats, closely interact with the N-terminal portion of TOR [27]. The position of the RSK phosphorylation sites on Raptor suggests that they could promote a conformational change in the mTOR-Raptor complex that would allow activation of the catalytic activity of mTOR. This could result from specific association or dissociation of regulatory proteins to the mTORC1 complex, leading to the direct regulation of mTOR activity. Another possibility is that Raptor phosphorylation could suppress the activity or interaction of mTORC1 with a negative regulator and therefore promote mTORC1 activity. Although many studies investigated the upstream regulation of

mTORC1, very few have reported the regulation of mTOR activity through the direct modification of mTORC1 constituents. The PI3K/Akt pathway was shown to directly regulate mTORC1 activity via the phosphorylation of PRAS40, a component of the mTORC1 complex. While PRAS40 phosphorylation at Thr246 was not found to be regulated by Ras/MAPK signaling [28], we have also determined that PRAS40 binding to Raptor was unaltered by RSK-mediated phosphorylation (data not shown). It has recently been demonstrated that Raptor phosphorylation by AMPK negatively controls mTORC1 activity [29]. Together with the present study, these new findings suggest that, as for TSC2, Raptor appears to be a major signal integrator that interprets cell growth cues as well as energy sufficiency.

Our findings also highlight the interrelation between the Ras/MAPK and mTOR pathways, both frequently deregulated in human cancers. Hyperactivation of mTOR has been described in several cancers harboring oncogenic activation of Ras [4, 5, 30], and mTORC1 activity was shown to be essential for Ras-mediated proliferation and transformation [31]. While the molecular mechanisms at the origin of mTOR hyperactivation in cancer cells remain to be fully elucidated, the constitutive Raptor phosphorylation observed in cells expressing oncogenic forms of Ras and MEK suggests that rapamycin may be of therapeutic value for the treatment of cancers with activating mutations in the Ras/MAPK pathway.

## **Experimental Procedures**

### **Cell Culture and Transfection**

HEK293, HeLa and NIH-3T3 cells were maintained in DMEM supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) and antibiotics. HEK293 and NIH-3T3 cells were transfected using calcium-phosphate as described previously [18]. HeLa cells were transfected with Fugene (Roche) according to the manufacturer's instructions. Cells were grown for 24 hours following transfection and starved of serum where indicated for 16-18 hours. Starved cells were pre-treated with wortmannin (100 nM), U0126 (10  $\mu$ M), rapamycin (100 nM)(Biomol, Plymouth Meeting, PA) or BI-D1870 (10  $\mu$ M)[23], and stimulated with either FBS (10%), insulin (100 nM), epidermal growth factor (EGF; 50 ng/ml)(Invitrogen) or phorbol 13-myristate 12-acetate (PMA; 25-100 ng/ml)(Biomol) before harvesting.

### **Immunoprecipitations and Immunoblotting**

Cell lysates were prepared as described previously [18]. For mTOR immunoprecipitations, cells were harvested in CHAPS lysis buffer (40 mM HEPES pH 7.4, 2 mM EDTA, 10 mM sodium pyrophosphate, 10 mM  $\beta$ -glycerophosphate, 0.3% CHAPS). Immunoprecipitations were carried out with the indicated antibody for 2 hrs followed by 1 hr incubation with Protein A-Sepharose CL-4B beads (GE Healthcare). Immunoprecipitates were washed thrice in lysis buffer and along with total cell lysates were subjected to SDS-PAGE and electroblotted onto nitrocellulose. The data presented is representative of at least three independent experiments.

### **In Vitro Kinase Reactions**

RSK in vitro kinase assays were performed as previously described (Roux, 2004 #970), using immuno-purified myc-Raptor (2  $\mu$ g per assay) or bacterially purified recombinant GST-Raptor (2  $\mu$ g per assay). For mTOR kinase assays, beads from immunoprecipitations were washed thrice in CHAPS lysis buffer followed by three washes in CHAPS buffer supplemented with 150 mM NaCl. Assays were performed for 30 min at 30°C with bacterially-purified recombinant GST-4EBP1 (2  $\mu$ g per assay) and 10  $\mu$ Ci  $\gamma$ [<sup>32</sup>P]-ATP in mTOR kinase buffer (25 mM HEPES pH 7.4, 50 mM NaCl, 50 mM  $\beta$ -glycerophosphate, 10 mM MnCl<sub>2</sub>, 100  $\mu$ M cold ATP). All samples were subjected to SDS-PAGE and incorporation of cold or radioactive



phosphate [ $^{32}\text{P}$ ] was determined by immunoblotting or quantified using a Fuji PhosphorImager with ImageQuant software. The data presented is representative of at least three independent experiments.

### **RNA Interference (RNAi)**

For the small interfering RNA (siRNA) studies, 21 nucleotide complementary RNA with symmetrical two nucleotide overhangs were obtained from Qiagen (Valencia, CA). The DNA sequences against which RNA duplexes were created for RSK1 and RSK2 and scrambled control were described elsewhere [25, 32, 33]. HEK293 cells were transfected using calcium-phosphate and 50 nM siRNA per dishes. Transfection efficiency was determined to be greater than 90% using a fluorescently-labeled mock siRNA.

## **Acknowledgments**

The authors would like to thank Drs. Nahum Sonenberg, Sylvain Meloche and John Blenis for generously providing DNA constructs. We also thank Drs. M. Therrien and H. Ray for critical reading of the manuscript. This work was supported by a Terry Fox Foundation grant from the National Cancer Institute of Canada (#018311). P.P. Roux holds a Canada Research Chair in Signal Transduction and Proteomics and a Career Development Award (CDA) from the Human Frontier Science Program Organization (HFSP). A. Carrière is recipient of a Fellowship from the Fonds de la Recherche en Santé du Québec (FRSQ), and L.-A. Julien is recipient of a Studentship from the Canadian Institutes for Health Research (CIHR) and the FRSQ. P. Thibault holds a Canada Research Chair in Proteomics and Mass Spectrometry. IRIC core facilities are supported by the FRSQ.

## References

1. Sarbassov, D.D., Ali, S.M., and Sabatini, D.M. (2005). Growing roles for the mTOR pathway. *Curr Opin Cell Biol* 17, 596-603.
2. Wullschleger, S., Loewith, R., and Hall, M.N. (2006). TOR signaling in growth and metabolism. *Cell* 124, 471-484.
3. Rini, B., Kar, S., and Kirkpatrick, P. (2007). Temsirolimus. *Nat Rev Drug Discov* 6, 599-600.
4. Guertin, D.A., and Sabatini, D.M. (2007). Defining the Role of mTOR in Cancer. *Cancer Cell* 12, 9-22.
5. Chiang, G.G., and Abraham, R.T. (2007). Targeting the mTOR signaling network in cancer. *Trends Mol Med*.
6. Loewith, R., Jacinto, E., Wullschleger, S., Lorberg, A., Crespo, J.L., Bonenfant, D., Oppliger, W., Jenoe, P., and Hall, M.N. (2002). Two TOR complexes, only one of which is rapamycin sensitive, have distinct roles in cell growth control. *Mol Cell* 10, 457-468.
7. Hay, N., and Sonenberg, N. (2004). Upstream and downstream of mTOR. *Genes Dev* 18, 1926-1945.
8. Inoki, K., and Guan, K.L. (2006). Complexity of the TOR signaling network. *Trends Cell Biol* 16, 206-212.
9. Nojima, H., Tokunaga, C., Eguchi, S., Oshiro, N., Hidayat, S., Yoshino, K., Hara, K., Tanaka, N., Avruch, J., and Yonezawa, K. (2003). The mammalian target of rapamycin (mTOR) partner, raptor, binds the mTOR substrates p70 S6 kinase and 4E-BP1 through their TOR signaling (TOS) motif. *J Biol Chem* 278, 15461-15464.
10. Schalm, S.S., Fingar, D.C., Sabatini, D.M., and Blenis, J. (2003). TOS motif-mediated raptor binding regulates 4E-BP1 multisite phosphorylation and function. *Curr Biol* 13, 797-806.
11. Hara, K., Maruki, Y., Long, X., Yoshino, K., Oshiro, N., Hidayat, S., Tokunaga, C., Avruch, J., and Yonezawa, K. (2002). Raptor, a binding partner of target of rapamycin (TOR), mediates TOR action. *Cell* 110, 177-189.

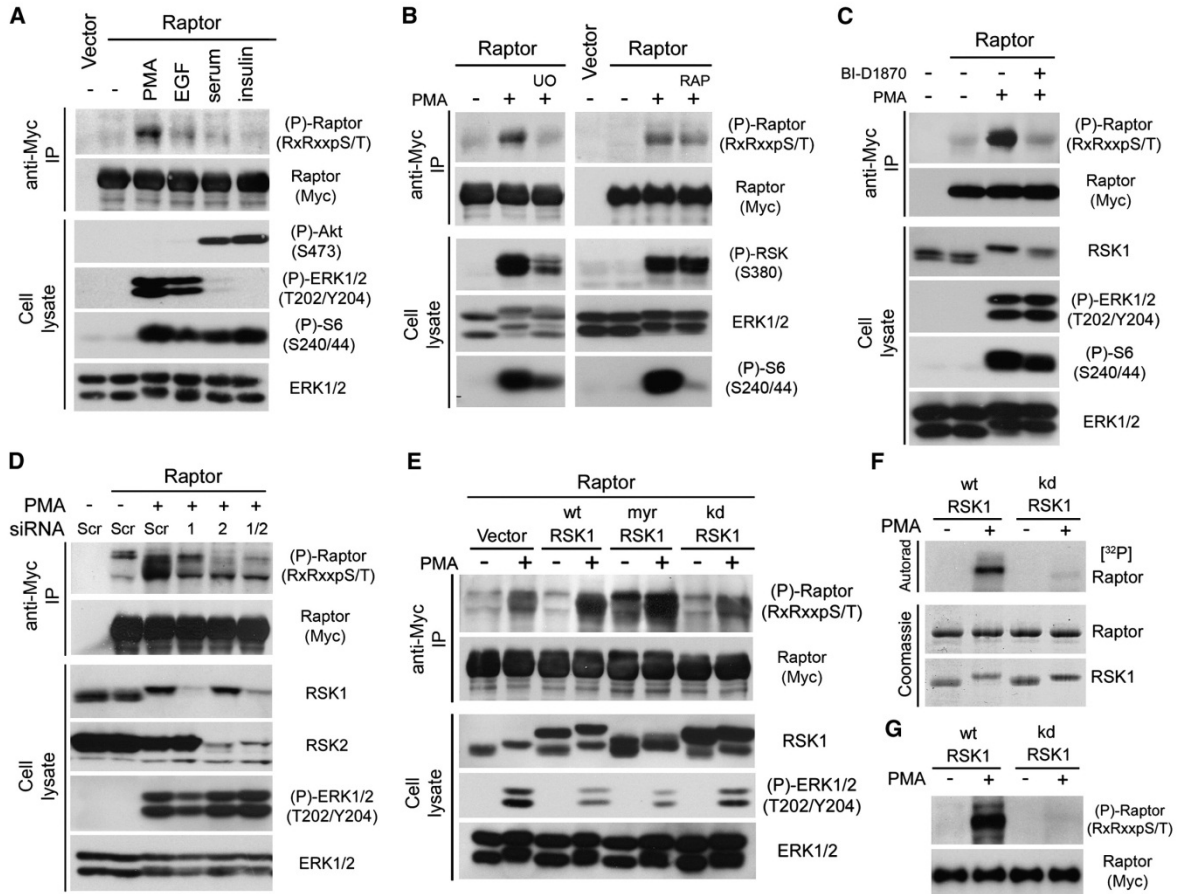
12. Kim, D.H., Sarbassov, D.D., Ali, S.M., King, J.E., Latek, R.R., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., and Sabatini, D.M. (2002). mTOR interacts with raptor to form a nutrient-sensitive complex that signals to the cell growth machinery. *Cell* *110*, 163-175.
13. Abraham, R.T. (2002). Identification of TOR signaling complexes: more TORC for the cell growth engine. *Cell* *111*, 9-12.
14. Manning, B.D., and Cantley, L.C. (2003). Rheb fills a GAP between TSC and TOR. *Trends Biochem Sci* *28*, 573-576.
15. Inoki, K., Zhu, T., and Guan, K.L. (2003). TSC2 mediates cellular energy response to control cell growth and survival. *Cell* *115*, 577-590.
16. Brugarolas, J., Lei, K., Hurley, R.L., Manning, B.D., Reiling, J.H., Hafen, E., Witters, L.A., Ellisen, L.W., and Kaelin, W.G., Jr. (2004). Regulation of mTOR function in response to hypoxia by REDD1 and the TSC1/TSC2 tumor suppressor complex. *Genes Dev* *18*, 2893-2904.
17. 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.
18. 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.
19. Rolfe, M., McLeod, L.E., Pratt, P.F., and Proud, C.G. (2005). Activation of protein synthesis in cardiomyocytes by the hypertrophic agent phenylephrine requires the activation of ERK and involves phosphorylation of tuberous sclerosis complex 2 (TSC2). *Biochem J* *388*, 973-984.
20. Carriere, A., Ray, H., Blenis, J., and Roux, P.P. (2008). The RSK factors of activating the Ras/MAPK signaling cascade. *Front Biosci* *13*, 4258-4275.
21. Roux, P.P., and Blenis, J. (2004). ERK and p38 MAPK-Activated Protein Kinases: a Family of Protein Kinases with Diverse Biological Functions. *Microbiol Mol Biol Rev* *68*, 320-344.

22. Alessi, D.R., Caudwell, F.B., Andjelkovic, M., Hemmings, B.A., and Cohen, P. (1996). Molecular basis for the substrate specificity of protein kinase B; comparison with MAPKAP kinase-1 and p70 S6 kinase. *FEBS Lett* 399, 333-338.
23. Sapkota, G.P., Cummings, L., Newell, F.S., Armstrong, C., Bain, J., Frodin, M., Grauert, M., Hoffmann, M., Schnapp, G., Steegmaier, M., et al. (2007). BI-D1870 is a specific inhibitor of the p90 RSK (ribosomal S6 kinase) isoforms in vitro and in vivo. *Biochem J* 401, 29-38.
24. Bain, J., Plater, L., Elliott, M., Shpiro, N., Hastie, J., McLauchlan, H., Klevvernic, I., Arthur, S., Alessi, D., and Cohen, P. (2007). The selectivity of protein kinase inhibitors; a further update. *Biochem J*.
25. Roux, P.P., Shahbazian, D., Vu, H., Holz, M.K., Cohen, M.S., Taunton, J., Sonenberg, N., and Blenis, J. (2007). RAS/ERK signaling promotes site-specific ribosomal protein S6 phosphorylation via RSK and stimulates cap-dependent translation. *J Biol Chem* 282, 14056-14064.
26. Malumbres, M., and Barbacid, M. (2003). RAS oncogenes: the first 30 years. *Nat Rev Cancer* 3, 459-465.
27. Adami, A., Garcia-Alvarez, B., Arias-Palomo, E., Barford, D., and Llorca, O. (2007). Structure of TOR and its complex with KOG1. *Mol Cell* 27, 509-516.
28. Fonseca, B.D., Lee, V.H., and Proud, C.G. (2008). The binding of PRAS40 to 14-3-3 proteins is not required for activation of mTORC1 signalling by phorbol esters/ERK. *Biochem J* 411, 141-149.
29. Gwinn, D.M., Shackelford, D.B., Egan, D.F., Mihaylova, M.M., Mery, A., Vasquez, D.S., Turk, B.E., and Shaw, R.J. (2008). AMPK phosphorylation of raptor mediates a metabolic checkpoint. *Molecular cell* 30, 214-226.
30. Shaw, R.J. (2006). Glucose metabolism and cancer. *Curr Opin Cell Biol* 18, 598-608.
31. Skeen, J.E., Bhaskar, P.T., Chen, C.C., Chen, W.S., Peng, X.D., Nogueira, V., Hahn-Windgassen, A., Kiyokawa, H., and Hay, N. (2006). Akt deficiency impairs normal cell proliferation and suppresses oncogenesis in a p53-independent and mTORC1-dependent manner. *Cancer Cell* 10, 269-280.
32. Shahbazian, D., Roux, P.P., Mieulet, V., Cohen, M.S., Raught, B., Taunton, J., Hershey, J.W., Blenis, J., Pende, M., and Sonenberg, N. (2006). The mTOR/PI3K and

MAPK pathways converge on eIF4B to control its phosphorylation and activity.  
*EMBO J* 25, 2781-2791.

33. Dimitri, C.A., Dowdle, W., MacKeigan, J.P., Blenis, J., and Murphy, L.O. (2005).  
Spatially separate docking sites on ERK2 regulate distinct signaling events in vivo.  
*Curr Biol* 15, 1319-1324.

## Figures



**Figure 1. RSK Phosphorylates Raptor In Vitro and In Cells Stimulated with Agonists of the Ras/MAPK Pathway**

(A) HEK293 cells were transfected with empty vector or myc-tagged Raptor, serum-starved and stimulated for 10 or 20 min with agonists of the Ras/MAPK and PI3K/Akt signaling pathways. Immunoprecipitated Raptor was then assayed for phosphorylation using a phosphomotif antibody that recognizes the RXRXXpS/T consensus motif.

(B and C) As in (A), but cells were pre-treated with U0126 (10  $\mu$ M), rapamycin (100 nM) or BI-D1870 (10  $\mu$ M) for 30 minutes prior to PMA (50 ng/ml) stimulation.

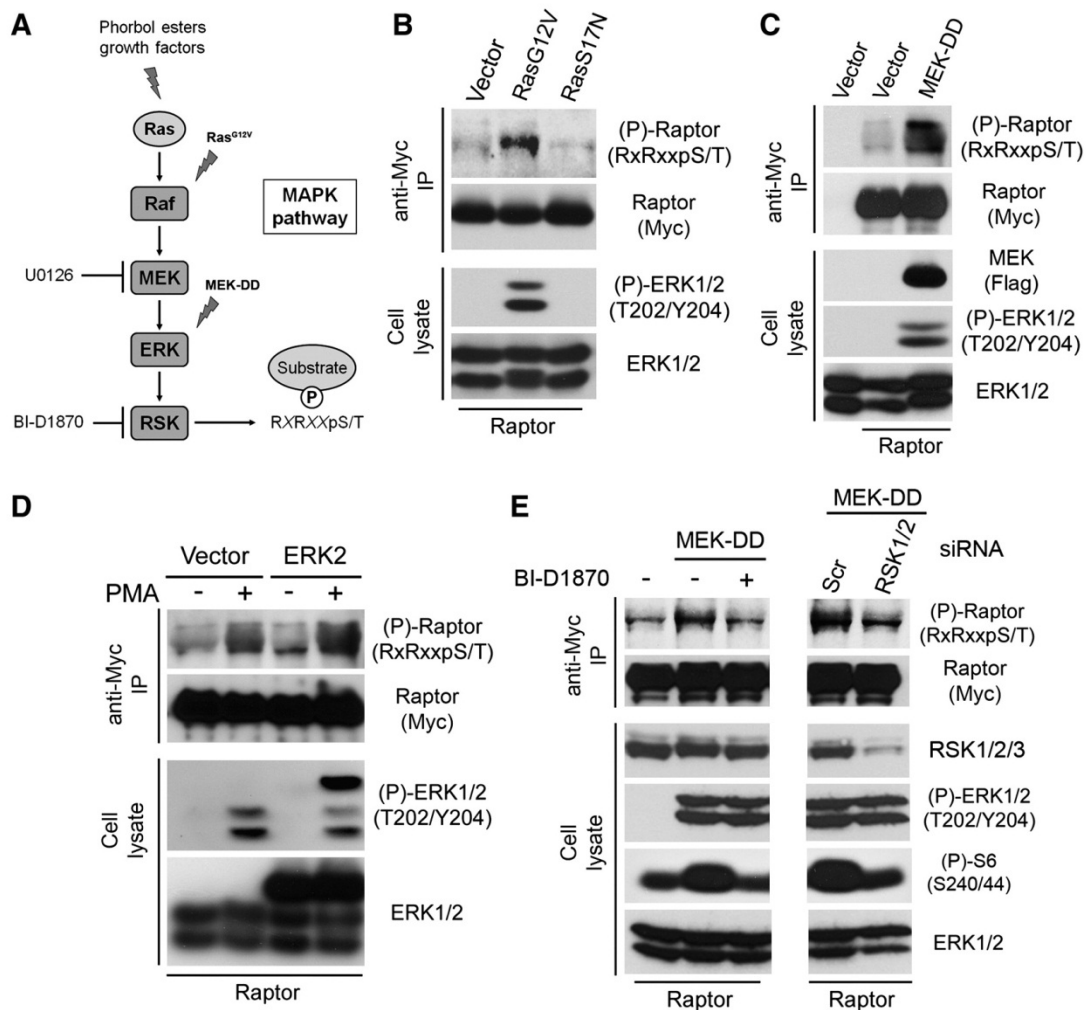
(D) HEK293 cells were co-transfected with control vector or myc-tagged Raptor and siRNA duplexes targeted against a scrambled sequence (Scr), RSK1 or RSK2, serum-starved and stimulated with PMA (50 ng/ml). Immunoprecipitated Raptor was then assayed as in (A).

(E) HEK293 cells were co-transfected with Raptor and either wt RSK1, constitutively activated RSK1 (myr), or kinase-inactive RSK1 (kd), serum starved and stimulated with PMA (50 ng/ml). Immunoprecipitated Raptor was then assayed as in (A).

(F) Immunoprecipitated HA-tagged wt or kinase-dead RSK1 (kd) from PMA-stimulated cells was incubated with immuno-purified Raptor in a kinase reaction with  $\gamma[^{32}\text{P}]\text{ATP}$ . The resulting samples were subjected to SDS-PAGE and the dried coomassie-stained gel autoradiographed.

(G) Samples were treated as in (F), but kinase reactions were performed without radioactivity. The resulting samples were immunoblotted for Raptor phosphorylation on RXXpS/T consensus sites.





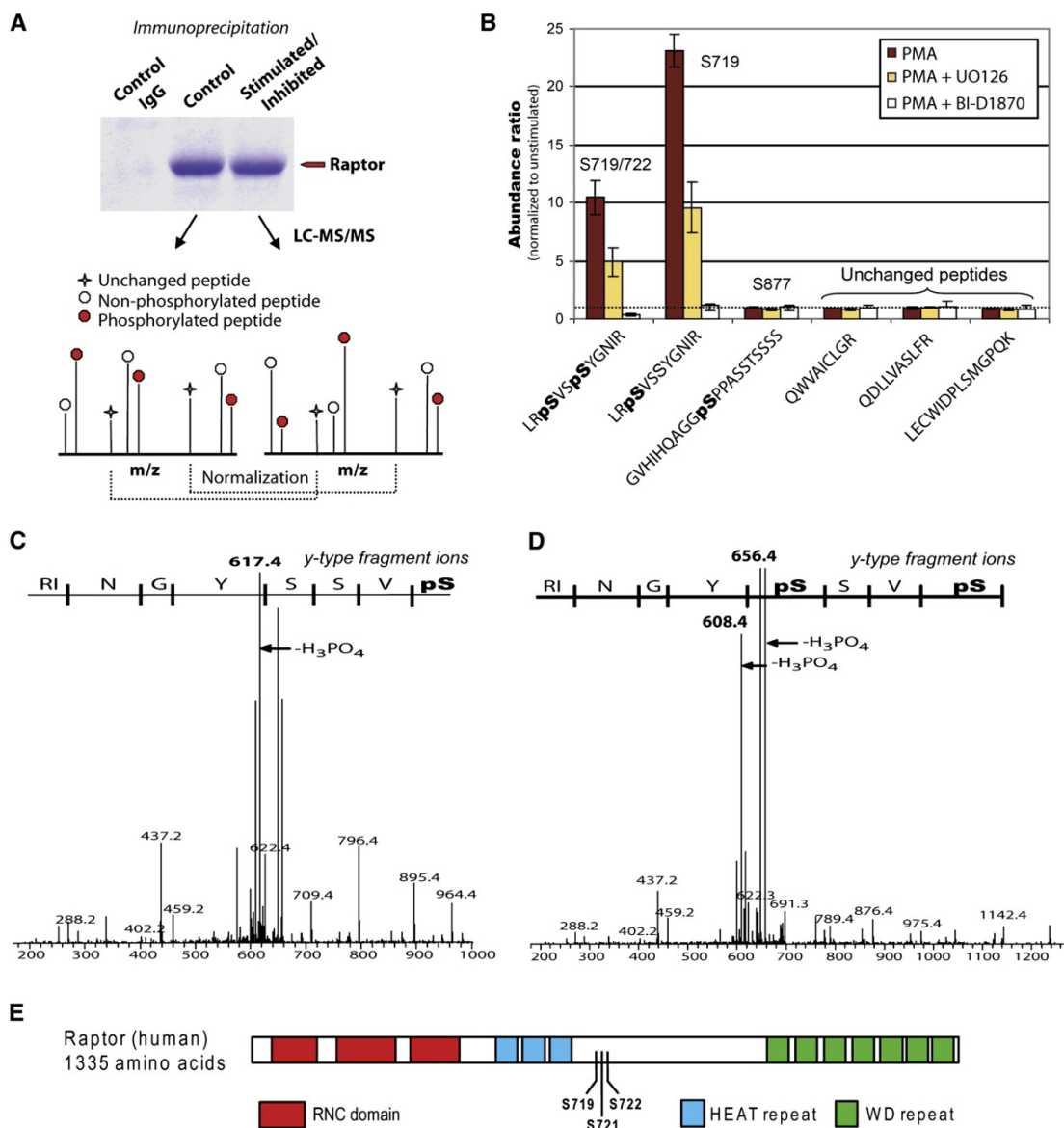
**Figure 2. Oncogenic Activation of the Ras/MAPK Pathway Promotes Constitutive Raptor Phosphorylation**

(A) Model depicting the Ras/MAPK pathway and inhibitors/activators used in this study.

(B and C) HEK293 cells were co-transfected with Raptor and constructs expressing activated Ras (G12V), dominant-negative Ras (S17N), constitutively-activated MEK1 (MEK-DD) or control vector and serum starved. Immunoprecipitated Raptor from unstimulated cells was then assayed for phosphorylation using the RXRXXpS/T phospho-motif antibody.

(D) HEK293 cells were co-transfected with Raptor and wt ERK2, serum starved, stimulated with PMA and analyzed as in (B).

(E) HEK293 cells were co-transfected with Raptor and MEK-DD, serum starved and treated with BI-D1870 for 60 min (left panel) or co-transfected with control siRNA (Scr) or siRNAs targeted against RSK1 and RSK2, and serum starved (right panel). Immunoprecipitated Raptor was then assayed for phosphorylation as in (B).



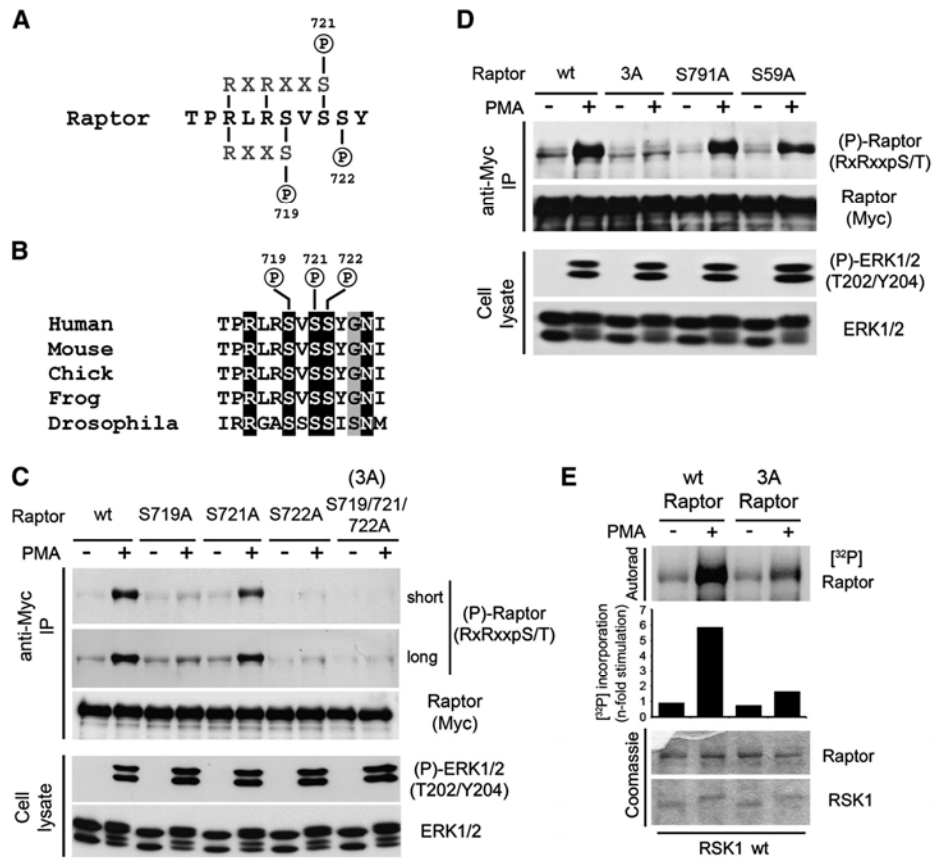
**Figure 3. Quantitative Mass Spectrometry Identifies and Profiles the Phosphorylation of Raptor upon Stimulation of the Ras/MAPK Pathway**

(A) Schematic representation of ion mapping and intensity normalization for determining changes in phosphorylation upon PMA stimulation and kinase inhibitor treatment.

(B) Abundance ratios of different modified and invariant Raptor tryptic peptides normalized to unstimulated cells. Dotted line indicates no changes in abundance ratio. (C and D) MS/MS spectra of doubly-protonated precursor at m/z 666.3 (C) and m/z 706.3 (D) corresponding to

tryptic peptides LRpSVSSYGNIR and LRpSVSpSYGNIR, respectively. Fragment ions indicated correspond to y-type cleavages.

(E) Schematic representation of the identified phosphorylation sites within Raptor.



**Figure 4. Ser719, Ser721 and Ser722 are the Primary RSK-dependent Phosphorylation Sites in Raptor**

(A) Schematic representation of the consensus motifs encompassing residues Ser719, Ser721 and Ser722 of Raptor.

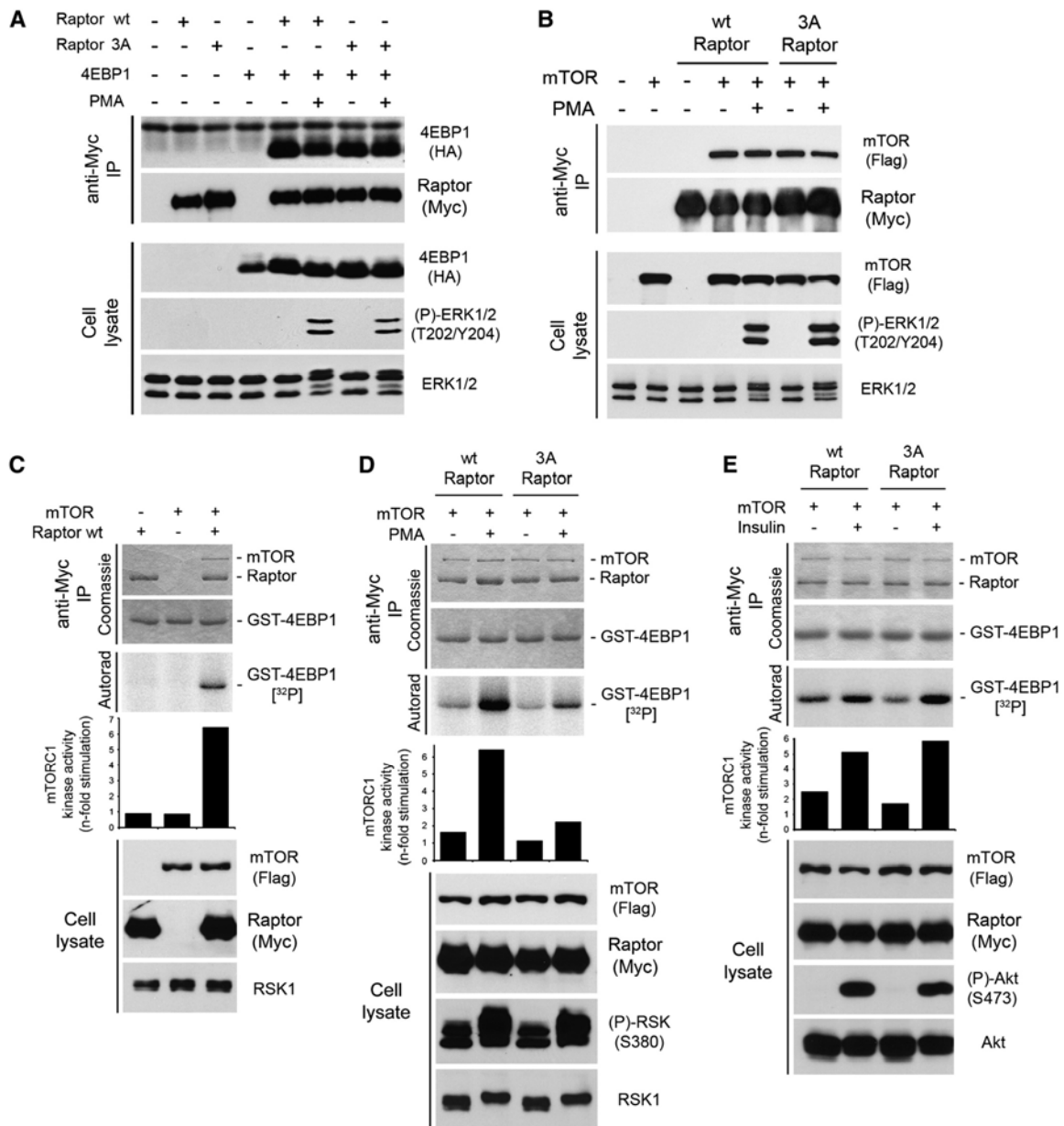
(B) Primary sequence alignment showing conservation of the three RSK-dependent phosphorylation sites within different Raptor orthologues.

(C) HEK293 cells were transfected with wt Raptor or potential RSK phosphorylation site mutants S719A, S721A, S722A and the triple mutant S719/721/722A (3A), serum starved and stimulated with PMA for 20 minutes. Immunoprecipitated Raptor was then immunoblotted for phosphorylation at RxxRxxpS/T sites.

(D) As in (C), except cells were transfected with wild type, 3A or potential RSK phosphorylation site mutants (S59A and S791A) that were not identified by MS analysis.

Raptor immunoprecipitates were then immunoblotted for phosphorylation at RXXpS/T sites.

(E) As in Figure 2D, except that HA-tagged wt RSK1 immunoprecipitates were incubated with either Raptor wt or the 3A mutant in an in vitro kinase reaction.



**Figure 5. RSK-mediated Phosphorylation of Raptor Promotes mTORC1 Activity without Altering Raptor Interaction with mTOR or its Substrates**

(A) Cells were co-transfected with HA-tagged 4E-BP1, and wt or the 3A mutant of Raptor, serum starved and stimulated with PMA. Associated 4E-BP1 was assayed within Raptor immunoprecipitates by immunoblotting.

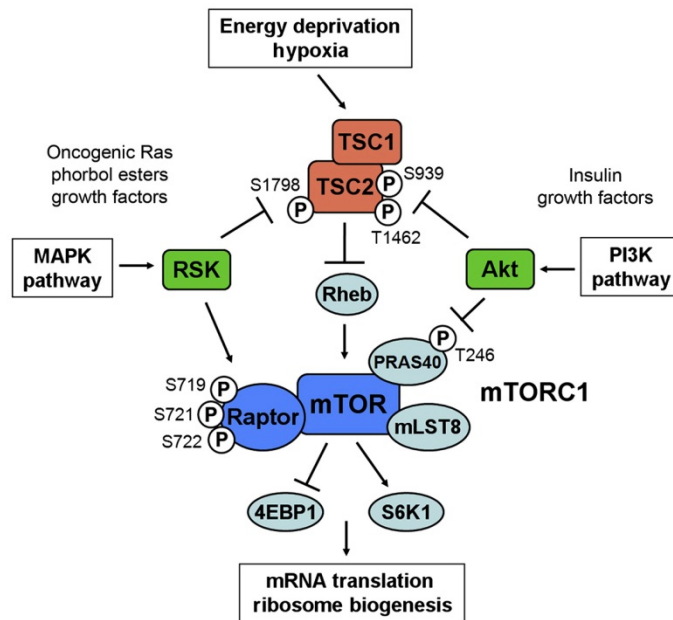
(B) Cells were co-transfected with Flag-tagged mTOR, and wt or the 3A mutant of Raptor, serum starved and stimulated with PMA. Associated mTOR was assayed within Raptor immunoprecipitates.

(C) Cells were co-transfected with mTOR and Raptor, serum starved and mTORC1 kinase activity was assayed within Raptor immunoprecipitates using GST-4EBP1 as a substrate. The kinase reaction was performed in the presence of  $\gamma[^{32}\text{P}]\text{ATP}$ , and the resulting samples were subjected to SDS-PAGE and the dried coomassie-stained gel autoradiographed.

(D) Cells were co-transfected with mTOR and wt or the 3A mutant of Raptor, serum starved and stimulated with PMA. mTORC1 activity was assayed as described in (A).

(E) As in (D), except that cells were stimulated with insulin (100 nM) for 20 min.





**Figure 6. The Ras/MAPK and PI3K/Akt Pathways Regulate mTORC1 Activation Using a Twofold Mechanism**

While Akt and RSK inactivate TSC2 and thereby promote Rheb GTP-loading, both kinases also directly regulate mTORC1 via alternative mechanisms. While Akt phosphorylates PRAS40 to suppress its inhibitory function, RSK directly phosphorylates Raptor to promote mTORC1 activity.

## **Supplemental Information**

### **Supplementary Experimental Procedures**

#### **Plasmid Constructs**

The plasmids encoding myc-tagged Raptor, and HA-tagged S6K1 and RSK1-4 were previously described [1-3]. All Raptor point mutants were generated using the Quickchange methodology (Stratagene, La Jolla, CA). pGEX-Raptor was generated by inserting nucleotides 2095-2235 of human Raptor in pGEX-4T. The vectors encoding Flag-MEK1-DD, HA-ERK2, RasG12V, RasS17N and AU1-mTOR were previously described [1, 4]. The plasmids encoding Flag-mTOR and GST-4E-BP1 were kindly provided by Dr. Nahum Sonenberg (McGill University) and the plasmid encoding HA-ERK1 was provided by Dr. Sylvain Meloche (Université de Montréal).

#### **Antibodies**

Anti-myc, -Flag, -HA and phospho-ERK1/2 monoclonal antibodies were purchased from Sigma (Oakville, ON). The anti-RSK1 and -RSK2 antibodies were kindly provided by Invitrogen (Carlsbad, CA). All phosphospecific antibodies, as well as the anti-Raptor and -mTOR antibodies were from Cell Signaling Technology (Beverly, MA), with the exception of the RSK phospho-Ser380 antibody, which was purchased from R&D Systems (Minneapolis, MN). The anti-ERK1/2 antibodies were described previously [5], and the anti-AU1 tag antibody was purchased from Covance. The antibody used for endogenous Raptor immunoprecipitation was purchased from Bethyl Laboratories. For immunoblotting, anti-rabbit and anti-mouse horseradish peroxidase (HRP)-conjugated antibodies were purchased from Chemicon (Temecula, CA).

#### **Mass Spectrometry Analyses**

Raptor immunoprecipitates were separated by SDS-PAGE, stained with coomassie (BioSafe, Bio-Rad) and gel bands were excised and digested with trypsin. The tryptic peptides were analyzed by nanoLC-MS using an Eksigent system (Dublin, CA) interfaced to an LTQ-Orbitrap mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) via a nanoelectrospray ionization source. LC separations were performed using custom made C<sub>18</sub> columns. Sample

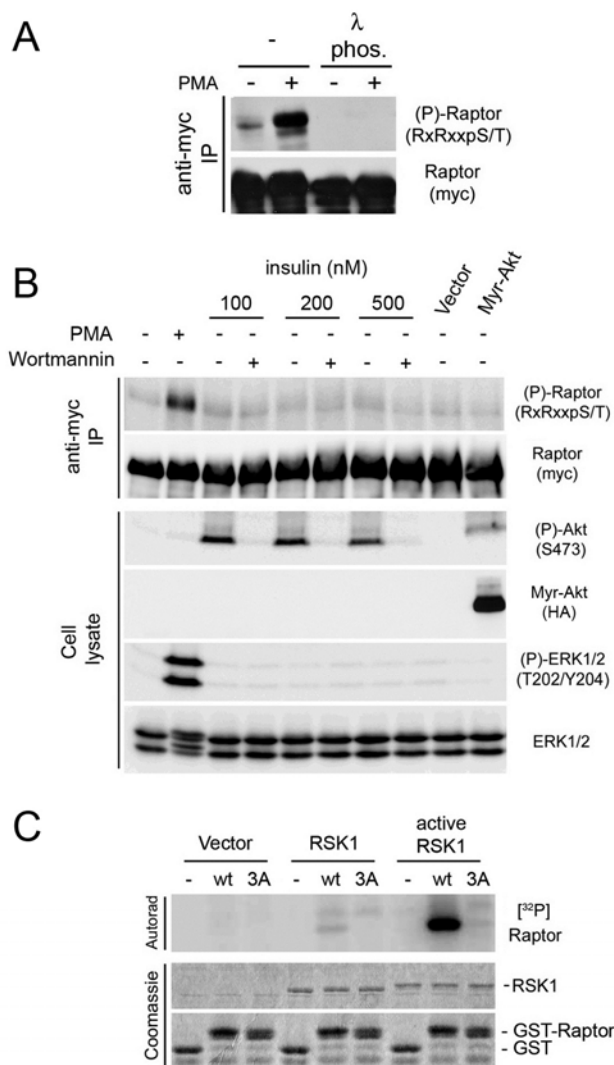
injection was 5  $\mu$ L, and tryptic digests were first loaded on the pre-column at a flow rate of 4  $\mu$ L/min and subsequently eluted onto the analytical column using a gradient from 10% to 60% aqueous acetonitrile (0.2 % formic acid) over 56 min with a flow rate of 0.6  $\mu$ L/min. Data-dependent acquisition mode was enabled and each Orbitrap survey scan (Resolution: 60,000) was followed by three MS/MS scan with dynamic exclusion for a duration of 30 s on the LTQ linear ion trap mass spectrometer. Multiply charged ions with intensity values above 10000 counts were selected for MS/MS sequencing. The normalized collision energy was set to 25 %. Each sample was analyzed with at least three replicates. Mass calibration used an internal lock mass (protonated  $(\text{Si}(\text{CH}_3)_2\text{O})_6$ ;  $m/z$  445.12057) and provided mass accuracy within 5 ppm for all nanoLC-MS experiments. Raw MS/MS spectra acquired from replicate LC-MS/MS analyses (n=3) were combined into a single file using Mascot Distiller (version 2.1.1.0, Matrix Science) to reduce spectral redundancy and to correctly identify precursor  $m/z$  from survey scans. Database searches were performed against a non-redundant human (133842 entries) IPI databases (version 3.24, released November 2006) using Mascot version 2.1 (Matrix Science, London, UK). Parent ion and fragment ion mass tolerances were both set at +/- 0.1 and 0.4 Da, respectively. Assignment of phosphorylation sites were validated through manual inspection of relevant MS/MS spectra

### Supplemental References

- S1. 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.
- S2. Schalm, S.S., Fingar, D.C., Sabatini, D.M., and Blenis, J. (2003). TOS motif-mediated raptor binding regulates 4E-BP1 multisite phosphorylation and function. *Curr Biol* *13*, 797-806.
- S3. Roux, P.P., Shahbazian, D., Vu, H., Holz, M.K., Cohen, M.S., Taunton, J., Sonenberg, N., and Blenis, J. (2007). RAS/ERK signaling promotes site-specific ribosomal protein S6 phosphorylation via RSK and stimulates cap-dependent translation. *J Biol Chem* *282*, 14056-14064.

- S4. Fingar, D.C., Salama, S., Tsou, C., Harlow, E., and Blenis, J. (2002). Mammalian cell size is controlled by mTOR and its downstream targets S6K1 and 4EBP1/eIF4E. *Genes Dev* 16, 1472-1487.
- S5. Roux, P.P., Richards, S.A., and Blenis, J. (2003). Phosphorylation of p90 ribosomal S6 kinase (RSK) regulates extracellular signal-regulated kinase docking and RSK activity. *Mol Cell Biol* 23, 4796-4804.

## Supplemental Figures

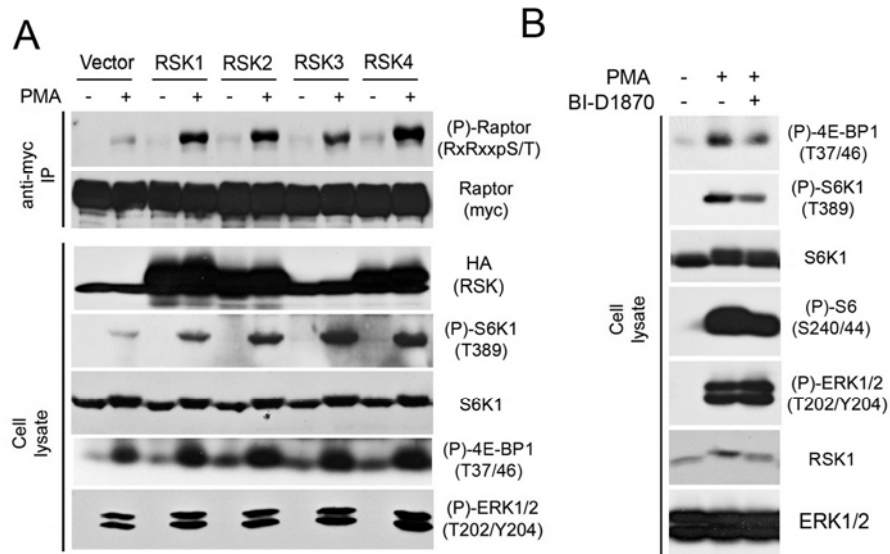


**Figure S1. Raptor is Phosphorylated on RXRXXpS/T Consensus Motifs Following Activation of the Ras/MAPK Pathway, but not the PI3K/Akt Pathway**

(A) HEK293 cells were transfected with myc-tagged Raptor, serum starved and stimulated with PMA (100 ng/ml). Immunoprecipitated Raptor was then treated with Lambda phosphatase (400U) for 60 min at 30°C, and immunoblotted with the RXRXXpS/T phospho-motif antibody.

(B) Cells were transfected with Raptor alone or in combination with constitutively activated Akt (HA-tagged Myr-Akt), serum starved and pre-treated with wortmannin (100 nM) prior to stimulation with increasing concentrations of insulin (100-500 nM). Immunoprecipitated Raptor was then assayed for phosphorylation using the RXXpS/T phospho-motif antibody.

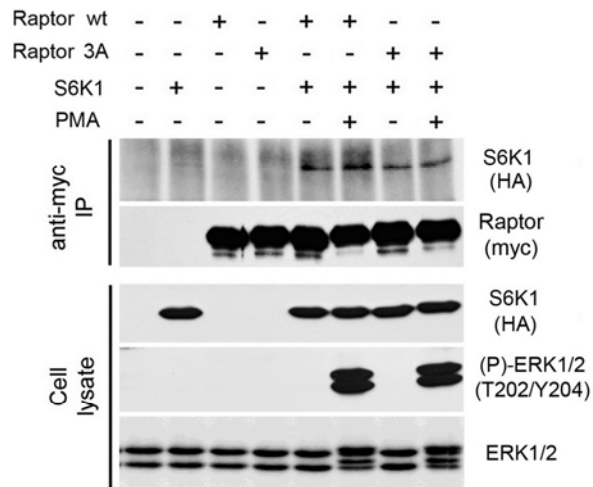
(C) Immunoprecipitated HA-tagged wt RSK1 from unstimulated or PMA-stimulated cells was incubated with a GST-fusion protein consisting of aa 696-745 of human Raptor (wt) or harboring the triple S719/21/22A mutation (3A). These recombinant proteins were used as in vitro substrates for RSK.



**Figure S2. Overexpression of the Four RSK Isoforms and BI-D1870 Treatment Highlight the Positive Role of RSK-mediated Raptor Phosphorylation in mTORC1 Activation**

(A) HEK293 cells were co-transfected with Raptor and either wt RSK1, RSK2, RSK3 and RSK4 isoforms, serum starved and stimulated with PMA (50 ng/ml). Immunoprecipitated Raptor was then assayed for phosphorylation using the RXXRXXpS/T phospho-motif antibody. The phosphorylation statuses of S6K on Thr389, as well as 4E-BP1 on Thr37/46, were analyzed to monitor mTORC1 activity.

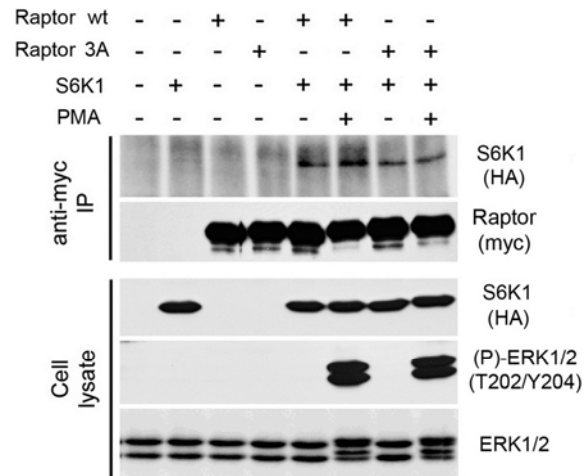
(B) HEK293 cells were treated with BI-D1870 (10  $\mu$ M) for 30 minutes prior to PMA (50 ng/ml) stimulation. mTORC1 activity was monitored as described in panel (A).



**Figure S3. RSK-mediated Phosphorylation of Raptor does not Affect Interaction with S6K1**

Cells were co-transfected with HA-tagged S6K1, and wt or the 3A mutant of Raptor, serum starved and stimulated with PMA. Associated S6K1 within Raptor immunoprecipitates was assayed by immunoblotting.





**Figure S4. mTORC1 Kinase Activity is Sensitive to Rapamycin Treatment and Requires a Functional mTOR Kinase Domain**

(A) Cells were co-transfected with wt mTOR and wt Raptor, treated with rapamycin (100 nM) for 1 hr, and mTOR kinase activity was assayed within Raptor immunoprecipitates using GST-4EBP1 as substrate. The kinase reaction was performed in the presence of [<sup>32</sup>P]ATP. The resulting samples were subjected to SDS-PAGE and the dried coomassie-stained gel autoradiographed.

(B) Cells were co-transfected with wt or kinase inactive (kd) mTOR, and wt Raptor, serum starved and mTOR activity was assayed as described in (A).

# Chapitre 3: Proteomic analysis of cap-dependent translation identifies LARP1 as a key regulator of 5'TOP mRNA translation

**Running head:** LARP1 regulates 5'TOP mRNAs

**Joseph Tcherkezian<sup>1,7</sup>, Marie Cargnello<sup>1,7</sup>, Yves Romeo<sup>2,3</sup>, Edward L. Huttlin<sup>4,5</sup>, Genevieve Lavoie<sup>1</sup>, Steven P. Gygi<sup>4,5</sup>, and Philippe P. Roux<sup>1,6,\*</sup>**

<sup>1</sup>Institute for Research in Immunology and Cancer (IRIC), Université de Montréal, Montreal, Quebec H3C 3J7, Canada

<sup>2</sup>Centre National de la Recherche Scientifique, Laboratoire de Biologie Moléculaire Eucaryote, Paris, France.

<sup>3</sup>Université de Toulouse, UPS, F-31000 Toulouse, France

<sup>4</sup>Department of Cell Biology, Harvard Medical School, Boston, MA 02115, USA

<sup>5</sup>Taplin Biological Mass Spectrometry Facility, Harvard Medical School, Boston, MA 02115, USA

<sup>6</sup>Department of Pathology and Cell Biology, Faculty of Medicine, Université de Montréal, Montreal, Quebec, H3C 3J7, Canada.

<sup>7</sup>These authors contributed equally to this work

The authors declare no conflict of interest

**Keywords:** mTOR; mRNA; translation; LARP1; 5'TOP; proteomics.

Article publié dans: **Genes and Development**, 2014 Feb; **28(4): 357-71**

## Mise en contexte

Après avoir montré que la voie Ras/MAPK stimulait l'activité du complexe mTORC1 nous nous sommes intéressés au rôle de mTOR dans la synthèse protéique globale mais également dans la traduction sélective des ARNm présentant un motif TOP. Il était déjà établi que la traduction de ces ARNm était sous le contrôle de l'activité de mTORC1 (Jefferies et al. 1994) néanmoins les mécanismes impliqués dans le recrutement spécifique des ARNm TOP à la machinerie traductionnelle n'étaient pas connus. Des données récentes indiquaient que les protéines 4E-BP étaient nécessaires à la régulation sélective des ARNm TOP par mTORC1 (Thoreen et al. 2012) et il avait été suggéré que mTOR, en plus des 4E-BP, contrôlait l'activité de facteurs impliqués dans la traduction des ARNm TOP (Gentilella and Thomas 2012).

Dans le but de mieux comprendre comment mTOR régulait à la fois la traduction de façon globale mais aussi spécifiquement de certains ARNm, nous avons réalisé des analyses de spectrométrie de masse quantitative pour identifier les protéines qui sont associées au complexe eIF4F et dont l'association est dépendante de l'activité mTOR. Cette méthode nous a permis d'identifier plusieurs facteurs ayant un rôle connu dans l'épissage, l'export, la traduction, la localisation et la stabilité des ARNm. Elle a également permis d'identifier de nombreuses protéines de liaison à l'ARN dont la fonction dans la traduction n'est pas établie, comme la protéine LARP1. Nous avons déterminé que LARP1 co-sédimente à la fois avec les sous-unités 40S, 60S et 80S des ribosomes et avec les polysomes et l'utilisation de l'interférence à l'ARN a montré que LARP1 est nécessaire à l'assemblage des polysomes et à la synthèse protéique. Par ailleurs, nous avons montré que LARP1 lie les ARNm TOP et est requise pour leur recrutement aux polysomes. Finalement nous avons trouvé que LARP1 interagit avec le complexe mTORC1 et est nécessaire à la croissance cellulaire et à la prolifération.

Ces travaux ont mené à la première identification systématique des partenaires du complexe associé à la coiffe des ARNm régulés par la voie mTOR et ont permis de définir LARP1 comme un important régulateur de la traduction des ARNm TOP et de la croissance cellulaire.

## **Contribution des auteurs**

Marie Cargnello et Joseph Tcherkezian ont participé de manière égale à la conception du projet, à la génération et l'analyse des résultats, à la conception des figures et à la rédaction de l'article.

Yves Romeo a participé à la conception du projet et à la mise au point de la méthode de purification du complexe associé à la coiffe des ARNm (figures 1 et 2).

Edward Huttlin a réalisé les analyses de spectrométrie de masse (figures 1; 2; 3 et S2).

Geneviève Lavoie a participé à la préparation des constructions LARP1 (figure 4), aux infections lentivirales (figures 5 et 6) et aux analyses de cycle cellulaire et d'apoptose par cytométrie en flux (figures 5 et S4).

Steven Gygi a participé à l'analyse des données de spectrométrie de masse (figures 1; 2; 3 et S2) et a commenté le manuscrit.

Philippe Roux a supervisé le projet, analysé les résultats et rédigé l'article.

## **Abstract**

The mammalian target of rapamycin (mTOR) promotes cell growth and proliferation by promoting mRNA translation and increasing the protein synthetic capacity of the cell. Although mTOR globally promotes translation by regulating the mRNA 5' cap-binding protein eIF4E, it also preferentially regulates the translation of certain classes of mRNA via unclear mechanisms. To help fill this gap in knowledge, we performed a quantitative proteomic screen to identify proteins that associate with the mRNA 5' cap in an mTOR-dependent manner. Using this approach, we identified many potential regulatory factors, including the putative RNA-binding protein LARP1 (La-related protein 1). Our results indicate that LARP1 associates with actively translating ribosomes via PABP, and that LARP1 stimulates the translation of mRNAs containing a 5' terminal oligopyrimidine (TOP) motif, encoding for components of the translational machinery. We found that LARP1 associates with the mTOR complex 1 (mTORC1) and is required for global protein synthesis, as well as cell growth and proliferation. Together, these data reveal important molecular mechanisms involved in TOP mRNA translation and implicate LARP1 as an important regulator of cell growth and proliferation.

## Introduction

The determination of cell size in multicellular organisms is achieved by the coordinated action of cell growth and cell cycle progression. The evolutionarily conserved Ser/Thr kinase mammalian target of rapamycin (mTOR) integrates both intracellular and extracellular signals to regulate cell growth and proliferation (Polak and Hall 2009; Laplante and Sabatini 2012). The mTOR kinase is the catalytic component of two distinct multiprotein complexes: mTORC1 (comprised of mTOR, Raptor, mLST8, and PRAS40) and mTORC2 (comprised of mTOR, Rictor, GβL, and mSIN1) (Jacinto 2008; Foster andingar 2010). When activated by growth signals, mTORC1 phosphorylates two well-characterized targets, the AGC family p70 ribosomal S6 kinases (S6K1 and S6K2) and the eukaryotic initiation factor 4E (eIF4E)-binding proteins 1 and 2 (4E-BP1/2) (Ma and Blenis 2009; Sengupta et al. 2010; Roux and Topisirovic 2012). While the S6Ks are implicated in the control of cell and organismal growth, the 4E-BPs regulate mRNA translation and have been shown to control cell proliferation (Dowling et al. 2010).

A key factor required for the translation of the vast majority of mRNAs is the eIF4F complex, which includes the mRNA 5' cap-binding protein eIF4E, the RNA helicase eIF4A and the modular scaffolding protein eIF4G that bridges the mRNA to the ribosome (Pestova et al. 1996; Sonenberg 2008). The 4E-BPs interact with eIF4E and thereby repress translation initiation by disrupting eIF4F complex formation (Pause et al. 1994). mTORC1 phosphorylates the 4E-BPs leading to their dissociation from eIF4E, thus increasing the amount of eIF4E available to engage in eIF4F complex assembly. Although most cellular mRNAs require eIF4E to be translated, the eIF4F complex is thought to be especially important for the efficient translation of mRNAs that contain extensive secondary structure within their 5' untranslated regions (5'UTRs) (Koromilas et al. 1992). mTORC1 has also been implicated in the selective regulation of mRNAs with 5' terminal oligopyrimidine (TOP) tracts (Jefferies et al. 1994), which encode for ribosomal proteins and several components of the translation machinery (Avni et al. 1997; Meyuhas 2000). Recent studies using high resolution transcriptome-scale ribosome profiling have confirmed that the translation of 5'TOP mRNAs is highly sensitive to mTORC1 inhibitors (Hsieh et al. 2012; Thoreen et al. 2012), but the mechanism by which this occurs still remains unclear.

Translational control of 5'TOP mRNAs relies, at least in part, on the regulation of eIF4E by the 4E-BPs (Hsieh et al. 2012; Thoreen et al. 2012). While required, suppression of 4E-BP1/2 function is unlikely to be sufficient to drive 5'TOP mRNA translation, as eIF4E overexpression is itself insufficient to promote the translation of 5'TOP mRNAs (Shama et al. 1995). These findings suggest the existence of additional regulatory factors that would directly interact with the TOP sequence and/or regulate 5'TOP mRNA translation (Gentilella and Thomas 2012). Several candidates have been proposed over the years, including the abundant La antigen (also known as LARP3)(Pellizzoni et al. 1996; Crosio et al. 2000; Cardinali et al. 2003), AUF1 (Kakegawa et al. 2007), TIA-1 (Damgaard and Lykke-Andersen 2011), and LARP7 (Markert et al. 2008), but definitive evidence for the regulatory roles of these proteins in 5'TOP mRNA translation is lacking.

To better understand how mTOR regulates both global and specific mRNA translation, we performed a quantitative proteomic screen to identify proteins that associate with the mRNA 5' cap in an mTOR-dependent manner. Using this method, we identified several candidate proteins and validated their regulated association to the mRNA 5' cap using complementary approaches. Amongst these, we found the putative RNA-binding protein LARP1 and provided evidence supporting an important role for this protein in 5'TOP mRNA translation. Together, our results provide important insights into the regulation of 5'TOP mRNA translation and suggest the involvement of many more uncharacterized proteins in mRNA translation.

## Results

### *Global quantitative assessment of proteins that associate with the mRNA 5' cap*

In an attempt to identify protein components that could potentially bridge mTOR activity with the translation of specific subsets of mRNAs, we used sepharose beads coupled to 7-methylguanosine ( $m^7GTP$ ), which mimics the mRNA 5' cap structure. This approach has been widely used to purify and monitor assembly of the eIF4F complex (Sonenberg et al. 1978), but was surprisingly never combined with high-resolution mass spectrometry to globally identify and quantify factors that associate with the mRNA 5' cap. We therefore elaborated a method based on  $m^7GTP$ -affinity chromatography to enrich in cap-binding proteins, such as eIF4E, as well as associated factors, followed by specific elution using excess free  $m^7GTP$  (Fig. 1A). To identify and quantify purified components, we used an unbiased quantitative approach where LysC-digested peptides were labeled with 6-plex isobaric mass tags (TMT<sup>6</sup>) and subjected to liquid chromatography-tandem mass spectrometry analysis (LC-MS/MS)(Fig. 1B).

As a first step, we sought to determine the proportion of binding proteins that could be purified based on potentially non-specific RNA-dependent interactions. To do so, we performed  $m^7GTP$ -affinity chromatography and incubated precipitates with nucleases (RNase A/Benzonase) prior to elution with  $m^7GTP$ , TMT<sup>6</sup> labeling and LC-MS/MS analysis (Fig. 1B). In total, we identified ~160 proteins among which approximately one-third showed significant decreased association to the  $m^7GTP$  beads following nuclease treatment (Fig. 1C). Among proteins unaffected by nuclease treatment, we identified eIF4E and many known direct and indirect eIF4E-binding proteins, including eIF4G1/3, 4E-T and 4E-BP1/2 (Fig. 1D). We also identified the eIF4G-binding protein PABP, which was chosen to set the minimum threshold for protein-protein interactions because of its ability to also directly interact with mRNAs (Fig. 1C). Among proteins previously shown to be involved in mRNA translation, we identified ATAXIN-2, an RNA-binding protein with prominent roles in the nervous system that was recently shown to associate with eIF4F and PABP (Zhang et al. 2013). Importantly, we identified several additional proteins that were never previously shown to associate directly or indirectly with the mRNA 5' cap (Fig. 1D). Classifying this restricted list of proteins according to molecular and cellular functions using the Ingenuity Pathway Analysis platform (IPA, <http://www.ingenuity.com>) revealed that most proteins detected participated in mRNA



translation ( $P < 1E-45$ ), and were involved in expected pathways, such as “mTOR signaling” ( $P < 1E-18$ ) (Fig. 1E). Finally, we used the Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes (STRING) database to generate an interaction network based on experimentally validated interactions between identified proteins. This analysis revealed a tight interaction network with several nodes characterized by functional complexes, such as three major clusters for mRNA metabolism and translation (Supplemental Fig. 1). Pfam domains enrichment revealed a large number of proteins containing RNA recognition motif ( $P < 2E-19$ ). Taken together, these data provide an extensive list of candidate proteins that may participate in translational control.

*The mRNA 5' cap-binding complex is principally regulated by mTOR signaling and the 4E-BPs*

Having globally identified proteins that associate with the mRNA 5' cap, we next assessed whether their association was regulated by mTOR agonists and antagonists. To do so, we treated serum-growing HEK293 cells with PI-103, a dual mTOR/PI3K inhibitor, to robustly abrogate mTOR activation and downstream signaling (Fig. 2A). Conversely, we treated serum-starved cells with insulin to provide a more physiological paradigm of mTOR activation. Cell treatments were performed in triplicate and all  $m^7GTP$  pull-down assays were processed and TMT<sup>6</sup>-labeled individually, prior to being pooled for LC-MS/MS analysis and quantification (Fig. 2A). In addition, these experiments were performed in the presence of nucleases to control for potentially non-specific RNA-dependent interactions. Prior to assessing the global effect of mTOR activation, we first determined whether we could measure significant changes in components of the eIF4F complex. As expected, eIF4E association to  $m^7GTP$  was not found to be modulated, whereas the association of eIF4G and eIF4A was strongly regulated by PI-103 and insulin treatments, as revealed by both western blotting (Fig. 2B) and TMT<sup>6</sup>-based quantifications (Fig. 2C; Tables 1 and 2). Because this method allowed for the simultaneous quantification of many peptides per protein, the changes induced by both cell treatments were found to be highly significant ( $P < 1E-12$  and  $P < 1E-29$  for eIF4G and eIF4A, respectively). We also analyzed the recruitment of the 4E-BPs, which are direct targets of mTORC1 (Pause et al. 1994). As expected, the association of 4E-BP1/2 was found to be

inversely correlated with that of eIF4G and eIF4A (Fig. 2B,C). To determine the contribution of the 4E-BPs in regulating the eIF4F complex, we repeated similar proteomic experiments in wild-type and 4E-BP1/2 double-knockout (DKO) mouse embryonic fibroblasts (MEFs). Consistent with previous reports (Dowling et al. 2010; Thoreen et al. 2012), we found that the eIF4F complex was constitutively bound to m<sup>7</sup>GTP in the absence of 4E-BPs (Fig. 2D,E), confirming that the 4E-BPs are required for the regulated assembly of the eIF4F complex. In addition to validating our quantitative approach, these results indicated that 4E-BP1/2-deficient cells provided a useful system to globally determine whether the proteins we identified in our proteomic approach required eIF4E for associating to mRNA 5' cap.

Next, we analyzed the impact of mTOR activation on all purified components of the 5' cap-binding complex. Interestingly, we found that the relative abundance of approximately half of all identified proteins was increased by insulin stimulation (Fig. 3A), with the most prominent effects seen with PABP (~7.5-fold), eIF4A1/2 (~5.5-fold), eIF3 isoforms (~4-fold) and eIF4G1/3 (~3.5-fold) (Table 1). Notably, the 4E-BPs were the only two proteins found to be less abundant in response to insulin (~0.3-fold,  $P < 7.8E-47$  for 4E-BP1). We also analyzed the relative abundance of identified proteins in response to PI-103 treatment and found that about half displayed decreased association (Fig. 3A), with the most prominent effects seen with eIF4A1 (~0.1-fold), eIF3 isoforms (~0.1-fold), eIF4G1/3 (~0.1-fold) and PABP (~0.2-fold) (Table 2). Again, the 4E-BPs were the only two proteins found to be more abundant in response to PI-103 treatment (~1.5-fold,  $P < 9.2E-17$  for 4E-BP1). To determine whether eIF4E was required for the recruitment of other identified proteins, we compared data obtained from wild-type and 4E-BP1/2 DKO cells treated with insulin or PI-103 (Fig. 3A). As with the eIF4F complex (Fig. 2), we found that 4E-BP1/2 were required for the regulated recruitment of all identified proteins (Fig. 3A). These results were important because they indicated that the 4E-BPs were the main mTOR effectors involved in regulating the assembly of the 5' cap-binding complex. We used this information to apply a threshold over which changes in interaction in wild-type cells were considered significant (Fig. 3A, see area in red). Notably, we found that the majority of insulin-regulated proteins were also inversely regulated by PI-103 treatment ( $R^2=0.6186$ ) (Fig. 3B). Among these, we found several mTOR-regulated proteins that are expected to interact directly or indirectly with eIF4E, such as 4E-T, eIF3A and DDX3 (Fig.

3C). In addition, we found several novel interacting proteins, such as LARP1, DDX6, hnRNPU, FAM98A, HSPA5, and DHX9 (Fig. 3D; Supplemental Table 4). Western blot analysis of candidate proteins in wild-type cells revealed mTOR-regulated binding in all cases (Fig. 3E), while no regulation was observed in cells lacking 4E-BP1/2 (Supplemental Fig. 2). Together, these results underscore the potential role of many candidate proteins in mRNA translation, such as the putative RNA-binding protein LARP1 (La-related protein 1).

#### *mTOR regulates LARP1 association to polysomes via PABP*

LARP1 is a widely conserved and ubiquitously expressed member of the La-related family of proteins (Bayfield et al. 2010). Although it is more generally divergent from genuine La proteins than other members, it nevertheless contains two closely related RNA-binding domains known as La motif (LAM) and an adjacent RNA recognition motif-like domain (RRM-L). Consistent with these structural features, LARP1 has been found to play a role in mRNA metabolism in diverse species (Chauvet et al. 2000; Nykamp et al. 2008; Blagden et al. 2009; Burrows et al. 2010), but its mode of action remains elusive. To determine if LARP1 associates with actively translating ribosomes (polysomes), we performed sucrose gradient velocity sedimentation of ribosomes using extracts from HEK293 cells. These experiments revealed that LARP1 efficiently cosedimented with pre-polysomal subunits (monosomes and ribosomal subunits), but also with polysomes (Fig. 4A), suggesting that LARP1 associates with mRNAs during the initial steps of translation and remains associated to actively translating polyribosomes. To determine if mTOR regulates LARP1 association to ribosomes, we treated serum-growing cells with the dual PI3K/mTOR inhibitor PI-103 to disrupt polysomes. Consistent with the observed mTOR-dependent association of LARP1 to the mRNA 5' cap (Fig. 3), we found that mTOR inhibition resulted in an important shift in the distribution of LARP1 from polysomal to sub-polysomal fractions (Fig. 4B). To further validate the specificity of this interaction, cells were treated with puromycin to inhibit protein synthesis by prematurely terminating peptide chains. Puromycin treatment strongly reduced polysome assembly and concomitantly shifted a substantial amount of LARP1 from polysomal to subpolysomal fractions (Supplemental Fig. 3A,B). While components of the eIF4F complex were, as expected, primarily associated with the 40S subunit (Tcherkezian et al. 2010), we

found that the sedimentation of several ribosomal proteins was also dependent on mTOR activity, as shown for rpL5 and rpS6 (Fig. 4A,B). Interestingly, LARP1 and PABP showed very similar distributions, suggesting a possible interplay between these proteins.

In agreement with previous reports (Blagden et al. 2009; Burrows et al. 2010), we found that endogenous LARP1 co-immunoprecipitated with endogenous PABP, irrespective of which protein was immunoprecipitated (Fig. 4C,D). Our results also indicate that the association between LARP1 and PABP was not affected by mTOR activity (Fig. 4E), as shown by cell treatments with insulin, PI-103 or a specific mTOR kinase inhibitor (Ku-0063794). These results suggested that LARP1 was likely recruited to the mRNA 5' cap as well as polysomes because of its association to PABP. Thus, we next sought to identify the minimal region in LARP1 responsible for PABP binding by generating C-terminal deletion mutants (Fig. 4F). Notably, we found that a C-terminal mutant (LARP1 $\Delta$ 150) lacking a stretch of DM15 tandem repeats (also known as LARP1 domains) with unknown functions showed significant decreased association to PABP (Fig. 4G). This effect was also observed with a larger deletion mutant (LARP1 $\Delta$ C300) lacking all DM15 tandem repeats. Furthermore, these mutants failed to associate with the mRNA 5' cap (Fig. 4H) as well as with actively translating ribosomes (Fig. 4I,J, and quantified in 4K), suggesting that PABP plays an important role in the recruitment of LARP1 to the translation machinery.

Given that LARP1 was identified in a proteomic screen for proteins that associate with the mRNA 5' cap, we tested whether LARP1 could associate with other known components, including the eIF4F complex. Notably, we found that LARP1 co-immunoprecipitated with eIF4A but not eIF4E or eIF4G (Supplemental Fig. 3C), raising the possibility that the association of LARP1 to ribosomes may also depend on eIF4A binding.

#### *LARP1 regulates protein synthesis, G1-phase progression, and cell proliferation*

Given that LARP1 associates with polysomes in an mTOR-dependent manner, we next sought to determine the possible role of LARP1 in global protein synthesis. To test this, we measured [<sup>3</sup>H]leucine incorporation in stable cell lines expressing different shRNA constructs targeted against LARP1 (shLARP1.1 and shLARP1.3), which showed >90% reduction in LARP1

levels (Fig. 5A; Supplemental Fig. 4A). Consistent with a previous report (Blagden et al. 2010), we found that LARP1 knockdown decreased protein synthesis rates by a factor of ~ 2-fold (Fig. 5A; Supplemental Fig. 4A). Because protein synthesis is required for cell growth and proliferation, we tested whether LARP1 depletion would affect these processes. As such, we found that LARP1 silencing using three shRNA constructs in three different cell lines (HEK293, HEC-1B and A549) significantly reduced cell proliferation to a level similar to that obtained with mTOR inhibitor treatments (Fig. 5B,C; Supplemental Fig. 4B,C). Importantly, this reduction in cell proliferation was not caused by an increase in cell death, as measured by FACS analysis of Annexin V binding (Supplemental Fig. 4F,G). mTOR inhibition is known to reduce the rate of G1-phase progression in many cell types (Fingar et al. 2004). To determine if LARP1 knockdown results in a similar defect, we performed FACS analysis of DNA content. Similar to the inhibition of mTOR using Ku-0063794 (Fig. 5D; Supplemental Fig. 4D,E), we found that LARP1 knockdown using three different shRNA constructs resulted in the accumulation of cells at the G0/G1 phase (Fig. 5D; Supplemental Fig. 4D,E).

Our results indicate that LARP1 regulates protein synthesis downstream of mTORC1, which is known to recruit effector proteins via interaction with its scaffolding component Raptor. To determine if LARP1 interacts with Raptor, we first performed forward and reverse co-immunoprecipitation experiments. Notably, we found that endogenous and exogenous LARP1 interact with Raptor, but not Rictor, a component of mTORC2 (Fig. 5E,F). Our results also indicated that LARP1 interaction with Raptor does not require mTOR, as the association was found in conditions that either disrupt (NP-40) or preserve (CHAPS) mTORC1 (Fig. 5G), which is suggestive of a direct interaction between LARP1 and Raptor. Consistent with these results, immunofluorescence localization of LARP1 and Raptor showed a high degree of overlap, including in a significant proportion of puncta (Fig. 5H), indicating that a proportion of both LARP1 and Raptor colocalizes in cells. Our results indicate that LARP1 interacts with both PABP and Raptor, therefore we next determined whether these interactions were mutually exclusive. To address this, we performed competition assays between Raptor and PABP for their binding to LARP1. Our results show that overexpression of myc-tagged human Raptor in HEK293 cells did not alter the ability of LARP1 to co-immunoprecipitate with PABP and vice-versa (Supplemental Fig. 5A,B), raising the possibility that both proteins

associate with LARP1 simultaneously. Taken together, these results indicate that LARP1 is an important mediator of mTOR-regulated cell growth and proliferation.

*LARP1 regulates polysome assembly and is particularly important for 5'TOP mRNA translation*

To help determine how LARP1 regulates protein synthesis, we performed sucrose gradient velocity sedimentation of ribosomes in LARP1-depleted cells (shLARP1.1 and shLARP1.2). Notably, we found that LARP1 knockdown resulted in a significant decrease in polysome assembly that was concomitant with an increase in the abundance of 80S monosomal subunits (Fig. 6A; Supplemental Fig. 6A), suggesting potential defects in translation initiation. Importantly, complementation of these LARP1-depleted cells with an RNAi-resistant form of LARP1 that partially restored LARP1 expression (Supplemental Fig. 7), also displayed a partial rescue of the decrease in polysome assembly (Supplemental Fig. 7), suggesting that these effects were specific to LARP1 knockdown and not caused by random off-target effects. While mTOR inhibition using PI-103 or Ku-0063794 resulted in similar polysome assembly defects (Fig. 6B; Supplemental Fig. 6B), we did not find altered mTOR signaling in LARP1-depleted cells (Fig. 6A), indicating that LARP1 may be regulating translation initiation downstream of mTORC1.

While mTORC1 controls global mRNA translation via the 4E-BPs, mRNAs that contain a 5'TOP sequence have been shown to be more dependent on its activity (Hsieh et al. 2012; Thoreen et al. 2012). Interestingly, LARP1 is related to LARP3 and LARP7, which were previously shown to directly bind 5'TOP sequences (Pellizzoni et al. 1996; Crosio et al. 2000; Cardinali et al. 2003; Markert et al. 2008). To determine whether LARP1 could affect the abundance of 5'TOP mRNAs in actively translating polysomes, we used a targeted quantitative real-time PCR (qPCR) approach. Based on a recent report (Thoreen et al. 2012), we selected ten control mRNAs which did not have a 5'TOP sequence and that were found to be mostly insensitive to mTOR inhibition. Conversely, ten mRNAs harboring a 5'TOP sequence were chosen based on their high sensitivity to mTOR inhibition (Thoreen et al. 2012). First, we determined the effect of mTOR antagonists (PI-103 and Ku-0063794) and in agreement with previous reports (Hsieh et al. 2012; Thoreen et al. 2012), our results show that

mTOR inhibition preferentially decreased 5'TOP mRNA loading in polysomes (mean inhibition: ~90%), whereas non-TOP mRNAs were less significantly affected (mean inhibition: ~50%) (Fig. 6B and Supplemental Fig. 6D). We then analyzed polysome preparations from LARP1-depleted cells and found a significant reduction in 5'TOP mRNA loading compared to non-TOP mRNAs (Fig. 6A and Supplemental Fig. 6C). Importantly, long-term LARP1 depletion was also found to reduce the abundance of proteins encoded by 5'TOP mRNAs, including PABP, rpS6, rpS20 and rpL32 (Fig. 6E), consistent with the idea that LARP1 is required for their expression.

Next we determined if LARP1 could selectively associate with 5'TOP mRNAs, when compared to mRNAs that do not contain a TOP motif. We performed RNA-immunoprecipitation (RIP) experiments with both endogenous and exogenous LARP1 followed by qPCR (Fig. 6C). Using this approach, we found that LARP1 strongly enriched 5'TOP mRNAs over non-TOP mRNAs, irrespective of whether endogenous (>27-fold) or exogenous (>10-fold) LARP1 was immunopurified (Fig. 6D). Taken together, these results suggest a model whereby mTORC1 mediates cell growth and proliferation by promoting 5'TOP mRNA translation through known mechanisms involving 4E-BP inhibition, but also through the regulation of LARP1 which appears to be required for the efficient translation of 5'TOP mRNAs (Fig. 7). Aside from LARP1, our proteomic results also suggest that many more proteins have unappreciated roles in mRNA translation.

## Discussion

While the basic mechanisms of mRNA translation have been elucidated in great detail, the identity and function of the factors implicated in targeted protein synthesis are lacking. Combining for the first time  $m^7GTP$ -affinity chromatography with quantitative mass spectrometry led to the identification of many proteins with uncharacterized roles in mRNA translation and metabolism (Fig. 1). While several of these components were previously shown to have important roles in diverse cellular processes, others, such as KIAA0564, C17orf85, and FAM98A, are completely uncharacterized. These findings underscore the complexity of targeted mRNA translation and the importance of developing novel strategies for globally identifying and characterizing new regulators of mRNA translation.

The control of gene expression at the translational level provides an efficient means for cells to rapidly respond to their changing environment. This tightly regulated process is highly dependent on mTORC1, which orchestrates a series of molecular events resulting in the recruitment and activation of several components of the translation machinery (Roux and Topisirovic 2012). Treatment of cells with mTORC1 agonists and antagonists led to the identification of many novel mTOR-regulated proteins that interact with the mRNA 5' cap (Fig. 3; Tables 1 and 2). In agreement with previous studies demonstrating an essential role for the 4E-BPs in mTOR-mediated global and targeted translation (Hsieh et al. 2012; Thoreen et al. 2012), we show that the 4E-BPs are necessary for the regulated association of most identified proteins (Fig. 2D, E and 3A). Though the 4E-BPs regulate global mRNA translation downstream of mTORC1, primarily due to their effects on eIF4F complex assembly, additional factors are likely to be required for the preferential translation of 5'TOP mRNAs which are hypersensitive to mTOR inhibition (Gentilella and Thomas 2012). An important goal of this proteomic study was to determine whether different classes of RNA-binding proteins could, at least in part, explain how mTORC1 differentially regulates both global and targeted mRNA translation. Aside from LARP1, we identified several RNA-binding proteins that appear to associate to the mRNA 5' cap, including several heterogeneous nuclear ribonucleoproteins (hnRNPs) and DEAD/DEAH box helicases.

Our results indicate that LARP1 associates with the translation machinery and regulates both global and targeted mRNA translation. Although LARP1 depletion significantly



decreased the abundance of 5'TOP mRNAs within polysome preparations, this effect was not as robust as mTOR inhibitor treatments (Fig. 6A, B). One possible explanation for this partial effect is that residual amounts of LARP1 could be sufficient to mediate basal levels of 5'TOP mRNA translation. Another possibility is that other RNA-binding proteins, including other LARPs, could compensate LARP1 function during its depletion. Indeed, LARP3 and LARP7 have been shown to associate with 5'TOP mRNAs (Pellizzoni et al. 1996; Crosio et al. 2000; Cardinali et al. 2003; Markert et al. 2008); however, it is not clear whether this association positively or negatively impacts their translation. Consistent with our findings, a recent report indicated that LARP1 specifically interacts with 5'TOP mRNAs (Aoki et al. 2013). The authors suggested that LARP1 could positively regulate 5'TOP mRNA stability. Though we have not seen this effect in our experiments, which were performed at steady state, it is likely that treatment of cells with transcriptional inhibitors such as actinomycin D is necessary to observe changes in TOP mRNA stability. Nevertheless, these intriguing findings raise the possibility of at least two potential mechanisms for the regulation of 5'TOP mRNAs by LARP1 that are not necessarily mutually exclusive but rather complementary. Although binding of LARP1 to the 5'TOP sequence, which is adjacent to the mRNA cap structure, might be necessary to stabilize and/or transport these transcripts, it is likely that LARP1 will have to dissociate from these motifs in order for the eIF4F complex to nucleate and promote translation initiation. The observation that LARP1 cosediments with 40S, 60S, 80S and polysomal fractions (Fig. 4A), associates with the cap complex in the absence of mRNA (Fig 3A,B), and interacts with PABP (Fig. 4C, D), strongly supports a model whereby LARP1 promotes 5'TOP mRNA translation. Nevertheless, future work is required to fully understand the exact mechanisms by which LARP1 coordinates both 5'TOP mRNA stability and translation.

Another fascinating question that arises from our work is why so many RNA-binding proteins associate with the mRNA 5' cap upon mTOR activation? One possible explanation is that each RNA-binding protein associates with and regulates the translation of a specific subset of mRNAs. In agreement with this hypothesis, DDX3 was previously shown to associate with the eIF4F complex and to regulate translation of a specific subset of mRNAs containing a complex 5'UTR (Soto-Rifo et al. 2012). We also identified DDX3 in our

proteomic screen, but additionally, we found an mTOR-dependent association of DDX3 with the eIF4F complex (Fig. 3C). Another explanation for the high number of RNA-binding proteins is the possibility that a substantial amount of overlap exists between RNA-binding proteins, thus ensuring compensatory mechanisms in the event of deregulation. In agreement with this possibility, it has been reported that although there is diverse binding specificities among RNA-binding proteins, there is also a considerable amount of overlap (Hogan et al. 2008). Both TIA-1 and AUF-1 were identified as proteins that specifically associate with TOP mRNAs during amino acid starvation. TIA-1 binding to the TOP sequence represses their translation and decreases their association to polysome (Damgaard and Lykke-Andersen 2011; Ivanov et al. 2011). While we did not identify these proteins in our screen, we expect them to behave like the 4E-BPs and to be specifically recruited to the mRNA 5' cap in condition where mTOR is inhibited.

Complementary approaches were used to gain in-depth knowledge on how LARP1 regulates mRNA translation. Similar to PABP, we found that LARP1 cosedimented with both subpolysomal and polysomal particles, and associated with the mRNA 5' cap in an mTOR-dependent manner. Furthermore, deletion of a C-terminal stretch of DM15 motifs in LARP1 significantly reduced its association with PABP, the eIF4F complex as well as actively translating ribosomes. Notably, LARP1 association with PABP did not seem to be regulated by mTOR activity, suggesting the possibility of a preformed complex that is recruited to the translation apparatus following mTOR activation. Furthermore, we show that LARP1 forms a complex with mTORC1 but not mTORC2 by associating with Raptor. This association is consistent with previous reports showing that mTORC1 substrates require Raptor for recruitment to the complex. It is noteworthy that LARP1 contains several putative TOR signaling (TOS) motifs that may be required for efficient binding, as reported for other Raptor-binding proteins. Interestingly, recent large-scale quantitative proteomics experiments (Hsu et al. 2011; Yu et al. 2011) identified multiple mTOR-dependent phosphorylation sites in LARP1, suggesting another possible level of control by mTORC1 signaling.

Given that LARP1 promotes global protein synthesis and cell proliferation, it is reasonable to think that its expression may be upregulated in a number of diseases including different types of cancer. As such, LARP1 mRNA was shown to be particularly upregulated in

liver cancer (Chen et al. 2002; Wurmbach et al. 2007; Roessler et al. 2010). In addition, a recent study showed that LARP1 mRNA and protein levels were upregulated in several hepatocellular carcinoma (HCC) cell lines as well as in HCC patients who concomitantly had a lower survival rate (Xie et al., 2013), raising the possibility that LARP1 may serve as a biomarker for predicting the prognosis of HCC. Despite promising preclinical and early clinical results obtained with mTOR inhibitors, resistance of cancer cells to these treatments has been reported. Several explanations for this resistance have been proposed, including feedback PI3K activation and loss of 4E-BP1/2 expression or overexpression of eIF4E (Alain et al. 2012). Overexpression of LARP1 in cancer cells suggests the possibility that it may promote resistance to mTOR inhibitors by facilitating cell growth and proliferation independently of mTOR activity.

This study provides new insights into the identity and regulation of components that associate with the mRNA 5' cap. It also sheds light on how mTOR regulates both global and specific mRNA translation. Most importantly, LARP1 was identified as a key molecule involved in cell growth and proliferation, suggesting that it may be a valuable therapeutic target for the treatment of cancer.

## **Materials and Methods**

### *Cell Culture and Treatments*

HEK293, HEC-1B, A549, as well as wild-type and *4E-BP1/4E-BP2* double knockout MEFs (kindly provided by Dr. Nahum Sonenberg) were maintained at 37°C in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) with 4.5 g/liter glucose supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) and antibiotics. For insulin stimulation, cells were serum-starved overnight and treated with insulin (100 nM) for 30 min. For mTOR inhibition, serum-growing cells were treated with PI-103 (1 μM), Ku-0063794 (5 μM) or rapamycin (100 nM) (Biomol, Plymouth Meeting, PA) for one hour before being harvested.

### *RNA Interference (RNAi) and Viral Infections*

For short hairpin RNA (shRNA)-mediated knockdown of LARP1, lentiviruses were produced using vectors from the Mission TRC shRNA library. Cells were infected in the presence of 4 μg/ml polybrene, and 3 days after viral infection, HEK293, A549 and HEC1B cells were treated and selected with 2 μg/ml puromycin. shRNA constructs were obtained from Sigma-Aldrich (shLARP1, TRCN0000575, TRCN0000624, TRCN0000891).

### *Immunoprecipitations, Cap-Binding Assays and Immunoblotting*

HEK293 and MEFs were washed with ice-cold PBS and lysed in 10 mM K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, 1 mM EDTA, 5 mM EGTA, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM β-glycerophosphate, 0.5% NP-40, 0.1% Brij 35, 0.1% deoxycholic acid, 1 mM sodium orthovanadate (Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>), 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), and a complete protease inhibitor cocktail tablet (Roche, Indianapolis, IN). For immunoprecipitations, HEK293 cell lysates were incubated with the indicated antibody or control IgG (Santa Cruz Biotechnology) for 2 h, followed by one hour incubation with protein A-Sepharose CL-4B beads (GE Healthcare, Waukesha, WI). Immunoprecipitates were washed thrice in lysis buffer and beads were eluted and boiled in 2x reducing sample buffer (5x is 60 mM Tris-HCl [pH 6.8], 25% glycerol, 2% SDS, 14.4 mM 2-mercaptoethanol, and 0.1% bromophenol blue). Where indicated, cells were harvested in CHAPS lysis buffer (40 mM HEPES [pH 7.4], 2 mM EDTA, 10 mM sodium pyrophosphate, 10 mM β-glycerophosphate, and 0.3% CHAPS). For cap-binding assays, HEK293 and MEF cells were lysed in 10 mM

Tris [pH 8], 150 mM NaCl, 10% glycerol, 1% NP-40. Cell lysates were incubated with 7-methyl-GTP Sepharose (GE Healthcare) for 2 h. Samples were washed twice in lysis buffer and twice in lysis buffer without detergent. Pull-down were eluted with 1 mM free 7-methyl-GTP (GE Healthcare) for 1 h at room temperature and precipitated overnight at 4°C with TCA. Eluates and total cell lysates were subjected to 10% SDS-PAGE, and resolved proteins were transferred onto polyvinylidene difluoride (PVDF) membranes for immunoblotting.

### *Epifluorescence Microscopy*

For immunofluorescence analyses,  $3 \times 10^4$  HEK293 cells were seeded in 12-well plates containing coverslips. Twenty-four hours later, cells were transfected with myc-tagged LARP1 and HA-tagged Raptor. Forty-eight hours later, cells were washed twice in PBS and fixed in 3.7% formaldehyde for 10 min at room temperature. Cells were washed twice in PBS, permeabilized for 5 min in PBS containing 0.2% Triton X-100, and blocked with PBS containing 0.1% bovine serum albumin for 30 min. Cells were incubated for 2 h with anti-Myc and anti-HA antibodies, washed twice with PBS, and incubated for 1 h with Alexa Fluor 488- or 555-conjugated goat anti-mouse or -rabbit secondary antibodies (Invitrogen). Cells were stained with DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) diluted in PBS and mounted on slides with Prolong gold (Invitrogen). Images were acquired on a Zeiss Axio Imager Z1 wide-field fluorescence microscope using a  $\times 40$  oil-immersion objective.

### *Polysomal mRNA profiling*

Sucrose gradient velocity sedimentation was employed to isolate the monosomal and polysomal fractions. For experiments using LARP1-depleted cells, following selection with puromycin, cells were passaged once in 15 cm dishes and then maintained in DMEM containing 10% serum and puromycin.  $9 \times 10^6$  HEK293, A549 and HEC1B LARP1-depleted cells were seeded in 15 cm dishes and 24 h later fresh medium without puromycin was added and cells were grown for another 24 hours prior to harvesting. For LARP1 rescue experiments, 24 hours after seeding  $9 \times 10^6$  HEK293 in 15 cm dishes containing DMEM with 10% serum and puromycin, cells were transfected with 9  $\mu$ g of RNAi-resistant LARP1 plasmid using calcium-phosphate and 24 hrs later puromycin was removed and cells were grown for another 24 hours. Ten minutes before harvesting, 100  $\mu$ g/ml cycloheximide was added to the culture

medium. Cells were washed in ice-cold PBS supplemented with 100 µg/ml cycloheximide and collected in polysome lysis buffer (PLB; 15 mM Tris [pH 7.4], 250 mM NaCl, 15 mM MgCl<sub>2</sub>, 1% Triton X-100, 100 µg/ml cycloheximide, 1 mM DTT, 400U/ml RNase Out (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA) and protease inhibitors. Samples were centrifuged at 10,000 × g for 10 min at 4°C. Protein concentration in the resulting supernatants was measured by Bradford and equal amounts of protein were layered on a 20-50% linear sucrose gradient and centrifuged in a Beckman SW41Ti rotor at 92,000 × g for 3 hours at 4°C. Following centrifugation, the A<sub>254</sub> was continuously monitored and recorded using a Gradient Station IP (Biocomp, Fredericton, NB) attached to a UV-MII (GE Healthcare) spectrophotometer. Polysomal fractions were collected and RNA was extracted using RNeasy Mini Kit (Qiagen).

#### *RNA-Immunoprecipitation*

Cells were washed with ice-cold PBS and lysed in RIP buffer (50 mM Tris-HCl [pH 7.4], 300 mM NaCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.05% NP-40, 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 1 mM PMSF, 1 mM DTT, 200 U/ml RNase Out, 100 µg/ml yeast tRNA (Sigma) and protease inhibitors). For immunoprecipitations, cell lysates were pre-cleared with protein A-Sepharose beads for 30 min and then incubated with the indicated antibody for 2 h, followed by 1 hour incubation with protein A-Sepharose beads. Immunoprecipitates were washed 6 times with RIP buffer and divided for western blot and for RNA extraction. RNA was eluted twice with elution buffer (PK: 50 mM Tris-HCl [pH 7.4], 100 mM NaCl, 10 mM EDTA, 1% SDS, 5 mM DTT, 400 U/ml RNase Out, 0.25 µg/ml yeast) during 15 min at 65°C and digested with 4 mg/ml proteinase K (Roche) for 40 min at 37°C. RNA was then extracted with phenol-chloroform.

## **Acknowledgments**

We deeply appreciate all members of our laboratories for their insightful discussions and comments on the manuscript and the data. This work was supported by grants from the Cancer Research Society (P.P.R.), the Canadian Institutes for Health Research (P.P.R.), and the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (P.P.R.), as well as the United States National Institutes of Health (S.P.G.; HG3456). P.P. Roux holds a Canada Research Chair in Signal Transduction and Proteomics. M. Cargnello holds a doctoral studentship from the Fonds de la recherche en santé du Québec (FRSQ). IRIC core facilities are supported by the FRSQ.

## References

- Alain T, Morita M, Fonseca BD, Yanagiya A, Siddiqui N, Bhat M, Zammit D, Marcus V, Metrakos P, Voyer LA et al. 2012. eIF4E/4E-BP ratio predicts the efficacy of mTOR targeted therapies. *Cancer Res* **72**: 6468-6476.
- Aoki K, Adachi S, Homoto M, Kusano H, Koike K, Natsume T. 2013. LARP1 specifically recognizes the 3' terminus of poly(A) mRNA. *FEBS letters* **587**: 2173-2178.
- Avni D, Biberman Y, Meyuhas O. 1997. The 5' terminal oligopyrimidine tract confers translational control on TOP mRNAs in a cell type- and sequence context-dependent manner. *Nucleic acids research* **25**: 995-1001.
- Bayfield MA, Yang R, Maraia RJ. 2010. Conserved and divergent features of the structure and function of La and La-related proteins (LARPs). *Biochim Biophys Acta* **1799**: 365-378.
- Blagden SP, Gatt MK, Archambault V, Lada K, Ichihara K, Lilley KS, Inoue YH, Glover DM. 2009. Drosophila Larp associates with poly(A)-binding protein and is required for male fertility and syncytial embryo development. *Dev Biol* **334**: 186-197.
- Burrows C, Abd Latip N, Lam SJ, Carpenter L, Sawicka K, Tzolovsky G, Gabra H, Bushell M, Glover DM, Willis AE et al. 2010. The RNA binding protein Larp1 regulates cell division, apoptosis and cell migration. *Nucleic acids research* **38**: 5542-5553.
- Cardinali B, Carissimi C, Gravina P, Pierandrei-Amaldi P. 2003. La protein is associated with terminal oligopyrimidine mRNAs in actively translating polysomes. *The Journal of biological chemistry* **278**: 35145-35151.
- Chauvet S, Maurel-Zaffran C, Miassod R, Jullien N, Pradel J, Aragnol D. 2000. dlarp, a new candidate Hox target in Drosophila whose orthologue in mouse is expressed at sites of epithelium/mesenchymal interactions. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* **218**: 401-413.
- Chen X, Cheung ST, So S, Fan ST, Barry C, Higgins J, Lai KM, Ji J, Dudoit S, Ng IO et al. 2002. Gene expression patterns in human liver cancers. *Molecular biology of the cell* **13**: 1929-1939.
- Crosio C, Boyl PP, Loreni F, Pierandrei-Amaldi P, Amaldi F. 2000. La protein has a positive effect on the translation of TOP mRNAs in vivo. *Nucleic acids research* **28**: 2927-2934.



- Damgaard CK, Lykke-Andersen J. 2011. Translational coregulation of 5'TOP mRNAs by TIA-1 and TIAR. *Genes & development* **25**: 2057-2068.
- Dowling RJ, Topisirovic I, Alain T, Bidinosti M, Fonseca BD, Petroulakis E, Wang X, Larsson O, Selvaraj A, Liu Y et al. 2010. mTORC1-mediated cell proliferation, but not cell growth, controlled by the 4E-BPs. *Science* **328**: 1172-1176.
- Fingar DC, Richardson CJ, Tee AR, Cheatham L, Tsou C, Blenis J. 2004. mTOR controls cell cycle progression through its cell growth effectors S6K1 and 4E-BP1/eukaryotic translation initiation factor 4E. *Mol Cell Biol* **24**: 200-216.
- Foster KG, Fingar DC. 2010. Mammalian target of rapamycin (mTOR): conducting the cellular signaling symphony. *J Biol Chem* **285**: 14071-14077.
- Gentilella A, Thomas G. 2012. Cancer biology: The director's cut. *Nature* **485**: 50-51.
- Hogan DJ, Riordan DP, Gerber AP, Herschlag D, Brown PO. 2008. Diverse RNA-binding proteins interact with functionally related sets of RNAs, suggesting an extensive regulatory system. *PLoS Biol* **6**: e255.
- Hsieh AC, Liu Y, Edlind MP, Ingolia NT, Janes MR, Sher A, Shi EY, Stumpf CR, Christensen C, Bonham MJ et al. 2012. The translational landscape of mTOR signalling steers cancer initiation and metastasis. *Nature* **485**: 55-61.
- Hsu PP, Kang SA, Rameseder J, Zhang Y, Ottina KA, Lim D, Peterson TR, Choi Y, Gray NS, Yaffe MB et al. 2011. The mTOR-regulated phosphoproteome reveals a mechanism of mTORC1-mediated inhibition of growth factor signaling. *Science* **332**: 1317-1322.
- Ivanov P, Kedersha N, Anderson P. 2011. Stress puts TIA on TOP. *Genes & development* **25**: 2119-2124.
- Jacinto E. 2008. What controls TOR? *IUBMB Life* **60**: 483-496.
- Jefferies HB, Reinhard C, Kozma SC, Thomas G. 1994. Rapamycin selectively represses translation of the "polypyrimidine tract" mRNA family. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **91**: 4441-4445.
- Takegawa T, Ohuchi N, Hayakawa A, Hirata S, Matsuda M, Kogure K, Kobayashi H, Inoue A, Kaspar RL. 2007. Identification of AUF1 as a rapamycin-responsive binding protein to the 5'-terminal oligopyrimidine element of mRNAs. *Archives of biochemistry and biophysics* **465**: 274-281.

- Koromilas AE, Lazaris-Karatzas A, Sonenberg N. 1992. mRNAs containing extensive secondary structure in their 5' non-coding region translate efficiently in cells overexpressing initiation factor eIF-4E. *EMBO J* **11**: 4153-4158.
- Laplante M, Sabatini DM. 2012. mTOR signaling in growth control and disease. *Cell* **149**: 274-293.
- Ma XM, Blenis J. 2009. Molecular mechanisms of mTOR-mediated translational control. *Nat Rev Mol Cell Biol* **10**: 307-318.
- Markert A, Grimm M, Martinez J, Wiesner J, Meyerhans A, Meyuhas O, Sickmann A, Fischer U. 2008. The La-related protein LARP7 is a component of the 7SK ribonucleoprotein and affects transcription of cellular and viral polymerase II genes. *EMBO Rep* **9**: 569-575.
- Meyuhas O. 2000. Synthesis of the translational apparatus is regulated at the translational level. *European journal of biochemistry / FEBS* **267**: 6321-6330.
- Nykamp K, Lee MH, Kimble J. 2008. C. elegans La-related protein, LARP-1, localizes to germline P bodies and attenuates Ras-MAPK signaling during oogenesis. *Rna* **14**: 1378-1389.
- Pause A, Belsham GJ, Gingras A, Donze O, Lin T, Lawrence JCJ, Sonenberg N. 1994. Insulin-dependent stimulation of protein synthesis by phosphorylation of a regulator of 5'-cap function. *Nature* **371**: 762-767.
- Pellizzoni L, Cardinali B, Lin-Marq N, Mercanti D, Pierandrei-Amaldi P. 1996. A Xenopus laevis homologue of the La autoantigen binds the pyrimidine tract of the 5' UTR of ribosomal protein mRNAs in vitro: implication of a protein factor in complex formation. *J Mol Biol* **259**: 904-915.
- Pestova TV, Shatsky IN, Hellen CU. 1996. Functional dissection of eukaryotic initiation factor 4F: the 4A subunit and the central domain of the 4G subunit are sufficient to mediate internal entry of 43S preinitiation complexes. *Mol Cell Biol* **16**: 6870-6878.
- Polak P, Hall MN. 2009. mTOR and the control of whole body metabolism. *Curr Opin Cell Biol* **21**: 209-218.
- Roessler S, Jia HL, Budhu A, Forgues M, Ye QH, Lee JS, Thorgeirsson SS, Sun Z, Tang ZY, Qin LX et al. 2010. A unique metastasis gene signature enables prediction of tumor

- relapse in early-stage hepatocellular carcinoma patients. *Cancer research* **70**: 10202-10212.
- Roux PP, Topisirovic I. 2012. Regulation of mRNA translation by signaling pathways. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* **4**.
- Sengupta S, Peterson TR, Sabatini DM. 2010. Regulation of the mTOR complex 1 pathway by nutrients, growth factors, and stress. *Mol Cell* **40**: 310-322.
- Shama S, Avni D, Frederickson RM, Sonenberg N, Meyuhas O. 1995. Overexpression of initiation factor eIF-4E does not relieve the translational repression of ribosomal protein mRNAs in quiescent cells. *Gene expression* **4**: 241-252.
- Sonenberg N. 2008. eIF4E, the mRNA cap-binding protein: from basic discovery to translational research. *Biochem Cell Biol* **86**: 178-183.
- Sonenberg N, Morgan MA, Merrick WC, Shatkin AJ. 1978. A polypeptide in eukaryotic initiation factors that crosslinks specifically to the 5'-terminal cap in mRNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **75**: 4843-4847.
- Soto-Rifo R, Rubilar PS, Limousin T, de Breyne S, Decimo D, Ohlmann T. 2012. DEAD-box protein DDX3 associates with eIF4F to promote translation of selected mRNAs. *EMBO J* **31**: 3745-3756.
- Tcherkezian J, Brittis PA, Thomas F, Roux PP, Flanagan JG. 2010. Transmembrane receptor DCC associates with protein synthesis machinery and regulates translation. *Cell* **141**: 632-644.
- Thoreen CC, Chantranupong L, Keys HR, Wang T, Gray NS, Sabatini DM. 2012. A unifying model for mTORC1-mediated regulation of mRNA translation. *Nature* **485**: 109-113.
- Wurmbach E, Chen YB, Khitrov G, Zhang W, Roayaie S, Schwartz M, Fiel I, Thung S, Mazzaferro V, Bruix J et al. 2007. Genome-wide molecular profiles of HCV-induced dysplasia and hepatocellular carcinoma. *Hepatology* **45**: 938-947.
- Yu Y, Yoon SO, Pouligiannis G, Yang Q, Ma XM, Villen J, Kubica N, Hoffman GR, Cantley LC, Gygi SP et al. 2011. Phosphoproteomic analysis identifies Grb10 as an mTORC1 substrate that negatively regulates insulin signaling. *Science* **332**: 1322-1326.
- Zhang Y, Ling J, Yuan C, Dubruille R, Emery P. 2013. A role for Drosophila ATX2 in activation of PER translation and circadian behavior. *Science* **340**: 879-882.

## Tables

**Table I:** Insulin-regulated candidate proteins identified in the proteomic screen

Accession Number	Protein	Peptide Count	MW	Coverage (%)	Fold change	P-value
<b>Upregulation</b>						
IPI00008524.1	Polyadenylate binding <b>PABPC1</b>	37	71	41.4	<b>8.3</b>	5.3E-90
IPI00012726.4	Polyadenylate binding <b>PABPC4</b>	16	72	19.6	<b>7.0</b>	1.8E-12
IPI00465233.1	Initiation factor <b>eIF3L</b>	7	67	12.9	<b>6.5</b>	6.7E-15
IPI00025491.1	Initiation factor <b>eIF4A1</b>	42	46	53.0	<b>5.7</b>	4.4E-42
IPI00328328.3	Initiation factor <b>eIF4A2</b>	14	46	29.0	<b>5.2</b>	1.7E-35
IPI00396370.6	Initiation factor <b>eIF3B</b>	16	92	18.9	<b>4.9</b>	5.1E-18
IPI00647650.3	Initiation factor <b>eIF3H</b>	9	40	34.4	<b>4.8</b>	4.2E-08
IPI00016910.1	Initiation factor <b>eIF3C</b>	12	105	19.0	<b>4.4</b>	2.9E-21
IPI00029012.1	Initiation factor <b>eIF3A</b>	29	167	16.0	<b>4.1</b>	9.9E-30
IPI00180154.4	Isoform 1 of <b>Ataxin-2</b>	16	140	9.8	<b>4.1</b>	1.9E-09
IPI00006181.1	Initiation factor <b>eIF3D</b>	10	64	22.6	<b>4.0</b>	1.1E-09
IPI00012795.3	Initiation factor <b>eIF3I</b>	11	37	36.0	<b>3.9</b>	8.3E-04
IPI00479262.4	Initiation factor <b>eIF4G1</b>	165	175	32.4	<b>3.8</b>	1.3E-12
IPI00761051.1	Uncharacterized protein <b>C10Orf137</b>	9	139	10.8	<b>3.3</b>	9.8E-19
IPI00290460.3	Initiation factor <b>eIF3G</b>	6	36	13.4	<b>3.1</b>	5.1E-12
IPI00219153.4	Ribosomal protein <b>L22</b>	3	15	33.6	<b>3.1</b>	3.7E-04
IPI00005198.2	Interleukin enhancer-binding <b>ILF2</b>	2	43	9.0	<b>3.0</b>	8.1E-04
IPI00185919.3	RNA-binding protein <b>LARP1</b>	7	124	10.3	<b>3.0</b>	5.7E-05
IPI00646377.1	Initiation factor <b>eIF4G3</b>	113	177	34.9	<b>3.0</b>	2.4E-231
IPI00030320.4	DEAD box RNA helicase <b>DDX6</b>	13	54	28.0	<b>2.9</b>	1.1E-16
IPI00844578.1	DEAD box RNA helicase <b>DHX9</b>	9	141	12.8	<b>2.7</b>	1.4E-23
IPI00013485.3	Ribosomal protein <b>S2</b>	5	31	19.8	<b>2.5</b>	5.3E-12
IPI00479217.1	Ribonucleoprotein <b>HNRNPU</b>	14	91	13.9	<b>2.5</b>	2.5E-06
<b>Downregulation</b>						
IPI00002570.1	Initiation factor <b>eIF4EBP2</b>	14	13	52.5	<b>0.3</b>	3.7E-24
IPI00002569.3	Initiation factor <b>eIF4EBP1</b>	13	13	51.7	<b>0.3</b>	7.8E-47

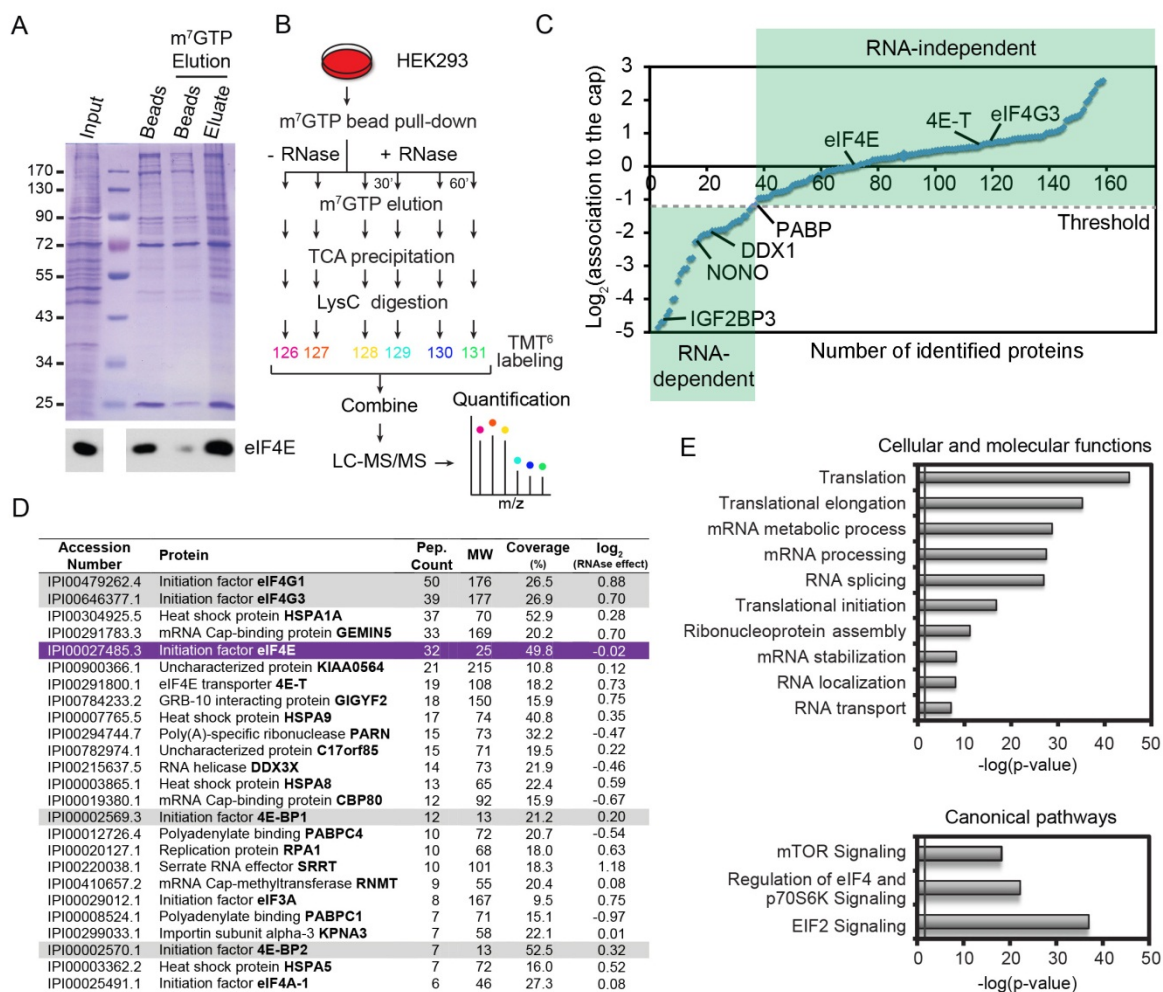
List of candidate proteins most regulated by insulin stimulation ranked according to fold changes (insulin/untreated). In grey are candidate proteins identified in both insulin and PI-103 treated conditions and showing inverse effects. \*P-values were calculated using two-way ANOVAs.

**Table II:** PI-103-regulated candidate proteins identified in the proteomic screen

Accession Number	Protein	Peptide Count	MW	Coverage (%)	Fold change	p-value
<b>Upregulation</b>						
IPI00002569.3	Initiation factor <b>eIF4EBP1</b>	12	13	21.2	<b>1.5</b>	9.2E-17
IPI00002570.1	Initiation factor <b>eIF4EBP2</b>	7	13	52.5	<b>1.3</b>	9.5E-07
<b>Downregulation</b>						
IPI00025491.1	Initiation factor <b>eIF4A1</b>	6	46	27.3	<b>0.1</b>	2.9E-29
IPI00465233.1	Initiation factor <b>eIF3L</b>	7	67	5.4	<b>0.1</b>	1.6E-04
IPI00479262.4	Initiation factor <b>eIF4G1</b>	50	175	26.5	<b>0.1</b>	1.6E-194
IPI00646377.1	Initiation factor <b>eIF4G3</b>	39	177	26.9	<b>0.1</b>	7.4E-172
IPI00647650.3	Initiation factor <b>eIF3H</b>	5	40	14.2	<b>0.1</b>	3.4E-22
IPI00290460.3	Initiation factor <b>eIF3G</b>	3	36	7.5	<b>0.1</b>	5.8E-12
IPI00016910.1	Initiation factor <b>eIF3C</b>	4	105	11.8	<b>0.1</b>	8.2E-14
IPI00029012.1	Initiation factor <b>eIF3A</b>	8	167	9.5	<b>0.2</b>	1.4E-30
IPI00012795.3	Initiation factor <b>eIF3I</b>	2	37	6.2	<b>0.2</b>	2.3E-06
IPI00012726.4	Polyadenylate binding <b>PABPC4</b>	10	72	20.7	<b>0.2</b>	4.3E-20
IPI00008524.1	Polyadenylate binding <b>PABPC1</b>	7	71	15.1	<b>0.2</b>	6.3E-17
IPI00185919.3	RNA-binding protein <b>LARP1</b>	2	124	3.9	<b>0.2</b>	4.1E-04
IPI00479217.1	Ribonucleoprotein <b>HNRNPU</b>	2	91	8.8	<b>0.3</b>	4.2E-03
IPI00844578.1	DEAD box RNA helicase <b>DHX9</b>	4	141	10.6	<b>0.3</b>	1.4E-04
IPI00221093.7	Ribosomal protein <b>S17</b>	2	16	22.2	<b>0.3</b>	5.0E-04
IPI00030320.4	DEAD box RNA helicase <b>DDX6</b>	3	54	15.5	<b>0.4</b>	4.5E-04
IPI00174442.2	Uncharacterized protein <b>FAM98A</b>	16	55	10.6	<b>0.4</b>	6.7E-03
IPI00019380.1	Cap-binding protein <b>CBP80</b>	12	92	15.9	<b>0.4</b>	3.4E-04
IPI00217030.1	Ribosomal protein <b>S4X</b>	3	30	17.9	<b>0.4</b>	9.9E-07
IPI00011253.3	Ribosomal protein <b>S3</b>	2	27	9.5	<b>0.4</b>	1.2E-05
IPI00419880.6	Ribosomal protein <b>S3A</b>	5	30	26.1	<b>0.4</b>	3.3E-09
IPI00013485.3	Ribosomal protein <b>S2</b>	4	31	13.0	<b>0.4</b>	1.5E-10
IPI00216587.9	Ribosomal protein <b>S8</b>	3	24	16.8	<b>0.4</b>	4.1E-05

List of candidate proteins most regulated by PI-103 treatment ranked according to fold changes (PI-103/untreated). In grey are candidate proteins identified in both insulin and PI-103 treated conditions and showing inverse effects. \*P-values were calculated using two-way ANOVAs.

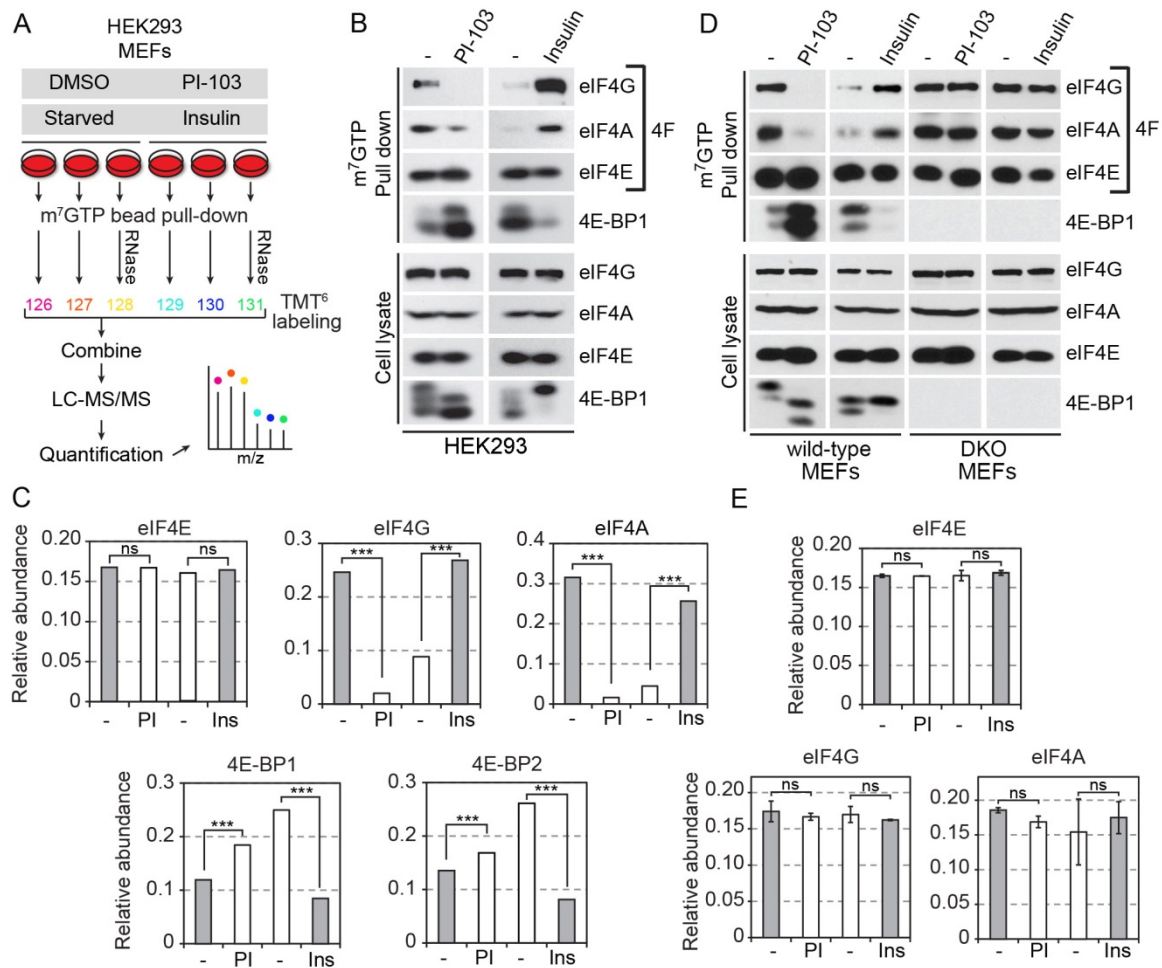
## Figures



**Figure 1.** Global Quantitative Assessment of Proteins that Associate with the mRNA 5' cap.

(A) Enrichment of eIF4E (immunoblot, bottom panel) and associated factors after specific elution with m<sup>7</sup>GTP (Coomassie gel, lane 5). (B) Schematic diagram of the multiplex workflow developed for identification and quantitation of the 5' cap-binding complex by combining m<sup>7</sup>GTP pull-down and 6-plex isobaric mass tag (TMT<sup>6</sup>) labeling in the presence or absence of RNase/Benzonase for 30 or 60 min. (C) Distribution of ~160 proteins found to be associated to the 5' cap-binding complex. The RNase dependence ratios (treated/untreated) are plotted on a log<sub>2</sub> scale, normalized with respect to eIF4E abundance. Proteins with a log<sub>2</sub> ratio ≤ 1.3 (PABPC1 threshold) such as DDX1, NONO and IGF2BP3 were considered RNA-

dependent. (D) List of the most abundant associated proteins ranked according to the numbers of peptides identified. Grey shading indicates proteins previously shown to interact directly with eIF4E (purple). Accession numbers: International Protein Index (IPI). (E) Classification of RNA-insensitive candidates according to cellular and molecular functions, or canonical signaling pathways using the DAVID Bioinformatics database (<http://david.abcc.ncifcrf.gov/>) or the Ingenuity Pathway Analysis platform (IPA, <http://www.ingenuity.com>) according to adjusted p-value. Gray line indicates minimum threshold (P=0.05).

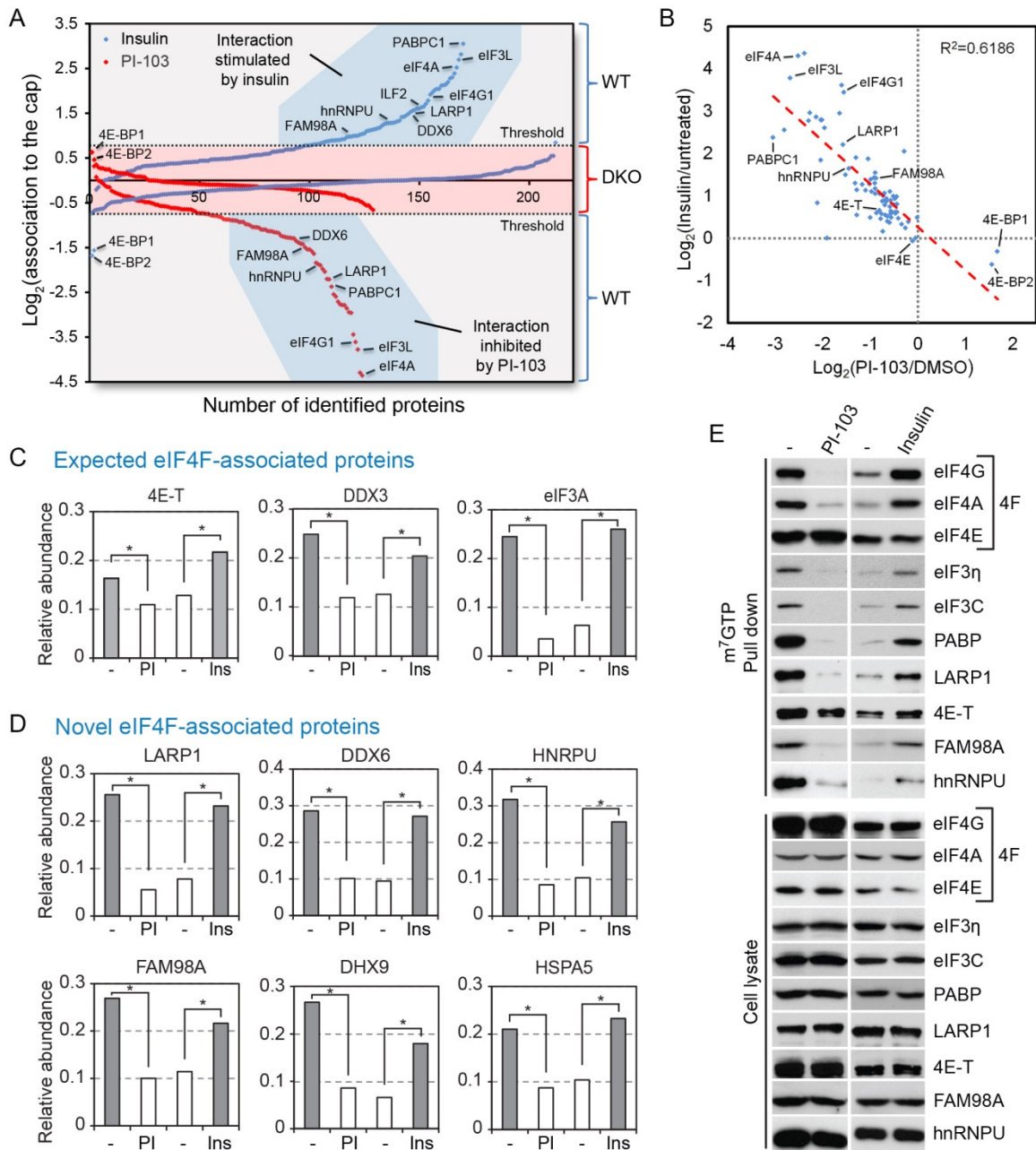


**Figure 2.** mTOR-Dependent Regulation of the 5' Cap-Binding Complex.

(A) Schematic diagram of the multiplex workflow strategy for the identification and quantitation of mTOR-regulated components. Cell treatments were performed in triplicate and all m<sup>7</sup>GTP pull-down assays were processed and TMT<sup>6</sup>-labeled individually, prior to being pooled for LC-MS/MS analysis and quantification. These experiments were also performed in the presence of RNase. (B) Effects of mTOR activity on eIF4F complex assembly using mTOR agonists and antagonists. Treatment of serum-growing cells with the dual mTOR/PI3K inhibitor PI-103 (1 μM) caused dissociation of eIF4G and eIF4A with an increase association of 4E-BP1 (lane 2, top left panels), while insulin treatment (100 nM) for 30 min had an opposite effect (lane 4, top right panels). Bottom panels show loading controls and treatment effects (4E-BPs phosphorylation shifts). (C) Bar graphs of TMT<sup>6</sup>-based quantifications for the same conditions. \*\*\* P<0.0001 using two-way ANOVAs. ns: non-significant. (D) Similar



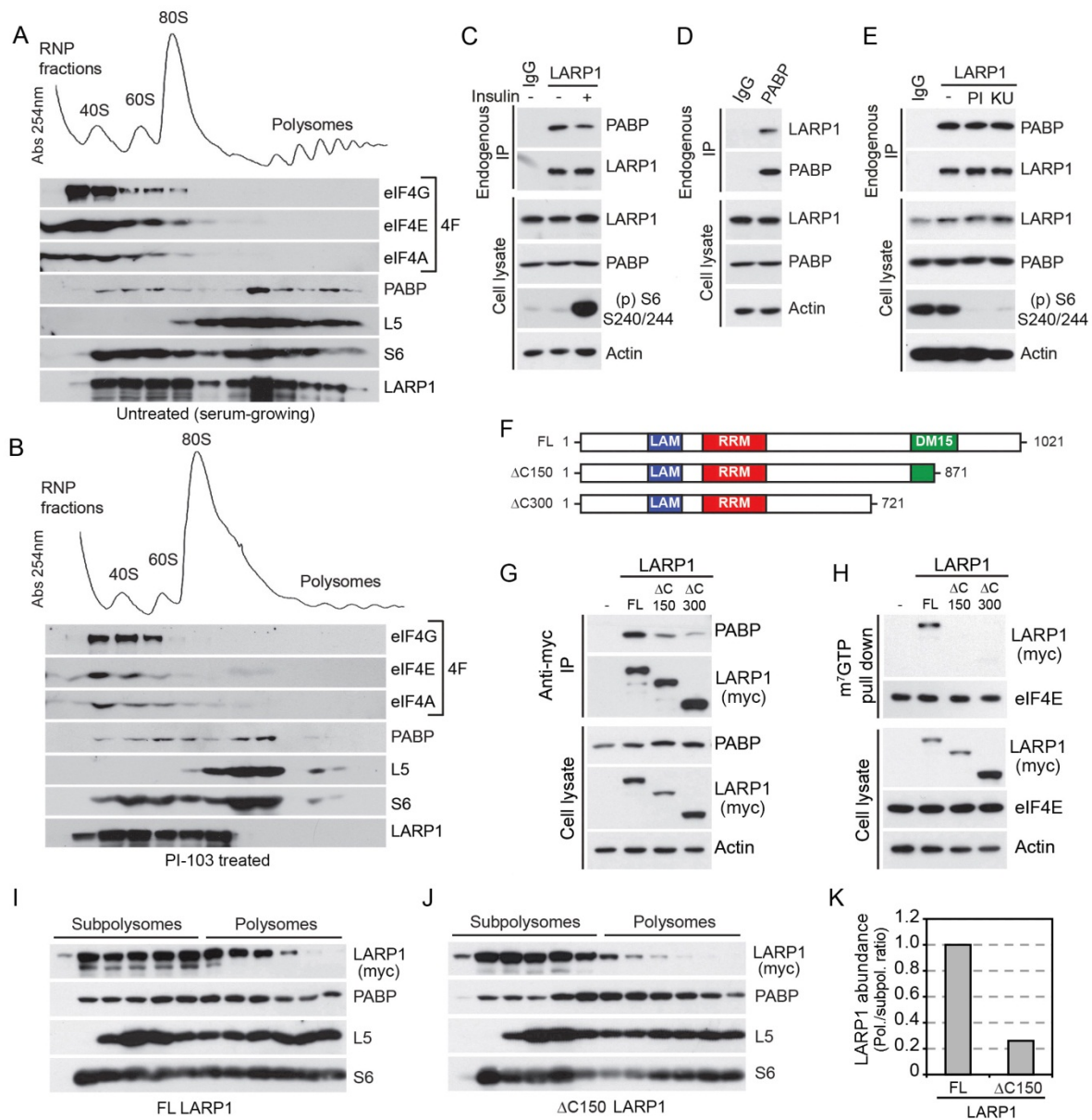
effects were seen in wild-type MEFs but complete loss of regulation was observed in 4E-BP1/2 DKO cells. (E) Bar graphs of TMT values from DKO cells also showing a loss of regulation.



**Figure 3.** Identification of Novel Components of the 5' Cap-Binding Complex.

(A) Plot highlighting the 5' cap association ratios in response to PI-103 (PI-103/DMSO, red squares) and insulin treatment (insulin/untreated, blue squares). Distributions obtained with 4E-BP1/2 DKO cells show loss of mTOR regulation (red shading) and were used to set minimum threshold for wild-type cells (grey shading). Proteins with a log<sub>2</sub> PI-103/DMSO ratio  $\geq 0.7$  and insulin/untreated ratio  $\leq 0.7$  such as FAM98A, hnRNPU, DDX6, LARP1,

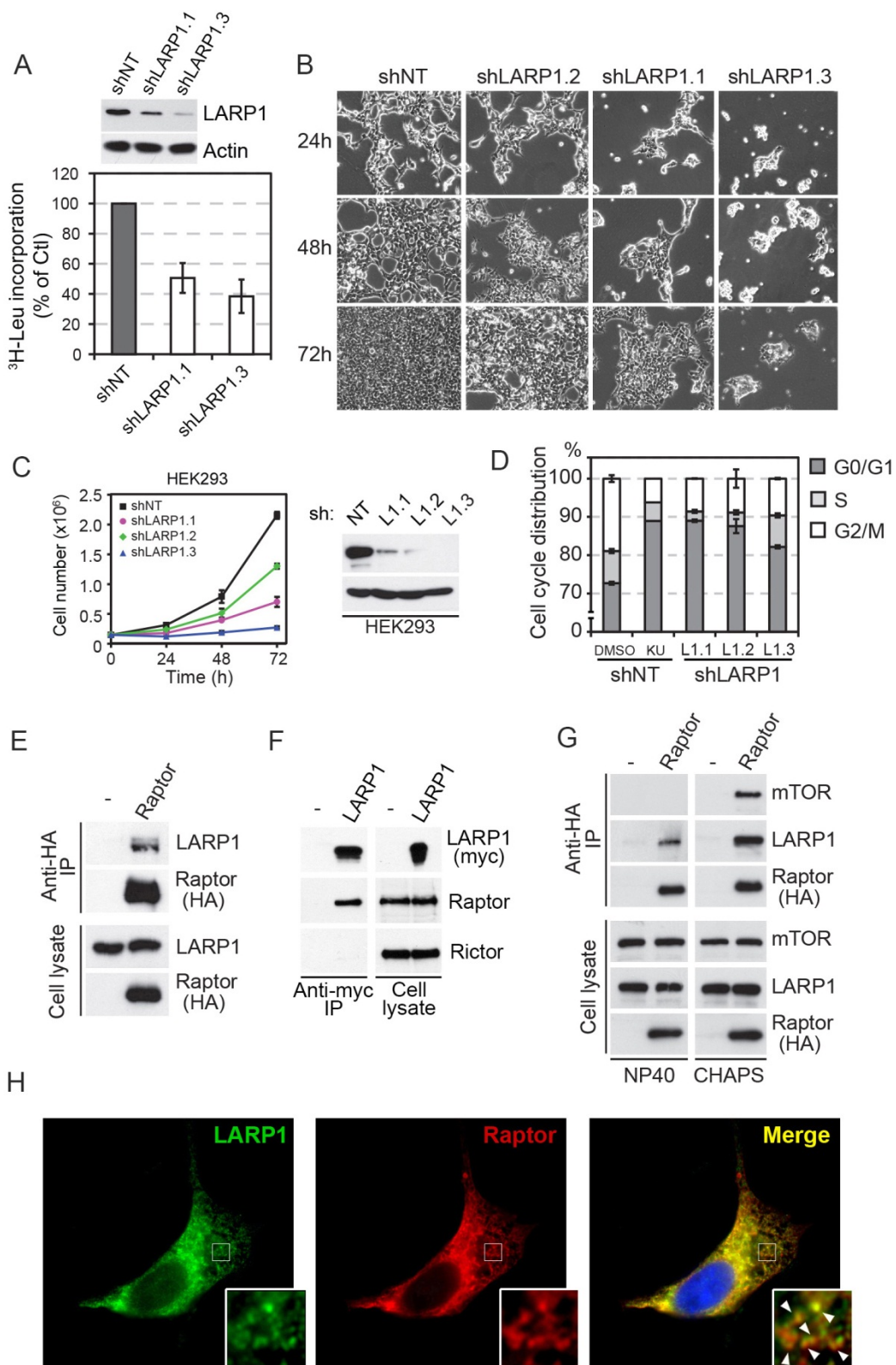
ILF2, eIF4G1, eIF4A, eIF3L, and PABPC1 were considered mTOR-regulated. Only 4E-BP1/2 showed opposite mTOR-dependent regulation. (B) Scattered plot distribution showing that a majority of insulin-regulated proteins were also inversely regulated by PI-103 ( $R^2=0.6186$ ). (C and D) Bar graphs of TMT values from workflow above depicting expected eIF4F-associated proteins including 4E-T, DDX3 and eIF3A (C) and novel eIF4F-associated proteins including LARP1, DDX6, hnRNPU, FAM98A, DHX9, and HSPA5 (D). \*  $P<0.01$  using two-way ANOVAs. (E) Several candidate proteins were also validated by immunoblotting, and all were confirmed to have mTOR-regulated association to the mRNA 5' cap.



**Figure 4. mTOR Regulates LARP1 Association to Polysomes via PABP.**

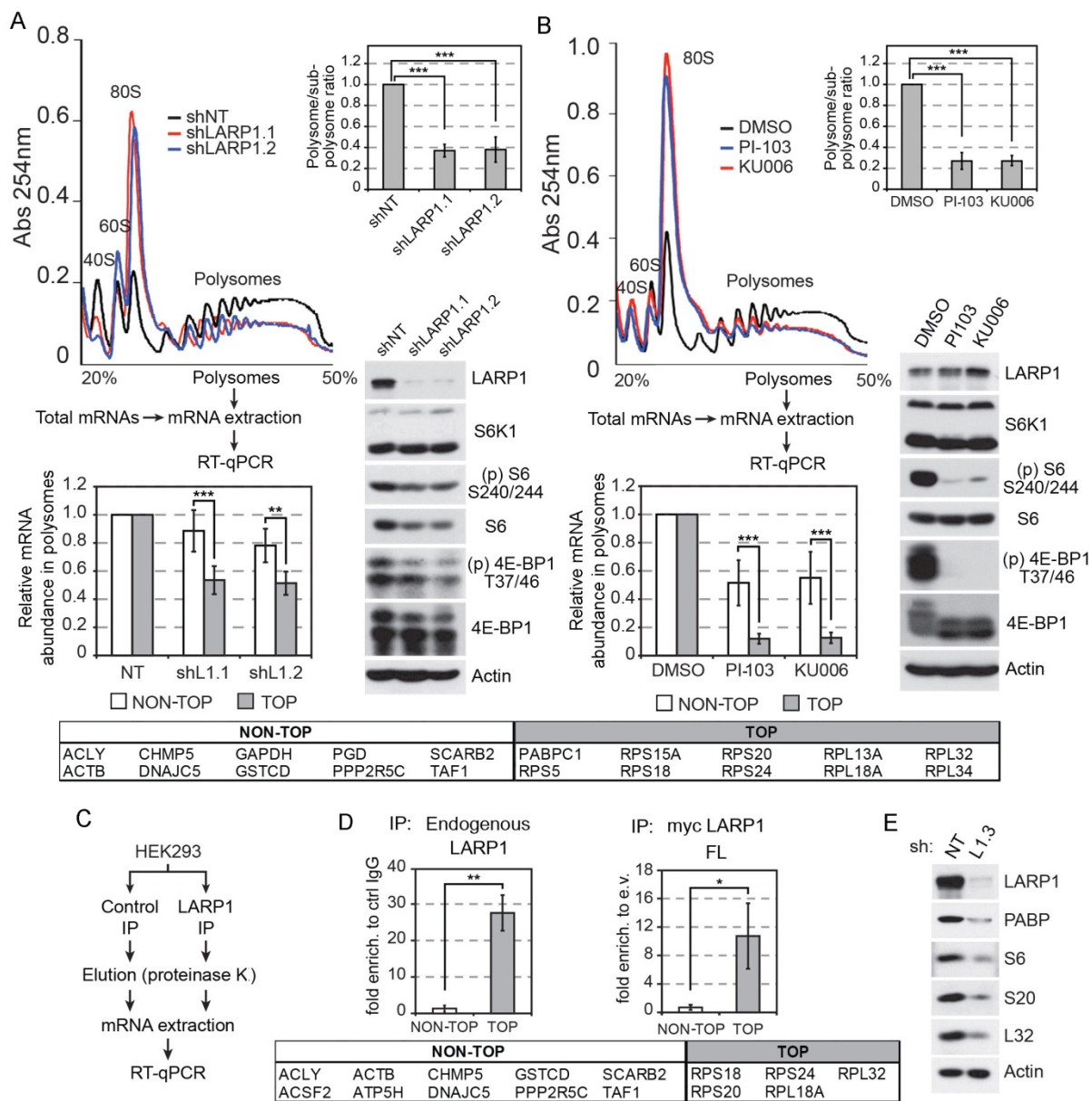
(A) Ribosome sedimentation profiling from HEK293 cell extracts. LARP1 cosedimented with 40S, 60S and 80S subpolysomal fractions as well as with polysomal fractions. Control proteins were distributed as expected from previous studies: S6 in 40S, 80S and polysomal fractions; L5 in 60S, 80S and polysomal fractions; eIF4F (eIF4E, eIF4A, and eIF4G) primarily in the 40S fractions; and PABP in all four fractions, as measured by immunoblotting. (B) Treatment of cells with PI-103 (1  $\mu$ M) for 1 hour significantly decreased polysome assembly

and concomitantly displaced polysome-associated components L5, S6, PABP, and LARP1 to subpolysomal fractions. (C, D and E) PABP coimmunoprecipitates with LARP1 independently of mTOR activation (insulin 100 nM, 30 min) or inhibition (PI-103 and Ku-0063794 for 1 hour). Bottom panels show loading and treatment controls by measuring S6 phosphorylation on serine 240/244. (F and G) LARP1 contains two putative RNA-binding domains (LAM and RRM) and a C-terminal stretch of DM15 (LARP1) motifs with unknown functions. Partial ( $\Delta$ C150) and complete ( $\Delta$ C300) LARP1 C-terminal deletion of the DM15 stretch drastically reduced association with PABP (G) and cap binding (H). (I and J) Sucrose gradient velocity sedimentation showing distribution of wild-type myc-LARP1 (I) in both subpolysomal and polysomal fractions, while the C-terminal mutant ( $\Delta$ C150)(J) primarily cosedimented with subpolysomal fractions. (K) The bar graph shows densitometry analysis of the abundance of wild-type LARP1 and the  $\Delta$ C150 mutant LARP1 in polysomal versus subpolysomal fractions.



**Figure 5. LARP1 Regulates Protein Synthesis, Cell Cycle Progression and Proliferation.**

(A) HEK293 stably expressing different shRNA constructs targeted against LARP1 (shLARP1.1 and shLARP1.3) show decreased global protein synthesis as measured by [<sup>3</sup>H]leucine incorporation, compared to control cells (shNT). (B and C) HEK293 cells stably expressing different shRNA constructs targeted against LARP1 (LARP1.1, L1.2 and L1.3) display significantly decreased cell proliferation as measured by cell counting at 24h, 48 h, and 72h. (B) DIC images show representative examples of HEK293 cells stably expressing shRNAs against LARP1. (D) Comparable to the inhibition of mTOR using Ku-0063794, knockdown of LARP1 with three different shRNAs results in a cell cycle arrest and accumulation of cells at G0/G1. (E) Endogenous LARP1 coimmunoprecipitates with HA-tagged Raptor in HEK293 cells. (F) Endogenous Raptor, but not Rictor, coimmunoprecipitates with myc-tagged LARP1. (G) The interaction between LARP1 and Raptor is not significantly affected by the presence of detergents that disrupt mTORC1. (H) Immunofluorescence showing myc-tagged LARP1 (in green) colocalizing with HA-tagged Raptor (in red), notably in puncta (insets). Nuclei stained with DAPI.

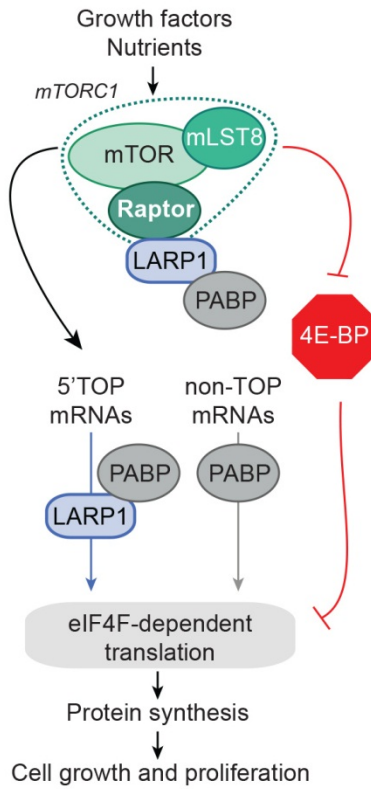


**Figure 6.** LARP1 associates with and regulates 5'TOP mRNA translation.

(A) Ribosome profiling of HEK293 cells stably expressing a non-target shRNA (shNT) or shRNAs against LARP1 (shLARP1.1 and shLARP1.2). A decrease in polysome assembly with a concomitant increase in 80S monosomes (Polysome/subpolysome ratios of 0.37 and 0.38) was found in LARP1-depleted cells. Immunoblot analysis (bottom right panels) reveals a modest effect on 4E-BP phosphorylation and S6 ribosomal protein expression. Bottom histogram shows ribosome mRNA profiling of LARP1-depleted cells (shL1.1 and shL1.2)



with a significant reduction (~50%) for 5'TOP mRNAs (average of 10 TOP mRNAs, bottom right panel, see *Materials and Methods* section) with no significant effects on control mRNAs (average of 10 NON-TOP mRNAs, bottom left panel, also see *Materials and Methods* section) when compared to a non-target shRNA (shNT). (B) Treatment of cells with mTOR inhibitors (PI-103 and Ku-0063794 for 1 hour) had a similar but stronger effect on polysome disassembly and 4E-BP phosphorylation. Bottom histogram shows ribosome mRNA profiling of cells treated with mTOR inhibitors with a significant reduction (~90%) for 5'TOP mRNAs (average of 10 TOP mRNAs, bottom right panel, see *Materials and Methods* section) with no significant effects on control mRNAs (average of 10 NON-TOP mRNAs, bottom left panel, see *Materials and Methods* section) when compared to untreated cells (DMSO). Absorbance of polysomes and subpolysomal particles was continuously monitored at 260 nm. Representative  $A_{260}$  nm traces are shown (n = 3). The areas under the curves were calculated and the Polysome/subpolysome ratio in the histograms refers to the percentage of ribosomes engaged in translation. The data are normalized to Polysome/subpolysome ratio of control condition (DMSO) and presented as a mean  $\pm$  S.E. (n = 3). \*\*\* P<0.0001 using two-way ANOVAs. (C) Diagram of the experimental workflow for the RNA-immunoprecipitation (RIP). (D) RNA-immunoprecipitation (RIP) of endogenous LARP1 (left panel) and exogenous LARP1 (right panel) showing enrichment of TOP mRNAs (average of 5 TOP mRNAs, bottom right panel, also see *Materials and Methods* section) versus NON-TOP (average of 10 non-TOP mRNAs, bottom left panel, also see *Materials and Methods* section) compared to control IgG or empty-vector. (E) Immunoblot analysis showing a significant decrease in the expression of protein encoded by 5'TOP mRNAs in HEK293 cells stably expressing an shRNA construct targeted against LARP1 (shL1.3).



**Figure 7.** Schematic representation of the role of LARP1 in mRNA translation.

Proposed model whereby mTORC1 mediates cell growth and proliferation by promoting 5'TOP mRNA translation through known mechanisms involving inhibition of the 4E-BPs, but also by facilitating the recruitment of 5'TOP mRNAs via their interaction with LARP1.

## **Supplemental Information**

Supplemental Information includes Supplemental Materials and Methods, Supplemental References and seven Figures

### **Supplemental Materials and Methods**

#### *DNA Constructs and Antibodies*

The plasmids encoding human myc-tagged LARP1 and HA-tagged Raptor were obtained from Origene (ref # RC200935) and Addgene (ref #8513), respectively. LARP1 C-terminal deletion mutants were generated by conventional PCR using pCMV6 encoding full-length LARP1 with the following forward primer: 5'-GCCGCCGCGATCGCCATGCTTTGGAGGGTGCTT-3' and 5'-CGAACCACGCGTGCCTTCTTTGGCGTCCTCCAGAGC-3' ( $\Delta$ C150), 5'-CGAACCACGCGTCTGGCTTGAGTCTTTGAGCTGTGG-3' ( $\Delta$ C300) as the reverse primers. PCR fragments and vector were digested with AsiSI and MluI prior to ligation. The non-shRNA-cleavable myc-tagged LARP1 construct was generated by introducing four silent mutations in the shRNA-target sequence of LARP1 cDNA with the QuickChange methodology (Stratagene, La Jolla, CA).

Antibodies targeted against LARP1, hnRNPU and Rictor were purchased from Bethyl Laboratories (Montgomery, TX). Antibodies targeted against 4E-T and FAM98A were purchased from Abcam (Cambridge, UK). Anti-myc, anti-HA and anti-actin monoclonal antibodies were purchased from Sigma-Aldrich (Oakville, Ontario, Canada). Antibodies targeted against eIF4E, 4E-BP1, phospho-4E-BP1 (Thr37/Thr46), S6, phospho-S6 (Ser240/244), phospho-Akt (Ser473), phospho-S/T-P motifs, mTOR, and Raptor were purchased from Cell Signaling Technologies (Beverly, MA). Anti-PABPC1, anti-eIF4AII, anti-eIF4G, anti-eIF3C, and eIF3 $\eta$  antibodies were purchased from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). The anti-L5 antibody was purchased from International Laboratory of Advanced Molecular Medicine (ILAMM, Tokyo, Japan). All secondary horseradish peroxidase (HRP)-conjugated antibodies used for immunoblotting were purchased from Chemicon (Temecula, CA).

### *LysC Digestion, TMT Labeling and Mass Spectrometry Analysis*

HEK293 and MEFs cells were either treated with insulin (100 nM) for 30 min or with PI-103 (1  $\mu$ M) or Ku-0063794 (5  $\mu$ M) for 1 hour before being harvested. 7-methyl-GTP Sepharose chromatography was performed as described above except that beads were either left untreated or treated with RNase A (100  $\mu$ g/ml, Fermentas) and benzonase (0.25 U/ $\mu$ l, Sigma) for 30 min at 25°C. Pull-down were eluted with 1 mM free 7-methyl-GTP (GE Healthcare) for 1 h at room temperature and precipitated overnight at 4°C with TCA. Following TCA precipitation, protein pellets were resuspended in 50 mM Tris, pH 8.5/8 M urea, followed by reduction and alkylation. Samples were then diluted to 4 M urea and digested with Lys-C (Wako) overnight at 37 degrees Celsius. Following digestion, samples were acidified and desalted via C18 solid phase extraction as described previously. Labeling with 6-plex TMT reagents (Thermo Scientific) was performed as previously reported (Ting et al., 2011). Peptides were then mixed and underwent a second round of C18 solid phase extraction prior to resuspension in 5% acetonitrile/ 5% formic acid for MS analysis. An LTQ-Velos-Orbitrap (Thermo Fisher Scientific) was used for all LC-MS experiments, coupled with a Famous autosampler (LC Packings) and an Agilent 1100 binary HPLC pump (Agilent Technologies) as described previously. In each instrument cycle, the top 10 most intense ions were selected in data-dependent fashion for acquisition of low-resolution ion trap MS2 spectra followed by high resolution Orbitrap MS3 spectra that were used for TMT quantitation as described previously.

### *Peptide and Protein Identification*

Raw mass spectra were associated with peptides and proteins using Sequest to search against a database containing the human IPI database (version 3.6) in forward and reverse orientations, along with sequences of common contaminants. Searches were performed at a 25 ppm precursor ion tolerance and 1.0 Da fragment ion tolerance, assuming full LysC digestion with up to two missed cleavages. Static modifications corresponding to Cys alkylation (+57.021464) and TMT labeling of Lys and peptide N-termini (+229.162932) were allowed, as was variable oxidation of Met (+15.994915). Correct peptide identifications were distinguished from incorrect using the target-decoy approach, coupled with linear discriminant analysis as described previously. Once peptides were filtered to an initial FDR of 1%, peptides were assembled into proteins and further filtered to a final protein-level FDR of 1%.

### *Quantification and Statistical Analysis*

For quantification, TMT reporter ion intensities were extracted from each Orbitrap MS3 spectrum and corrected for batch-specific isotope enrichments of each reagent. Peptides were required to have a minimum isolation specificity of 0.75 (Ting et al., 2011) and summed reporter ion S/N intensity of at least 100 with no more than 4 missing channels. Proteins were quantified by summing the reporter ion intensities for those peptides that met the minimum S/N and isolation specificity criteria. Relative abundances of all proteins across samples were normalized to the bait abundance (eIF4E), assuming equal loading across samples. Finally, reporter ion sums for each protein were normalized by each protein's sum across all six channels and were thus reported as the fractional intensity observed for each protein in each channel. Where appropriate, either T-Tests or one- or two-way ANOVAs were used in conjunction with multiple hypothesis testing correction (Benjamini and Hochberg, 1995) to identify statistically significant changes in protein expression based on matching peptide measurements. Two-way ANOVA models were applied to distinguish the effects of multiple experimental variables tested simultaneously within a single experiment (see Figure 2A); in each case, an experimental treatment (insulin or PI-103) was evaluated both with and without RNase treatment. Each of the multiple peptides matching each protein was treated as a separate quantification event for ANOVA while modeling RNase and experimental treatments as fixed factors.

### *Protein Synthesis Measurements*

Cells were seeded in 6-well plates and 48 h later, 0.5  $\mu\text{Ci/ml}$  [ $^3\text{H}$ ]leucine was added to the medium. After 6 hours, the medium was aspirated and the cells were incubated 30 min in cold 5% TCA. The wells were then washed once with 5% TCA and three times with tap water. The radioactivity incorporated into TCA-precipitable material was measured by liquid scintillation counting after solubilization in 0.1 M NaOH.

### *Quantitative Real-Time PCR*

Total RNA was reverse-transcribed using the cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA) as described by the manufacturer. Gene expression levels of endogenous controls glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) and beta-actin

(ACTB) were determined using pre-validated Taqman Gene Expression Assays (Applied Biosystems), and expression level for 5'TOP and control genes was determined using assays designed with the Universal Probe Library (UPL) from Roche. The genes tested for polysome mRNA profiling and RIP are listed below:

Ribosome mRNA profiling				Endogenous and exogenous LARP1 RIP			
NON-TOP mRNA	Gene ID	TOP mRNA	Gene ID	NON-TOP mRNA	Gene ID	TOP mRNA	Gene ID
ACLY	47	PABPC1	26986	ACLY	47	RPS18	6222
ACTB	60	RPS5	6193	ACSF2	80221	RPS20	6224
CHMP5	51510	RPS15A	6210	ACTB	60	RPS24	6229
DNAJC5	80331	RPS18	6222	ATP5H	10476	RPL18A	6142
GAPDH	2597	RPS20	6224	CHMP5	51510	RPL32	6161
GSTCD	79807	RPS24	6229	DNAJC5	80331		
PGD	5226	RPL13A	23521	GSTCD	79807		
PPP2R5C	5527	RPL18A	6142	PPP2R5C	5527		
SCARB2	950	RPL32	6161	SCARB2	950		
TAF1	6872	RPL34	6164	TAF1	6872		

#### *Cell Proliferation Assays*

HEK293, HEC1B and A549 cell lines stably expressing shRNA constructs against LARP1 or control non- target (NT) were seeded at  $1.5 \times 10^5$  in in 6-well plates and grown in 10% FBS. Cells were grown in the presence of inhibitors when indicated. The number of cells was counted every 24h during 3 consecutive days. Results represent the mean of duplicates±standard error (s.e.). DIC images were acquired using a Leica DMIRB inverted microscope with a 10X objective and equipped with a QImaging camera.

#### *Flow Cytometry Analysis of Cell Cycle Distribution and Apoptosis*

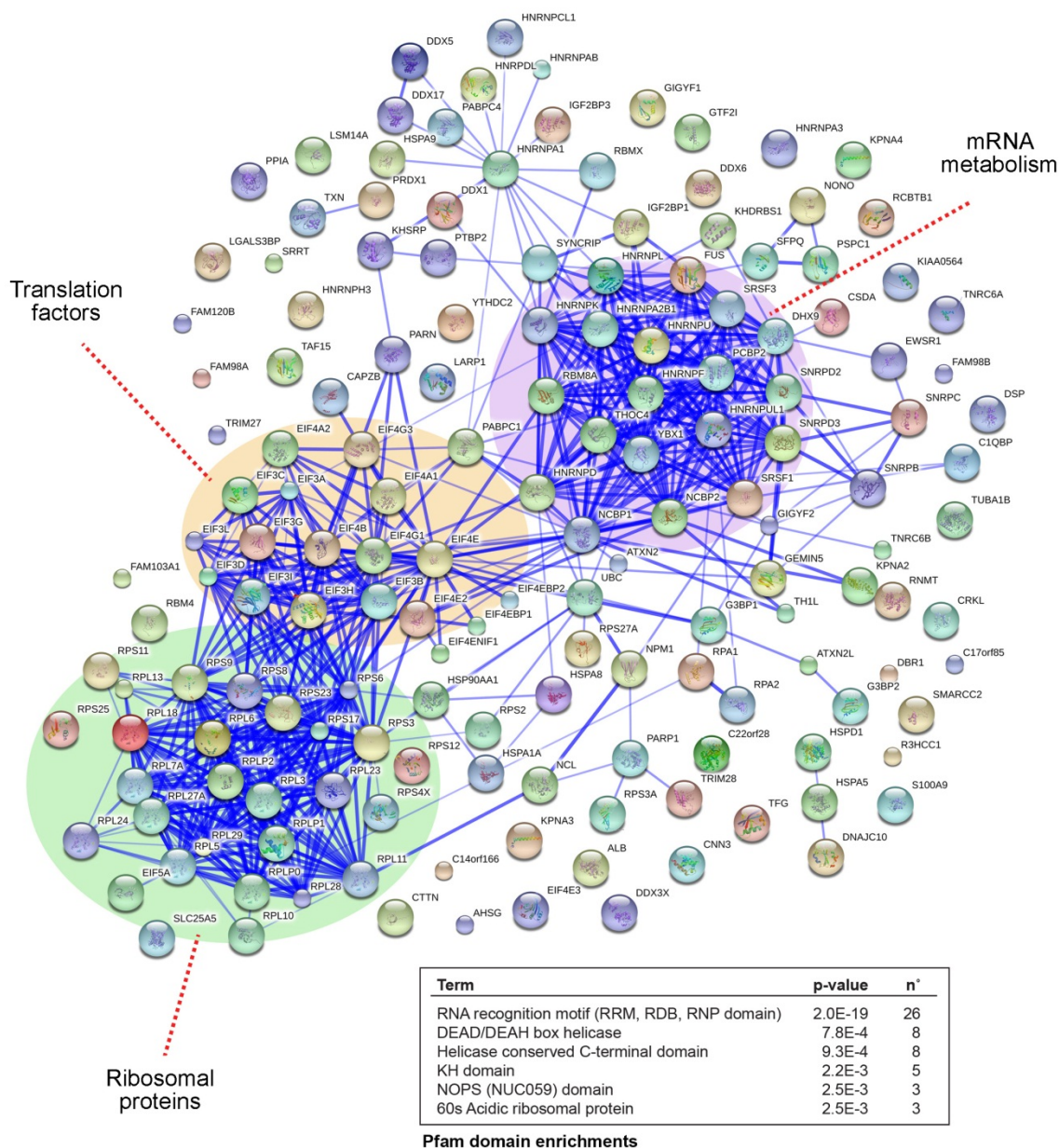
For cell cycle analysis, the DNA and RNA intercalating fluorescent dye propidium iodide (Sigma Aldrich) was used to quantify cellular DNA content and cell cycle distribution. HEK293, HEC1B and A549 cell lines stably expressing shRNA constructs against LARP1 or

control non- target (NT) were seeded at  $2.5 \times 10^5$  in 6-well plates and grown in 10% FBS for 24h and then treated with DMSO or mTOR antagonists for another 24h. Cells were harvested and fixed in 95% ethanol at  $-20^{\circ}\text{C}$ . Before analysis, cells were incubated with RNase A (100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ; Sigma Aldrich) and stained with propidium iodide (40  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) for 30 min. Samples were immediately analyzed by flow cytometry with a BD FACSCanto II flow cytometer (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) at low flow rate. A total of  $1 \times 10^4$  events were recorded per sample, and the cell distribution in G0/G1, S and G2/M phases were determined with Modfit LT software (Verity Software House, Topsham, ME, USA). For analysis of apoptotic cells were grown and seeded as described above for cell cycle analysis. After trypsinization, cells were washed twice with ice-cold PBS and  $1 \times 10^5$  cells were incubated with PE-labeled Annexin V (BD Pharmingen, San Jose, CA, USA) in cold Binding Buffer (10 mM HEPES pH 7.4, 2.5 mM  $\text{CaCl}_2$  and 140 mM NaCl) for 15 min.

### **Supplemental References**

- Benjamini, Y., and Hochberg, Y. (1995). Controlling the False Discovery Rate: a Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *J. Royal Stat. Soc. Series B* 57, 289-300.
- Ting, L., Rad, R., Gygi, S.P., and Haas, W. (2011). MS3 eliminates ratio distortion in isobaric multiplexed quantitative proteomics. *Nature Methods* 8, 937-940.

## Supplemental Figures

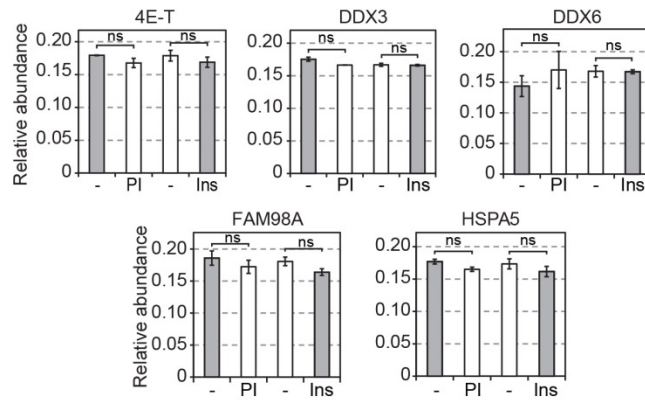


**Figure S1. Interaction Network Analysis of RNA-Independent Candidates.**

The Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes (STRING) database was used to generate an interaction network based on experimentally validated protein-protein interactions between identified proteins (RNA-dependent and -independent). The STRING database uses

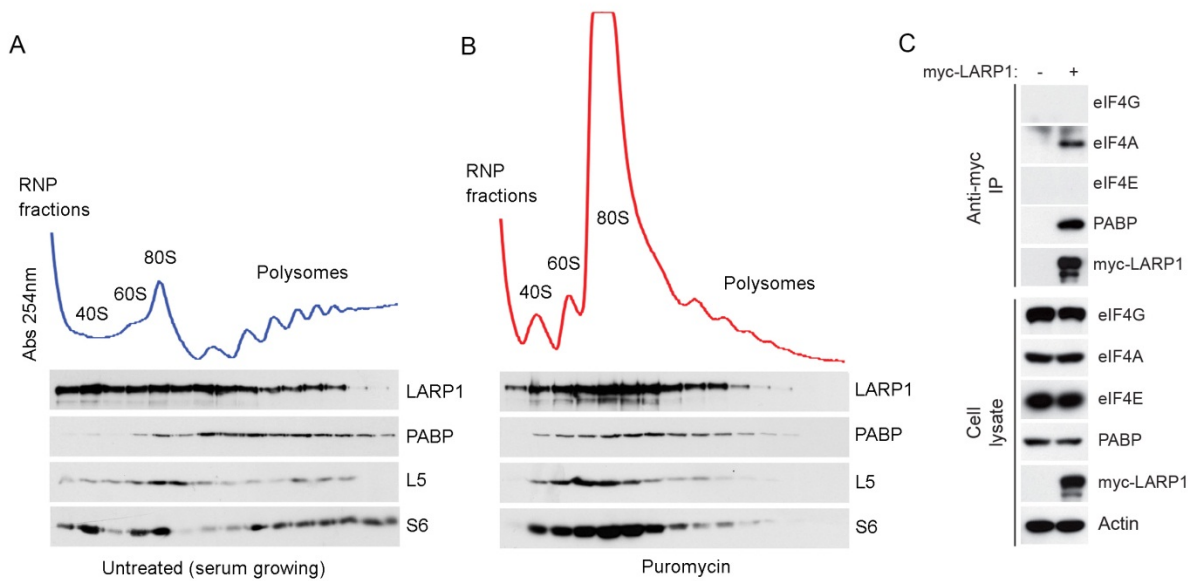


confidence scoring giving an estimate of how likely an association is to occur. This analysis revealed a tight interaction network with several nodes characterized by functional complexes, such as three major clusters for mRNA metabolism and translation (cutoff score of 0.4). Pfam domains enrichment revealed a large number of proteins containing RNA recognition motif ( $P < 2E-19$ ), consistent with the molecular functions of identified components. Notably, several candidate proteins do not have validated links to known translation components, and others appear to be completely uncharacterized.



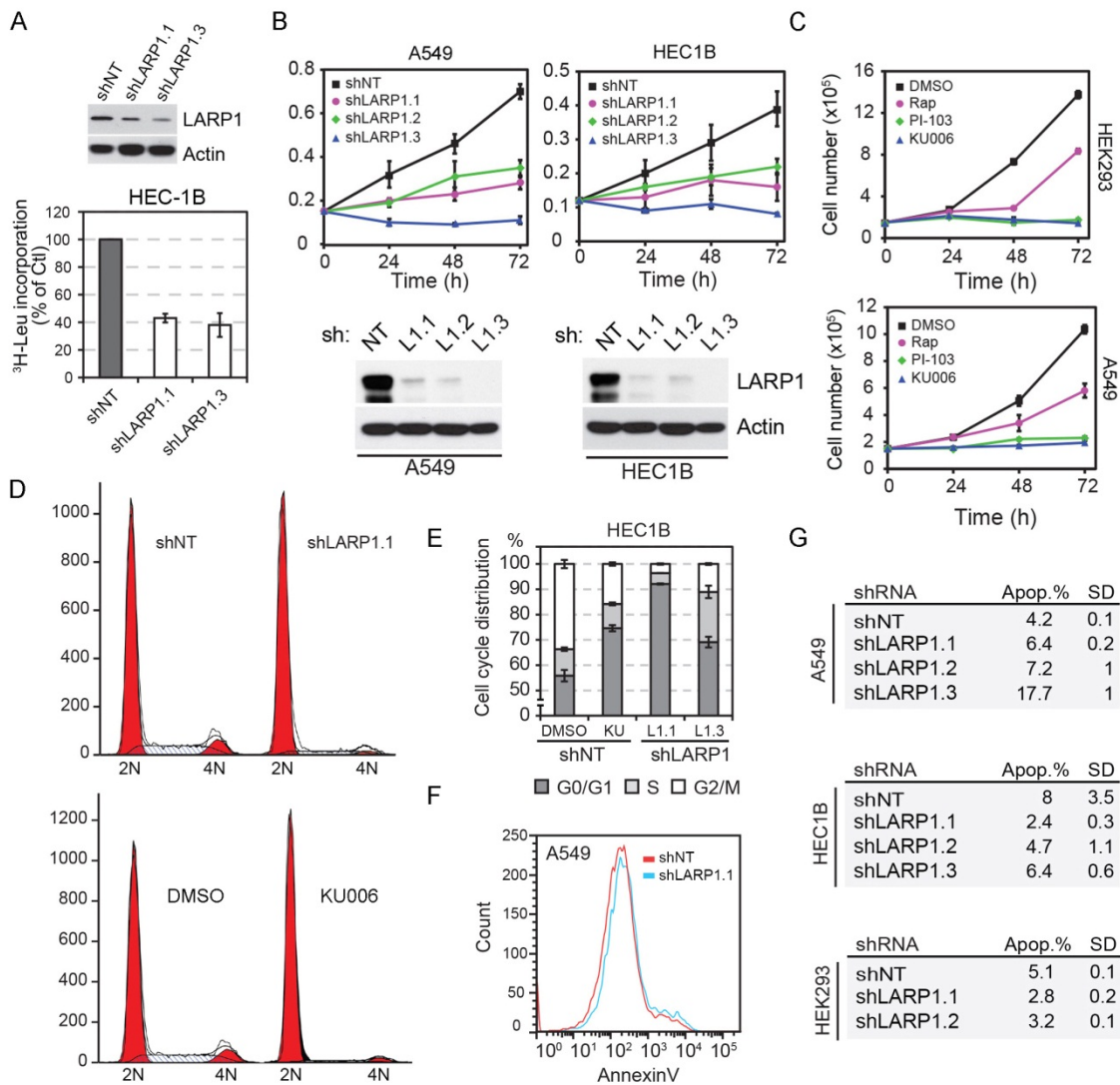
**Figure S2. Quantitative MS/MS Data of Selected Cap-Binding Complex Components Purified from 4E-BP1/2 DKO Cells.**

Histograms of TMT data (prepared as in Fig. 2E) showing lack of mTOR-dependent regulation of known (4E-T and DDX3) and novel associated proteins (DDX6, FAM98A, and HSPA5). ns: non-significant.



**Figure S3. LARP1 specifically associates with actively translating ribosomes and individual factors of the eIF4F complex.**

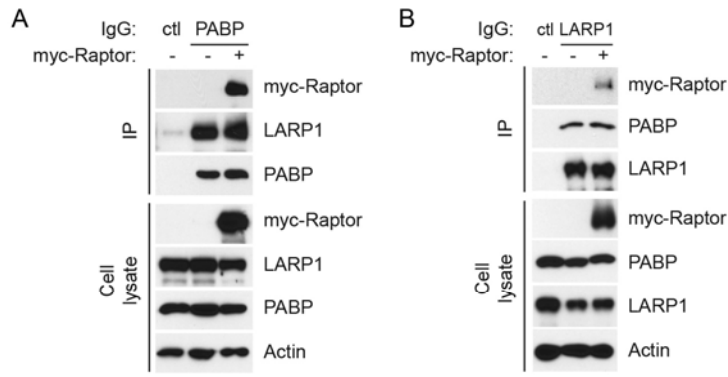
(A) Ribosome sedimentation profiling from serum-growing HEK293 cell extracts. (B) Treatment of cells with the protein synthesis inhibitor puromycin (200  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) for 1 hr prior to harvesting significantly decreased polysome assembly and concomitantly displaced polysome-associated components L5, S6, PABP, and LARP1 to subpolysomal fractions. (C) LARP1 co-immunoprecipitates with PABP and the eIF4F complex factor eIF4A.



**Figure S4. LARP1 Silencing Affects Global Protein Synthesis, G1-Phase Progression, and Cell Proliferation.**

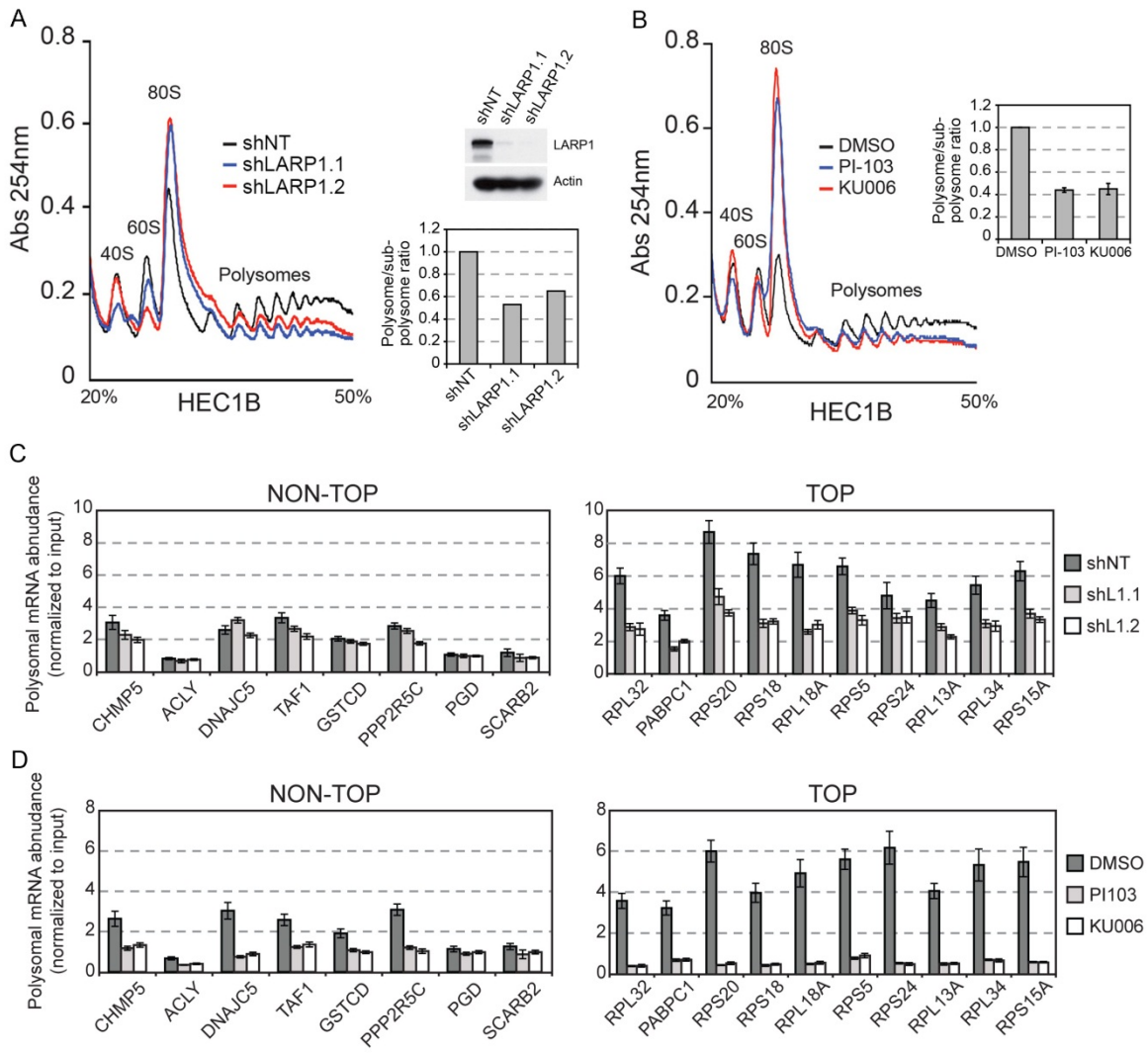
(A) HEC1B stably expressing different shRNA constructs targeted against LARP1 (shLARP1.1 and shLARP1.3) show decreased global protein synthesis as measured by [<sup>3</sup>H]leucine incorporation, compared to control cells (shNT). (B) HEC1B and A549 cells stably expressing different shRNA constructs targeted against LARP1 (LARP1.1, L1.2 and L1.3) display significantly decreased cell proliferation as measured by cell counting at 24h, 48 h, and 72h. (C) HEK293 (Top panel) and A549 (bottom panel) cells treated with PI-103 (1 μM), Ku-0063794 (5 μM), or rapamycin (25 nM) displayed significantly decreased cell

proliferation as measured by cell counting at 24, 48, and 72h. (D) FACS analysis showing an increase of A549 cells in G0/G1 following treatment with Ku-0063794 (Bottom panel) or upon LARP1 depletion (L1.1 and L1.3) (Top panel). (E) FACS analysis of DNA content showing an accumulation of HEC1B cells in G0/G1 following treatment with Ku-0063794 or upon LARP1 depletion (L1.1 and L1.3). (F and G) FACS analysis of Annexin V binding in three different stable cell lines expressing three shRNA constructs targeted against LARP1 (shLARP1.1, shLARP1.2, and shLARP1.3) compared control cells (shNT).



**Figure S5. PABP and Raptor associate with LARP1 in a noncompetitive manner.**

(A, B) HEK293 cells were transfected with myc-tagged Raptor prior to endogenous PABP (A) or LARP1 (B) immunoprecipitations. Associated proteins within endogenous PABP and LARP1 immunoprecipitates were assayed by immunoblotting. The overexpression of Raptor did not alter the association of LARP1 and PABP to each other, suggesting the possibility of simultaneous binding.

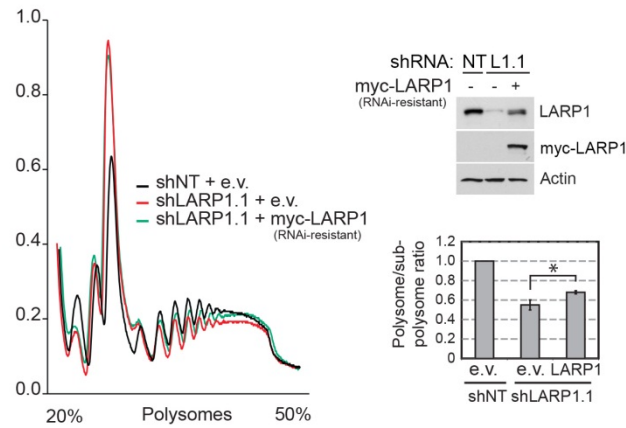


**Figure S6. mTOR inhibition and LARP1 Silencing Affects Global Protein Synthesis.**

(A) Polysome profiling of HEC1B cells stably expressing control vector (shNT) or shRNAs against LARP1 (shLARP1.1 and shLARP1.2). The profiles show a decrease in polysome assembly with a concomitant increase in 80S monosomes (polysome/subpolysome ratios of 0.53 and 0.65) in LARP1-depleted cells (see histogram). Immunoblot analysis shows >90% reduction in LARP1 expression. (B) Treatment of HEC1B cells with mTOR inhibitors (PI-103 and Ku-0063794 for 1 hour had a similar effect on polysomes (polysome/subpolysome ratios of 0.44 and 0.45). Absorbance of polysomes and subpolysomal particles was continuously

monitored at 254 nm. Representative  $A_{254}$  nm traces are shown. The area under the curves was calculated and the polysome/subpolysome ratios refer to the percentage of ribosomes engaged in translation. (C) The histograms show the relative quantification of each individual NON-TOP (left panel) and TOP (right panel) genes used in Figure 6A in polysome fractions from cells stably expressing control vector (shNT) or shRNAs against LARP1 (shLARP1.1 and shLARP1.2) compared to the input. (D) Relative quantification of NON-TOP (left panel) and TOP (right panel) genes used in Figure 6B in polysome fractions from cells treated with DMSO or mTOR inhibitors PI-103 and Ku-0063794.





**Figure S7. Partial restoration of polysome assembly by a non-shRNA-cleavable LARP1 construct.**

HEK293 stably expressing an shRNA construct targeted against LARP1 (sh LARP1.1) were transfected with an RNAi-resistant form of myc-tagged LARP1. Ribosome profiling (left panel) of cells expressing myc-tagged LARP1 (in green) displays a partial rescue of polysome assembly (compare control (in black) to LARP1-depleted cells (in red) as seen by the polysome/subpolysome ratios, presented as a mean  $\pm$  S.E. (n = 3)). \*\*\*  $P < 0.05$  using two-way ANOVAs (bottom right panel). Immunoblot analysis (top right panel) shows LARP1 expression levels in the three different cellular conditions.

# **Chapitre 4: Phosphorylation of the eukaryotic translation initiation factor 4E-transporter (4E-T) by c-Jun N-terminal kinase promotes stress-dependent P-body assembly**

**Running title:** 4E-T phosphorylation regulates P-bodies

**Marie Cargnello<sup>1</sup>, Joseph Tcherkezian<sup>1</sup>, Jonas F. Dorn<sup>1</sup>, Edward L. Huttlin<sup>2,3</sup>, Paul S. Maddox<sup>1,4</sup>, Steven P. Gygi<sup>2,3</sup>, and Philippe P. Roux<sup>1,4,#</sup>**

<sup>1</sup>Institute for Research in Immunology and Cancer (IRIC), Université de Montréal, Montreal, Quebec H3C 3J7, Canada

<sup>2</sup>Department of Cell Biology, Harvard Medical School, Boston, MA 02115, USA

<sup>3</sup>Taplin Biological Mass Spectrometry Facility, Harvard Medical School, Boston, MA 02115, USA

<sup>4</sup>Department of Pathology and Cell Biology, Faculty of Medicine, Université de Montréal, Montreal, Quebec H3C 3J7, Canada.

Number of words in materials and methods section: 1925

Number of words in introduction, results and discussion sections: 5378

**Keywords:** P-bodies; 4E-T; JNK; eIF4E; oxidative stress

Article publié dans: **Molecular and Cellular Biology**, 2012 Nov; 32(22):4572-84

## Mise en contexte

Comme nous l'avons vu dans le chapitre 1, le facteur eIF4E est un élément central dans la traduction des ARNm qui est fréquemment surexprimé dans les cancers (De Benedetti and Graff 2004). Son activité est finement contrôlée par ses interactions avec divers partenaires dont font parties les protéines 4E-BP et 4E-T. Alors que la régulation de l'activité d'eIF4E par les 4E-BP était très bien établie (Roux and Topisirovic 2012), peu de choses étaient connues sur le rôle de 4E-T dans la modulation de l'activité d'eIF4E. 4E-T avait été impliquée dans l'assemblage et le maintien des P-bodies et il avait été proposé que 4E-T agissait comme répresseur de la traduction en séquestrant eIF4E (Andrei et al. 2005; Ferraiuolo et al. 2005). Des études de spectrométrie de masse à large échelle avaient identifié de nombreux sites de phosphorylation dans 4E-T mais les kinases responsables de ces événements de phosphorylation ainsi que leur impact sur l'activité de 4E-T n'avaient pas été caractérisés. Ces données nous ont conduit à émettre l'hypothèse que 4E-T pouvait intégrer des signaux d'origines diverses pour moduler l'activité et la localisation d'eIF4E

Nos travaux ont montré que 4E-T est régulée par phosphorylation dans des conditions de stress oxydant induit par l'arsenite. Nous avons démontré qu'en réponse au stress oxydatif, la kinase JNK est recrutée aux P-bodies et phosphoryle 4E-T. Par spectrométrie de masse nous avons identifié six sérines de 4E-T qui sont phosphorylées par JNK. En utilisant un programme informatique que nous avons développé pour quantifier la localisation de 4E-T aux P-bodies à partir d'images d'immunofluorescence, nous avons trouvé que la phosphorylation de 4E-T est nécessaire à l'assemblage des P-bodies en réponse au stress. Finalement, afin d'étudier l'impact de la phosphorylation de 4E-T sur la traduction globale mais aussi spécifique des ARNm, nous avons réalisé des profils de polysome et analysé les ARNm polysomiaux par PCR quantitative. Ces essais ont montré que la phosphorylation de 4E-T n'affecte ni la traduction globale ni la traduction spécifique des cibles d'eIF4E.

Nos données montrent que 4E-T régule l'assemblage des P-bodies à deux niveaux, un premier dépendant de la présence de 4E-T dans des cellules non stressées, et un second dépendant de la phosphorylation de celle-ci par JNK en réponse au stress oxydatif. Ces résultats démontrent un rôle important de 4E-T et de JNK dans la formation des P-bodies.

## **Contribution des auteurs**

Marie Cargnello a participé à la conception du projet, à la génération et l'analyse des résultats, à la conception des figures et à la rédaction de l'article.

Joseph Tcherkezian a participé à la conception du projet ainsi qu'à la génération et l'analyse des profils de polysomes (figure 9).

Jonas Dorn a participé à l'analyse des données de microscopie confocale (figure 8).

Edward Huttlin a réalisé les analyses de spectrométrie de masse (figures 5 et S2).

Paul Maddox a participé à l'analyse des données de microscopie confocale (figure 8) et commenté le manuscrit

Steven Gygi a participé à l'analyse des données de spectrométrie de masse (figures 5 et S2) et a commenté le manuscrit.

Philippe Roux a supervisé le projet, analysé les résultats et rédigé l'article.

## **Abstract**

Processing bodies (PBs, or P bodies) are cytoplasmic granules involved in mRNA storage and degradation that participate in the regulation of gene expression. PBs concentrate nontranslated mRNAs and several factors involved in mRNA decay and translational repression, including the eukaryotic translation initiation factor 4E-transporter (4E-T). 4E-T is required for PB assembly, but little is known about the molecular mechanisms that regulate its function. Here, we demonstrate that oxidative stress promotes multisite 4E-T phosphorylation. We show that the c-Jun N-terminal kinase (JNK) is targeted to PBs in response to oxidative stress and promotes the phosphorylation of 4E-T. Quantitative mass spectrometry analysis reveals that JNK phosphorylates 4E-T on six proline-directed sites that are required for the formation of the 4E-T complex upon stress. We have developed an image-based computational method to quantify the size, number, and density of PBs in cells, and we find that while 4E-T is required for steady-state PB assembly, its phosphorylation facilitates the formation of larger PBs upon oxidative stress. Using polysomal mRNA profiling, we assessed global and specific mRNA translation but did not find that 4E-T phosphorylation impacts translational control. Collectively, these data support a model whereby PB assembly is regulated by a two-step mechanism involving a 4E-T-dependent assembly stage in unstressed cells and a 4E-T phosphorylation-dependent aggregation stage in response to stress stimuli.

## Introduction

The regulation of mRNA turnover plays an essential role in modulating gene expression (14, 27). In eukaryotes, the bulk of mRNAs undergoes decay by pathways that are initiated by poly(A)-tail shortening, commonly known as deadenylation, an event that decreases mRNA stability and translation efficiency (14). Deadenylation is an important step for all major paths of mRNA decay in mammalian cells, including AU-rich element (ARE)-mediated decay (AMD), nonsense-mediated decay (NMD) and decay mediated by microRNAs (miRNAs)(41). Deadenylated mRNAs are degraded either through the exosome in the 3' to 5' direction, or through decapping and subsequent degradation by the exoribonuclease Xrn1 in the 5' to 3' direction (14, 27). In many cases, the transit of an mRNA to a repressed state is associated with its recruitment to mRNA processing bodies (P-bodies; PBs), which are cytoplasmic foci containing the enzymatic machinery involved in mRNA deadenylation, decapping and degradation (26).

PBs are highly dynamic structures and their assembly is tightly linked with the availability of free cytoplasmic mRNAs. Translation inhibition, which leads to the release of mRNAs from polysomes, increases the number and size of PBs (35), and conversely, limiting the pool of free cytoplasmic mRNAs using cycloheximide disrupts PB formation (1). The assembly of PBs is thought to be orchestrated by protein-protein interactions among components and depends on oligomerization domains found in factors such as NOT1, Dcp2 or LSm4 (29). Depletion of proteins involved in mRNA decapping (RCK, LSm1-7, Hedls) and deadenylation (CCR4-CAF1-NOT1 complex) strongly decreases PB assembly (11), suggesting that mRNAs must undergo these processes to form PBs. In contrast to stress granules (SGs), which contain stalled 48S translation pre-initiation complexes (3), PBs contain only one translation initiation factor, the eukaryotic initiation factor 4E (eIF4E) (30). eIF4E binds to the 5' cap of mRNAs and, in addition to its role in translation, has been suggested to target transcripts to PBs in collaboration with the eIF4E-binding protein 4E-transporter (4E-T)(1, 12). 4E-T is required for the localization of eIF4E to PBs and its depletion was found to strongly decrease PB assembly (1, 12). Several large-scale proteomics studies have shown that 4E-T becomes phosphorylated on multiple residues (8, 24), but the regulation and function of these phosphorylation events with regards to PB assembly remain unknown.

Unlike SGs, PBs are found in unstressed cells, but their assembly can be modulated by levels of reactive oxygen species (ROS)(26). Indeed, oxidative stress, which can be induced by arsenite treatment, increases the number and size of PBs in cells (21). This response was shown to be independent of eIF2 $\alpha$  phosphorylation, a necessary event in SG assembly (21), suggesting that additional pathways must contribute to PB assembly. Oxidative stress leads to the activation of the mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathways (4), which include the c-Jun N-terminal kinase (JNK)(37). The mechanisms underlying JNK activation in response to oxidative stress are not well defined, but may involve upstream kinases that respond to oxidative modifications, such as the apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1) (23). It has been proposed that oxidative stress also inhibits a JNK phosphatase, thus contributing to sustained JNK activation in response to arsenite treatment (5). A recent study has proposed a role for JNK in the phosphorylation of the PB component Dcp1 (32), suggesting that JNK may participate in PB assembly.

Here, we show that JNK interacts with and phosphorylates 4E-T on proline-directed sites in response to oxidative stress. We found that JNK-mediated phosphorylation of 4E-T promotes complex formation and 4E-T localization to PBs, suggesting a new molecular mechanism by which stress signalling modulates the assembly of PBs.

## Materials and Methods

**DNA Constructs.** The plasmid encoding human HA-tagged 4E-T was kindly provided by Dr. Nahum Sonenberg (McGill University, Montreal, QC) and described previously (9). Myc-tagged 4E-T was generated by subcloning the coding region of 4E-T from pACTAG-HA-4E-T into pcDNA3-6myc. The human 4E-T mutant S6A was generated using the QuikChange methodology (Stratagene, La Jolla, CA). The vectors encoding Flag MKK7-JNK1 (CA and KD) were obtained from Addgene (ref #19726 and #19730) and the plasmid encoding HA-JNK1 was a kind gift from Dr. John Blenis (Harvard Medical School, Boston, MA).

**Antibodies.** Antibodies targeted against 4E-T were purchased from Abcam (Cambridge, UK). Anti-HA, -myc, -FLAG, -tubulin and phospho-ERK1/2 monoclonal antibodies were purchased from Sigma-Aldrich (Oakville, Ontario, Canada). Antibodies targeted against phospho-eIF2 $\alpha$ , phospho-JNK (Thr183/Tyr185), phospho-p38 (Thr180/Tyr182) and PABP were purchased from Cell Signaling Technologies (Beverly, MA). Antibodies targeted against Dcp1 were purchased from Abnova. All secondary horseradish peroxidase (HRP)-conjugated antibodies used for immunoblotting were purchased from Chemicon (Temecula, CA).

**Cell Culture and Transfection.** HEK293, U2OS and HeLa cells were maintained at 37°C in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) with 4.5 g/liter glucose supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) and antibiotics. HEK293 cells were transfected with calcium-phosphate as described previously (31). U2OS and HeLa cells were transfected with Fugene 6 (Roche) according to the manufacturer's instructions. Cells were grown for 48 h after transfection and were pre-treated with AS601245 (20  $\mu$ M), SP600125 (20  $\mu$ M), PD184352 (10-50  $\mu$ M), SB203580 (10-50  $\mu$ M) or N-acetylcysteine (5-20 mM) for 30 to 45 minutes. Cells were stimulated with either sodium arsenite (500  $\mu$ M), anisomycin (10  $\mu$ M), clotrimazole (20  $\mu$ M), FCCP (1  $\mu$ M), emetine (20  $\mu$ g/ml) or cycloheximide (50  $\mu$ g/ml) for 30 to 60 minutes before being harvested.



**RNA Interference (RNAi) and Viral Infections.** For small interfering RNA (siRNA)-mediated knockdown of 4E-T, predesigned Dicer-substrate siRNA duplexes against the 3' untranslated region (3'UTR) of human 4E-T (HSC.RNAL.N019843.4.10) were purchased from Integrated DNA Technologies (Coralville, IA). U2OS cells were transfected using oligofectamine (Invitrogen) and 25 nM siRNA per six-well plate. Retroviruses were produced using the pMSCV-GFP vector system to stably overexpress ectopic human wt 4E-T or the S6A mutant in HEK293 cells. 293GPG cells were transfected using calcium phosphate and 30 $\mu$ g of pMSCV-GFP 4E-T wild type or S6A mutant. Four days post-transfection, the retroviral supernatant was collected and filtered (0.45- $\mu$ m-pore-size filter) for use. Host HEK293 cells were infected in the presence of 4  $\mu$ g/ml Polybrene. After two passages post-infection, positive pools were selected by FACS with GFP.

**Immunoprecipitations and Immunoblotting.** Cell lysates were prepared as previously described (31). Briefly, cells were washed with ice-cold PBS and lysed in 10 mM K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, 1 mM EDTA, 5 mM EGTA, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM  $\beta$ -glycerophosphate, 0.5% Nonidet P-40, 0.1% Brij 35, 0.1% deoxycholic acid, 1 mM sodium orthovanadate (Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>), 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, and a Complete protease inhibitor cocktail tablet (Roche). For immunoprecipitations, cell lysates were incubated with the indicated antibody or control IgG (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) for 2 h, followed by a one-hour incubation with protein A-Sepharose CL-4B beads (GE Healthcare). Immunoprecipitates were washed thrice in lysis buffer and beads were eluted and boiled in 2x reducing sample buffer (5x is 60 mM Tris-HCl [pH 6.8], 25% glycerol, 2% SDS, 14.4 mM 2-mercaptoethanol, and 0.1% bromophenol blue). For  $\lambda$ -phosphatase assay, endogenous 4E-T immunoprecipitates were washed twice in lysis buffer and incubated for 1 h at 30°C with  $\lambda$ -phosphatase (New England Biolabs, Beverly, MA) in  $\lambda$ -phosphatase buffer. The reaction was stopped by adding 2x reducing sample buffer. Eluates and total cell lysates were subjected to 10-12% SDS-PAGE, and resolved proteins were transferred onto polyvinylidene difluoride (PVDF) membranes for immunoblotting.

**Protein Phosphotransferase Assays.** For JNK assays, beads from Flag-MKK7-JNK1 immunoprecipitations were washed twice in lysis buffer and twice in kinase buffer (25 mM Tris-HCl, pH 7.4, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM β-glycerophosphate). Kinase assays were performed with immunopurified full-length myc-tagged 4E-T wt or S6A mutant as substrates, under linear assay conditions. Assays were performed for 10 min at 30 °C in kinase buffer supplemented with 5 μCi of [γ-<sup>32</sup>P]ATP. All samples were subjected to SDS-PAGE, and incorporation of radioactive <sup>32</sup>P label was determined by autoradiography using a Fuji PhosphorImager with ImageQuant software.

**Tryptic Digestion, TMT Labeling and Mass Spectrometry Analysis.** Following SDS-PAGE separation with Coomassie staining, bands corresponding to 4E-T were excised and digested in-gel with sequencing-grade trypsin (Promega, Madison, WI) as described previously (34). Labeling with six-plex TMT reagents (Thermo Scientific) was accomplished as published with minimal modifications (36). Labeled peptides were then mixed and underwent C18 solid phase extraction as described previously (28). Finally, combined samples were resuspended in 5% acetonitrile/5% formic acid for mass spectrometry analysis. All LC-MS experiments were performed on an LTQ-Velos-Orbitrap (Thermo Fisher Scientific) equipped with a Famos autosampler (LC Packings) and an Agilent 1100 binary HPLC pump (Agilent Technologies) essentially as described previously (36). The LTQ-Velos-Orbitrap was operated in data-dependent mode, collecting high-resolution Orbitrap MS/MS spectra after HCD fragmentation for the top ten most intense ions following each survey scan collected in the Orbitrap.

**Peptide, Protein, and Phosphorylation Site Identification.** Following acquisition, individual MS/MS spectra were assigned to peptides using Sequest (39). To maximize phosphorylation site identifications, a two-stage database searching strategy was employed. In the first stage, all MS/MS spectra were searched against a database containing all protein sequences from the human IPI database (version 3.6) in forward and reverse orientations as well as sequences of common contaminants. Initial searches were performed with the following parameters: 25 ppm precursor ion tolerance; 0.02 Da product ion tolerance; fully tryptic digestion with up to two missed cleavages; static modifications Cys alkylation (+57.021464) and TMT labeling of

Lys and peptide N-termini (+229.162932); and dynamic modifications Met oxidation (+15.994915) and phosphorylation of Ser, Thr, and Tyr (+79.966330). The target-decoy approach (10) was then used to distinguish correct and incorrect peptide identifications using linear discriminant analysis based on several parameters including Xcorr, dCn', peptide length, precursor ion mass error, numbers of missed cleavages, peptide length, and charge state (18). After filtering to an initial 1% peptide-level FDR, peptides were then assembled into proteins, and proteins were scored and filtered to a final protein FDR of 1% (18).

In the second stage, relaxed parameters were used to match additional MS/MS spectra against a filtered database. Sequest was again employed, this time filtering the database to include only forward and reversed sequences for proteins that were identified in stage one. Stage two search parameters included 3.1 Da precursor ion tolerance; 0.02 Da product ion tolerance; no enzyme specificity; static modifications Cys alkylation (+57.021464) and TMT labeling of Lys and peptide N-termini (+229.162932); and dynamic modifications Met oxidation (+15.994915) and phosphorylation of Ser, Thr, and Tyr (+79.966330). The resulting peptides were again filtered via linear discriminant analysis, this time including the number of tryptic ends as an additional feature and correcting peptide mass errors to account for occasional incorrect monoisotopic mass assignments.

To evaluate phosphorylation site localization, all phosphopeptides matching 4E-T were scored using the AScore algorithm (2) and peptides were grouped according to the phosphorylation sites they contained. A minimum AScore of 13 was required for phosphorylation site localization ( $p < 0.05$ ) and phosphorylation site assignments were manually validated to ensure reliability.

**Phosphorylation Site Quantification.** Relative quantification of each peptide was accomplished based on intensities observed for all six reporter ions from high resolution Orbitrap MS/MS spectra, after correcting for batch-specific isotopic enrichments of each TMT reagent. Each peptide was required to have a minimum isolation specificity of 0.75 (36) and summed reporter ion intensity of at least 500 with no more than four missing reporter ions. Individual sites were quantified based on the summed reporter ion intensities for all matching peptides. Non-phosphorylated peptides matching 4E-T were combined to estimate unmodified protein abundance. Quantitative profiles for all phosphorylation sites were normalized to

account for slight changes in 4E-T abundance. Finally, ANOVA was used to identify statistically significant, site-specific changes in protein phosphorylation. Within each experiment, all p-values were adjusted to account for multiple hypothesis testing via the method of Benjamini and Hochberg (16).

**Confocal Microscopy.** For immunofluorescence analyses,  $1.5 \times 10^5$  U2OS cells or  $1 \times 10^5$  HeLa cells were seeded in six-well plates containing coverslips. Cells were treated as indicated, washed in PBS, and fixed in 3.7% formaldehyde for 15 min at room temperature. Cells were permeabilized for 7 min in PBS containing 0.2% Triton X-100 and blocked for 45 min in PBS containing 10% FBS (blocking buffer). Cells were incubated for 2.5 hrs with indicated primary antibodies diluted in blocking buffer, followed by 1 h incubation with Alexa fluor 488 or 555-conjugated anti-mouse or -rabbit secondary antibodies (Invitrogen) diluted in blocking buffer. Cells were stained for 2 min with DAPI (4',6'-diamidino-2-phenylindole) at 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  and coverslips were mounted on slides with Prolong gold (Invitrogen). Immunofluorescence microscopy images from single confocal sections (0.7  $\mu\text{m}$ ) were acquired at room temperature with an LSM 510 Meta laser scanning confocal microscope (Zeiss) using a Plan Apochromat 63x oil immersion objective. All images were acquired using identical parameters.

**Image-based quantification of PB characteristics.** PB characteristics were measured using custom image analysis software written for MATLAB (TheMathWorks, Natick, MA, USA) in two steps: Image segmentation and data analysis. Cells were detected using non-specific background fluorescence in the GFP channel, by identifying local clusters of pixels with intensities significantly above the noise level. To separate touching cells, a watershed transform was applied using nuclei that had been segmented in the DAPI channel using Otsu's algorithm, as seeds. PBs were detected similarly to cells: by identifying local clusters of pixels in the cytoplasm with intensities significantly above the noise level (at least 2 noise standard deviations), after subtracting the background as estimated via a  $3 \times 3 \mu\text{m}$  local median filter.

We characterized PBs by their density and their fluorescence intensity. We chose to use PB density (number of PBs divided by the cell area) as a measure for the quantity of PBs, since the number of PBs correlates with cell area. Peak fluorescence intensity of PBs above background is used as a measure for the amount of 4E-T localized in PBs, and consequently,

as a proxy for PB size. This measure is more robust than, for example, total fluorescence intensity within the PB. Since PBs are mostly sub-resolution features, variations in their size are reflected in variations in fluorescence intensity, rather than in the area occupied by their image.

Cell-to-cell variations in expression levels were corrected based on the assumptions that higher expression would equally increase both localized (peak PB intensity) and diffuse (background intensity) 4E-T signal, and that the different genetic and pharmacological experimental settings only affect the relation between localized and diffuse 4E-T signal, but not their reaction to differences in expression level. Consequently, we applied a robust linear fit of the form  $PI(k)=s*BI(k)+i^*$  to the intensity measurements for each PB ( $k \in [1 \#P]$ ), where  $PI(k)$  is the peak fluorescence intensity of PB  $k$ ,  $BI$  the local cellular background fluorescence around PB  $k$ ,  $s$  the slope, assumed to be the same for all experimental conditions, and  $i^*$  the intercept, considered to be different for each experimental conditions. To eliminate the effect of expression level, we subtracted  $s*BI(k)$  from each peak intensity measurement.

Overall recruitment of 4E-T into PBs can occur either via increase of PB size, or via assembly into new PBs. Thus, we define "PB agglomeration" as the total amount of 4E-T localized to PBs, which is calculated as the product of PB density and peak fluorescence intensity. The uncertainty of PB agglomeration is calculated from the uncertainties of PB density and peak fluorescence intensity via Gaussian error propagation.

**Polysomal mRNA profiling.** Sucrose gradient velocity sedimentation was employed to isolate the polysomal fractions. Ten minutes before collection, 100 $\mu$ g/ml cycloheximide was added to the culture medium. Cells were washed in ice-cold PBS supplemented with 100 $\mu$ g/ml cycloheximide and collected in polysome lysis buffer (PLB; 15mM Tris [pH 7.4], 250mM NaCl, 15mM MgCl<sub>2</sub>, 1% Triton X-100, 100 $\mu$ g/ml cycloheximide, 1mM DTT, 400U/ml RNase Out (Invitrogen) and protease inhibitors). Samples were centrifuged at 10 000g for 10 min at 4°C. The resulting supernatant was layered on a 20-50% linear sucrose gradient and centrifuged in a Beckman SW41Ti rotor at 92 000g for 3 hours at 4°C. Following centrifugation, the A<sub>254</sub> was continuously monitored and recorded using a Gradient Station IP (Biocomp, Fredericton, NB, USA) attached to a UV-MII (GE Healthcare) spectrophotometer. Polysomal fractions were collected and RNA was extracted using RNeasy Mini Kit (Qiagen).

**Quantitative real-time PCR.** Total RNA was reverse-transcribed using the cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA) as described by the manufacturer. Gene expression levels of endogenous controls glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) and beta-actin (ACTB) were determined using pre-validated Taqman Gene Expression Assays (Applied Biosystems), and gene expression level for Survivin, c-myc, VEGFA and ODC1 was determined using assays designed with the Universal Probe Library (UPL) from Roche.

## Results

### **4E-T Localizes to PBs and Becomes Phosphorylated in Response to Oxidative Stress.**

Several high-throughput phosphoproteomics studies have shown that 4E-T can be phosphorylated on several residues, but the biological significance of these modifications is unknown (8, 24). To determine if conditions that promote PB assembly result in 4E-T phosphorylation, we treated HEK293 cells with arsenite which is frequently used to induce PB assembly (20), and we evaluated cellular responses via indirect immunofluorescence microscopy and biochemistry. Validating the effect of arsenite in U2OS cells transfected with HA-tagged 4E-T confirmed that at steady state, 4E-T localized mainly within discrete foci in the cytoplasm that were also labelled by anti-Dcp1 antibodies, which is indicative of PBs (Fig. 1A). As expected, arsenite treatment increased both the number and the size of PBs. Arsenite treatment also induced the formation of SGs, as shown by the labelling of cytoplasmic foci with anti-poly(A)-binding protein (PABP) antibodies (Fig. 1B). Notably, none of the 4E-T puncta overlapped with the PABP-positive granules, indicating that 4E-T did not localize within other types of cytoplasmic RNA granules, such as SGs. To determine if arsenite treatment altered the electrophoretic properties of 4E-T, we analyzed endogenous 4E-T by SDS-PAGE. Interestingly, we found that arsenite treatment induced a robust mobility shift in 4E-T, whereas no effect was seen in response to the known SG inducers clotrimazole and FCCP (Fig. 1C)(20). To determine if the mobility shift in 4E-T was due to phosphorylation, we immunoprecipitated endogenous 4E-T and treated immunoprecipitates with  $\lambda$ -phosphatase. We found that phosphatase treatment completely abolished the 4E-T mobility shift (Fig. 1D), indicating that arsenite treatment promotes 4E-T phosphorylation.

One of the main molecular mechanisms of action of arsenite is the induction of oxidative stress (17). To address whether oxidative stress was required for 4E-T phosphorylation, cells were pre-treated with increasing concentrations of the antioxidant *N*-acetyl-*L*-cysteine (NAC). Phosphorylation of 4E-T induced by arsenite was efficiently prevented by the presence of NAC (Fig. 1E), indicating that oxidative stress is a prerequisite for 4E-T phosphorylation. Together, these results demonstrate that 4E-T becomes phosphorylated in response to oxidative stress, which correlates with the induction of PBs.

### **JNK Phosphorylates 4E-T *In Vitro* and *In Vivo*.**

We next sought to identify candidate kinases responsible for 4E-T phosphorylation upon arsenite treatment. Given that arsenite promotes the activation of all three conventional MAPK pathways (Fig. 2A)(17), we tested whether pre-treatment of cells with MAPK pathway inhibitors would affect 4E-T phosphorylation (Fig. 2B). To assess the role of the ERK1/2 and p38MAPK pathways, we pre-treated HEK293 cells with increasing concentrations of the inhibitors PD184352 and SB203580, respectively, before cell stimulation experiments. Inhibition of MEK1/2 (Fig. 2C) and p38MAPK (Fig. 2D) did not affect the mobility shift of 4E-T induced by arsenite, indicating that these pathways do not contribute to 4E-T phosphorylation. In contrast, treatment of cells with two different JNK inhibitors (SP600125 and AS601245) efficiently blocked the mobility shift of 4E-T induced by arsenite (Fig. 2E and 2F), suggesting that JNK is required for 4E-T phosphorylation. To address whether JNK activity is sufficient to stimulate 4E-T phosphorylation in the absence of stress stimuli, we transfected HEK293 cells with an MKK7-JNK1 fusion protein that exhibits constitutive JNK activity (22). Transient expression of this construct (CA) strongly enhanced the electrophoretic mobility shift of 4E-T, whereas no effect was seen with the kinase-inactive MKK7-JNK1 allele (KD)(Fig. 3A). To further demonstrate the involvement of JNK in 4E-T phosphorylation, we used anisomycin which activates JNK in the absence of oxidative stress. Consistent with JNK being required for 4E-T phosphorylation, we found that anisomycin treatment also induced a mobility shift in 4E-T (Fig. 3B). Next, we investigated whether 4E-T is a direct JNK substrate by performing *in vitro* kinase assays with immunopurified proteins. While no incorporation of [<sup>32</sup>P] label was seen in purified 4E-T incubated with control beads or the kinase-inactive MKK7-JNK1 (KD), we found that activated MKK7-JNK1 (CA) robustly increased [<sup>32</sup>P] incorporation (~ 9-fold) in purified 4E-T (Fig. 3C). Taken together, these results demonstrate that JNK directly phosphorylates 4E-T both *in vitro* and *in vivo*.

### **JNK Interacts and Colocalizes with 4E-T upon Oxidative Stress.**

Our results indicate that JNK directly phosphorylates 4E-T, suggesting that both proteins physically interact in cells. To explore this possibility, we expressed HA-tagged JNK1 and myc-tagged 4E-T in HEK293 cells, and co-immunoprecipitated them with anti-HA antibodies.



At steady state, 4E-T and JNK did not appear to interact in cells; however, upon arsenite treatment, we observed a strong, time-dependent, interaction between both proteins (Fig. 4A). Notably, similar results were found when performing the reverse co-immunoprecipitation (Fig. 4B). Having found that JNK interacts with and directly phosphorylates 4E-T, we investigated whether arsenite treatment could promote their colocalization to PBs. Immunofluorescence of HA-tagged JNK1 in untreated U2OS cells resulted in uniform staining throughout the cytoplasm and the nucleus, whereas endogenous 4E-T was enriched in PBs (Fig. 4C, upper panels). The anti-4E-T antibody was found to be specific, as cells transfected with an siRNA targeting 4E-T did not display specific staining (Fig. S1). Upon arsenite treatment, a significant proportion of JNK appeared to relocalize to distinct cytoplasmic foci that overlapped with 4E-T puncta (Fig. 4C, lower panels). This raises the possibility that JNK promotes the phosphorylation of 4E-T within PBs. Together, these results suggest that JNK interacts with 4E-T and is targeted to PBs in response to oxidative stress.

### **Identification of 4E-T Phosphorylation Sites Regulated by JNK.**

Next, we sought to identify JNK-regulated phosphorylation sites in 4E-T using a quantitative mass spectrometry (MS)-based approach. HEK293 cells were transfected with myc-tagged 4E-T and either the constitutively-activated form of JNK1 (CA) or the kinase-inactive mutant (KD). Immunoprecipitated 4E-T was then isolated via SDS-PAGE, digested in-gel with trypsin and labeled with 6-plex isobaric tandem mass tags (TMT<sup>6</sup>). Samples were then combined and analyzed by liquid chromatography-assisted tandem MS, and the relative abundances of each phosphopeptide were measured across experimental conditions (Fig. 5A). Using this approach, we identified a total of 34 phosphorylation sites, from which six showed significant changes (ANOVA; FDR < 5%) between the activated and inactive JNK conditions (Fig. 5B). Identification of these residues as phosphorylation sites (Ser301, Ser374, Ser513, Ser587, Ser693 and Ser752) was obtained by MS/MS sequencing as depicted by annotated high resolution MS/MS spectra from representative tryptic peptides (Fig. S2). These phosphorylation sites are located in the central portion of 4E-T (Fig. 5C and S3), and reside within proline-directed sequences (S/T-P) characteristic of JNK phosphorylation motifs (Fig. 5B and S3). To validate that JNK phosphorylates these sites *in vivo*, we performed site-

directed mutagenesis to replace all six serine residues with unphosphorylatable alanines in a single mutant (S6A). Notably, mutation of these sites completely abolished the electrophoretic mobility shift in 4E-T induced by the constitutive activation of JNK (Fig. 6A) and significantly reduced the mobility shift induced by arsenite treatment (Fig. 6B), indicating that JNK phosphorylates these residues in cells. To further validate that these sites are directly phosphorylated by JNK, we performed *in vitro* kinase assays using constitutively-activated MKK7-JNK1 (CA) and immunopurified wild-type (wt) 4E-T or the S6A mutant as substrates. Mutation of all six residues significantly inhibited JNK-mediated [<sup>32</sup>P] label incorporation in immunopurified full-length 4E-T (Fig. 6C), confirming that JNK predominantly phosphorylates 4E-T at these residues.

### **JNK Promotes 4E-T Complex Assembly upon Oxidative Stress.**

PB assembly has been shown to be partly mediated through oligomerization of its components (7). To determine whether 4E-T forms higher molecular weight complexes in mammalian cells, we used immunoprecipitation of differentially tagged 4E-T proteins. HEK293 cells were co-transfected with plasmids coding for myc- and HA-tagged forms of 4E-T, and co-immunoprecipitated proteins were analyzed by immunoblotting. At steady state, relatively low levels of HA-tagged 4E-T co-immunoprecipitated with myc-tagged protein, indicating that differentially tagged proteins can assemble in the same complex (Fig. 7A). Arsenite treatment dramatically increased co-immunoprecipitation of the two tagged forms of 4E-T in a time-dependent manner, regardless of whether we pulled down myc- or HA-tagged protein (Fig. 7A-B), suggesting that oxidative stress promotes 4E-T complex assembly. To test whether 4E-T complex formation further correlated with the assembly of PBs, we treated HEK293 cells with cycloheximide or emetine, which disrupt PBs by decreasing the pool of cytoplasmic mRNAs (35). Importantly, both compounds strongly decreased the ability of 4E-T to form complexes (Fig. 7C), indicating that co-immunoprecipitation of differentially tagged proteins correlates with PB assembly. Furthermore, we found that treatment of cells with NAC decreased the ability of 4E-T to form complexes (Fig. 7D), suggesting that oxidative stress is required for 4E-T complex formation.

To investigate the molecular mechanism of 4E-T complex assembly, we tested whether phosphorylation of 4E-T by JNK was required for complex assembly. Indeed, we found that co-immunoprecipitation of differentially tagged 4E-T proteins from arsenite-treated cells was impaired by both JNK inhibitors (SP600125 or AS601245)(Fig. 7E), suggesting that 4E-T phosphorylation may regulate 4E-T complex formation. To explore this possibility, we compared wt 4E-T with the S6A mutant in co-immunoprecipitation experiments. While arsenite treatment strongly induced the co-immunoprecipitation of wt 4E-T with itself, we found that the S6A mutant was significantly impaired in complex formation (Fig. 7F). Together, these results indicate that oxidative stress-mediated JNK activation promotes the assembly of 4E-T in higher molecular weight complexes. Moreover, we found that 4E-T phosphorylation promotes complex assembly, suggesting a potential mechanism by which arsenite induces PB assembly.

#### **4E-T Phosphorylation Promotes PB Assembly in Response to Oxidative Stress.**

Based on our *in vitro* and *in vivo* results, we hypothesized that JNK-mediated phosphorylation of 4E-T was involved in PB assembly. To test this hypothesis, we measured PB assembly using a quantitative image-based assay. Since PB assembly in response to oxidative stress could result in an increase in either PB number or PB size, we initially characterized PB assembly via the total amount of 4E-T present in PBs relative to the area of the cell, which we defined as the product of PB size and density. To validate our assay, we measured the effects of arsenite and cycloheximide treatments in U2OS cells (Fig. 8A), the latter of which was expected to eliminate PBs (33). Indeed, our assay reported that the amount of 4E-T per area (number of PBs) was significantly increased by arsenite treatment ( $\sim 60\%$ ,  $p < 10^{-58}$ ), and significantly decreased by cycloheximide treatment ( $\sim 10$ -fold,  $p < 10^{-48}$ ), respectively (Fig. 8B), which validated our quantitative approach. Next, we assessed the role of JNK in PB assembly and 4E-T localization by treating cells with JNK inhibitors (AS601245 and SP600125) prior to arsenite treatment. Notably, we found that JNK inhibition significantly impaired PB assembly (Fig. 8C), as seen by the decrease of 4E-T accumulation to these structures following arsenite treatment ( $\sim 25\%$ ,  $p < 10^{-23}$ ). These results demonstrate that JNK activity is required to stimulate the assembly of PBs in response to oxidative stress.

JNK-mediated phosphorylation of 4E-T is required for 4E-T complex formation. To test whether 4E-T complex formation is involved in PB nucleation or growth of existing PBs, we transfected wt 4E-T or the S6A mutant in HeLa cells and quantified the localization of transfected proteins in PBs. Using our quantitative image-based assay (Fig. 8A), we found that compared to wt 4E-T, arsenite did not efficiently promote the accumulation of the S6A mutant to PBs ( $\sim 30\%$ ,  $p < 10^{-15}$ )(Fig. 8D). While we found that wt 4E-T and the S6A mutant were similarly localized to PBs in resting cells, our results indicate that the S6A mutant accumulated preferentially in small-sized PBs upon oxidative stress (Fig. 8E). Indeed, while wt 4E-T was associated with an increased number (reflected by PB density) and size (PB intensity) of PBs in response to arsenite, we found that the S6A mutant was severely impaired in its ability to mediate PB size increases ( $p < 10^{-25}$ )(Fig. 8E). These results suggest that 4E-T phosphorylation may not be necessary for the nucleation of PBs, but rather, may be involved in the growth of pre-existing PBs in response to oxidative stress. Altogether, our findings are consistent with an overall model whereby JNK, by mediating the phosphorylation of 4E-T, promotes the accumulation of 4E-T in larger PBs (Fig. 8F). These results support the idea that PBs are dynamic structures regulated in part by the JNK signalling pathway in response to stress stimuli.

## Discussion

PBs are dynamic aggregates of specific mRNAs and proteins that play important roles in mRNA storage and degradation. Despite being evolutionarily conserved, little is known about the regulatory mechanisms that participate in their steady state assembly and induction in stressed cells. In this study, we show that JNK signalling regulates PB assembly by phosphorylating one of its components, the eIF4E-binding protein 4E-T. In particular, our data demonstrate that activation of JNK by oxidative stress promotes the formation of large PB foci. JNK directly phosphorylates 4E-T on several residues, and these phosphorylation events were found to promote the assembly of *in vitro* complexes containing 4E-T and to increase the size of PBs. These observations indicate that 4E-T might function as an important scaffold upon which PBs are assembled, and suggest that JNK phosphorylation may therefore be required for the formation of larger PBs.

The assembly of PBs has been proposed to occur in two discrete stages (13). In the first step, mRNAs associate with the protein constituents of PBs to form ribonucleoprotein (RNP) monomers. Several PB proteins likely contribute to the translationally repressed state of these mRNAs (6, 13), as was suggested for 4E-T, which presumably competes with translation initiation factors for binding to eIF4E (12). The PB monomers then aggregate in the second stage to form the larger cytoplasmic foci that are microscopically visible. While 4E-T may be involved in the formation of RNP monomers, our data indicate that it mainly participates in the second step of this model by specifically promoting the formation of larger aggregate structures.

4E-T is part of a subset of PB factors, including Lsm1, RCK/p54 and CCR4, which are required for the accumulation of each other in PBs (1). It is not known what makes any of these factors concentrate in cytoplasmic foci, but at a minimum, this seems to require RNA (35). Many yeast PB components, including LSm4, CCR4 and NOT1, contain Q/N (glutamine and asparagine)-rich regions that have the potential to form aggregates similar to Q/N-rich domains found in prion proteins (7, 15, 29). The average Q/N-content in the eukaryotic proteome is 7.7 per 80-mer (25), and many PB components contain at least one region that exceeds this average (29). Such domains were shown to participate in protein aggregation and

accumulation to PBs (29), and are also found in proteins prone to aggregation, such as huntingtin (25). It was also observed that PB components contain high numbers of proline residues in or just downstream of these Q/N-rich regions (29). Proline-rich regions often form extended and flexible regions that facilitate protein-protein interactions and are often regulated by phosphorylation (38). Binding via these proline-rich domains is generally not very specific, but can be both very rapid and strong (19). Our data suggest that 4E-T participates in the aggregation stage of PB assembly, and interestingly, we found that 4E-T contains two regions with higher than average Q/N-content (11 and 14 per 80-mer, respectively)(Fig. 5C and Fig. S4). We also found that these regions are enriched in proline residues (Fig. S4), suggesting that they may participate in 4E-T protein aggregation. While this model is suggested by our data, more experimentation will be required to characterize the 4E-T interaction network.

Accumulating evidence indicate that several stress-activated signalling pathways directly regulate PB assembly. In *S. cerevisiae*, the protein kinase Ste20 was recently shown to promote phosphorylation of the decapping factor Dcp2, which increased Dcp2 accumulation in PBs upon stress (40). In mammalian cells, the decapping cofactor Dcp1 was found to be phosphorylated by JNK in response to interleukin (IL)-1 stimulation (32). While Dcp1 does not seem to be required for PB assembly (33), expression of a phosphomimetic mutant was shown to disrupt PBs, suggesting a possible antagonistic role of JNK in response to IL-1 stimulation (32). We found that JNK activity is required for PB assembly in response to oxidative stress, suggesting that PBs are likely subject to multiple regulatory mechanisms that affect mRNP maturation. Our data are consistent with JNK affecting the second step of PB assembly, by specifically promoting the formation of larger aggregate structures. Indeed, expression of the S6A mutant resulted in the presence of smaller but more numerous PBs in response to oxidative stress, suggesting that JNK-mediated 4E-T phosphorylation regulates the final aggregation of these smaller structures. Interestingly, many of the JNK phosphorylation sites are located within or in proximity to the Q/N-rich regions (Fig. S4), suggesting that 4E-T phosphorylation may affect its ability to form larger aggregates. These phosphorylation events may be a rapid and reversible mechanism to promote PB assembly in response to different types of stress stimuli.

In closing, we propose a model whereby 4E-T regulates the second stage of PB assembly in unstressed cells. We found that JNK regulates 4E-T function by facilitating the aggregation stage in response to stress stimuli. Together, these results demonstrate an important role for 4E-T in PB assembly and underscore the role of JNK in this regulation.

## **Acknowledgments**

We deeply appreciate all the members of our laboratory for their insightful discussions and comments on the manuscript and the data. We also specifically acknowledge Chris Jahns (HMS Taplin Biological Mass Spectrometry Facility) for assistance with preparation of in-gel digests. This work was supported by grants from the Canadian Cancer Society Research Institute (P.P.R.) and the Cancer Research Society (P.P.R), as well as the United States National Institutes of Health (S.P.G.; HG3456). P.P. Roux holds a Canada Research Chair in Signal Transduction and Proteomics and a Career Development Award from the Human Frontier Science Program (HFSP). M. Cargnello holds a doctoral studentship from the Fonds de la recherche en santé du Québec (FRSQ). IRIC core facilities are supported by the FRSQ. We have no conflict of interest to declare.



## References

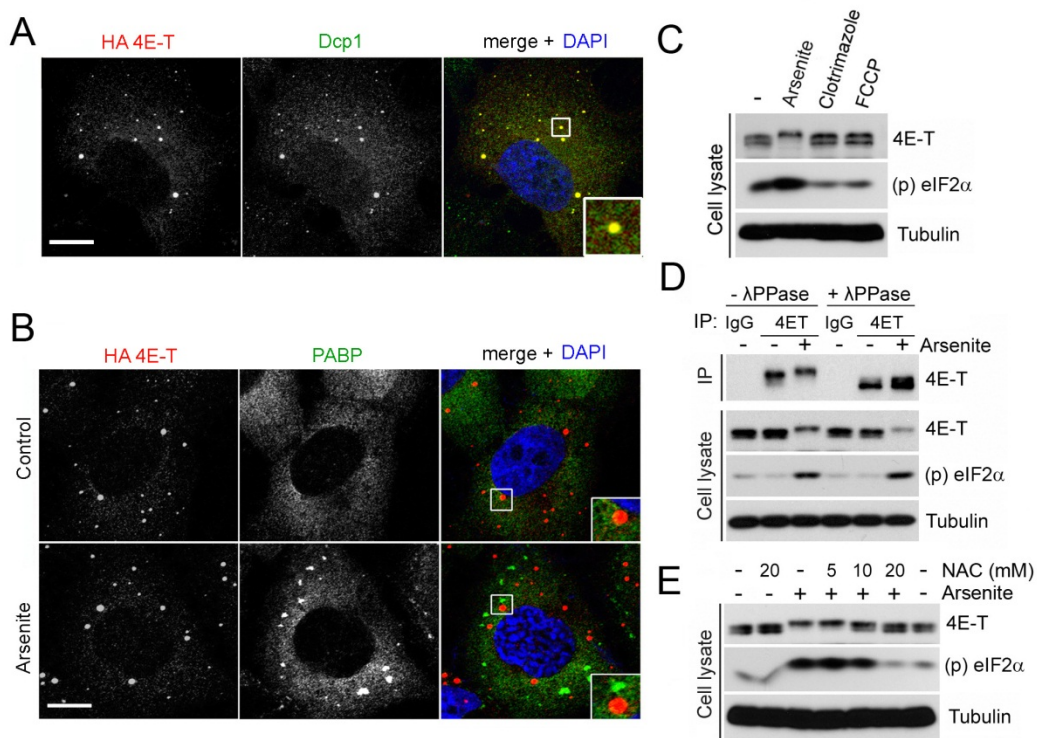
1. **Andrei, M. A., D. Ingelfinger, R. Heintzmann, T. Achsel, R. Rivera-Pomar, and R. Luhrmann.** 2005. A role for eIF4E and eIF4E-transporter in targeting mRNPs to mammalian processing bodies. *RNA* **11**:717-27.
2. **Beausoleil, S. A., J. Villen, S. A. Gerber, J. Rush, and S. P. Gygi.** 2006. A probability-based approach for high-throughput protein phosphorylation analysis and site localization. *Nat Biotechnol* **24**:1285-92.
3. **Buchan, J. R., and R. Parker.** 2009. Eukaryotic stress granules: the ins and outs of translation. *Mol Cell* **36**:932-41.
4. **Cargnello, M., and P. P. Roux.** 2011. Activation and Function of the MAPKs and Their Substrates, the MAPK-Activated Protein Kinases. *Microbiol Mol Biol Rev* **75**:50-83.
5. **Cavigelli, M., W. W. Li, A. Lin, B. Su, K. Yoshioka, and M. Karin.** 1996. The tumor promoter arsenite stimulates AP-1 activity by inhibiting a JNK phosphatase. *The EMBO Journal* **15**:6269-6279.
6. **Coller, J., and R. Parker.** 2005. General translational repression by activators of mRNA decapping. *Cell* **122**:875-86.
7. **Decker, C. J., D. Teixeira, and R. Parker.** 2007. Edc3p and a glutamine/asparagine-rich domain of Lsm4p function in processing body assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* **179**:437-49.
8. **Dephoure, N., C. Zhou, J. Villen, S. A. Beausoleil, C. E. Bakalarski, S. J. Elledge, and S. P. Gygi.** 2008. A quantitative atlas of mitotic phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**:10762-7.
9. **Dostie, J., M. Ferraiuolo, A. Pause, S. A. Adam, and N. Sonenberg.** 2000. A novel shuttling protein, 4E-T, mediates the nuclear import of the mRNA 5' cap-binding protein, eIF4E. *EMBO J* **19**:3142-56.
10. **Elias, J. E., and S. P. Gygi.** 2007. Target-decoy search strategy for increased confidence in large-scale protein identifications by mass spectrometry. *Nat Methods* **4**:207-14.
11. **Eulalio, A., I. Behm-Ansmant, and E. Izaurralde.** 2007. P bodies: at the crossroads of post-transcriptional pathways. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**:9-22.

12. **Ferraiuolo, M. A., S. Basak, J. Dostie, E. L. Murray, D. R. Schoenberg, and N. Sonenberg.** 2005. A role for the eIF4E-binding protein 4E-T in P-body formation and mRNA decay. *J Cell Biol* **170**:913-24.
13. **Franks, T. M., and J. Lykke-Andersen.** 2008. The control of mRNA decapping and P-body formation. *Mol Cell* **32**:605-15.
14. **Garneau, N. L., J. Wilusz, and C. J. Wilusz.** 2007. The highways and byways of mRNA decay. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**:113-26.
15. **Gilks, N., N. Kedersha, M. Ayodele, L. Shen, G. Stoecklin, L. M. Dember, and P. Anderson.** 2004. Stress granule assembly is mediated by prion-like aggregation of TIA-1. *Mol Biol Cell* **15**:5383-98.
16. **Hochberg, Y., and Y. Benjamini.** 1990. More powerful procedures for multiple significance testing. *Stat Med* **9**:811-8.
17. **Huang, C., Q. Ke, M. Costa, and X. Shi.** 2004. Molecular mechanisms of arsenic carcinogenesis. *Mol Cell Biochem* **255**:57-66.
18. **Huttlin, E. L., M. P. Jedrychowski, J. E. Elias, T. Goswami, R. Rad, S. A. Beausoleil, J. Villen, W. Haas, M. E. Sowa, and S. P. Gygi.** 2010. A tissue-specific atlas of mouse protein phosphorylation and expression. *Cell* **143**:1174-89.
19. **Kay, B. K., M. P. Williamson, and M. Sudol.** 2000. The importance of being proline: the interaction of proline-rich motifs in signaling proteins with their cognate domains. *FASEB J* **14**:231-41.
20. **Kedersha, N., and P. Anderson.** 2007. Mammalian stress granules and processing bodies. *Methods Enzymol* **431**:61-81.
21. **Kedersha, N., G. Stoecklin, M. Ayodele, P. Yacono, J. Lykke-Andersen, M. J. Fritzler, D. Scheuner, R. J. Kaufman, D. E. Golan, and P. Anderson.** 2005. Stress granules and processing bodies are dynamically linked sites of mRNP remodeling. *J Cell Biol* **169**:871-84.
22. **Lei, K., A. Nimnual, W. X. Zong, N. J. Kennedy, R. A. Flavell, C. B. Thompson, D. Bar-Sagi, and R. J. Davis.** 2002. The Bax subfamily of Bcl2-related proteins is essential for apoptotic signal transduction by c-Jun NH(2)-terminal kinase. *Mol Cell Biol* **22**:4929-42.

23. **Matsuzawa, A., and H. Ichijo.** 2008. Redox control of cell fate by MAP kinase: physiological roles of ASK1-MAP kinase pathway in stress signaling. *Biochim Biophys Acta* **1780**:1325-36.
24. **Mayya, V., D. H. Lundgren, S. I. Hwang, K. Rezaul, L. Wu, J. K. Eng, V. Rodionov, and D. K. Han.** 2009. Quantitative phosphoproteomic analysis of T cell receptor signaling reveals system-wide modulation of protein-protein interactions. *Sci Signal* **2**:ra46.
25. **Michelitsch, M. D., and J. S. Weissman.** 2000. A census of glutamine/asparagine-rich regions: implications for their conserved function and the prediction of novel prions. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**:11910-5.
26. **Parker, R., and U. Sheth.** 2007. P bodies and the control of mRNA translation and degradation. *Mol Cell* **25**:635-46.
27. **Parker, R., and H. Song.** 2004. The enzymes and control of eukaryotic mRNA turnover. *Nat Struct Mol Biol* **11**:121-7.
28. **Rappsilber, J., Y. Ishihama, and M. Mann.** 2003. Stop and go extraction tips for matrix-assisted laser desorption/ionization, nanoelectrospray, and LC/MS sample pretreatment in proteomics. *Anal Chem* **75**:663-70.
29. **Reijns, M. A., R. D. Alexander, M. P. Spiller, and J. D. Beggs.** 2008. A role for Q/N-rich aggregation-prone regions in P-body localization. *J Cell Sci* **121**:2463-72.
30. **Rhoads, R. E.** 2009. eIF4E: new family members, new binding partners, new roles. *J Biol Chem* **284**:16711-5.
31. **Roux, P. P., B. A. Ballif, R. Anjum, S. P. Gygi, and J. Blenis.** 2004. Tumor-promoting phorbol esters and activated Ras inactivate the tuberous sclerosis tumor suppressor complex via p90 ribosomal S6 kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**:13489-94.
32. **Rzeczkowski, K., K. Beuerlein, H. Muller, O. Dittrich-Breiholz, H. Schneider, D. Kettner-Buhrow, H. Holtmann, and M. Kracht.** 2011. c-Jun N-terminal kinase phosphorylates DCP1a to control formation of P bodies. *J Cell Biol* **194**:581-96.
33. **Sheth, U., and R. Parker.** 2003. Decapping and decay of messenger RNA occur in cytoplasmic processing bodies. *Science* **300**:805-8.
34. **Shevchenko, A., M. Wilm, O. Vorm, and M. Mann.** 1996. Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Anal Chem* **68**:850-8.

35. **Teixeira, D., U. Sheth, M. A. Valencia-Sanchez, M. Brengues, and R. Parker.** 2005. Processing bodies require RNA for assembly and contain nontranslating mRNAs. *RNA* **11**:371-82.
36. **Ting, L., R. Rad, S. P. Gygi, and W. Haas.** 2011. MS3 eliminates ratio distortion in isobaric multiplexed quantitative proteomics. *Nat Methods* **8**:937-40.
37. **Weston, C. R., and R. J. Davis.** 2007. The JNK signal transduction pathway. *Curr Opin Cell Biol* **19**:142-9.
38. **Williamson, M. P.** 1994. The structure and function of proline-rich regions in proteins. *Biochem J* **297 ( Pt 2)**:249-60.
39. **Yates, J. R., 3rd, J. K. Eng, A. L. McCormack, and D. Schieltz.** 1995. Method to correlate tandem mass spectra of modified peptides to amino acid sequences in the protein database. *Anal Chem* **67**:1426-36.
40. **Yoon, J. H., E. J. Choi, and R. Parker.** 2010. Dcp2 phosphorylation by Ste20 modulates stress granule assembly and mRNA decay in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* **189**:813-27.
41. **Zheng, D., N. Ezzeddine, C. Y. Chen, W. Zhu, X. He, and A. B. Shyu.** 2008. Deadenylation is prerequisite for P-body formation and mRNA decay in mammalian cells. *J Cell Biol* **182**:89-101.

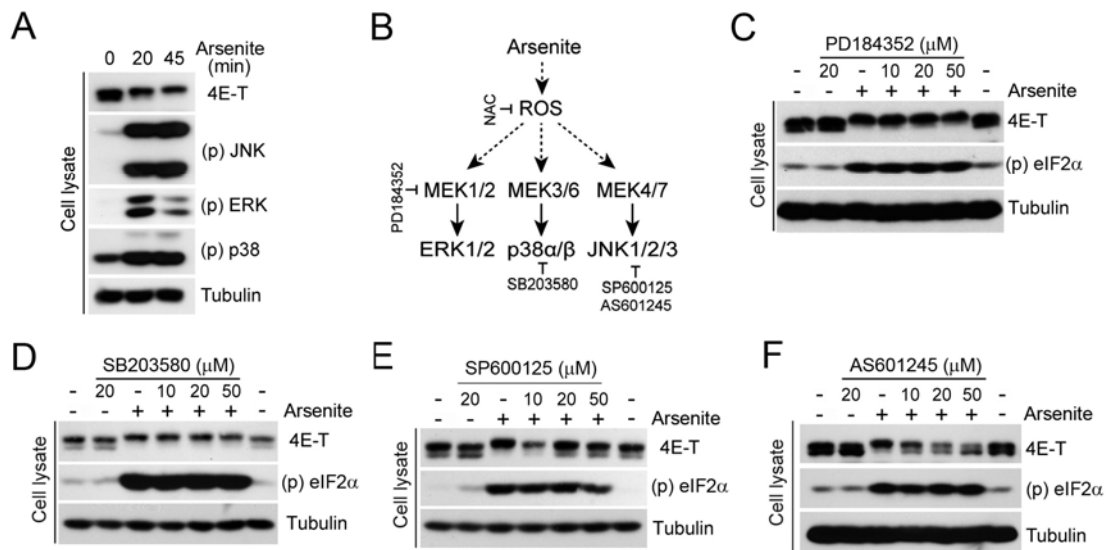
## Figures



**Figure 1. 4E-T Becomes Phosphorylated in Response to Oxidative Stress.**

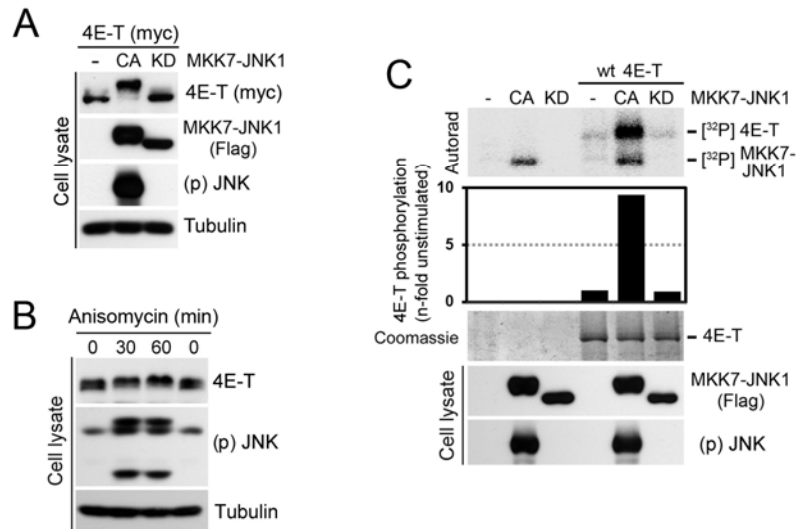
(A) Serum growing U2OS cells were transfected with HA-tagged 4E-T. Subcellular localization of endogenous Dcp1 (P-body component, green) and HA-tagged 4E-T (red) was determined by indirect immunofluorescence. The colocalization of these factors appears yellow in the merged image. Nuclei were stained with DAPI (blue). (B) U2OS stably expressing HA-tagged 4E-T were grown in presence of serum and treated for 45 min with arsenite (0.5 mM). Endogenous PABP (stress granule component, green) and HA-tagged 4E-T (red) were analysed by immunofluorescence. Higher magnification views of boxed areas are shown in bottom right insets and display 4E-T and Dcp1 colocalization (A) and the distinct localization of 4E-T and PABP (B). Bars: 10  $\mu$ m. (C) HEK293 cells were treated with arsenite (0.5 mM) for 45 min and clotrimazole (mitochondrial stress inducer, 20  $\mu$ M) or FCCP (metabolic stress inducer, 1  $\mu$ M) for 60 min. The phosphorylation of 4E-T was assayed by mobility shift. Induction of oxidative stress by arsenite was verified by monitoring the phosphorylation of eIF2 $\alpha$  on Ser51. (D) Endogenous 4E-T was immunoprecipitated from

HEK293 cells treated with arsenite. Immunoprecipitates were treated with  $\lambda$ -phosphatase and 4E-T phosphorylation was assayed as in (C). (E) HEK293 cells were incubated for 45 min with the anti-oxidant agent *N*-acetyl-*L*-cysteine (NAC) at the indicated concentrations prior to arsenite treatment. 4E-T phosphorylation was assayed as in (C).



**Figure 2. 4E-T is a target of JNK signalling.**

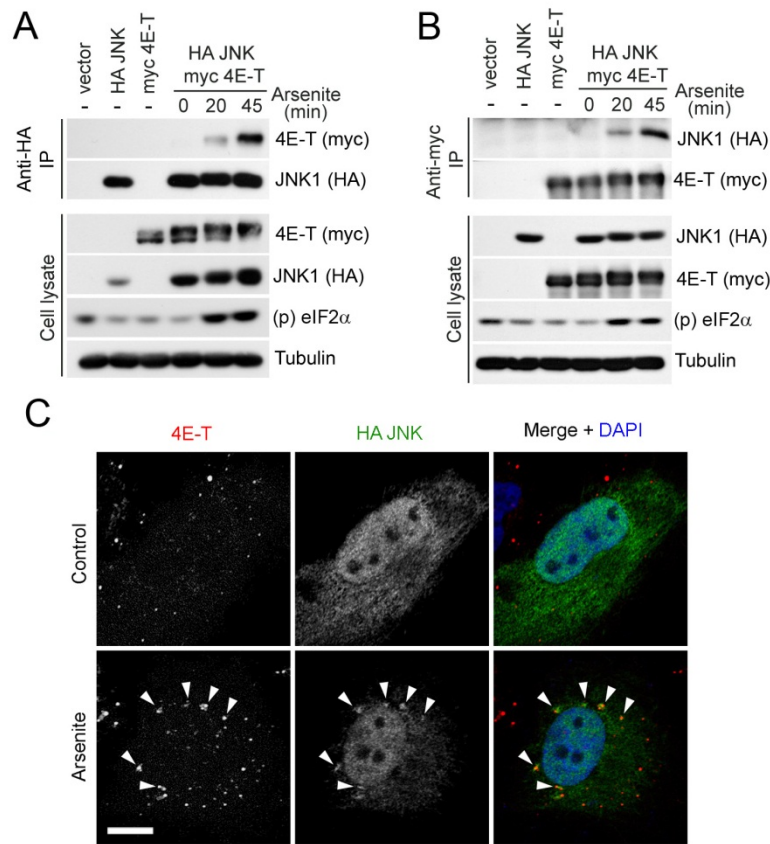
(A) HEK293 cells were treated with arsenite (0.5 mM) for the indicated time. Activation of JNK, p38 and ERK was determined by immunoblotting and 4E-T phosphorylation by mobility shift assay. (B) Schematic representation of the agonist and pharmacological inhibitors used in this study. (C) to (F) Cells were pre-treated for 30 min with PD184352 (C), SB203580 (D), SP600125 (E) or AS601245 (F) at the indicated concentrations prior to arsenite treatment. The phosphorylation of 4E-T was analysed by mobility shift assay.



**Figure 3. JNK phosphorylates 4E-T in vitro and in vivo.**

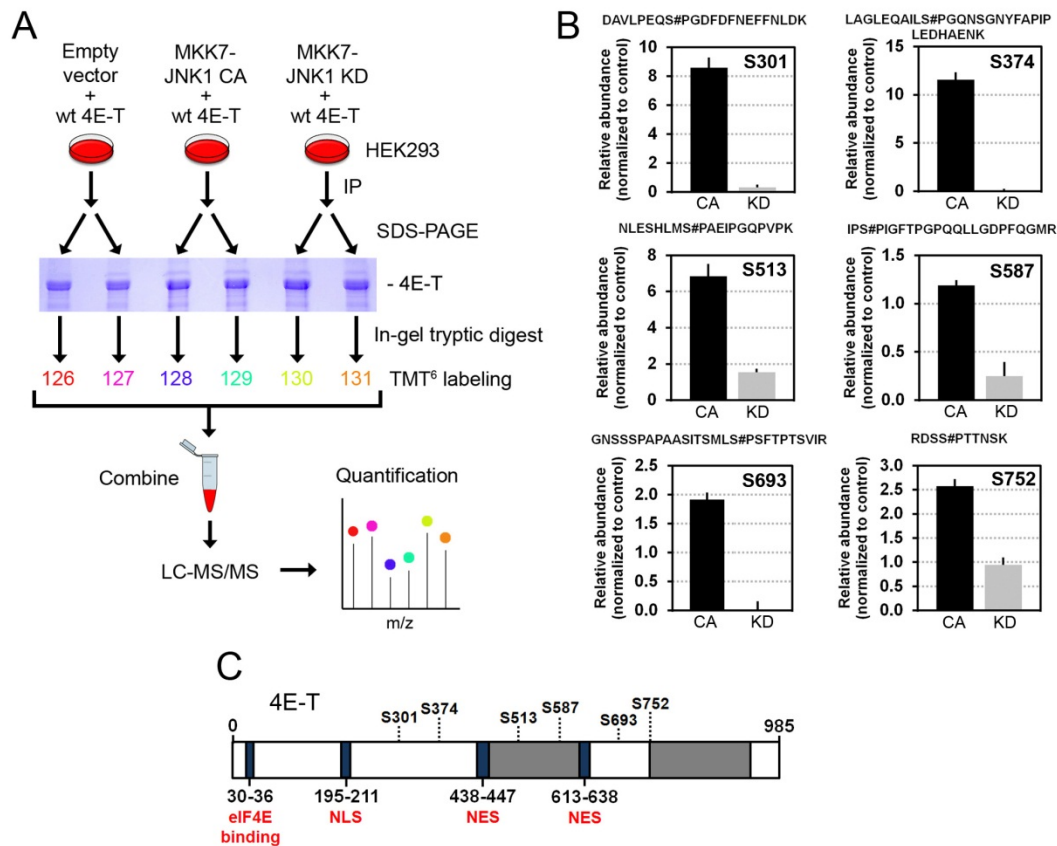
(A) Cells were co-transfected with myc-tagged 4E-T and Flag-tagged MKK7-JNK1 in constitutively activated (CA) or kinase-inactive (KD) forms. 4E-T phosphorylation was analysed by mobility shift assay. (B) JNK activation was induced by anisomycin treatment (10  $\mu$ M) for the indicated time and 4E-T phosphorylation was analysed as in (A). (C) HEK293T cells were transfected with Flag-tagged MKK7-JNK1 (CA or KD) or myc-tagged 4E-T. Immunoprecipitated myc-tagged 4E-T from serum-starved cells was incubated with immunopurified Flag-tagged MKK7-JNK1 in a kinase reaction with  $\gamma$ [ $^{32}$ P]ATP. The resulting samples were subjected to SDS-PAGE, and the dried Coomassie-stained gel was autoradiographed. Histogram shows the n-fold increase of 4E-T phosphorylation normalized to the condition where JNK was not transfected.





**Figure 4. JNK interacts and colocalizes with 4E-T upon induction of oxidative stress.**

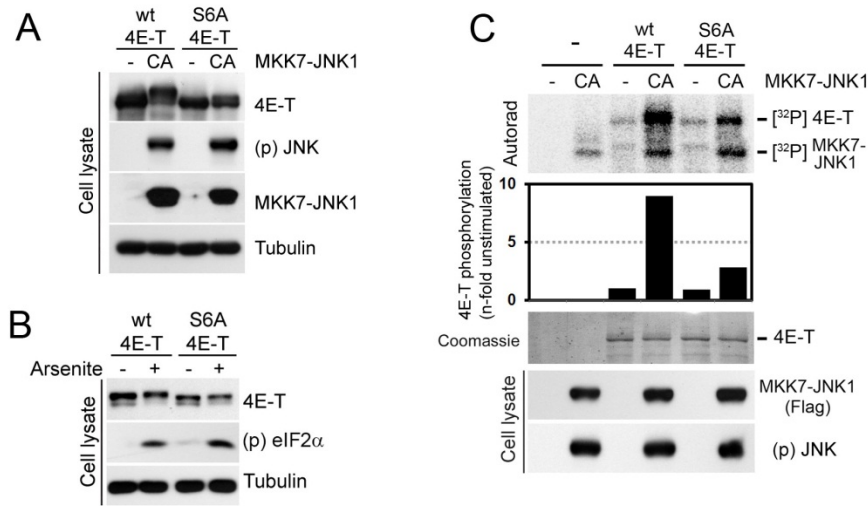
(A) HEK293 cells were co-transfected with HA-tagged JNK1 and myc-tagged 4E-T and treated with arsenite (0.5 mM) for the indicated time. Associated 4E-T was assayed within HA-JNK immunoprecipitates by immunoblotting. (B) As in (A), except that associated JNK was assayed within myc 4E-T immunoprecipitates by immunoblotting. (C) U2OS cells were transfected with HA-tagged JNK1, left untreated (top panel) or treated with arsenite (0.5 mM) for 45 min (bottom panel). Endogenous 4E-T (red) and HA-tagged JNK1 (green) were immunostained. Nuclei were stained by DAPI (blue). Arrowheads show examples of colocalized puncta. Bar: 10  $\mu$ m.



**Figure 5. Identification of 4E-T phosphorylation sites regulated by JNK.**

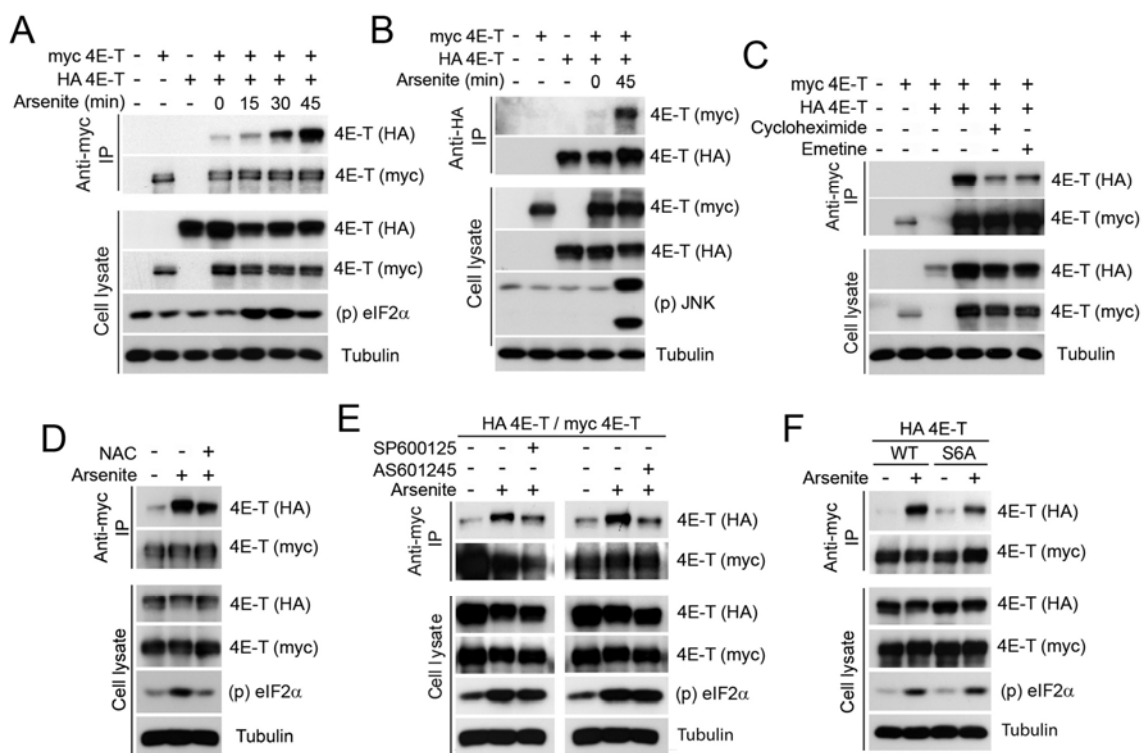
(A) Outline of the quantitative phosphoproteomic workflow developed for phosphopeptide quantitation in HEK293 cells using the Tandem Mass Tag (TMT) technology. Cells were co-transfected with myc-tagged 4E-T and either empty vector, constitutively activated or inactivated JNK1. Immunoprecipitated 4E-T from cell extracts was resolved by SDS-PAGE and digested in-gel with trypsin prior to TMT<sup>6</sup> labeling and mass spectrometry analysis. (B) MS/MS analysis revealed six phosphorylation sites in 4E-T which are differentially regulated between the activated (CA) and inactivated (KD) JNK conditions. The six serine residues (Ser301, Ser374, Ser513, Ser587, Ser693 and Ser752) reside within the (S/T-P) consensus JNK phosphorylation motif. The data was normalized to the empty vector condition. Error bars indicate the standard deviation (SD) of duplicate samples (all changes: FDR < 0.05). Sites of phosphorylation within each tryptic peptide are indicated by ‘#’ immediately following the modified residue, with numbering based on the sequence found in the International Protein

Index (IPI00291800.1). (C) Schematic representation of the identified phosphorylation sites within 4E-T. NES, nuclear export signal, NLS, nuclear localization signal. The gray areas represent regions with high Q/N-content.



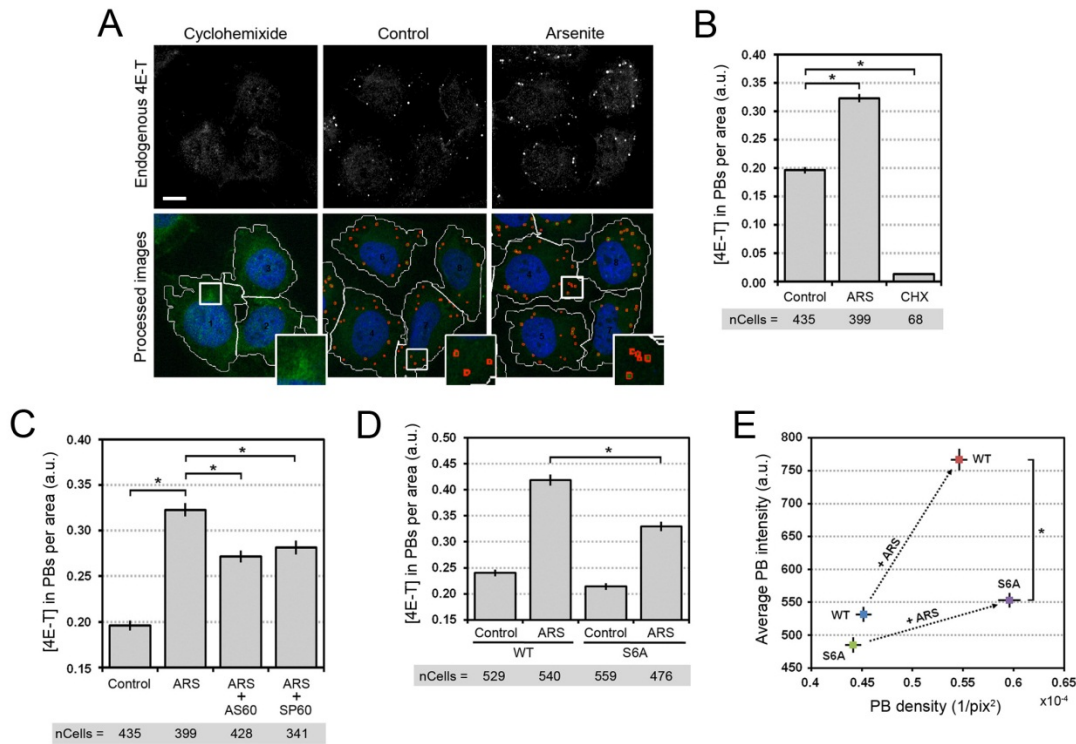
**Figure 6. JNK phosphorylates 4E-T on six serine residues.**

(A) HEK293 cells were co-transfected with wt 4E-T or the S6A mutant (S301A/S374A/S513A/S587A/S693A/S752A) and activated JNK1. The phosphorylation of 4E-T was analysed by mobility shift assay. (B) Cells were transfected with wt or S6A 4E-T and treated with arsenite (0.5 mM) for 45 min. 4E-T phosphorylation was assayed as in (A). (C) HEK293T cells were co-transfected with wt or S6A 4E-T and activated JNK1. Immunoprecipitated myc-tagged 4E-T from serum-starved cells was incubated with immunopurified Flag-tagged MKK7-JNK1 (CA) in a kinase reaction with  $\gamma$ [<sup>32</sup>P]ATP. The resulting samples were subjected to SDS-PAGE, and the dried Coomassie-stained gel was autoradiographed. Histogram shows the n-fold increase of 4E-T phosphorylation normalized to the condition where JNK was not transfected.



**Figure 7. JNK contributes to 4E-T complex assembly upon oxidative stress.**

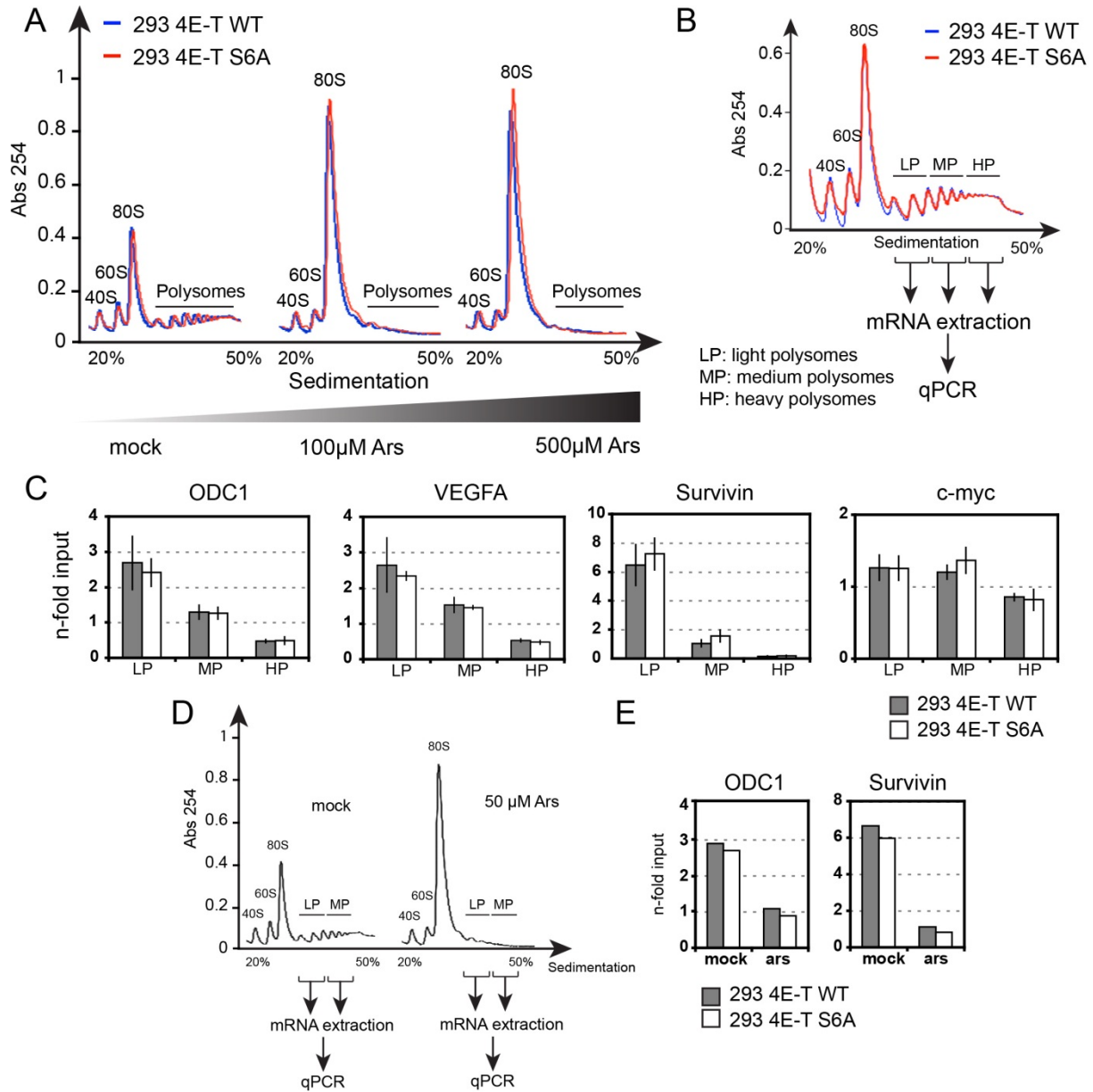
(A) HEK293 cells were transfected with wt HA and myc-tagged 4E-T and treated with arsenite (0.5 mM) for the indicated time. Associated HA-tagged 4E-T was assayed within myc 4E-T immunoprecipitates by immunoblotting. (B) Same as in (A), except that myc-tagged 4E-T was assayed within HA 4E-T immunoprecipitates by immunoblotting. (C) to (E) Same as in (A), except that cells were treated with cycloheximide (50  $\mu$ g/mL) or emetine (20  $\mu$ g/mL) for 60 min (C), NAC (10 mM) for 45 min prior to arsenite treatment (D) and SP600125 (20  $\mu$ M) or AS601245 (20  $\mu$ M) for 30min prior to arsenite treatment (E). (F) Cells were transfected with wt myc-tagged 4E-T and HA-tagged wt or JNK-nonphosphorylatable forms of 4E-T and treated with arsenite (0.5 mM) for 45 min. Associated HA-tagged 4E-T was assayed within myc 4E-T immunoprecipitates by immunoblotting.



**Figure 8. 4E-T phosphorylation promotes PB assembly in response to oxidative stress.**

(A) Serum growing U2OS cells were treated with cycloheximide (50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) for 1 hour or arsenite (0.5 mM) for 45 min. Endogenous 4E-T was immunostained and analysed by confocal microscopy (top panel). The images were processed using the software Matlab (bottom panel). Cell shapes were visualized by the fluorescence of the background cytoplasm and the cell outline was traced (white line). PBs were detected and circled (red line) based on the endogenous 4E-T immunofluorescence. The number of PBs per cell and their associated intensity was reported in as explained in the Experimental Procedures. Higher magnification views of boxed areas are shown in bottom right insets and display the recognition of PBs by the informatics program. Bar: 10  $\mu\text{m}$ . (B) Data generated in (A) were analysed to quantify the total amount of endogenous 4E-T accumulating in PBs from cells left untreated and treated either with cycloheximide or arsenite. Error bars indicate the standard error of the mean (SEM). \*,  $p < 0.001$ . (C) U2OS cells were incubated with AS601245 (20  $\mu\text{M}$ ) or SP600125 (20  $\mu\text{M}$ ) for 30 min prior to treatment with arsenite. Endogenous 4E-T was immunostained and confocal images were processed as in (A). The amount of 4E-T localizing in PBs was determined as in (B). Error bars indicate the standard error of the mean (SEM). \*,  $p < 0.001$ .

(D) HeLa cells were transfected with wt or S6A mutant 4E-T and treated with arsenite. HA-tagged 4E-T was immunostained and the localization of 4E-T within PBs was determined as in (A) and (B) except that 4E-T localization in PBs was normalized to its expression levels prior to quantification. Error bars indicate the standard error of the mean (SEM). \*,  $p < 0,001$ . Number of cells analysed for each condition is indicated below the bar graphs in (B), (C) and (D). (E) Representation of the distribution of wt and S6A HA-tagged 4E-T from data in (8D). The average PB intensities were plotted over the PB densities for WT and S6A 4E-T in untreated and arsenite treated cells. Arrows show the change in the accumulation of 4E-T in PBs upon arsenite treatment. Error bars indicate the standard error of the mean (SEM). \*,  $p < 0,001$ .

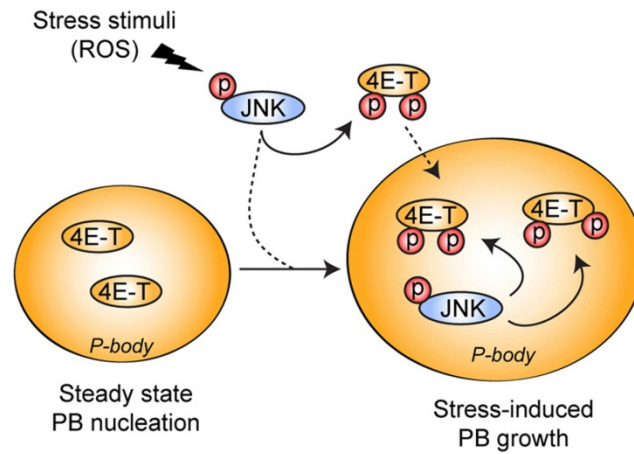


**Figure 9. S6A mutation of 4E-T does not affect global protein synthesis, and loading of eIF4E-sensitive transcripts on polysomes.**

(A) Polysome profiles of HEK293 cells stably expressing HA-4E-T wt (blue) or S6A (red) treated for 45 min with increasing doses of arsenite. Cell extracts were size-fractionated by centrifugation through sucrose density gradients (20–50%). Absorbance at 254 nm is shown as a function of sedimentation. The 40S, 60S, 80S ribosomal subunits and polysomes are indicated. (B) Polysomal mRNAs from HEK293 cells stably expressing HA-4E-T wt (blue) or



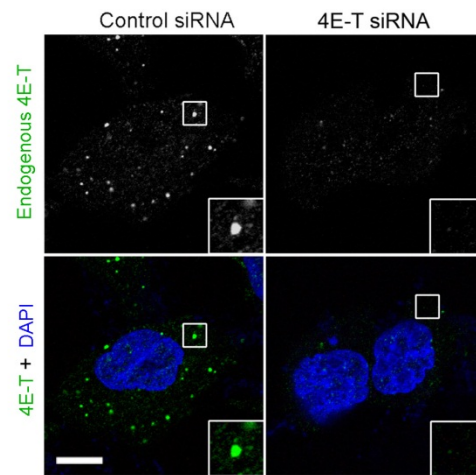
S6A (red) were collected in three fractions corresponding to the light (LP), medium (MP) and heavy polysomes (HP). (C) The expression levels of ODC1, Survivin, VEGFA, and c-myc transcripts were analysed by quantitative PCR and the data were normalized to GAPDH and ActB from each polysomal fractions as well as input. Data is expressed in fold enrichment relative to input. (D and E) Same as in (B) and (C) but treated with 50  $\mu$ M arsenite.



**Figure 10. 4E-T phosphorylation stimulates PB growth upon stress.**

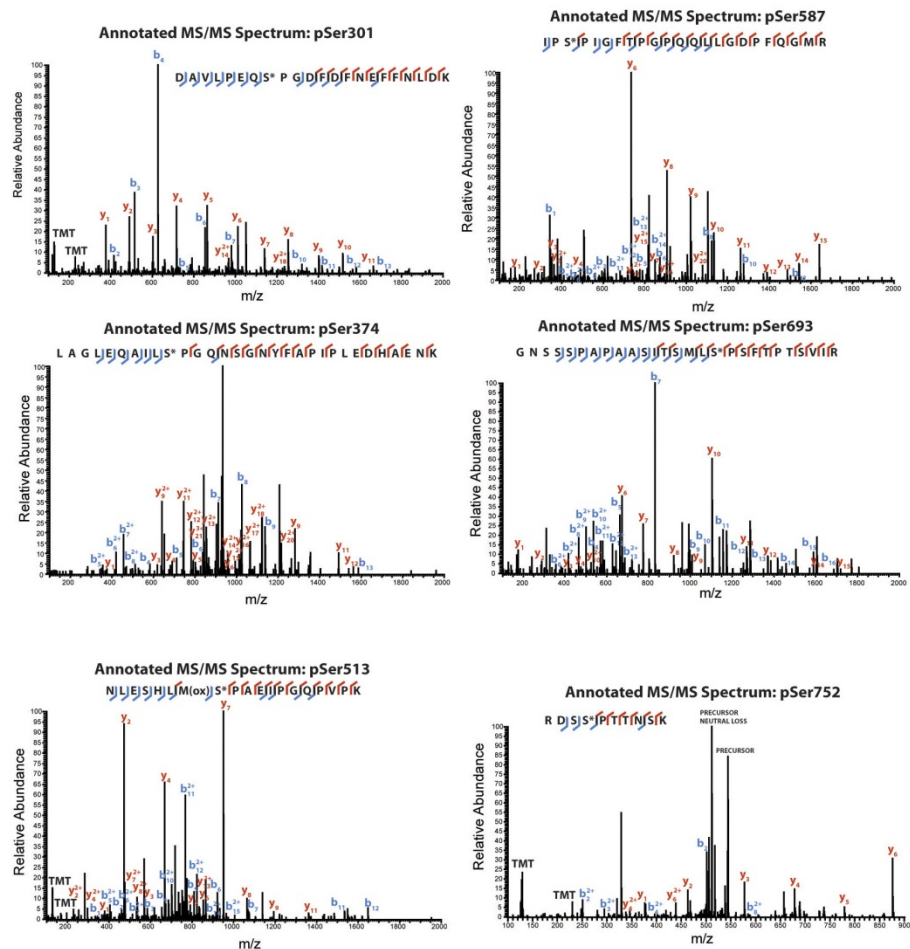
Upon oxidative stress, activated JNK localizes to PBs where it interacts with and phosphorylates 4E-T. The phosphorylation of 4E-T mediated by JNK enhances its accumulation in PBs and participates in the increased assembly of PBs upon oxidative stress. JNK can then regulate the formation of PBs by phosphorylating its substrate, 4E-T.

## Supplemental Figures



**Figure S1. Specificity of the antibody against endogenous 4E-T.**

U2OS cells were transfected with siRNA duplexes targeted against a control sequence or human 4E-T. Endogenous 4E-T was immunostained using an anti-4E-T antibody, and nuclei were stained using DAPI. Higher magnification views of boxed areas are shown in bottom right insets and show the disappearance of 4E-T staining with the siRNA targeted against 4E-T.



**Figure S2. Tandem mass spectra of the six precursor ions corresponding to tryptic phosphopeptides regulated by JNK in 4E-T.**

High resolution MS/MS spectra of tryptic phosphopeptide precursor ions showing respective y- and b-ions. Representative tryptic peptide sequences are displayed above each spectrum, with phosphorylated residues indicated by asterisks.

```

4E-T_chick 1 MDKRGGTEAENGDAFL LN TA KYPHRYTKEELLDIKERPYSKQRPSCLEKYDSGVDPEKWHASLYPASGRSSP
4E-T_Cow 1 MD S V ETENGDAFLDLKKQPAS SPHRYTKEELLDIKERPYSKQRPSCLEKYDSGVDPEKWHASLYPASGRSSP
4E-T_Rat 1 MKRS VDETEGDAFLDLKKLPATSKSPHRYTKEELLDIKERPYSKQRPSCLEKYDSGVDPEKWHASLYPASGRSSP
4E-T_mouse 1 MKRS V ETENGDAFL LKKLPATSKSPHRYTKEELLDIKERPYSKQRPSCLEKYDSGVDPEKWHASLYPASGRSSP
4E-T_Human 1 MDRS VGETESGDAFLDLKKPASKQPHRYTKEELLDIKERPYSKQRPSCLEKYDSGVDPEKWHASLYPASGRSSP

4E-T_chick 80 VESLKKELD DRPSLVRRIVDRPRVKKEDLDVVLSPQRRSFGGGCHVTAAVSSRRAGSPLEK NDG RM GGRRIIGSGR
4E-T_Cow 79 VESLKKELD DRPSLVRRIVDRPRVKKEDLDVVLSPQRRSFGGGCHVTAAVSSRRAGSPLEK NDG RM GGRRIIGSGR
4E-T_Rat 80 VESLKKELD DRPSLVRRIVDRPRVKKEDLDVVLSPQRRSFGGGCHVTAAVSSRRAGSPLEK NDG RM GGRRIIGSGR
4E-T_mouse 79 VESLKKELD DRPSLVRRIVDRPRVKKEDLDVVLSPQRRSFGGGCHVTAAVSSRRAGSPLEK NDG RM GGRRIIGSGR
4E-T_Human 80 VESLKKELD DRPSLVRRIVDRPRVKKEDLDVVLSPQRRSFGGGCHVTAAVSSRRAGSPLEK NDG RM GGRRIIGSGR

4E-T_chick 160 YTSERNFKDHRGG KD RDSRDARDRRDRDYDKRRFRREFGDSKRVFGERRRNDSYTEEPWFSAGPTSQSETIELT
4E-T_Cow 159 YTSARNFKDHRGG KDDL ---DLR DRDRDRDYDKRRFRREFGDSKRVFGERRRNDSYTEEPWFSAGPTSQSETIELT
4E-T_Rat 160 YTSARAFKDHRLSDKDLR ---DLRDRDRDYDKRRFRREFGDSKRVFGERRRNDSYTEEPWFSAGPTSQSETIELT
4E-T_mouse 159 YTSARAFKDHRLSDKDLR ---DLRDRDRDYDKRRFRREFGDSKRVFGERRRNDSYTEEPWFSAGPTSQSETIELT
4E-T_Human 160 YTSARNFKDHRRLSDKDLR ---DLRDRDRDYDKRRFRREFGDSKRVFGERRRNDSYTEEPWFSAGPTSQSETIELT

4E-T_chick 240 GFDDKILEEDHKGRKRTRRTASVKEG IVFCNGGVAEEDEVVILAQEPFADQEVPRDVLPEQSPGFDFNEFFNLDK
4E-T_Cow 236 GFDDKILEEDHKGRKRTRRTASVKEG IVFCNGGVAEEDEVVILAQEPFADQEVPRDVLPEQSPGFDFNEFFNLDK
4E-T_Rat 237 GFDDKILEEDHKGRKRTRRTASVKEG IVFCNGGVAEEDEVVILAQEPFADQEVPRDVLPEQSPGFDFNEFFNLDK
4E-T_mouse 236 GFDDKILEEDHKGRKRTRRTASVKEG IVFCNGGVAEEDEVVILAQEPFADQEVPRDVLPEQSPGFDFNEFFNLDK
4E-T_Human 237 GFDDKILEEDHKGRKRTRRTASVKEG IVFCNGGVAEEDEVVILAQEPFADQEVPRDVLPEQSPGFDFNEFFNLDK

4E-T_chick 320 SVPLCLASMIEDVLGEGSVASRFSRWFSNPSRSGSRSSSLRSTPHEELERLAGLEQAALLSPGQNSGNYFAPFLPDHSEN
4E-T_Cow 315 -VPCLASMIEDVLGEGSVASRFSRWFSNPSRSGSRSSSLRSTPHEELERLAGLEQAALLSPGQNSGNYFAPFLPDHSEN
4E-T_Rat 316 -VPCLASMIEDVLGEGSVASRFSRWFSNPSRSGSRSSSLRSTPHEELERLAGLEQAALLSPGQNSGNYFAPFLPDHSEN
4E-T_mouse 315 -VPCLASMIEDVLGEGSVASRFSRWFSNPSRSGSRSSSLRSTPHEELERLAGLEQAALLSPGQNSGNYFAPFLPDHSEN
4E-T_Human 316 -VPCLASMIEDVLGEGSVASRFSRWFSNPSRSGSRSSSLRSTPHEELERLAGLEQAALLSPGQNSGNYFAPFLPDHSEN

4E-T_chick 400 KVDILEMLQAKAVDLKPLLSLSANKEKRL ES HSGVVLSVEVEAGLKGLKVDQEQRLA PPFMAEQ EE LNIAGS RQ
4E-T_Cow 394 KVDILEMLQAKAVDLKPLLSLSANKEKRLKSSHSQVVLSVEVEAGLKGLKVDQEQRLA PPFMAELHLEETLSAVASNRQ
4E-T_Rat 395 KVDILEMLQAKAVDLKPLLSLSANKEKRLKSSHSQVVLSVEVEAGLKGLKVDQEQRLA PPFMAELHLEETLSAVASNRQ
4E-T_mouse 394 KVDILEMLQAKAVDLKPLLSLSANKEKRLKSSHSQVVLSVEVEAGLKGLKVDQEQRLA PPFMAELHLEETLSAVASNRQ
4E-T_Human 395 KVDILEMLQAKAVDLKPLLSLSANKEKRLKSSHSQVVLSVEVEAGLKGLKVDQEQRLA PPFMAELHLEETLSAVASNRQ

4E-T_chick 479 LKKDGDMTAFNKLVS MKASGTLPSQPKVNSLHSLMSPPEIPGQP SKNILQELLGPP TRPASSN LSGL SGLPEG
4E-T_Cow 474 LKKDGDMTAFNKLVS MKASGTLPSQPKVNSLHSLMSPPEIPGQPVEKNILQELLGPPVQRPASSNLLSGLMGSLEPT
4E-T_Rat 475 LKKDGDMTAFNKLVS MKASGTLPSQPKVNSLHSLMSPPEIPGQPVEKNILQELLGPPVQRPASSNLLSGLMGSLEPT
4E-T_mouse 474 LKKDGDMTAFNKLVS MKASGTLPSQPKVNSLHSLMSPPEIPGQPVEKNILQELLGPPVQRPASSNLLSGLMGSLEPT
4E-T_Human 475 LKKDGDMTAFNKLVS MKASGTLPSQPKVNSLHSLMSPPEIPGQPVEKNILQELLGPPVQRPASSNLLSGLMGSLEPT

4E-T_chick 559 ASLLGQRAPSPF PVFPFRAASADYLHRRTPSPITGTPSGQQLLGDPPQGRKPMSPVAQMSPLE QAALEGLALPH
4E-T_Cow 554 ASLLGQRAPSPF SOVFPFRAASADYLHRRTPSPITGTPSGQQLLGDPPQGRKPMSPVTAQMSQLELQAALEGLALPH
4E-T_Rat 555 ASLLGQRAPSPF SOVFPFRAASADYLHRRTPSPITGTPSGQQLLGDPPQGRKPMSPVTAQMSQLELQAALEGLALPH
4E-T_mouse 554 ASLLGQRAPSPF SOVFPFRAASADYLHRRTPSPITGTPSGQQLLGDPPQGRKPMSPVTAQMSQLELQAALEGLALPH
4E-T_Human 555 ASLLGQRAPSPF SOVFPFRAASADYLHRRTPSPITGTPSGQQLLGDPPQGRKPMSPVTAQMSQLELQAALEGLALPH

4E-T_chick 639 DLA QAAAFYQHGFGKPO D NRDC RNRQRVTKSPAP CHRGN SSPAPVASITSMLSPSFTPTSVIRKMYESKEKSKE
4E-T_Cow 634 DLA QAAAFYQHGFGKPOVDRTRDGRNRQRVTKSPAP HRGNSSSPAPAAITSMLSPSFTPTSVIRKMYESKEKSKE
4E-T_Rat 635 DLAVQTTFYQGFSGKPOVDRTRDGRNRQRVTKSPAP HRGNSSSPAPAAITSMLSPSFTPTSVIRKMYESKEKSKE
4E-T_mouse 634 DLAVQTTFYQGFSGKPOVDRTRDGRNRQRVTKSPAP HRGNSSSPAPAAITSMLSPSFTPTSVIRKMYESKEKSKE
4E-T_Human 635 DLAVQAAAFYQGFSGKPOVDRTRDGRNRQRVTKSPAP HRGNSSSPAPAAITSMLSPSFTPTSVIRKMYESKEKSKE

4E-T_chick 719 PPSGK KSGDKR NQ PNE NLSS SVENADQ LLETGLTFLPALORSACSTPL QNRFCKEODYRPAKGRKFT
4E-T_Cow 714 PPSGKAA QDGKEDRQKSEENLSS SVENADQ LLETGLTFLPALORSACSTPL QNRFCKEODYRPAKGRKFT
4E-T_Rat 715 PPSGK VPDGKEDRQKSEENLSS SVENADQ LLETGLTFLPALORSACSTPL QNRFCKEODYRPAKGRKFT
4E-T_mouse 714 PPSGKAA VPDGKEDRQKSEENLSS SVENADQ LLETGLTFLPALORSACSTPL QNRFCKEODYRPAKGRKFT
4E-T_Human 715 PPSGKAA QDGKEDRQKSEENLSS SVENADQ LLETGLTFLPALORSACSTPL QNRFCKEODYRPAKGRKFT

4E-T_chick 798 LASPVFGPFLRPVHQVPLVPHVPIVRPAHQHLPGLVQRLMAGVHPQHLPLLOAG LPPG DL HLQGLS PILGQPF
4E-T_Cow 794 LASPVFGPFLRPVHQVPLVPHVPIVRPAHQHLPGLVQRLMAGVHPQHLPLLOAGVLPFP DL HLQGLSGPILGQPF
4E-T_Rat 795 LASPVFGPFLRPVHQVPLVPHVPIVRPAHQHLPGLVQRLMAGVHPQHLPLLOAGVLPFP DL HLQGLSGPILGQPF
4E-T_mouse 793 LASPVFGPFLRPVHQVPLVPHVPIVRPAHQHLPGLVQRLMAGVHPQHLPLLOAGVLPFP DL HLQGLSGPILGQPF
4E-T_Human 795 LASPVFGPFLRPVHQVPLVPHVPIVRPAHQHLPGLVQRLMAGVHPQHLPLLOAGVLPFP DL HLQGLSGPILGQPF

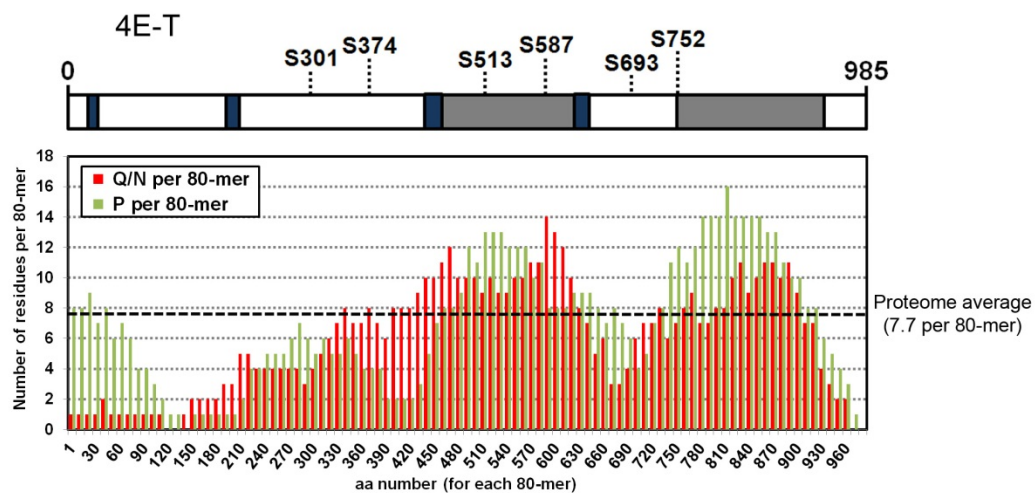
4E-T_chick 877 YPLE TASHHLLNPRRGTEPLHLAMQQLQRSVLHSPGSGSQAANA SVQTPQNVPSRSGDPLHSHQLEHRPSQRSSSPV
4E-T_Cow 874 YPLE TASHHLLNPRRGTEPLHLAMQQLQRSVLHSPGSGSQAANA SVQTPQNVPSRSGDPLHSHQLEHRPSQRSSSPV
4E-T_Rat 875 YPLVSAASHHLLNPRRGTEPLHLAMQQLQRSVLHSPGSGSQAANA SVQTPQNVPSRSGDPLHSHQLEHRPSQRSSSPV
4E-T_mouse 873 YPLVSAASHHLLNPRRGTEPLHLAMQQLQRSVLHSPGSGSQAANA SVQTPQNVPSRSGDPLHSHQLEHRPSQRSSSPV
4E-T_Human 875 YPLE TASHHLLNPRRGTEPLHLAMQQLQRSVLHSPGSGSQAANA SVQTPQNVPSRSGDPLHSHQLEHRPSQRSSSPV

4E-T_chick 956 GLAKWFGSDVLOQLPMSMPKVISVDELEYRQ
4E-T_Cow 953 GLAKWFGSDVLOQLPMSMPKVISVDELEYRQ
4E-T_Rat 954 GLAKWFGSDVLOQLPMSMPKVISVDELEYRQ
4E-T_mouse 952 GLAKWFGSDVLOQLPMSMPKVISVDELEYRQ
4E-T_Human 954 GLAKWFGSDVLOQLPMSMPKVISVDELEYRQ

```

Figure S3. Conservation of the JNK-dependent 4E-T phosphorylation sites amongst vertebrate species.

Primary sequence alignment of 4E-T from different vertebrate species was generated with ClustalW. Conserved residues are depicted in black, and black arrows indicate the six JNK-dependent phosphorylation sites identified.



**Figure S4. Frequency of Q/N/P residues in 4E-T.**

The frequency of Q, N and P residues were calculated based on the number of Q/N or P residues per 80-mers of 4E-T, starting at position 1 and shifting ten aa at a time.

## Chapitre 5: Discussion

### 1. Régulation de mTORC1 par les kinases RSK

#### *Phosphorylation de Raptor et activation du complexe mTORC1*

Nous avons montré que la phosphorylation de Raptor par RSK est nécessaire à l'activation du complexe mTORC1 en réponse aux facteurs de croissance et à l'activation oncogénique de la voie Ras/ERK néanmoins les mécanismes moléculaires contribuant à cet effet ne sont pas connus (Chapitre 2). La phosphorylation de Raptor par RSK qui a lieu dans une région de Raptor sans fonction associée n'influe ni sur la capacité de Raptor à interagir avec les substrats du complexe à savoir les 4E-BP et les S6K ni sur l'interaction entre Raptor et mTOR (Chapitre 2 Figure 5). On peut imaginer que ces événements de phosphorylation potentialisent l'activation de mTORC1 par un autre mécanisme, par exemple en favorisant le recrutement du complexe au lysosome. En effet, au moment où nous avons publié nos résultats, l'activation de mTORC1 par les acides aminés et les protéines Rag grâce à sa localisation au lysosome n'était pas connue. Il est donc possible que la phosphorylation des sérines 719, 721 et 722 identifiée dans nos travaux facilite ou stabilise l'interaction de Raptor avec les protéines Rag ou p62 qui sont responsables du recrutement de mTORC1 au lysosome (Chapitre 1 Section 2.1.2.2). Raptor interagit également avec la protéine LRS (Leucyl-tRNA Synthetase) qui intervient dans l'activation de mTORC1 en présence de leucine en activant les protéines Rag (Han et al. 2012). La phosphorylation de Raptor par RSK pourrait agir au niveau de la localisation de mTORC1 au lysosome grâce aux protéines p62 et Rag et/ou au niveau de l'activation des Rag par LRS. Dans les deux cas, ces événements s'accompagneraient de l'activation du complexe mTORC1 que nous avons observé *in vitro* (Chapitre 2 Figure 5). Une façon de répondre à ces hypothèses serait de tester par immunoprécipitation les interactions de Raptor avec ses différents partenaires et de voir si le mutant non-phosphorylable de Raptor pour les sérines 719, 721 et 722 possède les mêmes affinités pour p62, Rag et LRS. La localisation cellulaire de ce mutant de Raptor pourrait également apporter un élément de réponse à ces questions et permettrait de savoir si la capacité de Raptor à s'accumuler au lysosome est affectée par sa phosphorylation.

Un autre mécanisme par lequel la phosphorylation de Raptor par RSK peut potentiellement moduler l'activité de mTORC1 serait de défavoriser la liaison de l'inhibiteur DEPTOR à mTOR. Celui-ci est associé avec les complexes mTORC1 et mTORC2 et cette association prévient leur activité (Peterson et al. 2009). Bien que DEPTOR et Raptor n'interagissent pas directement, on peut imaginer que la conformation de Raptor soit affectée par la phosphorylation des sérines ciblées par RSK et influe sur la capacité de DEPTOR à lier et bloquer le complexe mTORC1. Ce mécanisme de régulation de l'interaction de DEPTOR à mTORC1 s'ajouterait au contrôle de son expression par les kinases mTOR et CK1 (Caseine Kinase 1) qui le phosphorylent et induisent sa dégradation par le protéasome (Duan et al. 2011; Gao et al. 2011; Zhao et al. 2011).

Finalement il a été montré que la phosphorylation de Raptor sur les sérines 792 et 722 par l'AMPK en réponse au stress métabolique induit la liaison des protéines 14-3-3 qui séquestrent Raptor et par conséquent inhibent l'activité de mTORC1 (Gwinn et al. 2008). Les sites de Raptor phosphorylés par RSK entourent et/ou sont confondus (pour la sérine 722) avec les sites reconnus par les protéines 14-3-3. Bien que nous ne l'ayons pas testé, il reste possible que RSK lève l'inhibition exercée par l'AMPK sur le complexe mTORC1 en empêchant la liaison des protéines 14-3-3 à Raptor.

### *Raptor, une protéine d'échafaudage cruciale pour l'activité de mTORC1*

Raptor, comme son nom l'indique est la protéine régulatrice du complexe. C'est elle qui intègre les signaux provenant des facteurs de croissance et de la présence des nutriments, qui régule la localisation du complexe et qui interagit avec les substrats de mTORC1 pour permettre leur phosphorylation. Étant donné le rôle central de mTORC1 dans des processus anaboliques essentiels à l'homéostasie cellulaire, il n'est pas surprenant de voir que l'activité Raptor est contrôlée par de nombreux mécanismes. En effet Raptor est la cible de nombreuses kinases et voies de signalisation, notre groupe et d'autres ont montré que les kinases RSK, ERK, AMPK, CDK1 (Cyclin-Dependent Kinase 1) et JNK phosphorylent Raptor et modulent aussi bien positivement que négativement de cette manière l'activité de mTORC1 (Carriere et al. 2008; Gwinn et al. 2008; Gwinn et al. 2010; Carriere et al. 2011; Kwak et al. 2012). D'après le site phosphosite.org, près de 40 résidus de Raptor sont phosphorylés dans diverses



conditions. Ces résidus se concentrent presque intégralement dans la région centrale de Raptor qui est comprise entre les répétitions HEAT et WD40 (Chapitre 2 Figure 3). Selon des données de microscopie électronique du complexe mTOR/Raptor, cette région de Raptor serait impliquée dans son interaction avec mTOR (Yip et al. 2010). Il est fort probable que ces événements de phosphorylation modulent la conformation de Raptor ainsi que son affinité pour mTOR tout en créant des sites d'ancrage pour les partenaires de Raptor. De façon assez surprenante, très peu de données existent concernant cette région de Raptor et son rôle potentiel dans les interactions protéines/protéines et la localisation cellulaire. Les nombreuses modifications post-traductionnelles de ce domaine suggèrent que celui-ci tient une fonction importante dans l'activité de Raptor qui mériterait de s'y attarder plus en détail.

#### *Potentiel thérapeutique des kinases RSK dans le cancer*

Les données que nous avons générées concernant le contrôle de Raptor par RSK combinées aux travaux sur la régulation du complexe TSC1/TSC2 par les kinases ERK et RSK (Roux et al. 2004; Ma et al. 2005) ainsi que sur la régulation de Raptor par ERK (Carriere et al. 2011) montrent que la voie Ras/MAPK régule positivement le complexe mTORC1. Ceci permet d'expliquer comment mTORC1, classiquement décrit au sein de la voie PI3K/Akt, est hyperactivé dans des tumeurs associées avec l'activation de la voie MAPK, comme par exemple dans les mélanomes présentant des mutations de B-Raf. Ainsi l'inhibition des kinases RSK dans ces tumeurs peut être envisagée afin de freiner la synthèse protéique et la prolifération cellulaire. Dans cette optique, notre groupe a montré que le blocage des kinases RSK par interférence à ARN et par l'utilisation d'inhibiteurs pharmacologiques prévient la croissance de tumeurs dérivées de mélanomes dans des modèles de xénogreffe en inhibant l'activité de mTORC1 (Romeo et al. 2013). L'utilisation d'inhibiteurs des kinases RSK pourrait s'appliquer au traitement de tumeurs présentant une hyperactivation de la voie Ras/ERK. De plus combiner l'inhibition de RSK et de PI3K pourrait bloquer plus efficacement l'activité de mTORC1 dans des tumeurs associées à une activation oncogénique de la voie PI3K et offrirait une alternative à l'utilisation des inhibiteurs de MEK et Raf qui ont été utilisés en combinaison avec des inhibiteurs de PI3K (Jin et al. 2011).

Étant donné qu'un grand nombre de cancers présentent une hyperactivation ou une surexpression des RSK, il est important de déterminer précisément les rôles joués par ces kinases dans l'homéostasie. L'identification de nouveaux substrats de RSK est donc nécessaire afin de mieux comprendre comment ces kinases régulent diverses fonctions cellulaires qui peuvent être impliquées dans des pathologies humaines. Dans cette optique, notre équipe a récemment démontré que RSK est impliquée dans des mécanismes de rétrocontrôle négatif de la voie MAPK (Saha et al. 2012; Zhang et al. 2013) ainsi que dans la résistance aux agents de chimiothérapie dans le mélanome (Ray-David et al. 2013). Le criblage phosphoprotéomique des substrats de RSK, réalisé récemment dans le laboratoire, nous a permis d'identifier près de 500 substrats potentiels suggérant l'implication de RSK dans de nombreuses fonctions biologiques encore non adressées. Chose étonnante, LARP1 figure parmi ces substrats potentiels et pourrait représenter un nouveau point de contact entre les RSK et la régulation de la synthèse protéique (données non publiées).

## 2. LARP1, un nouveau point de contact entre mTORC1 et la traduction des ARNm

### *LARP1 régule la traduction des ARNm en aval de mTORC1*

Nos données montrent que la diminution de l'expression de LARP1 par interférence à ARN induit le blocage des cellules en G1 et par conséquent indiquent que LARP1 est nécessaire à la progression du cycle cellulaire (Chapitre 3 Figure 5). Nous pensons que cet effet est dû au rôle de LARP1 dans la traduction des ARNm TOP qui sont requis pour la croissance cellulaire puisqu'ils contribuent à la biogenèse des ribosomes. Néanmoins notre approche ciblée d'identification d'ARNm dont la traduction est dépendante de LARP1 n'exclut pas que d'autres classes d'ARNm soient également contrôlées par LARP1.

Les ARNm TOP ne représentent pas l'unique groupe d'ARNm dont la traduction est dépendante de mTORC1. En effet le profilage de ribosome a permis d'établir qu'un autre groupe d'ARNm codant entre autres pour des protéines impliquées dans des processus d'invasion cellulaire et de dissémination métastatique était également régulé par mTORC1 (Hsieh et al. 2012). Ces ARNm présentent aussi des éléments riches en pyrimidines dans leur 5'UTR appelés PRTE (Pyrimidine-Rich Translational Element), mais à la différence des TOP, ces éléments ne sont pas situés directement après la coiffe (Hsieh et al. 2012). On peut très

bien imaginer que LARP1 intervienne dans leur traduction en aval de mTORC1, d'autant plus qu'il a été montré que la déplétion de LARP1 compromet la migration cellulaire (Burrows et al. 2010). De plus nous avons trouvé que LARP1 interagit avec la sous-unité eIF4A du complexe d'initiation de la traduction (Chapitre 3 Figure S3). Celle-ci est une hélicase de l'ARN qui est particulièrement importante pour la traduction des ARNm ayant des 5'UTR longs et structurés (Marintchev 2013). L'interaction entre LARP1 et eIF4A suggère que ces deux protéines agissent de pair et que LARP1 pourrait aussi être requis pour la traduction des ARNm à longues régions 5'UTR.

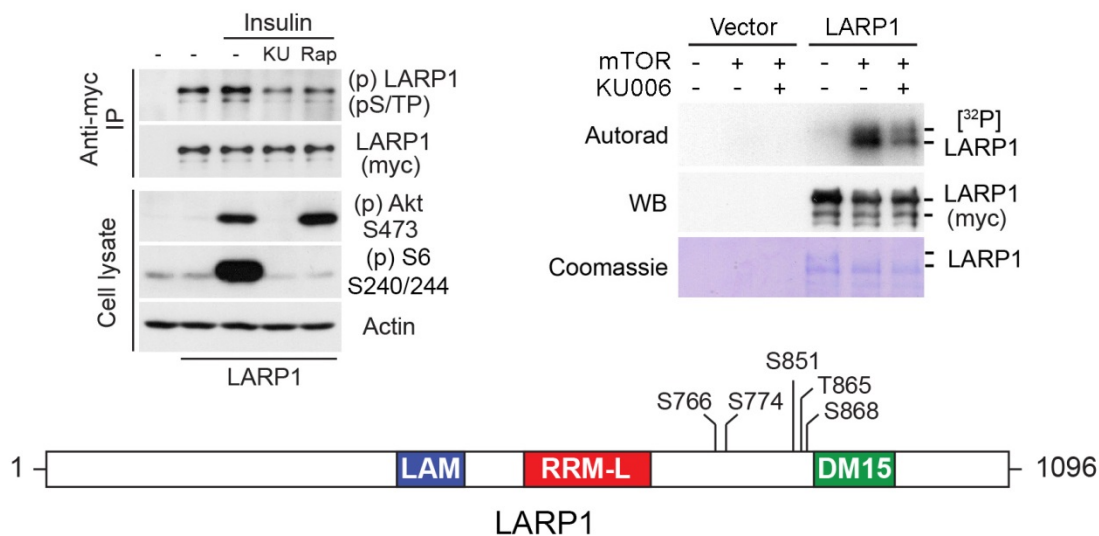
Afin de définir précisément quels sont les ARNm régulés par LARP1 il serait possible d'utiliser des technologies développées ces dernières années à savoir le profilage de ribosome dans des conditions où l'expression de LARP1 serait bloquée et l'identification des ARNm associés spécifiquement à LARP1 à l'échelle du transcriptome grâce au « HITS-CLIP » (High ThroughPut Sequencing-CrossLinking ImmunoPrecipitation). Alors que le profilage de ribosomes permettrait d'identifier quels sont les ARNm dont la traduction est affectée en absence de LARP1, le HITS-CLIP permettrait quant à lui d'identifier les ARNm associés à LARP1 et de définir une séquence d'ARN consensus reconnue par LARP1. Ces données apporteraient des informations précieuses sur la fonction biologique de LARP1 et permettraient de déterminer si LARP1 représente une cible potentielle dans le traitement du cancer.

#### *Mécanismes potentiels d'activation directe de LARP1 par mTORC1*

Il est intéressant de noter que LARP1 est associée et colocalise avec Raptor dans les cellules. Ces données suggèrent plusieurs choses à propos du contrôle de la fonction de LARP1 par mTORC1. Tout d'abord il est possible que l'interaction de LARP1 et Raptor contribue au recrutement de LARP1 au complexe d'initiation lorsque les conditions cellulaires sont favorables à la croissance et à la prolifération. En effet, il a été montré que Raptor et mTOR sont associés à eIF3 en réponse à l'insuline, le modèle proposé étant que cette interaction permet d'amener S6K à proximité de ses substrats impliqués dans la traduction des ARNm, comme c'est le cas avec la phosphorylation d'eIF4B, et de stimuler ainsi la synthèse protéique

(Holz et al. 2005). Un mécanisme similaire de recrutement au complexe d'initiation de la traduction pourrait également s'appliquer pour LARP1.

Un autre mécanisme possible de régulation de LARP1 réside dans sa phosphorylation directe par mTORC1. En effet des études récentes de phosphoprotéomique à grande échelle cherchant à identifier le répertoire de protéines phosphorylées en réponse à l'activation de mTORC1 ont montré que LARP1 pourrait être un de ses substrats (Hsu et al. 2011; Yu et al. 2011). En accord avec ces données, nous avons montré que LARP1 interagit avec Raptor (Chapitre 3 Figure 5) et que mTORC1 est capable de phosphoryler LARP1 *in vitro* ainsi que potentiellement *in vivo* (Chapitre 5 Figure 1). On peut donc imaginer que LARP1 en interagissant avec Raptor soit recrutée au complexe mTORC1 puis phosphorylée par celui-ci. Par ailleurs, LARP1 et Raptor colocalisent (Chapitre 3 Figure 5) ce qui suggère que LARP1 puisse être phosphorylée au niveau des membranes des lysosomes lorsque le complexe est activé.



**Figure 1: mTOR phosphoryle LARP1 *in vitro* et *in vivo***

Une forme active de mTOR induit la phosphorylation de LARP1 immunopurifiée à partir de cellules HEK293. Cette phosphorylation est bloquée par l'utilisation du KU-0063794, un inhibiteur catalytique de mTOR (panel de gauche). LARP1 est phosphorylée sur des ser/thr suivies de proline qui correspondent en partie aux sites ciblés par mTOR. L'inhibition de mTOR par le Ku-0063794 et la rapamycine, bloque également la phosphorylation de LARP1

*in vivo* (panel de droite). La représentation graphique de LARP1 (en bas) montre la localisation des sites potentiels phosphorylés par mTOR. Ces sites se concentrent à proximité du domaine DM15 de LARP1. LAM (LA-Motif), RRM-L (RNA-Recognition Motif-Like), DM15 (répétition en tandem).

D'après les données de criblages de phosphoprotéomique de mTORC1 (Hsu et al. 2011; Yu et al. 2011), plusieurs résidus de LARP1 pourraient être ciblés par mTOR. Ces sites, (Chapitre 5 Figure 1) se concentrent à proximité de la région DM15 dont le rôle n'est pas bien caractérisé mais pourrait intervenir dans la liaison de LARP1 aux ARNm (Nykamp et al. 2008). En fait nous avons trouvé que l'inhibition de mTORC1 conduit à la dissociation des ARNm TOP de LARP1. Il est possible que cet effet reflète le relargage de LARP1 des polysomes et leur désassemblage ou qu'il soit effectivement dû à un changement d'affinité des ARNm TOP pour LARP1. La phosphorylation de LARP1 par mTORC1 à proximité du domaine DM15 pourrait favoriser la liaison des ARNm à LARP1. Si tel est le cas, mTORC1 stimulerait la traduction des ARNm TOP en augmentant leur association à LARP1 et le recrutement de celle-ci à la machinerie traductionnelle.

#### *Mécanismes potentiels du contrôle de la traduction par LARP1*

LARP1 est associée aussi bien avec le complexe d'initiation de la traduction à la coiffe des ARNm qu'avec les polysomes laissant présager un rôle à différents niveaux de LARP1 dans la traduction. La protéine PABP, qui est associée au complexe d'initiation grâce à son interaction avec eIF4G, montre un profil de sédimentation similaire à celui de LARP1. Nous pensons que PABP est l'intermédiaire qui permet le recrutement de LARP1 à la machinerie traductionnelle. En effet la délétion de la partie C-terminale de LARP1 empêche son interaction avec PABP et corrèle avec une perte d'association de LARP1 au complexe d'initiation et aux polysomes sans affecter pour autant la sédimentation de PABP aux polysomes (Chapitre 3 Figure 4). Afin de confirmer que PABP recrute LARP1 au complexe d'initiation et aux polysomes, il serait important de définir plus précisément le domaine ou motif de LARP1 qui est reconnu par PABP. Celle-ci interagit avec ses partenaires grâce à la reconnaissance d'un motif PAM (PABP-interacting Motif) présent dans la séquence de ses interacteurs (Albrecht and Lengauer 2004). L'existence de motif PAM2 a été démontrée pour LARP4 et LARP6 (Yang et al. 2011;

Merret et al. 2013b) et il est fort probable que LARP1 présente également un tel motif. Si cela s'avère vrai, nous pourrions déterminer plus précisément l'impact de l'interaction de PABP sur le recrutement de LARP1 à la machinerie traductionnelle. En effet il est possible que la fonction de la région C-terminale de LARP1 ne se limite pas à la liaison de PABP mais intervienne dans des interactions avec d'autres protéines comme eIF4A ou Raptor. Il est donc important de déterminer quel(s) domaine(s) de LARP1 participe(nt) à la liaison de ses différents partenaires pour mieux comprendre, d'un point de vue mécanistique, comment agit LARP1. De la même manière, déterminer parmi les domaines LAM, RRM et DM15 le(s)quel(s) est/sont requis pour la liaison des ARNm à LARP1, en particulier les ARNm TOP, reste un point important à adresser.

En plus d'interagir avec PABP, LARP1 lie sélectivement les ARNm TOP (chapitre 3 figure 6). Bien que nous ne l'ayons pas testé, la possibilité que LARP1 reconnaisse directement le motif TOP permettrait d'expliquer l'enrichissement sélectif des ARNm TOP dans les immunoprécipitations de LARP1. Une façon de vérifier que le motif TOP est reconnu par LARP1 serait de réaliser une expérience de retardement sur gel (EMSA : Electromobility Shift Assay) avec des fragments d'ARN contenant ou non la séquence TOP. Utilisée avec des mutants de délétion de LARP1, cette technique permettrait également de déterminer quel domaine de LARP1 contribue à cette association. Dans l'éventualité où l'interaction de LARP1 avec la séquence TOP serait confirmée, LARP1 serait connectée à la fois à la queue poly(A) (via PABP) et à la région directement en aval de la coiffe des ARNm (via le motif TOP). On peut alors imaginer un modèle dans lequel LARP1 stimulerait la traduction des ARNm TOP en facilitant ou stabilisant la conformation en boucle fermée et en favorisant le recrutement de la sous-unité 40S du ribosome grâce à son interaction avec eIF4A.

#### *Une fonction potentielle de LARP1 dans la stabilité des ARNm?*

Plusieurs évidences pointent vers un rôle de LARP1 dans la régulation de la stabilité des ARNm. Tout d'abord LARP1 a été impliquée dans la dégradation des ARNm codant pour les MAPK chez *C.elegans* (Nykamp et al. 2008). Les auteurs ont montré que la diminution de l'expression de LARP1 conduit à l'augmentation des niveaux d'ARNm des MAPK. Le mécanisme détaillé permettant d'expliquer cet effet n'est pas connu mais semblerait faire

intervenir la localisation de LARP1 aux P-bodies qui concentrent les acteurs de la dégradation des ARNm (Chapitre 1 Section 1.2.2.1). Des travaux récents ont montré quant à eux que LARP1 interagit avec l'exonucléase 5'→3' XRN4 en réponse au choc thermique chez *A. thaliana* (Merret et al. 2013a). Cette interaction permet le recrutement de XRN4 aux polysomes et participe à la dégradation massive d'ARNm qui est induite par le stress. Finalement la diminution de l'expression de LARP1 a été associée à une réduction des niveaux des ARNm TOP (Aoki et al. 2013). Les auteurs suggèrent que LARP1 stabilise les ARNm TOP en les protégeant des exonucléases en 3'. Lors de nos essais utilisant l'interférence à ARN pour réprimer l'expression de LARP1, nous n'avons pas remarqué de différence dans l'abondance des ARNm TOP que nous avons testés. Néanmoins nous n'avons pas utilisé d'inhibiteur de transcription pour adresser d'éventuels effets de LARP1 sur la stabilité des ARNm. Par ailleurs notre modèle proposant un rôle de LARP1 comme facteur de traduction spécifique des ARNm TOP n'est pas incompatible avec un rôle supplémentaire de LARP1 comme protection contre la dégradation.

Ces données montrent un rôle de LARP1 aussi bien positif que négatif dans la régulation de la stabilité des ARNm. Les techniques ainsi que les organismes modèles utilisés dans ces travaux expliquent probablement comment LARP1 peut agir à la fois comme facteur de stabilisation et comme cofacteur des enzymes de la dégradation des ARNm. Il est fort possible que LARP1 puisse remplir différentes fonctions selon le contexte cellulaire, à savoir promouvoir la traduction et stabiliser les ARNm dans des conditions favorables à la croissance, et induire la dégradation des ARNm en réponse au stress.

### 3. Contrôle du métabolisme des ARNm cytoplasmiques par 4E-T

#### *4E-T est un répresseur de la traduction des ARNm*

L'activité du facteur d'initiation de la traduction eIF4E qui lie la coiffe des ARNm est régulée par des interactions avec ses divers partenaires dont fait partie 4E-T. Celle-ci interagit avec eIF4E grâce au motif Tyr-X-X-X-X-Leu-Φ (où X représente n'importe quel acide aminé et Φ un acide aminé hydrophobe) qui est également présent dans les autres interacteurs d'eIF4E, les 4E-BP et eIF4G (Dostie et al. 2000). Les orthologues de 4E-T chez *D. melanogaster* (Cup) et *X. laevis* ont été impliqués dans la répression de la traduction respectivement de l'ARNm

oskar et des ARNm maternels de l'oocyte (Wilhelm et al. 2003; Minshall et al. 2007). Il a été suggéré que 4E-T agirait comme répresseur de la traduction en liant eIF4E et prévenant la liaison d'eIF4G qui est nécessaire au recrutement du ribosome lors de l'initiation de la traduction (Ferraiuolo et al. 2005). Le modèle actuel propose que 4E-T et ses orthologues interagissent à la fois avec eIF4E et avec des facteurs reconnaissant des éléments spécifiques de la région 3'UTR comme CPEB (Cytoplasmic Poly(A) Element Binding) et Bruno et empêchent ainsi l'activation de l'ARNm nécessaire à l'initiation de la traduction (Jackson et al. 2010). Nos travaux s'alignent avec ce rôle de 4E-T dans la répression des ARNm puisque les ARNm localisés aux P-bodies ne sont pas engagés dans la traduction. Il est possible que 4E-T intervienne à différents niveaux dans la répression des ARNm, par exemple en prévenant l'assemblage du complexe d'initiation eIF4F en amont et plus en aval en envoyant les ARNm vers les P-bodies pour contrôler leur devenir dans la cellule.

Un autre mécanisme liant 4E-T à la répression de la traduction réside dans son interaction avec la protéine 4E-HP (eIF4E2 ou eIF4E-Homologous Protein). Nous avons initialement identifié l'interaction de 4E-HP avec 4E-T dans d'un criblage double hybride chez la levure réalisé par la compagnie hybrigenics. Cette interaction a été ré-observée par la suite lors de purification en tandem de 4E-T couplée à de la spectrométrie de masse (données non publiées) et deux articles récents ont décrit l'association de 4E-T et 4E-HP (Morita et al. 2012; Kubacka et al. 2013). Celle-ci lie la coiffe des ARNm mais n'interagit pas avec eIF4G, ce qui suggère que les ARNm qui lui sont associés ne sont pas engagés dans la traduction (Joshi et al. 2004). Chez la drosophile, d4E-HP est associée à la protéine de liaison à l'ARN Bicoid et réprime la traduction de l'ARNm *caudal* qui est important lors du développement embryonnaire (Cho et al. 2005). Le fait que 4E-T interagisse avec 4E-HP suggère que 4E-T peut réprimer la traduction par un autre mécanisme que la séquestration d'eIF4E et de cette manière peut possiblement affecter la traduction de différentes classes d'ARNm ou intervenir dans différents contextes comme en réponse à divers stress.

Il a été suggéré que 4E-T contribuerait à la dégradation des ARNm. Tout d'abord il a été montré que la diminution de l'expression de 4E-T mène à la stabilisation des ARNm possédant un élément ARE dans leur 3'UTR suggérant que 4E-T intervient dans l'AMD (Chapitre 1 Section 1.2.2.3) (Ferraiuolo et al. 2005). Ensuite 4E-T localise aux P-bodies qui



sont des sites qui concentrent les facteurs de la dégradation des ARNm et où s'accumulent des intermédiaires de la dégradation (Chapite 1 Section 1.2.3.1). Cependant une étude récente a montré par un essai d'ancrage de l'ARN (mRNA tethering assay) que 4E-T ne modifie pas la stabilité des ARNm qui lui sont associés (Kamenska et al. 2013). Néanmoins ces données concernant le rôle potentiel de 4E-T dans la dégradation des ARNm ne sont pas nécessairement incompatibles. Alors que la fonction initiale de 4E-T serait de réprimer la traduction des ARNm, il reste possible que cette répression s'accompagne de la dégradation pour certains de ces ARNm.

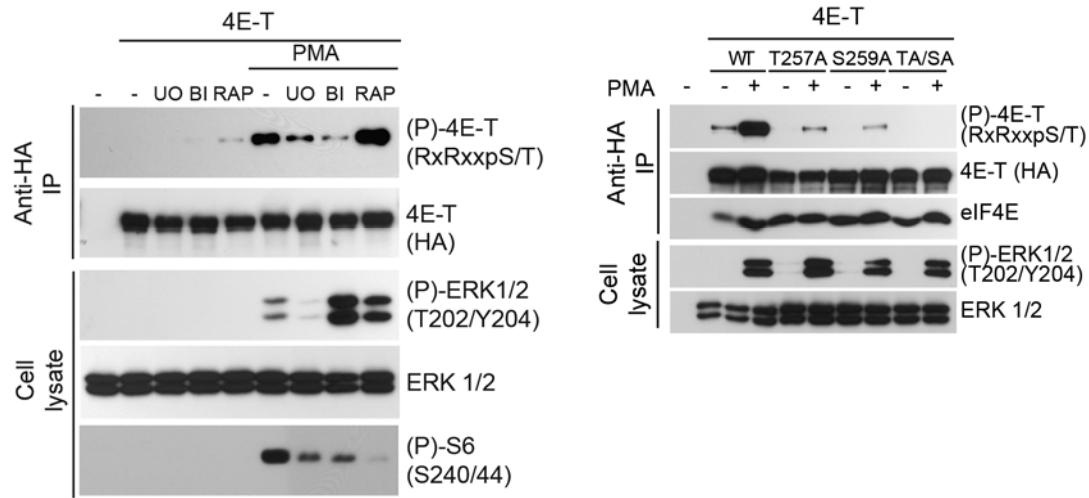
Finalement bien qu'il n'y ait pas de domaine spécifique à la liaison des ARNm dans la séquence de 4E-T il n'est pas impossible qu'en plus d'agir en tant que protéine d'échafaudage dans la formation des P-bodies, 4E-T reconnaisse directement des ARNm. En fait deux études de protéomique cherchant à identifier à large échelle le répertoire des RBP ont montré que 4E-T pourrait faire partie de cette classe de protéines (Baltz et al. 2012; Castello et al. 2012). Il serait important de confirmer ces données, et, si tel est le cas, de caractériser les ARNm qui sont associés à 4E-T. Nous pourrions ainsi adresser l'impact de 4E-T dans le métabolisme des ARNm et tester l'effet de l'accumulation de 4E-T dans les P-bodies et de sa phosphorylation sur sa capacité à lier et à moduler la traduction et possiblement la stabilité de ces ARNm.

#### *L'activité de 4E-T est modulée par les voies de signalisation JNK et Ras/MAPK*

Nous avons montré que la voie JNK est responsable de la phosphorylation de 4E-T en réponse au stress oxydant et que ces événements de phosphorylation induisent le confinement de 4E-T aux P-bodies (Chapitre 4). Nous pensons que la phosphorylation de 4E-T par JNK dans sa région centrale crée des sites d'ancrages pour d'autres facteurs des P-bodies et contribue ainsi à leur assemblage en réponse au stress. En effet nous avons des données qui montrent que 4E-T est au cœur d'un vaste réseau protéique relié au métabolisme des ARNm. En collaboration avec l'équipe du Dr Affar nous avons identifié plus de 200 protéines associées à 4E-T par purification en tandem couplée à de la spectrométrie de masse (données non publiées). Parmi ces protéines figurent de nombreux facteurs connus pour localiser aux P-bodies tels que eIF4E, DDX6, CNOT1 et LARP1, et pour participer à la répression des ARNm comme LSM14 et eIF4E2 (également appelé 4E-HP). La présence d'ARNm dans les échantillons

explique probablement le grand nombre de protéines identifiées par cette méthode, il serait donc intéressant de répéter cette expérience avec des traitements aux RNases pour identifier les protéines qui sont associées avec 4E-T grâce à des interactions protéines/protéines et celles qui sont recrutées par leur liaison aux ARNm. Ceci permettrait de déterminer l'interactome de 4E-T et de tester l'impact de la phosphorylation de 4E-T par JNK sur sa capacité à interagir avec ses partenaires.

Finalement, lors de précédents travaux, nous avons mis en évidence que 4E-T est un substrat de la voie Ras/MAPK et nous avons montré que la kinase RSK phosphoryle potentiellement 4E-T sur la thréonine 257 et la sérine 259 (Chapitre 5 Figure 2). L'impact de ces évènements de phosphorylation n'est pas connu néanmoins d'après le site [scansite3.mit.edu](http://scansite3.mit.edu), la phosphorylation de la thréonine 257 pourrait être reconnue par les protéines 14-3-3. Celles-ci modulent l'activité des protéines auxquelles elles sont associées et ont déjà été impliquées dans le contrôle de l'assemblage des P-bodies en réponse à l'insuline (Larance et al. 2010). En effet RSK phosphoryle ses substrats dans un consensus qui est en partie similaire à la séquence reconnue par les protéines 14-3-3. On peut imaginer que la phosphorylation de 4E-T par RSK induise le recrutement des protéines 14-3-3 et affecte la localisation et/ou l'activité de répression traductionnelle de 4E-T. Cet effet représenterait un mécanisme supplémentaire de contrôle de la traduction des ARNm par les kinases RSK.



**Figure 2: RSK phosphoryle 4E-T sur la thréonine 257 et la sérine 259**

*La stimulation de la voie Ras/MAPK (illustrée par la phosphorylation de ERK1/2) par le PMA induit la phosphorylation de 4E-T sur les sites basophiliques ciblés par RSK. L'inhibition respective des kinases MEK et RSK avec le UO126 et le BID-1870 prévient la phosphorylation de 4E-T tandis que l'inhibition de mTORC1 avec la rapamycine n'a pas d'effet (panel de gauche). La mutation de la thréonine 257 et de la sérine 259 montre que ces résidus sont les sites basophiliques majeurs ciblés par RSK in vivo (panel de droite).*

## Chapitre 6: Conclusion

Le contrôle de la traduction des ARNm tient un rôle primordial dans la régulation de l'expression génique et est critique pour la croissance et la prolifération cellulaire. Les voies de signalisation PI3K/mTOR et MAPK sont particulièrement impliquées dans ce contrôle, elles régulent l'expression spécifique d'ARNm codant pour des protéines participant à la tumorigenèse en modulant l'activité du complexe eIF4F et sont ainsi étroitement associées au cancer. Dans un tel contexte, une meilleure compréhension du rôle respectif de ces voies dans la régulation de la traduction revêt une importance clinique majeure dans le traitement du cancer ainsi que dans le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques.

Nos travaux se sont inscrits dans cet objectif et grâce à l'utilisation de la spectrométrie de masse quantitative nous avons établi de nouveaux mécanismes moléculaires importants dans la régulation du métabolisme des ARNm cytoplasmiques. Tout d'abord nous avons montré pour la première fois que la voie Ras/MAPK, *via* les kinases RSK, stimule directement l'activité de mTORC1 en phosphorylant la protéine Raptor. Ces données placent Raptor en senseur des signaux de croissance et démontrent que la voie Ras/MAPK peut activer mTORC1 indépendamment de PI3K/Akt. Par la suite, nous nous sommes intéressés au rôle de mTORC1 dans l'initiation de la traduction et avons réalisé un criblage protéomique dans le but d'identifier de nouveaux facteurs dont le recrutement à la machinerie traductionnelle est dépendant de mTORC1. Ces travaux ont mené à la première identification systématique des partenaires du complexe d'initiation de la traduction régulés par la voie mTOR et ont défini LARP1 comme effecteur majeur de la traduction et de la croissance cellulaire en aval de mTORC1. Finalement, notre étude de l'effet du stress oxydant dans la répression de la traduction nous a permis de montrer que la kinase JNK contrôle la localisation du répresseur 4E-T au sein des P-bodies et décrit un nouveau mécanisme par lequel la voie JNK régule le métabolisme des ARNm.

Ainsi, l'ensemble des travaux présentés dans cette thèse souligne l'importance du contrôle de la traduction des ARNm dans la croissance cellulaire et l'oncogenèse, et apporte des informations essentielles pour le développement de nouvelles thérapies anti-cancéreuses.

## Bibliographie

- Ahearn IM, Haigis K, Bar-Sagi D, Philips MR. 2012. Regulating the regulator: post-translational modification of RAS. *Nature reviews Molecular cell biology* **13**: 39-51.
- Aitken CE, Lorsch JR. 2012. A mechanistic overview of translation initiation in eukaryotes. *Nature structural & molecular biology* **19**: 568-576.
- Albrecht M, Lengauer T. 2004. Survey on the PABC recognition motif PAM2. *Biochemical and biophysical research communications* **316**: 129-138.
- Alessi DR, Saito Y, Campbell DG, Cohen P, Sithanandam G, Rapp U, Ashworth A, Marshall CJ, Cowley S. 1994. Identification of the sites in MAP kinase kinase-1 phosphorylated by p74raf-1. *The EMBO journal* **13**: 1610-1619.
- Alkalaeva EZ, Pisarev AV, Frolova LY, Kisselev LL, Pestova TV. 2006. In vitro reconstitution of eukaryotic translation reveals cooperativity between release factors eRF1 and eRF3. *Cell* **125**: 1125-1136.
- Anderson P, Kedersha N. 2009. Stress granules. *Current biology : CB* **19**: R397-398.
- Andrei MA, Ingelfinger D, Heintzmann R, Achsel T, Rivera-Pomar R, Luhrmann R. 2005. A role for eIF4E and eIF4E-transporter in targeting mRNPs to mammalian processing bodies. *Rna* **11**: 717-727.
- Angenstein F, Greenough WT, Weiler IJ. 1998. Metabotropic glutamate receptor-initiated translocation of protein kinase p90rsk to polyribosomes: a possible factor regulating synaptic protein synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**: 15078-15083.
- Aoki K, Adachi S, Homoto M, Kusano H, Koike K, Natsume T. 2013. LARP1 specifically recognizes the 3' terminus of poly(A) mRNA. *FEBS letters* **587**: 2173-2178.
- Avni D, Biberman Y, Meyuhas O. 1997. The 5' terminal oligopyrimidine tract confers translational control on TOP mRNAs in a cell type- and sequence context-dependent manner. *Nucleic acids research* **25**: 995-1001.
- Baltz AG, Munschauer M, Schwanhausser B, Vasile A, Murakawa Y, Schueler M, Youngs N, Penfold-Brown D, Drew K, Milek M et al. 2012. The mRNA-bound proteome and its global occupancy profile on protein-coding transcripts. *Molecular cell* **46**: 674-690.

- Bandi HR, Ferrari S, Krieg J, Meyer HE, Thomas G. 1993. Identification of 40 S ribosomal protein S6 phosphorylation sites in Swiss mouse 3T3 fibroblasts stimulated with serum. *The Journal of biological chemistry* **268**: 4530-4533.
- Banerjee P, Ahmad MF, Grove JR, Kozlosky C, Price DJ, Avruch J. 1990. Molecular structure of a major insulin/mitogen-activated 70-kDa S6 protein kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **87**: 8550-8554.
- Bar-Peled L, Chantranupong L, Cherniack AD, Chen WW, Ottina KA, Grabiner BC, Spear ED, Carter SL, Meyerson M, Sabatini DM. 2013. A Tumor suppressor complex with GAP activity for the Rag GTPases that signal amino acid sufficiency to mTORC1. *Science* **340**: 1100-1106.
- Bar-Peled L, Schweitzer LD, Zoncu R, Sabatini DM. 2012. Ragulator is a GEF for the rag GTPases that signal amino acid levels to mTORC1. *Cell* **150**: 1196-1208.
- Barthelme D, Dinkelaker S, Albers SV, Londei P, Ermler U, Tampe R. 2011. Ribosome recycling depends on a mechanistic link between the FeS cluster domain and a conformational switch of the twin-ATPase ABCE1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108**: 3228-3233.
- Benjamin D, Colombi M, Moroni C, Hall MN. 2011. Rapamycin passes the torch: a new generation of mTOR inhibitors. *Nature reviews Drug discovery* **10**: 868-880.
- Bhattacharyya SN, Habermacher R, Martine U, Closs EI, Filipowicz W. 2006. Relief of microRNA-mediated translational repression in human cells subjected to stress. *Cell* **125**: 1111-1124.
- Bienroth S, Wahle E, Suter-Crazzolara C, Keller W. 1991. Purification of the cleavage and polyadenylation factor involved in the 3'-processing of messenger RNA precursors. *The Journal of biological chemistry* **266**: 19768-19776.
- Bissler JJ, McCormack FX, Young LR, Elwing JM, Chuck G, Leonard JM, Schmithorst VJ, Laor T, Brody AS, Bean J et al. 2008. Sirolimus for angiomyolipoma in tuberous sclerosis complex or lymphangiomyomatosis. *The New England journal of medicine* **358**: 140-151.
- Bogoyevitch MA, Ngoei KR, Zhao TT, Yeap YY, Ng DC. 2010. c-Jun N-terminal kinase (JNK) signaling: recent advances and challenges. *Biochimica et biophysica acta* **1804**: 463-475.

- Bouveret E, Rigaut G, Shevchenko A, Wilm M, Seraphin B. 2000. A Sm-like protein complex that participates in mRNA degradation. *The EMBO journal* **19**: 1661-1671.
- Bregues M, Teixeira D, Parker R. 2005. Movement of eukaryotic mRNAs between polysomes and cytoplasmic processing bodies. *Science* **310**: 486-489.
- Brown EJ, Albers MW, Shin TB, Ichikawa K, Keith CT, Lane WS, Schreiber SL. 1994. A mammalian protein targeted by G1-arresting rapamycin-receptor complex. *Nature* **369**: 756-758.
- Brugarolas J, Lei K, Hurley RL, Manning BD, Reiling JH, Hafen E, Witters LA, Ellisen LW, Kaelin WG, Jr. 2004. Regulation of mTOR function in response to hypoxia by REDD1 and the TSC1/TSC2 tumor suppressor complex. *Genes & development* **18**: 2893-2904.
- Buchan JR, Parker R. 2009. Eukaryotic stress granules: the ins and outs of translation. *Molecular cell* **36**: 932-941.
- Burrows C, Abd Latip N, Lam SJ, Carpenter L, Sawicka K, Tzolovsky G, Gabra H, Bushell M, Glover DM, Willis AE et al. 2010. The RNA binding protein Larpl regulates cell division, apoptosis and cell migration. *Nucleic acids research* **38**: 5542-5553.
- Cantwell-Dorris ER, O'Leary JJ, Sheils OM. 2011. BRAFV600E: implications for carcinogenesis and molecular therapy. *Molecular cancer therapeutics* **10**: 385-394.
- Cardinali B, Carissimi C, Gravina P, Pierandrei-Amaldi P. 2003. La protein is associated with terminal oligopyrimidine mRNAs in actively translating polysomes. *The Journal of biological chemistry* **278**: 35145-35151.
- Cargnello M, Roux PP. 2011. Activation and function of the MAPKs and their substrates, the MAPK-activated protein kinases. *Microbiology and molecular biology reviews* : *MMBR* **75**: 50-83.
- Cargnello M, Tcherkezian J, Dorn JF, Huttlin EL, Maddox PS, Gygi SP, Roux PP. 2012. Phosphorylation of the eukaryotic translation initiation factor 4E-transporter (4E-T) by c-Jun N-terminal kinase promotes stress-dependent P-body assembly. *Molecular and cellular biology* **32**: 4572-4584.
- Carriere A, Cargnello M, Julien LA, Gao H, Bonneil E, Thibault P, Roux PP. 2008. Oncogenic MAPK signaling stimulates mTORC1 activity by promoting RSK-mediated raptor phosphorylation. *Current biology* : *CB* **18**: 1269-1277.

- Carriere A, Romeo Y, Acosta-Jaquez HA, Moreau J, Bonneil E, Thibault P, Fingar DC, Roux PP. 2011. ERK1/2 phosphorylate Raptor to promote Ras-dependent activation of mTOR complex 1 (mTORC1). *The Journal of biological chemistry* **286**: 567-577.
- Castello A, Fischer B, Eichelbaum K, Horos R, Beckmann BM, Strein C, Davey NE, Humphreys DT, Preiss T, Steinmetz LM et al. 2012. Insights into RNA biology from an atlas of mammalian mRNA-binding proteins. *Cell* **149**: 1393-1406.
- Chen CY, Del Gatto-Konczak F, Wu Z, Karin M. 1998. Stabilization of interleukin-2 mRNA by the c-Jun NH2-terminal kinase pathway. *Science* **280**: 1945-1949.
- Chen CY, Gherzi R, Andersen JS, Gaietta G, Jurchott K, Royer HD, Mann M, Karin M. 2000. Nucleolin and YB-1 are required for JNK-mediated interleukin-2 mRNA stabilization during T-cell activation. *Genes & development* **14**: 1236-1248.
- Chen CY, Shyu AB. 2011. Mechanisms of deadenylation-dependent decay. *Wiley interdisciplinary reviews RNA* **2**: 167-183.
- Chen J, Zheng XF, Brown EJ, Schreiber SL. 1995. Identification of an 11-kDa FKBP12-rapamycin-binding domain within the 289-kDa FKBP12-rapamycin-associated protein and characterization of a critical serine residue. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **92**: 4947-4951.
- Cho PF, Poulin F, Cho-Park YA, Cho-Park IB, Chicoine JD, Lasko P, Sonenberg N. 2005. A new paradigm for translational control: inhibition via 5'-3' mRNA tethering by Bicoid and the eIF4E cognate 4EHP. *Cell* **121**: 411-423.
- Choo AY, Yoon SO, Kim SG, Roux PP, Blenis J. 2008. Rapamycin differentially inhibits S6Ks and 4E-BP1 to mediate cell-type-specific repression of mRNA translation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**: 17414-17419.
- Chu CY, Rana TM. 2006. Translation repression in human cells by microRNA-induced gene silencing requires RCK/p54. *PLoS biology* **4**: e210.
- Cohen P, Frame S. 2001. The renaissance of GSK3. *Nature reviews Molecular cell biology* **2**: 769-776.
- Cougot N, Babajko S, Seraphin B. 2004. Cytoplasmic foci are sites of mRNA decay in human cells. *The Journal of cell biology* **165**: 31-40.



- Crosio C, Boyl PP, Loreni F, Pierandrei-Amaldi P, Amaldi F. 2000. La protein has a positive effect on the translation of TOP mRNAs in vivo. *Nucleic acids research* **28**: 2927-2934.
- Cutler RE, Jr., Stephens RM, Saracino MR, Morrison DK. 1998. Autoregulation of the Raf-1 serine/threonine kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**: 9214-9219.
- Dalton LE, Healey E, Irving J, Marciniak SJ. 2012. Phosphoproteins in stress-induced disease. *Progress in molecular biology and translational science* **106**: 189-221.
- Damgaard CK, Lykke-Andersen J. 2011. Translational coregulation of 5'TOP mRNAs by TIA-1 and TIAR. *Genes & development* **25**: 2057-2068.
- Danckwardt S, Hentze MW, Kulozik AE. 2008. 3' end mRNA processing: molecular mechanisms and implications for health and disease. *The EMBO journal* **27**: 482-498.
- Davis RJ. 2000. Signal transduction by the JNK group of MAP kinases. *Cell* **103**: 239-252.
- De Benedetti A, Graff JR. 2004. eIF-4E expression and its role in malignancies and metastases. *Oncogene* **23**: 3189-3199.
- Decker CJ, Parker R. 2012. P-bodies and stress granules: possible roles in the control of translation and mRNA degradation. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* **4**: a012286.
- Decker CJ, Teixeira D, Parker R. 2007. Edc3p and a glutamine/asparagine-rich domain of Lsm4p function in processing body assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of cell biology* **179**: 437-449.
- Demetriades C, Doumpas N, Telean AA. 2014. Regulation of TORC1 in Response to Amino Acid Starvation via Lysosomal Recruitment of TSC2. *Cell* **156**: 786-799.
- Derijard B, Hibi M, Wu IH, Barrett T, Su B, Deng T, Karin M, Davis RJ. 1994. JNK1: a protein kinase stimulated by UV light and Ha-Ras that binds and phosphorylates the c-Jun activation domain. *Cell* **76**: 1025-1037.
- Dever TE, Green R. 2012. The elongation, termination, and recycling phases of translation in eukaryotes. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* **4**: a013706.
- DeYoung MP, Horak P, Sofer A, Sgroi D, Ellisen LW. 2008. Hypoxia regulates TSC1/2-mTOR signaling and tumor suppression through REDD1-mediated 14-3-3 shuttling. *Genes & development* **22**: 239-251.

- Di Leva G, Garofalo M, Croce CM. 2013. MicroRNAs in Cancer. *Annual review of pathology*.
- Dickson B, Sprenger F, Morrison D, Hafen E. 1992. Raf functions downstream of Ras1 in the Sevenless signal transduction pathway. *Nature* **360**: 600-603.
- Dorrello NV, Peschiaroli A, Guardavaccaro D, Colburn NH, Sherman NE, Pagano M. 2006. S6K1- and betaTRCP-mediated degradation of PDCD4 promotes protein translation and cell growth. *Science* **314**: 467-471.
- Dostie J, Ferraiuolo M, Pause A, Adam SA, Sonenberg N. 2000. A novel shuttling protein, 4E-T, mediates the nuclear import of the mRNA 5' cap-binding protein, eIF4E. *The EMBO journal* **19**: 3142-3156.
- Dowling RJ, Topisirovic I, Alain T, Bidinosti M, Fonseca BD, Petroulakis E, Wang X, Larsson O, Selvaraj A, Liu Y et al. 2010. mTORC1-mediated cell proliferation, but not cell growth, controlled by the 4E-BPs. *Science* **328**: 1172-1176.
- Duan S, Skaar JR, Kuchay S, Toschi A, Kanarek N, Ben-Neriah Y, Pagano M. 2011. mTOR generates an auto-amplification loop by triggering the betaTrCP- and CK1alpha-dependent degradation of DEPTOR. *Molecular cell* **44**: 317-324.
- Duran A, Amanchy R, Linares JF, Joshi J, Abu-Baker S, Porollo A, Hansen M, Moscat J, Diaz-Meco MT. 2011. p62 is a key regulator of nutrient sensing in the mTORC1 pathway. *Molecular cell* **44**: 134-146.
- Durand S, Lykke-Andersen J. 2013. Nonsense-mediated mRNA decay occurs during eIF4F-dependent translation in human cells. *Nature structural & molecular biology* **20**: 702-709.
- Elkon R, Ugalde AP, Agami R. 2013. Alternative cleavage and polyadenylation: extent, regulation and function. *Nature reviews Genetics* **14**: 496-506.
- Erikson E, Maller JL. 1985. A protein kinase from *Xenopus* eggs specific for ribosomal protein S6. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **82**: 742-746.
- . 1986. Purification and characterization of a protein kinase from *Xenopus* eggs highly specific for ribosomal protein S6. *The Journal of biological chemistry* **261**: 350-355.
- Eulalio A, Behm-Ansmant I, Izaurralde E. 2007a. P bodies: at the crossroads of post-transcriptional pathways. *Nature reviews Molecular cell biology* **8**: 9-22.

- Eulalio A, Behm-Ansmant I, Schweizer D, Izaurralde E. 2007b. P-body formation is a consequence, not the cause, of RNA-mediated gene silencing. *Molecular and cellular biology* **27**: 3970-3981.
- Fabian MR, Cieplak MK, Frank F, Morita M, Green J, Srikumar T, Nagar B, Yamamoto T, Raught B, Duchaine TF et al. 2011. miRNA-mediated deadenylation is orchestrated by GW182 through two conserved motifs that interact with CCR4-NOT. *Nature structural & molecular biology* **18**: 1211-1217.
- Fabian MR, Sonenberg N. 2012. The mechanics of miRNA-mediated gene silencing: a look under the hood of miRISC. *Nature structural & molecular biology* **19**: 586-593.
- Falcon BL, Barr S, Gokhale PC, Chou J, Fogarty J, Depeille P, Miglarese M, Epstein DM, McDonald DM. 2011. Reduced VEGF production, angiogenesis, and vascular regrowth contribute to the antitumor properties of dual mTORC1/mTORC2 inhibitors. *Cancer research* **71**: 1573-1583.
- Fernandez J, Yaman I, Mishra R, Merrick WC, Snider MD, Lamers WH, Hatzoglou M. 2001. Internal ribosome entry site-mediated translation of a mammalian mRNA is regulated by amino acid availability. *The Journal of biological chemistry* **276**: 12285-12291.
- Ferraiuolo MA, Basak S, Dostie J, Murray EL, Schoenberg DR, Sonenberg N. 2005. A role for the eIF4E-binding protein 4E-T in P-body formation and mRNA decay. *The Journal of cell biology* **170**: 913-924.
- Ferron F, Decroly E, Selisko B, Canard B. 2012. The viral RNA capping machinery as a target for antiviral drugs. *Antiviral research* **96**: 21-31.
- Fisher TL, Blenis J. 1996. Evidence for two catalytically active kinase domains in pp90rsk. *Molecular and cellular biology* **16**: 1212-1219.
- Fleming Y, Armstrong CG, Morrice N, Paterson A, Goedert M, Cohen P. 2000. Synergistic activation of stress-activated protein kinase 1/c-Jun N-terminal kinase (SAPK1/JNK) isoforms by mitogen-activated protein kinase kinase 4 (MKK4) and MKK7. *The Biochemical journal* **352 Pt 1**: 145-154.
- Frolova L, Le Goff X, Zhouravleva G, Davydova E, Philippe M, Kisselev L. 1996. Eukaryotic polypeptide chain release factor eRF3 is an eRF1- and ribosome-dependent guanosine triphosphatase. *Rna* **2**: 334-341.

- Furic, L., Rong, L., Larsson, O., Koumakpayi, I.H., Yoshida, K., Brueschke, A., Petroulakis, E., Robichaud, N., Pollak, M., Gaboury, L.A., et al. (2010). eIF4E phosphorylation promotes tumorigenesis and is associated with prostate cancer progression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**, 14134-14139.
- Gao D, Inuzuka H, Tan MK, Fukushima H, Locasale JW, Liu P, Wan L, Zhai B, Chin YR, Shaik S et al. 2011. mTOR drives its own activation via SCF(betaTrCP)-dependent degradation of the mTOR inhibitor DEPTOR. *Molecular cell* **44**: 290-303.
- Garcia-Martinez JM, Moran J, Clarke RG, Gray A, Cosulich SC, Chresta CM, Alessi DR. 2009. Ku-0063794 is a specific inhibitor of the mammalian target of rapamycin (mTOR). *The Biochemical journal* **421**: 29-42.
- Garneau NL, Wilusz J, Wilusz CJ. 2007. The highways and byways of mRNA decay. *Nature reviews Molecular cell biology* **8**: 113-126.
- Gehring, N.H., Lamprinaki, S., Kulozik, A.E., and Hentze, M.W. (2009). Disassembly of exon junction complexes by PYM. *Cell* **137**, 536-548.
- Gentilella A, Thomas G. 2012. Cancer biology: The director's cut. *Nature* **485**: 50-51.
- Gingras AC, Gygi SP, Raught B, Polakiewicz RD, Abraham RT, Hoekstra MF, Aebersold R, Sonenberg N. 1999a. Regulation of 4E-BP1 phosphorylation: a novel two-step mechanism. *Genes & development* **13**: 1422-1437.
- Gingras AC, Raught B, Gygi SP, Niedzwiecka A, Miron M, Burley SK, Polakiewicz RD, Wyslouch-Cieszynska A, Aebersold R, Sonenberg N. 2001. Hierarchical phosphorylation of the translation inhibitor 4E-BP1. *Genes & development* **15**: 2852-2864.
- Gingras AC, Raught B, Sonenberg N. 1999b. eIF4 initiation factors: effectors of mRNA recruitment to ribosomes and regulators of translation. *Annual review of biochemistry* **68**: 913-963.
- Graff JR, Zimmer SG. 2003. Translational control and metastatic progression: enhanced activity of the mRNA cap-binding protein eIF-4E selectively enhances translation of metastasis-related mRNAs. *Clinical & experimental metastasis* **20**: 265-273.
- Gu M, Lima CD. 2005. Processing the message: structural insights into capping and decapping mRNA. *Current opinion in structural biology* **15**: 99-106.

- Guertin DA, Stevens DM, Saitoh M, Kinkel S, Crosby K, Sheen JH, Mullholland DJ, Magnuson MA, Wu H, Sabatini DM. 2009. mTOR complex 2 is required for the development of prostate cancer induced by Pten loss in mice. *Cancer cell* **15**: 148-159.
- Guertin DA, Stevens DM, Thoreen CC, Burds AA, Kalaany NY, Moffat J, Brown M, Fitzgerald KJ, Sabatini DM. 2006. Ablation in mice of the mTORC components raptor, rictor, or mLST8 reveals that mTORC2 is required for signaling to Akt-FOXO and PKCalpha, but not S6K1. *Developmental cell* **11**: 859-871.
- Gupta S, Barrett T, Whitmarsh AJ, Cavanagh J, Sluss HK, Derijard B, Davis RJ. 1996. Selective interaction of JNK protein kinase isoforms with transcription factors. *The EMBO journal* **15**: 2760-2770.
- Gwinn DM, Asara JM, Shaw RJ. 2010. Raptor is phosphorylated by cdc2 during mitosis. *PLoS one* **5**: e9197.
- Gwinn DM, Shackelford DB, Egan DF, Mihaylova MM, Mery A, Vasquez DS, Turk BE, Shaw RJ. 2008. AMPK phosphorylation of raptor mediates a metabolic checkpoint. *Molecular cell* **30**: 214-226.
- Haeusgen W, Herdegen T, Waetzig V. 2011. The bottleneck of JNK signaling: molecular and functional characteristics of MKK4 and MKK7. *European journal of cell biology* **90**: 536-544.
- Han JM, Jeong SJ, Park MC, Kim G, Kwon NH, Kim HK, Ha SH, Ryu SH, Kim S. 2012. Leucyl-tRNA synthetase is an intracellular leucine sensor for the mTORC1-signaling pathway. *Cell* **149**: 410-424.
- Hara K, Maruki Y, Long X, Yoshino K, Oshiro N, Hidayat S, Tokunaga C, Avruch J, Yonezawa K. 2002. Raptor, a binding partner of target of rapamycin (TOR), mediates TOR action. *Cell* **110**: 177-189.
- Hara K, Yonezawa K, Weng QP, Kozlowski MT, Belham C, Avruch J. 1998. Amino acid sufficiency and mTOR regulate p70 S6 kinase and eIF-4E BP1 through a common effector mechanism. *The Journal of biological chemistry* **273**: 14484-14494.
- Hardie DG, Ross FA, Hawley SA. 2012. AMPK: a nutrient and energy sensor that maintains energy homeostasis. *Nature reviews Molecular cell biology* **13**: 251-262.
- Harrington LS, Findlay GM, Gray A, Tolkacheva T, Wigfield S, Rebholz H, Barnett J, Leslie NR, Cheng S, Shepherd PR et al. 2004. The TSC1-2 tumor suppressor controls insulin-

- PI3K signaling via regulation of IRS proteins. *The Journal of cell biology* **166**: 213-223.
- Hilleren P, McCarthy T, Rosbash M, Parker R, Jensen TH. 2001. Quality control of mRNA 3'-end processing is linked to the nuclear exosome. *Nature* **413**: 538-542.
- Hinnebusch AG. 2011. Molecular mechanism of scanning and start codon selection in eukaryotes. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR* **75**: 434-467, first page of table of contents.
- Holcik M, Korneluk RG. 2000. Functional characterization of the X-linked inhibitor of apoptosis (XIAP) internal ribosome entry site element: role of La autoantigen in XIAP translation. *Molecular and cellular biology* **20**: 4648-4657.
- Holz MK, Ballif BA, Gygi SP, Blenis J. 2005. mTOR and S6K1 mediate assembly of the translation preinitiation complex through dynamic protein interchange and ordered phosphorylation events. *Cell* **123**: 569-580.
- Hsiao KM, Chou SY, Shih SJ, Ferrell JE, Jr. 1994. Evidence that inactive p42 mitogen-activated protein kinase and inactive Rsk exist as a heterodimer in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **91**: 5480-5484.
- Hsieh AC, Liu Y, Edlind MP, Ingolia NT, Janes MR, Sher A, Shi EY, Stumpf CR, Christensen C, Bonham MJ et al. 2012. The translational landscape of mTOR signalling steers cancer initiation and metastasis. *Nature* **485**: 55-61.
- Hsu PP, Kang SA, Rameseder J, Zhang Y, Ottina KA, Lim D, Peterson TR, Choi Y, Gray NS, Yaffe MB et al. 2011. The mTOR-regulated phosphoproteome reveals a mechanism of mTORC1-mediated inhibition of growth factor signaling. *Science* **332**: 1317-1322.
- Ingolia NT, Ghaemmighami S, Newman JR, Weissman JS. 2009. Genome-wide analysis in vivo of translation with nucleotide resolution using ribosome profiling. *Science* **324**: 218-223.
- Inoki K, Li Y, Xu T, Guan KL. 2003a. Rheb GTPase is a direct target of TSC2 GAP activity and regulates mTOR signaling. *Genes & development* **17**: 1829-1834.
- Inoki K, Li Y, Zhu T, Wu J, Guan KL. 2002. TSC2 is phosphorylated and inhibited by Akt and suppresses mTOR signalling. *Nature cell biology* **4**: 648-657.
- Inoki K, Zhu T, Guan KL. 2003b. TSC2 mediates cellular energy response to control cell growth and survival. *Cell* **115**: 577-590.

- Jackson RJ, Hellen CU, Pestova TV. 2010. The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation. *Nature reviews Molecular cell biology* **11**: 113-127.
- . 2012. Termination and post-termination events in eukaryotic translation. *Advances in protein chemistry and structural biology* **86**: 45-93.
- Jefferies HB, Reinhard C, Kozma SC, Thomas G. 1994. Rapamycin selectively represses translation of the "polypyrimidine tract" mRNA family. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **91**: 4441-4445.
- Jewell JL, Russell RC, Guan KL. 2013. Amino acid signalling upstream of mTOR. *Nature reviews Molecular cell biology* **14**: 133-139.
- Jin N, Jiang T, Rosen DM, Nelkin BD, Ball DW. 2011. Synergistic action of a RAF inhibitor and a dual PI3K/mTOR inhibitor in thyroid cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **17**: 6482-6489.
- Johannessen CM, Johnson BW, Williams SM, Chan AW, Reczek EE, Lynch RC, Rioth MJ, McClatchey A, Ryeom S, Cichowski K. 2008. TORC1 is essential for NF1-associated malignancies. *Current biology : CB* **18**: 56-62.
- Johannessen CM, Reczek EE, James MF, Brems H, Legius E, Cichowski K. 2005. The NF1 tumor suppressor critically regulates TSC2 and mTOR. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**: 8573-8578.
- Johnson GL, Nakamura K. 2007. The c-jun kinase/stress-activated pathway: regulation, function and role in human disease. *Biochimica et biophysica acta* **1773**: 1341-1348.
- Jones SW, Erikson E, Blenis J, Maller JL, Erikson RL. 1988. A Xenopus ribosomal protein S6 kinase has two apparent kinase domains that are each similar to distinct protein kinases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **85**: 3377-3381.
- Joshi B, Cameron A, Jagus R. 2004. Characterization of mammalian eIF4E-family members. *European journal of biochemistry / FEBS* **271**: 2189-2203.
- Kakegawa T, Ohuchi N, Hayakawa A, Hirata S, Matsuda M, Kogure K, Kobayashi H, Inoue A, Kaspar RL. 2007. Identification of AUF1 as a rapamycin-responsive binding protein to the 5'-terminal oligopyrimidine element of mRNAs. *Archives of biochemistry and biophysics* **465**: 274-281.

- Kallunki T, Su B, Tsigelny I, Sluss HK, Derijard B, Moore G, Davis R, Karin M. 1994. JNK2 contains a specificity-determining region responsible for efficient c-Jun binding and phosphorylation. *Genes & development* **8**: 2996-3007.
- Kamenska A, Lu WT, Kubacka D, Broomhead H, Minshall N, Bushell M, Standart N. 2013. Human 4E-T represses translation of bound mRNAs and enhances microRNA-mediated silencing. *Nucleic acids research*.
- Kapp LD, Lorsch JR. 2004. GTP-dependent recognition of the methionine moiety on initiator tRNA by translation factor eIF2. *Journal of molecular biology* **335**: 923-936.
- Kaul G, Pattan G, Rafeequi T. 2011. Eukaryotic elongation factor-2 (eEF2): its regulation and peptide chain elongation. *Cell biochemistry and function* **29**: 227-234.
- Kedersha N, Anderson P. 2002. Stress granules: sites of mRNA triage that regulate mRNA stability and translatability. *Biochemical Society transactions* **30**: 963-969.
- Kedersha N, Stoecklin G, Ayodele M, Yacono P, Lykke-Andersen J, Fritzler MJ, Scheuner D, Kaufman RJ, Golan DE, Anderson P. 2005. Stress granules and processing bodies are dynamically linked sites of mRNP remodeling. *The Journal of cell biology* **169**: 871-884.
- Kedersha NL, Gupta M, Li W, Miller I, Anderson P. 1999. RNA-binding proteins TIA-1 and TIAR link the phosphorylation of eIF-2 alpha to the assembly of mammalian stress granules. *The Journal of cell biology* **147**: 1431-1442.
- Keene JD, Tenenbaum SA. 2002. Eukaryotic mRNPs may represent posttranscriptional operons. *Molecular cell* **9**: 1161-1167.
- Kervestin S, Jacobson A. 2012. NMD: a multifaceted response to premature translational termination. *Nature reviews Molecular cell biology* **13**: 700-712.
- Kim DH, Sarbassov DD, Ali SM, King JE, Latek RR, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Sabatini DM. 2002. mTOR interacts with raptor to form a nutrient-sensitive complex that signals to the cell growth machinery. *Cell* **110**: 163-175.
- Kim DH, Sarbassov DD, Ali SM, Latek RR, Guntur KV, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Sabatini DM. 2003. GbetaL, a positive regulator of the rapamycin-sensitive pathway required for the nutrient-sensitive interaction between raptor and mTOR. *Molecular cell* **11**: 895-904.



- Kim E, Goraksha-Hicks P, Li L, Neufeld TP, Guan KL. 2008. Regulation of TORC1 by Rag GTPases in nutrient response. *Nature cell biology* **10**: 935-945.
- Kolch W. 2005. Coordinating ERK/MAPK signalling through scaffolds and inhibitors. *Nature reviews Molecular cell biology* **6**: 827-837.
- Korhonen R, Linker K, Pautz A, Forstermann U, Moilanen E, Kleinert H. 2007. Post-transcriptional regulation of human inducible nitric-oxide synthase expression by the Jun N-terminal kinase. *Molecular pharmacology* **71**: 1427-1434.
- Kovacina KS, Park GY, Bae SS, Guzzetta AW, Schaefer E, Birnbaum MJ, Roth RA. 2003. Identification of a proline-rich Akt substrate as a 14-3-3 binding partner. *The Journal of biological chemistry* **278**: 10189-10194.
- Kozak M. 1986. Influences of mRNA secondary structure on initiation by eukaryotic ribosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **83**: 2850-2854.
- . 1987a. An analysis of 5'-noncoding sequences from 699 vertebrate messenger RNAs. *Nucleic acids research* **15**: 8125-8148.
- . 1987b. At least six nucleotides preceding the AUG initiator codon enhance translation in mammalian cells. *Journal of molecular biology* **196**: 947-950.
- . 1989. Circumstances and mechanisms of inhibition of translation by secondary structure in eucaryotic mRNAs. *Molecular and cellular biology* **9**: 5134-5142.
- . 1991. A short leader sequence impairs the fidelity of initiation by eukaryotic ribosomes. *Gene expression* **1**: 111-115.
- Kozma SC, Ferrari S, Bassand P, Siegmann M, Totty N, Thomas G. 1990. Cloning of the mitogen-activated S6 kinase from rat liver reveals an enzyme of the second messenger subfamily. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **87**: 7365-7369.
- Krol J, Loedige I, Filipowicz W. 2010. The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay. *Nature reviews Genetics* **11**: 597-610.
- Kubacka D, Kamenska A, Broomhead H, Minshall N, Darzynkiewicz E, Standart N. 2013. Investigating the consequences of eIF4E2 (4EHP) interaction with 4E-transporter on its cellular distribution in HeLa cells. *PloS one* **8**: e72761.

- Kwak D, Choi S, Jeong H, Jang JH, Lee Y, Jeon H, Lee MN, Noh J, Cho K, Yoo JS et al. 2012. Osmotic stress regulates mammalian target of rapamycin (mTOR) complex 1 via c-Jun N-terminal Kinase (JNK)-mediated Raptor protein phosphorylation. *The Journal of biological chemistry* **287**: 18398-18407.
- Kwiatkowski DJ, Manning BD. 2005. Tuberous sclerosis: a GAP at the crossroads of multiple signaling pathways. *Human molecular genetics* **14 Spec No. 2**: R251-258.
- Kyriakis JM, App H, Zhang XF, Banerjee P, Brautigan DL, Rapp UR, Avruch J. 1992. Raf-1 activates MAP kinase-kinase. *Nature* **358**: 417-421.
- Kyriakis JM, Avruch J. 1990. pp54 microtubule-associated protein 2 kinase. A novel serine/threonine protein kinase regulated by phosphorylation and stimulated by poly-L-lysine. *The Journal of biological chemistry* **265**: 17355-17363.
- Laplante M, Sabatini DM. 2012. mTOR signaling in growth control and disease. *Cell* **149**: 274-293.
- Larance M, Rowland AF, Hoehn KL, Humphreys DT, Preiss T, Guilhaus M, James DE. 2010. Global phosphoproteomics identifies a major role for AKT and 14-3-3 in regulating EDC3. *Molecular & cellular proteomics : MCP* **9**: 682-694.
- Lawler S, Fleming Y, Goedert M, Cohen P. 1998. Synergistic activation of SAPK1/JNK1 by two MAP kinase kinases in vitro. *Current biology : CB* **8**: 1387-1390.
- Lecuyer E, Yoshida H, Parthasarathy N, Alm C, Babak T, Cerovina T, Hughes TR, Tomancak P, Krause HM. 2007. Global analysis of mRNA localization reveals a prominent role in organizing cellular architecture and function. *Cell* **131**: 174-187.
- Levy S, Avni D, Hariharan N, Perry RP, Meyuhas O. 1991. Oligopyrimidine tract at the 5' end of mammalian ribosomal protein mRNAs is required for their translational control. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **88**: 3319-3323.
- Li D, Wei T, Abbott CM, Harrich D. 2013. The unexpected roles of eukaryotic translation elongation factors in RNA virus replication and pathogenesis. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR* **77**: 253-266.
- Li J, Kim SG, Blenis J. 2014. Rapamycin: One Drug, Many Effects. *Cell metabolism*.
- Li Y, Kiledjian M. 2010. Regulation of mRNA decapping. *Wiley interdisciplinary reviews RNA* **1**: 253-265.

- Lin TA, Kong X, Haystead TA, Pause A, Belsham G, Sonenberg N, Lawrence JC, Jr. 1994. PHAS-I as a link between mitogen-activated protein kinase and translation initiation. *Science* **266**: 653-656.
- Luo Z, Tzivion G, Belshaw PJ, Vavvas D, Marshall M, Avruch J. 1996. Oligomerization activates c-Raf-1 through a Ras-dependent mechanism. *Nature* **383**: 181-185.
- Lykke-Andersen J, Wagner E. 2005. Recruitment and activation of mRNA decay enzymes by two ARE-mediated decay activation domains in the proteins TTP and BRF-1. *Genes & development* **19**: 351-361.
- Ma L, Chen Z, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Pandolfi PP. 2005. Phosphorylation and functional inactivation of TSC2 by Erk implications for tuberous sclerosis and cancer pathogenesis. *Cell* **121**: 179-193.
- Ma XM, Blenis J. 2009. Molecular mechanisms of mTOR-mediated translational control. *Nature reviews Molecular cell biology* **10**: 307-318.
- Ma XM, Yoon SO, Richardson CJ, Julich K, Blenis J. 2008. SKAR links pre-mRNA splicing to mTOR/S6K1-mediated enhanced translation efficiency of spliced mRNAs. *Cell* **133**: 303-313.
- Maag D, Fekete CA, Gryczynski Z, Lorsch JR. 2005. A conformational change in the eukaryotic translation preinitiation complex and release of eIF1 signal recognition of the start codon. *Molecular cell* **17**: 265-275.
- MacDonald CC, Wilusz J, Shenk T. 1994. The 64-kilodalton subunit of the CstF polyadenylation factor binds to pre-mRNAs downstream of the cleavage site and influences cleavage site location. *Molecular and cellular biology* **14**: 6647-6654.
- Magnuson B, Ekim B, Fingar DC. 2012. Regulation and function of ribosomal protein S6 kinase (S6K) within mTOR signalling networks. *The Biochemical journal* **441**: 1-21.
- Manning BD, Cantley LC. 2007. AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell* **129**: 1261-1274.
- Manning BD, Tee AR, Logsdon MN, Blenis J, Cantley LC. 2002. Identification of the tuberous sclerosis complex-2 tumor suppressor gene product tuberlin as a target of the phosphoinositide 3-kinase/akt pathway. *Molecular cell* **10**: 151-162.
- Marintchev A. 2013. Roles of helicases in translation initiation: a mechanistic view. *Biochimica et biophysica acta* **1829**: 799-809.

- Mason CS, Springer CJ, Cooper RG, Superti-Furga G, Marshall CJ, Marais R. 1999. Serine and tyrosine phosphorylations cooperate in Raf-1, but not B-Raf activation. *The EMBO journal* **18**: 2137-2148.
- McCarthy JE, Kollmus H. 1995. Cytoplasmic mRNA-protein interactions in eukaryotic gene expression. *Trends in biochemical sciences* **20**: 191-197.
- Menon S, Dibble CC, Talbott G, Hoxhaj G, Valvezan AJ, Takahashi H, Cantley LC, Manning BD. 2014. Spatial Control of the TSC Complex Integrates Insulin and Nutrient Regulation of mTORC1 at the Lysosome. *Cell* **156**: 771-785.
- Merret R, Descombin J, Juan YT, Favory JJ, Carpentier MC, Chaparro C, Charng YY, Deragon JM, Bousquet-Antonelli C. 2013a. XRN4 and LARP1 Are Required for a Heat-Triggered mRNA Decay Pathway Involved in Plant Acclimation and Survival during Thermal Stress. *Cell reports* **5**: 1279-1293.
- Merret R, Martino L, Bousquet-Antonelli C, Fneich S, Descombin J, Billey E, Conte MR, Deragon JM. 2013b. The association of a La module with the PABP-interacting motif PAM2 is a recurrent evolutionary process that led to the neofunctionalization of La-related proteins. *Rna* **19**: 36-50.
- Meyuhas O. 2000. Synthesis of the translational apparatus is regulated at the translational level. *European journal of biochemistry / FEBS* **267**: 6321-6330.
- . 2008. Physiological roles of ribosomal protein S6: one of its kind. *International review of cell and molecular biology* **268**: 1-37.
- Meyuhas O, Dreazen A. 2009. Ribosomal protein S6 kinase from TOP mRNAs to cell size. *Progress in molecular biology and translational science* **90**: 109-153.
- Ming XF, Kaiser M, Moroni C. 1998. c-jun N-terminal kinase is involved in AUUUA-mediated interleukin-3 mRNA turnover in mast cells. *The EMBO journal* **17**: 6039-6048.
- Minshall N, Reiter MH, Weil D, Standart N. 2007. CPEB interacts with an ovary-specific eIF4E and 4E-T in early *Xenopus* oocytes. *The Journal of biological chemistry* **282**: 37389-37401.
- Moore MJ, Proudfoot NJ. 2009. Pre-mRNA processing reaches back to transcription and ahead to translation. *Cell* **136**: 688-700.

- Morita M, Ler LW, Fabian MR, Siddiqui N, Mullin M, Henderson VC, Alain T, Fonseca BD, Karashchuk G, Bennett CF et al. 2012. A novel 4EHP-GIGYF2 translational repressor complex is essential for mammalian development. *Molecular and cellular biology* **32**: 3585-3593.
- Naveau M, Lazennec-Schurdevin C, Panvert M, Mechulam Y, Schmitt E. 2010. tRNA binding properties of eukaryotic translation initiation factor 2 from *Encephalitozoon cuniculi*. *Biochemistry* **49**: 8680-8688.
- Nicklin P, Bergman P, Zhang B, Triantafellow E, Wang H, Nyfeler B, Yang H, Hild M, Kung C, Wilson C et al. 2009. Bidirectional transport of amino acids regulates mTOR and autophagy. *Cell* **136**: 521-534.
- Nissan T, Rajyaguru P, She M, Song H, Parker R. 2010. Decapping activators in *Saccharomyces cerevisiae* act by multiple mechanisms. *Molecular cell* **39**: 773-783.
- Nojima H, Tokunaga C, Eguchi S, Oshiro N, Hidayat S, Yoshino K, Hara K, Tanaka N, Avruch J, Yonezawa K. 2003. The mammalian target of rapamycin (mTOR) partner, raptor, binds the mTOR substrates p70 S6 kinase and 4E-BP1 through their TOR signaling (TOS) motif. *The Journal of biological chemistry* **278**: 15461-15464.
- Nykamp K, Lee MH, Kimble J. 2008. *C. elegans* La-related protein, LARP-1, localizes to germline P bodies and attenuates Ras-MAPK signaling during oogenesis. *Rna* **14**: 1378-1389.
- Ong SH, Hadari YR, Gotoh N, Guy GR, Schlessinger J, Lax I. 2001. Stimulation of phosphatidylinositol 3-kinase by fibroblast growth factor receptors is mediated by coordinated recruitment of multiple docking proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**: 6074-6079.
- Pages G, Berra E, Milanini J, Levy AP, Pouyssegur J. 2000. Stress-activated protein kinases (JNK and p38/HOG) are essential for vascular endothelial growth factor mRNA stability. *The Journal of biological chemistry* **275**: 26484-26491.
- Parker R, Sheth U. 2007. P bodies and the control of mRNA translation and degradation. *Molecular cell* **25**: 635-646.
- Passmore LA, Schmeing TM, Maag D, Applefield DJ, Acker MG, Algire MA, Lorsch JR, Ramakrishnan V. 2007. The eukaryotic translation initiation factors eIF1 and eIF1A induce an open conformation of the 40S ribosome. *Molecular cell* **26**: 41-50.

- Paulin FE, Campbell LE, O'Brien K, Loughlin J, Proud CG. 2001. Eukaryotic translation initiation factor 5 (eIF5) acts as a classical GTPase-activator protein. *Current biology : CB* **11**: 55-59.
- Pause A, Belsham GJ, Gingras AC, Donze O, Lin TA, Lawrence JC, Jr., Sonenberg N. 1994. Insulin-dependent stimulation of protein synthesis by phosphorylation of a regulator of 5'-cap function. *Nature* **371**: 762-767.
- Pearce LR, Komander D, Alessi DR. 2010. The nuts and bolts of AGC protein kinases. *Nature reviews Molecular cell biology* **11**: 9-22.
- Pelletier J, Sonenberg N. 1985. Insertion mutagenesis to increase secondary structure within the 5' noncoding region of a eukaryotic mRNA reduces translational efficiency. *Cell* **40**: 515-526.
- . 1988. Internal initiation of translation of eukaryotic mRNA directed by a sequence derived from poliovirus RNA. *Nature* **334**: 320-325.
- Pende M, Um SH, Mieulet V, Sticker M, Goss VL, Mestan J, Mueller M, Fumagalli S, Kozma SC, Thomas G. 2004. S6K1(-/-)/S6K2(-/-) mice exhibit perinatal lethality and rapamycin-sensitive 5'-terminal oligopyrimidine mRNA translation and reveal a mitogen-activated protein kinase-dependent S6 kinase pathway. *Molecular and cellular biology* **24**: 3112-3124.
- Pesole G, Mignone F, Gissi C, Grillo G, Licciulli F, Liuni S. 2001. Structural and functional features of eukaryotic mRNA untranslated regions. *Gene* **276**: 73-81.
- Peterson TR, Laplante M, Thoreen CC, Sancak Y, Kang SA, Kuehl WM, Gray NS, Sabatini DM. 2009. DEPTOR is an mTOR inhibitor frequently overexpressed in multiple myeloma cells and required for their survival. *Cell* **137**: 873-886.
- Petroulakis E, Parsyan A, Dowling RJ, LeBacquer O, Martineau Y, Bidinosti M, Larsson O, Alain T, Rong L, Mamane Y et al. 2009. p53-dependent translational control of senescence and transformation via 4E-BPs. *Cancer cell* **16**: 439-446.
- Pisarev AV, Hellen CU, Pestova TV. 2007. Recycling of eukaryotic posttermination ribosomal complexes. *Cell* **131**: 286-299.
- Pisarev AV, Skabkin MA, Pisareva VP, Skabkina OV, Rakotondrafara AM, Hentze MW, Hellen CU, Pestova TV. 2010. The role of ABCE1 in eukaryotic posttermination ribosomal recycling. *Molecular cell* **37**: 196-210.

- Potter CJ, Pedraza LG, Xu T. 2002. Akt regulates growth by directly phosphorylating Tsc2. *Nature cell biology* **4**: 658-665.
- Pritchard CA, Samuels ML, Bosch E, McMahon M. 1995. Conditionally oncogenic forms of the A-Raf and B-Raf protein kinases display different biological and biochemical properties in NIH 3T3 cells. *Molecular and cellular biology* **15**: 6430-6442.
- Pyronnet S, Pradayrol L, Sonenberg N. 2000. A cell cycle-dependent internal ribosome entry site. *Molecular cell* **5**: 607-616.
- Rahman MA, Salajegheh A, Smith RA, Lam AK. 2013. B-Raf mutation: a key player in molecular biology of cancer. *Experimental and molecular pathology* **95**: 336-342.
- Rajakulendran T, Sahmi M, Lefrancois M, Sicheri F, Therrien M. 2009. A dimerization-dependent mechanism drives RAF catalytic activation. *Nature* **461**: 542-545.
- Ramachandran V, Shah KH, Herman PK. 2011. The cAMP-dependent protein kinase signaling pathway is a key regulator of P body foci formation. *Molecular cell* **43**: 973-981.
- Ramakrishnan V. 2002. Ribosome structure and the mechanism of translation. *Cell* **108**: 557-572.
- Raught B, Peiretti F, Gingras AC, Livingstone M, Shahbazian D, Mayeur GL, Polakiewicz RD, Sonenberg N, Hershey JW. 2004. Phosphorylation of eucaryotic translation initiation factor 4B Ser422 is modulated by S6 kinases. *The EMBO journal* **23**: 1761-1769.
- Ray-David H, Romeo Y, Lavoie G, Deleris P, Tcherkezian J, Galan JA, Roux PP. 2013. RSK promotes G2 DNA damage checkpoint silencing and participates in melanoma chemoresistance. *Oncogene* **32**: 4480-4489.
- Rogers GW, Jr., Komar AA, Merrick WC. 2002. eIF4A: the godfather of the DEAD box helicases. *Progress in nucleic acid research and molecular biology* **72**: 307-331.
- Romeo Y, Moreau J, Zindy PJ, Saba-El-Leil M, Lavoie G, Dandachi F, Baptissart M, Borden KL, Meloche S, Roux PP. 2013. RSK regulates activated BRAF signalling to mTORC1 and promotes melanoma growth. *Oncogene* **32**: 2917-2926.
- Romeo Y, Zhang X, Roux PP. 2012. Regulation and function of the RSK family of protein kinases. *The Biochemical journal* **441**: 553-569.

- Roux PP, Ballif BA, Anjum R, Gygi SP, Blenis J. 2004. Tumor-promoting phorbol esters and activated Ras inactivate the tuberous sclerosis tumor suppressor complex via p90 ribosomal S6 kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**: 13489-13494.
- Roux PP, Shahbazian D, Vu H, Holz MK, Cohen MS, Taunton J, Sonenberg N, Blenis J. 2007. RAS/ERK signaling promotes site-specific ribosomal protein S6 phosphorylation via RSK and stimulates cap-dependent translation. *The Journal of biological chemistry* **282**: 14056-14064.
- Roux PP, Topisirovic I. 2012. Regulation of mRNA translation by signaling pathways. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* **4**.
- Rozen F, Edery I, Meerovitch K, Dever TE, Merrick WC, Sonenberg N. 1990. Bidirectional RNA helicase activity of eucaryotic translation initiation factors 4A and 4F. *Molecular and cellular biology* **10**: 1134-1144.
- Rufener SC, Muhlemann O. 2013. eIF4E-bound mRNPs are substrates for nonsense-mediated mRNA decay in mammalian cells. *Nature structural & molecular biology* **20**: 710-717.
- Ruvinsky I, Katz M, Dreazen A, Gielchinsky Y, Saada A, Freedman N, Mishani E, Zimmerman G, Kasir J, Meyuhav O. 2009. Mice deficient in ribosomal protein S6 phosphorylation suffer from muscle weakness that reflects a growth defect and energy deficit. *PloS one* **4**: e5618.
- Rzeczkowski K, Beuerlein K, Muller H, Dittrich-Breiholz O, Schneider H, Kettner-Buhrow D, Holtmann H, Kracht M. 2011. c-Jun N-terminal kinase phosphorylates DCP1a to control formation of P bodies. *The Journal of cell biology* **194**: 581-596.
- Sabatini DM, Erdjument-Bromage H, Lui M, Tempst P, Snyder SH. 1994. RAFT1: a mammalian protein that binds to FKBP12 in a rapamycin-dependent fashion and is homologous to yeast TORs. *Cell* **78**: 35-43.
- Sachs AB, Varani G. 2000. Eukaryotic translation initiation: there are (at least) two sides to every story. *Nature structural biology* **7**: 356-361.
- Saha M, Carriere A, Cheerathodi M, Zhang X, Lavoie G, Rush J, Roux PP, Ballif BA. 2012. RSK phosphorylates SOS1 creating 14-3-3-docking sites and negatively regulating MAPK activation. *The Biochemical journal* **447**: 159-166.



- Sancak Y, Peterson TR, Shaul YD, Lindquist RA, Thoreen CC, Bar-Peled L, Sabatini DM. 2008. The Rag GTPases bind raptor and mediate amino acid signaling to mTORC1. *Science* **320**: 1496-1501.
- Sancak Y, Thoreen CC, Peterson TR, Lindquist RA, Kang SA, Spooner E, Carr SA, Sabatini DM. 2007. PRAS40 is an insulin-regulated inhibitor of the mTORC1 protein kinase. *Molecular cell* **25**: 903-915.
- Sarbassov DD, Ali SM, Sengupta S, Sheen JH, Hsu PP, Bagley AF, Markhard AL, Sabatini DM. 2006. Prolonged rapamycin treatment inhibits mTORC2 assembly and Akt/PKB. *Molecular cell* **22**: 159-168.
- Sarbassov DD, Guertin DA, Ali SM, Sabatini DM. 2005. Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science* **307**: 1098-1101.
- Schalm SS, Blenis J. 2002. Identification of a conserved motif required for mTOR signaling. *Current biology : CB* **12**: 632-639.
- Schalm SS, Fingar DC, Sabatini DM, Blenis J. 2003. TOS motif-mediated raptor binding regulates 4E-BP1 multisite phosphorylation and function. *Current biology : CB* **13**: 797-806.
- Schlichting I, Almo SC, Rapp G, Wilson K, Petratos K, Lentfer A, Wittinghofer A, Kabsch W, Pai EF, Petsko GA et al. 1990. Time-resolved X-ray crystallographic study of the conformational change in Ha-Ras p21 protein on GTP hydrolysis. *Nature* **345**: 309-315.
- Schoenberg DR, Maquat LE. 2012. Regulation of cytoplasmic mRNA decay. *Nature reviews Genetics* **13**: 246-259.
- Schwanhausser B, Busse D, Li N, Dittmar G, Schuchhardt J, Wolf J, Chen W, Selbach M. 2011. Global quantification of mammalian gene expression control. *Nature* **473**: 337-342.
- Schweingruber C, Rufener SC, Zund D, Yamashita A, Muhlemann O. 2013. Nonsense-mediated mRNA decay - mechanisms of substrate mRNA recognition and degradation in mammalian cells. *Biochimica et biophysica acta* **1829**: 612-623.
- Sekiguchi T, Hirose E, Nakashima N, Ii M, Nishimoto T. 2001. Novel G proteins, Rag C and Rag D, interact with GTP-binding proteins, Rag A and Rag B. *The Journal of biological chemistry* **276**: 7246-7257.

- Shah OJ, Wang Z, Hunter T. 2004. Inappropriate activation of the TSC/Rheb/mTOR/S6K cassette induces IRS1/2 depletion, insulin resistance, and cell survival deficiencies. *Current biology : CB* **14**: 1650-1656.
- Shahbazian D, Roux PP, Mieulet V, Cohen MS, Raught B, Taunton J, Hershey JW, Blenis J, Pende M, Sonenberg N. 2006. The mTOR/PI3K and MAPK pathways converge on eIF4B to control its phosphorylation and activity. *The EMBO journal* **25**: 2781-2791.
- Shatkin AJ, Manley JL. 2000. The ends of the affair: capping and polyadenylation. *Nature structural biology* **7**: 838-842.
- Shaw RJ. 2009. LKB1 and AMP-activated protein kinase control of mTOR signalling and growth. *Acta physiologica* **196**: 65-80.
- Sheth U, Parker R. 2003. Decapping and decay of messenger RNA occur in cytoplasmic processing bodies. *Science* **300**: 805-808.
- Shuman S. 2002. What messenger RNA capping tells us about eukaryotic evolution. *Nature reviews Molecular cell biology* **3**: 619-625.
- Sluss HK, Barrett T, Derijard B, Davis RJ. 1994. Signal transduction by tumor necrosis factor mediated by JNK protein kinases. *Molecular and cellular biology* **14**: 8376-8384.
- Sonenberg N, Hinnebusch AG. 2009. Regulation of translation initiation in eukaryotes: mechanisms and biological targets. *Cell* **136**: 731-745.
- Sonenberg N, Morgan MA, Merrick WC, Shatkin AJ. 1978. A polypeptide in eukaryotic initiation factors that crosslinks specifically to the 5'-terminal cap in mRNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **75**: 4843-4847.
- Sossin WS, DesGroseillers L. 2006. Intracellular trafficking of RNA in neurons. *Traffic* **7**: 1581-1589.
- Spriggs KA, Bushell M, Willis AE. 2010. Translational Regulation of Gene Expression during Conditions of Cell Stress. *Molecular cell* **40**: 228-237.
- Stein I, Itin A, Einat P, Skaliter R, Grossman Z, Keshet E. 1998. Translation of vascular endothelial growth factor mRNA by internal ribosome entry: implications for translation under hypoxia. *Molecular and cellular biology* **18**: 3112-3119.
- Stoneley M, Willis AE. 2004. Cellular internal ribosome entry segments: structures, trans-acting factors and regulation of gene expression. *Oncogene* **23**: 3200-3207.

- Takashima A, Faller DV. 2013. Targeting the RAS oncogene. *Expert opinion on therapeutic targets* **17**: 507-531.
- Tee AR, Manning BD, Roux PP, Cantley LC, Blenis J. 2003. Tuberous sclerosis complex gene products, Tuberin and Hamartin, control mTOR signaling by acting as a GTPase-activating protein complex toward Rheb. *Current biology : CB* **13**: 1259-1268.
- Teixeira D, Sheth U, Valencia-Sanchez MA, Brengues M, Parker R. 2005. Processing bodies require RNA for assembly and contain nontranslating mRNAs. *Rna* **11**: 371-382.
- Terai K, Matsuda M. 2005. Ras binding opens c-Raf to expose the docking site for mitogen-activated protein kinase kinase. *EMBO reports* **6**: 251-255.
- Thoreen CC, Chantranupong L, Keys HR, Wang T, Gray NS, Sabatini DM. 2012. A unifying model for mTORC1-mediated regulation of mRNA translation. *Nature* **485**: 109-113.
- Thoreen CC, Kang SA, Chang JW, Liu Q, Zhang J, Gao Y, Reichling LJ, Sim T, Sabatini DM, Gray NS. 2009. An ATP-competitive mammalian target of rapamycin inhibitor reveals rapamycin-resistant functions of mTORC1. *The Journal of biological chemistry* **284**: 8023-8032.
- Topisirovic I, Svitkin YV, Sonenberg N, Shatkin AJ. 2011. Cap and cap-binding proteins in the control of gene expression. *Wires Rna* **2**: 277-298.
- Tournier C, Whitmarsh AJ, Cavanagh J, Barrett T, Davis RJ. 1999. The MKK7 gene encodes a group of c-Jun NH2-terminal kinase kinases. *Molecular and cellular biology* **19**: 1569-1581.
- Udell CM, Rajakulendran T, Sicheri F, Therrien M. 2011. Mechanistic principles of RAF kinase signaling. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* **68**: 553-565.
- Vander Haar E, Lee SI, Bandhakavi S, Griffin TJ, Kim DH. 2007. Insulin signalling to mTOR mediated by the Akt/PKB substrate PRAS40. *Nature cell biology* **9**: 316-323.
- Vargas NB, Brewer BY, Rogers TB, Wilson GM. 2009. Protein kinase C activation stabilizes LDL receptor mRNA via the JNK pathway in HepG2 cells. *Journal of lipid research* **50**: 386-397.
- Vezina C, Kudelski A, Sehgal SN. 1975. Rapamycin (AY-22,989), a new antifungal antibiotic. I. Taxonomy of the producing streptomycete and isolation of the active principle. *The Journal of antibiotics* **28**: 721-726.

- Vigil D, Cherfils J, Rossman KL, Der CJ. 2010. Ras superfamily GEFs and GAPs: validated and tractable targets for cancer therapy? *Nature reviews Cancer* **10**: 842-857.
- von der Haar T, Gross JD, Wagner G, McCarthy JE. 2004. The mRNA cap-binding protein eIF4E in post-transcriptional gene expression. *Nature structural & molecular biology* **11**: 503-511.
- von Roretz C, Di Marco S, Mazroui R, Gallouzi IE. 2011. Turnover of AU-rich-containing mRNAs during stress: a matter of survival. *Wiley interdisciplinary reviews RNA* **2**: 336-347.
- Wagner EF, Nebreda AR. 2009. Signal integration by JNK and p38 MAPK pathways in cancer development. *Nature reviews Cancer* **9**: 537-549.
- Wander SA, Hennessy BT, Slingerland JM. 2011. Next-generation mTOR inhibitors in clinical oncology: how pathway complexity informs therapeutic strategy. *The Journal of clinical investigation* **121**: 1231-1241.
- Wang X, Campbell LE, Miller CM, Proud CG. 1998. Amino acid availability regulates p70 S6 kinase and multiple translation factors. *The Biochemical journal* **334 ( Pt 1)**: 261-267.
- Wang X, Li W, Williams M, Terada N, Alessi DR, Proud CG. 2001a. Regulation of elongation factor 2 kinase by p90(RSK1) and p70 S6 kinase. *The EMBO journal* **20**: 4370-4379.
- Wang X, Paulin FE, Campbell LE, Gomez E, O'Brien K, Morrice N, Proud CG. 2001b. Eukaryotic initiation factor 2B: identification of multiple phosphorylation sites in the epsilon-subunit and their functions in vivo. *The EMBO journal* **20**: 4349-4359.
- Warner JR. 1999. The economics of ribosome biosynthesis in yeast. *Trends in biochemical sciences* **24**: 437-440.
- 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. *Molecular and cellular biology* **19**, 1871-1880.
- Wek RC, Jiang HY, Anthony TG. 2006. Coping with stress: eIF2 kinases and translational control. *Biochemical Society transactions* **34**: 7-11.
- Wells SE, Hillner PE, Vale RD, Sachs AB. 1998. Circularization of mRNA by eukaryotic translation initiation factors. *Molecular cell* **2**: 135-140.

- Widmann C, Gibson S, Jarpe MB, Johnson GL. 1999. Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human. *Physiological reviews* **79**: 143-180.
- Wilhelm JE, Hilton M, Amos Q, Henzel WJ. 2003. Cup is an eIF4E binding protein required for both the translational repression of oskar and the recruitment of Barentsz. *The Journal of cell biology* **163**: 1197-1204.
- Wright LP, Philips MR. 2006. Thematic review series: lipid posttranslational modifications. CAAX modification and membrane targeting of Ras. *Journal of lipid research* **47**: 883-891.
- Yamada-Okabe, T., Doi, R., Shimmi, O., Arisawa, M., and Yamada-Okabe, H. (1998). Isolation and characterization of a human cDNA for mRNA 5'-capping enzyme. *Nucleic acids research* **26**, 1700-1706.
- Yamashita A, Chang TC, Yamashita Y, Zhu W, Zhong Z, Chen CY, Shyu AB. 2005. Concerted action of poly(A) nucleases and decapping enzyme in mammalian mRNA turnover. *Nature structural & molecular biology* **12**: 1054-1063.
- Yang H, Rudge DG, Koos JD, Vaidialingam B, Yang HJ, Pavletich NP. 2013. mTOR kinase structure, mechanism and regulation. *Nature* **497**: 217-223.
- Yang HS, Jansen AP, Komar AA, Zheng X, Merrick WC, Costes S, Lockett SJ, Sonenberg N, Colburn NH. 2003. The transformation suppressor Pdc4 is a novel eukaryotic translation initiation factor 4A binding protein that inhibits translation. *Molecular and cellular biology* **23**: 26-37.
- Yang Q, Double S. 2011. Structural biology of poly(A) site definition. *Wiley interdisciplinary reviews RNA* **2**: 732-747.
- Yang R, Gaidamakov SA, Xie J, Lee J, Martino L, Kozlov G, Crawford AK, Russo AN, Conte MR, Gehring K et al. 2011. La-related protein 4 binds poly(A), interacts with the poly(A)-binding protein MLLE domain via a variant PAM2w motif, and can promote mRNA stability. *Molecular and cellular biology* **31**: 542-556.
- Yip CK, Murata K, Walz T, Sabatini DM, Kang SA. 2010. Structure of the human mTOR complex I and its implications for rapamycin inhibition. *Molecular cell* **38**: 768-774.
- Yu K, Shi C, Toral-Barza L, Lucas J, Shor B, Kim JE, Zhang WG, Mahoney R, Gaydos C, Tardio L et al. 2010. Beyond rapalog therapy: preclinical pharmacology and antitumor

- activity of WYE-125132, an ATP-competitive and specific inhibitor of mTORC1 and mTORC2. *Cancer research* **70**: 621-631.
- Yu Y, Yoon SO, Poulogiannis G, Yang Q, Ma XM, Villen J, Kubica N, Hoffman GR, Cantley LC, Gygi SP et al. 2011. Phosphoproteomic analysis identifies Grb10 as an mTORC1 substrate that negatively regulates insulin signaling. *Science* **332**: 1322-1326.
- Zhang X, Lavoie G, Fort L, Huttlin EL, Tcherkezian J, Galan JA, Gu H, Gygi SP, Carreno S, Roux PP. 2013. Gab2 phosphorylation by RSK inhibits Shp2 recruitment and cell motility. *Molecular and cellular biology* **33**: 1657-1670.
- Zhao J, Yuan X, Frodin M, Grummt I. 2003. ERK-dependent phosphorylation of the transcription initiation factor TIF-IA is required for RNA polymerase I transcription and cell growth. *Molecular cell* **11**: 405-413.
- Zhao Y, Xiong X, Sun Y. 2011. DEPTOR, an mTOR inhibitor, is a physiological substrate of SCF(betaTrCP) E3 ubiquitin ligase and regulates survival and autophagy. *Molecular cell* **44**: 304-316.
- Zoncu R, Bar-Peled L, Efeyan A, Wang S, Sancak Y, Sabatini DM. 2011a. mTORC1 senses lysosomal amino acids through an inside-out mechanism that requires the vacuolar H(+)-ATPase. *Science* **334**: 678-683.
- Zoncu R, Efeyan A, Sabatini DM. 2011b. mTOR: from growth signal integration to cancer, diabetes and ageing. *Nature reviews Molecular cell biology* **12**: 21-35.