

Université de Montréal

**Caractérisation de la fonction de CNK dans la régulation
du mécanisme de signalisation du module MAPK/ERK
chez la Drosophile**

par

Mélanie Douziech

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

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

Août, 2005

© Mélanie Douziech, 2005



QH

506

U54

2006

V. 005

Direction des bibliothèques

AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée :

**Caractérisation de la fonction de CNK dans la régulation
du mécanisme de signalisation du module MAPK/ERK
chez la Drosophile**

présentée par :

Mélanie Douziech

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Benoit Coulombe, président-rapporteur

Dr Marc Therrien, directeur de recherche

Dre Trang Hoang, membre du jury

Dr Paul Lasko, examinateur externe

Dr Christian Deschepper, représentant du doyen de la FES

Thèse acceptée le :



Résumé

Les cellules eucaryotes perçoivent d'innombrables signaux en provenance du milieu extracellulaire. Plusieurs récepteurs exprimés en surface les intègrent pour ensuite les retransmettre efficacement en direction du noyau dans le but d'induire une réponse physiologique appropriée permettant à la cellule de maintenir son homéostasie. Ces signaux sont véhiculés à travers la cellule par l'intermédiaire d'un important réseau de communication intracellulaire défini par différentes cascades de signalisation. L'une d'entre elles appelée la voie de signalisation Ras/MAPK, assure la régulation de nombreux processus fondamentaux, telles la survie, l'apoptose, la prolifération et la différenciation cellulaire. Elle est définie par un module de trois kinases respectivement appelées RAF, MEK et MAPK. Plusieurs cribles génétiques réalisés chez la drosophile ont été élaborés dans le but d'identifier de nouvelles composantes impliquées au sein de cette cascade de signalisation. Les protéines d'échafaudage KSR et CNK ont ainsi été identifiées.

Cette thèse porte sur la caractérisation du rôle de CNK dans de la signalisation Ras/MAPK. Selon nos résultats, CNK a une fonction à action « bimodale » lui permettant de réguler, autant en condition inactivée qu'en condition activée, la voie de signalisation. En absence d'un signal, CNK a la capacité de réguler négativement la voie de signalisation Ras/MAPK. Sa portion carboxy-terminale comporte une région à double composante appelée la région RIR (« RAF inhibitory region »), qui semble avoir la capacité de maintenir le domaine kinase de RAF dans une conformation inactive, prévenant possiblement la phosphorylation inadéquate de MEK avant stimulation. Suite à la stimulation d'un récepteur tyrosine kinase, Src42 s'associe à une région conservée de CNK, appelée la région Y1163, positionnée immédiatement en carboxy-terminal du RIR. Cette association semble inhiber l'effet répresseur exercé par la région RIR de CNK sur le domaine kinase de RAF. Étonnamment, cette désinhibition semble dépendre de la liaison des domaines SH3 et SH2 de Src42 et non de son activité kinase. La portion amino-terminale de CNK permet quant à elle, suivant l'intégration d'un signal Ras, d'accentuer la signalisation en favorisant potentiellement l'activation de RAF par un mécanisme moléculaire qui dépend à la fois de KSR et d'une nouvelle composante de la

voie appelée HYP. Il avait déjà été démontré que le rôle de KSR dans ce processus d'activation était de faciliter la phosphorylation de MEK par RAF en favorisant leur rapprochement mutuel. Or nos résultats suggèrent que son rôle ne se limite pas à une simple activité d'échafaudage. En fait, son mécanisme d'action serait potentiellement de moduler l'activité du domaine kinase de RAF par modification allostérique. La protéine HYP semble quant à elle assurer l'association de KSR au domaine SAM de CNK, un événement qui serait d'ailleurs essentiel au processus d'activation de RAF. CNK serait donc une plate-forme moléculaire permettant d'assembler simultanément différentes composantes de la voie dans le but de réguler efficacement l'activation de RAF. CNK doit cependant intégrer deux signaux distincts conjointement requis pour désinhiber d'une part la région RIR de CNK et d'autre part activer de la voie de signalisation Ras/MAPK par un mécanisme qui dépend de KSR.

Mots clés : signalisation intracellulaire, Ras, RAF, domaine kinase, CNK, KSR, HYP.

Abstract

Eukaryotic cells perceive a vast array of signals coming from the extracellular medium. Several classes of receptor molecules receive and transmit those signals to the nucleus or other intracellular parts of the cell to induce a suitable physiological output enabling the cell to maintain its homeostasis. Those signals are conveyed through the cell by a complex intracellular communication network defined by various signalling cascades. One of these is called the Ras/MAPK pathway which is involved in the regulation of many fundamental processes such as survival, apoptosis, proliferation and cellular differentiation. It is defined by a module of three kinases respectively called RAF, MEK and MAPK. Several genetic screens were conducted in *Drosophila* to identify new components of this signalling cascade, which led to the identification of two scaffolding proteins, namely KSR and CNK.

This thesis discusses the characterization of the CNK function within the Ras/MAPK pathway. Our results suggest that CNK has a bimodal function which controls the pathway in active and inactive conditions. On the one hand, its C-terminal portion contains a bipartite region called the RIR that appears to bind the kinase domain of RAF and maintains it in an inactive conformation, thereby preventing inadequate MEK phosphorylation in absence of a signal. Conversely, upon RTK stimulation, Src42 associates with a conserved region located C-terminal to the RIR called the Y1163 region. This association seems to release the inhibitory effect mediated by the RIR region on RAF catalytic activity. Surprisingly, this derepression does not involve Src42 catalytic function, but depends on both its SH3 and SH2 domains. In addition, the N-terminal portion of CNK allows, following the integration of a Ras signal, the activation of RAF by a molecular mechanism that depends on the recruitment of KSR via a new SAM domain-containing protein called HYP. Although KSR had already been shown to be involved in the pathway by scaffolding MEK to RAF, our results suggest that the role of KSR is not limited to this scaffolding function, but that it modulates RAF kinase activity possibly through an allosteric mechanism. Therefore, it appears that CNK is a molecular platform assembling

simultaneously various components of the Ras/MAPK pathway to regulate RAF and MEK activation.

Keywords: signal transduction, Ras, RAF, kinase domain, CNK, KSR, HYP.

Table des matières

Résumé.....	III
Abstract	V
Table des matières.....	VII
Liste des tableaux.....	XII
Liste des figures	XIII
Liste des abréviations.....	XV
Dédicace.....	XXI
Remerciements.....	XXIII
Avant-propos et contribution des auteurs	XXV
1. CHAPITRE 1	1
Introduction	1
1.1. Voies de signalisation et carcinogenèse.....	2
1.2. Perception et transmission de signaux extracellulaires.....	3
1.2.1. La phosphorylation	3
1.2.1.1. Les protéines kinases	4
1.2.1.1.1. Architecture générale du domaine kinase	6
1.2.1.1.2. Fixation et orientation du nucléotide.....	6
1.2.1.1.3. Liaison du substrat et mécanisme de phosphotransfert.....	7
1.2.2. Les interactions protéine-protéine.....	8
1.3. Les petites GTPases	9
1.4. Les voies de signalisation de type MAPK	10
1.4.1. Les MAPKs.....	11
1.4.1.1. Spécificité du substrat	13
1.4.1.2. Région d'ancrage des MAPKs.....	14
1.4.1.3. Motifs d'interaction des molécules cibles.....	15
1.4.2. Le module RAF/MEK/ERK.....	15
1.4.2.1. Les récepteurs tyrosine kinases.....	16
1.4.2.2. RAS	18

1.4.2.2.1. Modifications posttraductionnelles de RAS.....	20
1.4.2.2.2. Activation de Ras	21
1.4.2.2.3. Lieux d'activation de Ras	22
1.4.2.2.4. Inactivation de Ras.....	23
1.4.2.2.5. Effecteurs de Ras	24
1.4.2.3. RAF.....	26
1.4.2.3.1. Structure des isoformes de RAF	27
1.4.2.3.2. Régulation de l'activation de C-RAF.....	27
1.4.2.3.2.1. Autorégulation négative de C-RAF	27
1.4.2.3.2.2. Oligomérisation de RAF	29
1.4.2.3.2.3. La phosphorylation.....	31
1.4.2.3.2.3.1. Les régulateurs positifs dans l'activation de RAF	32
1.4.2.3.2.3.2. Inhibition par phosphorylation.....	37
1.4.2.3.3. RAF dans la pathogenèse des cancers.....	39
1.4.2.3.4. Activation de MEK par RAF	43
1.4.2.3.5. Fonctions de RAF indépendantes de l'activation de ERK.....	45
1.4.3. MEK.....	46
1.4.4. ERKs	48
1.4.4.1. Importation/exportation nucléaire.....	49
1.4.4.2. Réponses biologiques induites par ERKs	51
1.4.4.3. Spécificité dans l'activation de la voie ERK	53
1.5. Les protéines d'échafaudage	54
1.5.1. Protéines d'échafaudage de la voie ERK.....	58
1.5.1.1. Sur-8.....	59
1.5.1.2. MP1	59
1.5.1.3. MORG1	60
1.5.1.4. MEKK1	61
1.5.1.5. Sef	61
1.5.1.6. CNK	62
1.5.1.7. KSR.....	64

1.6. Régulateurs négatifs de la voie ERK	66
1.6.1. IMP.....	67
1.6.2. RKIP.....	67
1.6.3. Sprouty.....	68
1.6.4. Spred	69
1.7. Modèles animaux pour étudier la signalisation ERK.....	70
1.7.1. <i>Drosophila melanogaster</i>	70
1.7.1.1. Développement de l'œil	71
1.7.2. <i>Caenorhabditis elegans</i>	71
1.7.2.1. Développement de la vulve.....	72
1.8. Les objectifs du projet de thèse.....	72
2. CHAPITRE 2.....	74
Article 1:	74
Bimodal regulation of RAF by CNK in <i>Drosophila</i>	74
2.1. Abstract	76
2.2. Introduction.....	77
2.3. Materials and methods	80
2.3.1. Plasmids	80
2.3.2. Cell culture, transfection, and protein analysis.....	80
2.3.3. <i>Drosophila</i> genetics and histology	81
2.4. Results.....	82
2.4.1. CNK has opposite effects on RAF function.....	85
2.4.2. Two short amino acid sequences in CNK define a “RAF-Inhibitory Region” that blocks MEK phosphorylation by RAF.....	91
2.4.3. The RIR of CNK antagonizes RAS signaling during eye development	100
2.4.4. A RNAi-based rescue assay uncovers CNK’s natural opposite effects on the MAPK module.....	101
2.4.5. CNK’s RIR prevents “signaling leakage” within the KSR/RAF/MEK complex	106

2.5. Discussion	108
2.6. Acknowledgements	113
2.7. References	114
3. CHAPITRE 3	117
Article 2:	117
A KSR/CNK Complex Mediated by a Novel SAM Domain-Containing Protein, Hyphen, Controls RAS-dependent RAF Activation in Drosophila	117
3.1. Summary	119
3.2. Introduction	120
3.3. Experimental Procedures	123
3.3.1. Plasmids	123
3.3.2. Cell culture, transfection, protein analysis and antibodies.....	124
3.3.3. RNAi experiments.....	124
3.3.4. Genetics.....	124
3.4. Results and Discussion.....	125
3.4.1. CNK and KSR are Required for Activation of the Catalytic Domain of RAF	125
3.4.2. The Kinase Domain of KSR Mediates CNK Activity	134
3.4.3. KSR is More than a Scaffold Connecting MEK to RAF	136
3.4.4. CNK Links KSR to RAF	137
3.4.5. The KSR/CNK Interaction Depends on a Novel SAM Domain-Containing Protein, Hyphen	150
3.5. Concluding Remarks	158
3.6. Acknowledgments.....	162
3.7. References	163
4. CHAPITRE 4	166
Discussion	166
4.1. Processus d'activation de RAF par CNK et KSR	168

4.1.1. Mécanisme d'action du domaine SAM de CNK	169
4.1.1.1. Site d'ancrage pour une kinase	169
4.1.1.2. Polymérisation/dépolymérisation.....	171
4.1.1.3. Association non polymérique.....	173
4.1.2. Mécanisme d'action de la région CRIC de CNK.....	174
4.1.3. Rôle de CNK dans l'activation de KSR.....	174
4.1.4. Rôle de KSR dans l'activation de RAF	176
4.1.4.1. KSR est plus qu'une simple protéine d'échafaudage.....	178
4.1.4.2. Mutants du domaine catalytique de KSR.....	181
4.2. Mécanisme de régulation de la région RIR de CNK.....	187
4.2.1. Effet inhibiteur de la région RIR.....	187
4.2.2. Désengagement de la région RIR par Src42	191
4.2.3. Implication du RIR dans l'activation de RAF?.....	193
4.2.4. Analyse du mécanisme d'action de Src sur l'activation de RAF.....	195
4.2.5. Modification conformationnelle de CNK	197
4.3. Rôle de la fonction « bimodale » de CNK.....	199
4.4. Implication de CNK dans d'autres voies de signalisation	199
4.5. Intervention thérapeutique	202
4.6. Conclusion.....	205
Bibliographie.....	206
Annexe 1	I
Annexe 2	XX

Liste des tableaux

Table 3.I Genomic Rescue Experiments Revealed the Positive Role Played by the RIM.....	149
---	-----

Liste des figures

Figure 1.1 Structure générale du domaine kinase de RAF.....	5
Figure 1.2 Les voies de signalisation de type MAPK.....	12
Figure 1.3 Les différents récepteurs pouvant activer la voie de signalisation Ras/ERK.	17
Figure 1.4 Effecteurs de Ras	25
Figure 1.5 Homologues de RAF chez les mammifères, le nématode et la drosophile	28
Figure 1.6 Mécanisme d'activation de C-RAF	30
Figure 1.7 Représentation schématique des protéines d'échafaudage et des différentes composantes de signalisation associées	56
Figure 1.8 Représentation schématique de la structure de CNK chez la drosophile.	63
Figure 1.9 Représentation schématique de la structure de KSR chez la souris.	63
Figure 2.1 CNK activity is required downstream of RAS, but upstream of RAF	83
Figure 2.2 Opposite behavior of CNK in the RAS/MAPK pathway	86
Figure 2.3 Functional mapping of the RAF-Inhibitory Region (RIR) on CNK.....	92
Figure 2.4 The negative effect of CNK is mediated by two co-required elements.....	99
Figure 2.5 CNK's RAF-Inhibitory Region antagonizes RAS signaling <i>in vivo</i>	102
Figure 2.6 CNK has a natural antagonistic effect on signal transmission through the MAPK module	104
Figure 2.7 CNK, a bimodal regulator of RAF function.....	110
Figure 3.1 The N-terminal Portion of CNK Augments KSR-Induced MEK phosphorylation by RAF	126
Figure 3.2 CNK and KSR Activities are Required Upstream of the RAF Activation Loop Phosphorylation Event.....	129
Figure 3.3 CNK Activity is KSR-dependent	135
Figure 3.4 Two Inactive KSR Mutants Retain their Ability to Associate with RAF and MEK	138
Figure 3.5 CNK Mediates the Formation of a KSR/RAF Complex	140
Figure 3.6 The Recruitment of KSR to CNK Depends on Hyphen, a Novel SAM Domain-containing Protein	152

Figure 3.7 Model Summarizing the Scaffolding and the RTK-dependent Activating Property of the KSR/HYP/CNK Complex with respect to RAF and MEK.....	159
Figure 4.1 Modèle d'activation du module Ras/MAPK	182
Figure 4.2 Implication de la voie Ras/ERK dans divers processus biologiques associés au cancer ...	203
Supplemental Figure 2.1 Fine mapping of the RAF-Inhibitory Region (RIR) on CNK.....	95
Supplemental Figure 2.2 Fine mapping of the RAF-Interacting Motif (RIM) on CNK.....	97
Supplemental Figure 3.1 CNK ^{NT} does not augment RAF ^{ED} activity	132
Supplemental Figure 3.2 The kinase domain of KSR interacts with endogenous CNK....	144
Supplemental Figure 3.3 Hyphen is an evolutionarily conserved protein	156

Liste des abréviations

ADN	Acide DésoxyriboNucléique
AMPc	cyclic Adenosine MonoPhosphate
ANF-GCR	Atrial Natriuretic Factor (ANF)-dependent Guanylate Cyclase Receptor
ASK1	Apoptosis Signal-regulating Kinase 1
ATP	Adénosine TriPhosphate
B	Basic motif
BAD	Bcl-2 Antagonist of cell Death
BAG-1	Bcl-2-interacting protein
Bcl-2	B-cell CLL/lymphoma 2
Ca ²⁺	Calcium
CAPRI	Calcium-Promoted Ras Inactivator
CD	Common Docking domain
Cdc37	Cell division cycle 37 <i>S. cerevisiae</i> homologue
Cdks	Cyclin-dependent kinases
CNK	Connector eNhancer of KSR
Cos2	Costal-2
CRD	Cysteine-Rich Domain
CREB	cAMP Responsive Element Binding protein
CRIC	Conserved Region In CNK
CT	Carboxy-Terminale
C-TAK1	CDC25C-Associated Kinase 1
D	Docking domain
DAG	DiAcylGlycerol
DEF	Docking site for ERK, FXFP
DVD	Domain for Versatile Docking
ED	glutamic and aspartic acids
EGF	Epidermal Growth Factor
EH	End-Helix
EpoR	Erythropoietin Receptor

ErbB	Human Epidermal growth factor receptor
ERK	Extracellular signal Regulated protein Kinases
FAK	Focal Adhesion Kinase
FBS	Fetal Bovine Serum
FGF	Fibroblast Growth Factor
FKBP	FK506-Binding Protein
FRB	FKBP-Rapamycin-Binding protein
FRS2	FGF Receptor Substrate 2
FTase	FarnésylTransférase
GAPs	GTPases Activating Proteins
GBD	G protein Binding/switching Domain
GDP	Guanosine DiPhosphate
GEFs	Guanine nucleotide Exchange Factors
GGTase	GéranylGéranylTransférase
G-loop	Glycine-rich loop
GMPc	cyclic Guanosine MonoPhosphate
GPCRs	G Protein-Coupled Receptors
Grb2	Growth factor receptor-binding protein 2
GTP	Guanosine TriPhosphate
HOG	High-Osmolarity Glycerol
HSP68	Heat Shock Protein 68
HSP70	Heat Shock Protein 70
HSP90	Heat Shock Protein 90
HYP	HYPhen
IKK	IK β -Kinase
ILK	Integrin-Linked Kinase
IMP	Impedes Mitogenic signal Propagation
InaD	Inactivation no afterpotential D
IP ₃	Inositol(1,4,5)tri-Phosphate
IS	Inhibitory Sequence

JAKs	JANus Kinase
JIP-1	JNK Interacting Protein-1
JNK/SAPK	c-Jun NH2 terminal Kinases/Stress-Activated Protein Kinases
K.-O	Knock Out
KDN	KSR Dominant Negative
KSR	Kinase Suppressor of RAS
LPA	LysoPhosphatidic Acid
LRR	Leucine-Rich Repeats
Mae	Modulator of the activity of ets
MAGUIN	Membrane-Associated Guanylate kinase-INteracting protein
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase
MAPKAP	MAPK-Activated Protein kinase
MEFs	Mouse Embryonic Fibroblasts
MEK1	MAP kinase/ERK Kinase
MEK1	Mitogen Activated Protein Kinase
MEKK1	MEK Kinase
MKK3	MAPK Kinase-3
MKPs	MAP Kinase Phosphatases
ML	Mid-Loop
MLK3	Mixed-Lineage Kinase-3
MORG1	Mitogen-activated protein kinase ORGanizer 1
MP1	MEK-Partner 1
MST2	MKN28-derived non-receptor type of Serine/Threonine kinase 2
N region	Negative-charge regulatory region
NES	Nuclear Export Signal
NF- κ β	Nuclear Factor κ B
NF1	NeuroFibromatosis type 1
NGF	Nerve Growth Factor
NLS	Nuclear Localization Signal
NORE	NOvel RAS Effector 1

NPC	Nuclear Pore Complex
NT	Amino-Terminale
N-WASp	Wiskott-Aldrich Syndrome protein
P	résidu Phosphoaccepteur
PAK	p21 Activated Kinase
PC12	Pheochromocytoma Cells
PDGF	Platelet-Derived Growth Factor
PDK1	3-Phosphoinositide-Dependent protein Kinase-1
PDZ	PSD-95/DLG-1/ZO-1
PH	Pleckstrin Homology
PI3K	Phosphatidyl Inositol-3 Kinase
Pin1	Peptidyl-prolyl <i>cis-trans</i> isomerase NIMA-interacting 1
PIP ₂	PhosphatididylInositol-4,5-bisPhosphate
PKA	Protein Kinase A
PKB	Protein Kinase B
PKC	Protein Kinase C
PKR	Protein kinase R
PLC γ	PhosphoLipase C gamma
PLD	PhosphoLipase D
P-loop	Phosphate binding loop
PMA	Phorbol 12-Myristate 13-Acetate
PP2A	Protein Phosphatase 2A
PS	PhosphatidylSérines
PSD95	PostSynaptic Density protein of 95 kDa
PTB	PhosphoTyrosine-Binding domain
Ptp2	Protein tyrosine phosphatase 2
pY	phosphotyrosine
PYK2	Proline-rich tYrosine Kinase 2
RAF	RApidly growing Fibrosarcomas
Ras	Rat sarcoma

Ras-GRF	Ras-Guanine nucleotide-Releasing Factor
Ras-GRP	Ras-Guanyl nucleotide-Releasing Protein
RASSF1A	RAS association domain Family 1A gene
Rb	Retinoblastoma tumor suppressor protein
RBD	Ras Binding Domain
RIM	RAF-Interacting Motif
RIR	RAF Inhibitory Region
RKIP	RAF Kinase Inhibitor Protein
Rlf	RalGDS-like factor
RNAi	ARN interférence
RSK	p90 Ribosomal S6 Kinase
RTKs	Receptor Tyrosine Kinases
S2	Schneider cells 2
SAM	Sterile-Alpha Motif
Sef	Similar expression to <i>fgf</i> genes
SEV	SEVenless
SFKs	Src-Family protein tyrosine Kinase
SGK	Serum and Glucocorticoid-regulated Kinase
SH2	Src-Homology domain 2
SH3	Src-Homology domain 3
Shp2	Sh2 inositol 5-phosphatase 1
SOS	Son Of Sevenless
Spred	Sprouty-related suppressor of Ras signalling
Spy	Sprouty
S-SCAM	Synaptic SCAffolding Molecule
Ste11	Sterile 11
Sur-8	Suppressor of RAS mutation-8
TAB1	TAK1 Binding protein 1
TAK1	TGF- β -Activated protein Kinase
TEL	Translocation, Ets, Leukemia

TRP	Transient Receptor Potential
VDAC	Voltage-Dependent Anion Channel
VEGFR	Vascular Epithelial Growth Factor Receptor
VPCs	Vulval Precursor Cells
v-Src	Rous Sarcoma virus

Dédicace

*" À l'amour de ma vie, Gino,
à ma famille et à tous ceux
que j'aime du plus profond de
mon cœur ! "*

" Science sans conscience n'est que ruine de l'âme. "

François Rabelais, 1484-1533
Pantagruel, 1532

Remerciements

Je tiens à remercier en premier lieu l'amour de ma vie, Gino, qui a su m'épauler avec brio pendant ces longues années d'étude. Sa patience, ses encouragements et sa confiance m'ont permis d'atteindre avec succès les nombreux objectifs que je m'étais fixés. Sa présence auprès de moi m'a donné la force nécessaire et a su ensoleiller mes journées.

Je dédie cette thèse à mes parents, Jacques et Francine, qui sont pour moi un cadeau du ciel. Leur amour inconditionnel m'a permis d'avoir le courage nécessaire pour atteindre mes objectifs. Je tiens à remercier ma grande soeur Nadine et mon frère jumeau Maxime d'avoir toujours tendu l'oreille dans les moments difficiles. Je remercie Stéphane, alias Pedro, et Annie pour leurs nombreuses séances d'encouragements. J'apprécie également la compréhension de mes deux neveux Jérémie et Alexandre de ne pas avoir été aussi présente dans leur vie qu'ils l'auraient souhaité. Je suis reconnaissante envers Lise, Serge, Julie, Martin, Hugo, Guillaume, Sophie et Gino qui ont toujours su me soutenir depuis le début de cette aventure. J'apprécie énormément ma belle-famille.

J'aimerais remercier Sophie Bisson, Christopher Metrakos, Nathalie Bériault, Patrice Racine, Caroline Bériault, Sylvain Lalonde, Tanya Rivard, Éric Côté, Marylène Hince, Éric Bériault et Francine Bériault, lesquels sont à mes yeux des ami(e)s sincères en qui j'ai pu puiser l'énergie nécessaire pour poursuivre mes études. J'apprécie les nombreux mots d'encouragement qu'ils ont eu à mon égard et je rends hommage à leur amitié !

Je tiens à remercier mon directeur de thèse, le Dr Marc Therrien, qui m'a permis de me réaliser sur le plan scientifique. J'apprécie la confiance qu'il m'a témoignée tout au long de mes études. Sa disponibilité a été grandement appréciée. Je voudrais également remercier mes collègues de labo passés et présents avec qui j'ai eu énormément de plaisir à travailler. J'ai eu la chance de rencontrer des gens extraordinaires avec qui j'ai développé au cours des années de belles amitiés. Je pense à Caroline Baril, François Roy, Martin Lefrançois, Monica Walczak, Anne-Valérie Armengod, Judith Antoine-Bertrand et Amélie Casgrin. Merci beaucoup ! Sans vous les longues heures de travail n'auraient été les mêmes.

J'aimerais également remercier les membres de mon comité qui ont accepté de lire et d'évaluer cette thèse. Un merci tout particulier à Dr Benoit Coulombe qui, depuis les dix dernières années, m'a judicieusement conseillé. Je tiens à remercier Mme Viviane Jodoin, la coordonnatrice du programme de Biologie moléculaire, pour ce qu'elle est, une personne attentionnée toujours à l'écoute. Sa disponibilité est également remarquable.

Je suis également reconnaissante envers l'IRCM, l'IRIC et le programme de Biologie moléculaire. Ce travail a généreusement été financé par les programmes de Bourses d'études supérieures de la Société de recherche sur le cancer (SRC), les Fonds pour la formation de chercheur et l'aide à la recherche (FCAR) et le Conseil de recherches en sciences naturelles et génie du Canada (CRSNG).

Avant-propos et contribution des auteurs

La voie de signalisation Ras/MAPK régule plusieurs processus biologiques fondamentaux nécessaires au maintien de l'homéostasie d'une cellule. Cette voie est fréquemment suractivée dans certaines formes de cancers d'où l'intérêt d'étudier en détail les différents mécanismes moléculaires qui assurent la régulation de son processus d'activation. Plusieurs cribles génétiques réalisés chez la drosophile ont permis l'identification de nouvelles composantes nécessaires à la régulation de cette voie de signalisation. Cette thèse tente de démontrer l'importance fonctionnelle de l'une d'entre elles, appelée CNK, dans l'activation de la voie de signalisation Ras/MAPK.

Cette thèse comporte quatre chapitres. Le premier est une introduction qui offre une synthèse entourant les mécanismes de transmission des signaux au sein de la signalisation Ras en aval des récepteurs tyrosine kinases (RTKs). Les processus d'activation des différentes composantes du module MAPK sont décrits. Ce résumé offre également certaines informations concernant les protéines d'échafaudage impliquées dans la signalisation Ras/MAPK ainsi que les différents régulateurs négatifs agissant au sein de la voie.

Les trois chapitres suivants forment le corps de l'ouvrage. Les chapitres 2 et 3 correspondent à des manuscrits relatant les différents résultats obtenus au cours de ma formation. Le premier article (chapitre 2) a déjà été publié en 2003 dans la revue *The EMBO Journal*, alors que le second (chapitre 3) est en préparation.

La majorité des travaux qui font l'objet du deuxième chapitre ont été réalisés par moi-même. Le Dr François Roy a contribué en générant la figure 2.1A et 2.6C. Il a également participé à la cartographie du site de liaison de RAF sur CNK. Martin Lefrançois a démontré l'association directe entre RAF et CNK au moyen du système à double hybride chez la levure (Lefrançois et Therrien, données non publiées). Anne-Valérie Armengod a généré la mouche transgénique sE-CNK FL^{ΔRIM}, puis réalisé les interactions génétiques montrées à la figure 2.5. Gino Laberge a quant à lui démontré

l'existence d'une association entre les formes endogènes de RAF et de CNK (figure 2.1C). Le manuscrit a été écrit par le Dr Marc Therrien, mais j'ai participé à son élaboration.

Le chapitre 3 correspond au second manuscrit qui sera bientôt soumis pour publication. La majorité des résultats générés pour l'élaboration de cet article ont été réalisés par moi-même. La Dre Malha Sahmi a contribué en identifiant HYP à l'aide de la technique d'ARN double brin à interférence. Elle a fait les figures 3.6A et 3.6D de cet article. Gino Laberge m'a aidé à générer les différentes mouches transgéniques utilisées pour réaliser l'essai de sauvegarde de la létalité dont les résultats figurent à la Table 3.I. Le manuscrit a été écrit par le Dr Marc Therrien, mais j'ai participé à son élaboration.

Le quatrième chapitre discute des différents résultats exposés dans cette thèse en tentant d'établir un modèle d'activation de la voie de signalisation Ras/MAPK en aval des RTKs. Un nouveau mécanisme d'action de KSR au sein du module MAPK est proposé en relation à CNK dans la régulation de l'activité kinase de RAF.

Deux articles supplémentaires ont été ajoutés en annexe puisqu'ils fournissent certaines informations qui faciliteront d'une part la compréhension du rôle de KSR au sein de la voie de signalisation Ras et d'autre part l'implication de Src42 dans le désengagement de la région RIR de CNK.

1. CHAPITRE 1

Introduction

1.1. Voies de signalisation et carcinogènèse

La cellule perçoit une quantité impressionnante d'informations en provenance du milieu extracellulaire. Elle doit les intégrer pour ensuite les transmettre efficacement en direction du noyau dans le but de réguler adéquatement les divers processus moléculaires qui garantissent le maintien de son homéostasie. Cette transmission est assurée par un réseau de communication intracellulaire complexe défini par différentes voies de signalisation qui permettront l'induction d'une réponse biologique appropriée en fonction de la stimulation initialement perçue. La communication entre ces voies de signalisation doit nécessairement être efficace puisque la cellule, qui est en soi une unité fonctionnelle, doit répondre correctement aux signaux externes. Comprendre comment ce réseau de communication opère *in vivo* est donc un défi de taille d'autant plus que sa désorganisation entraîne l'apparition des cellules cancéreuses. En effet, il semblerait que la carcinogènèse chez l'humain soit le résultat d'altérations génétiques multiples qui transforment progressivement une cellule saine en cellule cancéreuse en perturbant séquentiellement différentes voies de signalisation normalement impliquées dans le contrôle de la prolifération, de la motilité et de la survie cellulaire. Ces altérations permettent ainsi de contourner les différents points de contrôle qui gouvernent normalement le réseau de communication intracellulaire et les mécanismes de réparation de l'ADN (Bell and Ryan, 2005; Vogelstein and Kinzler, 2004). Les cellules cancéreuses sont génétiquement instables et peuvent favoriser l'induction progressive de diverses mutations en réponse à une pression sélective (van Haaften et al., 2004). Ce « modus operandi » pourrait être analogue à celui favorisant l'évolution des espèces telle que décrite par Darwin (Hanahan and Weinberg, 2000). Ces modifications leur permettent d'acquérir de nouvelles caractéristiques avantageuses dont la capacité à proliférer indépendamment des signaux extracellulaires. L'angiogènèse anormale, l'inhibition de l'apoptose et la production de métastases sont des propriétés supplémentaires qui leur confèrent un sérieux avantage. Au stade avancé de la maladie, les approches thérapeutiques devront donc être foudroyantes et certainement très spécifiques si l'on espère contrer sa progression sans affecter les tissus sains (Martin, 2003).

Notre laboratoire étudie la voie de signalisation Ras/MAPK, laquelle est fréquemment perturbée dans plusieurs formes de cancers (Thompson and Lyons, 2005). Elle gouverne différents processus cellulaires fondamentaux tels que la prolifération, la différenciation, la survie et l'apoptose. Divers événements moléculaires régulent avec exactitude chaque étape menant vers son activation ou son inactivation. Nous tentons de comprendre ces mécanismes moléculaires dans l'espoir d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques efficaces susceptibles d'entraver la progression tumorale associée à une suractivation de la voie Ras/MAPK. Cette introduction décrit d'abord les mécanismes moléculaires qui assurent la perception et la transmission de signaux en direction du noyau pour ensuite s'attarder aux différentes composantes de la voie Ras/MAPK en relatant leurs différents dispositifs de régulation.

1.2. Perception et transmission de signaux extracellulaires

La cellule exprime à sa surface différents récepteurs susceptibles de percevoir tout changement dans le milieu extracellulaire. Les hormones, les facteurs de croissance, les cytokines sont autant d'agonistes capables d'induire spécifiquement leur activation. Différentes cascades de signalisation intracellulaires seront par la suite initiées dans le but d'assurer la transmission de l'information, initialement perçue en surface, en direction du noyau. Cette information est véhiculée en partie par l'entremise d'événements de phosphorylation entre les différentes composantes de ces voies, permettant par conséquent d'induire une réponse biologique particulière (Thomas et al., 2000).

1.2.1. La phosphorylation

La phosphorylation réversible est une réaction enzymatique au cours de laquelle un groupement phosphate en position γ de l'ATP est transféré sur le groupement hydroxyl d'un résidu sérine, thréonine ou tyrosine phosphoaccepteur (Morrison et al., 2000). Cette réaction est largement utilisée chez les eucaryotes et permet de réguler efficacement différents processus biologiques dont la prolifération et la différenciation cellulaire (Johnson et al., 1998). C'est en 1955 que la réaction de phosphorylation sur un résidu sérine a été mise à jour pour la première fois avec la caractérisation de la glycogène

phosphorylase. Pendant 13 ans, ce type de modification était associé au métabolisme du glycogène (Johnson et al., 1998). La découverte de la protéine kinase dépendante de l'AMP cyclique en 1968, capable de phosphoryler à la fois les résidus sérines et thréonines, a renversé ce dogme. Il faudra attendre jusqu'en 1980 pour constater la phosphorylation sur un résidu tyrosine avec la découverte du virus de sarcome de Rous (v-Src). D'ailleurs, ces découvertes ont pavé la voie vers l'identification de nouvelles protéines kinases impliquées dans une variété de processus cellulaires (Johnson et al., 1998). Leur caractérisation a permis de mettre en lumière l'impact des événements de phosphorylation sur la fonction des protéines. En effet, la phosphorylation peut non seulement influencer l'état d'activation d'une protéine, elle peut également favoriser la formation de complexes macromoléculaires en générant différents sites d'ancrage. La localisation subcellulaire et la stabilisation des protéines peuvent également être modulées par phosphorylation (Morrison et al., 2000). Les protéines kinases catalysent le phosphotransfert, alors que les phosphatases induisent la déphosphorylation. Dans les deux cas, ces enzymes peuvent être subdivisées selon la spécificité du résidu qui doit subir la réaction enzymatique. Certaines enzymes sont toutefois caractérisées par une activité à double spécificité et donc reconnaissent autant les résidus sérines, thréonines que tyrosines (Blume-Jensen and Hunter, 2001).

1.2.1.1. Les protéines kinases

Les kinases représentent chez les eucaryotes l'une des plus grandes familles de protéines (Johnson et al., 1998). Le génome humain encode plus de 500 membres (Blume-Jensen and Hunter, 2001; Manning et al., 2002). Elles ont toutes la capacité de catalyser le transfert du phosphate en position γ de l'ATP (Hanks and Hunter, 1995). Leur domaine catalytique, qui fait environ 250 à 300 acides aminés, contient 12 sous-domaines hautement conservés permettant aux différentes protéines kinases d'adopter en condition activée une architecture 3D analogue (Figure 1.1). Ces sous-domaines sont indispensables à l'accomplissement de la fonction de l'enzyme puisqu'ils assurent la fixation et l'orientation du nucléotide, la reconnaissance et la liaison du substrat de même que la réaction de phosphotransfert (Hanks and Hunter, 1995).

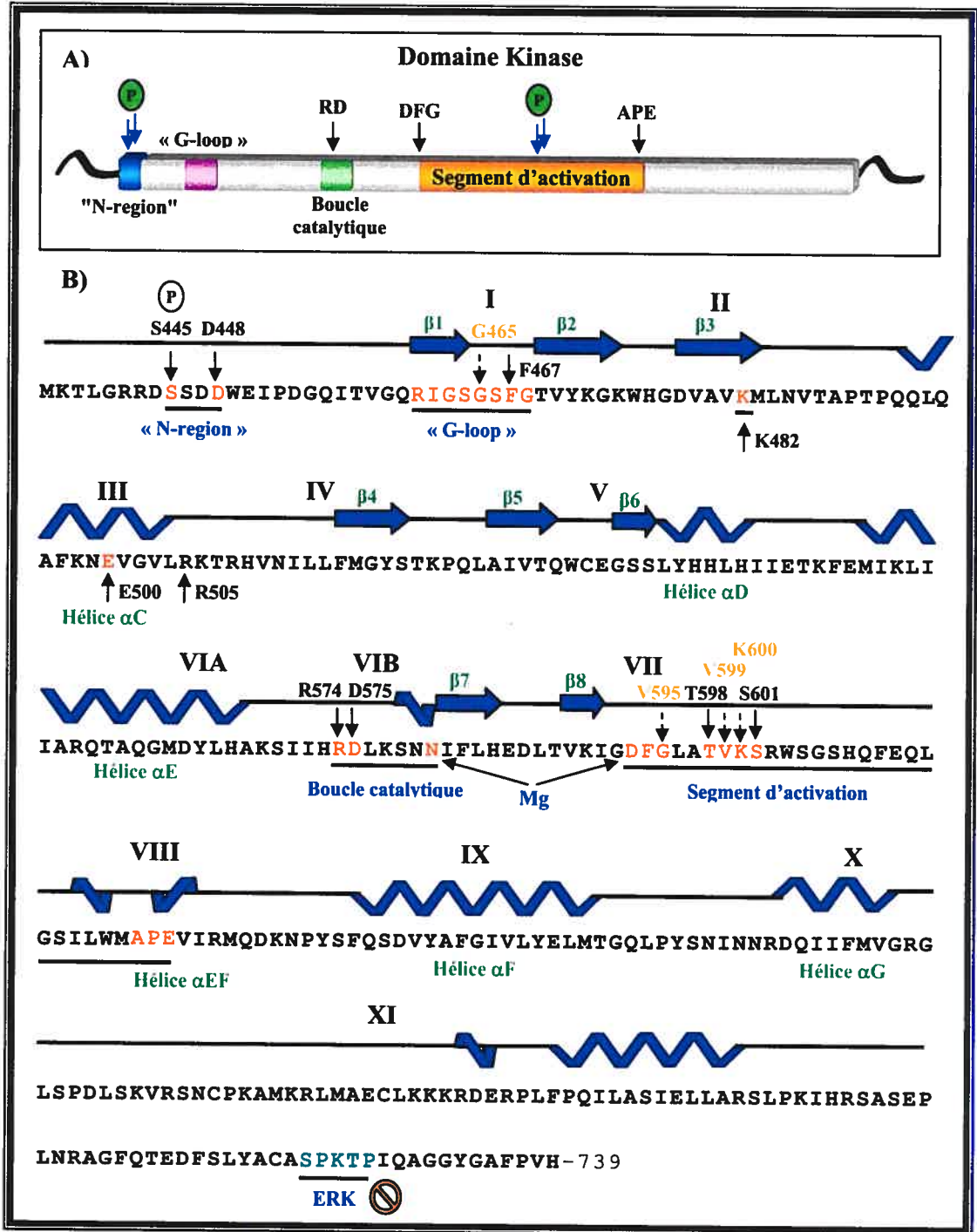


Figure 1.1 (A) Structure générale du domaine kinase de RAF. (B) Le domaine kinase de B-RAF comporte 12 sous-domaines conservés (I à XI). Les flèches bleues sont des feuilletts β et les zigzags correspondent à des hélices. Schéma adapté de (Wan et al., 2004).

1.2.1.1.1. Architecture générale du domaine kinase

Le domaine kinase adopte une architecture particulière qui permet au site actif de l'enzyme d'être profondément inséré entre le lobe N-terminal (N-lobe) et le lobe C-terminal (C-lobe). Le N-lobe, principalement impliqué dans la fixation et l'orientation du nucléotide, est composé de cinq feuillets β antiparallèles ($\beta 1$ à $\beta 5$) et d'une hélice α , appelée hélice αC . Le C-lobe, qui est responsable de la liaison du substrat et de l'initiation du phosphotransfert, est quant à lui caractérisé par deux feuillets β antiparallèles ($\beta 7$ et $\beta 8$) et de six hélices α (αD , αE , αEF , αF , αG et αH). La région charnière établit la connexion entre ces lobes. Elle contient un résidu glycine conservé qui permet aux lobes de pivoter l'un par rapport à l'autre et ce, en fonction de l'état d'activation de l'enzyme (Figure 1.1B) (Nolen et al., 2004).

1.2.1.1.2. Fixation et orientation du nucléotide

Quatre des cinq sous-domaines caractéristiques du N-lobe sont impliqués dans la fixation et l'orientation adéquate du nucléotide (Hanks and Hunter, 1995; Hanks et al., 1988; Johnson et al., 1998). Le sous-domaine I est une région riche en résidus glycines, appelée le « G-loop », dont la séquence consensus est $GXGX\phi GXV$ (X est n'importe quel acide aminé et ϕ , une tyrosine ou une phénylalanine) (Hanks et al., 1988; Huse and Kuriyan, 2002). Ce motif assure la liaison et la coordination des groupements phosphates de l'ATP. La lysine et le glutamate localisés respectivement au sein du feuillet $\beta 3$ (sous-domaine II) et de l'hélice αC (sous-domaine III), correspondent à deux résidus également invariables qui coordonnent latéralement les groupements α et β non hydrolysables de l'ATP. L'implication du glutamate est indirecte puisqu'il stabilise les interactions de la lysine invariable avec les groupements phosphates. La région charnière, qui correspond au sous-domaine V du N-lobe, établit des contacts avec l'adénine alors que le ribose de l'ATP est stabilisé par différents résidus localisés dans le sous-domaine VIB du C-lobe. L'acide aspartique du motif DFG (sous-domaine VII) coordonne l'ion magnésium primaire suivant sa chélation, ce qui assure sa liaison aux phosphates en position β et γ de l'ATP. L'ion magnésium secondaire est quant à lui chélaté par l'asparagine positionnée dans la boucle

catalytique et permet la liaison des groupements phosphates en position α et γ de l'ATP. Dans les deux cas, ces ions garantissent l'orientation adéquate du phosphate en position γ nécessaire à la catalyse (Figure 1.1B) (Hanks and Hunter, 1995; Johnson et al., 1998).

1.2.1.1.3. Liaison du substrat et mécanisme de phosphotransfert

Le C-lobe, formé des sous-domaines VIA à XI, est responsable de la liaison du substrat et du phosphotransfert (Hanks and Hunter, 1995). Le sous-domaine VIB est caractérisé par une séquence conservée prénommée la boucle catalytique. Cette dernière assure non seulement l'orientation adéquate du substrat, elle initie également la réaction de phosphotransfert. Cette boucle, dont la séquence consensus est H-R-D-L-K-X-X-N, contient plusieurs résidus conservés qui accomplissent des fonctions particulières. L'acide aspartique (**D**) est la base catalytique qui accepte le proton provenant du groupement hydroxyl de la protéine substrat. La lysine (**K**) facilite le phosphotransfert en neutralisant la charge négative du phosphate en position γ , alors que l'asparagine (**N**) stabilise la boucle catalytique en interagissant directement avec la base catalytique (Figure 1.1B) (Hanks and Hunter, 1995; Johnson et al., 1998).

Le segment d'activation, délimité par les motifs DFG (sous-domaine VII) et APE (sous-domaine VIII) adopte différentes conformations qui définissent l'état d'activation de l'enzyme. Il contient, entre autres, une boucle d'activation caractérisée par un ou plusieurs sites régulateurs pouvant être phosphorylés dans le but d'induire un changement conformationnel qui rend possible la liaison du substrat (Huse and Kuriyan, 2002). L'un de ces résidus phosphorylés (phosphate primaire) peut interagir avec une arginine conservée localisée immédiatement en amont de la base catalytique (Johnson et al., 1996). Cette association est essentielle pour réorienter le motif DFG de façon à ce qu'il soit correctement positionné lors de la catalyse (Huse and Kuriyan, 2002). La phénylalanine du motif DFG établit d'ailleurs, en condition inactive, des contacts avec l'hélice α C dans le but d'altérer sa position et ainsi, indirectement empêcher le glutamate d'interagir avec la lysine du sous-domaine II (Huse and Kuriyan, 2002; Nolen et al., 2004). Dans certains cas, la conformation inactive de l'enzyme peut davantage être stabilisée par l'intermédiaire

d'une association entre le glutamate de l'hélice αC et l'arginine positionnée en amont de la base catalytique (Nolen et al., 2004). Ainsi, sans réorganisation du segment d'activation induite par phosphorylation, les différents résidus impliqués dans la réaction enzymatique, la liaison de l'ATP ou l'association du substrat, sont désordonnés et donc incompetents pour initier la catalyse.

La liaison du substrat est assurée par la boucle P+1 localisée dans la portion carboxy-terminale (CT) du segment d'activation de l'enzyme. Cette boucle reconnaît, entre autres, l'acide aminé qui suit le résidu phosphoaccepteur (P) de la molécule substrat, d'où la terminologie P+1 (Taylor et al., 1995). La mutation de cette boucle provoque assurément une réduction de l'activité de l'enzyme puisqu'elle perturbe soit la liaison, soit l'orientation du substrat (Nolen et al., 2004). Cette boucle P+1 correspond également au motif signature de l'enzyme, en ce sens qu'elle détermine la spécificité d'action de la protéine kinase. Elle contient plusieurs résidus qui permettent de spécifier quel groupement hydroxyl doit s'y associer (Hanks et al., 1988; Taylor et al., 1995).

En somme, le domaine catalytique de la kinase doit modifier efficacement sa conformation suivant sa phosphorylation pour ensuite stabiliser, grâce à des interactions intramoléculaires, une conformation compétente pour initier la réaction de phosphotransfert. Cette stabilisation permet également d'assurer la liaison et l'orientation adéquate de la molécule substrat et du nucléotide. À l'inverse, sa déphosphorylation déstabilise la conformation, ce qui par conséquent inactive l'enzyme.

1.2.2. Les interactions protéine-protéine

La phosphorylation n'est pas la seule stratégie que la cellule a développée pour assurer la communication entre les différentes composantes des voies de signalisation. Les interactions protéine-protéine participent également au processus de transmission de signaux en favorisant, entre autres, le recrutement des molécules cibles aux récepteurs activés (Pawson et al., 2002). Elles facilitent également l'assemblage de complexes macromoléculaires qui permet de promouvoir la spécificité nécessaire à l'induction d'une réponse biologique appropriée (Pawson and Scott, 1997). Ces associations peuvent

moduler la conformation d'une protéine, réguler son état d'activation et déterminer la spécificité du substrat (Ladbury and Arold, 2000; Pawson and Nash, 2003). Elles peuvent également influencer la localisation subcellulaire des différentes composantes de la voie, toujours dans le but d'initier une réponse physiologique adaptée à la stimulation de départ. Il est donc évident que les interactions protéine-protéine occupent une place importante dans le maintien de l'homéostasie de la cellule (Buck and Iyengar, 2003). De façon générale, les molécules de signalisation comportent un ou plusieurs domaines susceptibles de médier ces interactions protéine-protéine. Plusieurs d'entre eux ont d'ailleurs été conservés à travers l'évolution (Pawson, 2003). Voici ci-dessous une brève énumération des principaux domaines d'interaction impliqués dans la signalisation.

Le domaine SH2 (Src-homology domain 2) reconnaît spécifiquement une région composée d'une phosphotyrosine (pY) suivie par 3 à 5 acides aminés. Le motif PTB (Phosphotyrosine-binding domain) reconnaît également une pY, cependant les 5 à 8 résidus hydrophobes localisés en amont déterminent la spécificité de liaison (Guy et al., 2002; Pawson and Scott, 1997). Le domaine SH3 reconnaît quant à lui une région riche en prolines dont la séquence consensus minimale est PxxP (x étant n'importe quel acide aminé) (Buday, 1999). Le domaine SAM a la capacité de former des oligomères. Ces derniers résultent soit de son autoassociation, soit de la liaison d'un autre domaine SAM. Il peut dans certains cas, s'associer à des protéines qui n'en comportent aucun (Qiao and Bowie, 2005). Le domaine PDZ reconnaît quant à lui une courte séquence correspondant aux derniers acides aminés de la protéine cible (Craven and Bredt, 1998). Certains ont cependant la capacité de dimériser (Cowburn, 1997; Ponting et al., 1997).

1.3. Les petites GTPases

Les petites GTPases représentent une classe de protéines essentielles dans le domaine de la signalisation puisqu'elles assurent, dans de nombreux cas, le lien entre les récepteurs et différentes composantes de signalisation intracellulaires (Bos, 1998). La famille des petites GTPases comporte plus de 150 membres, tous caractérisés par une activité GTPase intrinsèque (Ehrhardt et al., 2002; Symons and Takai, 2001; Zwartkruis and Bos, 1999). Ces protéines sont généralement ancrées à la surface interne de la

membrane plasmique grâce à des modifications posttraductionnelles qui ont lieu à l'extrémité CT (Hunter, 2000). Leur activité est stimulée par des protéines GEFs (guanine nucleotide exchange factors) qui favorisent l'échange du GDP en GTP, entraînant par conséquent un changement conformationnel essentiel à leur activation. Cette modification assure également l'orientation adéquate de leur domaine effecteur qui est impliqué dans l'association de protéines cibles. Par ailleurs, leur inactivation résulte de l'hydrolyse du GTP en GDP suivant l'induction de leur activité GTPase intrinsèque par différentes protéines GAPs (GTPases activating proteins) (Donovan et al., 2002).

Les petites GTPases peuvent être subdivisées en cinq sous-familles, soit Ras, Rho, Rab, Arf et Ran, lesquelles sont impliquées dans la régulation d'une variété de processus biologiques importants (Symons and Takai, 2001; Takai et al., 2001). En effet, Rho, Rac et Cdc42 de la sous-famille Rho, régulent entre autres la réorganisation de l'actine cytosquelettique. La sous-famille Rab (environ 50 membres) semble moduler le transport vésiculaire intracellulaire au cours duquel le ciblage, l'association et la fusion des vésicules au bon endroit dans la cellule sont assurés (Takai et al., 2001). Sar1 et Arf (sous-famille Arf) semblent être impliquées dans la formation des vésicules de transport alors que la sous-famille Ran (un seul membre chez l'humain) module entre autres le transport actif nucléo-cytoplasmique (Symons and Takai, 2001; Takai et al., 2001). La sous-famille Ras comporte quant à elle 13 membres (dont Ras, Rap et Ral) qui semblent tous être impliqués dans la régulation de l'expression génique (Ehrhardt et al., 2002). Notre laboratoire s'intéresse particulièrement à la petite GTPase Ras. Son mode de régulation sera d'ailleurs discuté à la section intitulée Ras (section 1.4.2.2, page 18).

1.4. Les voies de signalisation de type MAPK

Les voies de signalisation de type MAPK (« Mitogen-activated protein kinases ») ont été conservées au cours de l'évolution (Sakaguchi et al., 2004). Elles coordonnent adéquatement une multitude de processus biologiques importants suivant leur activation par différentes petites GTPases. Elles sont toutes caractérisées par un module de trois kinases (MAP3K, MAP2K et MAPK) qui assure la transmission de signaux par phosphorylation séquentielle (Figure 1.2). Cette phosphorylation est primordiale pour induire leur

activation. De façon générale, MAP3K induit l'activation de la MAP2K. Cette dernière, qui est caractérisée par une activité à double spécificité, peut induire l'activation de la MAPK en lui phosphorylant deux résidus localisés dans sa boucle d'activation (Dhanasekaran and Premkumar Reddy, 1998). MAPK ainsi activée phosphoryle à son tour une multitude de molécules cibles spécifiques qui garantissent l'établissement d'une réponse biologique appropriée (Torii et al., 2004). Fait à noter, les interactions protéine-protéine occupent une place importante dans la transmission du signal puisqu'elles favorisent entre autres l'assemblage de complexes multiprotéiques qui facilitent les différents événements de phosphorylation. Voici donc une brève description des protéines de type MAPK et de leur mécanisme d'action au sein des cascades de signalisation intracellulaires.

1.4.1. Les MAPKs

Les membres de la famille des MAPKs (Figure 1.2) peuvent être subdivisés en 5 sous-familles, soit ERK (« extracellular signal regulated protein kinases »), JNK/SAPK (« c-Jun NH2 terminal kinases/stress-activated protein kinases »), p38, ERK5/7 et ERK3 (English et al., 1999). ERK1 et ERK2 appartiennent à la première sous-famille et sont principalement impliquées dans la régulation de la prolifération et de la différenciation cellulaire. Leur activation dépend d'une MAP2K, en l'occurrence MEK1 ou MEK2, qui phosphoryle spécifiquement leurs résidus thréonine et tyrosine caractéristiques du motif TEY localisé dans leur boucle d'activation. Les trois membres de la sous-famille JNK/SAPK, soit JNK1, JNK2 et JNK3, sont principalement activés par des stress environnementaux et semblent impliqués dans la régulation de l'apoptose (Chen et al., 2001; Kuan et al., 1999). MKK4 et MKK7 induisent la phosphorylation de leur motif TPY. p38 α , p38 β , p38 γ et p38 δ appartiennent toutes à la sous-famille p38. Leur activation résulte de la phosphorylation de leur motif TGY par MKK3 ou MKK6 en réponse à des stress. p38 α constitue la principale isoforme capable d'induire l'apoptose, alors que p38 β favorise la survie cellulaire (Nemoto et al., 1998). ERK5 et ERK7, appartenant à la

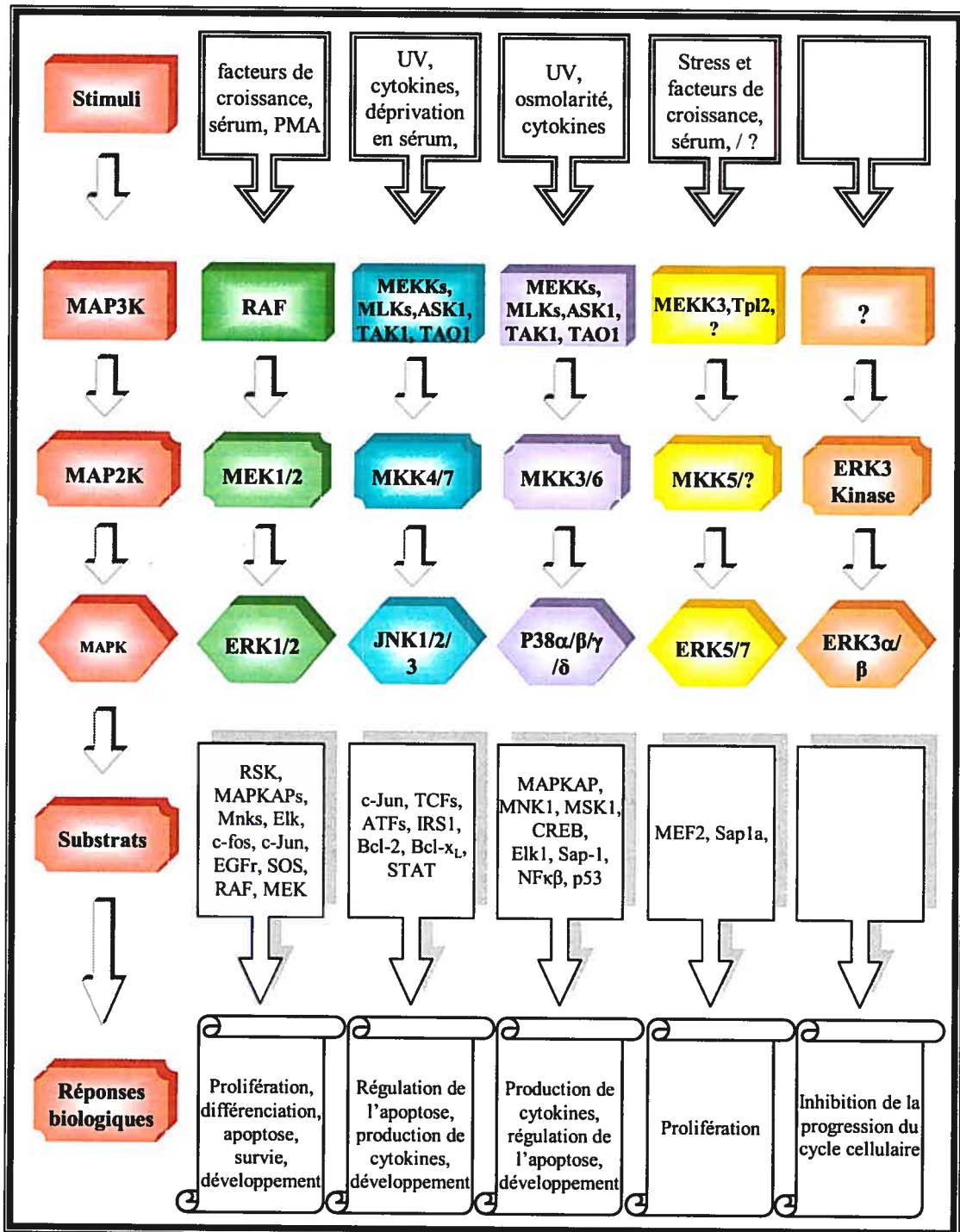


Figure 1.2 Les voies de signalisation de type MAPK. Schéma adapté de (Garrington et al., 1999).

quatrième sous-famille des MAPKs, sont toutes deux caractérisées par le motif TEY. Leurs résidus thréonine et tyrosine doivent être respectivement phosphorylés pour induire leur activation. ERK5 peut être induite par une variété de stimuli incluant divers agents mitogènes et stress environnementaux (Kamakura et al., 1999). MKK5 serait son activateur. À l'inverse, aucune stimulation actuellement connue n'induit l'activation de ERK7. Cette dernière semble être constitutivement activée. Ses substrats sont inconnus, quoiqu'une étude réalisée par double hybride propose l'existence d'une association entre sa portion CT non catalytique et CLIC3, une protéine adjointe à un canal qui module la concentration intracellulaire du chlore (Qian et al., 1999). La dernière sous-famille est représentée par ERK3 (Chen et al., 2001). Son motif d'activation (SEG) ne comprend qu'un seul site phosphoaccepteur, soit le résidu sérine, qui semble d'ailleurs être constitutivement phosphorylé (Bogoyevitch and Court, 2004; Cheng et al., 1996; Julien et al., 2003). La MAPKAP-5 semble être son substrat physiologique (Schumacher et al., 2004; Seternes et al., 2004). La fonction de ERK3 serait potentiellement d'inhiber la progression du cycle cellulaire (Julien et al., 2003).

1.4.1.1. Spécificité du substrat

Les MAPKs phosphorylent leurs substrats sur un résidu sérine ou thréonine. Cette phosphorylation dépend néanmoins de la présence d'une proline en position P+1, le résidu phosphoaccepteur étant en position P+0 (Schaeffer and Weber, 1999). L'analyse cristallographique de la forme activée de ERK2 montre que la phosphorylation de ses résidus localisés dans sa boucle d'activation (motif TEY) induit un changement conformationnel qui engendre l'ouverture d'une pochette dont la fonction consiste à reconnaître spécifiquement la proline en position P+1 du substrat. Sans activation, cette pochette est masquée par une arginine pour empêcher l'association enzyme/substrat d'avoir lieu inutilement (Canagarajah et al., 1997). Ce mécanisme serait potentiellement conservé chez tous les membres de la famille des MAPKs. En effet, il a été montré que l'arginine en position 230 de JNK3 prévient, en condition non activée, l'association du substrat en limitant l'accès du résidu proline (Chen et al., 2001). La partie CT de la boucle

d'activation de p38 interfère également dans l'association du résidu proline (English et al., 1999; Wang et al., 1997).

1.4.1.2. Région d'ancrage des MAPKs

La séquence minimale consensus de phosphorylation des MAPKs (Ser/Thr-Pro) n'est pas la seule information qui leur permet de spécifier correctement quel substrat doit être phosphorylé. D'autres séquences seraient impliquées dans l'établissement d'une spécificité d'interaction enzyme/substrat (Sharrocks et al., 2000). Ces séquences font partie d'une invagination appelée région d'ancrage qui assure l'association du substrat indépendamment de l'état d'activation de l'enzyme (Schaeffer and Weber, 1999; Tanoue et al., 2001). Le domaine CD (« common docking domain ») constitue l'une de ces séquences (Tanoue et al., 2000). Il permet aux MAPKs d'interagir avec affinité aux activateurs, aux inhibiteurs et aux substrats. Ces interactions sont cependant mutuellement exclusives (Tanoue et al., 2000). Le domaine CD contient plusieurs résidus adjacents chargés négativement qui assurent ces différentes associations. Son rôle serait d'augmenter l'efficacité de la réaction enzymatique en assurant l'ancrage adéquat de la molécule cible. Le site ED correspond au second motif également riche en résidus acides localisé dans la région d'ancrage qui semble impliqué dans la spécification des interactions, puisque la mutation d'acides aminés particuliers permet dans certains cas de convertir la spécificité d'association. Par exemple, la mutation des thréonines 157 et 158 de ERK2 en résidus correspondant à ceux de p38 lui permet maintenant, contrairement à ERK2 de type sauvage, d'interagir avec MAPKAP-3, une cible normale de p38. Cette association peut être davantage favorisée si le domaine CD de ERK2 est également mutagenésé de façon à mimer celui de p38. Ce résultat démontre donc l'importance des motifs ED et CD dans la régulation et la spécification des interactions. Il a été proposé que la composition des acides aminés au sein de la région d'ancrage permet l'obtention d'une organisation structurale caractéristique qui serait distincte pour toutes les MAPKs et permettrait de spécifier efficacement chacune de leurs cibles (Tanoue et al., 2001).

1.4.1.3. Motifs d'interaction des molécules cibles

Les facteurs de transcription contiennent tous une séquence d'interactions spécifiquement reconnue par le domaine CD des MAPKs (Kolch, 2000). Cette séquence d'interaction ou domaine D (« docking domain »), contient généralement un motif LxL (x pour n'importe quel acide aminé) localisé 3 à 5 acides aminés en aval d'une région riche en résidus basiques. Plusieurs résidus hydrophobes positionnés en aval du motif LxL sont également requis (Raman and Cobb, 2003; Tanoue and Nishida, 2003). L'espacement et la composition en acides aminés de ces différents motifs seraient déterminants pour assurer aux facteurs de transcription d'être spécifiquement reconnus par une MAPK particulière (Schaeffer and Weber, 1999; Sharrocks et al., 2000; Yang et al., 1998). Or il semble que les MAP2Ks, les MAPKAPs et les phosphatases à double spécificité (MKPs) soient également caractérisées par un motif qui leur permet d'être spécifiquement reconnues. Cette séquence est riche en acides aminés chargés positivement entourés par des résidus hydrophobes (Biondi and Nebreda, 2003; Sharrocks et al., 2000; Tanoue and Nishida, 2002). L'introduction de diverses mutations au sein de ce motif perturbe leur association aux MAPKs (Xu et al., 2001; Zhou et al., 2001).

Certains facteurs de transcription possèdent un domaine de liaison supplémentaire appelé le domaine DEF (« Docking site for ERK, FXFP »; X représente n'importe quel acide aminé) (Fantz et al., 2001; Galanis et al., 2001; Jacobs et al., 1999). Son rôle serait de diriger adéquatement la phosphorylation de résidus (S/T)P spécifiques (Fantz et al., 2001). Contrairement au domaine D, la région d'interaction du motif FXFP au niveau des MAPKs n'a pas encore été identifiée (Pouyssegur et al., 2002). Il est à noter que le motif FXFP ne se limite pas aux facteurs de transcription. La phosphatase MKP-1 et la protéine d'échafaudage KSR en possèdent un (Jacobs et al., 1999; Therrien et al., 1996).

1.4.2. Le module RAF/MEK/ERK

Notre laboratoire s'intéresse à l'une des cascades de signalisation de type MAPK, soit la voie ERK. Elle est définie par un module de trois kinases respectivement appelées RAF, MEK et ERK (Sakaguchi et al., 2004). Cette voie de signalisation a été conservée au

cours de l'évolution des métazoaires et gouverne différents processus cellulaires fondamentaux tels que la prolifération, la différenciation et la survie (Yoshioka, 2004). Les récepteurs tyrosine kinases (RTKs), les récepteurs couplés aux protéines G et les intégrines ont tous la capacité d'induire, suivant l'association de leur agoniste, l'activation de la petite GTPase Ras qui pourra à son tour initier l'activation de cette voie de signalisation (Figure 1.3) (Pouyssegur et al., 2002). Divers événements moléculaires régulent avec exactitude chaque étape du processus d'activation et d'inactivation de la voie ERK. Différentes formes de cancers sont d'ailleurs fréquemment associées à une suractivation de la signalisation ERK (Thompson and Lyons, 2005). Les sections qui suivent décrivent les différentes composantes de la voie ERK en s'attardant aux mécanismes moléculaires nécessaires à la régulation de leurs fonctions respectives.

1.4.2.1. Les récepteurs tyrosine kinases

Les RTKs régulent un grand nombre de processus biologiques fondamentaux. Ils modulent par exemple la progression du cycle cellulaire, le métabolisme, la survie, la prolifération et la différenciation cellulaire (Schlessinger, 2000). Ces récepteurs transmembranaires doivent d'abord percevoir les différents signaux en provenance du milieu extracellulaire, pour ensuite initier la transduction de signaux en direction du noyau dans le but d'induire une réponse physiologique adéquate. Le génome humain encode 58 RTKs subdivisés en 20 sous-familles distinctes (Blume-Jensen and Hunter, 2001; Pawson, 2002; Schlessinger, 2000).

Les RTKs s'associent à leur ligand par l'intermédiaire de leur domaine de liaison extracellulaire. Ils contiennent tous une hélice transmembranaire leur permettant d'être solidement ancrés à la membrane plasmique, ainsi qu'un domaine cytoplasmique caractérisé par un motif ayant une activité tyrosine kinase intrinsèque. Cette région cytoplasmique comporte également des séquences régulatrices additionnelles pouvant être phosphorylées (Hubbard et al., 1998; Hunter, 2000). La région juxtamembranaire positionnée en aval de l'hélice est l'une de ces séquences régulatrices qui permettent, entre autres, une fois phosphorylées, de stabiliser la conformation active du domaine tyrosine kinase (Hubbard, 2002; Huse and Kuriyan, 2002).

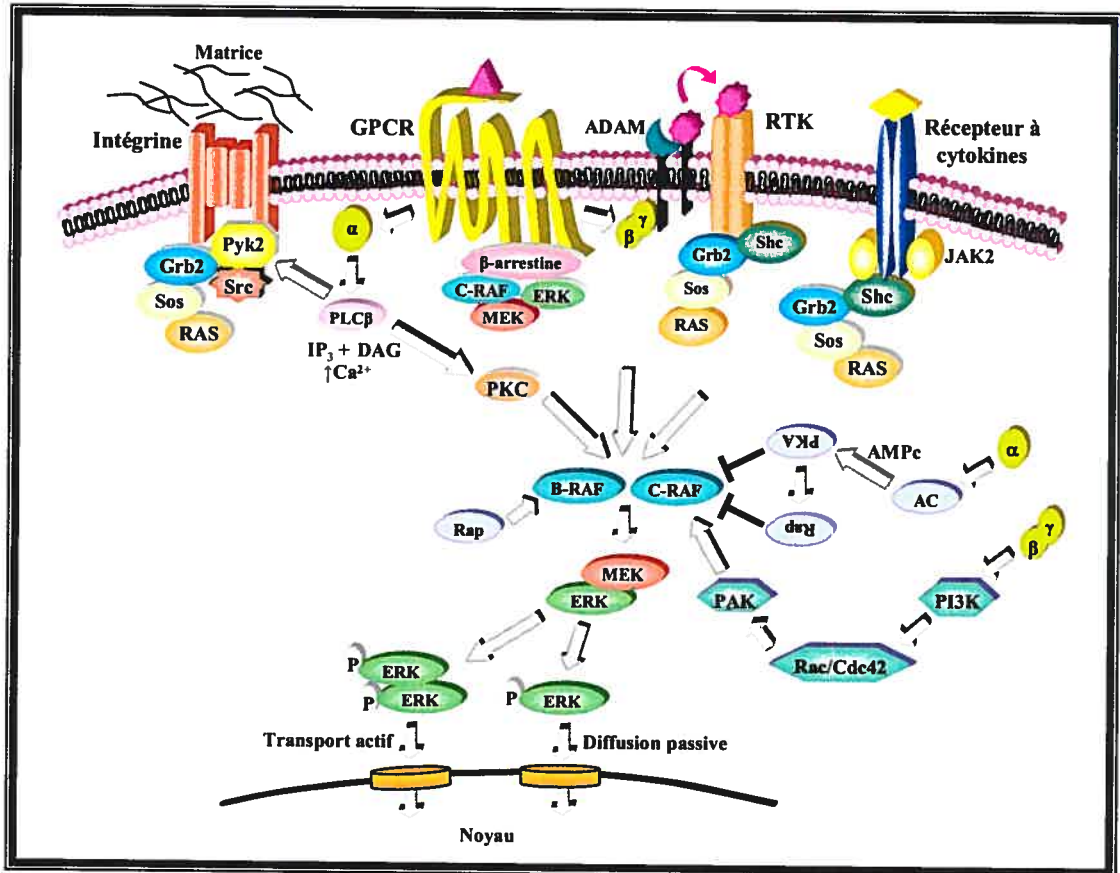


Figure 1.3 Les différents récepteurs pouvant activer la voie de signalisation Ras/ERK.

De façon générale, les RTKs sont monomériques. La liaison d'un ligand induit la dimérisation du récepteur. La juxtaposition des domaines kinases favorise la transphosphorylation de leur résidu tyrosine localisé dans la boucle d'activation, induisant par conséquent leur activité enzymatique. Le récepteur s'autophosphoryle ensuite dans le but de générer des sites d'ancrage nécessaires au recrutement du complexe Grb2/SOS (Whitmarsh and Davis, 1996). L'association du domaine SH2 de Grb2 au récepteur peut soit être directe, soit médiée par une protéine adaptatrice (Shc, IRS-1/2, FRS2). SOS ainsi localisée, induit l'activation de la petite GTPase Ras en favorisant l'échange de son GDP en GTP. Ras-GTP peut dès lors interagir par l'intermédiaire de son domaine effecteur, à RAF dans le but d'initier la transmission du signal en direction du noyau (Hunter, 2000).

1.4.2.2. RAS

L'humain comporte trois gènes *Ras* qui encodent 4 différentes protéines, soit H-Ras, N-Ras, K-Ras 4A et 4B, les deux dernières étant le résultat d'un épissage alternatif (Johnson et al., 1997; Reuther and Der, 2000). Ces gènes ont initialement été identifiés dans le milieu des années 60 comme étant les composantes capables d'induire la transformation des cellules résultant de leur infection par certains virus (Harvey et Kirsten) de rat (Bar-Sagi, 2001; Ehrhardt et al., 2002). Ce n'est qu'au début des années 80 que plusieurs allèles mutants de ces gènes ont été identifiés dans différents types tumoraux humains comme étant des oncogènes encodant des protéines à activité GTPase (Bar-Sagi, 2001; Ehrhardt et al., 2002). D'un point de vue structural, tous les résidus cruciaux responsables de l'activité GTPase sont localisés dans les 165 premiers acides aminés. Ce domaine catalytique est conservé chez toutes les isoformes dont l'homologie de séquence varie entre 90 % et 100 % d'identité. On y retrouve le site de liaison nucléotidique du phosphate β (« Phosphate binding loop ou P-loop ») ainsi que les régions « switch » 1 et 2 (régions exposées en surface selon la cristallographie) capables de modifier à souhait leur conformation lorsque le GTP s'y associe (Spoerner et al., 2001). Le reste des acides aminés localisés en CT définit la région hypervariable qui, comme son nom l'indique, diverge significativement entre les isoformes à l'exception de la boîte CAAX. Ce motif correspond à une séquence (« anchor sequence ») qui assure non seulement l'ancrage de la

protéine à la membrane plasmique, mais également la route qu'elle empruntera pour transiter en direction de ce compartiment. La région hypervariable comporte de plus une séquence appelée « linker » qui est localisée entre le domaine catalytique et la séquence d'ancrage (Bar-Sagi, 2001; Hancock, 2003). Ce motif permet à certaines isoformes de modifier leur microlocalisation au niveau de la membrane plasmique (Hancock, 2003).

Les protéines Ras jouent un rôle essentiel dans la régulation des différentes voies de signalisation qui modulent la prolifération cellulaire. Plusieurs tumeurs comportent certaines mutations activatrices dans l'un des trois gènes *Ras* et caractérisent environ 20 % de tous les cancers que l'on retrouve chez l'humain (Downward, 2003; Takai et al., 2001). *K-Ras* constitue le gène le plus fréquemment muté, soit dans 85 % des cas, alors que *N-Ras* en caractérise environ 15 %. *H-Ras* est, quant à lui, muté dans moins de 1 % des cancers. Ces mutations activatrices compromettent systématiquement l'activité GTPase de Ras en la rendant insensible aux GAPs, ce qui par conséquent prévient l'hydrolyse du GTP. La plupart de ces mutations affectent les acides aminés en position 12, 13 et 61, lesquels semblent impliqués dans la catalyse (Vojtek and Der, 1998). Les glycines 12 et 13 seraient impliquées dans l'organisation spatiale des différents résidus qui médient l'initiation du processus hydrolytique, alors que la glutamine 61 assurerait le positionnement adéquat de la molécule d'eau requise pour attaquer le phosphate en position γ (Scheffzek et al., 1997; Resat et al., 2001). Il semble que les glycines 12 et 13 perturbent également l'affinité de liaison du GDP puisqu'elles font partie du « P-loop ». Cette boucle s'entoure normalement autour du phosphate β du nucléotide (GDP ou GTP) dans le but d'obtenir une interaction stable. L'affinité de liaison du GTP est par contre moins affectée par cette perturbation structurale puisque les régions « switch » 1 et 2 de Ras contribuent également à sa stabilisation, de sorte que ces mutants vont d'emblée lier préférentiellement le GTP (Klockow et al., 2000). Dans tous les cas, ces mutations entraînent une hyperactivation des voies de signalisation Ras dépendantes (Campbell and Der, 2004).

Le fait que les protéines Ras soient ubiquitairement exprimées chez la souris et l'humain, quoique leur niveau d'expression varie entre les différents types cellulaires, suggère de prime abord qu'elles ont des fonctions redondantes (Bar-Sagi, 2001). D'ailleurs, l'analyse phénotypique des souris « Knock out » (K.-O) caractérisées par l'ablation du gène

N-Ras seul ou en combinaison avec le gène *H-Ras*, ne démontre aucun phénotype particulier autant durant la gestation qu'après la naissance. Pourtant, plusieurs analyses semblent démontrer l'existence d'une spécificité d'action. En effet, malgré le profil d'expression similaire des gènes *K-Ras* et *N-Ras*, certaines tumeurs sont fréquemment associées avec la mutation de l'un de ces gènes. Par exemple, 80 % des cancers pancréatiques sont caractérisés par une mutation dans le gène *K-Ras*, alors que 25 % des leucémies aiguës sont associées à une mutation dans le gène *N-Ras* (Bar-Sagi, 2001; Yan et al., 1998). L'analyse phénotypique des souris K.-O pour le gène *K-Ras* a également démontré l'existence d'une spécificité d'action, puisque ces embryons meurent entre le 12^e et le 14^e jour de gestation. À 11,5 jours postcoïtum, les embryons montrent un retard de croissance important, une mort cellulaire accrue au niveau du foie accompagnée d'une légère anémie (Johnson et al., 1997). Aucun phénotype n'est cependant apparent avant 10,5 jours. Il est donc possible de croire que les deux autres isoformes pourraient accomplir les diverses fonctions normalement requises durant les premiers stades de l'embryogenèse. D'ailleurs, les embryons *N-Ras*^{-/-}; *K-Ras*^{+/-} meurent plus précocement d'une sévère anémie. Il semble donc exister une redondance fonctionnelle partielle entre les isoformes de Ras. La région hypervariable, qui diverge significativement entre ces isoformes, serait potentiellement impliquée dans leur spécificité d'action (Hancock, 2003; Hingorani and Tuveson, 2003).

1.4.2.2.1. Modifications posttraductionnelles de RAS

Ras doit subir diverses modifications posttraductionnelles qui lui permettent d'être correctement ancrée à la membrane plasmique dans le but d'exercer sa fonction (Gelb et al., 1998). La première modification est une prénylation au cours de laquelle un groupement farnesyl ou géranylgeranyl est ajouté. La farnésyltransférase (FTase) et la géranylgeranyltransférase (GGTase) catalysent respectivement ces additions lipidiques. Elles reconnaissent une courte séquence, soit la boîte CAAX, localisée dans la région hypervariable de Ras. Le X détermine quelle enzyme et par conséquent quel groupement modifiera la cystéine de la boîte CAAX (A pour acide aminé aliphatique). Si le X correspond à une sérine, une méthionine ou une glutamine, la protéine sera reconnue par la

Ftase, alors que s'il s'agit d'une leucine, la cystéine sera modifiée par la GGTase (Casey, 1995; Resh, 1996; Zhang and Casey, 1996). Suivant cette prénylation, les résidus AAX sont clivés par une endoprotéase membranaire localisée au niveau du réticulum endoplasmique (RE). La cystéine prénylée est ensuite méthylée par une méthyltransférase, également ancrée au RE, dans le but d'éliminer la charge négative obtenue suivant le clivage protéolytique (Bivona and Philips, 2003; Dai et al., 1998; Magee and Marshall, 1999; Silvius, 2002). Pour parvenir à la membrane plasmique, Ras fait appel à un « second signal » lui permettant de transiter vers ce compartiment. Ce signal correspond à une séquence d'environ vingt acides aminés en amont de la boîte CAAX qui contient l'information nécessaire et suffisante pour assurer cette relocalisation (Choy et al., 1999; Takai et al., 2001). Cette séquence permet à N-Ras et H-Ras de subir au niveau du RE, une seconde modification au cours de laquelle un acide gras palmitate est respectivement ajouté à une ou deux cystéines (Hancock, 2003). Cette modification permet d'augmenter l'hydrophobicité des protéines pour assurer un solide ancrage à la membrane plasmique (Ehrhardt et al., 2002). Les vésicules de transport de la voie de sécrétion constitutive assurent leur déplacement (Apolloni et al., 2000; Choy et al., 1999; Silvius, 2002). K-Ras 4A est également palmitoylée, cependant il n'est pas clair si elle transite ou non au golgi avant de s'ancrer à la membrane plasmique. K-Ras 4B est quant à elle caractérisée par une séquence polybasique riche en résidus lysines chargée positivement qui lui permet de s'associer aux phospholipides membranaires potentiellement par interaction électrostatique (Magee and Marshall, 1999; Reuther and Der, 2000). La route qu'emprunte K-Ras 4B pour y parvenir n'est cependant pas connue (Apolloni et al., 2000; Hingorani and Tuveson, 2003).

1.4.2.2.2. Activation de Ras

Suite à l'activation des récepteurs (Figure 1.3), Ras doit rapidement relâcher le GDP pour ensuite lier le GTP. Ce relâchement est limitant puisque le GDP est associé de façon stable. Sans l'intervention d'une GEF, Ras serait incapable de répondre rapidement aux signaux externes. SOS par exemple permet de réduire adéquatement l'affinité de liaison du GDP, assurant ainsi sa dissociation en moins d'une seconde. Pour ce faire, SOS doit

d'abord être recrutée à la membrane plasmique par Grb2, une molécule adaptatrice qui lie de façon constitutive SOS grâce à son domaine SH3. Le domaine SH2 de Grb2 peut, quant à lui, interagir avec un récepteur activé en fixant une phosphotyrosine spécifique. Ce recrutement permet ainsi d'augmenter localement la concentration de SOS à proximité de Ras dans le but de favoriser l'échange nucléotidique (Nimnual and Bar-Sagi, 2002). SOS doit d'abord se complexer à Ras-GDP en liant directement la région « switch » 2 de Ras pour ensuite favoriser le déplacement de la région « switch » 1. Ce déplacement détruit les différents points de contact de faibles affinités entre « switch » 1 et le GDP, entraînant par conséquent l'ouverture du site de liaison nucléotidique, ce qui réduit l'affinité d'association de Ras pour le GDP (Boriack-Sjodin et al., 1998; Wittinghofer, 1998). La forte concentration cellulaire en GTP, laquelle est dix fois supérieure à celle du GDP, favoriserait son association à Ras (Boriack-Sjodin et al., 1998; Cherfils and Chardin, 1999; Geyer and Wittinghofer, 1997).

Plusieurs GEFs pour Ras ont jusqu'à maintenant été identifiées. Outre SOS, SmgGDS, Ras-GRP et Ras-GRF ont toute cette capacité. Elles démontrent cependant une certaine spécificité concernant les isoformes de Ras qu'elles peuvent activer (Bivona and Philips, 2003; Olson and Marais, 2000; Takai et al., 2001). Cette spécificité d'activation pourrait participer dans l'établissement d'une réponse biologique adéquate.

1.4.2.2.3. Lieux d'activation de Ras

La localisation des isoformes de Ras à la membrane plasmique diffère de par la divergence de leur région hypervariable. Contrairement à K-Ras 4B, H-Ras est enrichie au niveau d'une structure lipidique très ordonnée et riche en cholestérol appelée « raft ». Suite à son activation, H-Ras est cependant redirigée vers la portion désordonnée de la membrane plasmique par l'intermédiaire de sa séquence « linker » (Hingorani and Tuveson, 2003; Jaumot et al., 2002; Reuther and Der, 2000). Cette localisation différentielle pourrait servir à réguler non seulement leur activation par des RTKs spécifiques, mais également à déterminer quels effecteurs en aval seront induits et ce, en fonction de leur disponibilité dans un microenvironnement donné (Prior et al., 2001). D'ailleurs, C-RAF semble

principalement activée par K-Ras, alors que la PI3K serait préférentiellement activée par H-Ras (Yan et al., 1998).

Ras peut également être activée dans les endomembranes (Bondeva et al., 2002; Chiu et al., 2002). Ce résultat a ébranlé le dogme voulant que l'activation de Ras et son mécanisme d'action se fassent exclusivement à la membrane plasmique. En effet, l'ajout d'EGF induit rapidement l'activation de Ras à la membrane plasmique suivie par une activation soutenue au niveau du golgi. Cette activation ne semble cependant pas être le résultat d'un transport vésiculaire issu de la membrane plasmique (Chiu et al., 2002). La GTPase Ras-GRP1 serait en fait responsable de cette activation suivant l'induction de la PLC γ par Src. En effet, le relâchement du calcium (Ca^{2+}) induit par la PLC γ favoriserait la relocalisation de la GEF au golgi dans le but d'y activer H-Ras et ainsi obtenir une activation soutenue de la voie. Ce Ca^{2+} permettrait simultanément d'induire CAPRI (calcium-promoted Ras inactivator), une Ras-GAP capable de réguler négativement l'activité de K-Ras associée à la membrane plasmique (Bivona et al., 2003; Walker et al., 2003). Cette activation soutenue au golgi serait d'ailleurs essentielle à la différenciation des cellules PC12, laissant ainsi présager la pertinence fonctionnelle de ce compartiment subcellulaire dans l'induction d'une réponse biologique particulière (Bivona et al., 2003).

1.4.2.2.4. Inactivation de Ras

Pour inactiver la petite GTPase Ras, celle-ci doit hydrolyser le GTP lié grâce à son activité GTPase intrinsèque. Sa vitesse de réaction est cependant très lente et doit être accélérée pour éviter une suractivation inadéquate de la voie (Wittinghofer, 1998). Les protéines GAPs, par l'intermédiaire de leur association à Ras, permettent d'accélérer efficacement ce processus hydrolytique (Scheffzek et al., 1998). Ras-GAP, NF1, GAP1 et SynGAP sont autant de GAPs capables de favoriser l'hydrolyse du GTP en GDP. Elles ont cependant certaines préférences concernant l'isoforme de Ras avec laquelle elles interagissent, offrant ainsi de la spécificité (Olson and Marais, 2000).

L'analyse cristallographique du complexe Ras-GTP/Ras-GAP a permis de comprendre le mécanisme moléculaire par lequel Ras-GAP catalyse l'hydrolyse du GTP

(Scheffzek et al., 1997; Sprang, 1997). En effet, Ras-GAP stabilise les régions « switch » de Ras et permet l'orientation optimale des résidus impliqués dans la réaction. Ras-GAP fournit un résidu catalytique additionnel (arginine invariable) essentiel à la réaction d'hydrolyse en l'insérant au niveau du site actif de Ras (Scheffzek et al., 1997; Scheffzek et al., 1998; Sprang, 1997). Cette arginine interagit non seulement avec le phosphate en position γ du GTP, mais établit également un contact avec la glutamine 61 de Ras dans le but de l'orienter adéquatement pour qu'elle puisse à son tour positionner correctement une molécule d'eau en direction du phosphate en position γ du GTP (Scheffzek et al., 1998). Cette molécule d'eau induit alors l'attaque nucléophile, entraînant par conséquent le relâchement de ce phosphate inorganique (Sprang, 1997).

1.4.2.2.5. Effecteurs de Ras

Outre les protéines GAPs, la petite GTPase Ras peut lier un bon nombre de substrats protéiques appelés effecteurs de Ras (Figure 1.4). Pour être un effecteur, il faut par définition interagir spécifiquement avec la forme activée de Ras et donc GTP lié, par l'intermédiaire d'une surface d'interaction négativement chargée appelée le domaine effecteur (Scheffzek et al., 1997). Ce domaine assure le recrutement efficace des molécules effectrices dans le but d'initier leur processus d'activation (Zwartkruis and Bos, 1999). Ras-GTP a la capacité d'activer plusieurs voies de signalisation (Figure 1.4) qui fréquemment coopèrent dans le but d'induire des réponses biologiques appropriées (Shields et al., 2000). À titre d'exemple, l'augmentation de l'expression de la cycline D1 nécessaire à la progression du cycle cellulaire dépend à la fois de l'activation de RAF, de Ral-GDS et de PI3K (Gille and Downward, 1999). Ainsi, chaque réponse induite suivant l'activation de la petite GTPase Ras dépend d'un ensemble d'événements résultant de la communication entre les différentes voies de signalisation. Voici donc les mécanismes de régulation des composantes du module ERK suivant l'activation de Ras.

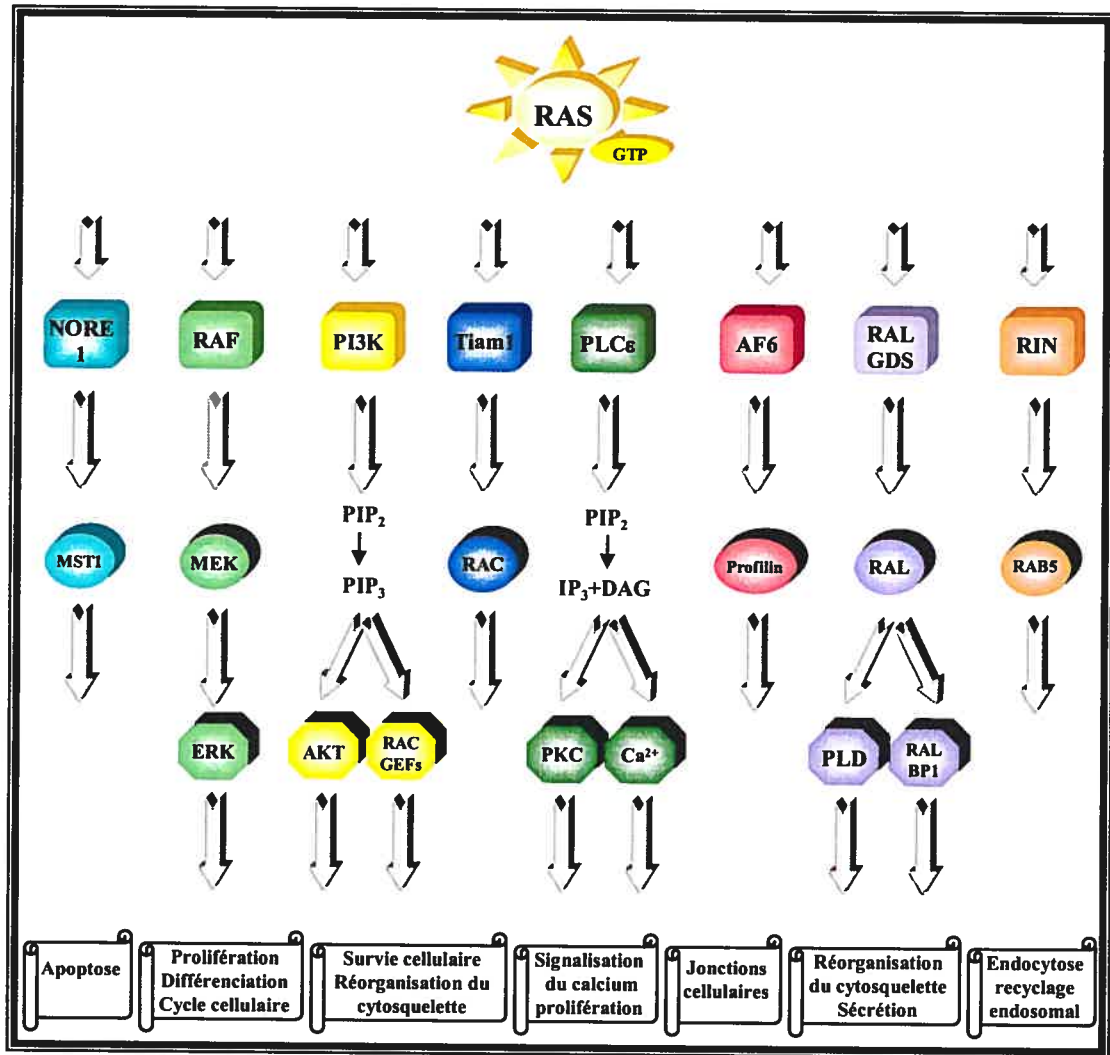


Figure 1.4 Effecteurs de Ras. Schéma adapté de (Shields et al., 2000; Ehrhardt et al., 2002).

1.4.2.3. RAF

La sérine/thréonine kinase RAF est l'un des tout premiers effecteurs de Ras à avoir été caractérisé chez les mammifères (Downward, 2003). Elle a initialement été isolée comme oncogène à partir de rétrovirus pouvant infecter la souris et le poulet. Plusieurs homologues chez différentes espèces animales incluant la drosophile et le nématode, ont ensuite été clonés. Aucun homologue n'a cependant été trouvé chez la levure (Kolch, 2000; Mercer and Pritchard, 2003). Chez les mammifères, trois isoformes ont été identifiées, soit A-RAF, B-RAF et C-RAF. A-RAF est principalement exprimée dans les différents tissus du système urogénital, alors que B-RAF se retrouve au niveau du système neuronal, des testicules et des cellules hématopoïétiques. C-RAF semble être ubiquitairement exprimée chez la souris (O'Neill and Kolch, 2004).

L'analyse phénotypique des souris K.-O pour A-RAF, B-RAF et C-RAF a permis de mettre en lumière certaines fonctions qui leur sont particulières (Hagemann and Rapp, 1999; O'Neill and Kolch, 2004). Par exemple, A-RAF aurait un rôle à jouer au cours du développement neurologique et intestinal (Pritchard et al., 1996; Wojnowski et al., 1998). Les souris *a-raf*^{-/-} meurent entre le septième et le vingt et unième jour après leur naissance. B-RAF serait quant à elle indispensable au mécanisme de vascularisation embryonnaire ainsi que dans la survie des cellules endothéliales. Les embryons meurent *in utero* au jour embryonnaire 12,5 d'une importante hémorragie (Wojnowski et al., 1997). L'apoptose généralisée à travers l'embryon correspond au phénotype résultant de l'élimination du gène *c-raf*. Ces embryons, mourant *in utero* entre 10,5 et 12,5 jours suivant la fertilisation, montrent non seulement un retard de croissance important, mais également une organogenèse tissu-spécifique affectée. Certains embryons franchissent cependant la période de gestation, mais meurent rapidement après leur naissance en raison de l'immaturation de leurs poumons et de leur peau (Mercer et al., 2002; Mikula et al., 2001; Wojnowski et al., 1998).

1.4.2.3.1. Structure des isoformes de RAF

Les homologues de RAF partagent une architecture similaire qui comporte trois régions conservées (CR1, CR2 et CR3). La première région ou CR1, comporte d'une part le site de liaison à Ras (RBD; Ras binding domain) et d'autre part, une région riche en cystéines (CRD; cysteine-rich domain) qui peut également lier Ras-GTP (Drugan et al., 1996). Le CR2 est une séquence riche en résidus sérines et thréonines. Ces régions CR1 et CR2 sont toutes deux localisées dans la partie amino-terminale (NT) de RAF et constituent la région régulatrice qui module l'activité du domaine kinase de RAF (Morrison et al., 1993). Cette fonction régulatrice serait également conservée chez A-RAF et B-RAF (Huser et al., 2001). Le CR3 correspond au domaine kinase de RAF et se retrouve dans la portion CT de la protéine (Figure 1.5).

1.4.2.3.2. Régulation de l'activation de C-RAF

C-RAF est soumise à une régulation complexe définie par un ensemble d'événements moléculaires collectivement requis pour obtenir une activation maximale. Le recrutement membranaire, l'oligomérisation et la phosphorylation de résidus particuliers correspondent à quelques-unes des étapes auxquelles C-RAF doit être soumise. Parmi ces événements, plusieurs semblent être conservés au sein du processus d'activation des isoformes A-RAF et B-RAF (Baccarini, 2005; Wellbrock et al., 2004). Les prochaines sections discutent des mécanismes moléculaires impliqués dans la régulation de l'activité de C-RAF et relatent les différentes similitudes qui existent entre les isoformes.

1.4.2.3.2.1. Autorégulation négative de C-RAF

La découverte de l'oncogène viral v-RAF, caractérisé par la délétion de sa partie NT, a permis de faire une première incursion dans le mode de régulation de C-RAF. Plusieurs analyses biochimiques ont par la suite confirmé qu'une troncation de la portion NT de C-RAF, qui comprend les régions conservées CR1 et CR2, était suffisante pour générer une forme constitutivement activée. Ces observations ont permis de proposer

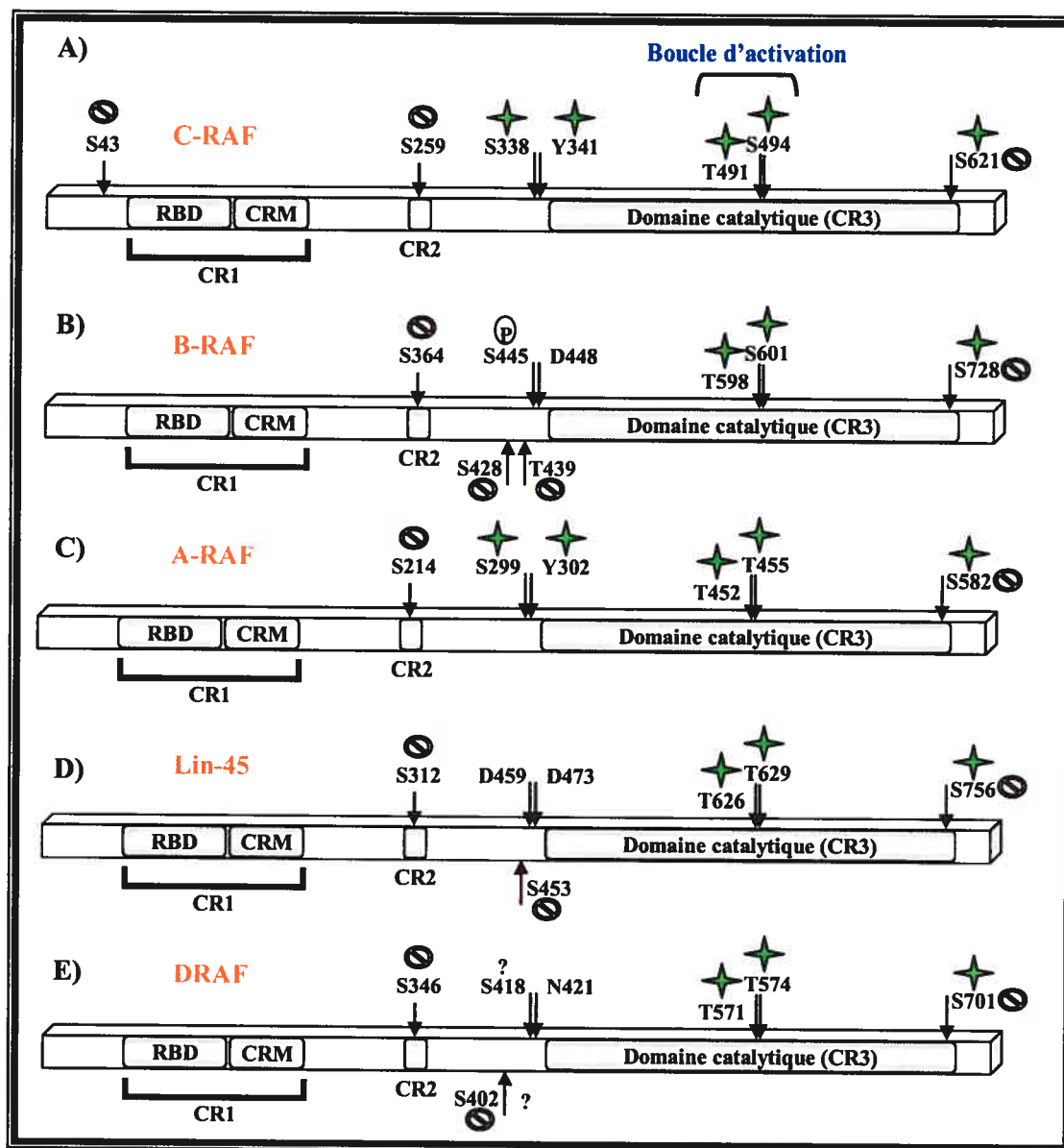


Figure 1.5 Homologues de RAF chez les mammifères, le nématode et la drosophile. Schémas adaptés de (Chong et al., 2003).

- ★ Sites de phosphorylation requis positivement dans l'activation du domaine kinase.
- ⊖ Sites de phosphorylation qui régulent négativement l'activité.

l'hypothèse suggérant l'implication de la partie NT de C-RAF dans la régulation négative de son activité catalytique (Chong and Guan, 2003; Cutler et al., 1998). Cette région régulatrice module l'activité kinase de deux façons. La première consiste à maintenir C-RAF dans une conformation inactive en masquant les différents sites de phosphorylation requis pour son activation en absence d'un signal. Le second rôle implique son association à Ras, ce qui a pour effet de recruter C-RAF à la membrane plasmique suivant l'activation de la voie. En absence d'un signal, la conformation inactive de C-RAF est stabilisée par l'association de protéines chaperonnes de type 14-3-3, dont les sites de liaison sur C-RAF correspondent à deux phosphosérines en position 259 et 621. Le CRD de C-RAF participe également à cette conformation inactive en interagissant d'une part avec le domaine kinase et d'autre part avec 14-3-3 (Figures 1.6A et B) (Clark et al., 1997; Cutler et al., 1998; Dhillon and Kolch, 2002; Light et al., 2002; Michaud et al., 1995; Thorson et al., 1998). Suite à l'activation de Ras, C-RAF est recrutée à la membrane plasmique. La S259 peut alors être déphosphorylée suivant le déplacement de 14-3-3. Selon Morrison et ses collègues, ce déplacement pourrait potentiellement être le résultat de l'association du RBD de C-RAF à Ras (Morrison and Cutler, 1997). Cependant, le déplacement de 14-3-3 ne semble pas être suffisant pour instabiliser l'interaction du NT de C-RAF à son domaine kinase, puisque la mutation de la S259 n'empêche pas cette association d'avoir lieu sauf si Ras activée est coexprimée. La dissociation entre le NT et le domaine kinase de C-RAF serait plutôt médiée par l'exposition du domaine CRD suivant la liaison de Ras au motif RBD de C-RAF (Morrison and Cutler, 1997). Le CRD serait alors disponible pour interagir avec Ras et/ou des composantes de la membrane plasmique permettant ainsi de relâcher complètement toute forme de répression négative imposée sur la structure de C-RAF. L'une des fonctions de 14-3-3 serait donc de masquer le CRD de C-RAF pour l'empêcher de s'associer à la membrane (Sendoh et al., 2000).

1.4.2.3.2.2. Oligomérisation de RAF

L'oligomérisation constitue une étape importante dans l'activation des RTKs. L'association de l'agoniste assure la juxtaposition des domaines kinases intracellulaires,

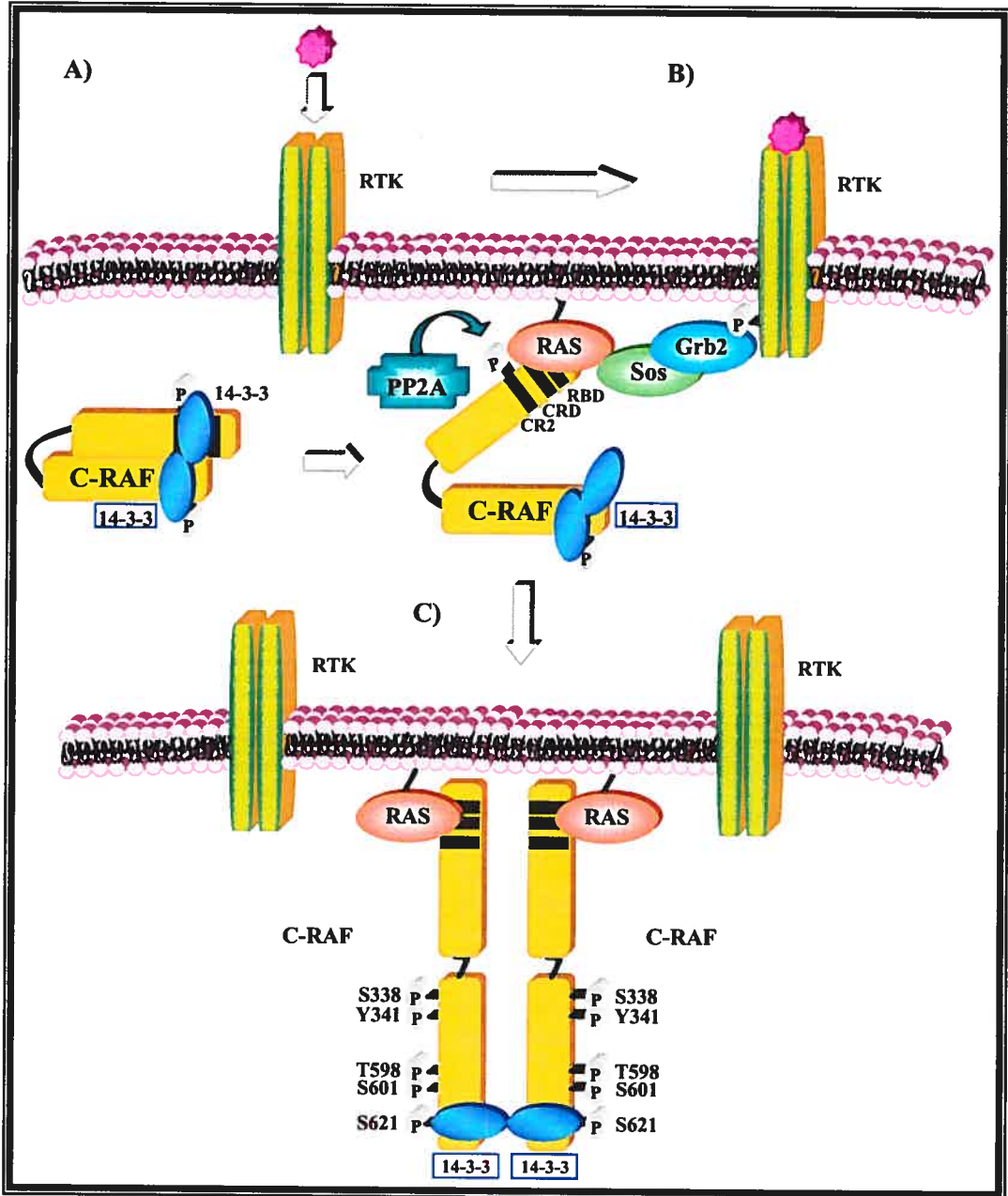


Figure 1.6 Mécanisme d'activation de C-RAF. (A) C-RAF est maintenue dans un état inactif en absence d'un signal. (B) Ras-GTP recrute C-RAF à la membrane plasmique. 14-3-3 est ainsi déplacée. La S259 est déphosphorylée par PP2A. (C) L'oligomérisation de C-RAF stabilise la conformation ouverte et favorise la phosphorylation des sites activateurs. Schémas adaptés de (Heckman et al., 2004).

favorisant par conséquent leur activation par transphosphorylation (Jiang and Hunter, 1999). Dans certains cas, cette oligomérisation n'est pas suffisante. Le récepteur à cytokine EpoR par exemple est constitutivement sous la forme d'un dimère (Livnah et al., 1999). Les domaines cytoplasmiques seraient cependant mal orientés l'un par rapport à l'autre pour éviter toute activation inadéquate. L'association du ligand favoriserait l'induction d'un changement conformationnel au niveau des récepteurs qui modifierait leur organisation tridimensionnelle dans le but de les activer (Remy et al., 1999). Différentes protéines kinases cytoplasmiques régulant divers processus cellulaires semblent également avoir recours à une étape d'oligomérisation pour initier leur activation par transphosphorylation. PKR, MEKK2, PDK1, MST2 sont autant d'exemples qui démontrent l'importance de l'oligomérisation dans leur processus d'activation (Cheng et al., 2005; Lemaire et al., 2005; O'Neill et al., 2004; Wick et al., 2003). Il est donc concevable de croire que l'activation de C-RAF pourrait également dépendre d'un tel événement. Or plusieurs évidences le suggèrent (Farrar et al., 1996; Farrar et al., 2000; Luo et al., 1996). D'ailleurs Ras semble avoir la capacité de se dimériser pour recruter deux molécules de RAF à la membrane (Inouye et al., 2000). Selon certaines analyses biochimiques, il semblerait que l'oligomérisation de RAF induit et/ou stabilise un changement conformationnel qui serait nécessaire à l'induction de son activité catalytique. Elle pourrait contribuer à l'exposition de la S259 en permettant la formation d'un pont intermoléculaire entre les molécules de 14-3-3 toujours associées à la S621, stabilisant par conséquent un complexe oligomérique (Figure 1.6C) (Goetz et al., 2003; Rommel et al., 1997). Aucune étude n'a cependant démontré l'implication d'une transphosphorylation de résidus clés résultant de l'oligomérisation de C-RAF (Figure 1.6C) (Goetz et al., 2003). Il est possible que son domaine kinase nécessite une modification allostérique supplémentaire qui permettrait l'exposition de ses sites phosphorégulateurs localisés dans la boucle d'activation.

1.4.2.3.2.3. La phosphorylation

Plusieurs événements de phosphorylation/déphosphorylation semblent également nécessaires à la régulation de l'activité kinase de C-RAF (Diaz et al., 1997; Stokoe and

McCormick, 1997). Ce mode de régulation pourrait potentiellement être conservé chez toutes les espèces (Chong et al., 2003). Il existe cependant certaines particularités entre les différents homologues (Figure 1.5). La section qui suit discute des principaux résidus qui doivent être phosphorylés pour assurer l'activation de C-RAF tout en comparant l'homologie entre les isoformes.

1.4.2.3.2.3.1. Les régulateurs positifs dans l'activation de RAF

C-RAF possède cinq sites de phosphorylation qui sont essentiels à son activation, dont quatre sont induits par Ras (Figure 1.5A) (Chong et al., 2003; Wellbrock et al., 2004). Le recrutement de C-RAF à la membrane plasmique par Ras activée constitue l'étape initiale menant vers la phosphorylation de ses sites. Sans cette translocation, l'activation de C-RAF semble impossible (Mason et al., 1999).

La phosphorylation de la sérine 338 (S338) et de la tyrosine 341 (Y341) correspond à deux de ces sites induits suivant sa relocalisation membranaire (Diaz et al., 1997; Fabian et al., 1993; Mason et al., 1999; Yip-Schneider et al., 2000). Ces sites sont conservés chez l'isoforme A-RAF (S299 et Y302) et semblent être régulés conformément à C-RAF (Figure 1.5C) (Marais et al., 1997; Mason et al., 1999). L'isoforme B-RAF possède également une sérine en position homologue à la S338, cependant elle est constitutivement phosphorylée (S445). Le résidu équivalent à la Y341 correspond quant à lui à un acide aspartique (D448) (Figure 1.5B). Ces différences laissent donc présager un mécanisme de régulation différent (Marais et al., 1997).

La Y341 de C-RAF est phosphorylée par Src (King et al., 2001; Marais et al., 1997; Mason et al., 1999). Les membres de la famille des tyrosine kinases JAK pourraient également phosphoryler ce site (Xia et al., 1996; Yip-Schneider et al., 2000). La kinase qui phosphoryle la S338 n'a toutefois pas encore fait l'unanimité. Plusieurs groupes de recherche suggèrent l'implication des sérine/thréonine kinases PAK1, 2 et 3 dans la phosphorylation de ce site (King et al., 1998; Li et al., 2001; Sun et al., 2000; Zang et al., 2002). Le modèle proposé est le suivant : Ras-GTP induit l'activation de la PI3K, laquelle permet à son tour l'activation des protéines GEFs spécifiques aux petites GTPases Rac et

Cdc42. Ces dernières peuvent s'associer à PAK et stimuler son activité. PAK interagit alors avec le domaine kinase de C-RAF et favorise la phosphorylation de la S338. Néanmoins, plusieurs résultats sont incompatibles avec ce modèle, ce qui par conséquent met sérieusement en doute l'implication de PAK en tant que médiateur physiologique dans la phosphorylation de la S338 de C-RAF induite par des facteurs de croissance (Chaudhary et al., 2000; Chiloehes et al., 2001; King et al., 1998; Mason et al., 1999; Sun et al., 2000; Wellbrock et al., 2004; Zang et al., 2002).

La S338 et la Y341 sont toutes deux localisées en amont du domaine kinase dans une région appelée la « Negative-charge regulatory region » (« N region ») (Figure 1.1). Ce nom vient du fait que C-RAF doit nécessairement avoir des charges négatives dans cette région pour promouvoir l'activation de son domaine kinase (Mason et al., 1999; Wellbrock et al., 2004). La phosphorylation Ras dépendante des résidus S338 et Y341 procure d'ailleurs ces charges négatives. Ces dernières seraient impliquées dans la réorientation de l'hélice α C du domaine kinase de C-RAF, permettant ainsi d'aligner correctement les différents résidus requis au processus d'activation. Sans cette phosphorylation, la « N région » semble induire certaines interactions intramoléculaires qui favoriseraient la conformation inactive du domaine kinase (Mason et al., 1999). L'analyse de la structure cristallographique du domaine kinase de B-RAF fournit une évidence supplémentaire concernant l'implication possible de la « N region » dans la stabilisation de la conformation active du domaine kinase (Figure 1.1B). En effet, il semble que le résidu D447 (homologue de la Y340 de C-RAF) fait contact avec l'arginine 505 de l'hélice α C (Mason et al., 1999; Wan et al., 2004). Cette interaction pourrait contribuer à stabiliser la conformation nécessaire à la catalyse. Plusieurs observations permettent donc d'expliquer moléculairement la raison pour laquelle B-RAF est fréquemment mutée dans divers cancers (Davies et al., 2002) (voir section 1.4.2.3.3, page 39). B-RAF pourrait être une cible adéquate puisqu'elle possède de prime abord une forte activité basale caractérisée par la présence constante de charges négatives dans sa « N region » (Mason et al., 1999; Wan et al., 2004). Une seule altération génétique pourrait être suffisante pour entraîner l'expression d'une forme constitutivement activée, contrairement à A-RAF et C-RAF qui doivent nécessairement être phosphorylées sur leurs résidus sérine et tyrosine pour obtenir

une activation maximale. D'ailleurs, l'introduction d'une mutation activatrice initialement identifiée chez B-RAF à son homologue C-RAF, est incapable de conduire à une augmentation significative de l'activité kinase de C-RAF (Davies et al., 2002; Wellbrock et al., 2004).

La phosphorylation de la S338 et de la Y341 est également impliquée dans l'inhibition de l'autorégulation négative de C-RAF (voir section 1.4.2.3.2.1, page 27). Ces événements de phosphorylation préviennent l'effet inhibiteur exercé par la région régulatrice de C-RAF sur son domaine kinase en stabilisant une conformation ouverte (Tran and Frost, 2003; Wellbrock et al., 2004). L'isoforme B-RAF semble, quant à elle, se comporter un peu différemment. En effet, la surexpression de la portion NT de B-RAF peut toujours inhiber l'activité de son domaine kinase malgré la phosphorylation constitutive de la S445 (homologue à la S338). La mutation de cette sérine 445 en alanine augmente cependant l'affinité d'association entre la région régulatrice NT de B-RAF et son domaine kinase, ce qui se traduit par l'inhibition de son activité catalytique. Ce résultat suggère donc l'implication de la S445 dans la régulation négative de l'activité auto-inhibitrice induite par le NT de B-RAF. Toutefois, seule la phosphorylation de résidus localisés dans sa boucle d'activation peut relever l'auto-inhibition exercée par la surexpression du NT de B-RAF sans toutefois perturber sa capacité à s'associer au domaine kinase (Figure 1.5B). La surexpression d'une forme oncogénique de Ras peut néanmoins perturber l'association NT/CT en autant que la liaison Ras/B-RAF soit intacte. Ainsi, parallèlement à C-RAF, un changement conformationnel médié par la liaison de Ras doit inhiber l'association NT/CT de B-RAF. La S445 constitutivement phosphorylée prédispose B-RAF au processus d'activation en réduisant l'affinité d'association entre le NT/CT, alors que la phosphorylation de certains résidus dans sa boucle d'activation (T598 et S601) entraîne l'insensibilisation du domaine kinase de B-RAF à l'autorégulation négative (Tran et al., 2005). Le mécanisme de régulation de lin-45 chez *C. elegans* pourrait être analogue puisque sa « N region » contient deux acides aspartiques en positions équivalentes à la S338 et la Y341 (Figure 1.5D) (Marais et al., 1997). RAF de drosophile (DRAF) contient une asparagine au lieu d'une tyrosine, la sérine équivalente à la S338 est cependant conservée (Figure 1.5E). Fait à noter, l'asparagine est précédée de deux acides

glutamiques qui pourraient potentiellement fournir les charges négatives (Chong et al., 2001).

La thréonine 491 (T491) et la sérine 494 (S494) localisées dans la boucle d'activation du domaine kinase de C-RAF doivent également être phosphorylées pour atteindre une activation maximale. Leur mutation en alanines réduit l'activité kinase induite par une forme oncogénique de Ras, alors que leur substitution en résidus phosphomimétiques (T491E/S494D) entraîne une élévation de l'activité basale. Cette activation peut être davantage augmentée par Ras activée, puisque C-RAF doit également être phosphorylée sur ses résidus S338 et Y341 pour être pleinement activée (Figure 1.5A) (Chong et al., 2001; Zhang and Guan, 2000). D'ailleurs, seule la mutagenèse des quatre sites en résidus acides entraîne l'activation maximale de C-RAF (Chong et al., 2003). La T491 et la S494 sont hautement conservées chez tous les homologues de RAF, toutes espèces confondues. Chez *C. elegans* par exemple, la substitution des résidus correspondants (T626 et T629) en résidus phosphomimétiques engendre un phénotype multivulvaire caractéristique d'une suractivation de la voie Ras/ERK, confirmant ainsi leur pertinence fonctionnelle au sein de la signalisation (Figure 1.5D) (Chong et al., 2001; Chong et al., 2003). Ces sites ont originellement été identifiés chez B-RAF (T598 et S601) (Figure 1.5B) (Chong et al., 2003; Zhang and Guan, 2000). Leur mutation en alanines résulte également en une perte d'activation de B-RAF, alors que leur substitution en acides aminés phosphomimétiques occasionne une activation constitutive. Contrairement à C-RAF, l'activité kinase de B-RAF devient indépendante de Ras compte tenu du fait que B-RAF ne requiert aucune phosphorylation dans sa « N region ». Chadee et al. ont démontré que l'ablation de MLK3 par RNAi prévient la phosphorylation des sites T598 et S601 de B-RAF suivant l'activation de la voie ERK par l'EGF (Chadee and Kyriakis, 2004; Chadee and Kyriakis, 2004). Cette phosphorylation n'est cependant pas directement médiée par MLK3. La phosphorylation des résidus homologues chez C-RAF (T491 et S494) n'est toutefois pas perturbée par l'ablation de MLK3. Or cette MAP3K, normalement induite par les cytokines, régule l'activation des composantes de la voie JNK. Sa participation au sein du processus d'activation de B-RAF permet donc d'apprécier les

interconnexions qui existent chez les différentes voies de signalisation dans le but d'induire une réponse biologique appropriée.

La phosphorylation de la sérine 621 (S621) de C-RAF semble être requise durant son processus d'activation (Figure 1.5A) (Hekman et al., 2004; Morrison et al., 1993; Yip-Schneider et al., 2000). Cette sérine est constitutivement phosphorylée et ne semble pas être perturbée suivant son activation (Hekman et al., 2004; Morrison et al., 1993; Thorson et al., 1998). Or de récentes études réalisées par Heckman et al. suggèrent l'existence d'une régulation rapide et transitoire de la phosphorylation de la S621 (Hekman et al., 2004; Wellbrock et al., 2004). Cette phosphorylation serait de prime abord le résultat d'une réaction d'autophosphorylation (Hekman et al., 2004; Thorson et al., 1998). L'association de 14-3-3 semble nécessaire à la stabilisation de cette phosphorylation. D'ailleurs l'activité kinase de C-RAF^{CT} peut davantage être stimulée par la surexpression de 14-3-3 et résulte en une augmentation du niveau de phosphorylation de sa S621. Ce résultat suggère donc que le niveau d'expression de 14-3-3 régule la stoechiométrie de phosphorylation de la S621 et par le fait même, l'activité catalytique du domaine kinase de C-RAF (Thorson et al., 1998). D'après l'homologie de séquence, cette sérine 621 est conservée chez certaines espèces animales, laissant ainsi présager un mécanisme de régulation potentiellement similaire à celui de C-RAF (Figures 1.5D et E) (Hsu et al., 2002; Radke et al., 2001).

Le résidu sérine en position 499 localisé dans la boucle d'activation de C-RAF semble être phosphorylé par la PKC (Chong et al., 2003). Toutefois, son importance fonctionnelle dans le processus d'activation ne fait pas l'unanimité. En effet, sa mutation en alanine n'affecte pas l'activité catalytique de C-RAF induite par la PKC, remettant par conséquent en doute la pertinence de ce site (Barnard et al., 1998; Chong et al., 2001).

Tous ces événements de phosphorylation mentionnés précédemment ne semblent pas être suffisants pour assurer l'activation de C-RAF. La déphosphorylation de sa sérine 259 (S259) serait également l'une des étapes requises à ce processus. Plusieurs analyses biochimiques semblent démontrer l'implication de la phosphatase PP2A dans la déphosphorylation de ce résidu (Abraham et al., 2000; Jaumot and Hancock, 2001; Kubicek et al., 2002; Sieburth et al., 1999; Wassarman et al., 1996). Cette déphosphorylation serait

nécessaire à la relocalisation membranaire de C-RAF puisque le mutant S259A semble s'y associer constitutivement (Dhillon et al., 2002; Kubicek et al., 2002). De plus, cette mutation semble augmenter l'association de C-RAF à Ras (Dhillon et al., 2002). PP2A pourrait donc contribuer au processus d'activation de C-RAF en favorisant son accumulation à la membrane plasmique (Figure 1.6B).

1.4.2.3.2.3.2. Inhibition par phosphorylation

Peu d'études décrivent les mécanismes moléculaires par lesquels l'activation du domaine kinase de C-RAF est atténuée. Pourtant, l'inactivation de C-RAF est essentielle pour éviter une suractivation de la voie Ras/ERK. Certaines analyses biochimiques semblent démontrer l'implication d'événements de phosphorylation divers dans ce processus d'inactivation de C-RAF. Certains sites seraient directement phosphorylés par la PKA (Dumaz and Marais, 2005), alors que d'autres seraient induits suivant l'activation de ERK (Dhillon and Kolch, 2002; Dougherty et al., 2005). Voici ci-dessous une brève description des différents mécanismes de régulation négative du domaine kinase de C-RAF.

C-RAF possède trois sites constitutivement phosphorylés, soit la S43, la S259 et la S621 (Figure 1.5A) (Morrison et al., 1993). Ces sites peuvent tous être hyperphosphorylés en présence de la PKA (Dhillon and Kolch, 2002; Dhillon et al., 2002). La phosphorylation de la S43 localisée en amont du motif RBD, semble diminuer l'affinité de liaison entre C-RAF et Ras-GTP, entraînant par conséquent une diminution de l'activité kinase de C-RAF (Dhillon and Kolch, 2002; Dumaz and Marais, 2003). Pourtant, la mutation de cette sérine n'empêche pas l'AMPc d'induire l'inactivation de C-RAF (Dumaz et al., 2002; Sidovar et al., 2000). Un résultat similaire est obtenu lorsque la S259 est également mutagenisée en alanine. L'activité kinase de C-RAF^{S259A} est toujours réprimée par l'AMPc au même titre que le double mutant C-RAF^{S43A/S259A} (Dumaz et al., 2002). La phosphorylation de ces sites n'est donc pas suffisante pour induire l'inactivation du domaine kinase de C-RAF par l'AMPc. La phosphorylation de la S233 est également induite suivant l'élévation de la concentration en AMPc. Sa mutagenèse n'empêche pas l'inactivation du domaine kinase de C-RAF. Seule l'activité catalytique du double mutant C-RAF^{S233A/S259A} devient pratiquement réfractaire à l'AMPc, alors que le triple mutant

C-RAF^{S43A/S233A/S259A} devient complètement insensible. D'ailleurs, l'élimination de la sous-unité catalytique de la PKA par RNAi empêche l'hyperphosphorylation de ces résidus d'avoir lieu. La phosphorylation de la S621 n'est pas impliquée dans la régulation négative de C-RAF par l'AMPc (Dumaz et al., 2002; Sidovar et al., 2000). Il est intéressant de mentionner que l'AMPc augmente significativement l'association C-RAF/14-3-3. Cette interaction est cependant abolie lorsque les résidus S233 et S259 sont mutagénisés. L'ensemble de ces résultats permet donc de proposer un mécanisme d'action par lequel la PKA induit l'inactivation progressive de C-RAF suivant la phosphorylation des résidus sérines 43, 233 et 259. La phosphosérine 43 pourrait perturber l'association Ras-GTP/C-RAF, alors que le recrutement de 14-3-3 serait assuré par les phosphosérines 233 et 259 dans le but de stabiliser une conformation fermée et inactive (Dumaz and Marais, 2003).

Grâce au marquage métabolique, six résidus hyperphosphorylés (S29, S43, S289, S296, S301 et S642) ont été cartographiés suivant une stimulation au PDGF (Dougherty et al., 2005). Cette hyperphosphorylation coïncide avec l'inactivation et/ou la désensibilisation de C-RAF aux stimulations subséquentes. Heckman et al. ont d'ailleurs rapporté que la mutation des sérines 296 et 301 accentue l'activité kinase de C-RAF induite par l'EGF, ce qui suggère également leur implication dans la régulation négative de C-RAF (Hekman et al., 2005). À l'exception de la S43, les cinq sérines sont phosphorylées *in vitro* par ERK. Il semble que cette hyperphosphorylation de C-RAF altère sa capacité à répondre aux signaux en provenance de la membrane puisqu'elle perturbe l'association Ras/C-RAF. Cette interaction devient cependant persistante lorsque les six sérines sont mutagénisées en alanines, favorisant ainsi une accumulation anormale de C-RAF à la membrane plasmique accompagnée d'une phosphorylation soutenue de la S338. Fait à noter, la phosphorylation de la S43 n'est pas suffisante pour abolir l'association Ras/C-RAF, malgré le fait qu'elle puisse réduire l'affinité de liaison de C-RAF pour Ras-GTP. Des résultats préliminaires semblent révéler l'importance des six résidus sérines (Dougherty et al., 2005). La phosphatase PP2A serait impliquée dans la déphosphorylation de ces sites (sauf la S43) dans le but de rendre à nouveau C-RAF sensible à une stimulation (Dougherty et al., 2005). PP2A nécessite cependant l'isomérisation préalable des phosphosérines en une conformation trans, afin qu'elle puisse les déphosphoryler efficacement. Pin1, une prolyl

isomérase, a cette capacité (Lu, 2004). D'ailleurs, C-RAF isolée à partir de cellules MEFs *pin1*^{-/-} demeure anormalement hyperphosphorylée plusieurs heures après avoir traitée au PDGF au même titre que lorsqu'une forme catalytiquement inactive de Pin1 est surexprimée. Fait intéressant, Pin1 est fréquemment surexprimée dans diverses formes de cancers. Permet-elle un recyclage efficace de C-RAF afin qu'elle puisse être rapidement activée par Ras? D'autres analyses seront requises (Dumaz and Marais, 2005).

Il est intéressant de mentionner que ERK semble également avoir la capacité d'inactiver par phosphorylation l'isoforme B-RAF. En effet, B-RAF contient en CT un motif SPKTP qui peut être spécifiquement reconnu par ERK (Figure 1.1B) (Brummer et al., 2003). Contrairement à C-RAF et A-RAF, cette séquence est conservée chez la mouche et la grenouille, laissant ainsi présager que la régulation négative médiée par ERK puisse être conservée à travers l'évolution (Brummer et al., 2003). B-RAF possède trois autres résidus, soit la S364, S428 et T439, qui, lorsque phosphorylés, exercent un effet inhibiteur (Figure 1.5B) (Zhang and Guan, 2000). PKB serait responsable de la phosphorylation de ces sites, quoique la S364 (homologue de la S259) puisse également être phosphorylée par SGK (Guan et al., 2000; Zhang et al., 2001). Leur mutagenèse en alanines permet d'obtenir une activation équivalente à celle occasionnée par la surexpression d'une forme activée de Ras (Chong et al., 2001). Chez *C. elegans*, *lin-45* (RAF) possède deux sites de phosphorylation (S312 et S453) qui doivent être simultanément mutés pour générer un phénotype multivulvaire caractéristique d'une suractivation de la voie Ras/ERK (Figure 1.5D). La S312 correspond au résidu S259 de C-RAF, alors que la S453 est équivalente à la T439 de B-RAF (Chong et al., 2001). Le résidu S259 est également conservé chez RAF de Drosophile (DRAF) et correspond à une sérine en position 346. DRAF possède également une sérine homologue à la S428 de B-RAF (S402) (Figure 1.5E). Ces résidus relativement conservés à travers les espèces permettent donc de supposer qu'ils puissent réguler négativement l'activité kinase.

1.4.2.3.3. RAF dans la pathogenèse des cancers

Les chercheurs oeuvrant dans le domaine de la signalisation intracellulaire ont toujours eu un engouement particulier pour RAF de par son implication dans l'activation de

la voie Ras/ERK (Garnett and Marais, 2004; Hoshino et al., 1999; Wellbrock et al., 2004). Or l'intérêt d'étudier RAF s'est accentué depuis la découverte des diverses mutations dans le gène *b-raf*, dont les plus communes sont des substitutions qui rendent la kinase constitutivement activée. La fréquence de ces mutations est particulièrement élevée dans les mélanomes (30 à 60 %), le cancer de la glande thyroïde (30 à 50 %), le cancer du colon (5 à 20 %) et le cancer des ovaires (environ 30 %). On les retrouve également, mais à plus faible fréquence (1 à 3%), dans d'autres cancers (Garnett and Marais, 2004). Parallèlement, une mutation (A451T) localisée dans le segment d'activation du domaine kinase de l'isoforme A-RAF a récemment été identifiée à partir d'une lignée cancéreuse leucémique. Ce résidu est conservé chez l'humain, la souris, le rat et le cochon, néanmoins aucune étude ne nous informe sur la possible implication de cette substitution dans l'altération de la fonction de la protéine A-RAF. L'analyse de nombreux tissus cancéreux n'a pas permis l'identification de mutations additionnelles dans A-RAF, suggérant ainsi, contrairement à *b-raf*, que le gène *a-raf* possède un rôle mineur dans la pathogenèse des cancers (Lee et al., 2005). Aucune modification génétique n'a jusqu'à présent été trouvée dans le gène *c-raf* (Davies et al., 2002; O'Neill and Kolch, 2004).

90 % des mutations chez B-RAF isolées à partir des lignées cancéreuses provenant entre autres du sein, des poumons et de la peau, correspondent à une substitution de la valine 599 en acide glutamique (V599E) (Figure 1.1B) (Davies et al., 2002; Gray-Schopfer et al., 2005; Mercer and Pritchard, 2003). Cette substitution oncogénique engendre l'activation constitutive de ERK endogène (Wellbrock et al., 2004). Elle induit également la prolifération et la transformation des cellules NIH 3T3 et des mélanocytes murins. Ces cellules transformées ont la capacité de former des tumeurs lorsqu'elles sont réintroduites dans des souris nues, permettant ainsi de qualifier B-RAF en tant qu'oncogène potentiel (Davies et al., 2002; Garnett and Marais, 2004). Or pourquoi cette mutation est prédominante dans différentes formes de cancers? L'analyse de la structure du domaine kinase de B-RAF a fourni d'importants indices. En effet, cette étude a permis de visualiser certaines interactions intramoléculaires entre le « G-loop » et le segment d'activation qui seraient nécessaires pour stabiliser la conformation inactive du domaine kinase de B-RAF en absence d'une stimulation. De façon générale, les mutations oncogéniques identifiées

chez B-RAF pourraient perturber ces interactions, instabilisant par conséquent la conformation inactive du domaine kinase. Normalement, ces associations orientent le motif DFG dans une position incompatible avec la catalyse. La V599 contacte en condition inactive la F467 du « G-loop », ce qui contribue à l'obtention d'une structure fermée. La mutation de cette phénylalanine a d'ailleurs été rapportée dans des cancers, démontrant une fois de plus l'importance fonctionnelle de l'association « G-loop »/segment d'activation dans la stabilisation de la conformation inactive du domaine kinase de B-RAF (Wellbrock et al., 2004). La phosphorylation de la T598 (pT598) semble perturber l'association « G-loop »/segment d'activation de manière à instabiliser la conformation inactive du domaine kinase. Cette pT598 pourrait contacter l'Arg574 positionnée en amont de la base catalytique (Asp575), dans le but de stabiliser une conformation ouverte et adéquate pour la catalyse. Il est possible que la V599 puisse, de concert avec le résidu D447 de la « N region », participer au repositionnement de l'hélice α C en établissant certains contacts qui pourraient également contribuer à la stabilisation de la conformation active du domaine kinase de B-RAF. Or il semble que la mutation de la V599E imite la phosphorylation du résidu 598 en fournissant une charge négative, ce qui par le fait même entraîne l'instabilisation de la conformation inactive et/ou la stabilisation d'une conformation active du domaine kinase (Davies et al., 2002; Mercer and Pritchard, 2003; Smalley, 2003; Wan et al., 2004; Wellbrock et al., 2004). La mutation de la K600 en acide glutamique (K600E) a également été rapportée. Ce mutant semble se comporter de la même façon que le mutant V599E en introduisant une charge négative qui contribue à mimer la phosphorylation (S601) dans la boucle d'activation de B-RAF (Ikenoue et al., 2003). Il est à noter que l'élimination de MLK3 par RNAi, laquelle semble indirectement impliquée dans la phosphorylation des résidus 598 et 601, est sans effet lorsque la V599 est mutagenisée, confirmant ainsi la capacité de cette mutation à mimer l'état de phosphorylation de B-RAF normalement induit suivant l'activation de la voie ERK (Chadee and Kyriakis, 2004).

Curieusement, plusieurs mutants de B-RAF ont une activité kinase largement réduite *in vitro*. En effet, ces substitutions oncogéniques affectent des résidus hautement requis dans la catalyse (Figure 1.1B). La G465 par exemple correspond à la seconde glycine du « G-loop » (GxGxxG). Ce motif médie normalement la fixation et l'orientation

adéquate des groupements phosphates de l'ATP. La G595 du motif DFG, constitue un second exemple, puisque sa perturbation altère non seulement la coordination d'un ion magnésium, mais également le positionnement approprié de l'hélice αC . Or il est étonnant que ces mutants de B-RAF possèdent tous la capacité d'induire l'activation de ERK endogène (Davies et al., 2002; Garnett and Marais, 2004; Wan et al., 2004). L'activité endogène de l'homologue C-RAF semble cependant nécessaire pour initier cette activation. En effet, la déplétion de C-RAF par RNAi abolit complètement l'activation de ERK induite suivant l'expression des mutants de B-RAF. Il a été proposé que l'hétérodimérisation entre C-RAF et B-RAF mutant puisse induire l'activation de C-RAF par l'intermédiaire d'un changement conformationnel. Il n'est cependant pas exclu que cette transactivation soit le résultat du recrutement d'une molécule activatrice ou de la titration d'une molécule inhibitrice par B-RAF (Hubbard, 2004; Morrison, 2004; Wan et al., 2004). Néanmoins, l'étude cristallographique prédit que les mutants de B-RAF adoptent une conformation ouverte. Ces mutants pourraient potentiellement être aptes à transactiver C-RAF par l'intermédiaire d'un changement allostérique suivant leur association (Garnett and Marais, 2004). Ce mécanisme de transactivation potentiel proposé par Wan et ses collaborateurs n'est pas sans précédent. En fait ce mécanisme pourrait être analogue à celui utilisé par les membres de la famille des tyrosine kinases Jak. En effet, ces protéines possèdent deux domaines kinases dont l'un est inactif. Le rôle de ce domaine pseudokinase serait de réguler par modification allostérique l'activité du second domaine kinase catalytiquement compétent (Chen et al., 2000). Il en est de même pour le récepteur guanylate cyclase impliqué dans la production du GMPc. Son domaine kinase, pourtant dépourvue d'une activité catalytique, module l'activité du domaine guanylate cyclase par l'intermédiaire d'un changement conformationnel (Duda et al., 2001; Potter and Hunter, 1998; Sharma et al., 2001).

Est-ce que l'hétérodimérisation entre C-RAF et B-RAF oncogénique requiert l'association de Ras-GTP dans le but de stabiliser la conformation ouverte de C-RAF et ainsi permettre à B-RAF mutant de transactiver le domaine kinase de C-RAF? Il semble que B-RAF ait la capacité de coopérer avec Ras-GTP dans le but d'induire l'activation de C-RAF. B-RAF est incapable en soi de stimuler l'activation du domaine kinase de C-RAF.

Par contre, la déplétion de B-RAF au moyen d'un anticorps abolit significativement l'activation de C-RAF par Ras oncogénique, contrairement à l'ajout d'un anticorps spécifiquement dirigé contre A-RAF (Mizutani et al., 2001). Davies et al. ont utilisé une approche similaire en mettant en évidence l'importance de Ras dans la prolifération cellulaire de diverses lignées tumorales en injectant un anticorps monoclonal qui neutralise sa fonction. Ils ont remarqué que cette neutralisation bloque la prolifération de certaines lignées caractérisées par des mutations de faible fréquence dans le gène *b-raf*. L'une de ces lignées est caractérisée par la mutation du résidu G465V localisé au sein du « G-loop ». Ce mutant a une activité kinase réduite et requiert C-RAF pour induire l'activation de ERK. Il est donc possible que Ras soit impliquée dans la transactivation de C-RAF par B-RAF (Davies et al., 2002). D'ailleurs certaines lignées tumorales possèdent, en plus d'une forme oncogénique de B-RAF, des mutations activatrices dans les gènes *N-Ras* et *K-Ras* (Davies et al., 2002; Yuen et al., 2002). Ce n'est cependant pas le cas du mutant B-RAF dont la valine en position 599 est mutée (Figure 1.1B). La prolifération des lignées tumorales caractérisées par cette mutation est indépendante de la fonction de Ras. La déplétion de C-RAF par RNAi est d'ailleurs sans effet (Karasarides et al., 2004; Wan et al., 2004). Cette valine substituée agit donc indépendamment de Ras et de C-RAF dans l'activation de ERK. C'est probablement la raison pour laquelle cette substitution est fréquemment observée dans diverses formes de cancers.

1.4.2.3.4. Activation de MEK par RAF

Depuis longtemps, C-RAF a toujours été perçue comme étant l'effecteur de Ras par excellence pour induire l'activation de ERK. Or plusieurs études réalisées chez la souris ont démontré que B-RAF semble en fait être le principal effecteur. En effet, contrairement à B-RAF, l'activité kinase de C-RAF est faible alors que celle de A-RAF est difficilement mesurable (Huser et al., 2001; Mercer et al., 2002). On ne note également aucune perturbation dans l'activation de ERK suivant une stimulation lorsque des fibroblastes embryonnaires de souris (MEFs) K.-O autant pour *c-raf* (*c-raf*^{-/-}) que pour *a-raf* (*a-raf*^{-/-}) sont analysés (Huser et al., 2001; Mercer et al., 2002). L'activation de ERK dans les cellules MEFs *b-raf*^{-/-} est par contre sévèrement compromise (Huser et al., 2001; Mercer et

al., 2002). L'implication des isoformes A-RAF et C-RAF en tant qu'activateurs physiologiques de MEK a donc suscité le questionnement. Pourtant, diverses études biochimiques ont montré que les trois isoformes de RAF surexprimées en culture de cellules, avaient la capacité à lier Ras-GTP et pouvaient être transloquées à la membrane plasmique par une forme oncogénique de Ras. Elles ont toutes la capacité de devenir constitutivement activées lorsque leur région régulatrice est délétée, causant ainsi la transformation d'une variété de types cellulaires (Pritchard et al., 1995). Ces études ont également démontré leur capacité à interagir avec MEK pour ensuite le phosphoryler *in vitro*, quoique l'habileté du domaine kinase de A-RAF à phosphoryler MEK soit beaucoup plus faible. B-RAF, quant à elle, induit une forte activation de MEK (Huser et al., 2001; Marais et al., 1997; Mercer et al., 2002; Murakami and Morrison, 2001; Weber et al., 2000). La raison pour laquelle A-RAF est un piètre activateur de MEK découle de sa faible capacité à être activée par Ras oncogénique comparativement aux deux autres isoformes. Cette activation réduite est le résultat d'une faible affinité de liaison entre son motif RBD et Ras-GTP. La mutagenèse de la K22 en arginine, et ce de façon à mimer le motif RBD de C-RAF, permet toutefois à A-RAF d'accroître son affinité d'association pour Ras-GTP, et d'augmenter son activité kinase (Weber et al., 2000).

L'analyse phénotypique des souris K.-O pour *c-raf* a cependant fourni une évidence concernant la possibilité que MEK puisse effectivement être un substrat physiologique de C-RAF. En effet, ces embryons sont caractérisés par des défauts au niveau du placenta qui sont similaires à ceux obtenus lorsque le gène *mek1* est éliminé (Giroux et al., 1999; Murakami and Morrison, 2001). Étonnamment, l'activation de ERK dans les cellules MEFs *mek1*^{-/-} est normale, laissant ainsi présager l'existence d'une redondance fonctionnelle entre les gènes *mek1* et *mek2*. L'activation normale de ERK dans les cellules MEFs *c-raf*^{-/-} pourrait également être le résultat d'une redondance fonctionnelle entre les isoformes de RAF. D'ailleurs, ce phénomène a été constaté lorsque les gènes *b-raf* et *c-raf* ont été simultanément éliminés (Hagemann and Rapp, 1999; Wojnowski et al., 2000). Certains groupes ont rapporté une augmentation significative de l'activité de B-RAF dans les cellules MEFs *c-raf*^{-/-} (Murakami and Morrison, 2001). Mercer et al. ont quant à eux démontré l'augmentation substantielle de l'activité de B-RAF et, à un moindre niveau,

l'activité de C-RAF dans les cellules MEFs *a-raf*^{-/-} (Mercer et al., 2002). Ces observations permettraient donc d'expliquer pourquoi aucune perturbation dans l'activation de ERK n'a été constatée suivant l'ablation des gènes *a-raf* et *c-raf*.

1.4.2.3.5. Fonctions de RAF indépendantes de l'activation de ERK

L'analyse phénotypique des souris K.-O caractérisées par l'ablation du locus *c-raf* a permis de proposer que la protéine C-RAF puisse accomplir, suivant son activation, certaines fonctions indépendamment de sa capacité à activer MEK (Hindley and Kolch, 2002; Troppmair and Rapp, 2003). La section qui suit relate l'importance fonctionnelle de C-RAF dans la régulation du cycle cellulaire et de l'apoptose.

Certains travaux démontrent la capacité de C-RAF à inactiver par phosphorylation le gène suppresseur de tumeurs des rétinoblastomes (Rb), assurant par conséquent la progression du cycle cellulaire en facilitant la transition G1/S. Cette phosphorylation dépend cependant de leur association préalable, sans quoi la prolifération est inhibée (Dasgupta et al., 2004; Wang et al., 1998). C-RAF a également la capacité de phosphoryler *in vitro* Cdc25. Cette dernière est une phosphatase à double spécificité normalement impliquée dans la déphosphorylation des Cdks dans le but de les activer et d'induire la progression du cycle cellulaire (Galaktionov et al., 1995). La pertinence physiologique de ces événements n'a cependant pas encore été confirmée *in vivo*.

Contrairement à A-RAF et B-RAF, plusieurs analyses biochimiques ont démontré l'effet antiapoptotique exercé par C-RAF lorsqu'il est surexprimé. Cet effet dépend non seulement de sa translocation à la surface externe de la mitochondrie, mais également de son activité kinase (Wang et al., 1996; Zhong et al., 2001). Sa relocalisation subcellulaire est le résultat d'une association entre son domaine kinase et Bcl-2, un facteur antiapoptotique qui préserve l'intégrité de la mitochondrie (Wang et al., 1996). C-RAF ainsi relocalisée peut interagir par l'intermédiaire de son domaine kinase avec la sérine/thréonine kinase BAG-1 dans le but de prévenir l'induction de l'apoptose par un mécanisme d'action encore inexpliqué. Certains croient que l'association C-RAF/BAG-1 permettrait d'induire l'activation de C-RAF (Wang et al., 1996). Néanmoins C-RAF ainsi

complexée peut maintenant lier BAD, un facteur proapoptotique, dans le but d'induire soit directement, soit indirectement via une kinase associée, sa phosphorylation, ce qui par conséquent initie son inactivation (Zha et al., 1996). C-RAF peut également prévenir l'apoptose indépendamment de son association à Bcl-2/BAD (Cornelis et al., 2005; Zhong et al., 2001). La caspase 9 peut par exemple, suivant l'induction de l'apoptose, cliver C-RAF dans le but de libérer son domaine catalytique de l'autorépression, pour ensuite être relocalisé à la mitochondrie et protéger la cellule. Son association à VDAC, qui régule la perméabilité mitochondriale, constitue un mécanisme supplémentaire permettant à C-RAF d'induire la survie cellulaire en inhibant potentiellement le relâchement du cytochrome C (Le Mellay et al., 2002). Cette inhibition dépend de l'activité kinase de C-RAF. Aucune phosphorylation de VDAC n'a cependant été décelée. Le facteur de transcription NF- κ B peut également être activé par C-RAF au moyen d'un mécanisme inconnu qui ne dépend pas toujours de l'activation de ERK. C-RAF semble indirectement impliquée dans l'activation de I κ B-kinase (IKK), laquelle assure l'inactivation par phosphorylation du facteur I κ B pour l'empêcher de séquestrer NF- κ B dans le cytoplasme (Baumann et al., 2000; Pearson et al., 2000). L'activité kinase de C-RAF n'est pas toujours requise pour garantir la survie cellulaire (Chen et al., 2001; Hindley and Kolch, 2002; Huser et al., 2001). Sa simple association au facteur proapoptotique ASK1 (apoptosis signal regulating kinase) prévient l'apoptose par l'intermédiaire d'un mécanisme d'action encore inconnu (Chen et al., 2001). Sa liaison à MST2 (une sérine/thréonine kinase membre de la famille Ste20) inhibe également l'apoptose, puisque C-RAF semble prévenir la transphosphorylation de MST2 en empêchant son homodimérisation normalement induite en réponse à certains agents proapoptotiques (O'Neill et al., 2004; O'Neill et al., 2005). D'ailleurs, l'élimination de MST2 par RNAi renverse l'hypersensibilité des cellules MEFs *c-raf*^{-/-} aux agents proapoptotiques (O'Neill and Kolch, 2005).

1.4.3. MEK

MEK1 et MEK2 sont des protéines kinases à double spécificité qui phosphorylent spécifiquement les résidus thréonines et tyrosines localisés dans la boucle d'activation du domaine catalytique des ERKs et dont la séquence consensus correspond à TEY (Kolch,

2000). La similarité de séquence entre ces isoformes atteint près de 90 % (Belanger et al., 2003). *C. elegans*, *D. melanogaster* et *X. laevis*, ne contiennent qu'un seul homologue de MEK (Giroux et al., 1999). MEK1 et MEK2 sont différentiellement activées par les membres de la famille RAF. A-RAF semble préférentiellement activer MEK1, alors que C-RAF les active toutes les deux. B-RAF, quant à elle, peut très bien lier les deux isoformes, cependant il semble qu'elle soit un meilleur activateur de l'isoforme MEK1 (Catling et al., 1995; Schaeffer and Weber, 1999). Ces résultats permettent donc de croire que MEK1 et MEK2 accomplissent des fonctions particulières. Dans le but d'apprécier leur spécificité d'action respective, certains groupes de recherche ont généré des souris K.-O pour les gènes *mek1* et *mek2* (Belanger et al., 2003; Giroux et al., 1999). L'inactivation de *mek1* entraîne la mort des embryons avant le onzième jour de la gestation. Ces derniers ne présentent aucun phénotype particulier mis à part une hypovascularisation anormale du placenta qui probablement provoque cette létalité précoce (Giroux et al., 1999). L'ablation de *mek2* ne semble pas être requise au cours du développement embryonnaire puisque les souris mutantes sont viables, fertiles, sans aucune altération morphologique apparente, à moins que MEK1 puisse adéquatement compenser la perte du gène *mek2* (Belanger et al., 2003).

Les MEKs doivent être activées par phosphorylation sur leurs résidus sérines (S218 et S222) localisés dans la boucle d'activation de leur domaine kinase. RAF est le principal activateur quoique MEKK1, normalement induite par des stress environnementaux, peut également induire la phosphorylation de ces sérines (Hagemann and Blank, 2001; Schaeffer and Weber, 1999). Outre leur domaine kinase, MEK1 et MEK2 contiennent trois motifs supplémentaires essentiels à l'accomplissement de leur fonction (Chen et al., 2001). Le premier correspond au domaine D spécifiquement impliqué dans la liaison des ERKs (Xu et al., 1999). Le second motif correspond à une région riche en résidus prolines insérée dans la portion CT du domaine kinase, soit entre les sous-domaines IX et X (Catling et al., 1995; Dang et al., 1998). Cette séquence est absente chez tous les autres membres de la famille des MEKs. Sa délétion n'affecte pas l'association de RAF, mais réduit par contre la capacité du domaine kinase de MEK à être efficacement activée par RAF (Catling et al., 1995; Schaeffer and Weber, 1999). La protéine d'échafaudage MP-1 impliquée dans la

signalisation Ras/ERK a la capacité de lier cette région riche en prolines (voir page 59) (Schaeffer et al., 1998). Ce motif polyproline contient plusieurs sites potentiels pouvant lier des protéines à domaine SH3, de même que de nombreux résidus pouvant être phosphorylés par différentes kinases telles ERKs (T292) et PAK1 (S298) (Coles and Shaw, 2002; Eblen et al., 2002; Frost et al., 1997; Gardner et al., 1994; Rossomando et al., 1994; Slack-Davis et al., 2003). Le troisième motif non catalytique de MEK1 et MEK2 est une séquence d'exportation nucléaire (« nuclear export signal » ou NES) qui garantit leur localisation cytoplasmique (Fukuda et al., 1997). Elle régule également la distribution subcellulaire des ERKs (Adachi et al., 2000; Fukuda et al., 1997; Widmann et al., 1999). Il est intéressant de mentionner que l'isoforme MEK1 contient également en CT une séquence d'ancrage d'environ vingt acides aminés appelée le domaine DVD (« conserved docking site ») qui serait nécessaire à la liaison de C-RAF. Cette séquence serait conservée chez plusieurs MAP2K dont MKK4/7 et MKK3/6, et permettrait le recrutement de leur MAP3K respective (Takekawa et al., 2005).

1.4.4. ERKs

ERK1 et ERK2 sont ubiquitairement exprimées chez la souris. Leur abondance respective varie cependant d'un type cellulaire à l'autre. L'analyse de leur composition en acides aminés a révélé une identité qui pouvait atteindre près de 85 % (Pearson et al., 2001). Quoique ces isoformes phosphorylent *in vitro* les mêmes substrats, l'ablation respective des gènes *erk1* et *erk2* a permis de mettre en évidence l'existence d'une spécificité d'action. En effet, ERK1 semble impliquée dans la maturation des thymocytes. Les souris *erk1*^{-/-} sont cependant viables, fertiles et ne montrent aucun retard de croissance. À l'inverse, les embryons *erk2*^{-/-} meurent précocement, soit avant le jour embryonnaire 8,5, malgré le fait que *erk1* y soit normalement exprimé (Saba-El-Leil et al., 2003). Ces résultats suggèrent que la protéine ERK1 soit incapable de compenser la perte du gène *erk2* dans l'accomplissement des différentes fonctions, contrairement au gène *erk1* qui, lui, semble être efficacement remplacé par *erk2*. Il n'est cependant pas exclu que *erk1* n'ait aucun rôle à jouer durant l'embryogenèse (Pages et al., 1999).

1.4.4.1. Importation/exportation nucléaire

En absence d'un signal, ERK est principalement localisée dans le cytoplasme. Sa localisation subcellulaire est assurée par son association à MEK. En effet, MEK possède dans sa portion NT une séquence NES riche en résidus leucines qui empêche ERK de s'accumuler au noyau (Adachi et al., 1999; Fukuda et al., 1996; Lenormand et al., 1998). Cette séquestration est néanmoins relevée lorsque MEK, phosphorylée par RAF, devient activée. MEK induit alors la phosphorylation du motif TEY de ERK. Cette phosphorylation entraîne la dissociation du complexe MEK/ERK et la translocation subséquente de ERK au noyau (Adachi et al., 1999; Fukuda et al., 1997; Lenormand et al., 1998). Ce mécanisme de rétention cytoplasmique semble être conservé chez *S. cerevisiae*. En effet, la tyrosine phosphatase cytoplasmique Ptp3 séquestre Hog1 (homologue de p38) dans le cytoplasme et ce, indépendamment de son activité phosphatase (Mattison and Ota, 2000). Chez les mammifères, la surexpression d'une forme catalytiquement inactive de MKP-3 contraint également ERK à demeurer dans le cytoplasme sans toutefois perturber la phosphorylation des cibles cytosoliques de ERK. Cette séquestration de ERK dépend cependant de la séquence NES de MKP-3 et de son domaine de liaison à ERK (Brunet et al., 1999; Karlsson et al., 2004).

ERK semble transloquer au noyau par différents mécanismes (Torii et al., 2004). Le premier consiste simplement en une diffusion passive des monomères à travers les pores nucléaires (« Nuclear pore complex » ou NPC) (Adachi et al., 1999). Le second fait appel à un mécanisme de transport actif qui fait intervenir différents facteurs solubles, dont la petite GTPase Ran et les membres de la famille des importines (Adachi et al., 1999). Chez la drosophile, la délétion ou la mutation des importines α et β réduit significativement la relocalisation de ERK activée au noyau (Lorenzen et al., 2001). ERK ne possède pourtant aucune séquence de localisation nucléaire classique (NLS) qui favoriserait ce transport actif. Il a été proposé que l'homodimérisation de ERK, suivant sa phosphorylation, génère une surface d'interaction nécessaire à la liaison d'une protéine possédant une séquence NLS (Cobb and Goldsmith, 2000; Khokhlatchev et al., 1998). Cette homodimérisation préviendrait aussi la séquestration cytoplasmique de ERK phosphorylée, puisque certains résidus normalement impliqués dans son association à MEK, sont également requis pour sa

dimérisation (Wilsbacher et al., 1999). Le troisième mécanisme permettant à ERK d'accéder au noyau se fait également par l'intermédiaire d'un transport actif. Cependant, cette translocation n'a besoin d'aucun facteur cytosolique puisque ERK aurait la capacité d'interagir directement avec le NPC (Matsubayashi et al., 2001).

Contrairement à une activation transitoire, l'activation soutenue de la voie de signalisation permet à ERK de s'accumuler au noyau suivant sa phosphorylation (Pouyssegur et al., 2002). Sa rétention au noyau nécessite cependant la synthèse d'ancres nucléaires (Lenormand et al., 1998). Chez *S. cerevisiae*, la séquestration de Hog1 au noyau serait assurée par une tyrosine phosphatase nommée Ptp2 qui induit son inactivation (Mattison and Ota, 2000; Mattison et al., 1999). Or chez les mammifères, certaines phosphatases à double spécificité (MKP1 et MKP2), responsables de l'inactivation de ERK au noyau, sont néosynthétisées suivant l'activation de la voie par des facteurs mitogéniques. Ces phosphatases peuvent, par l'intermédiaire de leur site de liaison, interagir spécifiquement avec ERK et la déphosphoryler (Volmat et al., 2001). Fait à noter, ERK phosphoryle ces MKPs, leur permettant ainsi d'être stabilisées en réduisant la vitesse de leur dégradation par le protéasome, sans pour autant modifier la capacité de ces phosphatases à déphosphoryler ERK (Brondello et al., 1999). Ces phosphatases pourraient donc assurer la séquestration de ERK au noyau et ainsi prévenir la suractivation inadéquate de la voie (Pouyssegur et al., 2002).

Suivant son inactivation, ERK nucléaire doit retourner dans le cytoplasme pour être en mesure d'intégrer à nouveau un éventuel signal. Sa translocation dépend toutefois d'un mécanisme d'exportation actif (Adachi et al., 2000). Or ERK ne semble posséder aucune séquence NES caractéristique (Pouyssegur et al., 2002). Son exportation serait plutôt médiée par MEK, qui en comporte une opérante dans sa portion NT (Adachi et al., 1999; Adachi et al., 2000; Fukuda et al., 1996). MEK serait donc un régulateur par excellence de la localisation subcellulaire de ERK. En absence d'un signal, MEK prévient la translocation nucléaire de ERK. Suite à l'inactivation de la voie de signalisation, ERK déphosphorylée interagit avec MEK dans le noyau pour ensuite initier son exportation et ainsi restaurer le pool activable de ERK dans le cytoplasme (Adachi et al., 2000). Il est à noter que la phosphatase MKP-3, qui possède également une séquence NES, pourrait

réguler la localisation de ERK. Fait intéressant, MKP-3 interagit avec ERK indépendamment de son état de phosphorylation, contrairement à MEK qui ne lie que la forme non phosphorylée de ERK. MKP-3 pourrait donc interagir avec ERK activée, induire sa déphosphorylation pour ensuite initier sa translocation cytoplasmique (Brunet et al., 1999; Camps et al., 1998; Karlsson et al., 2004).

1.4.4.2. Réponses biologiques induites par ERKs

ERK1 et ERK2 ont la capacité de phosphoryler une quantité impressionnante de substrats protéiques, lesquels sont localisés à différents endroits dans la cellule dans le but d'assurer une réponse biologique appropriée. Elles peuvent, suite à leur translocation au noyau, moduler efficacement l'expression génique en phosphorylant directement différents facteurs de transcription (Whitmarsh and Davis, 1996). Les ERKs peuvent également demeurer dans le cytoplasme et phosphoryler plusieurs protéines membranaires et cytoplasmiques (Chen et al., 2001; Cottin et al., 1999; Pearson et al., 2001). Dans certains cas, cette phosphorylation induite par ERK peut moduler négativement l'activité des molécules positionnées en amont, permettant ainsi d'exercer une rétroinhibition. Par exemple, le récepteur EGF, SOS, C-RAF et MEK peuvent être inactivés par ERK (Widmann et al., 1999). Cette capacité à phosphoryler différents substrats permet à ERK de réguler divers processus biologiques importants nécessaires au maintien de l'homéostasie cellulaire. La section qui suit aborde brièvement l'implication de ERK dans l'induction de trois de ces processus, soit la prolifération, la différenciation et la survie cellulaire.

La prolifération cellulaire peut, entre autres, être induite suivant l'activation des récepteurs à facteurs de croissance. Cette activation corrèle d'une part avec l'expression de la cycline D1 et d'autre part avec l'inhibition de l'expression de p21^{CIP1} et p27^{KIP1}, favorisant ainsi la progression du cycle cellulaire. Or plusieurs analyses ont initialement démontré l'impact de la signalisation ERK dans la régulation du cycle cellulaire. Ces études ont montré que l'expression d'une forme dominante négative de ERK avait la capacité d'inhiber la prolifération, au même titre qu'un ARN double brin spécifiquement dirigé contre ERK (Sebolt-Leopold and Herrera, 2004). En fait, il semble que ERK ait la

capacité de contrôler positivement l'expression de la cycline D1 suivant la stimulation des récepteurs à facteurs de croissance, confirmant par conséquent l'importance fonctionnelle de la voie de signalisation Ras/ERK dans la régulation de la prolifération cellulaire (Lavoie et al., 1996).

La voie de signalisation Ras/ERK est également impliquée dans la différenciation de plusieurs types cellulaires dont les cellules PC12. L'activation du récepteur TrkA par son ligand NGF est essentielle à ce processus. Cette stimulation assure l'induction de la petite GTPase Rap1 qui favorise à son tour l'activation de l'isoforme B-RAF (Vossler et al., 1997; Wixler et al., 1996; York et al., 1998).

Plusieurs évidences suggèrent également l'implication de la voie Ras/ERK dans la survie cellulaire (Ballif and Blenis, 2001). L'une de ces évidences correspond au fait que l'activation de ERK soit nécessaire pour empêcher les cellules PC12 d'entrer en apoptose après avoir retiré du milieu le NGF (Xia et al., 1995). Le fait que la fonction antiapoptotique de RAF soit réprimée suivant l'ajout d'un inhibiteur de MEK constitue une seconde évidence (Chen et al., 2001). L'un des mécanismes moléculaire par lequel ERK assure la survie cellulaire consiste à phosphoryler la sérine/thréonine kinase cytoplasmique RSK (p90 ribosomal S6 kinase). RSK ainsi activée peut alors phosphoryler le facteur proapoptotique BAD. Cette phosphorylation est nécessaire à l'inactivation de BAD puisqu'elle assure la liaison de 14-3-3, ce qui par conséquent induit la séquestration de BAD dans le cytosol. BAD n'est donc plus en mesure d'interférer avec les membres de la famille Bcl-2 (Bonni et al., 1999; Scheid et al., 1999; Shimamura et al., 2000). Il est à noter que RSK activée transloque également au noyau dans le but d'induire l'expression de certains facteurs de survie, tels que Bcl-2 et Bcl-X_L, suivant la phosphorylation du facteur de transcription CREB (Bonni et al., 1999; Finkbeiner, 2000). Chez la mouche, il semble que ERK puisse directement inactiver par phosphorylation la protéine Hid (head involution defective) qui constitue l'une des composante de la machinerie proapoptotique (Bergmann et al., 1998).

1.4.4.3. Spécificité dans l'activation de la voie ERK

Il semble que la durée d'activation de la signalisation ERK, et ce en fonction du type cellulaire, soit déterminante dans la spécification de la voie vers laquelle la cellule doit s'engager (Tan and Kim, 1999). Dans les fibroblastes par exemple, la protéine Fos est un capteur sensible à la durée d'activation de ERK. Lorsque l'activation est transitoire, Fos n'a pas le temps de s'accumuler, contrairement à une activation prolongée qui assure la stabilisation de Fos suivant sa phosphorylation par ERK. Fos ainsi phosphorylée peut alors influencer positivement la progression du cycle cellulaire (Murphy et al., 2002). La différenciation des cellules PC12 est un modèle d'étude qui a permis de démontrer l'importance des niveaux d'activation de la voie ERK dans la spécification d'un processus cellulaire particulier. Les récepteurs NGF et EGF ont tous deux la capacité d'induire l'activation de la voie de signalisation ERK. Contrairement au récepteur EGF qui induit la prolifération cellulaire résultant d'une activation transitoire de la voie, le récepteur NGF permet d'initier le processus de différenciation neuronale grâce à une activation soutenue. La surexpression d'une forme constitutivement activée du récepteur EGF peut par contre induire la différenciation des PC12, démontrant ainsi l'impact de l'intensité d'activation de la voie ERK dans la spécification du destin de la cellule (Traverse et al., 1994; Wixler et al., 1996). Cette activation différentielle de la voie est spécifiquement médiée par la régulation des isoformes C-RAF et B-RAF (Houslay and Kolch, 2000; Pouyssegur et al., 2002). En effet, la stimulation du récepteur EGF induit transitoirement l'activation de la petite GTPase Ras, laquelle permet à son tour d'activer l'isoforme C-RAF. La stimulation du récepteur NGF entraîne une activation prolongée de la voie grâce à l'induction de la petite GTPase Rap qui médie ses effets par l'intermédiaire de l'isoforme B-RAF (Marshall, 1995; Vossler et al., 1997; York et al., 1998). Contrairement à Ras, l'activité de Rap1 est insensible au mécanisme de rétroinhibition exercé par ERK, prolongeant par conséquent l'activation de la voie de signalisation induite par le récepteur NGF dans le but d'initier la différenciation neuronale (Stork, 2005). La localisation subcellulaire de Ras activée semble également avoir un impact sur l'intensité d'activation de la voie ERK. En effet, l'activation de Ras à la membrane plasmique par l'EGF n'entraîne qu'une activation transitoire de ERK, contrairement à Ras localisée dans les endomembranes (voir section 1.4.2.2.3, page

22). De façon générale, la spécificité d'activation de la voie de signalisation ERK peut dépendre des récepteurs activés à la surface, des différentes isoformes participant au processus d'activation, leur localisation subcellulaire et bien sûr le contexte cellulaire. Il est certain que l'état d'activation des autres voies de signalisation peut également influencer la réponse induite suivant une stimulation donnée (Xia et al., 1995).

1.5. Les protéines d'échafaudage

L'orchestration adéquate des différentes molécules effectrices qui signalisent en direction du noyau est essentielle à l'induction d'une réponse biologique appropriée. Les cellules ont élaboré différentes stratégies (exemple: la localisation subcellulaire et l'activation différentielle des isoformes) qui leur permettent de réguler efficacement la transmission de nombreux signaux malgré l'utilisation d'un répertoire d'enzymes communes (Smith and Scott, 2002). Les protéines d'échafaudage constituent l'une de ces stratégies. Par définition, une protéine d'échafaudage facilite la transduction de signaux en favorisant l'assemblage de complexes multiprotéiques permettant de confiner simultanément à un endroit donné plusieurs composantes d'une voie de signalisation. Cette organisation architecturale assure également la spécificité dans la transmission de signaux, d'autant plus que certaines kinases peuvent être partagées par différentes voies de signalisation. Ainsi, les protéines d'échafaudage servent à la fois de plate-forme et d'isolateur moléculaire dans le but d'assurer l'induction d'une réponse biologique spécifique (Elion, 2001; Tsunoda et al., 1997; Vondriska et al., 2004).

L'analyse des protéines d'échafaudage n'a pas toujours été simple. Au départ ces molécules étaient généralement isolées comme régulateurs négatifs, puisqu'en surexpression elles inhibaient systématiquement l'activation des voies de signalisation (Burack and Shaw, 2000; Cacace et al., 1999; Dickens et al., 1997; Yasuda et al., 1999). Des études approfondies ont cependant permis de constater que la concentration utilisée avait un sérieux impact. Les chercheurs ont remarqué qu'à forte concentration, la protéine d'échafaudage réduit la signalisation en titrant les molécules cibles indépendamment les unes des autres, contrairement à une concentration où la stoechiométrie normale est respectée. À l'inverse, une faible concentration n'est pas plus avantageuse puisque

l'assemblage simultané des composantes est perturbé, ce qui se traduit également par une signalisation réduite. Ce phénomène s'est d'ailleurs valu le nom d'inhibition combinatoire ou effet biphasique (Ferrell, 2000).

Le concept des protéines d'échafaudage a initialement émergé des analyses réalisées chez *S. cerevisiae*. Cette levure comporte six voies de signalisation de type MAPK distinctes dont quatre qui partagent le même répertoire d'enzymes (Elion, 2001). Pourtant, ces voies de signalisation peuvent, suivant leur stimulation, activer spécifiquement les bonnes enzymes dans le but d'induire une réponse physiologique précise adaptée au signal initialement perçu en surface. Cette spécification est attribuable à différentes protéines d'échafaudage capables de confiner adéquatement les composantes nécessaires en modules d'activation (Yoshioka, 2004). La protéine d'échafaudage Ste5 est le premier archétype à avoir été caractérisé. Elle facilite la transmission d'un signal en favorisant le rapprochement de la MAP3K Ste11, la MAP2K Ste7 et la MAPK Fus3, dans le but d'assurer la reproduction de la levure en réponse aux phéromones (Figure 1.7A) (Ferrell and Cimprich, 2003; Park et al., 2003). La protéine kinase Pbs2 agit également comme une protéine d'échafaudage au sein de la voie de signalisation HOG (High-osmolarity glycerol) puisqu'elle permet le recrutement simultané de Ste11 et de la MAPK Hog1 (Figure 1.7B). Cette double capacité de liaison de Ste11 doit être adéquatement régulée pour spécifier avec efficacité la voie vers laquelle la levure doit s'engager et ce, en fonction de la stimulation extracellulaire. Il semble que cette spécification soit directement modulée par Ste5 et Pbs2, lesquels agiraient comme isolateurs moléculaires capables de confiner adéquatement Ste11 pour éviter une réponse biologique inadéquate. En effet, l'expression d'une forme constitutivement activée de Ste11 préalablement fusionnée à Ste5 favorise l'activation de Fus3, contrairement à la fusion Pbs2-Ste11. Sans ces fusions, Ste11 active autant Hog1 que Fus3. Ces données démontrent donc l'impact de ces protéines d'échafaudage à canaliser efficacement la signalisation vers la bonne MAPK dans le but de répondre adéquatement (Harris et al., 2001).

La caractérisation de Ste5 a également permis de mettre en évidence la possibilité que certaines protéines d'échafaudage puissent activement prendre part au processus de

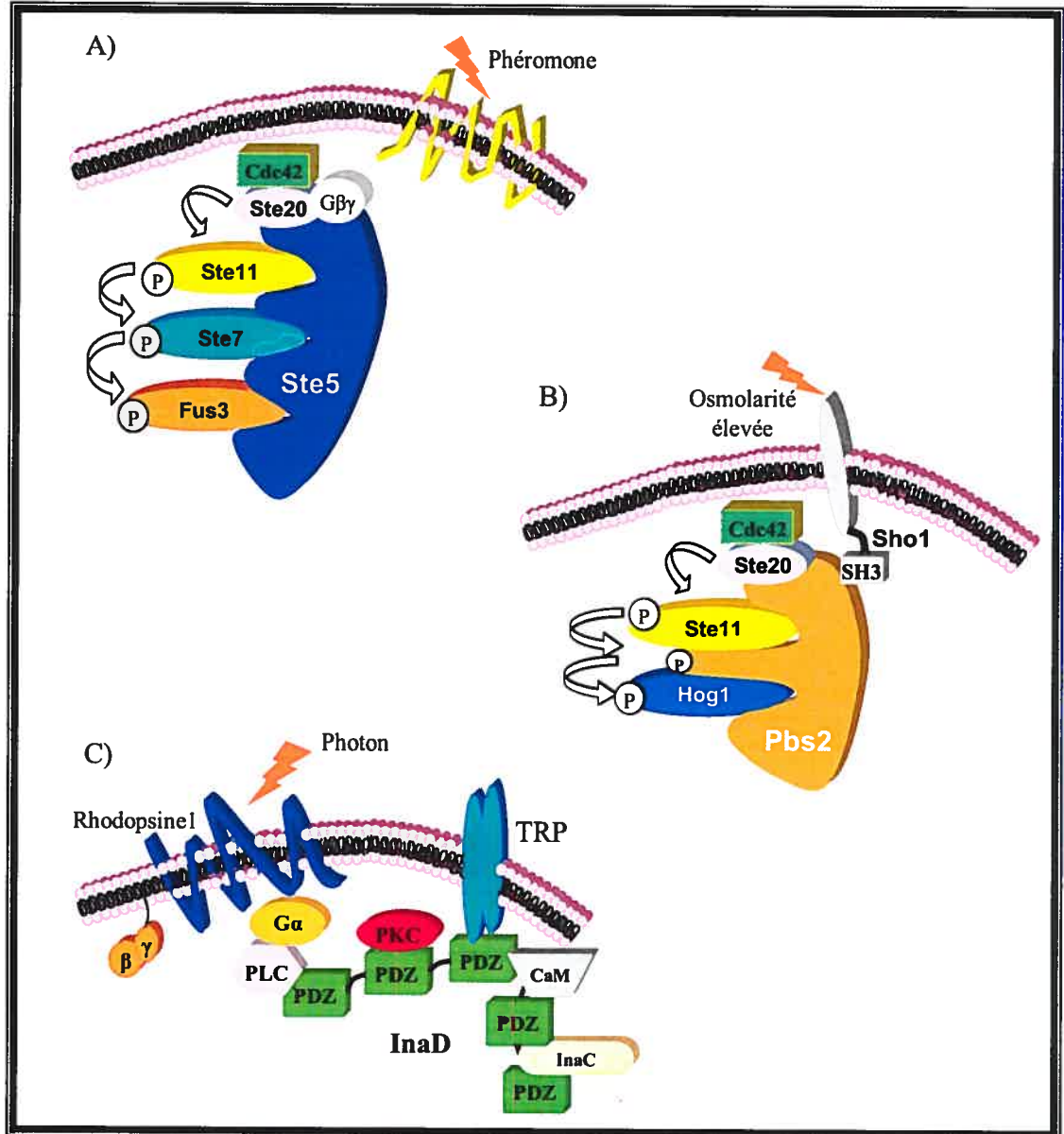


Figure 1.7 Représentation schématique des protéines d'échafaudage et des différentes composantes de signalisation associées. Schémas adaptés de (Garrington et al., 1999).

transmission de signaux en régulant par modification allostérique l'activité d'une kinase associée (Vondriska et al., 2004). En effet, il semblerait que Ste5 puisse moduler l'activité de la MAP3K Ste11 en favorisant l'exposition de sa région d'autorégulation négative NT de façon à ce qu'elle puisse être efficacement phosphorylée par Ste20. Cette phosphorylation permettrait d'enrayer l'effet répresseur exercé sur le domaine catalytique de Ste11. Ste5 pourrait également maintenir la conformation ouverte et active de Ste11 découlant de cette phosphorylation (Bardwell, 2004). Fait à noter, la protéine adaptatrice Ste50 semble également contribuer à l'ouverture de la conformation de Ste11 en perturbant son autorégulation négative. En effet, l'association de Ste50 au domaine SAM de Ste11 semble réduire l'affinité de liaison entre la région régulatrice NT de Ste11 et son domaine kinase (Wu et al., 1999). Ainsi, Ste5 aurait plusieurs rôles à jouer au sein de la cascade de signalisation. Le premier serait de recruter Ste11 à proximité de son activateur Ste20 au niveau de la membrane. Le second serait d'inhiber de concert avec Ste50 l'effet d'autorépression exercé par la région NT de Ste11 et/ou de maintenir la conformation active de Ste11 suivant sa phosphorylation par Ste20. Le troisième rôle serait de faciliter la transmission du signal en favorisant le rapprochement de Ste7 et Fus3. Fait à noter, ce rapprochement serait le résultat d'une association entre les portions NT et CT de Ste5. Cette association aurait lieu uniquement suivant la liaison du complexe G β γ (Ste4/Ste18) au motif RING-H2 de Ste5, favorisant par conséquent l'induction d'un changement conformationnel qui permettrait de réorienter adéquatement chacune des composantes du module MAPK et ainsi assurer la phosphorylation séquentielle en réponse aux phéromones (Sette et al., 2000). Ste5 serait donc une protéine d'échafaudage activement impliquée dans la régulation de la transmission de signaux. Or il semble que ce phénomène ne soit pas unique. En effet, la protéine d'échafaudage TAB1 (Transforming growth factor- β -activated protein kinase 1 ([TAK1]-binding protein) impliquée dans la signalisation p38 α aurait également le rôle d'un régulateur allostérique puisqu'elle semble avoir la capacité d'induire l'autophosphorylation de p38 α potentiellement par l'intermédiaire d'un changement conformationnel et ce, indépendamment de MKK3 ou de MKK6 (Ge et al., 2002). TAB1 aurait également la capacité d'induire l'activation de la MAP3K TAK1 (Sakurai et al., 2000).

La caractérisation des protéines d'échafaudage a permis de mieux comprendre comment la spécificité dans la transmission d'un signal pouvait être assurée malgré l'utilisation d'un répertoire d'enzymes souvent communes aux différentes cascades de signalisation. Cette caractérisation a néanmoins suscité de nouvelles questions puisque les protéines d'échafaudage semblent révoquer certains principes de base inhérents aux voies de signalisation (Burack and Shaw, 2000; Vondriska et al., 2004). L'un de ces principes concerne le phénomène d'amplification du signal à travers les différentes composantes de la voie. Par définition, l'amplification d'un signal est basée sur le principe suivant : la molécule A active quelques molécules B, lesquelles vont à leur tour activer plusieurs molécules C dans le but d'intensifier le signal initialement perçu en surface. D'un point de vue conceptuel, les protéines d'échafaudage intuitivement réduisent l'amplification du signal puisqu'elles rapprochent simultanément les différentes composantes qui transmettront ce signal. Si on assume que la stœchiométrie d'association est de 1:1 entre la protéine d'échafaudage et chacune de ses protéines cibles, alors le potentiel d'intensification est fortement réduit. D'ailleurs le seul exemple qui infirme le pouvoir d'amplification des protéines d'échafaudage vient de l'analyse de la phototransduction chez la drosophile par l'intermédiaire d'InaD (Figure 1.7C) (Burack and Shaw, 2000; Tsunoda and Zuker, 1999). Aucune donnée n'est actuellement disponible pour expliquer comment par exemple l'amplification de l'activation de ERK dans différents systèmes biologiques s'opère. La caractérisation des différentes propriétés biochimiques des protéines d'échafaudage fournira certainement de nouveaux indices qui permettront éventuellement d'éclaircir la transmission de signaux.

1.5.1. Protéines d'échafaudage de la voie ERK

La signalisation ERK transmet de nombreux signaux qui se traduisent par différentes réponses biologiques. L'orchestration adéquate des diverses composantes de la voie doit donc être spécifiquement modulée. Les protéines d'échafaudage semblent réguler la spécificité de la signalisation en coordonnant l'assemblage simultané des molécules effectrices à un endroit donné (Catling et al., 2001; Garrington and Johnson, 1999; Kolch, 2000; Vomastek et al., 2004). La signalisation ERK comporte plusieurs protéines

d'échafaudage qui semblent moduler chacune des étapes de la transmission du signal en direction du noyau. Voici sept protéines d'échafaudage qui modulent la signalisation ERK.

1.5.1.1. Sur-8

Initialement identifiée chez *C. elegans*, Sur-8 est un régulateur positif de la voie de signalisation Ras/ERK (Selfors et al., 1998; Sieburth et al., 1998). Elle contient 18 répétitions riches en leucines (« leucine-rich repeats » ou LRR) nécessaires pour favoriser des interactions protéine-protéine (Kobe and Kajava, 2001). Li et al. ont d'ailleurs démontré l'importance du LRR chez son homologue humain dans la formation d'un complexe ternaire Ras/hSur-8/C-RAF. Ils ont remarqué la capacité de hSur-8 à interagir spécifiquement non seulement avec le domaine effecteur de Ras, mais également avec la portion CT de C-RAF (Li et al., 2000; Sieburth et al., 1998). La surexpression de hSur-8 augmente significativement l'activation de ERK induite par une forme activée de Ras, mais est sans effet lorsqu'une forme oncogénique de RAF est coexprimée. Ce résultat est consistant avec les données obtenues en génétique qui suggèrent que la fonction de Sur-8 se situe en amont de RAF, mais en aval ou en parallèle de Ras (Li et al., 2000). La fonction de Sur-8 serait donc d'augmenter la signalisation Ras/ERK en favorisant l'association Ras/C-RAF (Morrison and Davis, 2003).

1.5.1.2. MP1

MP1 (MEK-patner 1) a initialement été isolée chez la levure grâce à l'utilisation d'un système à double hybride où MEK1 servait d'appât (Schaeffer et al., 1998). Cette protéine a la capacité d'interagir sélectivement avec MEK1 et ERK1. La région polyproline, localisée au sein du domaine kinase de MEK1, assure l'association de MP1 (Schaeffer et al., 1998; Sharma et al., 2005). Cette association ne dépend toutefois pas de l'état d'activation de MEK1 (Schaeffer et al., 1998). La cartographie du site de liaison de ERK1 sur MP1 n'a pas encore été définie (Sharma et al., 2005). MP1 agit positivement dans la signalisation Ras/ERK. Sa surexpression accentue significativement l'association MEK1/ERK1, se traduisant ainsi d'une part par une augmentation de la phosphorylation de ERK et d'autre part par une stimulation accrue de l'activité transcriptionnelle de Elk1.

L'activation de MEK1 par B-RAF est également augmentée en présence de MP1, quoique aucune association directe entre RAF et MP1 n'ait été détectée. MP1 agirait en tant que protéine d'échafaudage dédiée à la formation d'un complexe MEK1/ERK1 dans le but de spécifier leur activation. D'ailleurs, l'élimination de MP1 par RNAi décroît significativement leur phosphorylation respective suivant l'induction du récepteur EGF (Teis et al., 2002).

MP1 est associée aux endosomes (Teis et al., 2002). Cette compartimentalisation résulte d'une interaction avec une protéine membranaire adaptatrice, appelée p14, qui est spécifiquement attachée à la surface externe des endosomes (Wunderlich et al., 2001). Cette localisation subcellulaire semble être requise au processus d'activation de ERK, puisque l'élimination de p14 par RNAi entraîne inévitablement la relocalisation de MP1 dans le cytoplasme, accompagnée d'une réduction de l'activation de MEK et de ERK (Teis et al., 2002). La localisation endosomale du module MP1/MEK1/ERK1 est donc requise. Est-ce que cette activation permet d'induire une réponse biologique particulière? La génération de souris K.-O pour *mp1* et *p14* pourrait répondre à cette question.

1.5.1.3. MORG1

MORG1 a initialement été isolée chez la levure en utilisant MP1 comme appât. Cette protéine est principalement composée de sept domaines WD-40 susceptibles de médier des interactions protéine-protéine. Outre son association à MP1, MORG1 a la capacité d'interagir spécifiquement avec différentes composantes de la voie Ras/ERK, soit ERK1/2, MEK1/2, C-RAF et B-RAF. Contrairement à MP1, son association à MEK1 ne dépend pas de la région polyproline, suggérant ainsi que l'association MORG1/MEK1 est indépendante de la liaison de MP1. MORG1 semble stabiliser la formation d'un complexe multiprotéique qui faciliterait l'activation de ERK suivant une stimulation donnée. Cette augmentation d'activation n'a lieu que lorsque les cellules ont préalablement été stimulées par le LPA, le PMA ou le sérum. MORG1 est incapable d'accentuer l'activation de ERK en réponse à l'EGF, proposant ainsi son implication dans la régulation agoniste-spécifique de la signalisation Ras/ERK. L'utilisation d'un ARN double brin spécifiquement dirigé contre MORG1 a d'ailleurs confirmé ces résultats. MORG1 pourrait donc spécifier

l'assemblage des différentes composantes nécessaires à l'obtention d'une réponse biologique particulière et ce, en fonction de la stimulation extracellulaire appropriée (Vomastek et al., 2004).

1.5.1.4. MEKK1

MEKK1 régule principalement l'activation de la voie JNK/SAPK en induisant la phosphorylation de MKK4 qui une fois activée, peut à son tour induire par phosphorylation l'activation de JNK (Yan et al., 1994). Or plusieurs évidences semblent également démontrer l'implication de MEKK1 dans la régulation de la voie de signalisation ERK (Morrison and Davis, 2003). En effet, plusieurs ont rapporté la capacité de MEKK1 surexprimée à promouvoir l'activation de ERK1/2 (Gardner et al., 1994; Minden et al., 1994; Xu et al., 1996; Yan and Templeton, 1994). Son implication réelle dans la régulation de la signalisation ERK a été confirmée grâce à l'utilisation de cellules souches embryonnaires K.-O pour *mekk1* (Yujiri et al., 1998). Ces cellules voient leur activité ERK significativement réduite suivant l'activation de la voie par différents stimuli, contrairement aux cellules de type sauvage. Son rôle serait d'échafauder les différentes composantes du module ERK, puisque MEKK1 a la capacité d'interagir spécifiquement avec les formes endogènes de C-RAF, de MEK1 et de ERK2 (Karandikar et al., 2000). Il a été proposé que le rapprochement de ces trois composantes, par l'intermédiaire de leur association à MEKK1, leur permet d'interagir efficacement les unes avec les autres et d'assurer la transmission adéquate du signal.

1.5.1.5. Sef

Sef, originalement identifiée chez le poisson zèbre, a été décrite comme étant un régulateur à rétroaction négative de la voie Ras/ERK induite par le récepteur FGF (Furthauer et al., 2002; Kovalenko et al., 2003; Tsang and Dawid, 2004; Tsang et al., 2002). Cependant, une étude réalisée par Torii et collaborateurs propose que Sef soit une protéine d'échafaudage qui régule adéquatement, d'un point de vue spatial, la transmission du signal induite soit par des facteurs de croissance, soit par des formes activées de Ras ou de MEK (Torii et al., 2004). Sef a la capacité d'interagir avec le complexe MEK/ERK sans

toutefois prévenir leur activation. Elle semble plutôt bloquer la dissociation de ERK de façon à l'empêcher d'être transloquée au noyau. ERK ainsi séquestrée peut induire la phosphorylation de RSK2, une cible cytosolique. Le facteur de transcription nucléaire Elk1 n'est, quant à lui, plus phosphorylé par ERK à moins de lui avoir préalablement fusionné une séquence NES. D'ailleurs, l'élimination de Sef par RNAi augmente l'activité transcriptionnelle de Elk1 induite par des facteurs de croissance, sans toutefois accroître la phosphorylation de RSK2, démontrant ainsi l'implication de Sef dans la régulation différentielle de la signalisation ERK grâce à son activité d'échafaudage (Philips, 2004; Torii et al., 2004; Torii et al., 2004).

1.5.1.6. CNK

CNK a initialement été identifiée à partir d'un crible génétique fait chez la mouche (Therrien et al., 1998). Plusieurs homologues ont ensuite été rapportés, soit chez le rat (MAGUIN) (Yao et al., 1999), l'humain (Lanigan et al., 2003), le nématode et le moustique (Douziech et al., 2003). Elle contient de nombreux motifs susceptibles de médier des interactions protéine-protéine dont les domaines SAM et PDZ, de même qu'une région riche en prolines, suggérant ainsi la possibilité qu'elle puisse agir comme protéine d'échafaudage. Tous les homologues de CNK contiennent de plus une séquence conservée, appelée la région CRIC, qui semble être requise dans l'exercice de sa fonction (Figure 1.8) (Therrien et al., 1998).

CNK est une composante positivement requise au sein de la voie Ras/ERK. Elle serait essentielle en aval de plusieurs RTKs impliqués dans la prolifération, la différenciation et la survie cellulaire (Therrien et al., 1998; Anselmo et al., 2002; Burmeister et al., 2002). Une étude d'épistasie suggère que la fonction de CNK soit requise en aval de Ras mais en amont ou en parallèle de RAF, laissant ainsi présager que CNK puisse moduler l'activité de RAF. D'ailleurs la déplétion de CNK à l'aide de la technique RNAi dans les cellules d'insectes (S2) prévient l'activation de RAF induite par le récepteur à l'insuline (Anselmo et al., 2002). CNK a par ailleurs la capacité d'interagir avec le domaine

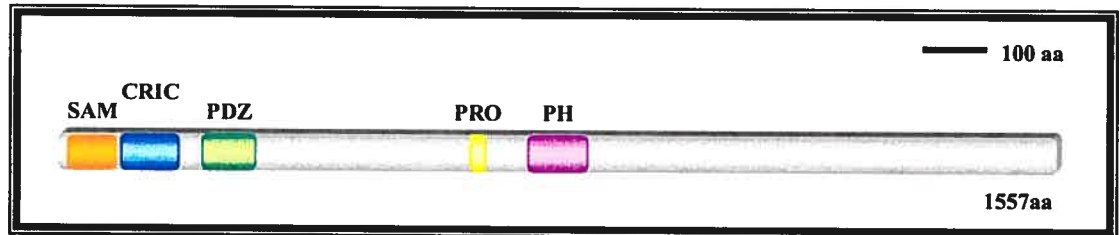


Figure 1.8 Représentation schématique de la structure de CNK chez la drosophile.

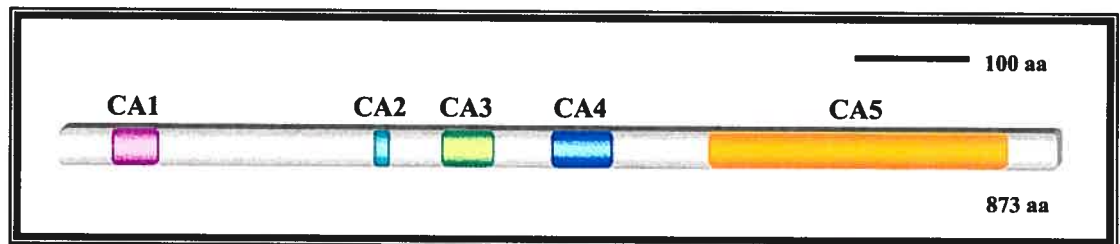


Figure 1.9 Représentation schématique de la structure de KSR chez la souris.

kinase de RAF au même titre que ses homologues chez le rat et l'humain, permettant ainsi de proposer que CNK puisse agir comme protéine d'échafaudage au sein du processus d'activation de RAF (Lanigan et al., 2003; Yao et al., 2000) (Therrien Cell 1998).

Il est à noter que certaines analyses biochimiques réalisées avec les homologues de mammifères démontrent la capacité de CNK à interagir avec différentes molécules effectrices des voies de signalisation Ral, Rho, JNK, PSD95/S-SCAM et RASSF1A, permettant ainsi de suggérer la possibilité que CNK puisse également orchestrer l'activation de voies de signalisation parallèles (Iida et al., 2002; Jaffe et al., 2004; Jaffe et al., 2005; Lanigan et al., 2003; Lopez-Ilasaca et al., 2005; Ohtakara et al., 2002; Rabizadeh et al., 2004; Yao et al., 1999).

1.5.1.7. KSR

Trois cribles génétiques, réalisés simultanément chez la drosophile et le nématode, ont conduit à l'identification de KSR (Kornfeld et al., 1995; Sundaram and Han, 1995; Therrien et al., 1995), un régulateur positif de la voie Ras/ERK qui semble jouer le rôle d'une protéine d'échafaudage (Muller et al., 2001; Nguyen et al., 2002; Roy et al., 2002; Stewart et al., 1999). Chez les mammifères deux isoformes ont été identifiées, soit KSR1 et KSR2 (Therrien et al., 1995; Channavajhala et al., 2003). La majorité des travaux ont cependant été réalisés à l'aide de KSR1. Contrairement à la drosophile, *C. elegans* contient également deux isoformes (KSR1 et KSR2) conjointement requises pour promouvoir l'activation de la voie Ras/ERK (Ohmachi et al., 2002). Le double K.-O des gènes *ksr-1* et *ksr-2* chez le nématode affecte sévèrement la phosphorylation de ERK comparativement à leur K.-O respectif (Ohmachi et al., 2002). Fait intéressant, la souris *mksr1*^{-/-} est viable sans aucun défaut majeur au niveau du développement normal de l'animal. L'activation de ERK dans les cellules MEFs *mksr1*^{-/-} est par contre perturbée suivant l'activation du récepteur EGF, suggérant par conséquent l'importance fonctionnelle de mKSR1 dans la signalisation Ras/ERK. D'ailleurs l'ablation du locus *mksr1* chez la souris empêche Ras oncogénique d'induire, par l'intermédiaire de la signalisation C-RAF/ERK, la formation de tumeurs au niveau de la peau (Hamilton and Wolfman, 1998; Lozano et al., 2003).

De façon générale, la structure de KSR est similaire à RAF (Morrison, 2001; Raabe and Rapp, 2002). Elle contient cinq domaines conservés dont un domaine kinase qui semble n'avoir aucune activité catalytique, quoique le groupe de Kolesnick ait publié le contraire (Figure 1.9) (Michaud et al., 1997; Stewart et al., 1999; Therrien et al., 1995; Zhang et al., 1997). Fait à noter, KSR de mammifère comporte une arginine dans le sous-domaine II de son domaine kinase au lieu de la lysine invariable nécessaire à la fixation et l'orientation adéquate des groupements phosphates de l'ATP. Cette distinction permet ainsi de suggérer que KSR ne puisse procéder à une réaction de phosphotransfert. D'ailleurs, il a été montré que des mutations dans KSR qui normalement abolissent l'activité catalytique d'une kinase (la lysine invariable et la base catalytique) restaurent le phénotype associé à une perte de fonction de KSR chez *C. elegans*, supportant par conséquent l'implication de KSR au sein de la signalisation ERK indépendamment d'une activité kinase intrinsèque (Stewart et al., 1999).

Différentes analyses d'immunoprécipitations ont démontré la capacité de mKSR1 à interagir avec C-RAF, MEK1/2 et ERK1/2 (Denouel-Galy et al., 1998; Jacobs et al., 1999; Therrien et al., 1996) (Yu et al., 1998). Contrairement à l'association KSR/MEK, la liaison de ERK à KSR est induite suivant l'activation de Ras au même titre que son interaction à C-RAF (Cacace et al., 1999; Muller et al., 2000; Therrien et al., 1996). HSP90, HSP70, HSP68, CDC37, C-TAK1 et 14-3-3 ont tous également la capacité de lier mKSR1 (Bell et al., 1999; Cacace et al., 1999; Muller et al., 2001; Stewart et al., 1999; Xing et al., 1997). L'ensemble de ces interactions couplé au fait que KSR semble dépourvue d'activité catalytique ont amené plusieurs groupes à suggérer que KSR puisse agir comme protéine d'échafaudage de la voie Ras/ERK. Roy et al. ont d'ailleurs démontré biochimiquement en utilisant les protéines de drosophile, la capacité de KSR à faciliter la phosphorylation de MEK par RAF en favorisant leur rapprochement (Roy et al., 2002). Il est intéressant de mentionner que 14-3-3 semble négativement réguler la fonction de KSR en liant deux phosphosérines (S297 et S392) potentiellement phosphorylées par C-TAK1 (Cacace et al., 1999; Muller et al., 2001). L'association de 14-3-3 semble stabiliser la conformation inactive de KSR et empêche son domaine CA3 de contacter la membrane plasmique (Raabe and Rapp, 2003). Cette séquestration cytoplasmique est cependant relevée suivant

l'activation de la voie, permettant ainsi à KSR de transloquer à la membrane plasmique pour ensuite favoriser l'activation de MEK par RAF (Roy and Therrien, 2002). PP2A serait responsable de la déphosphorylation de la S392 et constitue une étape essentielle menant vers la relocalisation membranaire du complexe KSR/MEK (Ory et al., 2003). Fait à noter, C-RAF est modulée de façon similaire par 14-3-3 (voir section 1.4.2.3.2.1, page 27). L'ensemble de ces résultats laisse donc présager que KSR pourrait potentiellement moduler l'assemblage d'un complexe multiprotéique essentiel à l'activation de ERK.

En somme, il existe plusieurs protéines d'échafaudage qui semblent tous être essentielles à la transmission de signaux au sein de la signalisation ERK. Ces protéines pourraient jouer un rôle important dans la spécification d'un signal. Est-ce que chaque module ERK associé à une protéine d'échafaudage donnée pourrait avoir des propriétés particulières? Par exemple, ces complexes pourraient induire une réponse biologique spécifique en canalisant le ou les substrats qui doivent être phosphorylés par ERK en fonction de la stimulation initialement perçue en surface. Chaque protéine d'échafaudage pourrait d'ailleurs répondre à certains stimuli de façon à augmenter la spécificité d'action de la voie. La localisation subcellulaire du module ERK activé pourrait également contribuer à induire une réponse biologique particulière (Harding et al., 2005). Déterminer les mécanismes de régulation de chacune des protéines d'échafaudage de la voie ERK permettrait vraisemblablement de comprendre comment le module ERK, impliqué dans divers processus biologiques, arrive à répondre correctement aux signaux externes.

1.6. Régulateurs négatifs de la voie ERK

La voie de signalisation Ras/ERK doit être négativement régulée pour éviter la suramplification inadéquate du signal en provenance des récepteurs. Plusieurs mécanismes d'action semblent assurer cette modulation. Par exemple, la désensibilisation des récepteurs suivant leur internalisation permet d'inactiver la signalisation. La déphosphorylation des sites de régulation positifs associés aux différentes molécules effectrices de la voie constitue un second moyen. La polyubiquitination, qui assure le ciblage des protéines en direction du protéasome, permet, au même titre que la phosphorylation rétroinhibitrice induite par ERK, d'inactiver la transduction de signaux.

Les GAPs détiennent également ce pouvoir en favorisant l'hydrolyse du GTP lié à Ras. Outre ces mécanismes, plusieurs protéines nouvellement identifiées semblent avoir la propriété d'interférer avec la signalisation Ras/ERK. Quatre exemples sont brièvement présentés ci-dessous.

1.6.1. IMP

IMP a initialement été isolée chez la levure au moyen d'un crible à double hybride utilisant Ras activée comme appât. Elle est conservée chez tous les eucaryotes examinés à ce jour, lesquels ne possèdent qu'un seul orthologue (Ory and Morrison, 2004). Sa structure primaire est caractérisée par un motif RING-H2 susceptible de faciliter l'ubiquitination des protéines par l'intermédiaire de son activité E3 ubiquitine ligase. Il semblerait selon certaines analyses biochimiques que IMP soit sa propre cible *in vivo* suivant la stimulation de la cellule soit par un agent mitogène, soit par la simple surexpression de Ras activée (Matheny et al., 2004).

Le mécanisme d'action de IMP au sein de la signalisation ERK serait de prévenir l'association C-RAF/MEK en séquestrant KSR dans une fraction cellulaire Triton-insoluble. Cette séquestration serait cependant relevée suivant l'activation de Ras, puisque l'association Ras-GTP/IMP semble induire son activité E3 ligase, entraînant par conséquent son autoubiquitination. KSR ainsi libérée peut transloquer à la membrane plasmique, s'associer à C-RAF pour ensuite favoriser l'activation de ERK. L'ubiquitination de IMP constitue une étape essentielle au processus d'activation de la voie, puisque la mutagenèse de son motif RING-H2 lui permet de devenir un superinhibiteur maintenant insensible à Ras-GTP (Ory and Morrison, 2004).

1.6.2. RKIP

RKIP a également été isolée chez la levure en utilisant comme appât le domaine kinase de C-RAF (Yeung et al., 1999). Les chercheurs croyaient au départ que RKIP était une nouvelle protéine d'échafaudage puisqu'elle avait également la capacité d'interagir avec MEK et ERK. Cependant, la définition de ses propriétés biochimiques a permis

d'établir que RKIP était plutôt un régulateur négatif de la voie (Kolch, 2000; Trakul and Rosner, 2005). En effet, RKIP a la capacité d'empêcher spécifiquement l'activation de la voie en s'associant avec RAF et MEK de façon mutuellement exclusive, prévenant ainsi la formation d'un complexe RAF/MEK (Keller et al., 2004; Yeung et al., 2000; Yeung et al., 1999). Contrairement à l'association RKIP/MEK, la liaison de RKIP à C-RAF est régulée par des facteurs de croissance (Yeung et al., 2000; Yeung et al., 1999). Corbitt et al. ont démontré la capacité de la PKC à phosphoryler la S153 de RKIP. Cette phosphorylation favorise la dissociation du complexe RKIP/C-RAF. D'ailleurs, la surexpression de la PKC permet de relever l'effet inhibiteur exercé par RKIP sur l'activation de la voie de signalisation Ras/ERK (Corbit et al., 2003). ERK semble également avoir la capacité de phosphoryler RKIP pour forcer la dissociation du complexe RKIP/RAF (Kolch et al., 2005).

1.6.3. Sprouty

Sprouty a initialement été identifiée chez la drosophile comme régulateur négatif de la voie de signalisation induite par le FGF (Hacohen et al., 1998). Quatre gènes homologues ont ensuite été identifiés chez les mammifères (de Maximy et al., 1999; Dikic and Giordano, 2003). Sprouty possède dans sa portion NT un résidu tyrosine invariable qui devient phosphorylé en réponse aux facteurs de croissance. Cette phosphotyrosine sert à ancrer différentes molécules caractérisées par un domaine SH2. Spry2 par exemple, peut lier Grb2 dans le but de prévenir son recrutement à la membrane plasmique par FRS2, ce qui par conséquent inactive la signalisation induite par le FGF (Hanafusa et al., 2002).

La région cystéine riche de Spry, localisée en CT, semble également impliquée dans la régulation négative de la voie Ras/ERK induite par le récepteur FGF (Hanafusa et al., 2002; Tsang and Dawid, 2004) (Lim et al., 2002). Ce domaine contient un motif d'interaction conservé capable de lier le domaine kinase de C-RAF. Spry4 par exemple, lie C-RAF dans le but d'inhiber son activité induite par la PKC δ suivant la stimulation du récepteur VEGF (« vascular epithelial growth factor ») (VEGFR), sans toutefois perturber son activation induite par Ras en réponse à l'EGF. La signalisation VEGFR est médiée, non pas par Grb2/SOS/Ras, mais plutôt par PLC γ 1/PKC δ (Figure 1.3) (Sasaki et al., 2003).

Il est intéressant de mentionner que hSpry2 et 4 peuvent interagir avec B-RAF pour ensuite inhiber l'activation de ERK dans des mélanocytes (Tsavachidou et al., 2004). L'ensemble de ces résultats permet de suggérer que les différents mécanismes d'action utilisés par Spry pour réguler la signalisation ERK semblent dépendre des molécules avec lesquelles elle interagit (Kim and Bar-Sagi, 2004; Li et al., 2003).

1.6.4. Spred

Spred est un régulateur négatif de la signalisation Ras/ERK et s'apparente à Sprouty (Kim and Bar-Sagi, 2004). Son mécanisme d'action semble cibler l'activation même de RAF sans toutefois perturber sa translocation à la membrane plasmique suivant l'activation de la voie. La surexpression de Spred prévient la phosphorylation de la S338 de C-RAF normalement induite suivant une stimulation à l'EGF. Cette inhibition n'est cependant pas le résultat d'une inactivation de Ras. Elle serait plutôt causée par la séquestration de RAF à la membrane plasmique. En effet, l'interaction Ras-GTP/RAF est intensifiée en présence de Spred, laquelle est constitutivement associée à Ras indépendamment de l'état d'activation de la cellule. Il est ainsi possible d'émettre l'hypothèse que Ras, par l'intermédiaire de sa liaison à Spred, empêche RAF d'être adéquatement distribuée à proximité de ses activateurs en la séquestrant et par conséquent en avortant son processus d'activation (Wakioka et al., 2001). Spred est donc un régulateur négatif additionnel qui assure la modulation adéquate de l'activation de la voie Ras/ERK.

En somme, plusieurs régulateurs négatifs peuvent contrôler efficacement le flot de signalisation de la voie ERK. Or il est intéressant de mentionner que l'utilisation des protéines d'échafaudage n'est peut-être pas le seul moyen permettant à la signalisation ERK de spécifier correctement une réponse biologique particulière. L'utilisation des différents régulateurs négatifs de la voie de signalisation ERK pourrait également contribuer. À titre d'exemple, Spry 4 permet d'inactiver spécifiquement C-RAF induite par la PKC δ sans toutefois perturber l'activation de C-RAF médiée par Ras (section 1.6.3, page 68). La protéine GAP CAPRI peut réguler négativement l'activité de K-Ras associée à la membrane plasmique, alors que l'activation de H-RAS localisée au niveau des endomembranes n'est pas perturbée (Bivona et al., 2003; Walker et al., 2003) (voir section

1.4.2.2.3, page 22). Ainsi, il est possible de proposer que ces différents régulateurs négatifs de la voie ERK puisse réguler la transmission d'un signal de différentes façons (intensité, localisation, contexte cellulaire, etc) et contribuer à induire une réponse biologique appropriée.

1.7. Modèles animaux pour étudier la signalisation ERK

La caractérisation fonctionnelle des gènes associés à différentes maladies humaines est facilitée par l'utilisation d'organismes modèles tels la mouche à fruit et le nématode (Hariharan and Haber, 2003). En effet, plusieurs processus biologiques fondamentaux régissant la cellule ont été conservés au cours de l'évolution des métazoaires, validant par conséquent la pertinence d'utiliser ces organismes comme modèles d'étude. Fait intéressant, 77 % des gènes causant des maladies humaines (cancers, maladies neurologiques, malformations, désordres du métabolisme) ont un homologue chez la mouche contre 65 % chez le nématode (Baumeister and Ge, 2002; Bernards and Hariharan, 2001; O'Kane, 2003). La voie de signalisation Ras/ERK est particulièrement bien conservée chez ces invertébrés (Baumeister and Ge, 2002). D'ailleurs plusieurs cribles génétiques ont été réalisés autant chez la drosophile que chez *C. elegans* dans le but d'identifier de nouvelles composantes pour ensuite tenter d'élucider les mécanismes moléculaires contrôlant la transmission de signaux au sein de cette voie de signalisation.

1.7.1. *Drosophila melanogaster*

L'utilisation de l'oeil de la drosophile comme modèle d'étude s'est avéré être un outil puissant pour analyser les mécanismes de la transduction de signaux émis par les RTKs (Rebay, 2002). La différenciation des photorécepteurs de l'oeil requiert l'activation de la voie de signalisation Ras/ERK induite par les récepteurs EGF et Sevenless. L'activation soutenue de la voie altère au même titre que son inhibition la différenciation normale des photorécepteurs, entraînant par conséquent l'apparition d'un phénotype d'oeil rugueux. Plusieurs cribles génétiques ont été élaborés dans le but d'identifier des mutations qui modifient de façon dominante le phénotype d'oeil rugueux de départ. Les mutations qui exacerbent cette rugosité correspondent à des « enhanceurs », contrairement aux

suppresseurs qui l'inhibent (St Johnston, 2002). Cette technique a permis d'identifier plusieurs composantes modulant l'activation de la signalisation Ras/ERK.

1.7.1.1. Développement de l'œil

L'œil d'une mouche adulte est composé d'environ 800 facettes identiques appelées ommatidies, qui comportent chacune huit photorécepteurs (R1 à R8), quatre cellules « cone », onze cellules pigmentaires et un poil mécanosensoriel (Mollereau and Domingos, 2005). La formation de ces ommatidies est initiée au cours du développement de la larve, chaque cellule étant progressivement recrutée pour former une ommatidie de plus en plus mature. Au cours du troisième stade larvaire, le sillon morphogénétique, qui marque en fait le passage de la vague de différenciation cellulaire, balaie progressivement la surface du disque de l'œil. Cette progression se fait de la partie postérieure vers la partie antérieure, en laissant derrière elle des ommatidies en formation. Le photorécepteur R8 est le premier à être recruté. Il s'ensuit un recrutement progressif des photorécepteurs R2 et R5 suivi par R3 et R4. Les cellules non différenciées vont ensuite se diviser. Les photorécepteurs R1 et R6 suivi par R7 seront subséquentement recrutés (Voas and Rebay, 2004).

1.7.2. *Caenorhabditis elegans*

Le développement de la vulve chez le nématode est un modèle d'étude intéressant pour étudier la signalisation Ras/ERK induite par le récepteur EGF (Chang et al., *CanMetRev.* 1999). L'expression de mutants affectant, soit positivement, soit négativement le flot de signalisation altère le développement normal de la vulve. Une forme constitutivement activée de Ras (*let-60*) par exemple entraîne l'apparition de multiples vulves, contrairement à l'expression d'un mutant perte de fonction de RAF (*Lin-45*) qui prévient son développement (Kornfeld et al., *Cell* 1995; Sundaram et al., *Cell* 1995). Plusieurs cribles génétiques ont été élaborés dans le but d'identifier des mutations dans des gènes qui peuvent amplifier ou inhiber ces phénotypes de base (multiples vulves ou absence de vulve). KSR-1, MEK et MAPK ont d'ailleurs été identifiées de cette façon (Wu et al., *Genes Dev* 1994; Wu et al., *Genes Dev* 1995; Kornfeld et al., *Cell* 1995; Sundaram et al., *Cell* 1995).

1.7.2.1. Développement de la vulve

Au cours du développement de la vulve, six cellules (P3.p, P4.p, P5.p, P6.p, P7.p, P8.p) ventralement positionnées expriment le récepteur EGF (Let-23). Ces cellules précurseurs, appelées VPCs (vulval precursor cells), ont toutes la capacité de répondre adéquatement suivant la liaison du ligand LIN-3. La cellule d'ancrage ou AC (« anchor cell »), située dans la gonade somatique est nécessaire à l'expression de LIN-3 et serait positionnée en amont des cellules VPCs. Suivant l'expression du ligand, la cellule P6.p intègre le signal qui se traduit par l'activation de la voie Ras accompagnée d'une répression concomitante de la voie Notch. La cellule se divise alors à trois reprises afin de générer huit cellules qui formeront la vulve centrale. À l'inverse, la différenciation des cellules précurseurs P5.p et P7.p résulte de l'activation de la voie Notch accompagnée d'une inhibition de la signalisation Ras. Ces cellules vont également se diviser trois fois pour éventuellement générer la structure latérale de la vulve. Les précurseurs P3.p, P4.p et P8.p, qui n'ont pas été adéquatement induits, ne se diviseront qu'une seule fois pour ensuite faire partie de l'épiderme syncytium qui recouvre le ver (Chang and Sternberg, 1999; Moghal and Sternberg, 2003; Sundaram, 2004).

1.8. Les objectifs du projet de thèse

Initialement identifiée chez la drosophile, CNK régule positivement l'activation de la voie de signalisation Ras/ERK. Une analyse génétique réalisée dans l'oeil de la drosophile a démontré l'implication de CNK en aval de Ras, mais en amont ou en parallèle de RAF. En effet, un allèle perte de fonction de *cnk* inhibe le phénotype induit par une forme oncogénique de Ras (Ras^{V12}), sans toutefois modifier le phénotype généré par RAF activée (Therrien et al., 1998). La surexpression de CNK amplifie par contre la rugosité de l'oeil induite par Ras^{V12}, démontrant par conséquent la possibilité que CNK puisse intégrer des signaux Ras dépendants. Cette coopération dépend de la portion NT de CNK, soit plus précisément du domaine SAM et de sa région CRIC (Therrien et al., 1999). À l'inverse, le phénotype induit par RAF activée est fortement antagonisé par la surexpression de CNK pleine longueur au même titre que par CNK^{CT}. Ces résultats suggèrent qu'en absence d'un signal en provenance de Ras, CNK pourrait inactiver la signalisation en titrant l'une des

composantes de la voie par l'intermédiaire de sa portion CT (Therrien et al., 1999). Une analyse biochimique avait d'ailleurs démontré la capacité de CNK^{CT} à interagir directement avec RAF, offrant par conséquent une cible potentielle de cet effet répresseur (Therrien et al., 1998).

L'objectif initial de mon projet était donc, dans un premier temps, de caractériser le mécanisme moléculaire par lequel CNK intègre des signaux Ras-dépendants. Pour ce faire, un essai fonctionnel, basé sur l'état d'activation de ERK dans un système de cellules en culture, a été développé dans le but de valider biochimiquement les résultats obtenus en génétique. Nous devons démontrer l'implication de la portion NT de CNK dans l'activation de la voie de signalisation Ras/ERK, pour ensuite valider l'importance du domaine SAM et de la région CRIC. La cartographie du site de liaison de RAF devait également être définie afin de vérifier si l'effet répresseur exercé par CNK^{CT} dans l'oeil de la drosophile pouvait être le résultat d'une titration de RAF. Les résultats de ces travaux seront présentés au chapitre 2 sous forme d'un article scientifique (Douziech et al., 2003).

L'étape suivante de mon projet consistait à évaluer l'importance fonctionnelle de CNK et de ses différentes régions d'interaction, au sein du complexe KSR/RAF/MEK en tirant profit d'un essai biochimique basé sur l'état d'activation de MEK dans un système de cellules en culture. Différents mutants de RAF et de KSR ont ensuite été testés dans le but de caractériser moléculairement leur impact respectif dans l'activation de la voie de signalisation Ras/ERK suivant l'expression de CNK^{NT}. Nous avons également vérifié la capacité de KSR à interagir spécifiquement avec CNK pour ensuite tenter d'évaluer l'importance de cette association, d'une part dans l'activation de la voie et d'autre part dans la formation du complexe KSR/RAF/MEK. Ces résultats font partie d'un manuscrit en préparation et seront présentés au chapitre 3.

2. CHAPITRE 2

Article 1:

Bimodal regulation of RAF by CNK in Drosophila

Publication dans: The EMBO journal Vol. 22 no.19 pp5068-5078.

2003

Bimodal regulation of RAF by CNK in *Drosophila*

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

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

*To whom correspondence should be addressed

tel.: (514) 987-5720

fax.: (514) 987-5591

Title: 46 characters

Abstract : 141 words

Total character count: 54,982

Running heads: Antagonistic effects of CNK on RAF function

2.1. Abstract

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

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

2.2. Introduction

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

RAS was recognized early on as a major player in RAF activation, principally by its ability to recruit RAF to the plasma membrane through an interaction between its effector loop region and the RAS-binding domain (RBD) on RAF (for review, see Avruch *et al.*, 1994). However, as this event did not appear sufficient to activate mammalian Raf-1 *in vitro*, additional molecules were predicted to participate in RAF activation. A search for proteins that could bind and modify RAF activity identified the 14-3-3 protein family as potential RAF regulators (for review, see Morrison and Cutler, 1997). These abundant proteins bind as dimers a wide range of targets through the recognition of specific sequence motifs, some of which requiring threonine or serine phosphorylation for binding (for review, see Tzivion and Avruch, 2002). RAF proteins contain two evolutionarily-conserved 14-3-3 binding sites; one surrounding phospho-serine 259 (pS259) and the second at phospho-serine 621 (pS621) in Raf-1 (Muslin *et al.*, 1996). Growing evidence now suggest that 14-3-3-binding to these sites have opposite effects on RAF. Whereas pS621 occupancy seems critical for RAF activity (Thorson *et al.*, 1998; Yip-Schneider *et al.*, 2000), pS259-binding correlates with inactive RAF (Dhillon *et al.*, 2002; Light *et al.*, 2002) possibly by forcing RAF to adopt an inactive conformation and/or by sequestering RAF in the

cytoplasm. Displacement of 14-3-3 from pS259, an event apparently triggered by RAS-binding and accompanied by pS259 dephosphorylation, appears to be one of the critical events leading to RAF activation. Despite its importance, this event does not fully account for RAF activation as mutations disrupting the pS259 site modestly enhance RAF catalytic function (Dhillon *et al.*, 2002; Light *et al.*, 2002).

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

Another potential RAF regulator is Connector eNhancer of KSR (CNK), a multidomain-containing protein conserved among metazoans, which has been identified originally in a KSR-dependent genetic screen in *Drosophila* (Therrien *et al.*, 1998). As for other *bona fide* components of the RTK/RAS/MAPK pathway in *Drosophila*, CNK is required for photoreceptor cell differentiation, wing vein formation as well as for imaginal disc cell proliferation and/or survival (Therrien *et al.*, 1998). Genetic epistasis experiments positioned CNK downstream of RAS, but upstream or in parallel to RAF, thereby suggesting that CNK might be regulating RAF activity (Therrien *et al.*, 1998). Consistent with that possibility, CNK was found to associate with the catalytic domain of RAF (Therrien *et al.*, 1998) and depletion of endogenous CNK by RNAi in S2 cells abolished

insulin-induced RAF activation (Anselmo *et al.*, 2002). The role of CNK with respect to RAF is probably not restricted to *Drosophila* as a rat homolog, named Maguin, has recently been found to associate with Raf-1 in rat brain extracts (Yao *et al.*, 2000).

Here, using a CNK-dependent MAPK activation assay in S2 cells combined to a novel RNAi-based rescue protocol, we show that CNK has both a positive and a negative impact on RAF function. We found that CNK, through two of its amino-terminal domains, integrates RAS signals to control MEK phosphorylation by RAF. In contrast, we found that CNK's ability to associate with RAF is mediated by a short bipartite element that acts as an inhibitor of RAF catalytic function. Finally, we present evidence that the opposite functions of CNK amplify signaling difference between the OFF and ON states of a KSR/RAF/MEK complex, which might contribute to the switch-like behavior of the MAPK module. Together, these findings identify CNK as a novel type of signal regulator that specifically controls RAF function.

2.3. Materials and methods

2.3.1. Plasmids

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

pMet-haMAPK was generated first by inserting a PCR product corresponding to *Drosophila* MAPK into the EcoRI/SacI sites of pMet. A double-stranded oligonucleotide encoding three HA epitopes was then inserted in the EcoRI site of pMet-MAPK upstream of the first methionine. pMet-pyoTor⁴⁰²¹RAFc was generated in three steps. First, an EcoRI fragment corresponding to Tor⁴⁰²¹RAFc (Dickson *et al.*, 1992) was inserted in the pMet vector. An AgeI site was then introduced immediately downstream from Torso's signal peptide sequences and used to insert a PYO epitope. pMet-mycMEK^{2E} was generated by replacing the serines 234 and 238 by glutamic acid residues.

pMet-RAS^{V12} and effector loop mutants were described previously (Therrien *et al.*, 1999). pMet-haRAS^{V12}, pMet-pyoRAF, pMet-KSR, and pMet-mycMEK^{DA} were described in Roy *et al.*, (2002). pHS-SEV^{S11} was described in Therrien *et al.*, (1998).

2.3.2. Cell culture, transfection, and protein analysis

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

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

2.3.3. Drosophila genetics and histology

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

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

2.4. Results

To delineate biochemically the position of CNK with respect to the components of the RAS/MAPK module, we depleted endogenous CNK by RNAi in a stable RAS^{V12}-expressing S2 cell line and assessed its effect on endogenous MEK and MAPK activation. As shown in Figure 2.1A, reduction of CNK by the addition of double-stranded (ds) CNK RNA specifically abrogated MEK and MAPK activation as revealed by the decrease in phosphorylated (activated) MEK and MAPK. These results demonstrated that CNK is required downstream of RAS for activation of the MAPK module. We next examined the effect of removing CNK on activated RAF-induced MAPK activation. Compared to the activated receptor tyrosine kinase Sevenless (Sev^{S11}) or RAS^{V12}, which did not activate MAPK upon CNK or MEK depletion (Figure 2.1B, lanes 3, 4, 6 and 7), activated RAF (Tor⁴⁰²¹RAFc) was still fully capable of activating MAPK upon CNK depletion, but not when MEK was eliminated (Figure 2.1B, lanes 9 and 10). Together, these results strongly suggest that CNK is acting between RAS and RAF.

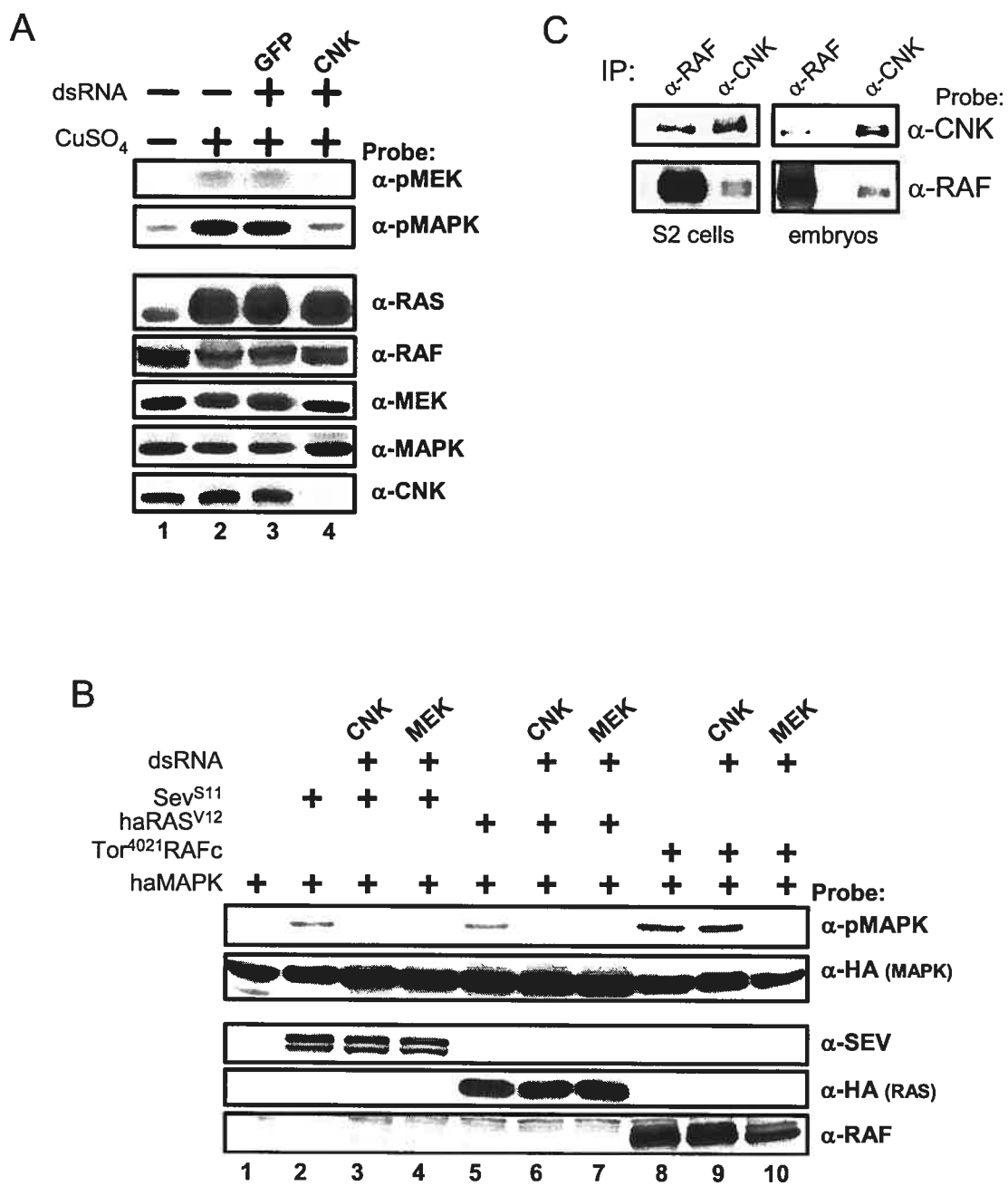
Overexpression of CNK has been found previously to associate with endogenous RAF in S2 cells. Furthermore, a C-terminal fragment of CNK has also been reported to interact directly with the catalytic domain of RAF (Therrien *et al.*, 1998). To demonstrate that a CNK/RAF complex does exist *in vivo*, we immunoprecipitated plain S2 cell or *Drosophila* embryo extracts using either anti-RAF or anti-CNK antibodies and probed immunoblots with either antibodies to look for co-immunoprecipitation. As shown in Figure 2.1C, the anti-RAF antibodies brought down endogenous CNK (~10% of total NP-40-soluble CNK) and likewise, the anti-CNK monoclonal antibody co-immunoprecipitated endogenous RAF (~5% of total NP-40-soluble RAF) in both S2 cells and embryos. These results thus demonstrate the existence of a CNK/RAF complex *in vivo*. Together with the fact that CNK activity appears to be required upstream of RAF, these findings strongly suggest that CNK directly regulates RAF function.

Figure 2.1 CNK activity is required downstream of RAS, but upstream of RAF

(A) Untreated (-) or CuSO₄-treated (+) RAS^{V12} cells were either incubated in the absence (-) or in the presence (+) of the indicated dsRNAs. pMEK and pMAPK levels, as well as endogenous RAS, RAF, MEK, MAPK and CNK levels were assessed by immunoblot analysis using the antibodies indicated to the right. The results shown here and thereafter are representative of at least three similar experiments.

(B) S2 cells were transfected with the haMAPK reporter construct (0.3μg) either alone (lane 1) or together (+) with the indicated combinations of SEV^{S11} (0.4 μg), haRAS^{V12} (0.4 μg) or Tor⁴⁰²¹RAFc (0.2 μg) constructs and the dsCNK or dsMEK RNAs (0.5 μg). Cells were lysed 16 hours post-induction of expression and pMAPK levels were determined. Protein levels were determined as indicated.

(C) Three milligrams of proteins from plain S2 cells or 0-14 hr Drosophila embryos were immunoprecipitated using either α-RAF or α-CNK antibodies.



2.4.1. CNK has opposite effects on RAF function

To characterize the molecular event(s) within the RAS/MAPK pathway that is/are regulated by CNK activity, we examined whether forced expression of CNK could modulate MAPK activation in S2 cells. For this purpose, we used three Flag epitope-tagged CNK constructs (Figure 2.2A), namely, full-length (FL), N-terminal (NT) and C-terminal (CT) that had previously been shown to modulate RAS^{V12}-mediated signaling in the developing *Drosophila* eye (Therrien *et al.*, 1999).

We assayed for MAPK activation by monitoring the phosphorylated levels of HA-tagged MAPK as performed above for endogenous MAPK. When expressed alone, none of the CNK constructs elevated phospho-MAPK (pMAPK) levels (data not shown and 2.2D, lane 2 for NT-CNK). However, compared to HA-tagged RAS^{V12} expressed alone (Figure 2.2B, lane 2), co-expression of FL-CNK and CT-CNK inhibited MAPK activation (Figure 2.2B, lanes 3 and 5, respectively), whereas NT-CNK stimulated MAPK activation (Figure 2.2B, lane 4). Therefore, these results indicate that forced expression of CNK affects RAS-mediated MAPK activation and also suggest that CNK comprises both positively- and negatively-acting regions.

Because CNK appears to be required between RAS and RAF (Figure 2.1B), we reasoned that the opposite effects of CNK could be due to a modulation of RAF function. To investigate this possibility, we examined the ability of FL-CNK and NT-CNK to alter MAPK activation induced by activated RAF or activated MEK (myc-tagged MEK^{2E}). If FL-CNK blocked a positive step upstream of RAF, there should be no effect on MAPK activation induced by activated forms of RAF or MEK. In contrast, if CNK blocked a step downstream of RAF, it should either inhibit RAF or both RAF and MEK activities depending on the position of the inhibitory event. Strikingly, we found that FL-CNK (like CT-CNK, data not shown), completely prevented MAPK activation induced by activated RAF (Figure 2.2C, lane 3), but not by activated MEK (lane 6) [the apparent slight positive effect of FL-CNK on pMAPK levels induced by MEK^{2E} (lane 6) was not reproducible].

Figure 2.2 Opposite behavior of CNK in the RAS/MAPK pathway

(A) Schematic representation of full-length (FL) *Drosophila* CNK (top open box) with its various domains / elements (black boxes): Sterile Alpha Motif (SAM); Conserved Region In CNK (CRIC); PSD-95/DLG-1/ZO-1 (PDZ); Proline-rich stretch (Pro); Pleckstrin Homology (PH); RAF-Inhibitory Region (RIR); RAF-Interacting Motif (RIM); Inhibitory Sequence (IS). Numbers on top correspond to amino acid positions frequently referred to in the text. Solid lines, labeled to the left, denote the various CNK deletion constructs used in this study. Every CNK constructs contain one copy of the Flag epitope at the amino-terminus.

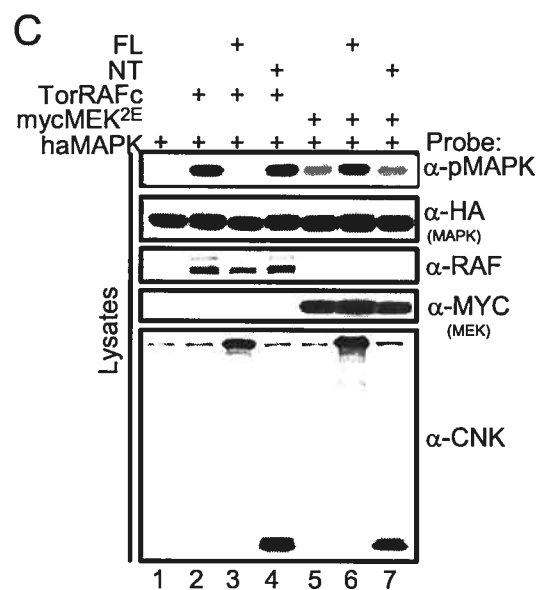
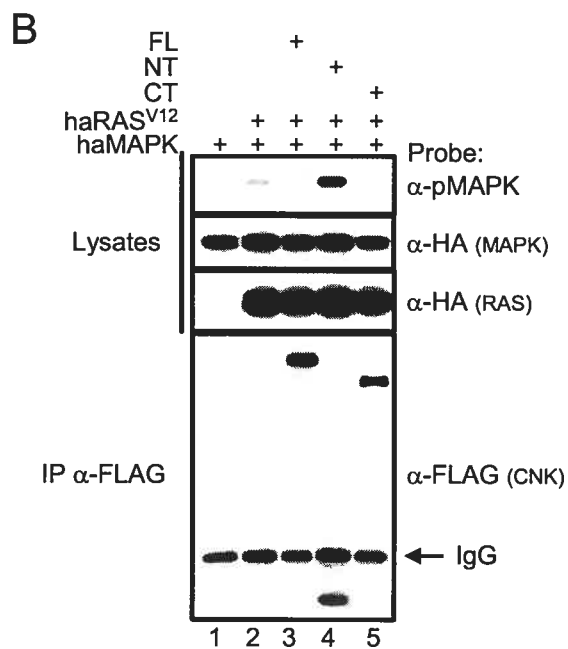
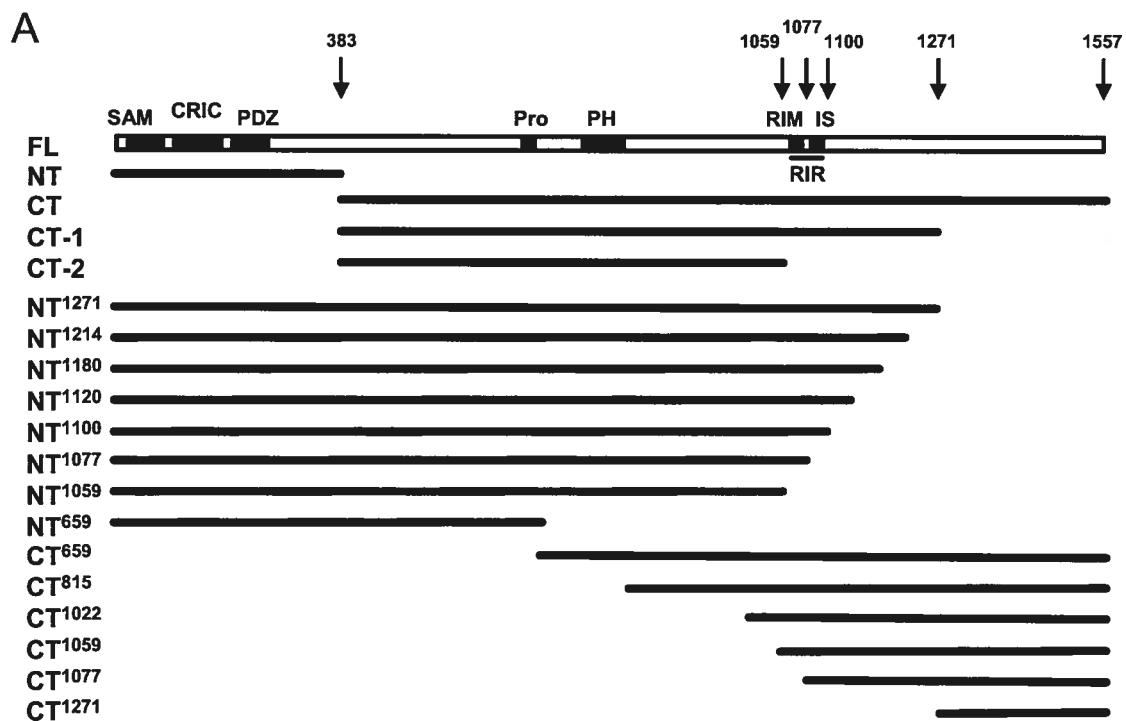
(B) S2 cells were transfected with haMAPK alone (lane 1) or with the indicated combinations of haRAS^{V12} (0.25 µg), FL-CNK (FL; 1.65 µg), NT-CNK (NT; 0.1 µg) and CT-CNK (CT; 1.65 µg) constructs. Cells were lysed 36 h post-induction and pMAPK levels were determined. Owing to a poor detection of Flag-tagged CNK constructs directly from cell lysates using the anti-Flag antibody, their levels were examined by immunoprecipitation.

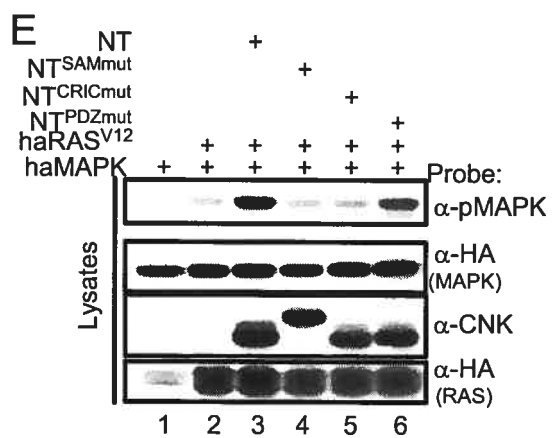
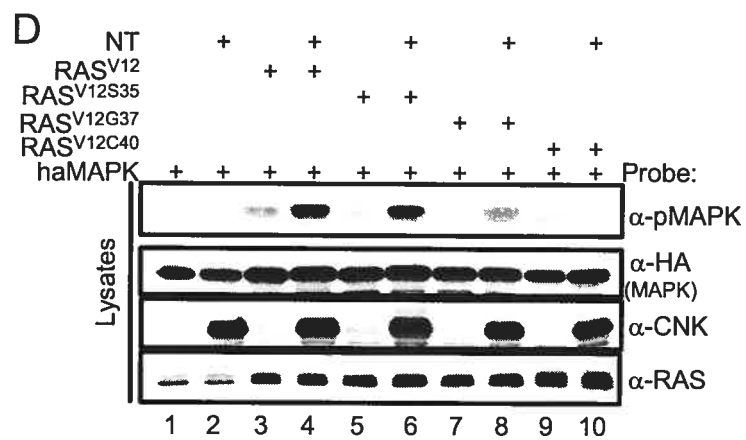
(C) S2 cells were transfected with haMAPK alone (0.3 µg) or with the indicated combinations of Tor⁴⁰²¹RAFc (0.2 µg), mycMEK^{2E} (0.3 µg), FL (0.6 µg) or NT (0.1 µg) constructs. Cells were lysed 16 h post-induction. The flag-tagged CNK variants were examined using anti-CNK.

(D) S2 cells were transfected and analyzed as in C using the indicated combinations of haMAPK (0.6 µg), RAS^{V12} (0.6 µg), RAS^{V12S35} (0.1 µg), RAS^{V12G37} (0.25 µg), RAS^{V12C40} (0.6 µg) and NT (0.25 µg). Various amounts of the RAS constructs were used to adjust for their apparent difference in expression levels. The RAS proteins were not tagged and thus were monitored using an anti-*Drosophila* RAS monoclonal antibody, which also detected endogenous RAS as seen in lanes 1 and 2.

(E) S2 cells were transfected using the indicated combinations of haMAPK (0.6 µg), haRAS^{V12} (0.25 µg), and wild type or mutant NT constructs (0.25 µg). The mutated SAM

domain (SAMmut) has a two amino acid change in conserved residues (amino acids W17S and I18S) that are critical for structural integrity (Stapleton et al., 1999). For unclear reasons, this NT-CNK mutant migrates differently from the other NT constructs (lane 4). We have generated another mutant version of the SAM domain (L71K), which changes an amino acid shown to be critical for dimer formation of the EphA4 receptor SAM domain, but does not appear to alter the structural integrity of the domain (Stapleton et al. 1999). This mutated SAM domain (NT^{L71K}-CNK) migrates normally, and like the SAM^{W17S-I18S} mutant, it does not cooperate with RAS^{V12} (data not shown). NT^{CRICmut} has a three amino acid deletion (A162-H163-R164) in the CRIC region similar to the mutation found in a *Drosophila cnk* loss-of-function allele (Therrien et al., 1998). Finally, NT^{PDZmut} has a two amino acid change (G217S and F218S) in highly conserved residues of the PDZ domains (Ponting et al., 1997).





These results therefore indicate that the negative influence of CNK occurs at a step between RAF and MEK. We applied the same logic to position the positive effect of NT-CNK and concluded that NT-CNK exerts its positive effect in a RAS-dependent manner between RAS and RAF as NT-CNK was inert on its own and did not cooperate with either activated RAF or MEK (Figure 2.2C, lanes 4 and 7, respectively).

Therrien *et al.*, (1999) previously reported that NT-CNK cooperated in the *Drosophila* eye not only with RAS^{V12}, but also with RAS^{V12G37}, which is a RAS effector loop mutant that has a much reduced capacity to send signals through the MAPK pathway owing to its impaired association with RAF (White et al. 1995). They concluded that either NT-CNK augments RAS signaling through a RAS^{V12G37}-dependent, but MAPK-independent pathway or that, if NT-CNK functions between RAS and RAF, it could rescue or compensate to some extent the defect caused by this particular effector loop mutation thereby permitting RAF activation. To distinguish between these possibilities, we co-expressed NT-CNK with RAS^{V12} or the three RAS effector loop mutations that had been tested. These included RAS^{V12S35} that interacts normally with RAF, and RAS^{V12G37} and RAS^{V12C40} that no longer interact with RAF (data not shown). As shown in Figure 2.2D, NT-CNK strongly augmented pMAPK levels induced by either RAS^{V12} or RAS^{V12S35} (lanes 3 to 6) and surprisingly, it also allowed RAS^{V12G37}, which is inert on its own, to activate MAPK (compare lanes 7 and 8). These data therefore suggest that NT-CNK exerts its effect not through an alternate pathway, but largely within the RAS/MAPK pathway. The fact that NT-CNK appears to compensate to some extent the inability of RAS^{V12G37} to activate MAPK, but not for RAS^{V12C40} (Figure 2.2D, compare lanes 9 and 10), indicates that these two effector loop mutations are not equivalent with respect to their defect in activating RAF.

NT-CNK comprises three conserved regions (SAM, CRIC and PDZ domains; Figure 2.2A). To determine which of these is required for the positive effect of NT-CNK on the MAPK module, we tested the activity of NT-CNK mutant constructs affecting each domain individually. When co-expressed with RAS^{V12}, the mutated SAM and CRIC domain variants failed to cooperate with RAS (Figure 2.2E, lanes 4 and 5). In contrast, the

PDZ domain mutant still retained activity (Figure 2.2E, lane 6). These results thus indicated that the SAM and CRIC domains are critical for the ability of NT-CNK to stimulate MAPK activation by RAS. Since the CRIC mutation used in this assay corresponds to the lesion found in a *cnk* loss-of-function allele (Therrien *et al.*, 1998), it strongly suggests that our assay mimics a genuine functional property of CNK (see below).

2.4.2. Two short amino acid sequences in CNK define a “RAF-Inhibitory Region” that blocks MEK phosphorylation by RAF

Interestingly, in addition to its positive role on the MAPK module, CNK can block RAS- or RAF-dependent MAPK activation (Figure 2.2). We investigated this property by first mapping the region(s) of CNK that has a negative influence on the pathway. We generated a series of C-terminal deletions of CNK (Figure 2.2A) and tested their ability to inhibit RAS-dependent MAPK activation. As FL-CNK, the first deletion construct (NT¹²⁷¹-CNK) also blocked RAS^{V12} activity (Figure 2.3A, lane 4). In contrast and similar to NT-CNK, two other deletion constructs (NT¹⁰⁵⁹- and NT⁶⁵⁹-CNK) no longer inhibited, but instead cooperated with RAS^{V12} (Figure 2.3A, lanes 5, 6 and 7). These data indicated that the C-terminal boundary of an inhibitory region, hereafter called RAF-Inhibitory Region (RIR), lies between amino acid position 1059 and 1271. Finer deletion constructs were then similarly tested, which positioned the RIR to a short area of about forty amino acids between positions 1059 and 1100 (see Supplementary Figure 2.1 available at *The EMBO Journal* Online).

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

Figure 2.3 Functional mapping of the RAF-Inhibitory Region (RIR) on CNK

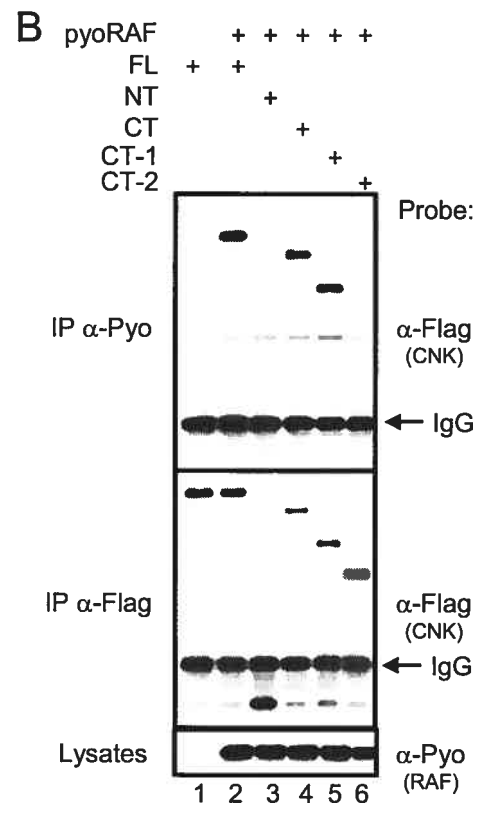
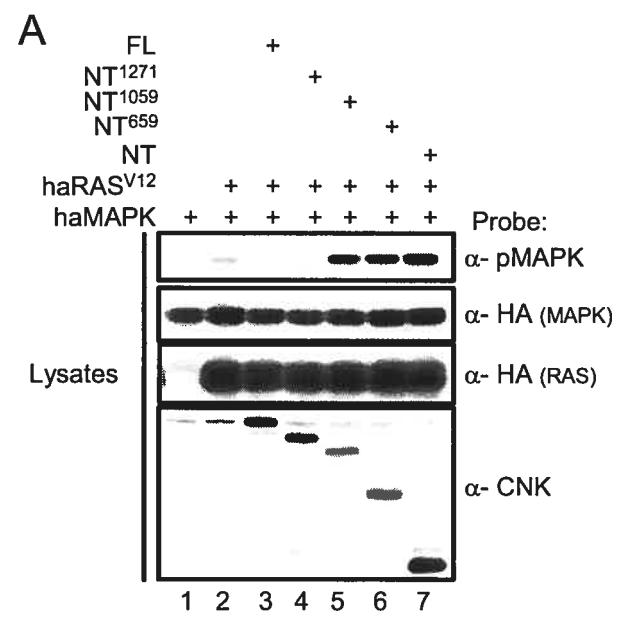
(A) S2 cells were transfected with the indicated combinations of haMAPK (0.6 μg), haRAS^{V12} (0.25 μg), FL and NT constructs (0.1 to 1 μg). Cell lysates were prepared 16 h post-induction of expression.

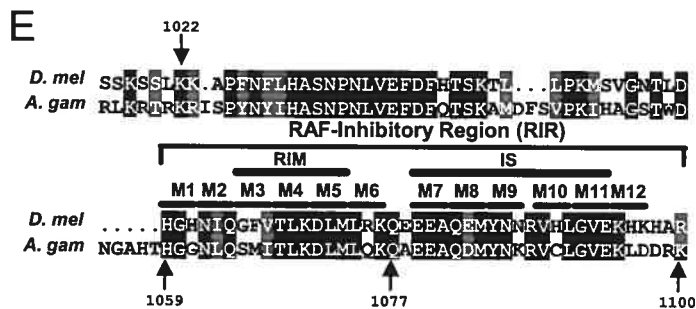
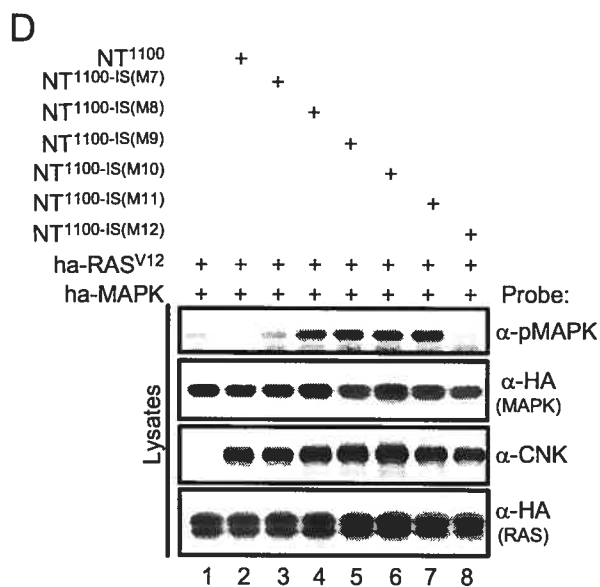
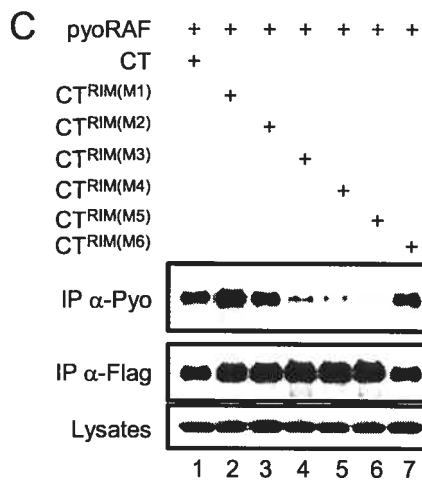
(B) S2 cells were transfected with the indicated combinations of pyoRAF (0.7 μg), FL and CT constructs (1 to 1.8 μg) and NT construct (0.08 μg). Cells were lysed 36 h post-induction. For these experiments and below, pyoRAF was immunoprecipitated (IP) from cell lysates using the α -Pyo antibody and co-immunoprecipitated CNK proteins were detected using the α -Flag antibody.

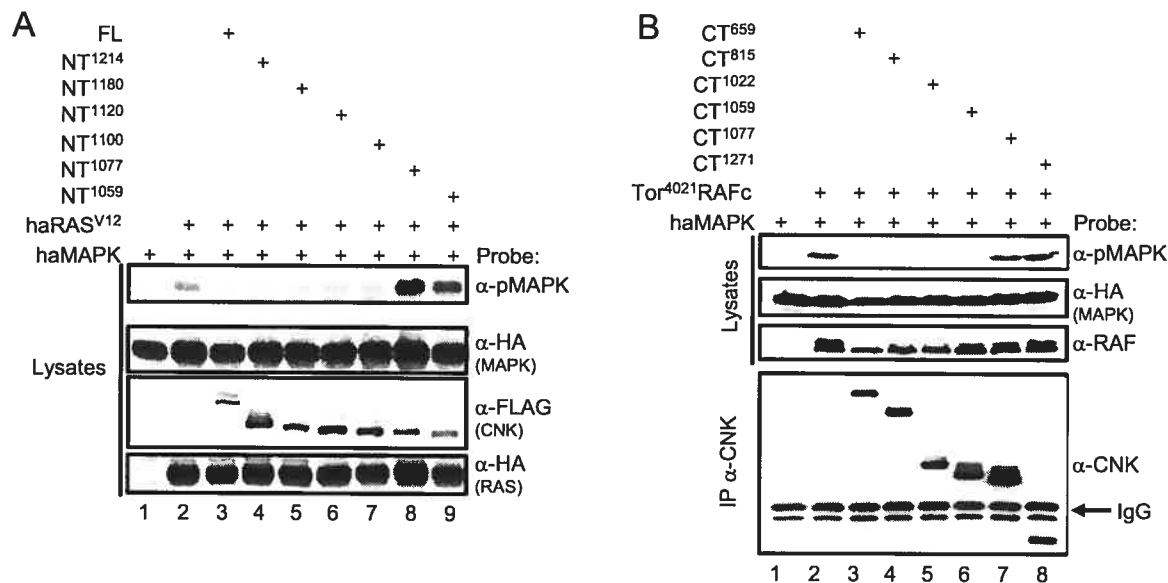
(C) S2 cells were transfected with the indicated combinations of pyoRAF (0.7 μg) and CT constructs (1 to 1.8 μg).

(D) S2 cells were transfected with the indicated combinations of haMAPK (0.3 μg), haRAS^{V12} (0.125 μg), NT constructs (0.6 μg).

(E) Amino acid comparison of the *Drosophila* (*D. mel*) CNK RAF-Inhibitory Region (pos. 1022-1100) to the equivalent region of *A. gambiae* (*A. gam*) CNK. Identical and conserved residues are in black and grey boxes, respectively. Positions of the “alanine-scanning” mutations (M1 to M12) are depicted as a solid line over the amino acid sequence. Minimal amino acid sequence for the RIM and the IS are also highlighted by a solid line over the relevant area. Although sequences within the 1022-1059 interval also appear to participate in RAF-binding (Suppl. Figure 2.2B), these are not essential.





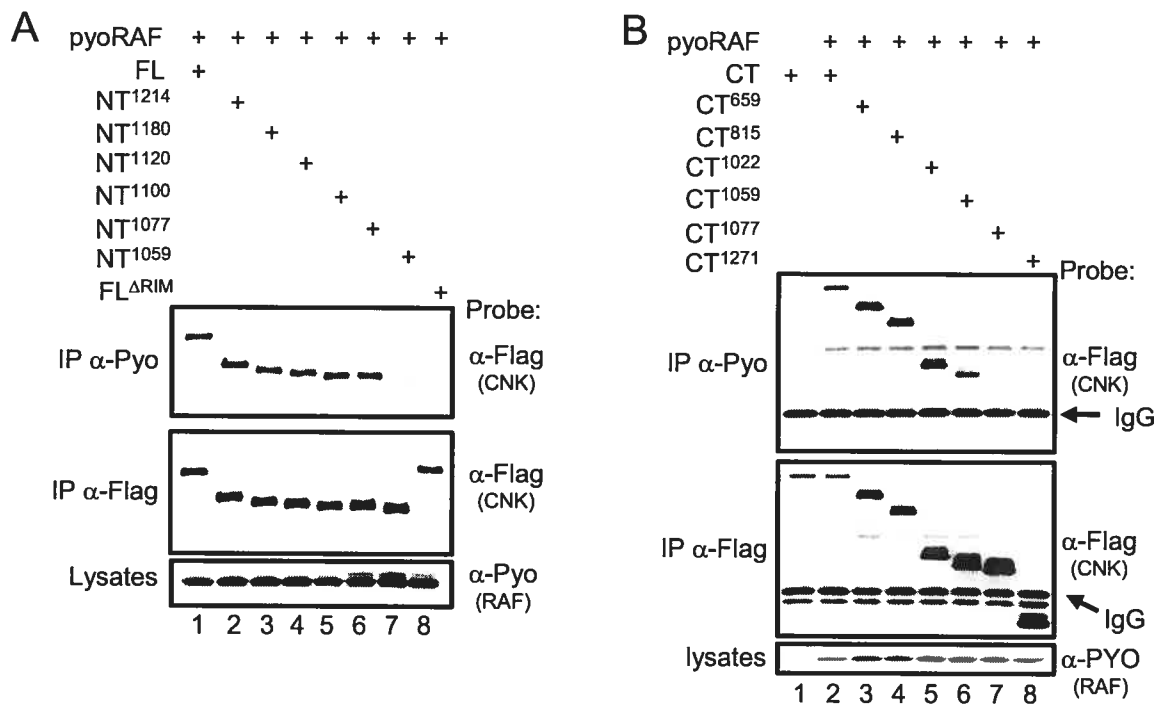


Supplemental Figure 2.1 Fine mapping of the RAF-Inhibitory Region (RIR) on CNK

(A) S2 cells were transfected with the indicated combinations of haMAPK (0.3 mg), haRASV12 (0.125 mg), FL and NT constructs (0.1 to 0.6 mg). To narrow down further the RIR C-terminal border, five additional C-terminal truncations within the 1059-1271 region were tested (Figure 2.2A). This positioned the C-terminal border within a 23 amino acid stretch (position 1077 and 1100; compare lanes 7 and 8). (B) S2 cells were transfected with the indicated combinations of haMAPK (0.3 mg), Tor4021RAFc (0.2 mg), and CT constructs (0.1 to 0.6 mg). A similar deletion study was carried out as in (A) to delineate the RIR N-terminal border. Six N-terminal truncations of CT-CNK (Figure 2.2A) were co-expressed along with activated RAF, instead of RASV12, since Tor4021RAFc is more potent than RASV12 to activate MAPK, thus more sensitive to detect a release of inhibition. This placed the RIR N-terminal border between positions 1059 and 1077 (compare lanes 6 and 7).

were detected by probing immunoblots with an anti-flag antibody. As shown in Figure 2.3B (lanes 2, 3 and 4), FL- and CT-CNK, but not NT-CNK, associated with RAF (~25% of RAF is associated with FL-CNK, and ~50% of FL-CNK is associated with RAF in these conditions). Two C-terminal deletions of CT-CNK (CT-1 and CT-2, Figure 2.2A) were also included in that experiment. CT-1, which ended at position 1271, still bound to RAF, whereas CT-2, which ended at position 1059, no longer interacted (Figure 2.3B, lanes 5 and 6). These results thus placed the C-terminal border of the RAF-binding region, hereafter called the RAF-Interacting Motif (RIM), in the 1059-1271 interval. The finer C- and N-terminal truncations used above to map the RIR were then used to delineate more accurately the RIM. This analysis showed that sequences in the 1059-1077 interval are critical for RAF binding (see Supplementary Figure 2.2). Finally, we narrowed down the RIM to a nine amino acid stretch (positions 1065-1073) by testing for RAF interaction, a series of “alanine scanning” mutants within the 1059-1077 interval (M1 to M6, Figures 2.3C and E). Together, our data thus revealed that the RIM is part of the RIR, which strongly suggests that the binding of RAF by CNK is responsible for the inhibitory effect of CNK. In support of this conclusion, the three point mutations (M3 to M5) that impeded RAF binding (Figure 2.3C) also abrogated the inhibitory effect of CNK (data not shown and see below).

Our mapping data showed that the RIR comprises additional sequences after the C-terminal end of the RIM (Figure 2.3E). This indicated that other sequences that are not required for RAF interaction have an inhibitory effect on RAS signaling. To define more precisely the position of these sequences, we tested a set of “alanine scanning” mutants within the 1077-1100 interval (M7 to M12, Figure 2.3E) and found that mutants M7 to M11 relieved the inhibitory effect of CNK (Figure 2.3D) but, as expected, did not prevent RAF-binding (data not shown and see below). These results therefore confirmed that the RIR contains at least two distinct negative elements: the RIM that interacts with RAF and an adjacent inhibitory sequence (IS), that is required along with the RIM to inhibit signal transmission within the MAPK module.



Supplemental Figure 2.2 Fine mapping of the RAF-Interacting Motif (RIM) on CNK

(A) S2 cells were transfected with the indicated combinations of pyoRAF (0.7 mg), FL and NT constructs (1 to 1.8 mg). (B) S2 cells were transfected with the indicated combinations of pyoRAF (0.7 mg) and CT constructs (0.2 to 1.3 mg). Note that the CNK/RAF interaction is significantly reduced, although not eliminated, when sequences between positions 1022 and 1059 are removed (lanes 4 and 5), which suggests that this interval includes sequences important for stable CNK/RAF association, although they are not essential for binding.

To verify whether the two negative elements (RIM and IS) also functioned accordingly in full-length CNK, we introduced the M4 mutation (affects the RIM) or the M11 mutation (affects the IS) in FL-CNK and examined their behavior with respect to RAS-induced MAPK activation and RAF-binding. Compared to FL-CNK (Figure 2.4A, lane 3), FL^{RIR(M4)}-CNK and FL^{RIR(M11)}-CNK no longer inhibited MAPK activation, but instead strongly cooperated with RAS^{V12} (lanes 4 and 5). Furthermore, a double FL^{RIR(M4/M11)}-CNK mutant cooperated to the same extent as either single mutants (lane 6), thus indicating that the two elements are co-required for the negative effect. As for NT-CNK (Figure 2.2), the ability of those mutants to cooperate with RAS appears to depend on the N-terminal domains of CNK as a double mutant version that affects both the SAM domain and the RIR barely cooperated with RAS^{V12} (Figure 2.4A, lane 7). We next examined the ability of the M4 and M11 mutants to associate with RAF. As predicted, FL^{RIR(M4)}-CNK no longer interacted with RAF (Figure 2.4B, lane 3), whereas FL^{RIR(M11)}-CNK interacted normally with RAF (lane 4), thus confirming that only the RIM is essential for RAF-binding. Taken together, these results demonstrate that the RIM and IS elements, which constitute the RIR, are jointly required and sufficient to explain the inhibitory effect of CNK on the MAPK module.

Finally, to determine whether the RIR functions autonomously, we fused it (position 1059-1100) to the C-terminal end of GFP (GFP-RIR) and examined whether this was sufficient to transpose CNK's negative effect to GFP. As shown in Figure 2.4C, GFP-RIR strongly inhibited RAS-induced MAPK activation (lane 4), whereas GFP alone (lane 3) or two inactivated versions (lanes 5 and 6) of the RIR (RIR^{M4} or RIR^{M11}) did not affect MAPK activation. These results therefore indicate that the RIR acts as an independent negative unit.

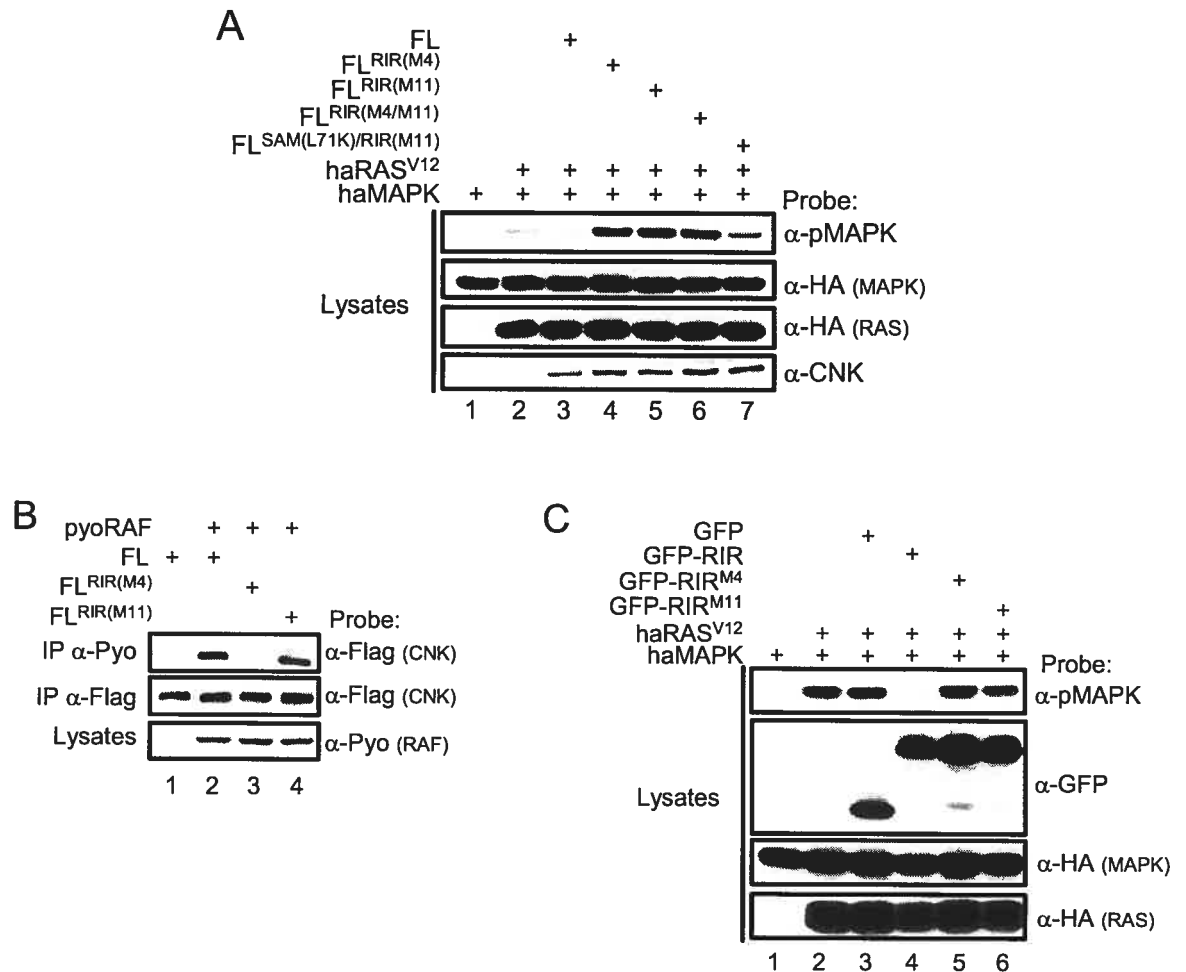


Figure 2.4 The negative effect of CNK is mediated by two co-required elements

(A) S2 cells were transfected with the indicated combinations of haMAPK (0.3 μ g), haRAS^{V12} (0.14 μ g), FL (0.5 to 0.8 μ g) constructs. (B) S2 cells were transfected with the indicated combinations of pyoRAF (0.7 μ g) and FL-CNK (1.5 μ g) constructs. (C) S2 cells were transfected with the indicated combinations of haMAPK (0.3 μ g), haRAS^{V12} (0.2 μ g) and GFP constructs (0.5 μ g).

2.4.3. The RIR of CNK antagonizes RAS signaling during eye development

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

To determine whether the RIR had any inhibitory effect on RAS^{V12} signaling *in vivo*, we compared the ability of FL-CNK or a CNK transgene with no RIM (FL^{ΔRIM}-CNK) to modulate RAS^{V12} effects in the developing *Drosophila* eye. We crossed transgenic flies expressing the FL-CNK constructs to a strong RAS^{V12} transgenic line (named CR2; Maixner *et al.*, 1998). As observed previously, FL-CNK cooperated with RAS^{V12} (data not shown). Strikingly, however, co-expression of FL^{ΔRIM}-CNK and RAS^{V12} resulted in a complete synthetic lethality at the pupal stage with pupae presenting highly disorganized eye tissues (data not shown). This phenomenon probably resulted from a particularly strong

cooperation between RAS^{V12} and $FL^{\Delta RIM}$ -CNK. Given that both constructs are probably expressed to low levels in tissues other than the eye, the observed lethality is likely a consequence of detrimental MAPK activation in tissues required for viability. To circumvent this problem, we crossed the CNK transgenic lines to a weaker RAS^{V12} line (CR1; Maixner *et al.*, 1998). As expected, instead of cooperating with RAS^{V12} , FL-CNK slightly suppressed the CR1 rough eye phenotype (compare Figures 2.5B and 2.5C). To confirm this, we determined the average number of R7 cells per ommatidium for each genotype as a read-out for RAS/MAPK signaling (Fortini *et al.*, 1992). The eye section results are summarized at the bottom of each SEM (Figures 2.5A to 2.5D). As shown in Figure 2.5B, CR1 had an average of 1.9 R7 cells per ommatidium. Co-expression of FL-CNK reduced this number to 1.2 (Figure 2.5C), which confirmed its ability to suppress RAS^{V12} in this context. In contrast to FL-CNK, the $FL^{\Delta RIM}$ -CNK construct cooperated with RAS^{V12} as the eyes were rougher than the CR1 parents and the average number of R7 cell per ommatidium increased to 2.7 (Figure 2.5D). Therefore, as in S2 cells, the RIR has a negative effect on RAS signaling during eye development. Identical results using the CR1 and CR2 lines were obtained with CNK lines that had a mutated IS element (G.L. and M.T. unpublished results). Furthermore and importantly, we found that the ΔRIM or IS mutant constructs were as competent as wild-type CNK to rescue the lethality of *cnk* null alleles (data not shown), thus strongly suggesting that the RIR does not naturally function as a positive element (see below).

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

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

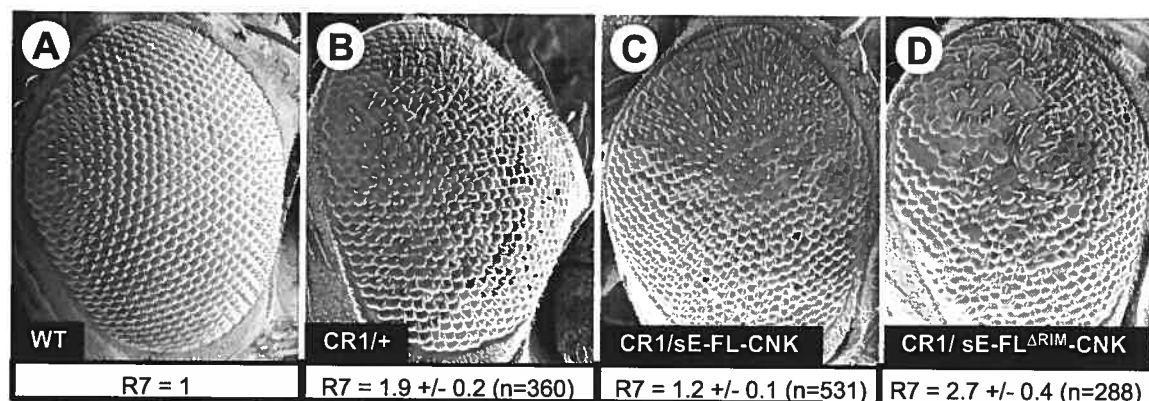


Figure 2.5 CNK's RAF-Inhibitory Region antagonizes RAS signaling *in vivo*

(A-D) Scanning electron micrographs of adult *Drosophila* eyes. The genotypes are indicated on the figures, as well as the average number of R7 cells per ommatidium (+/- SD). n denotes the number of ommatidia analyzed and three eyes were analyzed per genotype. A *t* test applied on the difference in mean number of R7 cells/ommatidium between the CR1 and CR1/sE-FL-CNK genotypes or the CR1 and CR1/sE-FL^{ΔRIM}-CNK genotypes confirmed their statistical significance: P = 0.006 and 0.036, respectively.

juxtaposition, thereby abrogating signal transmission. According to that model, the RIR might normally be required for higher order assembly of the RAS/MAPK module and thus for optimal signal transmission.

To assess unambiguously the natural effect of the RIR on the MAPK pathway, its activity needs to be monitored in non-overexpressed conditions. To that end, we devised a novel RNAi-based strategy in S2 cells that allowed us to deplete endogenous CNK levels and to restore them with exogenous, but non-targetable CNK transcripts. The ability to rescue a CNK knock-down phenotype, such as a MAPK activation defect, would indicate that relatively normal levels of exogenous CNK have been reached. This approach could then serve as a simple assay to evaluate the effect of specific CNK mutants in relatively normal stoichiometric conditions. To specifically remove endogenous CNK, we used a dsCNK RNA (dsCNK^{3'UTR}) encompassing exclusively CNK's 3'UTR sequences (Figure 2.6A), which reduced endogenous CNK levels by over 90% after four days of culture (data not shown). Conversely, to obtain dsCNK^{3'UTR}-resistant CNK transcripts, we replaced the natural 3'UTR sequences in the FL-CNK construct by those of the *Drosophila alcohol dehydrogenase (ADH)* gene. The resulting chimeric transcripts (CNK-3'ADH) were insensitive to the dsCNK^{3'UTR} RNA (see inset, Figure 2.6A, and data not shown).

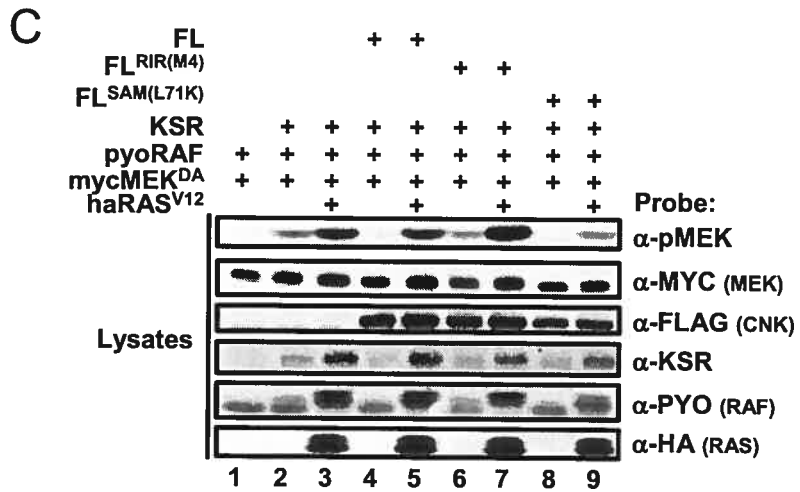
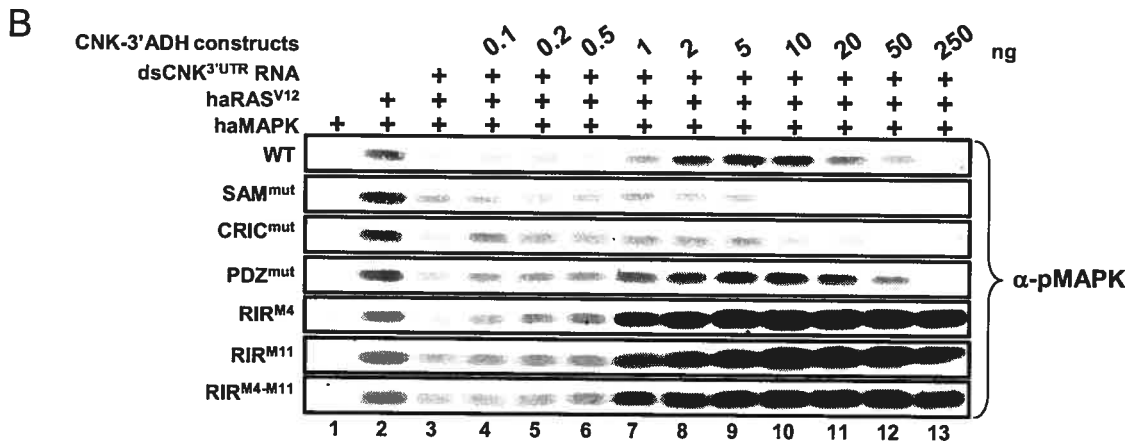
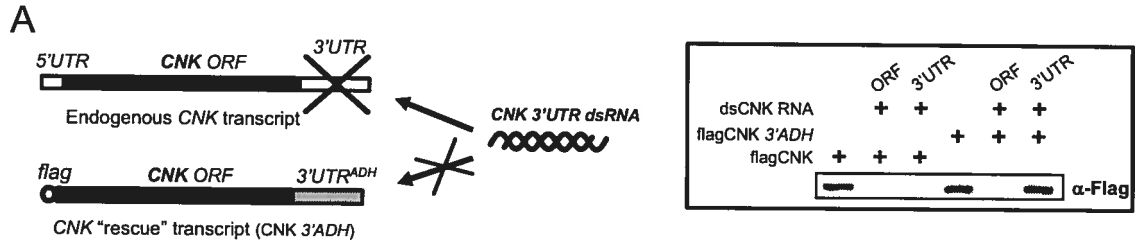
Consistent with its ability to reduce endogenous CNK levels, dsCNK^{3'UTR} RNA decreased RAS-induced MAPK activation (Figure 2.6B, compare lanes 2 and 3). We then determined whether introduction of a wild-type CNK-3'ADH (CNK^{WT}-3'ADH) construct would rescue MAPK activation under those conditions. Given that CNK overexpression leads to an inhibition of RAS-induced MAPK activation (Figure 2.2), we conducted parallel co-transfections using a spectrum of plasmid quantities to narrow down optimal rescuing amounts. Strikingly, not only this approach restored MAPK activation, but also revealed a dose-dependent rescue profile identifying reproducible sub-optimal (0.1 to 1 ng), optimal (2 to 10 ng) and inhibitory (> 20 ng) doses of plasmids (Figure 2.6B, WT panel; and data not shown). To determine whether this assay faithfully identifies CNK regions that are functionally relevant with respect to RAS-mediated MAPK activation, we tested the effect

Figure 2.6 CNK has a natural antagonistic effect on signal transmission through the MAPK module

(A) Diagram representing the strategy used to deplete endogenous CNK by targeting its 3'UTR sequences. CNK "rescue" is achieved by co-transfecting a CNK construct containing the ADH 3'UTR sequences. The specificity of the CNK 3'UTR dsRNA compared to a dsRNA targeting CNK's open reading frame (ORF) is shown in the inset: FL-CNK (0.4 μ g) or FL-CNK-3'ADH (0.4 μ g) constructs were transfected in S2 cells along either CNK's 3'UTR or ORF dsRNAs (0.5 μ g). Cells were lysed 36 h post-induction.

(B) S2 cells were transfected with the indicated combinations of haMAPK (0.3 μ g), haRAS (0.125 μ g), dsCNK^{3'UTR} RNA (20 μ g) and the indicated amounts of the CNK-3'ADH variants. Cells were lysed four days post-induction of expression. Activated MAPK levels were detected (α -pMAPK) as well as those for haMAPK, haRAS^{V12} and CNK-3'UTR variants (not shown).

(C) S2 cells were transfected with the indicated combinations of mycMEK^{DA} (0.3 μ g), pyoRAF (0.03 μ g), KSR (0.1 μ g), RAS^{V12} (0.6 μ g) and FL-CNK variant (1.1 μ g) constructs. Cells were lysed 36 h post-induction of expression.



of mutations affecting the SAM, CRIC and PDZ domains, respectively. Consistent with their implication in the cooperation observed above between NT-CNK and RAS^{V12} (Figure 2.2E), we found that CNK^{SAMmut}-3'ADH, and CNK^{CRICmut}-3'ADH behave as loss-of-functions, whereas CNK^{PDZmut}-3'ADH is as competent as wild-type CNK to restore MAPK activation (Figure 2.6B). The inability of the CRIC mutation to rescue MAPK activation is consistent with its previous identification as a *cnk* loss-of-function allele (Therrien *et al.*, 1998), thereby providing compelling evidence that this assay can identify *bona fide* functional domains/elements. In addition, these results indicate that the SAM domain is genuinely required for RAS-induced MAPK activation, whereas the PDZ domain is not involved.

Next, we tested the ability of mutations affecting the RIR to rescue MAPK activation. If the RIR normally has a positive function, its disruption should attenuate or preclude the rescue capability of a RIR mutant construct at doses optimal for WT CNK. Markedly, the three tested RIR mutants (M4, M11 or M4/M11) did not behave as loss-of-function, but rather as gain-of-function alleles (Figure 2.6B). Therefore, these results demonstrate that the RIR does not provide a positive input, but functions as a true inhibitory module.

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

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

Given that CNK's negative property seems to affect precisely the RAF/MEK step, we examined whether CNK could attenuate KSR-induced MEK activation by RAF.

As previously reported (Roy *et al.*, 2002), co-expression of KSR with pyoRAF and kinase-inactivated mycMEK (mycMEK^{DA}), resulted in MEK activation (Figure 2.6C, lane 2), which could be further enhanced by co-expressing RAS^{V12} (lane 3). However, co-expression of FL-CNK along with KSR, RAF and MEK strongly blocked RAS-independent MEK activation (compare lanes 2 and 4). To determine whether the RIR was responsible for this effect, we tested the FL-CNK^{RIRM4} mutant in similar conditions. As shown in lane 6, this mutation obliterated the repressive effect of CNK. Similar results were obtained with either the RIR^{M11} or RIR^{M4-M11} mutations (data not shown). Interestingly, when RAS^{V12} was introduced in the presence of FL-CNK, RAS activity counteracted much of the inhibitory effect (compare lanes 4 and 5), presumably owing to the ability of the amino-terminal portion of CNK to cooperate with activated RAS. Consistent with that possibility, FL-CNK^{SAMmut} was far less active than wild-type FL-CNK (compare lanes 5 and 9). Taken together, these results are consistent with a model whereby CNK prevents signal transmission between RAF and MEK within a KSR/RAF/MEK complex in the absence of a signal, but then facilitates signaling upon upstream activation, thus increasing significantly the signal-to-noise ratio of this signaling complex.

2.5. Discussion

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

Three lines of evidence support the claim that CNK is essential for RAF activity. First, depletion of endogenous CNK prevented MAPK activation by RAS^{V12}, but not by activated RAF (Figure 2.1B). Secondly, NT-CNK cooperated with RAS^{V12} to activate MAPK (or MEK; data not shown), but not with activated RAF (Figures 2.2B and 2.2C). This result not only places CNK's positive effect between RAS and RAF, but it also suggests that this activity is RAS-dependent. Finally, NT-CNK rescued MAPK activation by RAS^{V12G37} (Figure 2.2D). This finding is striking as it provides strong evidence that CNK function is intimately linked to the RAF activation mechanism. As for mammalian RAS (White *et al.*, 1995), *Drosophila* RAS G37 or C40 effector mutants no longer interact with *Drosophila* RAF (data not shown). Since only the G37 mutant is rescued by NT-CNK co-expression (a RAF-dependent event; data not shown), it suggests that it is either a weak loss-of-function with respect to RAF binding and/or that it retained another essential function that has been lost by the C40 mutant. The G37 mutant may thus prove useful to elucidate the role of CNK in RAF activation.

We have mapped CNK's inhibitory function to a thirty amino acid region named the RIR (RAF-Inhibitory Region). This region comprises at least two distinct, but co-required negative elements: the RIM (RAF-Interacting Motif) and the IS (Inhibitory Sequence) elements (Figure 2.3E) that function together as an inhibitory unit (Figure 2.4A). Although its mechanism of action is unknown, the RIR appears to block signal transmission from RAF to MEK (Figures 2.2C and 2.6C) through an association between the RIM and the RAF catalytic domain. Indeed, an isolated RAF catalytic domain or the Torso-RAF catalytic domain fusion protein (Tor⁴⁰²¹-RAFc) have been found to associate with CNK

(Therrien *et al.*, 1998; and data not shown). The association appears to be direct as it is detectable using a yeast two-hybrid interaction assay (M.L. and M.T., unpublished results). The role of the IS element is unknown. It is not required for RAF-binding, but it is essential for the inhibitory effect of the RIR (Figure 2.4). Interestingly, since only a catalytically-competent RAF kinase domain associates with CNK (data not shown), it is possible that the RIR works as a RAF pseudosubstrate to control MEK phosphorylation.

What could be the purpose of CNK's bimodal effect? Several scenarios can be envisioned to explain our data and two of these are presented here. In quiescent cells, CNK could function together with 14-3-3 in preventing signal-independent MEK activation by RAF. This negative role might be important to ensure that no signal leaks through prior to genuine upstream activation, which otherwise might be sufficient to initiate a biological response. Upon RAS activation, CNK's amino-terminal domains would then integrate RAS signals and thus convert CNK into a positive regulator of signal transmission (Figure 2.7A). As CNK's opposite action appears to augment the signal-to-noise ratio of the RAS/MAPK module (Figure 2.6C), it might contribute to switch-like activation of the pathway (Ferrell, 1998). Alternatively, CNK's negative effect might have a similar role as RKIP, a recently described RAF inhibitor (Yeung *et al.*, 1999). Namely, it might work as a rheostat to finely adjust the amount of MEK molecules activated by RAF to satisfy cell-specific requirements. For that matter, it will be interesting to determine whether the RIR is itself negatively regulated to increase signaling flow from RAF to MEK (Figure 2.7A). This possibility is appealing given the large difference between the ability of WT-CNK and RIR-inactivated CNK constructs to rescue the MAPK activation defect (Figure 2.6B).

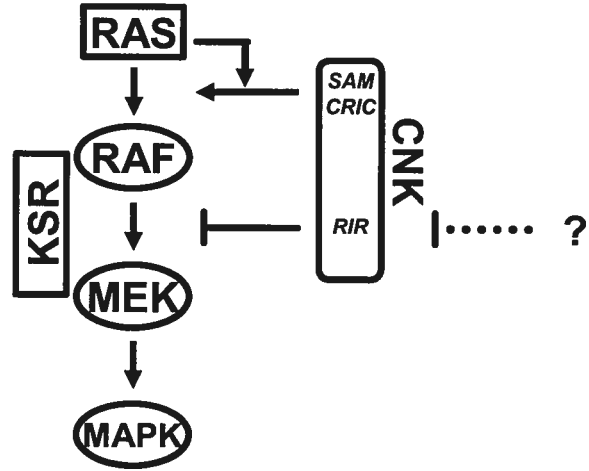
CNK homologues are present in other metazoans (Figure 2.7B). This evolutionary conservation strongly suggests that ERK/MAPK modules in other species are also regulated by a CNK activity at the level of RAF. Although the SAM and CRIC domains are relatively well conserved, the sequence corresponding to the RIR (Figure 2.3E) seems to be unique to *D. melanogaster* and *A. gambiae*. Nonetheless, rat CNK2/maguin isoforms (CNK's closest homologues; Figure 2.7B) have been shown to associate with c-RAF (Yao *et al.*, 2000), which suggest that they contain a region functionally similar to the RIR. If that

Figure 2.7 CNK, a bimodal regulator of RAF function

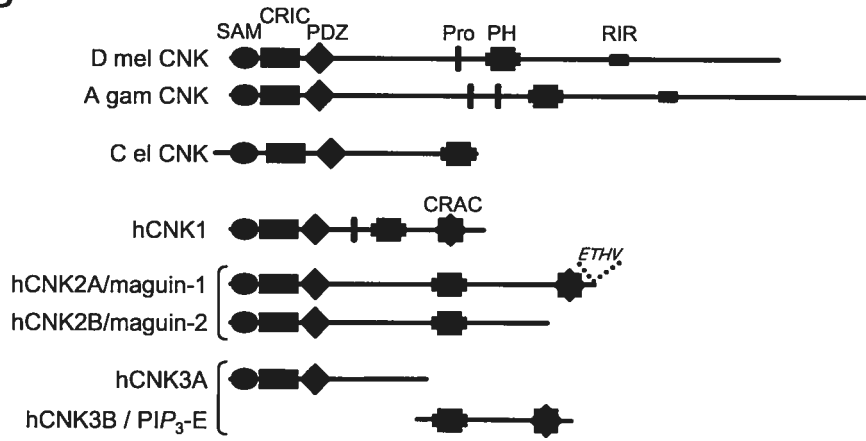
(A) Summary of the effects of CNK on the RAS/MAPK module. The SAM and CRIC domains are two critical regions integrating RAS's signals that then feed at a step between RAS and RAF. In contrast, the RIR inhibits MEK phosphorylation by RAF by binding to the RAF catalytic domain. The question mark and the blunt dotted line illustrate the possibility that the RIR might itself be negatively regulated. KSR acts as a scaffold bridging RAF and MEK, thereby augmenting signal transmission (see Introduction).

(B) Structural comparison of CNK homologues found in *Drosophila melanogaster* (D mel; accession #AF100152), *Anopheles gambiae* (A gam; accession #EAA15086), *Caenorhabditis elegans* (C el; accession #R01H10.8) and human (h). There are at least three separate genes in humans: hCNK1 (accession #AF100153), hCNK2A/B (accession #AF418269 and #AF418270, respectively) and hCNK3A/B (accession #AK055911 and #AJ310566, respectively). Although hCNK2A and hCNK2B are splicing variants, the situation is not clear for hCNK3A and hCNK3B/PIP₃-E. Their respective ESTs were both mapped to the same chromosomal location (6q25.2; MapView NCBI), but are separated by approximately 100 kb and have no overlapping sequences. They might thus represent to two separate genes. In addition to the domain composition previously described for the CNK homologues (Therrien et al., 1998), mammalian and other CNKs found in chordates (not shown) have an additional conserved region of approximately 50 amino acids of unknown function. We named this novel region of homology Conserved Region Among Chordate CNKs (CRAC) and depicted it as a black star. Similar to the rat MAGUIN homologue (Yao et al. 2000), hCNK2A contains a PDZ-binding motif (ETHV) at its C-terminus.

A



B



were the case, it would be important to verify whether mutations disrupting its presumed negative function have any oncogenic properties. In addition, given the significance the RAS/MAPK module plays in tumor formation in humans, the identification of a short inhibitory peptide against RAF catalytic function might open new avenues for anticancer drug development.

2.6. Acknowledgements

We are grateful to David Wassarman for critical reading of the manuscript and to Debbie Morrison, Gerry Rubin and Frank Sprenger for providing reagents. We would also like to thank Alexandre Viau for help in aligning the CNK homologues and Yves Lepage for help with statistical analysis of R7 cell numbers. M.D. is the recipient of a “Société de Recherche sur le Cancer” Studentship. F.R. is the recipient of a Canadian Institutes for Health Research (CIHR) Fellowship and M.T. is the recipient of a CIHR Scholarship. This work was supported by a CIHR grant to M.T.

2.7. References

- Anselmo,A.N., Bumeister,R., Thomas,J.M., and White,M.A. (2002) Critical contribution of linker proteins to Raf kinase activation. *J. Biol. Chem.* **277**, 5940-5943.
- Avruch,J., Zhang,X.F., and Kyriakis,J.M. (1994) Raf meets Ras: completing the framework of a signal transduction pathway. *Trends Biochem.Sci.* **19**, 279-283.
- Baek,K.H., Fabian,J.R., Sprenger,F., Morrison,D.K., and Ambrosio,L. (1996) The activity of D-raf in torso signal transduction is altered by serine substitution, N-terminal deletion, and membrane targeting. *Dev. Biol.* **175**, 191-204.
- Burack,W.R., Shaw,AS. (2000) Signal transduction: hanging on a scaffold. *Curr. Opin. Cell. Biol.* **12**, 211-6.
- Dhillon,A.S., Meikle,S., Yazici,Z., Eulitz,M., and Kolch,W. (2002) Regulation of Raf-1 activation and signalling by dephosphorylation. *EMBO J.* **21**, 64-71.
- Diaz,B., Barnard,D., Filson,A., MacDonald,S., King,A., and Marshall,M. (1997) Phosphorylation of Raf-1 serine 338-serine 339 is an essential regulatory event for Ras-dependent activation and biological signaling. *Mol. Cell. Biol.* **17**, 4509-4516.
- Dickson,B., Sprenger,F., Morrison,D., and Hafen,E. (1992) Raf functions downstream of Ras1 in the Sevenless signal transduction pathway. *Nature* **360**, 600-603.
- English,J., Pearson,G., Wilsbacher,J., Swantek,J., Karandikar,M., Xu,S., and Cobb,M.H. (1999) Ferrell,J.E. (1998). How regulated protein translocation can produce switch-like responses. *Trends Biochem Sci.* **23**, 461-465.
- Fortini,M.E., Simon,M.A., and Rubin,G.M. (1992) Signalling by the sevenless protein tyrosine kinase is mimicked by Ras1 activation. *Nature* **355**, 559-561.
- Hou XS, Chou TB, Melnick MB, Perrimon N. (1995). The torso receptor tyrosine kinase can activate Raf in a Ras-independent pathway. *Cell* **81**, 63-71.
- Kimmel,B.E., Heberlein,U., and Rubin,G.M. (1990) The homeo domain protein rough is expressed in a subset of cells in the developing *Drosophila* eye where it can specify photoreceptor cell subtype. *Genes Dev.* **4**, 712-727.
- Kolch,W. (2000) Meaningful relationships: the regulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by protein interactions. *Biochem. J.* **351**, 289-305.
- Kornfeld,K., Hom,D.B., and Horvitz,H.R. (1995) The *ksr-1* gene encodes a novel protein kinase involved in Ras-mediated signaling in *C. elegans*. *Cell* **83**, 903-913.

- Light,Y., Paterson,H., and Marais,R. (2002) 14-3-3 antagonizes Ras-mediated Raf-1 recruitment to the plasma membrane to maintain signaling fidelity. *Mol. Cell. Biol.* **22**, 4984-4996.
- Maixner,A., Hecker,T.P., Phan,Q.N., and Wassarman,D.A. (1998) A screen for mutations that prevent lethality caused by expression of activated sevenless and Ras1 in the *Drosophila* embryo. *Dev Genet.* **23**, 347-361.
- Mason,C.S., Springer,C.J., Cooper,R.G., Superti-Furga,G., Marshall,C.J., and Marais,R. (1999) Serine and tyrosine phosphorylations cooperate in Raf-1, but not B-Raf activation. *EMBO J.* **18**, 2137-2148.
- Morrison,D.K. (2001) KSR: a MAPK scaffold of the Ras pathway? *J. Cell Sci.* **114**, 1609-1612.
- Morrison,D.K. and Cutler,R.E. (1997) The complexity of Raf-1 regulation. *Curr. Opin. Cell Biol.* **9**, 174-179.
- Muslin,A.J., Tanner,J.W., Allen,P.M., and Shaw,A.S. (1996) Interaction of 14-3-3 with signaling proteins is mediated by the recognition of phosphoserine. *Cell* **84**, 889-897.
- Ponting,C.P., Phillips,C., Davies,K.E., and Blake,D.J. (1997) PDZ domains: targeting signalling molecules to sub-membranous sites. *Bioessays* **19**, 469-479.
- Raabe,T. and Rapp,U.R. (2002) KSR--a regulator and scaffold protein of the MAPK pathway. *Sci. STKE* **136**, PE28.
- Roy,F., Laberge,G., Douziech,M., Ferland-McCollough,D., and Therrien,M. (2002) KSR is a scaffold required for activation of the ERK/MAPK module. *Genes Dev.* **16**, 427-438.
- Roy,F. and Therrien,M. (2002) MAP Kinase Module: The Ksr Connection. *Curr. Biol.* **12**, R325-R327.
- Rubin,G.M. and Spradling,A.C. (1982) Genetic transformation of *Drosophila* with transposable element vectors. *Science* **218**, 348-353.
- Stapleton,D., Balan,I., Pawson,T., and Sicheri,F. (1999) The crystal structure of an Eph receptor SAM domain reveals a mechanism for modular dimerization. *Nat. Struct. Biol.* **6**, 44-49.
- Sundaram,M. and Han,M. (1995) The *C. elegans* ksr-1 gene encodes a novel Raf-related kinase involved in Ras-mediated signal transduction. *Cell* **83**, 889-901.
- Therrien,M., Wong,A.M., and Rubin,G.M. (1998) CNK, a RAF-binding multidomain protein required for RAS signaling. *Cell* **95**, 343-353.
- Therrien,M., Wong,A.M., Kwan,E., and Rubin,G.M. (1999) Functional analysis of CNK in RAS signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **96**, 13259-13263.

Thorson,J.A., Yu,L.W., Hsu,A.L., Shih,N.Y., Graves,P.R., Tanner,J.W., Allen,P.M., Piwnica-Worms,H., and Shaw,A.S. (1998) 14-3-3 proteins are required for maintenance of Raf-1 phosphorylation and kinase activity. *Mol. Cell. Biol.* **18**, 5229-5238.

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

Tzivion,G., and Avruch,J. (2002) 14-3-3 proteins: active cofactors in cellular regulation by serine/threonine phosphorylation. *J. Biol. Chem.* **277**, 3061-3064.

White,M.A., Nicolette,C., Minden,A., Polverino,A., Van Aelst,L., Karin,M., and Wigler,M.H. (1995) Multiple Ras functions can contribute to mammalian cell transformation. *Cell* **80**, 533-541.

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

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

Yeung,K., Seitz,T., Li,S., Janosch,P., McFerran,B., Kaiser,C., Fee,F., Katsanakis,K.D., Rose,D.W., Mischak,H., Sedivy,J.M., and Kolch,W. (1999) Suppression of Raf-1 kinase activity and MAP kinase signalling by RKIP. *Nature* **401**, 173-177.

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

3. CHAPITRE 3

Article 2:

**A KSR/CNK Complex Mediated by a Novel SAM
Domain-Containing Protein, Hyphen, Controls RAS-dependent
RAF Activation in Drosophila**

Manuscript en préparation

2005

A KSR/CNK Complex Mediated by a Novel SAM Domain-Containing Protein, Hyphen,
Controls RAS-dependent RAF Activation in Drosophila

Mélanie Douziech¹, Malha Sahmi¹, Gino Laberge¹ and Marc Therrien^{1,2,*}

¹Institut de Recherche en Immunologie et en Cancérologie

²Département de pathologie et de biologie cellulaire

Université de Montréal

C. P. 6128 Succursale Centre-Ville. Montréal (QC), Canada H3C 3J7

*To whom correspondence should be addressed

tel.: (514) 343-7837

fax.: (514) 343-6965

Running Title: KSR is a RAF activator

3.1. Summary

RAF is a critical effector of the small GTPase RAS in both normal and malignant cells. Despite intense scrutiny, the mechanism regulating RAF activation remains partially understood. We show here that KSR, a RAF homologue known to assemble RAF/MEK/MAPK complexes, regulates RAF activation in *Drosophila* by a mechanism mediated by its kinase-like domain that is independent of its scaffolding property or putative kinase activity. Moreover, we found that KSR is brought to RAF prior to signal activation by the scaffold protein CNK and a novel SAM domain-containing protein, named Hyphen. Interestingly, the association of KSR to the CNK/Hyphen complex enables KSR to stimulate RAF activity in a RAS-dependent manner and this, irrespective of the ability of CNK to scaffold RAF. Consistent with catalytically-impaired B-RAF oncogenic mutations recently found to activate endogenous C-RAF, our data are compatible with a model whereby KSR stimulates RAF catalytic function through an allosteric process.

3.2. Introduction

Signal transmission through the RAF/MEK/ERK pathway, also known as the MAPK module, is a central event triggered by the small GTPase RAS to regulate a number of basic cellular processes in metazoans, including cell proliferation, differentiation and survival (Pearson et al., 2001; Shields et al., 2000). Unrestrained signaling through this pathway caused for instance by activating mutations in specific isoforms of either RAS or RAF has been linked to several types of cancer in humans and, for some of these, at an impressively high frequency (Davis et al., 2002; Malumbres and Barbacid, 2003). Because of potential benefits to human health, extensive efforts have been devoted to identify the components playing a critical role within the RAS/MAPK pathway and to describe in molecular terms the signal transfer mechanism. Despite significant progress toward that latter goal, a number of events have proven particularly challenging. One notable example is the mechanism leading to the activation of the RAF serine/threonine kinase.

Three RAF members have been identified in mammals (A-, B- and C-RAF/Raf-1) and homologues are present in other metazoans, including *C. elegans* and *Drosophila* where a single gene encoding a protein more closely related to B-RAF has been identified (Chong et al., 2003; Dhillon and Kolch, 2002). RAF proteins comprise an N-terminal regulatory region followed by a C-terminal catalytic domain. The N-terminal region includes a RAS-binding domain (RBD), a cysteine-rich domain (CRD) and an inhibitory 14-3-3-binding site encompassing serine 259 (S259) in C-RAF. The binding of 14-3-3 to this latter site requires the phosphorylation of the S259-like residue in RAF proteins, which in turn mediates their cytoplasmic retention in an inhibited conformation in unstimulated cells (Morrison and Cutler, 1997). Upon RTK-dependent activation, GTP-loaded RAS binds the RBD of RAF and facilitates the dephosphorylation of the S259-like residue, thereby releasing 14-3-3 and promoting the association of RAF to the membrane (Dhillon et al., 2002; Jaumot et al., 2001; Light et al., 2002). A number of phosphorylation events are then required to fully induce RAF catalytic activity (Chong et al., 2003). Although some are isozyme-specific, two are probably common to all members and affect conserved serine/threonine residues (T598 and S601 in B-RAF) situated in the activation loop of the

kinase domain (Zhang and Guan, 2000). Mutational analyses as well as a recent crystallographic study of the B-RAF kinase domain strongly suggest that phosphorylation of these residues plays a critical role in the final stage of activation by destabilizing an inhibitory interaction that takes place between the P loop (sub-domain I) and the DFG motif (sub-domain VII)/activation loop of the kinase domain (Wan et al., 2004). The mechanism and kinase(s) leading to the phosphorylation of these residues are unknown.

A number of scaffold proteins have also been suggested to regulate RAF activity (Kolch, 2000). However, their mode of action and functional interdependency is poorly understood. One example corresponds to the Kinase Suppressor of RAS (KSR) members, which are known to assemble RAF, MEK and MAPK into functional complexes (Morrison and Davis, 2003). Interestingly, these proteins are structurally related to RAF, although they have some key differences. For example, they do not contain an RBD, but comprise a unique region called CA1, which was found in *Drosophila* to enable KSR/RAF interaction (Roy et al., 2002). Further, they possess a kinase-like domain that appears to be devoid of kinase activity, but which constitutively binds MEK (Morrison and Davis, 2003). While the function of KSR as a scaffold of the MAPK module has been convincingly documented, genetic characterization of the single *ksr* gene found in *Drosophila* suggested that its activity is also required upstream of RAF (Therrien et al., 1995). This other role, however, has not been determined.

Connector eNhancer of KSR (CNK) is another scaffold protein acting as a putative regulator of RAF activity. As for KSR, its activity is essential for multiple receptor tyrosine kinase (RTK) signaling events where it appears to regulate the MAPK module at the level of RAF (Therrien et al., 1998). CNK homologues have been identified in other metazoans and evidence gathered in mammalian cell lines supports their participation in the regulation of B- and C-RAF (Bumeister et al., 2004; Lanigan et al., 2003; Ziogas et al., 2005). In flies, CNK associates directly with the catalytic domain of RAF through a short amino acid sequence called the RAF-Interacting Motif (RIM) and modulates RAF activity according to the RTK signaling status (Douziech et al., 2003; Laberge et al., 2005). In absence of an RTK signal, CNK-bound RAF is inhibited by a second motif adjacent to the RIM, called the Inhibitory Sequence (IS). Upon RTK activation, CNK integrates RAS and Src signals

thereby leading to RAF activation. The ability of RAS to promote RAF activation was found to strictly depend on two domains, a Sterile-Alpha Motif (SAM) domain and the so-called Conserved Region in CNK (CRIC) domain located in the N-terminal region of CNK (Douziech et al., 2003). The molecular role of these domains is currently unknown. On the other hand, the binding of a Src family kinase, Src42, to an RTK-dependent phosphotyrosine residue (pY1163) located C-terminal to the IS motif appears to release the inhibitory effect that the IS motif imposes on RAF catalytic function (Laberge et al., 2005).

In this report we investigated the role of CNK's SAM and CRIC domains during RAS-dependent RAF activation in *Drosophila* S2 cells. Strikingly, we found that their activity is mediated by KSR, and that KSR stimulates RAF catalytic function independently of its capacity to bridge together RAF and MEK. This effect occurs at a step upstream of the activation loop phosphorylation, but downstream of the dephosphorylation of the S259-like residue, thus indicating that it regulates the final stage of RAF activation. While the catalytically devoid KSR kinase domain appears to be the primary effector of this event, CNK participates in at least two ways: 1) it assembles a KSR/RAF complex *in vivo* independently of RAS signals by interacting separately with the kinase domains of KSR and RAF through its SAM domain and RIM element, respectively; 2) its CRIC domain promotes CNK-bound KSR activity toward RAF in a RAS-dependent manner. Finally, we found that the KSR/CNK interaction depends on a novel and evolutionarily conserved SAM domain-containing protein, Hyphen, whose presence is essential for RAS-induced signaling through the MAPK module at a step upstream of RAF. Together, this work unveils a network of interacting scaffolds that not only coordinate the assembly of the MAPK module in *Drosophila*, but which also regulates the catalytic function of RAF. Similarly to catalytically-impaired but conformationally-active B-RAF oncogenic variants that have been recently identified (Wan et al., 2004), we propose that KSR acts as a natural RAS-dependent allosteric inducer of RAF catalytic function.

3.3. Experimental Procedures

3.3.1. Plasmids

Copper-inducible Flag-tagged NT-CNK constructs have been previously described (Therrien and al., 1998). CNK^{N^TL71K} was depicted by Douziech et al (2003) pMet-flag-CNK-NT¹⁻⁵⁵⁰ was generated by adding a stop codon at the indicated position by quick change mutagenesis.

pMet-ha-RAS^{V12}, pMet-pyo-RAF, pMet-myc-MEK^{DA} constructs were described by Roy and al (2002). pMet-V5-KSR was made by introducing an oligonucleotide encoding the V5 epitope (GKPIPPLLGLDST) into the SacII site of pMet-KSR in place of the first methionine. The V5 epitope was also introduced into pMet-KSR^{K705M}, pMet-KSR^{CA1}, pMet-KSR^{D800AD817A} and pMet-KSR^{C922Y} previously described by Roy and al (2002). V5-KSR^{G688E} was generated by mutating the glycine at the position 688 into glutamic acid, whereas V5-KSR^{A696VA703T} was done by changing alanine 696 and 703 residues into valine and threonine respectively. The arginine 732 was mutated into histidine to generate the V5-KSR^{R732H} mutant. All mutants mentioned above were generated by quick change mutagenesis and verified by sequencing. KSR-ΔC655 and KSR-ΔN656 constructs correspond to amino acid positions 2 to 656 and 657 to 967 respectively. Mutant forms of pMet-pyo-RAF referred below were also generated by quick change mutagenesis. pyo-RAF^{RBDmut} was generated by changing arginine 174 into a leucine. Both 249 and 252 cysteine residues were mutated into serines to create the pMet-pyo-RAF^{CRMmut}. To fabricate the S346A KSR mutant, the serine 346 located into the 14-3-3 binding site was modified into an alanine. Potential threonine 571 and 574 phosphorylation sites located in the activation loop were either mutated into alanines, referred as AL^{AA} mutant, or into glutamic acid and aspartic acid respectively to generate the AL^{ED} RAF mutant.

DNA fragment corresponding to *Drosophila* HYP (GenBank accession CG30476) was amplified by PCR with an oligonucleotide having in 5' a sequence encoding two AU5

epitopes (TDFYLK) after what the PCR was subcloned into the pRmHA-5 vector. pMet-pyo-HYP was generated by subcloning into pMet-pyo-RAF^{CT}.

Genomic construct used for *in vivo* rescue experiments of *cnk* loss-of-function alleles was described in Laberge et al. (2005).

3.3.2. Cell culture, transfection, protein analysis and antibodies

S2 cells were maintained into 2.5% FBS-containing Schneider (Invitrogen Inc.) or serum-free insect cell media (Sigma). DNA and dsRNA transfections as well as NP-40 cell lysates and immunoprecipitations were conducted essentially as previously described (Roy and al., 2002). Sources for α -CNK, α -MAPK, α -pMAPK, α -MEK, α -pMEK, α -RAF, α -HA, α -MYC and α -PYO antibodies were described in Douziech et al. (2002). α -KSR monoclonal antibody was also mentioned previously (Therrien et al., 1996). Monoclonal α -V5 and polyclonal α -AU5 antibodies were obtained from Invitrogen and Bethyl Laboratories, respectively.

3.3.3. RNAi experiments

Double-stranded RNA production and RNAi experiments in S2 cells were conducted essentially as described in Roy et al. (2002). For rescue experiments in cell cultures, dsRNAs specifically targeted the 3'-UTR sequences of the selected endogenous transcript, which were then restored by constructs using the *adh* 3'-UTR sequences as previously described (Douziech et al., 2003). The fifteen SAM domain-containing proteins selected for RNAi were the following: CG4719, CG9098, CG9126, CG10743, CG11199, CG11206, CG12424, CG13320, CG13859, CG13996, CG15625, CG16757, CG30476, CG31163, and CG31187.

3.3.4. Genetics

Fly culture, crosses and procedures to generate transgenic flies were conducted according to standard protocols.

3.4. Results and Discussion

3.4.1. CNK and KSR are Required for Activation of the Catalytic Domain of RAF

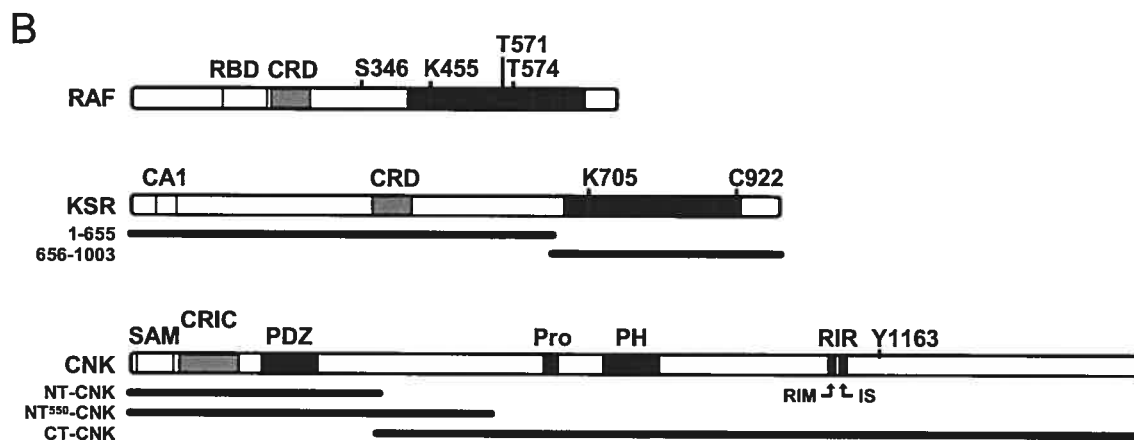
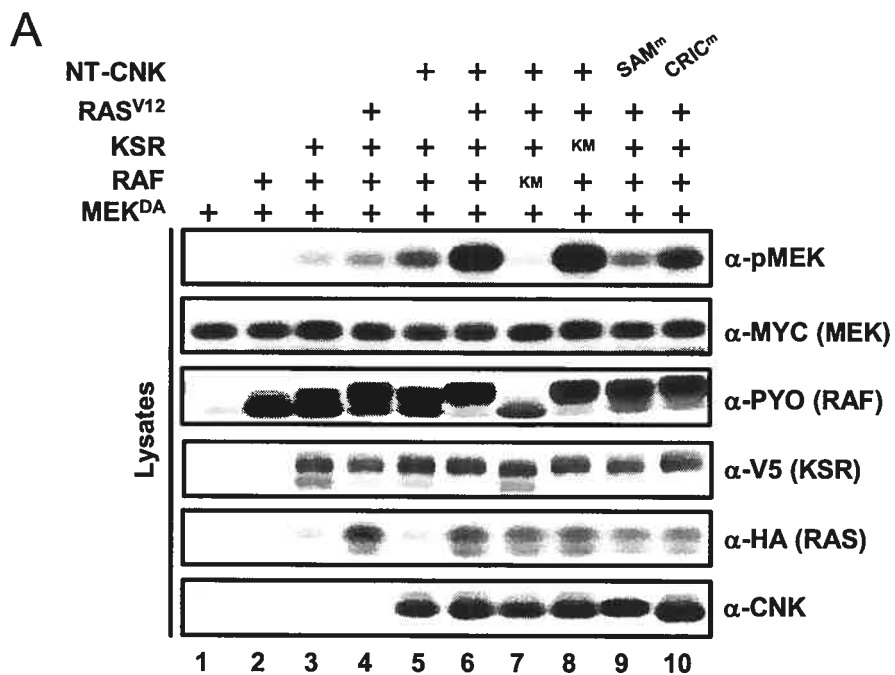
To investigate how the N-terminal region of CNK (NT-CNK) regulates RAF activation, we took advantage of a KSR-dependent MEK activation assay based on *Drosophila* proteins that was previously used to demonstrate KSR's ability to facilitate MEK phosphorylation by RAF (Roy et al., 2002). In that assay, co-expression of wild-type variants of epitope-tagged KSR, RAF and kinase-inactivated MEK^{DA}, is sufficient to induce MEK phosphorylation on activating residues S237 and S241 (Figure 3.1, compare lanes 1-3), which could be further enhanced by co-expression of RAS^{V12} (lane 4). Interestingly, co-expression of NT-CNK (amino acid position 2-384; Figure 3.1B) along with KSR, RAF and MEK, also enhanced MEK activation (lane 5), thus indicating that the effect of NT-CNK is integrated by the KSR/RAF/MEK complex. Consistent with the cooperation observed between activated RAS and NT-CNK (Douziech et al., 2003), their co-expression with KSR, RAF and MEK resulted in a synergistic activation of MEK (compare lanes 4 and 6, or lanes 5 and 6). The specificity of this assay still critically depended on RAF catalytic function as a kinase-impaired RAF mutant (RAF^{KM}) did not support MEK activation (lane 7). In contrast, although the presence of KSR was absolutely essential for MEK phosphorylation (see below), its function did not appear to depend on a putative kinase activity as a presumed catalytically-impaired mutant was as active as wild-type KSR (compare lanes 6 and 8, and see below). Finally, and most importantly, NT-CNK activity depended on the integrity of its SAM and CRIC domains (lanes 9 and 10).

The assay presented above provided us with a molecularly tractable system to narrow down RAF regulatory event(s) that is/are positively modulated by CNK. To address this point, we independently mutagenized four regions within RAF known to carry out distinct function and evaluated how this affected the response to NT-CNK. These regions included the RBD, the CRD, the S259-like residue (S346) within the N-terminal 14-3-3-

Figure 3.1 The N-terminal Portion of CNK Augments KSR-Induced MEK phosphorylation by RAF

(A) S2 cells were transfected using the indicated combinations of myc-MEK^{DA} (65 ng to 90 ng), pyo-RAF wild-type (wt) (25 ng to 35 ng) or K455M (90 ng), V5-KSR wt or K705M (4 ng to 8 ng), ha-RAS^{V12} (30 ng to 50 ng) and wt (35 ng) or mutant (100 ng) CNK^{NT} constructs. Cells were lysed 36 h post-induction and RAF activity was assessed by immunoblotting using anti-phosphoMEK (α -pMEK). Proteins levels were determined directly from cell lysates using appropriated antibodies indicated to the right. Results presented here and thereafter are representative of at least three similar experiments.

(B) Schematic of the main *Drosophila* RAF, KSR and CNK constructs used in this study. For RAF: the Ras binding domain (RBD), the cysteine-rich domain (CRM) and the catalytic domain of RAF (black box) are depicted. For KSR: In addition to a putative kinase domain (black box), the conserved areas 1 (CA1) and the cysteine-rich motif (CRM) are some other features of the KSR protein. For CNK: it has various domains/elements: sterile alpha motif (SAM); conserved region in CNK (CRIC); PSD95/DLG-1/ZO-1 domain (PDZ); proline-rich stretch (Pro); pleckstrin homology domain (PH) and the RAF-inhibitory region which is a negatively acting bipartite region (RIR) (Douziech et al., 2003). Solid lines, labeled to the left, denote the various KSR and CNK deletion constructs used in this study. Numbers on the top correspond to amino acid positions frequently referred to in the text.



binding site and the two phospho-accepting threonine residues (T571 and T574) within the activation loop of the kinase domain (Figure 3.1B). To ensure that endogenous RAF did not influence the output, we specifically depleted it by RNAi using a double-stranded (ds) RNA targeting its 3'UTR sequences. Given that the RAF constructs contained heterologous 3'UTR sequences (see Materials and Methods), exogenous RAF expression was not affected by the 3'UTR dsRNA. As shown in Figure 3.2A, co-transfection of RAS^{V12} with KSR and MEK^{DA} (-/+ NT-CNK) in the absence of RAF did not induce MEK phosphorylation (lanes 1 and 2), while similar co-transfections that included wild-type RAF (WT) restored MEK phosphorylation (lane 3) as well as the response to NT-CNK (lane 4). Interestingly, addition of NT-CNK further reduced RAF mobility (compare lanes 3 and 4, α -PYO panel). This event is most likely due to phosphorylation as the mobility shifts could be eliminated by *in vitro* phosphatase treatment (data not shown). Although the phosphorylation sites and their functional relevance are unknown, there is a tight correlation between the positive effects of NT-CNK and RAF mobility shift, which we used as a second readout of NT-CNK effect on RAF. Inactivation of the RBD, CRD and 14-3-3-binding site worked as expected: both the RBD and CRD mutations decreased RAF activity, whereas the S346A mutant was more active than WT (compare lanes 3, 5, 7 and 9). Interestingly, none of those variants impeded the response to NT-CNK (lanes 5-10), thus indicating that NT-CNK is probably not regulating the ability of the RAF N-terminal domain to associate with either RAS, the plasma membrane or 14-3-3. Nonetheless, it is remarkable that even though the RAF^{RBDmut} variant no longer associates with RAS (data not shown), the effect of NT-CNK on this mutant still depends on RAS^{V12} (data not shown), thus further demonstrating the RAS-dependency of NT-CNK activity. Next, we evaluated the effect of oppositely acting mutations within the activation loop (AL) of the kinase domain. Mutations changing T571 and T574 to phospho-mimetic residues (AL^{ED}) resulted in a strongly activated RAF variant (lane 11). Surprisingly, this mutant no longer responded to NT-CNK (lane 12). To ensure that the levels of MEK^{DA} were not limiting under those conditions, we conducted similar experiments using decreasing amounts of RAF^{ED} and obtained similar results (Supplementary Figure 3.1). Conversely, changing the same threonine residues to alanine (AL^{AA}) produced a potent loss-of-function that yet retained

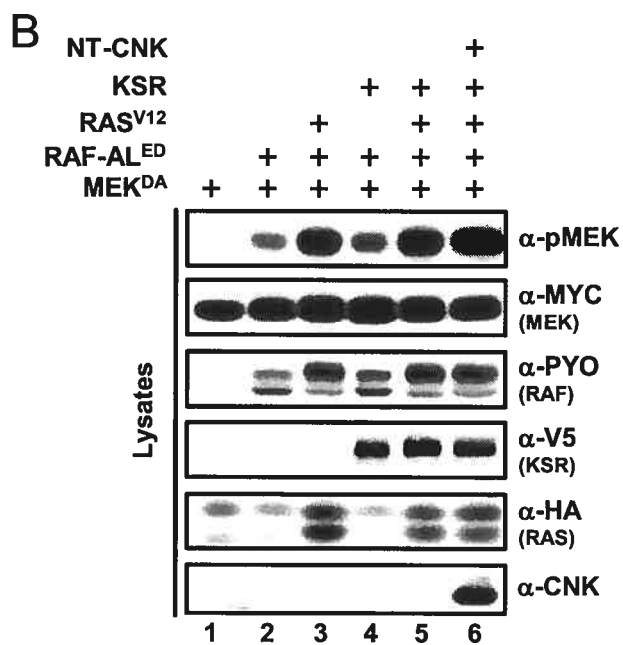
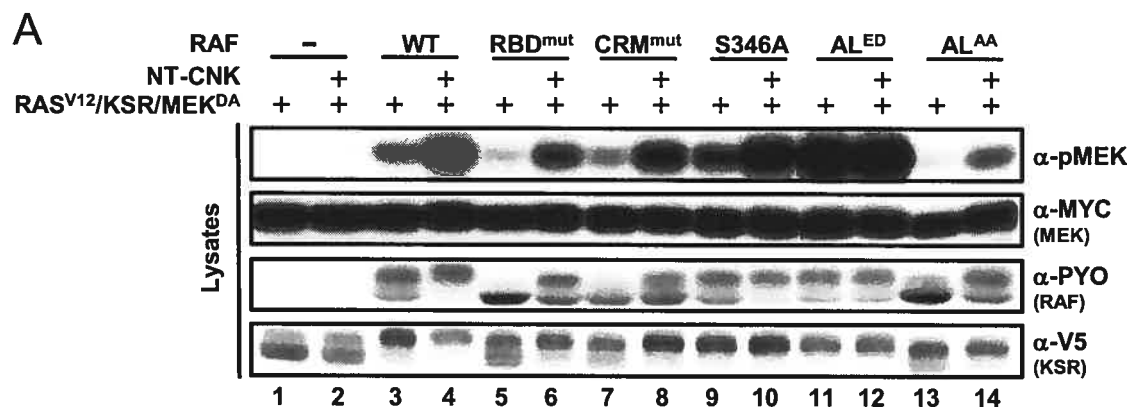
Figure 3.2 CNK and KSR Activities are Required Upstream of the RAF Activation Loop Phosphorylation Event

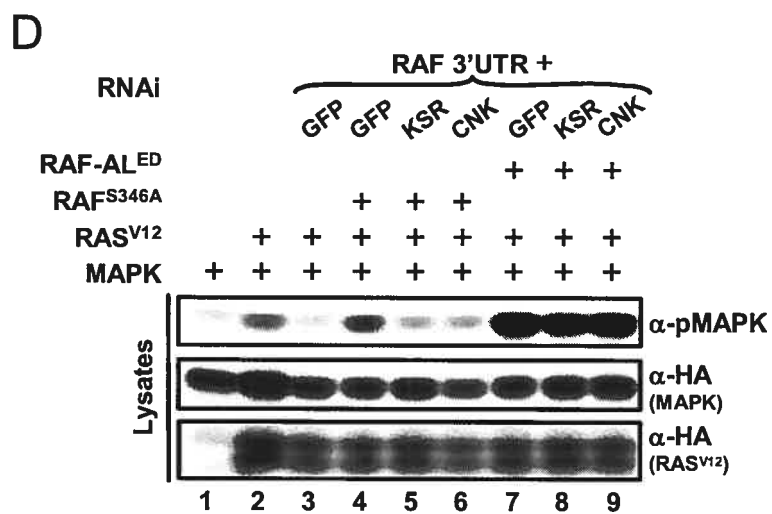
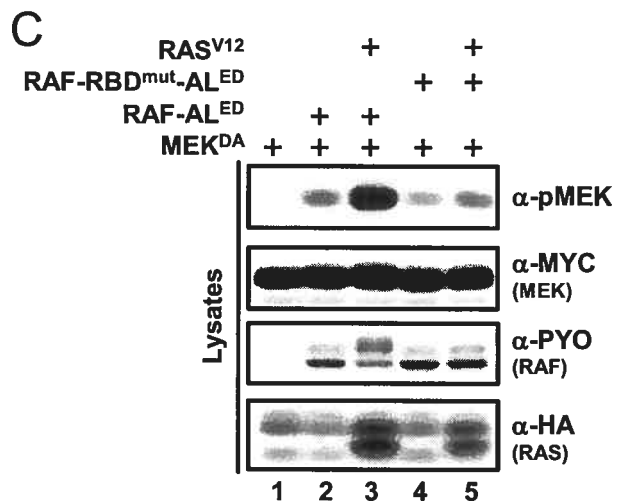
(A) S2 cells were transfected using the indicated combinations of myc-MEK^{DA} (55 ng to 85 ng), ha-RAS^{V12} (20 ng to 30 ng), V5-KSR (2 ng to 5 ng), CNK^{NT} (35 ng) and wt or mutant forms of RAF (20 ng to 150 ng). Various construct amounts were used to adjust for their apparent difference in expression levels. In each condition, RNAi against the 3'UTR of endogenous RAF was also transfected (500 ng). Cells were lysed 36h post-induction and pMEK levels were examined.

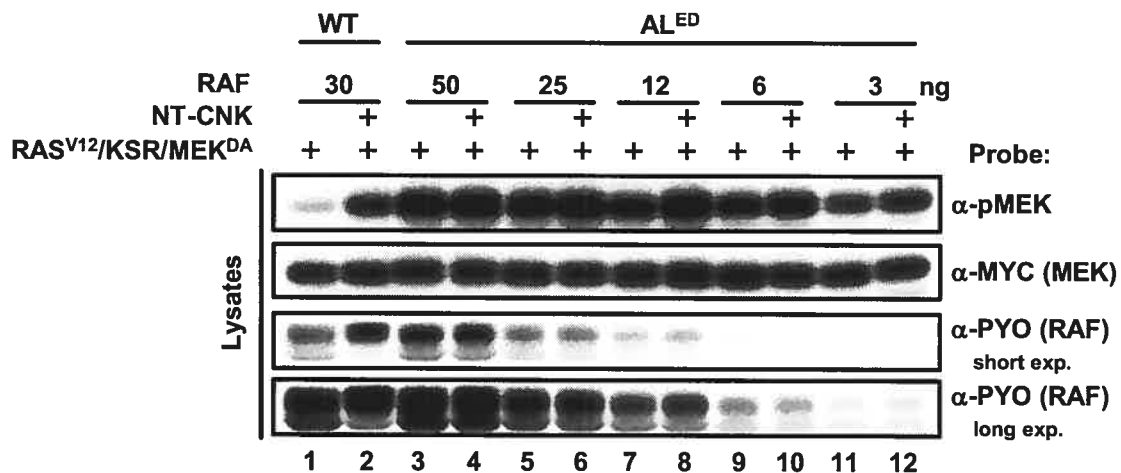
(B) S2 cells were transfected with myc-MEK^{DA} alone (70 ng) or with the indicated combinations of RAF-AL^{ED} (20 ng), ha-RAS^{V12} (30 ng), V5-KSR (4 ng), CNK^{NT} (35 ng) and 500 ng of RNAi against RAF 3'UTR. Lysates were done as in (A) and proteins levels were determined using appropriated antibodies indicated to the right.

(C) S2 cells were transfected with the indicated combinations of myc-MEK^{DA} (70 ng), ha-RAS^{V12} (30 ng), pyo-RAF-AL^{ED} (20 ng) or pyo-RAF^{RBDmut}-AL^{ED} double mutant (20 ng). RNAi against the 3'UTR of endogenous RAF was also introduced by transfection (500 ng). Cells were lysed as in (A) and examined for pMEK levels.

(D) S2 cells were plated in absence or in presence of RAF 3'UTR dsRNA (10 ug) in combination with either KSR (10 ug), CNK (10 ug) or GFP (10 ug) dsRNAs for 24h. Cells were then transfected with ha-MAPK alone (130 ng to 225 ng) or with the indicated combinations of ha-RAS^{V12} (90 ng to 176 ng), pyo-RAF-AL^{ED} (13 ng to 16 ng) or pyo-RAF^{S346A} (20 ng to 45 ng). dsRNA against GFP, CNK, KSR and RAF 3'UTR were also transfected in certain conditions (250 ng). The cells were induced for 18h before doing the lysates. RAF activity was verified by analyzing MAPK phosphorylation.







Supplemental Figure 3.1 CNK^{NT} does not augment RAF^{ED} activity

S2 cells were co-transfected RAF 3'-UTR dsRNA (500 ng) and the indicated combinations of myc-MEKDA (70 ng), V5-KSR (4 ng), ha-RASV12 (30 ng), NT-CNK (35 ng), with either pyo-RAF wt (30 ng) (lanes 1 and 2) or the indicated amounts of pyo-RAF-AL^{ED}. Cell lysates were prepared 36h post-induction of expression and levels of pMEK or of the transfected proteins were determined by immunoblots.

some capacity to respond to NT-CNK (lanes 13 and 14). Taken together, these results suggest that NT-CNK activity controls a step leading to T571-T574 phosphorylation and that this activity either is distinct or has broader consequences than the phosphorylation event *per se* as the AL^{AA} mutant still responded to NT-CNK.

The inability of RAF^{ED} to respond to NT-CNK prompted us to determine whether this was specific to CNK or whether this mutant also no longer integrated RAS and KSR activities. Interestingly, although RAF^{ED} activity could be further increased by RAS^{V12} (Figure 3.2B, compare lanes 2 and 3), it was not influenced by KSR expressed either alone (lane 4) or in combination with RAS and/or NT-CNK (lanes 5 and 6, and data not shown). Given the presence of an intact RBD in RAF^{ED}, we verified whether it accounted for its responsiveness to RAS even if the RAS-dependent NT-CNK effect did not modulate RAF^{ED}. As shown in Figure 3.2C, this appeared to be the case as a RAF^{RBDmut-ED} double mutant lost the capacity to respond to RAS^{V12} (lane 5). This finding therefore provides further evidence that the RBD-dependent and the NT-CNK-dependent steps are two independent RAS-mediated events. Curiously and in sharp contrast to RAF^{WT} or any of the other RAF mutants that has been tested so far, the fact that RAF^{ED} could not be modulated by KSR expression suggests that the RAF-MEK bridging effect of KSR is not critical for the ability of RAF^{ED} to phosphorylate MEK even if, as RAF^{WT}, RAF^{ED} does not stably associate with MEK (data not shown). Together, these results suggest that the scaffolding function of KSR is secondary to a more critical role played by KSR and which influences the activation loop of RAF.

To determine whether endogenous CNK and KSR are also required at a similar step, we depleted their respective contribution by RNAi and assessed the impact on RAF^{ED} activity using MAPK activation as readout. We conducted these experiments in the presence of RAS^{V12} so that appropriate RAS signals were provided to endogenous CNK and KSR. In addition, we depleted endogenous RAF by RNAi and restored it with similar amounts of the two distinct RAF gain-of-function tested above: RAF^{S346A} and RAF^{ED}. As shown in Figure 3.2D, neither CNK nor KSR depletion reduced RAF^{ED} activity. In contrast, the activity of RAF^{S346A} was affected by the removal of endogenous CNK and

KSR. Together, these results are consistent with a model whereby CNK and KSR activities are both required for events leading to the activated state of the RAF activation loop occurring downstream of the dephosphorylation of the S259-like residue.

3.4.2. The Kinase Domain of KSR Mediates CNK Activity

Using a strategy analogous to the one used for RAF, we next wanted to determine whether KSR is required for NT-CNK's positive function and if that is the case, then determine which structural features of KSR is mediating the effect. As for the above experiments, endogenous KSR was depleted by RNAi. First, we conducted a control experiment where RAS^{V12}, RAF^{WT} and MEK^{DA} were co-transfected in the absence of KSR to show its strict requirement for MEK phosphorylation (Figure 3.3A, lane 1). Strikingly, co-transfection of NT-CNK under those conditions did not significantly elevate MEK phosphorylation nor did it increase RAF mobility shift (lane 2), thus demonstrating that KSR is essential for the positive effect of CNK on RAF. Indeed, introduction of KSR along with RAS^{V12}, RAF^{WT} and MEK^{DA} restored MEK activation (lane 3), which could be further enhanced by NT-CNK (lane 4). We then tested the impact of KSR mutants on the ability of NT-CNK to stimulate MEK phosphorylation. We first evaluated two mutants that have either a decreased RAF binding (KSR^{CA1mut}) or a disrupted MEK binding (KSR^{C922Y}) activity. As previously shown (Roy et al., 2002), these mutations strongly reduced KSR activity (lanes 5 and 7). Interestingly, although the absolute output of pMEK was weaker than for KSR^{WT}, they were nonetheless capable of supporting NT-CNK activity (lanes 6 and 8). These results are especially surprising for KSR^{C922Y} as this variant totally lost its capacity to interact with MEK (Roy et al., 2002; see below). Therefore, these findings suggest that NT-CNK depends on a functional aspect of KSR that is distinct from its scaffolding property. To roughly delineate the region of KSR that is integrating NT-CNK function, we tested the ability of the N-terminal portion (KSR¹⁻⁶⁵⁵; Figure 3.1B) or the C-terminal portion (KSR⁶⁵⁶⁻¹⁰⁰³) of KSR to mediate NT-CNK effect. Strikingly, the isolated kinase domain of KSR, albeit weakly, was capable of integrating NT-CNK function (compare lanes 11 and 12), whereas the N-terminal domain was totally inert (lanes 9 and 10), thus suggesting that NT-CNK effect is integrated by the kinase domain of KSR.

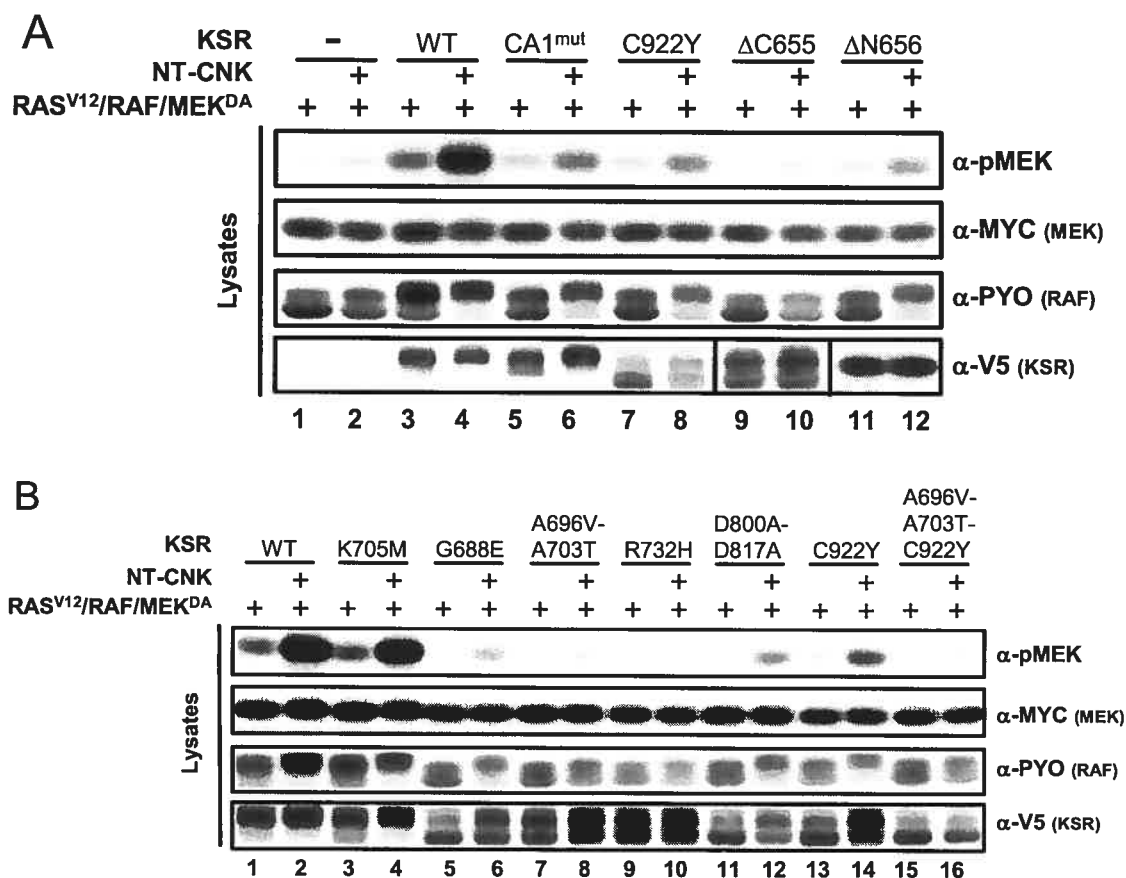


Figure 3.3 CNK Activity is KSR-dependent

(A) S2 cells were transfected using indicated combinations of myc-MEK^{DA} (70 ng), pyo-RAF (25 ng+NT, 30 ng), ha-RAS^{V12} (30 ng), CNK^{NT} (35 ng) either with or without wt or mutant KSR constructs (2.5 ng to 10 ng). Various construct amounts were used to adjust for their apparent difference in protein levels. RNAi against the 3'UTR of endogenous KSR was also transfected in each condition (500 ng). 36h post-induction, cells were lysed and RAF activity was determined by analyzing MEK phosphorylation. (B) S2 cells were transfected and analyzed as in (A) using the indicated combinations of myc-MEK^{DA} (70 ng), pyo-RAF (25 ng+NT, 30 ng), ha-RAS^{V12} (30 ng), CNK^{NT} (35 ng), wt or mutant forms of KSR (4 ng to 11.25 ng) and KSR 3'UTR dsRNA (500 ng).

To further explore the relevance of the kinase domain of KSR in mediating CNK's positive function, we compared the activity of a panel of kinase domain mutations in full-length KSR. As shown above, replacement of the typically critical lysine residue (KSR^{K705M}) located in subdomain II did not perturb KSR's ability to integrate NT-CNK activity (Figure 3.2B, lanes 1 to 4), which again indicated that the positive effect of KSR and CNK on RAF does not involve standard kinase activity. In support for this conclusion, we found that KSR^{D800A-D817A}, another catalytically-impaired mutant, retained the ability to respond to NT-CNK (lanes 11 and 12), even though it behaved as a strong loss-of-function given its disrupted MEK-binding activity (Roy et al. 2002; see below). In addition to the C922Y mutation, a number of point mutations located in the putative kinase domain have been recovered from genetic screens in *Drosophila* and *C. elegans* (Kornfeld et al., 1995; Sundaram et al., 1995; Therrien et al., 1995). We tested some of these mutations to determine whether any of them attenuated the response to NT-CNK. They included the G688E mutation and the A696V-A703T double point mutation that changed highly conserved residues within subdomain I (ATP-binding site) and sub-domain II, respectively, as well as the R732H mutation that affects a relatively well-conserved residue located between subdomains III (α C helix) and IV. Intriguingly, although KSR^{G688E} retained some capacity to respond to NT-CNK (lanes 5 and 6), and thus behaved similarly as KSR^{C922Y} and KSR^{D800A-D817A}, the two other mutants (KSR^{A696V-A703T} and KSR^{R732H}) were totally inert (lanes 7 to 10). The failure of the A696V-A703T or R732H mutations to mediate NT-CNK effect suggests that they disabled an essential aspect of KSR function, thereby preventing any KSR-mediated activity.

3.4.3. KSR is More than a Scaffold Connecting MEK to RAF

Mutations in KSR disrupting MEK or RAF binding, such as KSR^{CA1mut}, KSR^{C922Y} or KSR^{D800A-D817A} had been previously shown to impair KSR activity and were actually used as evidence to argue that KSR has a scaffolding role within the MAPK module (Roy et al., 2002). To determine whether the three new mutations tested above could be explained in similar terms, we assessed their ability to associate with MEK and RAF. Compared to KSR^{WT}, KSR^{G688E} displayed a reduced MEK binding activity (Figure 3.4A,

compare lanes 2 and 5), but interacted normally with RAF (Figure 3.4B, compare lanes 2 and 5). The reduced association of KSR^{G688E} with MEK would be consistent with its loss-of-function behavior, although it is surprising that it is not more active than the two KSR mutants (KSR^{D800A-D817A} and KSR^{C922Y}) that entirely lost MEK binding (Figure 3.4A, lanes 8 and 9). Unexpectedly, the two strongest mutants, KSR^{A696V-A703T} and KSR^{R732H}, showed normal association with either MEK (Figure 3.4A, lanes 6 and 7) or RAF (Figure 3.4B, lanes 6 and 7) and thus their inactivity could not be explained by a lack of MEK or RAF binding. Another property of KSR, which is a consequence of independent RAF and MEK binding, is its ability to bridge RAF and MEK. We verified this property and found no evidence that these two mutants are less capable than KSR^{WT} to induce a RAF/MEK complex (Figure 3.4C and data not shown). Together, these findings demonstrated that the mere bridging of RAF and MEK by KSR is not sufficient for RAF to phosphorylate MEK and therefore KSR must control another event.

3.4.4. CNK Links KSR to RAF

Our results thus far suggest that CNK and KSR positively regulate RAF at a similar step and that CNK could not stimulate RAF activity without KSR. Based on this functional dependency, we investigated the possibility that CNK and KSR physically interacted. To verify this, we co-expressed Flag-tagged CNK and V5-tagged KSR in S2 cells, immunoprecipitated KSR from cell lysates and looked for the presence of CNK in the immunoprecipitate. As shown in Figure 3.5A, we found that CNK and KSR indeed formed a complex when co-expressed together (lane 2). Given that both proteins can also associate with RAF, we conducted a similar experiment under conditions whereby endogenous RAF had been depleted by RNAi to determine whether RAF was mediating the CNK/KSR association, but found no evidence for this scenario (data not shown and see below). To narrow down the region of CNK involved in this association, we tested the ability of an N-terminal (NT⁵⁵⁰-CNK) and a C-terminal (CT-CNK) CNK construct (Figure 3.1B) to co-immunoprecipitate with KSR. These experiments showed that only the N-terminal region of CNK associated with KSR (Figure 3.5A, lanes 3 and 4), thus indicating that a KSR-

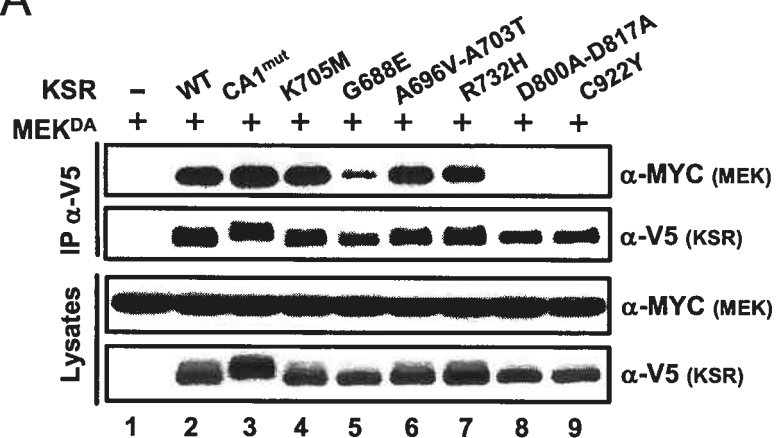
Figure 3.4 Two Inactive KSR Mutants Retain their Ability to Associate with RAF and MEK

(A) S2 cells were transfected with myc-MEK^{DA} (400 ng) alone or with wt KSR (120 ng) or one of the indicated KSR mutants (150 to 450 ng). Various amount of KSR constructs were used to adjust protein expression levels. Cell lysates were prepared 36 h post-induction and either directly used to evaluate protein levels or immunoprecipitated with anti-V5 antibody to examine the amounts of myc-MEK^{DA} associated with KSR.

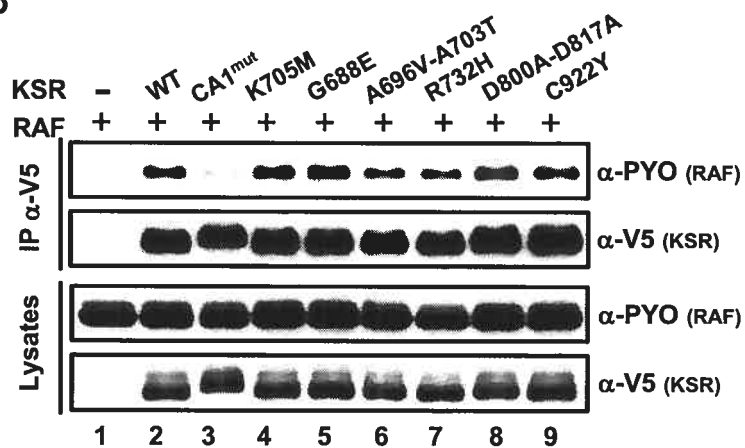
(B) S2 cells were transfected and analysed as in (A) using pyo-RAF (400 ng) alone or in combination with either wt KSR (150 ng) or KSR mutant constructs (150 to 180 ng).

(C) S2 cells were transfected with myc-MEK^{DA} (400 ng) and pyo-RAF (250 ng) constructs either alone (lane 3), with wt KSR (100 ng) or KSR^{A696VA703T} (240 ng); control (lane1) used 100 ng of wt KSR. Cell lysates were prepared 36h post-induction and immunoprecipitated with the anti-pyo antibody to measure associated MEK and KSR levels by immunoblot analysis. Protein levels were also examined.

A



B



C

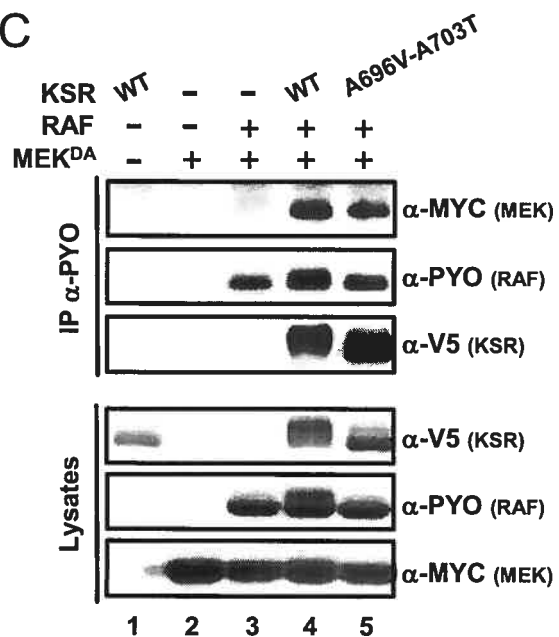


Figure 3.5 CNK Mediates the Formation of a KSR/RAF Complex

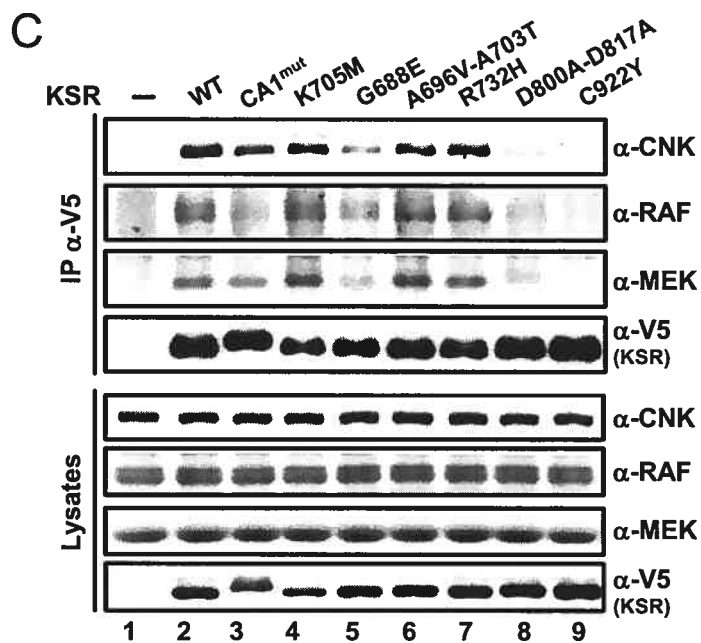
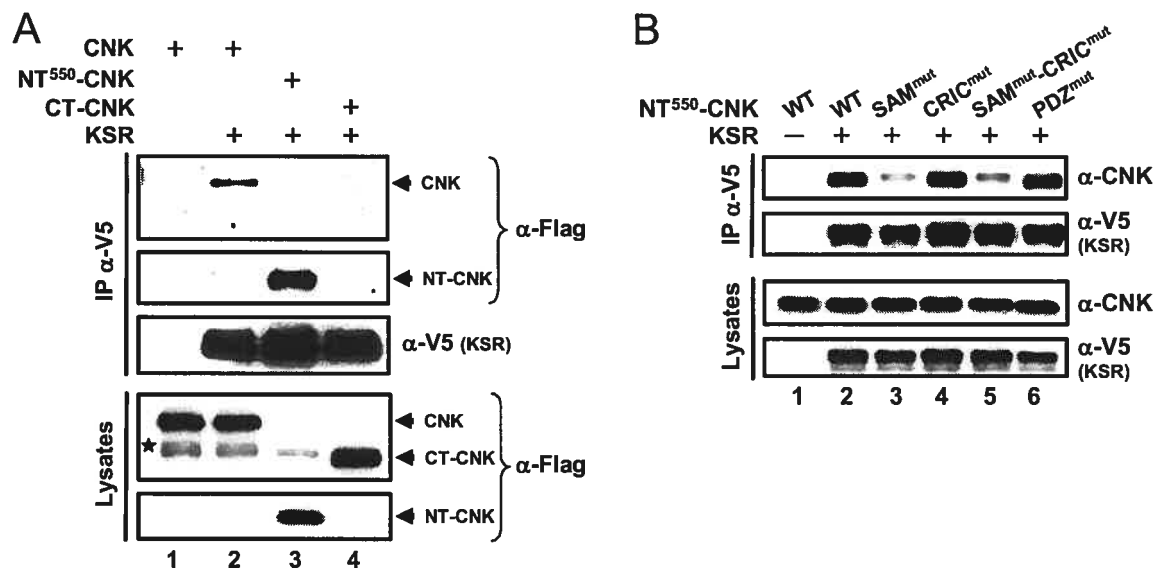
(A) S2 cells were transfected using indicated combinations of flag-tagged CNK (500 ng), CNK^{NT1-550} (80 ng), CNK^{CT} (600 ng) constructs with wt KSR (100 ng). 36h post-induction, lysates were immunoprecipitated by anti-V5 to reveal the associated CNK. A non specific band marked by a star in cell lysates is revealed by immunoblotting with the anti-flag at the CNK^{CT} position.

(B) S2 cells were transfected with either wt (80 ng) or mutant forms of CNK^{NT1-550} (80 to 120 ng) in combination with wt KSR (100 ng); control (lane1) used 80 ng of wt CNK^{NT1-550}. Cells were lysed 36 h post-induction and immunoprecipitated by monoclonal anti-V5 antibody to examine CNK/KSR association. Protein levels were determined by immunoblot analysis.

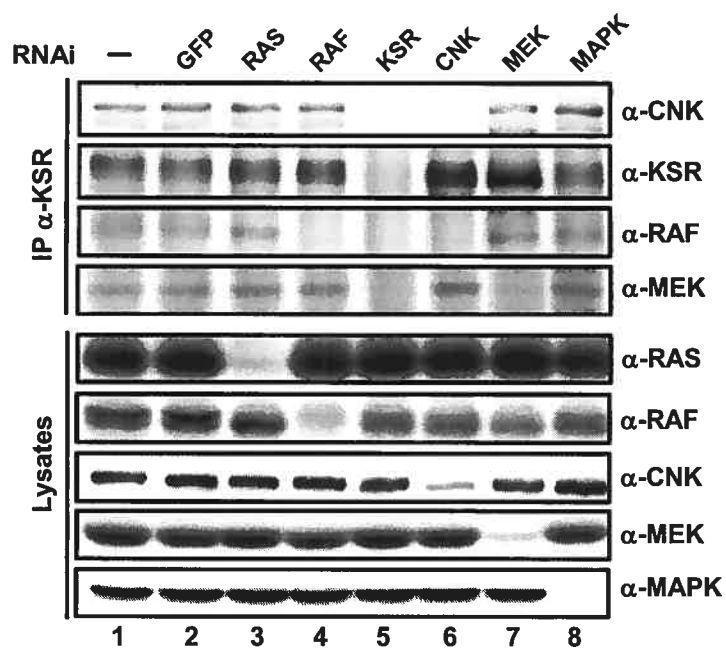
(C) S2 cells were transfected or not (lane 1) with either wt KSR (100 ng) or one of the indicated KSR mutants (100 ng for K705M, 150 ng for the others). 36 h post-induction, cells were lysed and immunoprecipitated with monoclonal anti-V5 antibody to examine the presence of endogenous CNK, RAF and MEK proteins associated with KSR. Protein levels were also evaluated with appropriated antibodies.

(D) S2 cells were plated with 50 μ g of the indicated dsRNAs. Cells were lysed 4 days after and immunoprecipitated using a monoclonal anti-KSR antibody to examine endogenous protein complex formation. Two 100 mm dishes have been pooled for each condition except for lane 7 which contains 5 dishes to adjust endogenous protein levels. Lane 1 contains no RNAi but has been treated the same way.

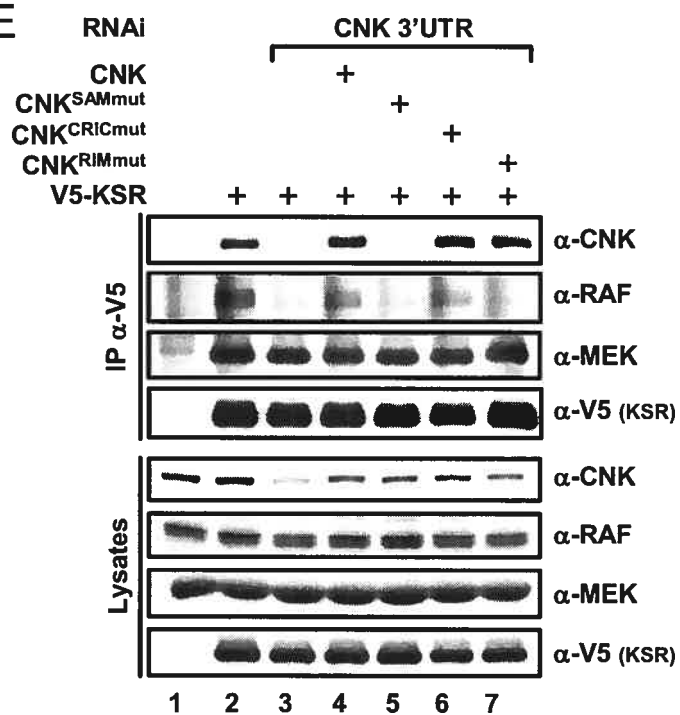
(E) S2 cells were either incubated in absence (lane 1 and 2) or in presence of RNAi (26 μ g) against the 3'UTR of CNK. 24 h after, cells were transfected using indicated combinations of V5-KSR (200 ng), CNK 3'UTR dsRNA (500 ng) and wt or mutant CNK constructs containing the ADH 3'UTR sequences (150 ng). 36 h post-induction, cells were lysed and immunoprecipitated with anti-V5 antibody to examine the complex formation. Protein levels were also determined.



D



E



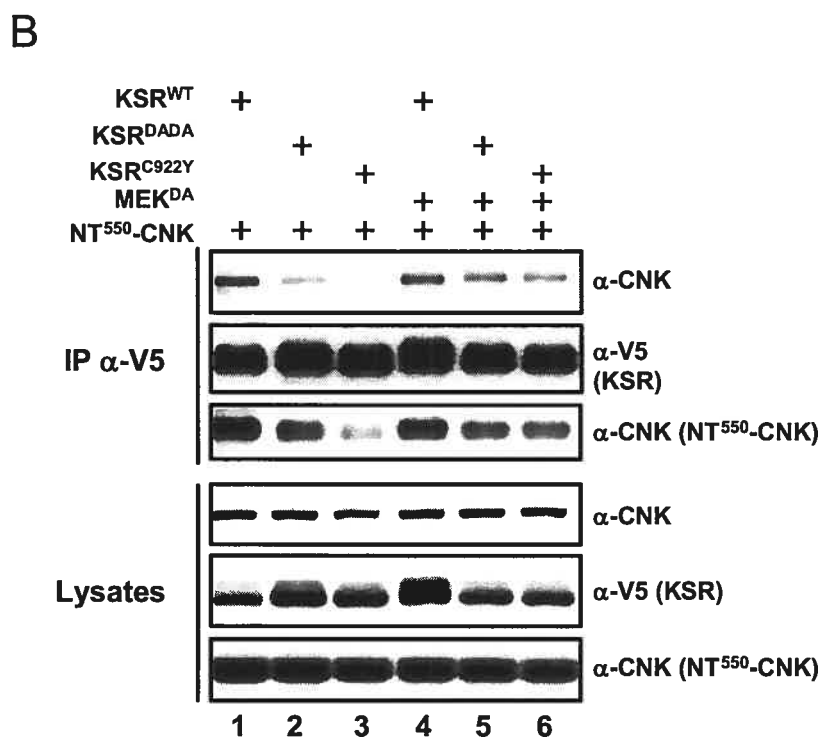
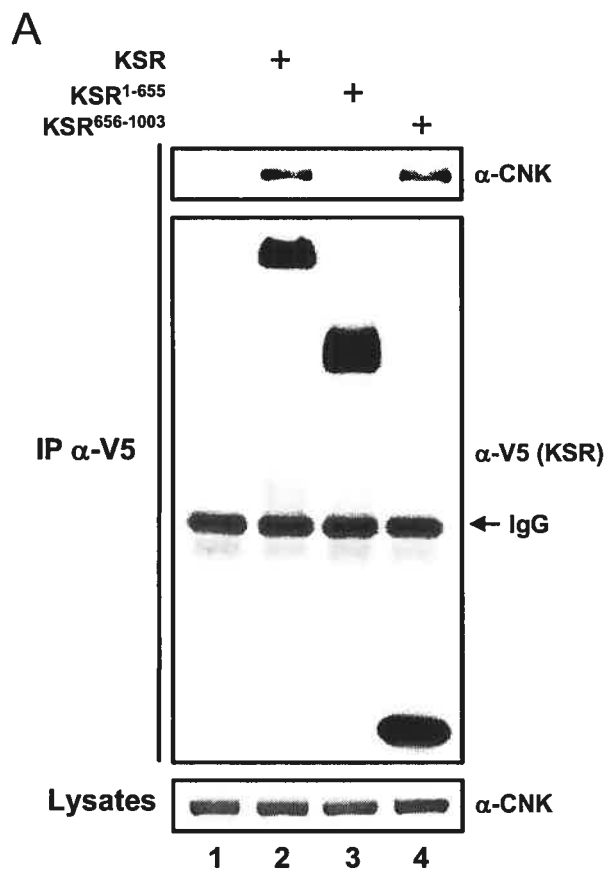
binding site resides in this area. Similar results were obtained with the shorter NT-CNK variant used in the functional studies, although that variant migrated immediately below the immunoglobulin heavy chain and thus was partly masked (data not shown). To determine if any of the three conserved domains of the N-terminal region of CNK is required for the association with KSR, we tested the effect of individual point mutations inactivating each of these in the NT⁵⁵⁰-CNK context. Markedly, inactivation of the SAM domain resulted in a severe loss of KSR binding (Figure 3.5B, lane 3), whereas the CRIC or PDZ domain mutations did not alter the association (lanes 4 to 6). We next sought to determine which region of KSR interacted with CNK. During the course of this work, we noticed that expression of V5-KSR in S2 cells associated with endogenous CNK, RAF and MEK as determined by co-immunoprecipitation and immunoblot analysis (Figure 3.5C, lane 2; and data not shown). We thus tested the isolated N- and C-terminal domains of KSR for their ability to associate with endogenous CNK. Consistent with the fact that NT-CNK activity is integrated by the kinase domain of KSR (Figure 3.4), we found that endogenous CNK specifically associated with the C-terminal KSR construct (Supplementary Figure 3.2A). Similar results were obtained with Flag-tagged CNK or NT-CNK constructs (data not shown). Taken together, these results identify the SAM domain of CNK as a KSR-binding interface and provide a molecular link to explain NT-CNK functional dependency toward KSR.

Given the ability of V5-KSR to associate with endogenous CNK, RAF and MEK (Figure 3.5C, lane 2), we took advantage of our panel of KSR kinase domain mutants to determine which residues are critical for those associations. As expected, the CA1 mutant only significantly affected the association with endogenous RAF (Figure 3.5C, compare lanes 2 and 3). Interestingly, the mutants that disturbed MEK binding (i.e. KSR^{G688E}, KSR^{D800A-D817A} and KSR^{C922Y}) also reduced the association with CNK (Figure 3.5C, lanes 5, 8 and 9), thus suggesting that MEK- and CNK-binding to KSR depend on a common region/architecture of the putative kinase domain. Nonetheless, we were intrigued by the fact that two of these mutations (D800A-D817A and C922Y) strongly affected endogenous CNK binding and yet responded to NT-CNK (Figure 3.3B). We verified whether NT-CNK

Supplemental Figure 3.2 The kinase domain of KSR interacts with endogenous CNK

(A) S2 cells were transfected with V5-KSR (100 ng), V5-KSR1-655 (100 ng) or V5-KSR656-1003 (50 ng). Cell lysates were prepared 36h post-induction and immunoprecipitated using the anti-V5 antibody. Endogenous CNK associated to the KSR variants was then monitored by immunoblots using an anti-CNK antibody.

(B) MEK overexpression restores the association between endogenous CNK (or NT550-CNK) and KSR variants. S2 cells were co-transfected with KSR 3'UTR dsRNA (500 ng) and the indicated combinations of V5-KSR (120 ng), V5-KSRDADA (600 ng), V5-KSRC922Y (450 ng), NT550-CNK (100 ng), with or without myc-MEKDA (400 ng). Cell lysates were prepared 36h post-induction and either directly used to monitor protein levels or immunoprecipitated with anti-V5 to determine the amounts of both endogenous CNK and NT550-CNK associated with the KSR variants.



could still associate with these two mutants and found that although the interactions were decreased, there was significant binding especially in a context of MEK overexpression (Supplementary Figure 3.2B, and data not shown), thus explaining the responsiveness of these mutants to NT-CNK. Another interesting observation was that the two most severe mutants, KSR^{A696V-A703T} and KSR^{R732H}, interacted normally with CNK as well as with MEK and RAF (lanes 6 and 7), therefore ruling out a binding defect with these proteins. Finally, and most surprisingly, the mutations affecting MEK and CNK binding also impeded endogenous RAF binding (lanes 5, 8 and 9), which contrasts with the KSR/RAF co-overexpression results shown in Figure 3.4B. This apparent paradox might be due to the fact that there is more than one site of interaction between KSR and RAF and that one of these sites is indirectly mediated by an endogenous protein whose association to KSR is itself disrupted by the mutations affecting RAF binding. Given their similar binding profiles, endogenous CNK and/or MEK could be acting as mediators of the KSR/RAF association. Before testing this hypothesis, we wanted to ensure that a KSR/CNK/RAF/MEK complex genuinely existed *in vivo*. To accomplish this, we immunoprecipitated endogenous KSR from plain S2 cells and probed the immunoprecipitates for the presence of endogenous CNK, RAF and MEK. As shown in Figure 3.5D, the KSR antibody indeed brought down all four proteins (lane 1), whereas elimination of endogenous KSR by RNAi prevented their detection (lane 5), hence demonstrating the presence of such a complex in S2 cells. We then took advantage of this simple immunoprecipitation procedure and used RNAi-treated cells to ask whether endogenous RAS activity is required for complex formation and if any of its known constituents mediates some of the associations. Depletion of endogenous RAS did not alter the ability of KSR to associate with CNK, RAF and MEK (lane 3), thus indicating that complex formation pre-exists to RAS activation. No effect also was detected when MAPK was depleted (lane 8). Besides abrogating their own presence in the complex, depletion of endogenous RAF or MEK did not alter the association of the other members of the complex (lanes 4 and 7). In contrast, depletion of endogenous CNK eliminated the association of RAF to KSR. Taken together, these findings strongly suggest that MEK and CNK interact with KSR independently, whereas the KSR/RAF association is mediated by CNK, which

would explain why mutations in KSR that impede CNK binding also affect endogenous RAF binding.

We next sought to determine which domain(s)/element(s) in CNK are mediating the KSR/RAF association. To manipulate experimentally the CNK-dependent KSR/RAF association, we depleted endogenous CNK by RNAi and rescued its presence by transfecting non-targetable CNK constructs. As shown in Figure 3.5E, depletion of endogenous CNK prevented co-immunoprecipitation of endogenous RAF with V5-KSR (compare lanes 2 and 3, panel α -RAF), whereas transfection of a wild-type CNK construct restored the interaction (lane 4). As predicted from the above binding studies, a rescue construct carrying a SAM domain mutation was incapable of restoring endogenous RAF binding as it failed to associate with V5-KSR (lane 5, α -RAF and α -CNK panels, respectively), thereby identifying the SAM domain as one of the critical points of contact to bridge KSR and RAF. On the other hand, a loss-of-function mutation within the CRIC domain did not prevent the formation of the KSR/RAF complex, therefore suggesting that the positive action of the CRIC is distinct from KSR/RAF complex formation. We previously showed that the kinase domain of RAF binds a short sequence motif in CNK named the RAF-Interacting Motif (RIM; Douziech et al., 2003). We thus verified whether this element is involved in the KSR/RAF interaction. Strikingly, a CNK rescue construct carrying a mutation in this element completely failed to restore the KSR/RAF association, even though it interacted normally with KSR (lane 7). Together, these findings provide strong evidence that the SAM domain and the RIM element are, respectively, specific bridging sites for KSR and RAF and thereby enable the assembly of a KSR/RAF complex.

If the ability of CNK to bring together KSR and RAF is functionally relevant for the pathway, then one would predict that both the SAM domain and the RIM element are positively required for normal CNK function. While this appears to be the case for the SAM domain (Figure 3.1A and Douziech et al., 2003), it is less clear for the RIM. Indeed, this element was initially defined as part of the so-called RAF Inhibitory Region (RIR; Douziech et al., 2003), which together with the IS element is essential for CNK's inhibitory effect on RAF. For instance, unlike wild-type CNK, shorter versions of CNK that do not contain these two motifs or full-length RIR-inactivated mutants have been found to

strongly collaborate with RAS when tested by overexpression in S2 cells or during *Drosophila* eye development (Douziech et al., 2003; and Figure 3.1). Although these data were obtained using overexpressed proteins, we recently conducted complementation assays *in vivo* using non-overexpressed genomic rescue constructs to show that the IS element of CNK has a genuine negative role with respect to RAF and that the RTK-dependent binding of Src42 to a C-terminal binding site relieve its inhibitory effect (Laberge et al., 2005). For example, we found that a loss-of-function caused by inactivating the Src42-binding site can be fully rescued by disrupting the IS element. Moreover, a construct where only the IS element is disabled also fully restored the viability of *cnk* loss-of-function alleles, thus demonstrating that it does not fulfill a positive role.

To determine whether the RIM plays a positive role in a non-overexpressed context, we tested a *cnk* genomic rescue construct containing a disrupted RIM element for its ability to prevent the lethality associated with *cnk* loss-of-function. We also tested mutations affecting either the SAM or the CRIC domains. In marked contrast to wild-type or IS-disrupted *cnk* constructs, a RIM-disrupted construct failed to complement *cnk* recessive lethality (Table 3.I). Similar findings were made with a double mutant construct that affected both the RIM and the IS elements, thus indicating that inactivation of the RIM is disrupting a positive function that cannot be restored by de-activating the IS element. As expected, mutations targeting either the SAM or the CRIC domains were also unable to reverse *cnk* lethality. Together, these results strongly suggest that like the SAM and CRIC domains, the RIM is fulfilling an essential positive role in physiological conditions, which would be consistent with its ability to juxtapose RAF to CNK-bound KSR. Such a positive role for the RIM is not incompatible with its negative property. Indeed, the RIM can be viewed as a mere binding site for RAF that is required both for the formation of a KSR/RAF complex and for enabling the IS element to block RAF activity in the absence of proper RTK-induced signals (see Concluding Remarks). This scenario would also explain why several *cnk* loss-of-function alleles recovered in the KSR-dependent genetic screen have molecular lesions producing mutant proteins similar to NT-CNK and yet behaved as loss-of-functions (Therrien et al., 1998; Laberge et al., 2005). It is interesting however that when

Genotype	% of $cnk^{E-1088} / cnk^{J(2)k16314}$ adult flies ^a	# of flies scored ^b
$cnk^{E-1088} / cnk^{J(2)k16314}$	0	1287
$cnk^{E-1088} / cnk^{J(2)k16314}, pcnk-cn k^{WT}$	21.9	515
$cnk^{E-1088} / cnk^{J(2)k16314}, pcnk-cn k^{ISmut}$	22.1	951
$cnk^{E-1088} / cnk^{J(2)k16314}, pcnk-cn k^{RIMmut}$	0.1	1215
$cnk^{E-1088} / cnk^{J(2)k16314}, pcnk-cn k^{RIMmut-ISmut}$	0	748
$cnk^{E-1088} / cnk^{J(2)k16314}, pcnk-cn k^{SAMmut}$	0	1167
$cnk^{E-1088} / cnk^{J(2)k16314}, pcnk-cn k^{CRICmut}$	0.3	309

Table 3.I Genomic Rescue Experiments Revealed the Positive Role Played by the RIM

The fully penetrant larval lethality associated with $cnk^{E-1088} / cnk^{J(2)k16314}$ trans-heterozygous flies is fully rescued by introducing of one copy of a wild-type cnk genomic rescue construct ($pcnk-cn k^{WT}$). ^aFor full rescue, the expected ratio of $cnk^{E-1088} / cnk^{J(2)k16314}$ adult flies over total progeny is 20%. ^bSimilar results were obtained with a distinct transgenic line for each constructs.

overexpressed, NT-CNK (or related CNK variants that lacked a functional RIM) is collaborating with RAS to mediate KSR activity even though it does not bridge KSR and RAF. Again, a number of models could explain this observation. The one we favor is that CNK does not only connect KSR to RAF, it is also controlling a RAF-activating property of KSR via its SAM and CRIC domains in a RAS-dependent manner. Therefore, when NT-CNK is overexpressed in the presence of activated RAS, a greater proportion of endogenous KSR become activated. As these activated KSR molecules still retain one physical contact to RAF through their CA1 domain, the sum of their weaker effect results nonetheless in a significant elevation of RAF activity.

3.4.5. The KSR/CNK Interaction Depends on a Novel SAM Domain-Containing Protein, Hyphen

One exciting finding of this study is the involvement of the SAM domain of CNK in the CNK/KSR interaction. Although initial studies on SAM domains revealed their ability to form homo- or hetero-oligomers with other SAM domains, mounting evidence suggests that they can also interact with unrelated proteins or even with RNA (Qiao et al., 2005). Hence, it is conceivable that the SAM domain of CNK directly contacts the kinase domain of KSR. However, as our current results do not answer this point, it is also possible that the interaction is not direct and/or depends on additional components.

Our preliminary evidence suggests that the SAM domain of CNK does not homodimerize (data not shown). Yet, we were surprised to find that the L71K mutation used in this study and which is expected to preserve the structural integrity of the SAM domain while preventing it from homo- or heterodimerizing with other SAM domains (Stapleton et al., 1999), is as deleterious as a drastic mutation (W17S-I18S) predicted to unfold the SAM domain (Douziech et al., 2003). This observation indicated that for proper function, the SAM domain of CNK probably heterodimerizes with another SAM domain-containing protein. If this is true, elimination of this hypothetical protein should impede RAS-mediated MAPK activation. As a first approach to investigate this possibility, we targeted by RNAi a selected set of the SAM domain-containing proteins found in *Drosophila* and tested the effect on MAPK activation induced by RAS^{V12} in S2 cells. In addition to CNK, *Drosophila* contains

thirty-five independent SAM domain-containing proteins according to the Single Modular Architecture Tool (SMART) database (Letunic et al., 2004). Seven of these, which are transcription factors or modulators of transcription factors, contain a variant form of the SAM domain known as the SAM/PNT domain and were not considered further. Another twelve were also not selected at this point because they corresponded to chromatin-remodeling factors, RNA-binding proteins or their available genetic characterization provided no hint for a role in RAS/MAPK signaling. Besides CNK, this left us with fifteen candidate proteins to test. Double-stranded RNA was produced for each of these and tested separately. Strikingly, one of these RNAi, which targeted CG30476, significantly reduced MAPK activation induced by RAS^{V12} (Figure 3.6A, compare lanes 2 and 3), whereas the others had no detectable effect (data not shown). Moreover, in contrast to endogenous MEK depletion, elimination of CG30476 did not affect MAPK activity when stimulated by RAF^{ED}, thus positioning its requirement upstream or in parallel to RAF. Together, these findings not only identified a potential candidate regulating the function of CNK, they also unveiled a novel mediator of RAS/MAPK signals.

CG30476 is an evolutionarily conserved low molecular weight protein of 106 amino acids that essentially consists of a single SAM domain followed by a short stretch of conserved residues (Suppl. Figure 3.3). We renamed this protein Hyphen (HYP) based on its presumed ability to link functionally critical proteins within the RAS/MAPK pathway. If HYP is influencing the function of the SAM domain of CNK, then depletion of endogenous HYP should have an impact on NT-CNK-induced MEK activation. This is indeed what we observed as RNAi-mediated HYP knock-down potently counteracted RAF-mediated MEK phosphorylation stimulated by RAS^{V12}, KSR and NT-CNK (Figure 3.6B, compare lanes 2 and 4). The specificity of the RNAi was demonstrated by rescuing the MEK activation defect using a non-targetable HYP construct (lane 5). Although HYP may be performing more than one function within the pathway, it is possible that it heterodimerizes with the SAM domain of CNK and that this interaction is a prerequisite for KSR recruitment. We investigated this hypothesis first by verifying whether the interaction between V5-KSR and NT-CNK depended on endogenous HYP. Strikingly, lowering endogenous HYP levels

Figure 3.6 The Recruitment of KSR to CNK Depends on Hyphen, a Novel SAM Domain-containing Protein

(A) S2 cells were transfected with the ha-MAPK reporter construct (300 ng) either alone (lane 1) or together with the indicated combinations of ha-RAS^{V12} (200 ng) or pyo-RAF-AL^{ED} (30 ng) constructs and the dsHYP or dsMEK RNAs (500 ng). Cells were lysed 18h post-induction of expression and pMAPK levels were determined.

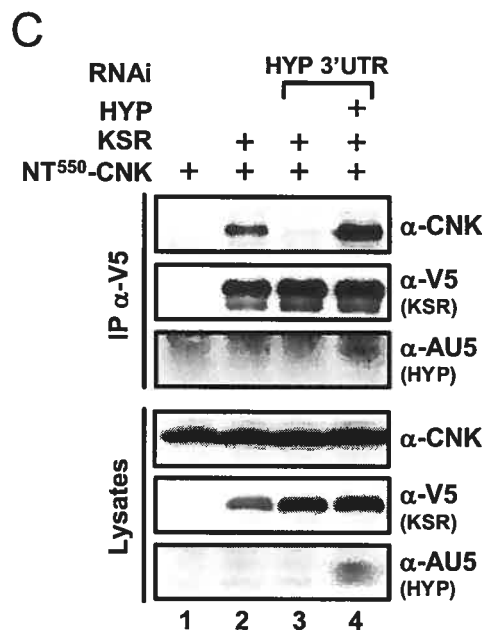
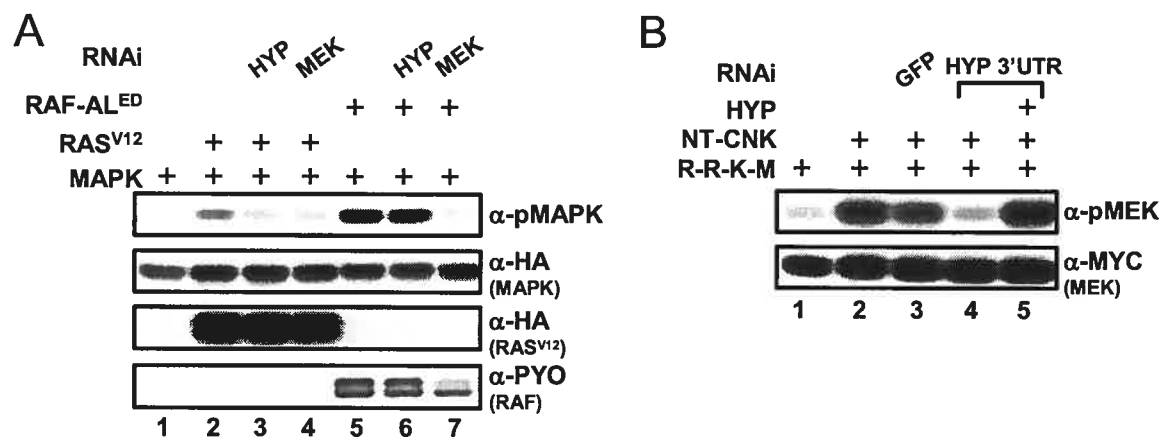
(B) S2 cells in lanes 3 to 5 were plated with 12ug of either dsGFP or dsHYP 3'UTR RNAs for 24 h. Cells were then transfected using the indicated combinations of myc-MEK^{DA} (53 ng to 70 ng), ha-RAS^{V12} (10 ng to 30 ng), V5-KSR (2 ng to 4 ng), pyo-RAF (25 ng to 45 ng) with or without CNK^{NT} (35 ng) and UA5-HYP (10 ng). Lanes 3 to 5 were also transfected with 500 ng of either dsRNA against GFP (lane 3) or HYP 3'UTR (lanes 4 and 5). Cell lysates were prepared 36 h post-induction of expression and analyzed for MEK phosphorylation

(C) S2 cells were plated with 60 ug of indicated dsRNA. Cells were lysed 4 days after and immunoprecipitated using a monoclonal anti-KSR antibody to examine endogenous protein complex formation. Three 100mm dishes have been pooled for each condition except for lane 3 which contains 2 dishes to adjust endogenous protein levels. Lane 1 contains no RNAi but has been treated the same way.

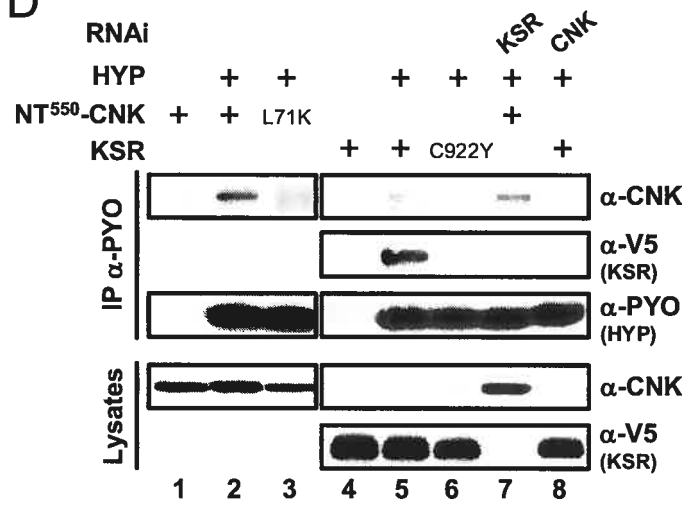
(D) S2 cells were transfected with the indicated combinations of CNK^{NT1-550} (80 ng) or CNK^{N^{TL}71K} (120 ng) with pyo-HYP (80 ng) and V5-KSR (100 ng) or V5-KSR^{C922Y} (140 ng) with pyo-HYP (80 ng). Cells were lysed 36 h post-induction and analyzed either directly for protein levels or immunoprecipitated with anti-pyo to measured associated CNK or KSR levels.

(E) S2 Cells in lanes 3 and 4 were plated with 12 ug of dsRNA against the 3'UTR of HYP for 24 h. Cells were then transfected with CNK^{NT1-550} (80 ng) alone or with V5-KSR (100 ng) with or without UA5-HYP (15 ng) and HYP 3'UTR dsRNA (500 ng). 36h post-induction, cells were either directly verified for protein levels or immunoprecipitated with

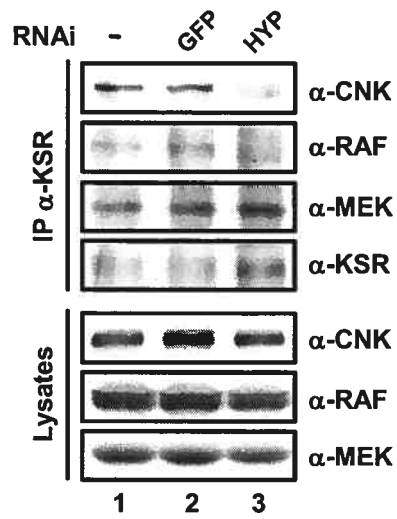
anti-V5 antibody to evaluate if the CNK/KSR complex formation could be rescued by the exogenous form of HYP.

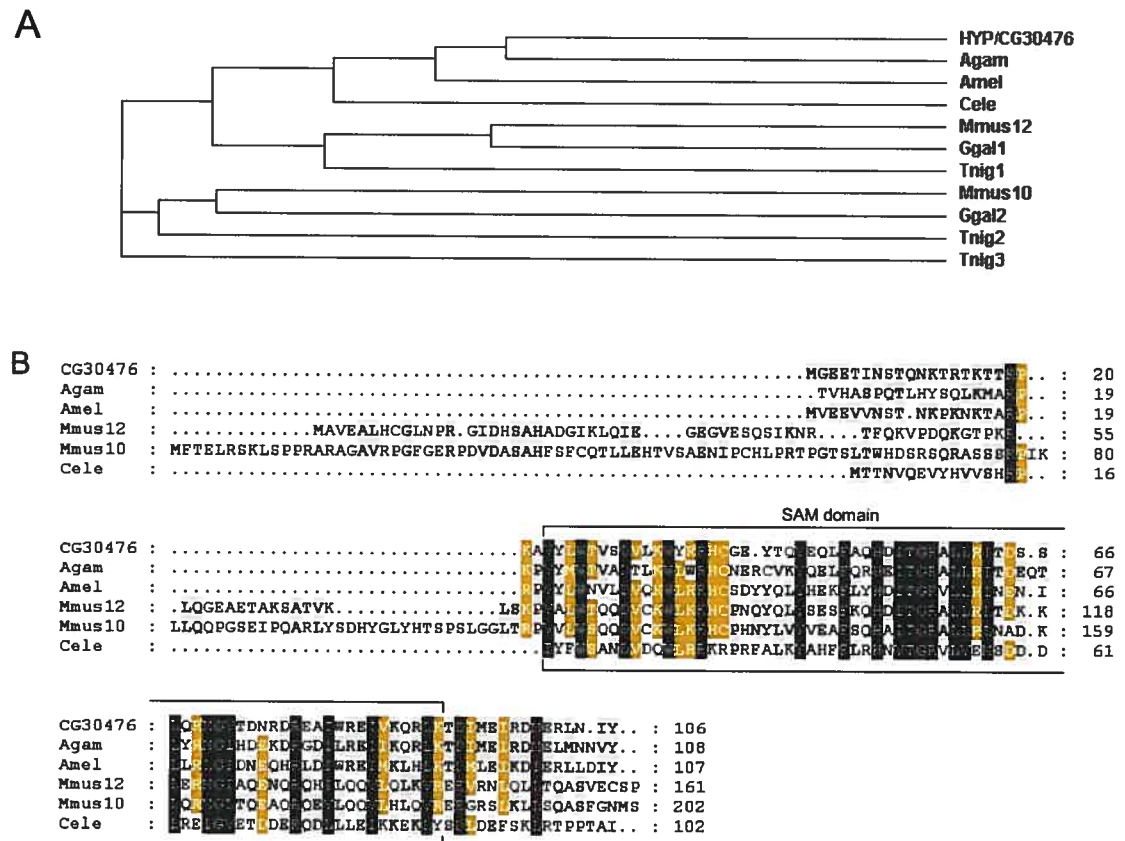


D



E





Supplemental Figure 3.3 Hyphen is an evolutionarily conserved protein

(A) Dendrogram showing the phylogeny relationship among metazoan proteins closely related to *Drosophila* HYP. Database analysis uncovered a single gene in insects (*Drosophila* CG30476; *A. gam.* [EAA00520.2]; *A. mel.* [Ensembl access #: ENSAPMP00000022190]) and nematode (*C. ele.* [M01G5.6]), while multiple homologues seem to exist in higher metazoans such as in mammals (*Mmus12*: NP_997389 and *Mmus10*: NP_542188); birds (*Ggal1*: XP_418395.1; and *Ggal2*: XP_425711.1) and fish (*Tnig1*: CAG11091.1; *Tnig2*: CAG11266.1; *Tnig3*: CAG03919.1). (B) Amino acid comparison for the insects, nematode and mouse HYP homologues is. Identical and conserved residues are in black and gray boxes, respectively.

severely reduced the KSR/CNK interaction (Figure 3.6C, compare lanes 2 and 3), thus providing a molecular explanation as to why HYP RNAi decreased RAS/MAPK signaling. As for the MEK activation defect, the association was fully restored by co-introducing an AU5-tagged HYP rescue construct (lane 4). Given that the AU5-HYP protein was also detected in the V5-KSR immunoprecipitate (lane 4, α -AU5 panel), it suggested that it is part of the KSR/CNK complex. We thus verified whether HYP could interact independently with CNK and KSR. Interestingly, immunoprecipitation of a PYO-tagged HYP protein brought down co-expressed Flag-NT-CNK as well as V5-KSR (Figure 3.6D, lanes 2 and 5) and these associations were impaired by mutations in the SAM domain of CNK (CNK^{L71K}; lane 3) or in the kinase domain of KSR (KSR^{C922Y}; lane 6), which were shown above to affect the KSR/CNK association. Although these results provided additional evidence that HYP is critical for the KSR/CNK association and that its SAM domain possibly heterodimerizes with the SAM domain of CNK, they did not address whether HYP and CNK interacted independently of endogenous KSR and conversely, whether the HYP/KSR association occurred independently of endogenous CNK. To address this point, we conducted HYP/CNK or HYP/KSR co-immunoprecipitation experiments in the presence of RNAi against KSR or CNK, respectively. Interestingly, while the HYP/CNK association was not significantly affected by elimination of endogenous KSR (lane 7), removal of endogenous CNK eliminated the HYP/KSR interaction (lane 8). It thus appears that the association between HYP and CNK is a prerequisite for KSR recruitment. Finally, to determine whether the endogenous KSR/CNK complex observed in S2 cells also depends on HYP, we immunoprecipitated endogenous KSR from plain S2 cells in the absence or in the presence of HYP RNAi. As expected, reduction of endogenous HYP, lowered the KSR/CNK interaction as well as the KSR/RAF complex, but did not perturb the KSR/MEK interaction (Figure 3.6E). Collectively, these results identified a novel critical player of the RAS/MAPK pathway allowing the formation of a KSR/CNK complex that in turn regulates RAF activity.

3.5. Concluding Remarks

We previously demonstrated the ability of KSR to promote the formation of RAF/MEK complexes independently of RAS signals and have proposed that this scaffolding effect is a key functional aspect of KSR (Roy et al., 2002). Here, we showed that KSR does not act alone to bring RAF and MEK together, but requires at least two other proteins, namely, CNK and HYP (Figure 3.7). More importantly, our data also strongly suggest that the KSR/HYP/CNK complex is participating in RAS-dependent RAF activation apparently at a step regulating the activation loop of RAF. Given that *Drosophila* KSR does not appear to have intrinsic kinase activity (unpublished observations) and that mutagenesis of a generally essential residue for catalysis (i.e. K705M) still displays strong activity, it suggests that KSR does not phosphorylate the activation loop residues of RAF, although we cannot completely exclude this possibility as KSR may act through a novel catalytic process. It is therefore possible that either another kinase is recruited to accomplish this task or RAF itself is executing it. In any event, it is interesting to consider the fact that CNK does not exhibit any positive activity unless KSR is present (Figure 3.3 and data not shown), while KSR overexpression can still induce RAF-mediated MEK phosphorylation independently of RAS and CNK (Figure 3.1; Roy et al., 2002; and data not shown). It thus appears that KSR mediates the effects of RAS and CNK and that it can even bypass their requirement when expressed at sufficiently high levels as if it carries an intrinsic RAF-activating property that is manifesting itself when overexpressed along with wild-type RAF and MEK. However, it is currently not clear why the scaffolding effect of KSR is not important for the ability of RAF^{ED} to phosphorylate MEK as it has recently been suggested in *C. elegans* (Rocheleau et al., 2005). We suspect that this discrepancy is technical as the high activity of overexpressed RAF^{ED} in S2 cells might compensate for its lesser association to MEK in the absence of KSR.

Various models can be envisioned to explain the RAF-activating property of KSR. The one we favor is based on the position where KSR acts during this event and on the strong architectural and primary amino acid sequence homology between KSR and RAF members. Recent crystallographic studies conducted on an inactive B-RAF catalytic

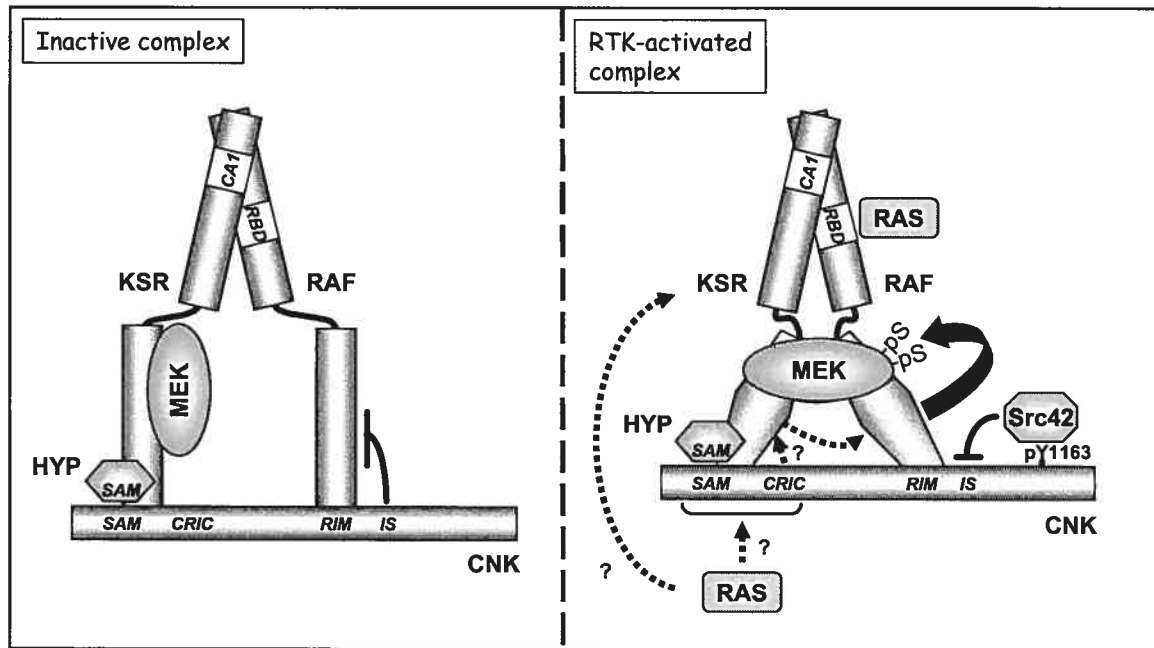


Figure 3.7 Model Summarizing the Scaffolding and the RTK-dependent Activating Property of the KSR/HYP/CNK Complex with respect to RAF and MEK. For simplicity the model (details in the text) does not include the presumed effects of 14-3-3 protein-binding on RAF and KSR architecture.

domain has uncovered an inhibitory interaction occurring between the P loop and the DFG motif/activation loop that is incompatible with catalysis (Wan et al., 2004). Moreover, structural analysis of this interaction strongly suggests that phosphorylation of the activation loop should interfere with the interaction and thereby help in switching and/or locking the DFG motif/activation loop into an active conformation. The importance of disrupting the inhibitory configuration was also supported by the striking observation that up to 90% of all B-RAF oncogenic mutations identified in melanomas affect a valine residue (V599) involved in stabilizing the inactive conformation (Wan et al., 2004; Wellbrock et al., 2004). Like for the V599E mutation, most of the other oncogenic mutations recovered in B-RAF could also be understood by their ability to disturb the inhibitory configuration. Interestingly, some of these even affected residues participating in catalysis and hence decreased intrinsic kinase activity. As these mutations were capable of elevating endogenous ERK activity by their ability to stimulate endogenous wild-type RAF proteins, it was proposed that a catalytically impaired but conformationally derepressed RAF kinase domain transduces its effect to inactive RAF proteins, possibly via an allosteric process, and as a result promotes their activation. KSR may act through a similar mechanism. For example, its overexpression along with MEK and RAF may allow it to adopt a configuration that in turn disrupts the inhibited configuration of the RAF catalytic domain, thereby rendering accessible the activation loop of RAF for phosphorylation. In physiological conditions, KSR may also operate via this process, but most likely in a regulated manner. Although not mutually exclusive, KSR may also work by bringing in other RAF-activating proteins, or sequestering away inhibitory proteins from RAF. Regardless of the exact mechanism KSR uses to activate RAF, this work has not only redefined the role of KSR with respect to RAF, it is also providing a novel framework to understand RAF activation by suggesting that a functional interaction between the KSR and RAF kinase domains might be a general mechanism governing RAF activation.

Although there might be various ways to bring KSR to RAF through the use of discrete scaffolding proteins, collectively our findings strongly suggest that prior to signal activation in S2 cells, the CNK/HYP pair juxtaposes a KSR/MEK complex to RAF and, owing to the so-called Inhibitory Sequence (IS) of CNK, helps in maintaining the higher

order complex in an inactive state (Figure 3.7). An alternative role for the IS element is to generate specificity downstream of the receptors. Therefore, upon activation, receptors inducing both RAS activity and the phosphorylation of the Y1163 residue, thus allowing Src42 binding, lead to RAF activation within CNK-assembled complexes. The requirement in RAS activity for the SAM and CRIC domains is currently unclear and several options are currently open. For example, these domains might perceive RAS activity by themselves or through other protein-protein interactions, which is then transmitted to KSR to regulate its conformation. On the other hand, it could result from the need for KSR in RAS activity that is not mediated by the SAM or CRIC domains, but is a pre-requisite for their proper function. Further, given that the CNK/HYP/KSR association does not require RAS to occur, it is possible that the RAS dependency is in fact restricted to the CRIC region.

3.6. Acknowledgments

We are grateful to ... for critical reading of the manuscript. M.T. is recipient of a Canadian Research Chair. This work was supported in part by grants from the Canadian Institutes of Health Research and the National Cancer Institute of Canada with funds from the Canadian Cancer Society.

3.7. References

- Anselmo, A.N., Bumeister, R., Thomas, J.M., and White, M.A. (2002). Critical contribution of linker proteins to Raf kinase activation. *J. Biol. Chem.* 277, 5940-5943.
- Bumeister, R., Rosse, C., Anselmo, A., Camonis, J., and White, M.A. (2004). CNK2 couples NGF signal propagation to multiple regulatory cascades driving cell differentiation. *Curr. Biol.* 14, 439-445.
- Chong, H., Vikis, H.G., and Guan, K.L. (2003). Mechanisms of regulating the Raf kinase family. *Cell. Signal.* 15, 463-469.
- Davies, H., Bignell, G.R., Cox, C., Stephens, P., Edkins, S., Clegg, S., Teague, J., Woffendin, H., Garnett, M.J., Bottomley, W., et al. (2002). Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature* 417, 949-954.
- Dhillon, A.S., and Kolch, W. (2002). Untying the regulation of the Raf-1 kinase. *Arch. Biochem. Biophys.* 404, 3-9.
- Dhillon, A.S., Meikle, S., Yazici, Z., Eulitz, M., and Kolch, W. (2002). Regulation of Raf-1 activation and signalling by dephosphorylation. *EMBO J.* 21, 64-71.
- Douziech, M., Roy, F., Laberge, G., Lefrancois, M., Armengod, A.V., and Therrien, M. (2003). Bimodal regulation of RAF by CNK in *Drosophila*. *EMBO J.* 22, 5068-5078.
- Jaumot, M., and Hancock, J.F. (2001). Protein phosphatases 1 and 2A promote Raf-1 activation by regulating 14-3-3 interactions. *Oncogene* 20, 3949-3958.
- Kolch, W. (2000). Meaningful relationships: the regulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by protein interactions. *Biochem J.* 351, Pt 2:289-305.
- Kornfeld, K., Hom, D.B., and Horvitz, H.R. (1995). The *ksr-1* gene encodes a novel protein kinase involved in Ras-mediated signaling in *C. elegans*. *Cell* 83, 903-13.
- Laberge, G., Douziech, M., and Therrien, M. (2005). Src42 binding activity regulates *Drosophila* RAF by a novel CNK-dependent derepression mechanism. *EMBO J.* 24, 487-498.
- Lanigan, T.M., Liu, A., Huang, Y.Z., Mei, L., Margolis, B., and Guan, K.L. (2003). Human homologue of *Drosophila* CNK interacts with Ras effector proteins Raf and Rlf. *FASEB J.* 17, 2048-2060.
- Letunic, I., Copley, R.R., Schmidt, S., Ciccarelli, F.D., Doerks, T., Schultz, J., Ponting, C.P., and Bork, P. (2004). SMART 4.0: towards genomic data integration. *Nucleic Acids Res.* 32, D142-144.

- Malumbres, M., and Barbacid, M. (2003). RAS oncogenes: the first 30 years. *Nat Rev Cancer* 3, 459-465.
- Morrison, D.K., and Cutler, R.E. (1997). The complexity of Raf-1 regulation. *Curr. Opin. Cell Biol.* 9, 174-179.
- Morrison, D.K., and Davis, R.J. (2003). Regulation of MAP kinase signaling modules by scaffold proteins in mammals. (2003). *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* 19, 91-118.
- Pearson, G., Robinson, F., Beers Gibson, T., Xu, B.E., Karandikar, M., Berman, K., and Cobb, M.H. (2001). Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocr Rev.* 22, 153-183.
- Qiao, F., and Bowie, J.U. (2005). The many faces of SAM. *Sci STKE.* 2005, re7.
- Rocheleau, C.E., Ronnlund, A., Tuck, S., and Sundaram, M.V. (2005). *Caenorhabditis elegans* CNK-1 promotes Raf activation but is not essential for Ras/Raf signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102, 11757-11762.
- Roy, F., Laberge, G., Douziech, M., Ferland-McCollough, D., and Therrien, M. (2002). KSR is a scaffold required for activation of the ERK/MAPK module. *Genes Dev.* 16, 427-438.
- Shields, J.M., Pruitt, K., McFall, A., Shaub, A., and Der, C.J. (2000). Understanding Ras: 'it ain't over 'til it's over'. *Trends Cell Biol.* 10, 147-154.
- Stapleton, D., Balan, I., Pawson, T., and Sicheri, F. (1999). The crystal structure of an Eph receptor SAM domain reveals a mechanism for modular dimerization. *Nat. Struct. Biol.* 6, 44-49.
- Sundaram, M., and Han, M. (1995). The *C. elegans* ksr-1 gene encodes a novel Raf-related kinase involved in Ras-mediated signal transduction. *Cell* 83, 889-901.
- Therrien, M., Michaud, N.R., Rubin, G.M., and Morrison, D.K. (1996). KSR modulates signal propagation within the MAPK cascade. *Genes Dev.* 10, 2684-2695.
- Therrien, M., Wong, A.M., and Rubin, G.M. (1998). CNK, a RAF-binding multidomain protein required for RAS signaling. *Cell* 95, 343-353.
- Wan, P.T., Garnett, M.J., Roe, S.M., Lee, S., Niculescu-Duvaz, D., Good, V.M., Jones, C.M., Marshall, C.J., Springer, C.J., Barford, D., and Marais, R. Cancer Genome Project. (2004). Mechanism of activation of the RAF-ERK signaling pathway by oncogenic mutations of B-RAF. *Cell* 116, 855-867.

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

Zhang, B.H., and Guan, K.L. (2000). Activation of B-Raf kinase requires phosphorylation of the conserved residues Thr598 and Ser601. *EMBO J.* 19, 5429-5439.

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

4. CHAPITRE 4

Discussion

Voilà plus de 20 ans que l'oncogène RAF est identifié. Des recherches intensives ont été réalisées depuis dans le but d'élucider son mécanisme d'activation. Ces études ont permis de démontrer la complexité de ce processus, lequel est caractérisé par un ensemble d'événements moléculaires collectivement requis pour obtenir une activation maximale. Le recrutement membranaire, les interactions protéine-protéine et la phosphorylation ne sont que quelques-unes des étapes auxquelles RAF doit être soumise (Wellbrock et al., 2004). Pourtant, ce processus d'activation cache encore bien des mystères. Le mécanisme moléculaire par lequel l'ouverture de la boucle d'activation du domaine kinase de RAF est assurée, n'a pas encore été élucidé. Plusieurs cribles génétiques réalisés autant chez la drosophile que chez *C. elegans* ont ainsi été effectués dans le but d'identifier de nouvelles molécules impliquées dans la voie de signalisation Ras qui permettraient peut-être d'en apprendre un peu plus sur le processus d'activation de RAF. Deux molécules ont ainsi été isolées, soit KSR et CNK (Kornfeld et al., 1995; Sundaram and Han, 1995; Therrien et al., 1995; Therrien et al., 1998). Ces dernières sont, selon la génétique, positivement requises dans la signalisation Ras/MAPK. Certaines analyses biochimiques ont déjà démontré que l'activité d'échafaudage de KSR facilite la phosphorylation de MEK par RAF en favorisant leur rapprochement (Roy et al., 2002). CNK a quant à elle la capacité d'interagir spécifiquement par l'intermédiaire de sa portion CT, au domaine kinase de RAF. La portion NT de CNK est susceptible de coopérer avec Ras^{V12} dans l'œil de la drosophile, un événement qui est d'ailleurs dépendant des domaines SAM et CRIC de CNK (Therrien et al., 1999). La déplétion de KSR et de CNK par RNAi dans un système de cellules en culture prévient l'activation de RAF induite par l'insuline, laissant ainsi présager une fois de plus leur importance fonctionnelle au sein de la cascade (Anselmo et al., 2002). Cette thèse discute des différentes découvertes qui ont été réalisées au laboratoire au cours des dernières années, concernant les mécanismes d'action de KSR et de CNK dans l'activation de la voie de signalisation Ras/MAPK. Plusieurs essais biochimiques ont permis de mettre en lumière certaines particularités qui les rendent d'autant plus intéressantes. Plusieurs hypothèses seront émises puis discutées dans le but d'éclaircir leur importance fonctionnelle dans le processus d'activation de RAF. Dans un souci de simplification, il est à noter que le mot MAPK est systématiquement utilisé au lieu de ERK.

4.1. Processus d'activation de RAF par CNK et KSR

L'élaboration d'un essai fonctionnel basé sur l'état d'activation de MAPK dans un système de cellules en culture, nous a permis de démontrer l'importance de la portion NT de CNK dans l'activation de la voie de signalisation Ras/MAPK. L'intégrité du domaine SAM et de la région CRIC de CNK est essentielle à ce processus (Chapitre 2) (Douziech et al., 2003). Selon nos analyses biochimiques, le domaine SAM de CNK a la capacité d'interagir avec le domaine kinase de KSR. Cette association semble toutefois dépendre d'une nouvelle composante de la voie, appelée HYP, qui est essentiellement constituée d'un domaine SAM (Chapitre 3, Douziech et al. 2005). Aucun partenaire protéique capable d'interagir spécifiquement avec la région CRIC de CNK n'a cependant pu être isolé. Son mécanisme d'action au sein du processus d'activation de la voie est encore un mystère et sera ultérieurement discuté à la section 4.1.2 (page 174).

L'effet de coopération entre CNK^{NT} et Ras^{V12} permet d'accentuer la signalisation en favorisant potentiellement l'activation de RAF par un mécanisme qui dépend de KSR (Figure 3.3.A). Par définition, le phénomène de coopération résulte d'une collaboration entre différentes composantes d'une voie de signalisation dans le but d'induire par exemple l'activation d'une protéine en aval. Cette activation est dite non additive puisque la réponse induite suivant cette collaboration excède la somme des effets médiés par chacune des composantes (Lim, 2002). En soi, ces composantes sont de faibles activateurs, voire même inertes dans certains cas. Seule la combinaison de leur activité assure la transmission efficace du signal. De façon générale, le phénomène de coopération semble être un événement moléculaire relativement récurrent au sein des divers processus biologiques qui régissent la cellule. La coopération qui caractérise la voie Ras/MAPK ne serait pas unique. La polymérisation de l'actine induite par le complexe multiprotéique Arp2/3 semble également dépendre d'un phénomène de coopération. En effet, il semblerait que ce complexe soit maintenu inactif par la protéine N-WASp (« Wiskott-Aldrich syndrome protein »). La collaboration entre la petite GTPase Cdc42 liée au GTP et le lipide PIP₂ (phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate) permettrait d'induire, suivant leur association respective à N-WASp, un changement conformationnel qui favoriserait l'initiation de la polymérisation. En soi, Cdc42 et PIP₂ sont de mauvais activateurs puisqu'ils n'arrivent pas

à modifier seuls la conformation de N-WASp. Ils doivent collaborer (Higgs and Pollard, 2000; Prehoda et al., 2000). Il en est de même pour CNK^{NT} puisqu'elle est incapable en soi d'initier le processus d'activation du domaine catalytique de RAF. Ras^{V12} est conjointement requise. KSR contribue également puisque sa déplétion par RNAi abolit la coopération entre Ras^{V12} et CNK^{NT} (Douziech et Therrien, donnée non publiée). Il est possible que d'autres molécules soient corequises puisque l'intégrité de la région CRIC de CNK est également nécessaire à la transmission du signal (Douziech et al. 2003). Par conséquent, il semble que le mécanisme d'activation de RAF repose en partie sur la capacité des domaines SAM et CRIC de CNK à accomplir leur fonction respective.

4.1.1. Mécanisme d'action du domaine SAM de CNK

Les protéines à domaine SAM participent à la régulation des nombreux processus biologiques impliqués dans le maintien de l'homéostasie de la cellule (Qiao and Bowie, 2005; Stapleton et al., 1999). Initialement décrit chez la levure et la drosophile (Ponting, 1995), ce domaine est l'un des plus abondants à travers tous les organismes: on le retrouve dans plus de 1300 protéines, comparativement aux 1600 protéines qui comportent un domaine SH2. Malgré le fait qu'ils adoptent une architecture tridimensionnelle similaire, les domaines SAM ont la capacité d'interagir de multiples façons dans le but de générer des oligomères qui permettent de réguler leur fonction. Ces oligomères peuvent être le résultat d'une homodimérisation, d'une hétérodimérisation ou d'une hétéro-oligomérisation. Dans certains cas, les domaines SAM peuvent induire la formation d'un polymère résultant de leur autoassociation (Qiao and Bowie, 2005). Ces modes d'association permettent de proposer certaines hypothèses quant au mécanisme d'action du domaine SAM de CNK. Les sections qui suivent en discutent.

4.1.1.1. Site d'ancrage pour une kinase

Certains facteurs de transcription de type ETS ont un domaine SAM qui peut contenir un site d'ancrage nécessaire à la liaison d'une protéine kinase. Cette association assure la phosphorylation en cis d'un résidu particulier situé à proximité du domaine SAM dans le but de moduler l'activité transcriptionnelle du facteur en question. Le domaine

SAM de l'activateur transcriptionnel ETS-1 par exemple, peut lier ERK2. Sans cette association, la phosphorylation de ETS-1 ne peut avoir lieu, compromettant par conséquent l'initiation de la transcription normalement induite suivant l'activation de la voie Ras/MAPK (Seidel and Graves, 2002). Or cette phosphorylation n'est pas toujours assurée par une interaction directe de l'enzyme avec son substrat (Qiao and Bowie, 2005). Le répresseur transcriptionnel Yan chez la mouche en est un exemple. En effet, sa phosphorylation par MAPK nécessite la liaison préalable du facteur de transcription Mae (« Modulator of the activity of ETS ») par l'intermédiaire de son domaine SAM, lequel a la capacité de s'hétérodimériser avec le domaine SAM de Yan. Selon l'hypothèse, Mae pourrait favoriser le recrutement de MAPK en lui fournissant un site d'ancrage, facilitant ainsi la phosphorylation de Yan et l'inhibition de sa fonction (Baker et al., 2001). Curieusement, ces interactions combinées de Yan, Mae et MAPK rappellent celles de CNK, HYP et KSR. En effet, HYP qui ne contient qu'un domaine SAM, permet la formation du complexe CNK/KSR puisque sa déplétion par RNAi prévient cette interaction (Figures 3.6D et 3.6E). La phosphorylation de MEK et de MAPK suivant l'activation de la voie est également compromise, démontrant par conséquent l'importance fonctionnelle de HYP au sein du processus d'activation (Figures 3.6A et 3.6B). Son mécanisme moléculaire n'a pas encore été caractérisé. Cependant, il est possible de supposer que HYP puisse assurer la stabilisation du complexe CNK/KSR par l'intermédiaire d'un changement conformationnel qui permettrait à CNK^{NT} de lier le domaine kinase de KSR avec une meilleure affinité. Fait à noter, l'association de KSR au domaine SAM de CNK n'est pas induite suivant l'activation de la voie puisque le complexe endogène semble être préformé (Figure 3.5D). Le mécanisme d'action de HYP ne serait donc pas d'assurer l'association de KSR suivant l'activation de la voie Ras/MAPK. D'ailleurs, HYP semble incapable d'interagir directement avec KSR puisque la déplétion de CNK par RNAi prévient l'association HYP/KSR (Figure 3.6D). L'association HYP/CNK semble dépendre d'une hétérodimérisation entre leur domaine SAM respectif (Figure 3.6D). Cette association pourrait par le fait même favoriser une réorientation de la région CRIC de CNK dans le but de l'exposer pour être en mesure d'intégrer adéquatement le signal provenant de Ras.

D'après le mécanisme d'action de Mae, HYP pourrait favoriser le rapprochement d'une kinase à proximité de son substrat dans le but de faciliter la phosphorylation. De prime abord, ce mécanisme d'action est peu probable, compte tenu du fait que KSR semble dépourvue d'activité kinase. Or l'association de KSR au domaine SAM de CNK permet par le fait même le rapprochement entre KSR et RAF, puisque le motif RIM de CNK assure la liaison du domaine kinase de RAF. HYP pourrait participer au processus d'activation de RAF en favorisant simplement l'assemblage du complexe CNK/HYP/KSR/RAF/MEK. Il n'est pas exclu que HYP puisse recruter une kinase additionnelle suivant l'activation de la voie. Cette kinase pourrait modifier par phosphorylation l'organisation tridimensionnelle du complexe CNK/KSR par exemple, dans le but d'induire leur mécanisme d'action respectif et ainsi favoriser l'activation de RAF. Fait intéressant, la surexpression de HYP entraîne sur gel SDS-PAGE un retard dans la mobilité de CNK^{NT} et de KSR. Ce retard pourrait être le résultat d'une phosphorylation par une kinase activatrice. Il n'est toutefois pas exclu que cette phosphorylation soit plutôt causée par une rétroinhibition de la voie de signalisation induite suivant l'activation de MAPK. HYP pourrait par exemple recruter MAPK activée dans le but de faciliter l'inactivation par phosphorylation du complexe CNK/HYP/KSR/RAF/MEK. HYP ne possède à prime abord aucune séquence consensus susceptible d'être reconnue par MAPK. Étonnamment, Mae qui assure la phosphorylation de Yan par MAPK, n'en possède pas non plus. Pourtant, l'association Mae/MAPK a été démontrée au moyen de protéines purifiées (Baker et al., 2001). Il serait donc intéressant de vérifier par immunoprécipitation l'existence d'une association entre HYP et MAPK. Nous pourrions également vérifier par RNAi si MAPK est impliquée dans la phosphorylation de CNK^{NT} et de KSR suivant l'expression de HYP. La cristallographie des complexes CNK/HYP et CNK/HYP/KSR pourrait de plus fournir d'importants indices concernant les modifications conformationnelles qui sont induites suivant ces associations.

4.1.1.2. Polymérisation/dépolymérisation

Certains domaines SAM ont la capacité d'induire la formation d'un polymère suivant leur autoassociation (Qiao and Bowie, 2005). Le domaine SAM de Yan par exemple, en a la capacité. Sa polymérisation est essentielle pour inhiber efficacement

l'expression génique (Qiao et al., 2004). Elle requiert néanmoins l'intégrité d'une interface d'interaction composée de deux régions respectivement appelées ML (« mid-loop ») et EH (« end-helix »). Selon une analyse cristallographique, le mécanisme d'action de Mae serait d'interagir, par l'intermédiaire de son domaine SAM, avec l'une de ces surfaces d'interaction dans le but d'empêcher la formation d'un polymère de Yan et par conséquent prévenir la répression transcriptionnelle. L'homologue humain de Yan, appelé TEL (« Translocation, Ets, Leukemia »), fonctionne de façon similaire (Tognon et al., 2004). Fait intéressant, son domaine SAM est fréquemment fusionné par translocation chromosomique à différents domaines tyrosine kinases, produisant par conséquent des protéines chimériques oncogéniques (Jousset et al., 1997). Chez la levure, la MAP3K Ste11 se polymérise également par l'intermédiaire de son domaine SAM, un processus qui peut d'ailleurs être renversé par l'association du domaine SAM de Ste50 (Bhattacharjya et al., 2005; Kwan et al., 2004). Il est donc concevable que le domaine SAM de CNK puisse également se polymériser. L'effet d'un tel polymère pourrait être d'empêcher par exemple l'accessibilité de RAF à ses activateurs. La liaison de HYP pourrait initier la dépolymérisation du domaine SAM de CNK suivant l'activation de la voie, pour ensuite favoriser le recrutement de KSR. De prime abord ce modèle semble peu probable, compte tenu du fait que le complexe CNK/HYP/KSR/RAF/MEK pourrait être préformé dans la cellule. La déplétion de HYP prévient d'ailleurs la formation de ce complexe, alors que l'élimination de Ras est sans effet (Figures 3.6C et 3.5D). La surexpression de Ras^{V12} ne permet pas non plus d'augmenter la formation du complexe (Douziech et Therrien, donnée non publiée), suggérant ainsi que la fonction positive de HYP au sein du processus d'activation de RAF n'est pas d'induire la dépolymérisation de CNK. Cependant, il est possible qu'un tel mécanisme de dépolymérisation du domaine SAM de CNK puisse être régulé par une voie indépendante de Ras. Parallèlement, CNK non complexée pourrait également avoir en soi, la capacité de se polymériser. Il serait donc intéressant de visualiser par microscopie électronique l'habileté de CNK purifiée à se polymériser en solution (Kim et al., 2001; Tognon et al., 2004). Nous pourrions également vérifier si la fusion du domaine SAM de CNK aux différents domaines tyrosine kinases fréquemment fusionnés au domaine SAM de TEL, peut favoriser la transformation des cellules.

4.1.1.3. Association non polymérique

Certains domaines SAM semblent favoriser l'assemblage d'homodimères, d'hétérodimères ou d'hétéro-oligomères. Chez *S. cerevisiae* par exemple, la MAP3K Ste11 et la protéine d'échafaudage Ste50 peuvent s'associer entre elles grâce à leur domaine SAM (Kwan et al., 2004). Cette hétérodimérisation résulte d'une association tête-à-queue entre les différentes régions (ML et EH) de l'interface d'interaction qui caractérise un domaine SAM. En effet, la région ML de Ste11 s'associe à la région EH de Ste50, stimulant par conséquent la formation d'un complexe de haut poids moléculaire (Bhattacharjya et al., 2005). Cette oligomérisation pourrait conduire à l'amplification du signal en augmentant localement la concentration de Ste11 et par le fait même, la phosphorylation efficace des substrats. À la lumière de ces informations, serait-il possible qu'un tel scénario puisse s'appliquer au complexe CNK/HYP/KSR/RAF/MEK? HYP pourrait, suivant l'activation de la voie Ras/MAPK, stabiliser la formation d'un hétéro-oligomère résultant de l'association de deux complexes CNK/HYP/KSR/RAF/MEK préformés. Chaque HYP associée à un complexe pourrait lier en trans le domaine SAM du CNK appartenant au second complexe. Il n'est cependant pas exclu que HYP puisse procéder par simple homodimérisation. Dans les deux cas, KSR et RAF seraient par le fait même oligomérisées. Or selon certaines études réalisées chez les mammifères, l'accessibilité du domaine kinase de RAF nécessite son oligomérisation (Goetz et al., 2003; Rommel et al., 1997). Cette oligomérisation faciliterait la stabilisation de la conformation ouverte de RAF résultant du déplacement de 14-3-3, assurant par conséquent l'accessibilité des domaines kinases. La conformation de KSR serait également stabilisée par un mécanisme similaire (Roy and Therrien, 2002). CNK^{NT} pourrait alors induire un changement conformationnel au niveau des domaines kinases de KSR dans le but d'initier leur activation (discuté à la section 4.1.3, page 174). Les molécules de KSR ainsi stimulées pourraient à leur tour transactiver les domaines kinases de RAF également par l'intermédiaire d'une modification allostérique (discuté à la section 4.1.4, page 176). Il serait donc intéressant d'évaluer la capacité de CNK à former un dimère suivant l'expression de HYP en présence ou en absence d'une forme activée de Ras. Fait à noter, certains groupes de recherche ont démontré la capacité de CNK de mammifère à se dimériser (Ohtakara et al., 2002; Ziogas

et al., 2005). Cette dimérisation semble cependant dépendre d'une région riche en leucines positionnée en CT (Ohtakara et al., 2002).

4.1.2. Mécanisme d'action de la région CRIC de CNK

La région CRIC de CNK a initialement été identifiée par homologie de séquence. Sa pertinence fonctionnelle a été proposée après avoir identifié chez la mouche un allèle perte de fonction résultant d'une délétion en phase de trois acides aminés dans la région CRIC de CNK (issu du crible génétique KSR-dépendant). (Therrien et al., 1998). Nous avons confirmé l'impact d'une telle mutation dans l'activation de la voie Ras/MAPK au moyen d'un essai biochimique dans un système de cellules S2 en culture (Douziech et al., 2003). Le mécanisme moléculaire par lequel la région CRIC de CNK assure l'activation de RAF n'a pas encore été élucidé. Nous savons par contre que cette région est susceptible de médier des interactions protéine-protéine. En effet, le groupe de recherche du Dr Hall a démontré la capacité du CRIC à interagir spécifiquement avec rhophilin et MLK2, lesquelles étant respectivement des composantes des voies de signalisation Rho et JNK (Jaffe et al., 2004; Jaffe et al., 2005). Malheureusement, notre laboratoire n'a pu identifier aucune protéine impliquée dans la signalisation MAPK qui avait la capacité d'interagir avec la région CRIC de CNK. Les différentes composantes connues de la voie ont d'ailleurs été testées par coimmunoprécipitations. Une approche par purification de protéines suivant l'activation de la voie devrait permettre d'isoler un partenaire à condition que la région CRIC médie ses effets au sein de la signalisation Ras/MAPK par l'intermédiaire d'une interaction protéine-protéine. Cette approche pourrait également être faite en absence de stimulation.

4.1.3. Rôle de CNK dans l'activation de KSR

D'après les travaux décrits au chapitre 3 de cette thèse, il semble que les effets positifs médiés par la portion NT de CNK dans le processus d'activation de RAF dépend de KSR (Figure 3.3A, lignes 2 et 4). Le domaine kinase de KSR aurait la capacité d'intégrer l'activité de CNK^{NT} suivant l'induction de la voie de signalisation (Figure 3.3A). D'ailleurs, KSR interagit avec le domaine SAM de CNK par l'intermédiaire de son

domaine kinase (cette association dépend de HYP) (Figures 3.5B et 3.S2). Étonnamment, plusieurs mutants du domaine catalytique de KSR parviennent à intégrer l'activité de CNK^{NT} qui se traduit par une modeste phosphorylation de MEK. Pourtant, ces mutants voient leur association à MEK perturbée (Figures 3.3B et 3.4A). Ces résultats suggèrent que CNK puisse moduler l'activité de KSR indépendamment du recrutement de MEK par KSR. Alors quel pourrait être le mécanisme moléculaire par lequel CNK^{NT} stimule l'activité de KSR? Serait-il possible que CNK^{NT} puisse moduler la conformation du domaine kinase de KSR dans le but d'induire son mécanisme d'action? Malgré le fait que KSR semble dépourvue d'une activité kinase (Voir section 4.3, page 162), son domaine catalytique est bien conservé (contient les douze sous-domaines conservés). Il est par conséquent possible de supposer que le domaine kinase de KSR puisse être activé de façon similaire aux domaines kinases catalytiquement compétents, sans pour autant avoir la capacité d'initier une réaction de phosphotransfert. La phosphorylation au niveau de la boucle d'activation du domaine kinase de KSR pourrait par exemple stimuler sa fonction. Cependant, d'après les travaux réalisés au laboratoire, cette phosphorylation ne semble pas dépendre de la portion NT de CNK. En effet, la mutation des deux sites phosphorégulateurs potentiels de KSR en résidus phosphomimétiques n'influence en aucun cas la capacité de KSR à intégrer l'activité de CNK^{NT}. D'ailleurs, ce mutant de KSR ne permet pas en soi d'accentuer l'activation de RAF (Douziech et Therrien, donnée non publiée). Une autre façon de moduler l'activité de KSR serait par l'intermédiaire d'un changement allostérique permettant de modifier l'organisation tridimensionnelle du domaine kinase de KSR. Nous proposons que CNK^{NT} puisse induire, suivant l'activation de la voie Ras/MAPK, un changement conformationnel qui stimulerait la fonction de KSR. Cependant, aucune donnée ne nous a permis de confirmer cette hypothèse. Il n'est pas exclu que CNK puisse également favoriser le recrutement de molécule(s) additionnelle(s). D'ailleurs nos travaux n'ont pas permis d'élucider le mécanisme d'action de la région CRIC de CNK. Cette région pourrait médier des interactions protéine-protéines. La relocalisation membranaire de KSR pourrait également être assurée par CNK^{NT}, ce qui serait une autre façon de réguler la fonction de KSR. Une étude cristallographique du complexe KSR/HYP/CNK^{NT}, suivant l'activation de la voie, serait nécessaire pour vérifier la capacité de CNK^{NT} à induire un changement allostérique au niveau du domaine kinase de

KSR. Selon mes travaux, il semble que l'activation de KSR induite par CNK^{NT} se répercute positivement sur l'activité de RAF. Ce mécanisme d'action potentiel est d'ailleurs discuté à la section suivante. Il est intéressant de mentionner que l'importance fonctionnelle de CNK dans le processus d'activation de RAF a également été proposée chez *C. elegans* par Rocheleau et al. (Rocheleau et al., 2005). Selon cette étude, CNK1 pourrait potentiellement participer à l'activation et/ou la phosphorylation du domaine kinase de RAF en favorisant soit la relocalisation membranaire de RAF, soit son oligomérisation. CNK1 pourrait également faciliter le recrutement d'une kinase activatrice (Rocheleau et al., 2005). Anselmo et ses collaborateurs avaient également suggéré l'implication de CNK dans le processus d'activation de RAF puisque sa déplétion par RNAi atténuait systématiquement non seulement la phosphorylation de MAPK, mais également l'activité kinase de RAF induite par le récepteur à l'insuline (Anselmo et al., 2002). De plus, cette étude avait permis de mettre en lumière l'importance fonctionnelle de KSR au sein de la signalisation Ras/MAPK puisque sa déplétion par RNAi abolissait également l'activation de RAF. Notre étude montre pour la première fois la relation entre CNK et KSR dans le mécanisme d'activation de RAF.

4.1.4. Rôle de KSR dans l'activation de RAF

Le mécanisme d'action de KSR au sein de la signalisation Ras/MAPK est controversé. Certains croient, en l'occurrence Kolesnick et ses collègues, qu'elle possède une activité kinase essentielle à la transmission du signal (Xing et al., 2004; Xing et al., 2000; Zhang et al., 1997), alors que d'autres la définissent comme une protéine d'échafaudage (Michaud et al., 1997; Roy et al., 2002; Stewart et al., 1999). Pourtant, plusieurs résultats tendent à réfuter l'implication de KSR en tant que protéine à activité kinase d'abord parce que la lysine invariable du sous-domaine II nécessaire à la fixation de l'ATP n'est pas conservée chez KSR de mammifère (Therrien et al., 1995). D'autres part, les différents groupes de recherche qui appuient la thèse d'une activité d'échafaudage n'ont jamais été en mesure de reproduire les résultats obtenus par Kolesnick. (Denouel-Galy et al., 1998; Michaud et al., 1997; Sugimoto et al., 1998; Yu et al., 1998). Les analyses réalisées par Stewart et ses collègues ont d'ailleurs sérieusement mis en doute, du moins

chez *C. elegans*, la pertinence fonctionnelle de l'activité kinase de KSR au sein du processus d'activation de la voie Ras/MAPK. En effet, des mutations (lysine invariable et base catalytique) qui normalement abolissent l'activité catalytique d'une kinase restaurent le phénotype associé à une perte de fonction de KSR, supportant par conséquent l'hypothèse que le mécanisme d'action de KSR au sein de la voie MAPK est indépendant d'une activité kinase intrinsèque (Stewart et al., 1999). Cette capacité à moduler la signalisation indépendamment d'une activité kinase n'est pas unique à KSR. Par exemple, la protéine ILK (« integrin-linked kinase ») impliquée dans l'adhésion cellulaire suivant l'activation des intégrines possède un domaine kinase similaire à celui de RAF, mais qui pourtant ne semble avoir aucune activité catalytique. Des mutations qui normalement inhibent l'activité d'une kinase complètent l'allèle ILK perte de fonction de type nul autant chez la drosophile que chez le nématode (Lynch et al., 1999; Mackinnon et al., 2002; Zervas and Brown, 2002; Zervas et al., 2001). En fait, ILK semble également agir comme une protéine d'échafaudage. Étonnamment, près de 10 % des protéines à domaine kinase chez l'humain semblent n'avoir aucune activité catalytique classique puisque au moins un des résidus essentiels à la catalyse serait absent, laissant ainsi présager leur incapacité à initier le phosphotransfert (Manning et al., 2002). La transmission du signal serait entre autres assurée par la capacité de ces protéines à promouvoir l'assemblage de complexes multiprotéiques. KSR semble avoir ce rôle au sein de la signalisation MAPK. KSR faciliterait la phosphorylation de MEK par RAF en favorisant leur rapprochement (Roy et al., 2002). D'ailleurs, les mutants de KSR qui préviennent cette phosphorylation sont incapables d'assembler simultanément RAF et MEK en complexe ternaire, suggérant ainsi que le mécanisme d'action de KSR au sein du processus d'activation de la voie ne semble pas avoir recours à une activité kinase. Fait intéressant, le mutant KSR^{DADA}, qui modifie entre autres la base catalytique, est celui que Kolesnick a utilisé pour démontrer la pertinence fonctionnelle du domaine kinase de KSR dans l'activation de RAF. D'après les résultats de Roy et al. ce mutant est incapable d'interagir avec MEK, ce qui par conséquent remet en doute les conclusions de Kolesnick (voir annexe 2). D'ailleurs, les sites de phosphorylation de RAF qui seraient induits par KSR correspondent aux sites d'autophosphorylation de RAF. Ces résultats suggèrent que le recrutement de MEK à RAF par KSR puisse favoriser l'autophosphorylation de RAF.

4.1.4.1. KSR est plus qu'une simple protéine d'échafaudage

L'assemblage de complexes multiprotéiques n'est pas le seul mécanisme permettant aux protéines kinases dépourvues d'une activité catalytique d'assurer la transmission de signaux. Certaines protéines semblent activement prendre part au processus d'activation de la voie (Manning et al., 2002). Les membres de la famille des Jaks par exemple ont un domaine kinase inactif, appelé domaine pseudokinase, qui assure par modification allostérique la régulation d'un second domaine kinase catalytiquement compétent (Chen et al., 2000). La caractérisation des mutants oncogéniques de B-RAF a également permis de mettre en évidence la possibilité qu'une régulation allostérique induite par B-RAF puisse moduler l'activation de l'isoforme C-RAF (Wan et al., 2004). En effet, plusieurs mutants de B-RAF, isolés à partir de lignées tumorales, ont une activité kinase largement réduite *in vitro* puisque ces substitutions oncogéniques affectent des résidus hautement requis pour la catalyse. Étonnamment, ces mutants possèdent tous la capacité d'induire l'activation de MAPK endogène (Davies et al., 2002; Garnett and Marais, 2004; Wan et al., 2004). Cette activation dépend cependant de son homologue C-RAF puisque sa déplétion par RNAi abolit complètement l'induction de MAPK par B-RAF mutant. Wan et al. proposent en fait que l'hétérodimérisation de C-RAF à B-RAF mutée entraîne l'activation de C-RAF par l'intermédiaire d'un changement conformationnel (Garnett and Marais, 2004; Wan et al., 2004). À la lumière de ces informations serait-il possible que KSR puisse réguler l'activité du domaine kinase de RAF par l'intermédiaire d'une modification conformationnelle? Cette hypothèse serait compatible avec le fait que dans l'embryon d'une mouche le phénotype associé à une mutation perte de fonction de KSR puisse être restauré par une forme activée de RAF (Therrien et al., 1995). D'ailleurs, une étude d'épistasie réalisée également chez la drosophile propose que KSR puisse agir entre Ras et RAF (Therrien et al., 1995). D'autre part, le fait que KSR^{K705M} (mutation de la lysine invariable chez la mouche) soit légèrement moins apte à faciliter la phosphorylation de MEK par RAF, malgré sa capacité à assembler le complexe ternaire, laisse également présager que KSR puisse avoir une activité catalytique (et non une activité kinase) qui serait nécessaire à l'activation de RAF au même titre que son activité d'échafaudage (Roy et al., 2002)). Il n'est cependant pas exclu que cette modeste réduction d'activation de la voie soit plutôt

causée par un changement conformationnel qui affecte la façon dont KSR^{K705M} présente MEK à RAF sans toutefois perturber l'association KSR/MEK. Or d'après les résultats décrits au chapitre 3 de cette thèse, il semble que KSR puisse moduler l'activité de RAF par l'intermédiaire d'un changement allostérique qui faciliterait potentiellement l'ouverture de la boucle d'activation du domaine kinase de RAF. Cette hypothèse est basée sur le fait qu'un mutant constitutivement activé de RAF caractérisé par la double mutation des thréonines 571 et 574 en résidus phosphomimétiques (RAF^{ED}) (sites phosphorégulateurs de la boucle d'activation de RAF), devient complètement réfractaire au mécanisme d'action de KSR (Figures 3.2B et 3.2D). Ce résultat a permis de proposer que KSR puisse ouvrir la boucle d'activation du domaine kinase de RAF potentiellement dans le but d'exposer ces sites phosphorégulateurs (Thr571 et Thr574). D'ailleurs la phosphorylation de ces thréonines est un événement moléculaire essentiel à l'obtention d'une activation maximale de RAF (voir section 1.4.2.3.2.3.1, page 32). Sachant que l'effet positif médié par CNK^{NT} dans le processus d'activation de RAF dépend de KSR, il est normal que le mutant RAF^{ED} soit également réfractaire au mécanisme d'action de CNK^{NT} (Figures 3.2A, 3.2B, 3.2D et 3.S1). Étonnamment, CNK^{NT} peut partiellement restaurer la phosphorylation de MEK suivant l'expression du mutant RAF^{AA} caractérisé par la mutagenèse de ses thréonines 571 et 574 en alanines (figure 3.2A). Pourtant ces mutations devraient compromettre la stabilisation de la conformation active du site actif de RAF, ce qui par conséquent devrait prévenir la phosphorylation de MEK. En fait ce résultat suggère que KSR puisse participer à la stabilisation de la conformation active du domaine kinase de RAF suivant l'intégration d'un signal Ras par CNK^{NT}, en favorisant par exemple la réorientation du segment d'activation de RAF. L'ouverture induite par KSR pourrait initier le processus d'activation du domaine kinase de RAF, sans toutefois être en mesure d'atteindre l'activation maximale. La phosphorylation des thréonines est essentielle à cette activation maximale puisqu'elle permet de réorienter les différents résidus nécessaires à la liaison efficace du substrat MEK. Puisque ces thréonines sont mutagenésées, la phosphorylation de MEK est donc minime. Il n'est cependant pas exclu que cette ouverture induite par KSR puisse également éliminer certaines interactions intramoléculaires qui contribuent normalement à la stabilisation de la conformation inactive du domaine kinase de RAF. À titre d'exemple, la conformation inactive d'un domaine kinase peut parfois être davantage stabilisée par l'intermédiaire

d'une association entre le glutamate de l'hélice α C et l'arginine positionnée en amont de la base catalytique (Nolen et al., 2004). Suivant la phosphorylation de la boucle d'activation, le phosphorésidu primaire peut alors interagir avec cette arginine dans le but de réorienter le motif DFG de façon à ce qu'il soit correctement positionné lors de la catalyse (Huse and Kuriyan, 2002). Il est possible que KSR puisse dissocier l'interaction du glutamate et de l'arginine par modification allostérique de façon à instabiliser la conformation inactive de RAF. L'association entre la phosphothréonine 571 et l'arginine maintenant disponible pourrait dès lors stabiliser davantage la conformation du domaine kinase de RAF nécessaire pour assurer la liaison efficace de MEK. En fait, l'activation du domaine kinase de RAF nécessite une réorganisation tridimensionnelle qui permettrait aux résidus normalement impliqués dans la liaison de l'ATP, l'association de MEK et le phosphotransfert d'être repositionnés adéquatement. KSR pourrait agir à plusieurs niveaux autant dans l'instabilisation de la conformation inactive que dans la stabilisation de la conformation active du domaine kinase de RAF, sans toutefois phosphoryler directement les résidus thréonines 571 et 574. L'ensemble de ces résultats permet donc de proposer que KSR soit plus qu'une simple protéine d'échafaudage favorisant le recrutement de MEK à RAF (Douziech et al. 2005). D'ailleurs certains mutants du domaine kinase de KSR (KSR^{A696V-A703T} et KSR^{R732H}) qui ont la capacité d'assembler le complexe ternaire, sont pourtant incapables de soutenir l'activation de MEK par RAF (Figures 3.3B et 3.4). Ces résultats seront discutés à la section suivante (section 4.1.4.2, page 181).

Malgré le fait que ces études adressent spécifiquement l'importance fonctionnelle de la portion NT de CNK dans le processus d'activation de RAF, il ne faut pas oublier que CNK a également la capacité d'interagir avec le domaine kinase de RAF par l'intermédiaire de sa portion CT (le motif RIM). CNK pourrait donc faciliter l'activation de RAF par KSR en favorisant le rapprochement de KSR à RAF. L'association entre RAF^{NT} et le domaine CA1 de KSR pourrait également stabiliser ce rapprochement (Figure 4.1). Cependant, malgré le fait que nous avons démontré que CNK peut lier simultanément les domaines kinases de KSR et de RAF (Figure 3.5E), aucune évidence expérimentale ne nous permet d'interconnecter le potentiel d'échafaudage de CNK au processus d'activation de RAF par KSR. Pour le démontrer, il faudrait vérifier la capacité de CNK de type sauvage à

accentuer d'une part la formation du complexe KSR/RAF et d'autre part la phosphorylation de MEK par RAF.

4.1.4.2. Mutants du domaine catalytique de KSR

La plupart des mutants du domaine kinase de KSR abolissent l'activation de la voie Ras/MAPK. Dans certains cas, la portion NT de CNK peut restaurer légèrement la phosphorylation de MEK par RAF, corroborant ainsi l'hypothèse suggérant l'importance fonctionnelle de CNK^{NT} dans la réorganisation tridimensionnelle du domaine kinase de KSR (Figure 3.3). Différentes hypothèses peuvent être émises dans le but d'expliquer pourquoi les mutations du domaine kinase de KSR le rendent inapte à induire l'activation de RAF. Les sections qui suivent se consacrent aux comportements que ces mutants semblent adopter en tentant d'éclaircir pourquoi l'activation de la voie est abolie.

Les mutants KSR^{DADA} (mutations de la base catalytique et de l'acide aspartique du motif DFG) et KSR^{C922Y} (mutation dans le sous domaine XI) sont incapables d'assembler le complexe KSR/RAF/MEK, ce qui par conséquent prévient l'activation de MEK. Pourtant la surexpression de CNK^{NT} permet de restaurer légèrement la phosphorylation de MEK, laissant ainsi présager que CNK puisse moduler l'activité de KSR par un mécanisme qui serait indépendant de la capacité de KSR à recrutement MEK (Figures 3.3B et 3.4). Il est possible que l'intégration du signal Ras par les domaines SAM et CRIC de CNK puisse induire un changement conformationnel qui permettrait aux mutants de KSR d'instabiliser la conformation inactive de leur domaine kinase et/ou stabiliser leur conformation active. Cette modeste réorganisation ne leur permettrait toutefois pas d'induire efficacement l'activation de RAF, ce qui par conséquent se traduirait par une faible phosphorylation de MEK. Cette phosphorylation ne serait pas attribuable à une restauration de l'association de MEK. En effet, si tel avait été le cas, la phosphorylation de MEK induite par RAF suivant l'expression du mutant KSR^{G688E} (mutation dans le site de liaison nucléotidique) aurait du être supérieure ou du moins équivalente à celle induite suivant l'expression de KSR^{C922Y} puisque KSR^{G688E} a la capacité d'interagir faiblement avec MEK, contrairement au mutant

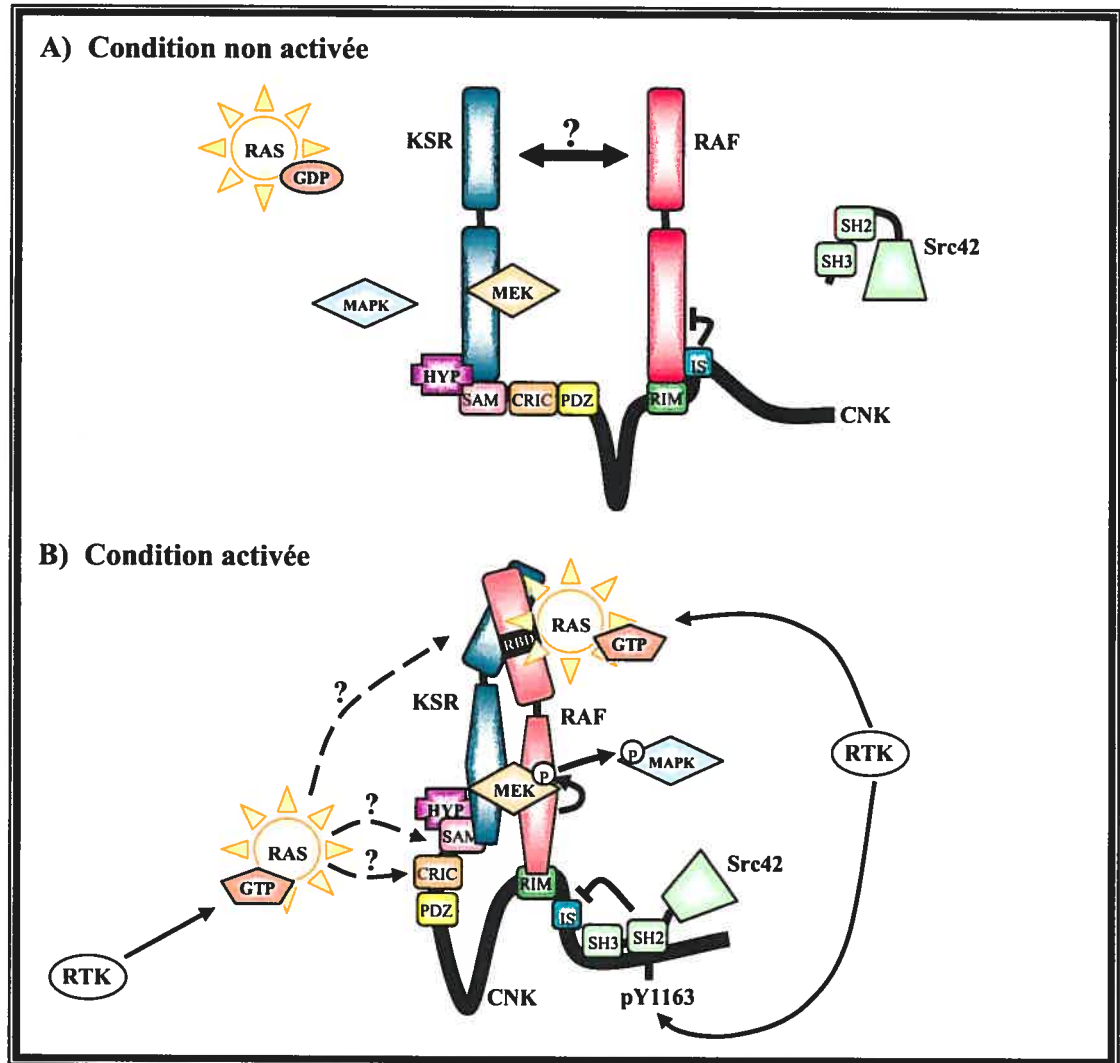


Figure 4.1 Modèle d'activation du module Ras/MAPK. (A) En absence d'une stimulation CNK maintient RAF inactive via sa région RIR. HYP assure le recrutement de KSR au domaine SAM de CNK. L'engagement des domaines NT de KSR et de RAF reste à être confirmé. (B) Suite à la stimulation d'un RTK, Ras et Src42 sont activées. Src42 s'associe à la région Y1163 de CNK et désengage le RIR. Parallèlement, les domaines SAM et CRIC de CNK intègre le signal Ras et stimule l'activité de KSR potentiellement via un changement conformationnel au niveau de son domaine kinase. KSR ainsi stimulée, transactive RAF en modulant également l'organisation tridimensionnelle de son domaine kinase, ce qui par conséquent semble favoriser l'exposition des sites phosphorégulateurs de RAF. MEK est ensuite phosphorylée par RAF pour assurer la transmission du signal.

KSR^{C922Y} qui lui, est incapable (Figure 3.4A). Ces résultats réfutent par conséquent l'implication de CNK^{NT} dans la stabilisation de l'interaction KSR/MEK. Parallèlement, si la fonction de CNK^{NT} avait uniquement été d'assurer la réorientation de MEK au site actif de RAF, le mutant KSR^{C922Y} n'aurait eu aucune activité, même suivant l'expression de CNK^{NT}. L'ensemble de ces résultats suggère que le mécanisme d'action de CNK semble être spécifiquement dirigé vers le domaine kinase de KSR et non vers l'association KSR/MEK.

Chez les mammifères, il semblerait que KSR ait la capacité de lier une molécule d'ATP (Muller et al., 2000). Quoique aucune preuve ne suggère une telle association nucléotidique chez la mouche, il est vraisemblable qu'il en soit ainsi puisque la mutation d'un important résidu positionné au sein du motif riche en glycines normalement impliqué dans la fixation et l'orientation des groupements phosphates de l'ATP (KSR^{G688E}), prévient l'activation de la voie de signalisation. D'après nos analyses biochimiques, cette mutation semble perturber l'association de MEK au domaine kinase de KSR, sans toutefois l'éliminer (Figure 3.4A). Deux modèles pourraient expliquer cette perturbation. Le premier propose que l'association d'une molécule d'ATP au site de liaison nucléotidique puisse, par exemple, faire en sorte que le domaine kinase de KSR adopte une conformation tridimensionnelle particulière qui permettrait la stabilisation de l'interface d'interaction de KSR et de MEK dans le but d'augmenter leur affinité d'association. Dans ce cas-ci, la liaison nucléotidique devrait potentiellement être constitutive puisque l'association KSR/MEK ne dépend pas d'un signal. D'ailleurs l'élimination de Ras par RNAi, au même titre que la surexpression de Ras^{V12}, n'affectent pas cette association, suggérant ainsi que la fixation de la molécule d'ATP au site de liaison nucléotidique de KSR ne dépend pas de l'activation préalable de la voie Ras/MAPK (Roy et al. 2002). Le second modèle propose que la perturbation de l'interaction KSR/MEK puisse être causée par une désorganisation structurale du domaine kinase de KSR résultant de la mutation de la glycine en position 688. La surexpression de CNK^{NT} pourrait restabiliser légèrement sa conformation, se traduisant ainsi en une faible phosphorylation de MEK (Figure 3.3B). Dans ce cas-ci, l'ATP ne serait pas directement impliquée dans la stabilisation de l'interaction KSR/MEK. Elle pourrait plutôt avoir le rôle d'un régulateur allostérique. Son association au site de

liaison nucléotidique de KSR pourrait être induite suivant l'intégration d'un signal Ras par la portion NT de CNK. Cette liaison pourrait par exemple induire un changement conformationnel qui permettrait au domaine kinase de KSR d'être en mesure de transactiver RAF. Fait intéressant, l'utilisation de l'ATP comme régulateur allostérique serait l'une des étapes essentielles au mécanisme moléculaire par lequel l'activité du récepteur guanylate cyclase (ANF-RGC, impliqué dans la production du GMPc) serait modulée. En effet, la liaison d'une molécule d'ATP au site de liaison nucléotidique permettrait d'activer partiellement le récepteur dans le but de le préparer à subir les étapes subséquentes menant vers l'activation de son domaine guanylate cyclase. Étonnamment, l'utilisation d'un analogue d'ATP non hydrolysable est tout aussi efficace, permettant ainsi de suggérer que le mécanisme d'action du nucléotide soit médié par modification allostérique plutôt que par l'intermédiaire d'une réaction de phosphotransfert. D'ailleurs le domaine kinase du récepteur serait inactif puisque la base catalytique n'est pas conservée. Or il est intéressant de mentionner que pour être pleinement activé, le récepteur ANF-RGC doit nécessairement être phosphorylé dans la région du site de liaison nucléotidique (kinase inconnue) (Potter and Hunter, 1998; Sharma et al., 2001). Cette phosphorylation a lieu suivant le changement conformationnel induit par la liaison d'une molécule d'ATP (Duda et al., 2001). Est-ce que l'intégration d'un signal Ras par CNK^{NT} pourrait favoriser un tel événement de phosphorylation sur KSR et ainsi assurer la transactivation subséquente du domaine kinase de RAF? Selon ce modèle CNK^{NT} pourrait par exemple favoriser la liaison d'une molécule d'ATP au site de liaison nucléotidique du domaine kinase de KSR par l'intermédiaire d'un changement conformationnel. Cette association nucléotidique pourrait faciliter l'exposition d'un ou plusieurs sites de phosphorylation qui seraient nécessaires à l'induction du mécanisme d'action de KSR. Par exemple, cette phosphorylation pourrait entraîner la restructuration du domaine kinase de KSR de façon à lui permettre non seulement de transactiver de RAF, mais également de réorienter adéquatement MEK à proximité du site actif de RAF dans le but de faciliter sa phosphorylation. Ce modèle permettrait d'expliquer pourquoi KSR^{G688E} est incapable de supporter l'activation de MEK, malgré sa capacité à interagir faiblement avec cette protéine. La conformation du domaine kinase de KSR serait altérée de manière à le rendre inapte à induire l'activation de RAF. Son association à MEK serait par le fait même perturbée sans toutefois être éliminée. Le

MEK qui arrive à se complexer pourrait potentiellement être mal orienté. Ce résultat démontre que le mécanisme d'action de KSR au sein du processus d'activation de RAF ne se résume pas uniquement au recrutement de MEK à RAF, sans quoi l'activation de MEK par RAF aurait été possible suivant l'expression du mutant KSR^{G688E}. L'ajout de CNK^{NT} pourrait contribuer à la réorganisation tridimensionnelle du domaine kinase de KSR en tentant de stabiliser une conformation active. Ce modèle explique également pourquoi KSR^{C922Y}, qui est incapable de lier MEK, est un meilleur activateur de la voie suivant l'expression de CNK^{NT}, que le mutant KSR^{G688E}. Le site de liaison nucléotidique de KSR^{C922Y} est intact et donc pourrait, de concert avec CNK^{NT}, stabiliser légèrement la conformation active du domaine kinase de KSR^{C922Y}. Par conséquent, il serait intéressant de vérifier la capacité de KSR à lier l'ATP en présence ou en absence de CNK^{NT}. Nous pourrions par la suite mutagenéiser le site de phosphorylation potentiel (la thréonine en position 692) localisé au sein de la pochette de liaison nucléotidique de KSR en résidu phosphomimétique et vérifier si ce mutant devient insensible au mécanisme d'action de CNK^{NT}.

Les mutants KSR^{AVAT} (mutations dans le site de liaison nucléotidique) et KSR^{R732H} (mutation entre les sous-domaines III et IV) sont particuliers. En effet, ils ont la capacité d'assembler le complexe CNK/HYP/KSR/RAF/MEK au même titre que KSR de type sauvage (Figure 3.4). Pourtant, aucune phosphorylation de MEK n'est visualisable, démontrant une fois de plus que le mécanisme d'action de KSR au sein du processus d'activation de RAF ne se résume pas simplement à une activité d'échafaudage (Figures 3.3B et 3.4). Par ailleurs, l'expression de CNK^{NT} ne permet pas de restaurer la phosphorylation de MEK. Alors, quel pourrait être le défaut de ces mutants? En fait, deux modèles possibles pourraient expliquer leur inaptitude à induire l'activation de RAF. Le premier concerne l'incapacité de ces mutants à intégrer un signal provenant de CNK^{NT}. Ces mutations pourraient par exemple stabiliser le domaine kinase de KSR dans une conformation inactive qui ne pourrait être adéquatement modifiée par CNK^{NT} suivant l'activation de la voie. L'activité de ces mutants de KSR ne pourrait être stimulée, ce qui par conséquent préviendrait l'activation de RAF. Le second modèle propose que ces mutants soient incompetents à induire l'activation de RAF par l'intermédiaire d'une

modification allostérique, sans toutefois perdre leur capacité à intégrer l'activité du NT de CNK. Dans ce cas-ci, CNK^{NT} aurait la capacité de modifier adéquatement la conformation du domaine kinase de KSR dans le but de stimuler sa fonction. Cependant, les mutations AVAT et R732H pourraient faire en sorte que KSR soit incapable d'ouvrir la boucle d'activation du domaine kinase de RAF, prévenant par conséquent l'exposition adéquate des sites phosphorégulateurs de RAF. Différentes approches expérimentales pourraient être faites dans le but de comprendre l'importance de KSR dans l'activation de RAF. Nous pourrions d'abord reconstituer *in vitro* l'activation de RAF par KSR au moyen d'un essai kinase pour ensuite évaluer l'impact des mutants (KSR^{AVAT} et KSR^{R732H}) et ainsi confirmer que cette inactivation n'est pas le résultat d'une mauvaise orientation de MEK. Si RAF arrive à s'autophosphoryler dans ces conditions, nous pourrions présumer que ces mutations rendent inaccessible MEK. À l'inverse, l'absence d'autophosphorylation impliquerait KSR dans le processus d'activation de RAF indépendamment de son activité d'échafaudage. Nous pourrions ensuite vérifier à l'aide du système de dimérisation forcée FRB-FKBP la capacité de KSR à induire l'activation de RAF. Si KSR parvient à activer RAF, nous pourrions directement évaluer l'impact des mutations AVAT et R732H. Si par exemple RAF peut être activée, ces mutations doivent nécessairement prévenir l'intégration du signal provenant de CNK^{NT}, sans toutefois perturber la capacité du domaine kinase de KSR à activer RAF par l'intermédiaire d'un changement conformationnel. À l'inverse si RAF ne peut être activée, le mécanisme d'activation de KSR est probablement altéré. Fait à noter, cet essai n'est valide que si KSR parvient à transactiver RAF en absence de CNK sans quoi, nous ne pourrions discriminer à savoir si les mutations du domaine kinase de KSR perturbent l'activité de CNK^{NT} ou la transactivation à proprement dite. Il est intéressant de mentionner que la mutation R732H perturbe une région conservée du domaine kinase de KSR qui pourrait potentiellement être impliquée dans la liaison de l'acide phosphatidique (PA) (Andresen et al., 2002). CNK^{NT} pourrait par exemple contribuer à l'exposition de cette surface d'interaction et favoriser la liaison du PA, suivant l'activation de la PLD par Ras^{V12}. Selon la littérature, il semble que la liaison du PA puisse influencer le recrutement de C-RAF à la membrane et la phosphorylation de MAPK, puisque l'expression d'une forme dominante négative de la PLD prévient ces événements moléculaires (Rizzo et al., 1999; Rizzo et al., 2000). Le recrutement de KSR^{R732H} à la

membrane pourrait donc être compromis, affectant par conséquent l'activation de la voie. Cependant nos résultats préliminaires ne supportent pas ce modèle.

En somme, CNK et KSR auraient d'importants rôles à jouer au sein du processus d'activation de RAF. Contrairement au rôle passif que KSR s'était fait initialement attribuer de par sa capacité à recruter MEK, mes résultats tendent à démontrer que KSR puisse activement prendre part au processus d'activation de RAF en modulant potentiellement la conformation de domaine kinase de RAF. Une étude cristallographique sera toutefois requise pour valider cette hypothèse.

4.2. Mécanisme de régulation de la région RIR de CNK

La portion CT de CNK comporte une séquence à double composante d'environ 40 acides aminés qui serait impliquée dans la régulation négative de la voie de signalisation Ras/MAPK (Figures 2.3 et 2.S1). Cette région, appelée RIR, contient un site de liaison à RAF (RIM) et une séquence inhibitrice (IS) en position adjacente (Douziech et al., 2003). Son rôle serait d'empêcher la phosphorylation de MEK par RAF en absence d'un signal provenant des RTKs. Son mécanisme d'action serait potentiellement de maintenir le domaine kinase de RAF dans une conformation inactive, un événement qui pourrait d'ailleurs s'ajouter à la stabilisation induite par la liaison de 14-3-3. Les prochaines sections discutent du rôle présumé de la région RIR au sein de la cascade Ras/MAPK et des mécanismes qui permettraient de relever son potentiel inhibiteur.

4.2.1. Effet inhibiteur de la région RIR

Différentes stratégies permettent à la cellule de réguler efficacement l'activité de ses protéines (Kobe and Kemp, 1999). L'association d'un cofacteur et les modifications posttraductionnelles en sont des exemples. Contrôler directement l'accès des molécules substrats au site actif de l'enzyme permet également d'influencer la fonction d'une protéine. Cette régulation porte le nom de régulation intrastérique. Dans la plupart des cas, l'accès du site actif de l'enzyme est négativement modulé par la liaison d'une séquence interne, appelée pseudosubstrat, positionnée en amont ou en aval du domaine catalytique

(Lew, 2003). Cette association intramoléculaire entraîne également la distorsion du domaine catalytique de la protéine, inhibant ainsi davantage son activité enzymatique (Huse and Kuriyan, 2002). De façon générale, cette distorsion se traduit en une incapacité à lier une molécule d'ATP. La boucle d'activation peut dans certains cas être obstruée, alors que l'hélice αC peut être mal orientée. Cette désorganisation généralisée du domaine catalytique de la protéine assure par conséquent l'inhibition efficace de son activité enzymatique en prévenant autant la liaison du nucléotide que la molécule substrat. Curieusement, cette régulation intrastérique n'est pas toujours le résultat d'une simple association intramoléculaire (Goldberg et al., 1996; Hu et al., 1994; Kobe and Kemp, 1999; Matsushita and Nairn, 1998). Dans certains cas, cette modulation se fait en trans suivant la formation d'un homodimère. La protéine p21-activated kinase PAK1 semble être ainsi régulée (Parrini et al., 2002). La régulation intrastérique peut également être assurée par interaction intermoléculaire suivant la formation d'un complexe oligomérique. La PKA en est un exemple puisque sa sous-unité catalytique peut être négativement régulée par une sous-unité régulatrice (Kim et al., 2005). Cette modulation intrastérique est donc un mode de régulation flexible qui permet de contrôler avec efficacité l'activité d'une enzyme.

CNK est caractérisée par une région inhibitrice (RIR) à deux composantes qui inactive la signalisation du module MAPK. Ses composantes correspondent à un domaine de liaison à RAF (RIM) et une séquence inhibitrice (IS), lesquels sont conjointement requis pour médier l'effet répresseur. Le mécanisme d'action du RIR n'a pas encore été clarifié, cependant il semble qu'il bloque la transmission du signal entre RAF et MEK par l'intermédiaire d'une association entre le domaine catalytique de RAF et le RIM de CNK (Douziech et al. 2003). La séquence IS ne semble pas être impliquée dans cette interaction. Son rôle moléculaire est inconnu. Or plusieurs évidences biochimiques suggèrent la possibilité que la région RIR de CNK puisse agir comme un pseudosubstrat dans le but de réguler la phosphorylation de MEK par RAF. Cependant, aucune structure cristallographique n'est actuellement disponible pour valider cette hypothèse. Certains comportements peuvent par contre être pris en considération pour qualifier la région RIR de pseudosubstrat potentiel (Kobe and Kemp, 1999). Ces comportements avaient initialement été décrits par différentes approches biochimiques. D'abord, l'utilisation d'un peptide

synthétique correspondant à la séquence de régulation négative doit agir comme inhibiteur. À l'inverse, la délétion de cette séquence doit prévenir la répression. D'après ces observations, il semble que la région RIR de CNK se comporte ainsi. En effet, la surexpression du RIR fusionnée à GFP peut en soi inhiber l'activation de MAPK induite par Ras^{V12}. La mutation du RIM ou de la séquence IS renverse par contre cette inhibition (Figure 2.4C). CNK est de plus incapable d'interagir avec un mutant de RAF dont l'activité catalytique a été détruite. Par conséquent, à la lumière de ces informations, il est possible de suggérer que CNK puisse réguler négativement la phosphorylation de MEK par RAF en agissant comme un pseudosubstrat.

Le fait que la région RIR soit composée de deux éléments conjointement requis pour médier l'inactivation du module MAPK n'est pas étonnant. En effet, certaines analyses cristallographiques ont montré que la liaison d'une séquence d'autorégulation négative au site actif d'une enzyme n'est pas toujours suffisante pour stabiliser la conformation inactive du domaine catalytique (Taylor and Radzio-Andzelm, 1997). Une séquence additionnelle généralement en position adjacente, serait également requise. Elle serait impliquée dans la liaison d'une région située en périphérie du site actif de l'enzyme. La protéine neuronale N-WASp impliquée dans la régulation de la polymérisation de l'actine en est un exemple (Bompard and Caron, 2004). En effet, cette dernière contient deux motifs respectivement appelés GBD (« G protein binding/switching domain ») et B (« basic motif »), qui maintiennent le complexe nécessaire à l'initiation de la polymérisation dans une conformation fermée et inactive. Étonnamment, ces domaines sont incapables d'inhiber la polymérisation lorsqu'ils sont individuellement exprimés. Par contre, l'expression du segment B-GBD inhibe en trans avec efficacité, suggérant ainsi que le mécanisme de régulation négative dépend d'une région à deux composantes (Kim et al., 2000; Prehoda et al., 2000). Ces résultats s'apparentent significativement à ceux obtenus suivant l'expression de la fusion GFP-RIR de CNK (Figure 2.4C). Fait intéressant, la PKA et la protéine kinase twitchin sont également caractérisées par un tel mécanisme de régulation à double composante (Gibson et al., 1997; Kobe et al., 1996). Ces résultats laissent donc présager que la région RIR de CNK puisse réguler négativement l'activité catalytique de RAF par un mécanisme moléculaire qui semble relativement récurrent. Une

analyse cristallographique du complexe RIR/RAF sera cependant nécessaire pour confirmer le mécanisme d'action du RIR.

L'utilisation d'un pseudosubstrat n'est pas le seul mécanisme moléculaire permettant de moduler négativement l'activité enzymatique d'une protéine (Kobe and Kemp, 1999; Taylor and Radzio-Andzelm, 1997). Il semble que mimer l'adénine de l'ATP soit également une stratégie adoptée par différentes protéines pour empêcher l'accès du nucléotide et ainsi prévenir la catalyse. À titre d'exemple, l'inhibiteur p27^{Kip1} contient un résidu tyrosine qui s'intercale dans la pochette de liaison de l'ATP de la protéine kinase Cdk2. Cette tyrosine établit différents contacts dont l'un avec la lysine invariable du sous-domaine II. Ces associations ont pour effet d'altérer le positionnement adéquat du « G-loop », ce qui par conséquent prévient la coordination adéquate du nucléotide (Russo et al., 1996). Il semble que le récepteur à l'insuline soit également régulé de cette façon. La phosphorylation de son résidu tyrosine permet cependant de libérer l'accès au nucléotide suivant un changement conformationnel (Hubbard, 1997). Serait-il possible que la région RIR de CNK puisse également contrôler l'accès du nucléotide puisque sa séquence IS est caractérisée par un résidu tyrosine (Y1085) qui est conservé chez *A. gambiae*? La synthèse d'un peptide phosphorylé permettrait de répondre à cette question. En effet, nous avons montré que le RIR a la capacité d'inhiber la phosphorylation de MAPK par Ras^{V12}. Une mutation dans la séquence IS, qui perturbe entre autres la Y1085, prévient par contre cette inactivation (Figures 2.3D et 2.3E). Est-ce que l'utilisation d'un peptide préalablement phosphorylé en position 1085 permettrait également d'éviter l'inactivation du module MAPK? Si tel est le cas, le mécanisme d'action de la séquence IS serait peut-être d'inhiber la phosphorylation de MEK par RAF en intercalant potentiellement son résidu tyrosine dans le site actif de RAF. Il n'est cependant pas exclu que cette tyrosine puisse agir ailleurs en désorientant par exemple certains résidus responsables du positionnement adéquat des différents acides aminés impliqués dans la réaction de phosphotransfert. Les récepteurs tyrosine kinases semblent être ainsi régulés. En effet, leur mécanisme d'auto-inhibition fait appel à une région juxtamembranaire non catalytique qui réprime l'activité enzymatique sans toutefois s'insérer dans le site actif. Elle exerce plutôt son effet par l'intermédiaire d'un changement conformationnel qui peut cependant être renversé par la phosphorylation

de certains résidus tyrosines (Huse and Kuriyan, 2002). Ce changement conformationnel résulte de l'association entre la région juxtamembranaire et l'hélice αC du N-lobe. Cette liaison altère d'une part le positionnement du « G-loop » et d'autre part prévient l'interaction de la lysine invariable du sous-domaine II au glutamate du sous-domaine III. Cette distorsion a pour conséquence d'empêcher la coordination adéquate des groupements phosphates de l'ATP (Wybenga-Groot et al., 2001). De façon similaire, la région RIR de CNK pourrait désorienter, suivant son association à RAF, certains résidus dans le but de modifier l'organisation tridimensionnelle du domaine kinase de RAF. Il existe donc différentes façons de réguler négativement l'activité d'une protéine. Il est à noter que la localisation subcellulaire et l'association d'un régulateur négatif additionnel (phosphatase par exemple) pourraient également favoriser l'inactivation de RAF par CNK sans pour autant perturber directement l'organisation structurale du domaine kinase de RAF.

4.2.2. Désengagement de la région RIR par Src42

Les différents mécanismes moléculaires permettant de réguler négativement l'activité catalytique d'une enzyme peuvent également être modulés. La phosphorylation, la protéolyse, l'association d'un activateur ou d'un ligand peuvent renverser ce processus d'inactivation. Ces événements assurent, entre autres, l'induction d'un changement conformationnel qui altère l'organisation structurale du domaine catalytique dans le but de réorienter adéquatement les différents résidus requis lors de la réaction enzymatique et ainsi restaurer la fonction de la protéine (Kobe and Kemp, 1999; Krupa et al., 2004). Alors, quel pourrait être le mécanisme moléculaire permettant d'inhiber l'effet répresseur exercé par la région RIR de CNK sur le domaine kinase de RAF?

CNK endogène est phosphorylée en tyrosine suivant la stimulation des RTKs, une phosphorylation qui d'ailleurs coïncide avec l'activation de MAPK (Laberge et al., 2005) (voir annexe 1). La région entourant la tyrosine 1163 (Y1163), positionnée en aval du RIR, serait essentielle non seulement pour assurer la phosphorylation en tyrosine de CNK, mais également pour garantir l'accomplissement de sa fonction. D'ailleurs, plusieurs allèles perte de fonction de CNK isolés lors d'un crible KSR-dépendant contiennent des mutations ponctuelles dans cette région (Therrien et al., 1998). De façon similaire, la mutation de la

Y1163 est incapable de renverser la létalité associée à des allèles perte de fonction de CNK dans l'animal. La mutation concomitante de la séquence IS peut par contre restaurer la viabilité. Ces résultats suggèrent que la mutation de la Y1163 amplifie le potentiel inhibiteur du RIR qui peut cependant être contrecarré par la mutation de la séquence IS. Ainsi il a été émis comme hypothèse que la région Y1163 de CNK puisse être impliquée dans la régulation négative du RIR suivant l'intégration d'un signal en provenance des RTKs. Or il semble que la protéine tyrosine kinase cytoplasmique Src42 puisse spécifiquement s'associer à la région Y1163, entre autres, par l'intermédiaire de son domaine SH2. Cette interaction requiert cependant la phosphorylation préalable de la Y1163 médiée soit par le récepteur, soit par une kinase non identifiée. Src42 ne génère pas son propre site d'ancrage puisque sa déplétion par RNAi n'empêche pas la phosphorylation de la Y1163 d'avoir lieu suivant la stimulation du récepteur. Selon le modèle, l'association de Src42 pourrait désinhiber la région RIR de CNK en induisant potentiellement un changement conformationnel qui permettrait par exemple de réorienter la séquence IS de CNK dans le but de libérer l'accès du site actif de RAF aux molécules substrats et/ou aux nucléotides. Curieusement, la régulation négative du RIR ne dépend pas de l'activité kinase de Src42. En effet, la simple expression de la portion NT de Src42, caractérisée par ses domaines SH2 et SH3, peut restaurer l'activation de MAPK induite par le récepteur Sev^{S11} (Laberge et Therrien, donnée non publiée). La mutagenèse des domaines SH2 ou SH3 de Src42 perturbe néanmoins cette activation. Il est intéressant de mentionner que Ras n'influence en aucun cas les effets médiés par Src42. En effet, sa déplétion par RNAi n'empêche pas la phosphorylation de CNK en tyrosine, ni l'association de Src42 à la région Y1163 de CNK (Laberge et al., 2005) (voir annexe 1). Ces événements sont par contre dépendants du RTK. Par conséquent CNK semble intégrer deux signaux distincts, mais conjointement requis pour assurer la phosphorylation de MEK par RAF. La portion NT de CNK serait essentielle à l'intégration d'un signal Ras alors que sa portion CT permettrait d'intégrer un signal Src42. Cette régulation permettrait d'offrir une certaine spécificité en aval des RTKs. En effet, seuls ceux ayant la capacité d'induire à la fois Ras et Src42 pourront activer le module MAPK associé à CNK.

4.2.3. Implication du RIR dans l'activation de RAF?

La plupart des séquences impliquées dans la régulation négative d'un domaine catalytique semblent également être requises lors et/ou suivant le processus d'activation de ce domaine (Taylor and Radzio-Andzelm, 1997). La région juxtamembranaire d'un RTK par exemple serait, entre autres, impliquée dans la stabilisation de la conformation active du domaine tyrosine kinase (Hubbard, 2002; Huse and Kuriyan, 2002). Chez la MAPK ERK2, la tyrosine qui obstrue le site actif doit être phosphorylée non seulement pour libérer l'accès, mais également pour induire l'activation du domaine kinase de ERK2 par modification conformationnelle puisque cette tyrosine est l'un des deux résidus essentiels localisés dans la boucle d'activation (Canagarajah et al., 1997; Zhang et al., 1994). Le domaine GBD de N-WASp assure quant à lui la liaison de la petite GTPase Cdc42 sous sa forme GTP liée, alors que le motif B interagit avec le PIP₂. Dans les deux cas, ces associations sont essentielles pour initier la polymérisation de l'actine (Rohatgi et al., 2000). À la lumière de ces informations, serait-il possible que le RIR de CNK soit également requis pour assurer l'activation de RAF et/ou le maintien de son activité catalytique? Selon les résultats obtenus en surexpression (Figures 2.3D, 2.4A, 2.4C, S2.1, 2.5), il semble que le RIR de CNK soit négligeable puisque sa mutagenèse accentuée systématiquement la signalisation Ras. Curieusement, nous avons obtenu des résultats contradictoires concernant l'importance de l'association CNK^{RIM}/RAF lorsque nous avons évalué d'un point de vue physiologique la pertinence fonctionnelle du RIM et de la séquence IS. Pour ce faire, nous avons utilisé deux approches complémentaires, l'une biochimique et l'autre génétique. Ces approches évaluaient la capacité des mutants de la région RIR à renverser ou non le phénotype associé à une perte de fonction de CNK. Cette perte de fonction se traduisait soit par l'incapacité de Ras^{V12} à activer MAPK dans un système de cellules en culture (Figure 2.6B), soit par la létalité chez la mouche (Table 3.I). Nous avons ainsi constaté que la phosphorylation de MAPK pouvait être restaurée suivant l'expression du mutant CNK^{RIM} à de faibles niveaux de concentrations (Figure 2.6B). Par contre, sous le contrôle de son promoteur endogène, le mutant RIM était incapable de renverser la létalité associée à une perte de fonction de CNK, démontrant ainsi l'importance de l'association CNK^{RIM}/RAF pour assurer la viabilité de la mouche (Table 3.I). Plusieurs

hypothèses peuvent expliquer cette contradiction. La surexpression de Ras dans les cellules S2 pourrait être l'une de ces hypothèses. En effet, le niveau d'expression de Ras^{V12} dépasse largement sa concentration physiologique, ce qui par conséquent pourrait favoriser l'activation de RAF indépendamment de son association à CNK. Si par exemple CNK participe au recrutement normal de RAF à la membrane plasmique par l'intermédiaire d'une association RIM/RAF suivant l'activation de la voie de signalisation, il est possible que la surexpression de Ras^{V12} puisse contrecarrer cette nécessité. La mutation du RIM se traduirait par conséquent en une coopération qui résulterait d'une part par la désinhibition du RIR et d'autre part par de l'intégration du signal Ras par la portion NT de CNK. Selon ce modèle, la région RIR pourrait donc avoir deux impacts. Le premier serait d'inhiber la phosphorylation de MEK par RAF. Le second, qui dépend dans ce cas-ci du RIM, pourrait permettre le recrutement de RAF à la membrane plasmique suivant l'activation de la voie (KSR serait par le même relocalisée à la membrane puisqu'elle interagit avec le domaine SAM de CNK). Dans l'animal, l'association CNK/RAF prend tout son sens puisque le recrutement de RAF à Ras est essentiel à son activation. Ras, dans ce cas-ci, est en quantité insuffisante pour contrecarrer le besoin d'une relocalisation membranaire de RAF, ce qui par conséquent ne permet pas de renverser la létalité associée à une perte de fonction de CNK. Fait intéressant, le recrutement membranaire de RAF endogène par CNK a déjà été démontré chez la drosophile (Anselmo et al., 2002). Par conséquent, il est possible de croire que l'association CNK^{RIM}/RAF puisse être une étape essentielle menant vers l'activation de RAF. Il faudrait cependant refaire l'essai de complémentation dans les cellules d'insectes en réduisant davantage la concentration de Ras^{V12}. À faible concentration, CNK^{RIM} mutant devrait se comporter comme une perte de fonction.

Outre la relocalisation membranaire, CNK pourrait également être impliquée dans la stabilisation de la conformation active du domaine kinase de RAF par l'intermédiaire de son motif RIM. L'importance de cette régulation fine pourrait être négligeable suivant la surexpression d'une forme oncogénique de Ras. La cristallographie du complexe en condition activée pourrait fournir des informations pertinentes. Il n'est cependant pas exclu que le RIM puisse lier autre chose qui soit requis au cours du développement de la mouche, mais qui ne dépend pas de l'activation de MAPK. Chez les mammifères par exemple, RAF

peut inhiber l'apoptose en inactivant par phosphorylation le facteur proapoptotique BAD. CNK pourrait par exemple assurer le recrutement de RAF à la mitochondrie dans le but de lui permettre d'effectuer sa fonction antiapoptotique.

4.2.4. Analyse du mécanisme d'action de Src sur l'activation de RAF

Chez les mammifères, la phosphorylation de la Y341 de C-RAF par Src est l'une des étapes essentielles menant vers l'activation du domaine kinase de C-RAF. En effet, cette phosphotyrosine assure, de concert avec la phosphosérine 338, l'inhibition du mécanisme d'autorégulation négative exercé par la région NT de C-RAF sur son domaine kinase (Tran and Frost, 2003; Wellbrock et al., 2004). Ces phosphorésidus, tous deux positionnés dans la « N-region », seraient également impliqués dans la réorientation de l'hélice α C du domaine kinase de C-RAF dans le but d'aligner correctement les différents résidus requis pour promouvoir son activation. Sans cette phosphorylation, la « N-region » pourrait favoriser certaines interactions intramoléculaires qui favoriseraient la conformation inactive du domaine kinase de C-RAF (Mason et al., 1999). B-RAF et RAF de drosophile (DRAF) ne possède aucun résidu analogue à la Y341 de C-RAF. Elles ont plutôt respectivement en position équivalente un aspartate (D448) et une asparagine (N421), laissant ainsi présager que le mécanisme de régulation de C-RAF puisse avoir divergé au cours de l'évolution (Chong et al., 2001; Marais et al., 1997). B-RAF et DRAF pourraient par contre être potentiellement issus du même gène ancestral. Leur régulation pourrait être similaire. Or quels sont les mécanismes moléculaires qui permettraient à B-RAF et à DRAF d'ouvrir leur conformation? Les études réalisées au laboratoire ont en fait permis de proposer que Src42 de Drosophile puisse avoir la capacité de moduler l'activité kinase de DRAF par l'intermédiaire d'un mécanisme d'action indirect qui nécessiterait l'intervention de CNK. Suite à l'activation des RTKs, Ras-GTP pourrait s'associer à DRAF pour ensuite favoriser le déplacement de 14-3-3 dans le but d'induire, suivant la déphosphorylation du résidu S259 équivalent, un changement conformationnel qui faciliterait la première ouverture de DRAF. La phosphorylation de la S338 équivalente, couplée aux charges négatives générées par deux acides glutamiques également positionnés dans la « N-region », pourrait potentiellement participer à la stabilisation de cette nouvelle

conformation adoptée par DRAF, permettant par conséquent de contrecarrer l'effet d'autorépression exercé par sa portion NT. La région RIR de CNK pourrait participer à cette stabilisation suivant la liaison de Src42 à la région Y1163 de CNK. Le RIR pourrait mimer les effets normalement accomplis suivant la phosphorylation de la Y341 de C-RAF. En effet, suivant l'association de Src42, CNK pourrait subir un changement conformationnel qui permettrait d'une part d'inhiber la fonction négative du RIR et d'autre part de favoriser l'établissement de nouveaux points de contact entre DRAF et le motif RIM de CNK dans le but d'augmenter la stabilité structurale de DRAF. La séquence IS pourrait par contre être réorientée dans le but d'éviter tout effet négatif durant l'activation de DRAF (Figure 4.1). D'ailleurs dans un essai de sauvegarde de la viabilité chez la mouche, la mutation de la séquence IS peut très bien renverser la létalité associée à une perte de fonction de CNK, contrairement à une mutation dans le RIM (Table 3.I) (Douziech et al. 2005). Les nouveaux points de contact du RIM pourraient par le fait même assurer par exemple la réorientation des différents résidus de DRAF nécessaires à la liaison du substrat MEK dans le but de faciliter suivant l'activation de DRAF, le transfert du phosphate. Ces nouveaux points de contact pourraient également favoriser la réorientation de l'hélice α C du domaine kinase de DRAF. KSR permettrait quant à elle d'exposer les sites de phosphorylation de la boucle d'activation de DRAF nécessaire à son activation maximale, en prévenant par modification allostérique certaines interactions intramoléculaires (discuté à la section 4.1.4, page 176). Il n'est cependant pas exclu que la région RIR de CNK puisse favoriser, toujours suivant la liaison de Src42, la stabilisation de la conformation de DRAF par l'intermédiaire d'une oligomérisation. Selon certains programmes informatiques, il semblerait que la région RIR de CNK puisse former une structure de type coiled-coil qui serait capable de se multimériser (Burkhard et al., 2001; Kammerer, 1997). Cette oligomérisation pourrait par le fait même rapprocher deux molécules de DRAF et ainsi faciliter l'établissement d'un pont intermoléculaire entre deux 14-3-3 toujours associées aux phosphosérines 621 équivalentes. KSR aurait alors accès aux domaines kinases de DRAF pour médier ses effets positifs. Par conséquent, l'implication de Src42 dans l'activation de RAF de drosophile serait dépendante de son association à CNK. Est-ce que ces événements moléculaires pourraient également contribuer au processus d'activation de B-RAF? Aucune étude n'est actuellement disponible pour

supporter cette hypothèse. La caractérisation du mécanisme d'action de CNK de mammifères au sein du processus d'activation de la voie Ras/MAPK est encore à ses premiers balbutiements. Selon l'homologie de séquence, la région RIR de CNK n'est pas conservée chez ses homologues mammifères. Pourtant diverses études démontrent la capacité de CNK (humain et rat) à interagir spécifiquement avec C-RAF et dans certains cas avec B-RAF, suggérant ainsi la possibilité que la région d'interaction de RAF sur CNK ait divergé au cours de l'évolution (Lanigan et al., 2003; Yao et al., 2000; Ziogas et al., 2005). La fonction régulatrice du RIR pourrait être conservée malgré cette divergence. D'ailleurs, la surexpression de la forme humaine de CNK2A inhibe la signalisation MAPK contrairement à la surexpression de sa portion NT (Lanigan et al., 2003). Cette inhibition pourrait être le résultat d'une séquence caractérisée par une fonction similaire au RIR de CNK de drosophile. D'autres analyses seront nécessaires pour cartographier la région inhibitrice de CNK2A et ainsi vérifier si cette répression est causée par une titration de RAF. Il est intéressant de mentionner que la phosphorylation de C-RAF par Src semble être facilitée par l'activité d'échafaudage de CNK1 (Ziogas et al., 2005).

4.2.5. Modification conformationnelle de CNK

L'étude du mécanisme d'action de la protéine d'échafaudage Ste5 dans l'activation de la voie de signalisation MAPK chez *S. cerevisiae* peut nous aider à proposer certaines hypothèses concernant la manière dont CNK pourrait influencer le processus d'activation de RAF. De façon générale, Ste5 détermine la spécificité de la signalisation grâce à sa capacité à recruter à proximité les différentes composantes du module MAPK (Ste11, Ste7 et Fus3). Or il semble selon une étude réalisée par Sette et ses collègues que le rôle de Ste5 au sein de la cascade de signalisation soit plus qu'une simple activité d'échafaudage (Sette et al., 2000). En effet, Ste5 faciliterait la phosphorylation de Ste11 par Ste20 suivant l'activation du récepteur à phéromones en assurant au moyen d'un changement conformationnel l'accessibilité de Ste11. Ce changement conformationnel permettrait également de réorienter adéquatement les différentes composantes du module MAPK dans le but de favoriser la transmission du signal par phosphorylation successive. L'association du complexe $G\beta\lambda$ ($G\beta$ /Ste4, $G\lambda$ /Ste18) à Ste5 induirait cette modification conformation-

nelle. À la lumière de ces informations, serait-il possible que le complexe CNK/HYP/KSR/RAF/MEK soit maintenu dans une conformation inactive en absence d'un signal en provenance des RTKs? L'organisation tridimensionnelle adoptée par CNK en condition non stimulée pourrait empêcher l'activation inappropriée de RAF par KSR en modulant respectivement leur accessibilité. Suivant l'activation des RTKs, l'association de Src42 à la région Y1163 de CNK pourrait à l'inverse induire un changement conformationnel qui permettrait d'une part de désengager le RIR de CNK, et d'autre part de favoriser le rapprochement entre KSR et RAF. MEK pourrait être simultanément réorientée dans une position compatible avec la catalyse. Le rapprochement entre KSR et RAF serait nécessaire au processus d'activation de RAF sans toutefois être suffisant puisque CNK doit également intégrer un signal Ras par sa portion NT. Fait intéressant, cette réorganisation tridimensionnelle du complexe CNK/HYP/KSR/RAF/MEK suivant l'activation de la voie n'est pas sans rappeler le mécanisme moléculaire permettant l'activation des récepteurs EpoR déjà oligomérisés en condition inactive avec les protéines tyrosine kinases Jak2 (Jiang and Hunter, 1999). En effet, les domaines intracellulaires des deux récepteurs EpoR doivent subir une réorientation suivant l'association du ligand dans le but de rapprocher à proximité les deux molécules Jak2 pour faciliter leur transphosphorylation. Ainsi, pour valider l'importance de Src42 dans la réorganisation tridimensionnelle de CNK, une analyse cristallographique du complexe CNK/HYP/KSR/RAF/MEK en présence ou en absence de la portion NT de Src42 serait idéale. Nous pourrions également déterminer si l'association entre les portions NT de KSR et de RAF peut être accentuée suivant l'expression de Src42^{NT}. Nous pourrions vérifier si suivant l'association de Src42 à la région Y1163 de CNK^{CT}, CNK^{NT} arrive à se complexer avec CNK^{CT}, permettant par le fait même de rapprocher KSR et RAF. Ce mode d'action est d'ailleurs celui qui permettrait à Ste5 de rapprocher Ste11 et Ste20 (Sette et al., 2000). Il est intéressant de mentionner que l'induction d'un changement conformationnel suivant l'association des domaines SH3 et SH2 de Src ne serait pas unique à CNK. En effet, il semble que la conformation de la sous-unité catalytique de la phosphodiesterase PDE4 puisse être modifiée suivant l'association du domaine SH3 de Lyn, laquelle est une tyrosine kinase de type Src (SFKs) chez les mammifères (McPhee et al., 1999).

4.3. Rôle de la fonction « bimodale » de CNK

D'après nos études, CNK serait un régulateur de la voie de signalisation Ras/MAPK dont le mécanisme d'action serait caractérisé par des effets antagonistes. En quiescence, CNK pourrait prévenir l'activation inappropriée de MEK par RAF en maintenant, de concert avec 14-3-3, RAF sous sa forme inactive. Suivant la stimulation de Ras, CNK^{NT} pourrait intégrer le signal et se convertir en régulateur positif de la voie dans le but d'initier le processus d'activation de RAF. CNK aurait ainsi une fonction à action « bimodale » lui permettant de moduler l'activation de la voie Ras/MAPK en tout temps (Douziech et al., 2003). Or quel est l'intérêt d'avoir une telle capacité? Une possibilité serait que CNK s'assure que l'activation de RAF mène spécifiquement à l'induction d'une réponse biologique particulière en contrôlant le moment et l'endroit d'activation. D'une part elle maintient le flot de signalisation à un niveau basal en absence d'un stimulus et d'autre part elle permet la transmission de l'information suivant l'intégration de deux signaux distincts conjointement requis (Ras et Src42). Cette régulation offre de la spécificité en aval des RTKs puisque seuls ceux capables d'induire à la fois Ras et Src42 pourront initier l'activation de RAF associée à CNK.

CNK n'est pas la seule molécule à exercer une fonction à action « bimodale » au sein d'une voie de signalisation. En effet, il semble que la forme humaine de Sprouty en ait la capacité (Egan et al., 2002). Sa portion NT amplifierait l'activation de MAPK induite par le récepteur EGF, alors que son domaine riche en cystéines localisé en CT l'inhiberait. La protéine d'échafaudage Costal-2 (Cos2) est un autre exemple. En effet, en absence d'une stimulation par Hedgehog (Hh), Cos2 préviendrait la transmission du signal en séquestrant dans le cytoplasme le facteur de transcription cubitus interruptus. Suivant l'activation de la voie, Cos2 pourrait favoriser sa libération (Kalderon, 2004; Lum et al., 2003).

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

Plusieurs mutants de la boucle effectrice de Ras ont été générés dans le but d'étudier la spécificité d'action relative aux différents effecteurs avec lesquels Ras interagit (White et

al., 1995). Ces mutations permettent d'abolir sélectivement certaines associations. Le mutant H-Ras^{T35S} par exemple n'est plus en mesure d'interagir avec PI3K et Ral-GDS, par contre son association à RAF n'est pas perturbée. Contrairement à la liaison de Ral-GDS, le mutant H-Ras^{E37G} est incapable d'établir de contacts avec RAF et PI3K. H-Ras^{Y40C} voit, quant à elle, son association à PI3K être privilégiée comparativement aux deux autres. Couplés à une mutation de la glycine 12 en valine, ces mutants de la boucle effectrice deviennent constitutivement activés et permettent d'induire sélectivement l'activation des différentes voies de signalisation normalement contrôlées par Ras de type sauvage.

La surexpression de CNK^{NT} dans l'œil de la mouche amplifie fortement le phénotype induit par Ras^{V12G37}, sans toutefois affecter ceux induits par Ras^{V12S35} et Ras^{V12C40} (Therrien et al., 1999). Cette coopération pourrait être causée par la participation de CNK dans une voie de signalisation MAPK-indépendante. Cette amplification pourrait également être le résultat d'une synergie entre la voie MAPK et la voie Ral. D'ailleurs, une telle synergie a déjà été rapportée chez les mammifères (Urano et al., 1996). Le fait qu'une mutation perte de fonction dans le gène *mapk* réprime la coopération, sans toutefois perturber la rugosité de l'œil résultant de la simple surexpression de Ras^{V12G37}, réfute l'implication de CNK^{NT} dans une voie MAPK-indépendante. Ras^{V12G37} peut d'ailleurs induire légèrement l'activation de MAPK lorsqu'elle est surexprimée dans les cellules S2 (Therrien et al., 1999). Par contre, CNK^{NT} est incapable d'accentuer le phénotype Ras^{V12S35} résultant d'une suractivation de la voie MAPK. Ce résultat laisse donc présager que la coopération découle d'événements divers qui requièrent non seulement l'association de RAF, mais également la participation d'effecteur(s) additionnel(s) (Therrien et al., 1999).

L'essai fonctionnel basé sur l'état d'activation de MAPK nous a permis de vérifier biochimiquement si CNK^{NT} donnait à Ras^{V12G37} la possibilité d'augmenter significativement la signalisation MAPK (Figure 2.2D). Nous avons d'abord confirmé par immunoprécipitation l'incapacité de ce mutant à interagir avec RAF. Or la coexpression de CNK^{NT} permet de restaurer légèrement cette association qui se traduit d'ailleurs par une élévation de la phosphorylation de MAPK. Cette phosphorylation dépend de RAF puisque son élimination par RNAi abolit complètement cette activation (Douziech et Therrien, données non publiées). Ces résultats suggèrent que la coopération entre Ras^{V12G37} et

CNK^{NT} dans l'œil de la mouche résulte en partie de l'activation de la voie MAPK suivant la restauration partielle de l'association Ras^{V12G37}/RAF par CNK^{NT}. Cette coopération nécessite au minimum l'activation d'un effecteur additionnel par Ras puisque le mutant Ras^{V12S35} est incapable de collaborer avec CNK^{NT}. Cet effecteur pourrait fonctionner dans la voie Ral. D'ailleurs l'homologue humain de CNK (hCNK2) est capable d'interagir spécifiquement avec une Ral-GEF, appelée Rlf, de même qu'avec la petite GTPase Ral. Son mécanisme d'action au sein de cette voie n'a cependant pas été caractérisé (Lanigan et al., 2003). Parallèlement, hCNK1 peut s'associer à Ral-GDS, une GEF également spécifique pour la GTPase Ral (Jaffe et al., 2004).

Outre la voie Ral, il semble que le mutant H-Ras^{V12G37} puisse spécifiquement induire l'activation d'effecteurs additionnels (Hingorani and Tuveson, 2003). RIN (Cox and Der, 2003), PLC ϵ (Cullen, 2001) et NORE (Khokhlatchev et al., 2002) en sont des exemples. Or hCNK1 a la capacité d'interagir, par l'intermédiaire de ses domaines CRIC et PDZ, avec le suppresseur de tumeur RASSF1A (Rabizadeh et al., 2004). Ce dernier complexé à NORE1 et MST induit la mort cellulaire, un processus qui peut d'ailleurs être davantage accentué suivant l'expression de hCNK1. Curieusement, l'expression de la portion NT de hCNK1 peut contrecarrer le phénomène d'apoptose induit soit par le complexe hCNK1/RASSF1A/NORE/MST, soit par Ki-Ras^{V12}. Ce résultat suggère la possibilité que hCNK1^{NT} puisse titrer RASSF1A et ainsi inhiber le mécanisme proapoptotique. Est-il possible que le phénotype issu de la coopération entre Ras^{V12G37} et CNK^{NT} soit le résultat d'une activation de la voie MAPK accompagnée d'une inhibition concomitante d'un mécanisme proapoptotique? Hippo est l'équivalent de MST chez la mouche et semble impliquée dans la régulation de l'apoptose au cours du développement de l'œil (Harvey et al., 2003; Wu et al., 2003). CNK^{NT} pourrait par exemple inhiber son mécanisme d'action en le titrant soit directement, soit indirectement, par l'intermédiaire d'une liaison à l'un de ses partenaires Salvador ou Warts. Cette titration permettrait ainsi d'obtenir un accroissement du nombre de cellules dans l'œil qui, couplé à une activation de la voie MAPK, se traduirait en une augmentation de la rugosité. Différentes approches expérimentales permettront d'adresser cette hypothèse.

Il semble que la déplétion de Src42 par RNAi réduit considérablement la phosphorylation globale de CNK suivant l'activation du récepteur Sevenless (Laberge et al., 2005). La répercussion fonctionnelle de cette phosphorylation médiée par Src42 ne semble toutefois pas être pertinente au processus d'activation de la voie Ras/MAPK. Cependant, il est possible de proposer que ces sites puissent permettre le recrutement de molécules additionnelles agissant dans d'autres voies de signalisation. CNK pourrait potentiellement servir de plate-forme moléculaire orchestrant différentes cascades de signalisation dans le but de répondre adéquatement aux signaux externes et ainsi permettre l'induction d'une réponse biologique appropriée.

4.5. Intervention thérapeutique

La tumorigenèse chez l'humain est un processus multifactoriel au cours duquel différentes altérations génétiques vont progressivement transformer une cellule saine en cellule cancéreuse (Hanahan and Weinberg, 2000). Cette transformation semble dans certains cas corrélée avec une suractivation de la voie Ras/MAPK (Fang and Richardson, 2005; Reddy et al., 2003). En effet, cette suractivation permettrait aux cellules tumorales d'acquies certaines caractéristiques avantageuses dont la capacité à proliférer indépendamment des facteurs de croissance, à promouvoir la survie cellulaire et favoriser l'invasion des tissus environnants (Figure 4.2). Par exemple, l'activation soutenue de MAPK favorise l'expression de métalloprotéinases particulières qui seraient responsables de la dégradation de la matrice extracellulaire nécessaire au processus métastatique. MAPK activée peut également phosphoryler le facteur proapoptotique BAD dans le but de l'inactiver et ainsi prévenir l'induction de l'apoptose (Ready et al., 2003). L'intérêt de développer des outils thérapeutiques permettant d'inhiber spécifiquement la voie Ras/MAPK s'est accentué au cours des deux dernières décennies dans l'espoir d'inhiber ou du moins contrôler la progression tumorale. Les oncologistes ont déjà à leur disposition plusieurs agents antitumoraux capables de réprimer la signalisation Ras en inhibant par exemple certains récepteurs à facteurs de croissance (Thompson and Lyons, 2005).

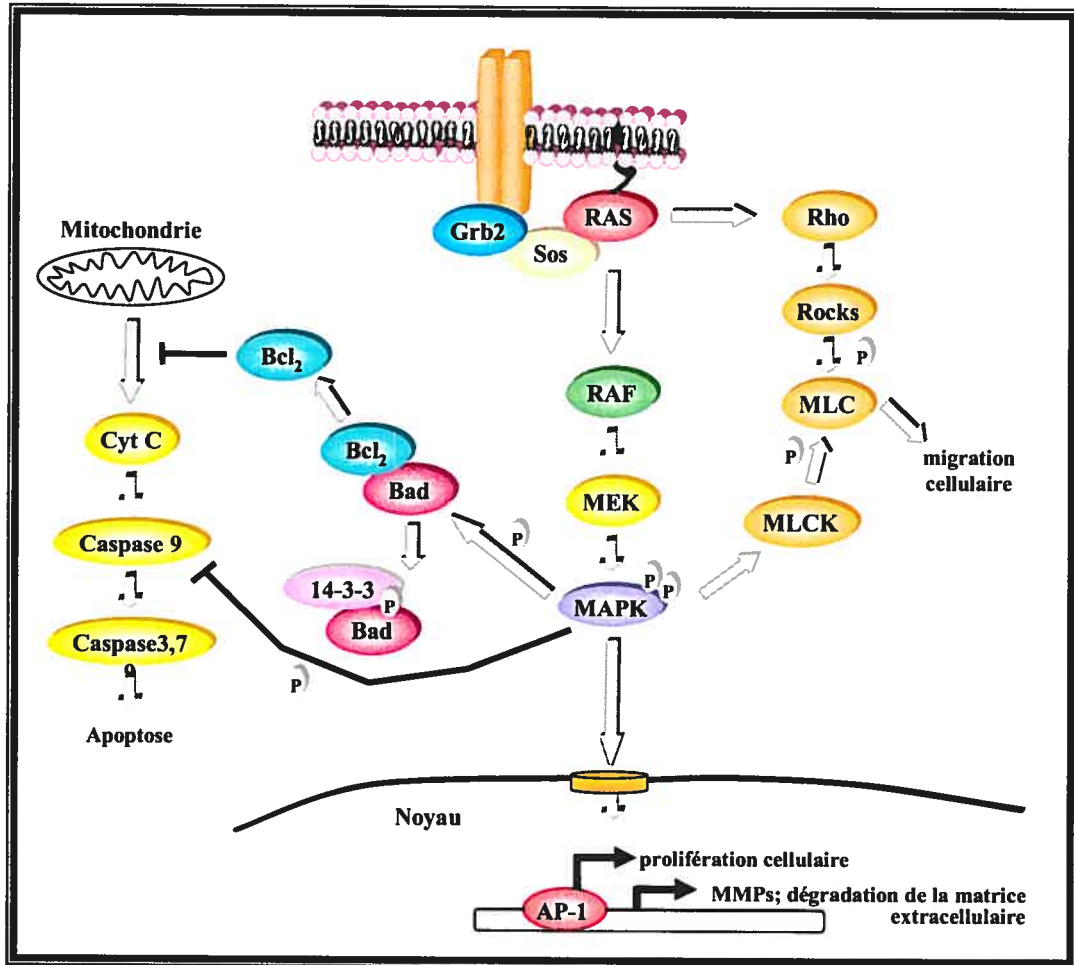


Figure 4.2 Implication de la voie Ras/ERK dans divers processus biologiques associés au cancer. Schéma adapté de Reddy et al., 2003

D'autres ont été générés dans le but de s'attaquer directement à Ras (Adjei, 2001; Mazieres et al., 2004). Des efforts considérables ont également été déployés dans le but de synthétiser différents inhibiteurs spécifiquement dirigés contre RAF et MEK (Sebolt-Leopold and Herrera, 2004). KSR pourrait être une cible thérapeutique de choix puisque la réduction de son niveau d'expression atténue significativement la progression tumorale induite par une forme oncogénique de Ras au niveau de la peau, du poumon et du pancréas chez la souris (Lozano et al., 2003; Xing et al., 2003). L'utilisation d'un oligonucléotide antisens dirigé contre le domaine CA1 de KSR est présentement évaluée en phase clinique (Xing et al., 2003). Cet agent pharmacologique est d'autant plus intéressant, compte tenu du fait que KSR facilite non seulement la phosphorylation de MEK par RAF, mais semble également favoriser l'activation de RAF par modification allostérique chez la mouche. Son potentiel thérapeutique pourrait donc être considérable puisque RAF participe également à la survie cellulaire indépendamment de sa capacité à induire la phosphorylation de MEK. CNK pourrait également être un excellent candidat dans le but de générer certains agents pharmacologiques. En effet, elle possède différentes propriétés fonctionnelles qui lui permettent de réguler avec efficacité l'activation de RAF. Sa région RIR pourrait d'ailleurs lui permettre d'être qualifiée en tant que potentiel suppresseur de tumeurs puisque sa surexpression (GFP-RIR) prévient l'activation de MAPK induite par Ras^{V12} (Figure 2.4). Cette suppression est également notable suivant l'activation de la voie par RAF activée (RAF^{ED}) (Douziech et Therrien, données non publiées). Ces résultats laissent donc présager que l'utilisation du RIR comme outil thérapeutique pourrait potentiellement perturber la prolifération tumorale associée à une suractivation de la voie Ras/MAPK. Les domaines SAM et CRIC de CNK pourraient également être ciblés dans le but de générer des inhibiteurs capables de neutraliser leur mécanisme d'action respectif. Cibler la région CRIC pourrait avoir des répercussions thérapeutiques intéressantes. Outre son impact dans la voie Ras/MAPK, cette région aurait la capacité d'interagir entre autres avec certaines composantes de la voie Rho, laquelle est potentiellement impliquée dans l'invasion des cellules cancéreuses (Jaffe et al., 2004; Jaffe et al., 2005; Ridley, 2004). D'après les résultats obtenus chez la mouche, la protéine HYP pourrait également être une cible thérapeutique intéressante. Son élimination à l'aide d'un oligonucléotide antisens pourrait abolir l'association CNK/KSR et ainsi prévenir l'activation de RAF. Par contre,

antagoniser l'interaction CNK/HYP à l'aide d'un inhibiteur spécifique n'est peut-être pas la meilleure stratégie à adopter. En effet, ce peptide pourrait peut-être se comporter de façon similaire à HYP en induisant, suivant son association, un changement conformationnel au niveau du domaine SAM de CNK, assurant par conséquent le recrutement adéquat de KSR.

4.6. Conclusion

En somme, cette étude nous a permis de pénétrer au cœur même du processus d'activation de RAF. Quoique le mécanisme d'action de CNK^{NT} demeure encore partiellement compris, il semble que cette région stimule l'activité de KSR en régulant potentiellement, suivant l'intégration d'un signal Ras, la conformation du domaine kinase de KSR. Suite à son activation, KSR pourrait être impliquée dans l'ouverture de la boucle d'activation du domaine kinase de RAF par l'intermédiaire d'un changement allostérique qui faciliterait entre autres l'exposition des sites phosphorégulateurs du domaine kinase de RAF. KSR serait donc un régulateur allostérique alors que CNK serait une plate-forme moléculaire permettant d'assurer à un endroit donné l'avènement des différentes étapes menant vers l'activation maximale de RAF suivant l'intégration de deux signaux distincts, l'un en provenance de Ras, l'autre de Src42.

Bibliographie

- Abraham, D., Podar, K., Pacher, M., Kubicek, M., Welzel, N., Hemmings, B. A., Dilworth, S. M., Mischak, H., Kolch, W., and Baccarini, M. (2000). Raf-1-associated protein phosphatase 2A as a positive regulator of kinase activation. *J Biol Chem* 275, 22300-22304.
- Adachi, M., Fukuda, M., and Nishida, E. (1999). Two co-existing mechanisms for nuclear import of MAP kinase: passive diffusion of a monomer and active transport of a dimer. *Embo J* 18, 5347-5358.
- Adachi, M., Fukuda, M., and Nishida, E. (2000). Nuclear export of MAP kinase (ERK) involves a MAP kinase kinase (MEK)-dependent active transport mechanism. *J Cell Biol* 148, 849-856.
- Adjei, A. A. (2001). Blocking oncogenic Ras signaling for cancer therapy. *J Natl Cancer Inst* 93, 1062-1074.
- Andresen, B. T., Rizzo, M. A., Shome, K., and Romero, G. (2002). The role of phosphatidic acid in the regulation of the Ras/MEK/Erk signaling cascade. *FEBS Lett* 531, 65-68.
- Anselmo, A. N., Bumeister, R., Thomas, J. M., and White, M. A. (2002). Critical contribution of linker proteins to Raf kinase activation. *J Biol Chem* 277, 5940-5943.
- Apolloni, A., Prior, I. A., Lindsay, M., Parton, R. G., and Hancock, J. F. (2000). H-ras but not K-ras traffics to the plasma membrane through the exocytic pathway. *Mol Cell Biol* 20, 2475-2487.
- Baccarini, M. (2005). Second nature: biological functions of the Raf-1 "kinase". *FEBS Lett* 579, 3271-3277.
- Baker, D. A., Mille-Baker, B., Wainwright, S. M., Ish-Horowicz, D., and Dibb, N. J. (2001). Mae mediates MAP kinase phosphorylation of Ets transcription factors in *Drosophila*. *Nature* 411, 330-334.
- Ballif, B. A., and Blenis, J. (2001). Molecular mechanisms mediating mammalian mitogen-activated protein kinase (MAPK) kinase (MEK)-MAPK cell survival signals. *Cell Growth Differ* 12, 397-408.
- Bar-Sagi, D. (2001). A Ras by any other name. *Mol Cell Biol* 21, 1441-1443.
- Bardwell, L. (2004). A walk-through of the yeast mating pheromone response pathway. *Peptides* 25, 1465-1476.

- Barnard, D., Diaz, B., Clawson, D., and Marshall, M. (1998). Oncogenes, growth factors and phorbol esters regulate Raf-1 through common mechanisms. *Oncogene* *17*, 1539-1547.
- Baumann, B., Weber, C. K., Troppmair, J., Whiteside, S., Israel, A., Rapp, U. R., and Wirth, T. (2000). Raf induces NF-kappaB by membrane shuttle kinase MEKK1, a signaling pathway critical for transformation. *Proc Natl Acad Sci U S A* *97*, 4615-4620.
- Baumeister, R., and Ge, L. (2002). The worm in us - *Caenorhabditis elegans* as a model of human disease. *Trends Biotechnol* *20*, 147-148.
- Belanger, L. F., Roy, S., Tremblay, M., Brott, B., Steff, A. M., Mourad, W., Hugo, P., Erikson, R., and Charron, J. (2003). Mek2 is dispensable for mouse growth and development. *Mol Cell Biol* *23*, 4778-4787.
- Bell, B., Xing, H., Yan, K., Gautam, N., and Muslin, A. J. (1999). KSR-1 binds to G-protein betagamma subunits and inhibits beta gamma-induced mitogen-activated protein kinase activation. *J Biol Chem* *274*, 7982-7986.
- Bell, H. S., and Ryan, K. M. (2005). Intracellular signalling and cancer: complex pathways lead to multiple targets. *Eur J Cancer* *41*, 206-215.
- Bergmann, A., Agapite, J., McCall, K., and Steller, H. (1998). The *Drosophila* gene *hid* is a direct molecular target of Ras-dependent survival signaling. *Cell* *95*, 331-341.
- Bernards, A., and Hariharan, I. K. (2001). Of flies and men--studying human disease in *Drosophila*. *Curr Opin Genet Dev* *11*, 274-278.
- Bhattacharjya, S., Xu, P., Chakrapani, M., Johnston, L., and Ni, F. (2005). Polymerization of the SAM domain of MAPKKK Ste11 from the budding yeast: implications for efficient signaling through the MAPK cascades. *Protein Sci* *14*, 828-835.
- Biondi, R. M., and Nebreda, A. R. (2003). Signalling specificity of Ser/Thr protein kinases through docking-site-mediated interactions. *Biochem J* *372*, 1-13.
- Bivona, T. G., Perez De Castro, I., Ahearn, I. M., Grana, T. M., Chiu, V. K., Lockyer, P. J., Cullen, P. J., Pellicer, A., Cox, A. D., and Philips, M. R. (2003). Phospholipase Cgamma activates Ras on the Golgi apparatus by means of RasGRP1. *Nature* *424*, 694-698.
- Bivona, T. G., and Philips, M. R. (2003). Ras pathway signaling on endomembranes. *Curr Opin Cell Biol* *15*, 136-142.
- Blume-Jensen, P., and Hunter, T. (2001). Oncogenic kinase signalling. *Nature* *411*, 355-365.
- Bogoyevitch, M. A., and Court, N. W. (2004). Counting on mitogen-activated protein kinases--ERKs 3, 4, 5, 6, 7 and 8. *Cell Signal* *16*, 1345-1354.

- Bompard, G., and Caron, E. (2004). Regulation of WASP/WAVE proteins: making a long story short. *J Cell Biol* 166, 957-962.
- Bondeva, T., Balla, A., Varnai, P., and Balla, T. (2002). Structural determinants of Ras-Raf interaction analyzed in live cells. *Mol Biol Cell* 13, 2323-2333.
- Bonni, A., Brunet, A., West, A. E., Datta, S. R., Takasu, M. A., and Greenberg, M. E. (1999). Cell survival promoted by the Ras-MAPK signaling pathway by transcription-dependent and -independent mechanisms. *Science* 286, 1358-1362.
- Boriack-Sjodin, P. A., Margarit, S. M., Bar-Sagi, D., and Kuriyan, J. (1998). The structural basis of the activation of Ras by Sos. *Nature* 394, 337-343.
- Bos, J. L. (1998). All in the family? New insights and questions regarding interconnectivity of Ras, Rap1 and Ral. *Embo J* 17, 6776-6782.
- Brondello, J. M., Pouyssegur, J., and McKenzie, F. R. (1999). Reduced MAP kinase phosphatase-1 degradation after p42/p44MAPK-dependent phosphorylation. *Science* 286, 2514-2517.
- Brummer, T., Naegel, H., Reth, M., and Misawa, Y. (2003). Identification of novel ERK-mediated feedback phosphorylation sites at the C-terminus of B-Raf. *Oncogene* 22, 8823-8834.
- Brunet, A., Roux, D., Lenormand, P., Dowd, S., Keyse, S., and Pouyssegur, J. (1999). Nuclear translocation of p42/p44 mitogen-activated protein kinase is required for growth factor-induced gene expression and cell cycle entry. *Embo J* 18, 664-674.
- Buck, E., and Iyengar, R. (2003). Organization and functions of interacting domains for signaling by protein-protein interactions. *Sci STKE* 2003, re14.
- Buday, L. (1999). Membrane-targeting of signalling molecules by SH2/SH3 domain-containing adaptor proteins. *Biochim Biophys Acta* 1422, 187-204.
- Burmeister, R., Rosse, C., Anselmo, A., Camonis, J., and White, M.A. (2004). CNK2 couples NGF signal propagation to multiple regulatory cascades driving cell differentiation. *Curr Biol* 14, 439-445.
- Burack, W. R., and Shaw, A. S. (2000). Signal transduction: hanging on a scaffold. *Curr Opin Cell Biol* 12, 211-216.
- Burkhard, P., Stetefeld, J., and Strelkov, S. V. (2001). Coiled coils: a highly versatile protein folding motif. *Trends Cell Biol* 11, 82-88.
- Cacace, A. M., Michaud, N. R., Therrien, M., Mathes, K., Copeland, T., Rubin, G. M., and Morrison, D. K. (1999). Identification of constitutive and ras-inducible phosphorylation sites of KSR: implications for 14-3-3 binding, mitogen-activated protein kinase binding, and KSR overexpression. *Mol Cell Biol* 19, 229-240.

- Campbell, P. M., and Der, C. J. (2004). Oncogenic Ras and its role in tumor cell invasion and metastasis. *Semin Cancer Biol* *14*, 105-114.
- Camps, M., Nichols, A., Gillieron, C., Antonsson, B., Muda, M., Chabert, C., Boschert, U., and Arkinstall, S. (1998). Catalytic activation of the phosphatase MKP-3 by ERK2 mitogen-activated protein kinase. *Science* *280*, 1262-1265.
- Canagarajah, B. J., Khokhlatchev, A., Cobb, M. H., and Goldsmith, E. J. (1997). Activation mechanism of the MAP kinase ERK2 by dual phosphorylation. *Cell* *90*, 859-869.
- Casey, P. J. (1995). Protein lipidation in cell signaling. *Science* *268*, 221-225.
- Catling, A. D., Eblen, S. T., Schaeffer, H. J., and Weber, M. J. (2001). Scaffold protein regulation of mitogen-activated protein kinase cascade. *Methods Enzymol* *332*, 368-387.
- Catling, A. D., Schaeffer, H. J., Reuter, C. W., Reddy, G. R., and Weber, M. J. (1995). A proline-rich sequence unique to MEK1 and MEK2 is required for raf binding and regulates MEK function. *Mol Cell Biol* *15*, 5214-5225.
- Chadee, D. N., and Kyriakis, J. M. (2004). MLK3 is required for mitogen activation of B-Raf, ERK and cell proliferation. *Nat Cell Biol* *6*, 770-776.
- Chadee, D. N., and Kyriakis, J. M. (2004). A novel role for mixed lineage kinase 3 (MLK3) in B-Raf activation and cell proliferation. *Cell Cycle* *3*, 1227-1229.
- Chang, C., and Sternberg, P. W. (1999). *C. elegans* vulval development as a model system to study the cancer biology of EGFR signaling. *Cancer Metastasis Rev* *18*, 203-213.
- Channavajhala, P. L., Wu, L., Cuzzo, J. W., Hall, J. P., Liu, W., Lin, L. L., and Zhang, Y. (2003). Identification of a novel human kinase supporter of Ras (hKSR-2) that functions as a negative regulator of Cot (Tpl2) signaling. *J Biol Chem* *278*, 47089-97.
- Chaudhary, A., King, W. G., Mattaliano, M. D., Frost, J. A., Diaz, B., Morrison, D. K., Cobb, M. H., Marshall, M. S., and Brugge, J. S. (2000). Phosphatidylinositol 3-kinase regulates Raf1 through Pak phosphorylation of serine 338. *Curr Biol* *10*, 551-554.
- Chen, J., Fujii, K., Zhang, L., Roberts, T., and Fu, H. (2001). Raf-1 promotes cell survival by antagonizing apoptosis signal-regulating kinase 1 through a MEK-ERK independent mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A* *98*, 7783-7788.
- Chen, M., Cheng, A., Candotti, F., Zhou, Y. J., Hymel, A., Fasth, A., Notarangelo, L. D., and O'Shea, J. J. (2000). Complex effects of naturally occurring mutations in the JAK3 pseudokinase domain: evidence for interactions between the kinase and pseudokinase domains. *Mol Cell Biol* *20*, 947-956.
- Chen, Z., Gibson, T. B., Robinson, F., Silvestro, L., Pearson, G., Xu, B., Wright, A., Vanderbilt, C., and Cobb, M. H. (2001). MAP kinases. *Chem Rev* *101*, 2449-2476.

- Cheng, J., Yu, L., Zhang, D., Huang, Q., Spencer, D., and Su, B. (2005). Dimerization through the catalytic domain is essential for MEKK2 activation. *J Biol Chem* 280, 13477-13482.
- Cheng, M., Boulton, T. G., and Cobb, M. H. (1996). ERK3 is a constitutively nuclear protein kinase. *J Biol Chem* 271, 8951-8958.
- Cherfils, J., and Chardin, P. (1999). GEFs: structural basis for their activation of small GTP-binding proteins. *Trends Biochem Sci* 24, 306-311.
- Chiloeches, A., Mason, C. S., and Marais, R. (2001). S338 phosphorylation of Raf-1 is independent of phosphatidylinositol 3-kinase and Pak3. *Mol Cell Biol* 21, 2423-2434.
- Chiu, V. K., Bivona, T., Hach, A., Sajous, J. B., Silletti, J., Wiener, H., Johnson, R. L., 2nd, Cox, A. D., and Philips, M. R. (2002). Ras signalling on the endoplasmic reticulum and the Golgi. *Nat Cell Biol* 4, 343-350.
- Chong, H., and Guan, K. L. (2003). Regulation of Raf through phosphorylation and N terminus-C terminus interaction. *J Biol Chem* 278, 36269-36276.
- Chong, H., Lee, J., and Guan, K. L. (2001). Positive and negative regulation of Raf kinase activity and function by phosphorylation. *Embo J* 20, 3716-3727.
- Chong, H., Vikis, H. G., and Guan, K. L. (2003). Mechanisms of regulating the Raf kinase family. *Cell Signal* 15, 463-469.
- Choy, E., Chiu, V. K., Silletti, J., Feoktistov, M., Morimoto, T., Michaelson, D., Ivanov, I. E., and Philips, M. R. (1999). Endomembrane trafficking of ras: the CAAX motif targets proteins to the ER and Golgi. *Cell* 98, 69-80.
- Clark, G. J., Drugan, J. K., Rossman, K. L., Carpenter, J. W., Rogers-Graham, K., Fu, H., Der, C. J., and Campbell, S. L. (1997). 14-3-3 zeta negatively regulates raf-1 activity by interactions with the Raf-1 cysteine-rich domain. *J Biol Chem* 272, 20990-20993.
- Cobb, M. H., and Goldsmith, E. J. (2000). Dimerization in MAP-kinase signaling. *Trends Biochem Sci* 25, 7-9.
- Coles, L. C., and Shaw, P. E. (2002). PAK1 primes MEK1 for phosphorylation by Raf-1 kinase during cross-cascade activation of the ERK pathway. *Oncogene* 21, 2236-2244.
- Corbit, K. C., Trakul, N., Eves, E. M., Diaz, B., Marshall, M., and Rosner, M. R. (2003). Activation of Raf-1 signaling by protein kinase C through a mechanism involving Raf kinase inhibitory protein. *J Biol Chem* 278, 13061-13068.
- Cornelis, S., Bruynooghe, Y., Van Loo, G., Saelens, X., Vandenabeele, P., and Beyaert, R. (2005). Apoptosis of hematopoietic cells induced by growth factor withdrawal is associated with caspase-9 mediated cleavage of Raf-1. *Oncogene* 24, 1552-1562.

- Cottin, V., Van Linden, A., and Riches, D. W. (1999). Phosphorylation of tumor necrosis factor receptor CD120a (p55) by p42(mapk/erk2) induces changes in its subcellular localization. *J Biol Chem* 274, 32975-32987.
- Cowburn, D. (1997). Peptide recognition by PTB and PDZ domains. *Curr Opin Struct Biol* 7, 835-838.
- Cox, A. D., and Der, C. J. (2003). The dark side of Ras: regulation of apoptosis. *Oncogene* 22, 8999-9006.
- Craven, S. E., and Bredt, D. S. (1998). PDZ proteins organize synaptic signaling pathways. *Cell* 93, 495-498.
- Cullen, P. J. (2001). Ras effectors: buying shares in Ras plc. *Curr Biol* 11, R342-344.
- Cutler, R. E., Jr., Stephens, R. M., Saracino, M. R., and Morrison, D. K. (1998). Autoregulation of the Raf-1 serine/threonine kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 9214-9219.
- Dai, Q., Choy, E., Chiu, V., Romano, J., Slivka, S. R., Steitz, S. A., Michaelis, S., and Philips, M. R. (1998). Mammalian prenylcysteine carboxyl methyltransferase is in the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 273, 15030-15034.
- Dang, A., Frost, J. A., and Cobb, M. H. (1998). The MEK1 proline-rich insert is required for efficient activation of the mitogen-activated protein kinases ERK1 and ERK2 in mammalian cells. *J Biol Chem* 273, 19909-19913.
- Dasgupta, P., Sun, J., Wang, S., Fusaro, G., Betts, V., Padmanabhan, J., Sebt, S. M., and Chellappan, S. P. (2004). Disruption of the Rb--Raf-1 interaction inhibits tumor growth and angiogenesis. *Mol Cell Biol* 24, 9527-9541.
- Davies, H., Bignell, G. R., Cox, C., Stephens, P., Edkins, S., Clegg, S., Teague, J., Woffendin, H., Garnett, M. J., Bottomley, W., *et al.* (2002). Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature* 417, 949-954.
- de Maximy, A. A., Nakatake, Y., Moncada, S., Itoh, N., Thiery, J. P., and Bellusci, S. (1999). Cloning and expression pattern of a mouse homologue of drosophila sprouty in the mouse embryo. *Mech Dev* 81, 213-216.
- Denouel-Galy, A., Douville, E. M., Warne, P. H., Papin, C., Laugier, D., Calothy, G., Downward, J., and Eychene, A. (1998). Murine Ksr interacts with MEK and inhibits Ras-induced transformation. *Curr Biol* 8, 46-55.
- Dhanasekaran, N., and Premkumar Reddy, E. (1998). Signaling by dual specificity kinases. *Oncogene* 17, 1447-1455.
- Dhillon, A. S., and Kolch, W. (2002). Untying the regulation of the Raf-1 kinase. *Arch Biochem Biophys* 404, 3-9.

- Dhillon, A. S., Meikle, S., Yazici, Z., Eulitz, M., and Kolch, W. (2002). Regulation of Raf-1 activation and signalling by dephosphorylation. *Embo J* 21, 64-71.
- Dhillon, A. S., Pollock, C., Steen, H., Shaw, P. E., Mischak, H., and Kolch, W. (2002). Cyclic AMP-dependent kinase regulates Raf-1 kinase mainly by phosphorylation of serine 259. *Mol Cell Biol* 22, 3237-3246.
- Diaz, B., Barnard, D., Filson, A., MacDonald, S., King, A., and Marshall, M. (1997). Phosphorylation of Raf-1 serine 338-serine 339 is an essential regulatory event for Ras-dependent activation and biological signaling. *Mol Cell Biol* 17, 4509-4516.
- Dickens, M., Rogers, J. S., Cavanagh, J., Raitano, A., Xia, Z., Halpern, J. R., Greenberg, M. E., Sawyers, C. L., and Davis, R. J. (1997). A cytoplasmic inhibitor of the JNK signal transduction pathway. *Science* 277, 693-696.
- Dikic, I., and Giordano, S. (2003). Negative receptor signalling. *Curr Opin Cell Biol* 15, 128-135.
- Donovan, S., Shannon, K. M., and Bollag, G. (2002). GTPase activating proteins: critical regulators of intracellular signaling. *Biochim Biophys Acta* 1602, 23-45.
- Dougherty, M. K., Muller, J., Ritt, D. A., Zhou, M., Zhou, X. Z., Copeland, T. D., Conrads, T. P., Veenstra, T. D., Lu, K. P., and Morrison, D. K. (2005). Regulation of Raf-1 by direct feedback phosphorylation. *Mol Cell* 17, 215-224.
- Douziech, M., Roy, F., Laberge, G., Lefrancois, M., Armengod, A. V., and Therrien, M. (2003). Bimodal regulation of RAF by CNK in Drosophila. *Embo J* 22, 5068-5078.
- Downward, J. (2003). Targeting RAS signalling pathways in cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 3, 11-22.
- Drugan, J. K., Khosravi-Far, R., White, M. A., Der, C. J., Sung, Y. J., Hwang, Y. W., and Campbell, S. L. (1996). Ras interaction with two distinct binding domains in Raf-1 may be required for Ras transformation. *J Biol Chem* 271, 233-237.
- Duda, T., Yadav, P., Jankowska, A., Venkataraman, V., and Sharma, R. K. (2001). Three dimensional atomic model and experimental validation for the ATP-Regulated Module (ARM) of the atrial natriuretic factor receptor guanylate cyclase. *Mol Cell Biochem* 217, 165-172.
- Dumaz, N., Light, Y., and Marais, R. (2002). Cyclic AMP blocks cell growth through Raf-1-dependent and Raf-1-independent mechanisms. *Mol Cell Biol* 22, 3717-3728.
- Dumaz, N., and Marais, R. (2003). Protein kinase A blocks Raf-1 activity by stimulating 14-3-3 binding and blocking Raf-1 interaction with Ras. *J Biol Chem* 278, 29819-29823.
- Dumaz, N., and Marais, R. (2005). Integrating signals between cAMP and the RAS/RAF/MEK/ERK signalling pathways. *Febs J* 272, 3491-3504.

- Dumaz, N., and Marais, R. (2005). Raf phosphorylation: one step forward and two steps back. *Mol Cell* 17, 164-166.
- Eblen, S. T., Slack, J. K., Weber, M. J., and Catling, A. D. (2002). Rac-PAK signaling stimulates extracellular signal-regulated kinase (ERK) activation by regulating formation of MEK1-ERK complexes. *Mol Cell Biol* 22, 6023-6033.
- Egan, J. E., Hall, A. B., Yatsula, B. A., and Bar-Sagi, D. (2002). The bimodal regulation of epidermal growth factor signaling by human Sprouty proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 6041-6046.
- Ehrhardt, A., Ehrhardt, G. R., Guo, X., and Schrader, J. W. (2002). Ras and relatives--job sharing and networking keep an old family together. *Exp Hematol* 30, 1089-1106.
- Elion, E. A. (2001). The Ste5p scaffold. *J Cell Sci* 114, 3967-3978.
- English, J., Pearson, G., Wilsbacher, J., Swantek, J., Karandikar, M., Xu, S., and Cobb, M. H. (1999). New insights into the control of MAP kinase pathways. *Exp Cell Res* 253, 255-270.
- Fabian, J. R., Daar, I. O., and Morrison, D. K. (1993). Critical tyrosine residues regulate the enzymatic and biological activity of Raf-1 kinase. *Mol Cell Biol* 13, 7170-7179.
- Fang, J. Y., and Richardson, B. C. (2005). The MAPK signalling pathways and colorectal cancer. *Lancet Oncol* 6, 322-327.
- Fantz, D. A., Jacobs, D., Glossip, D., and Kornfeld, K. (2001). Docking sites on substrate proteins direct extracellular signal-regulated kinase to phosphorylate specific residues. *J Biol Chem* 276, 27256-27265.
- Farrar, M. A., Alberol, I., and Perlmutter, R. M. (1996). Activation of the Raf-1 kinase cascade by coumermycin-induced dimerization. *Nature* 383, 178-181.
- Farrar, M. A., Tian, J., and Perlmutter, R. M. (2000). Membrane localization of Raf assists engagement of downstream effectors. *J Biol Chem* 275, 31318-31324.
- Ferrell, J. E., Jr. (2000). What do scaffold proteins really do? *Sci STKE* 2000, PE1.
- Ferrell, J. E., Jr., and Cimprich, K. A. (2003). Enforced proximity in the function of a famous scaffold. *Mol Cell* 11, 289-291.
- Finkbeiner, S. (2000). CREB couples neurotrophin signals to survival messages. *Neuron* 25, 11-14.
- Frost, J. A., Steen, H., Shapiro, P., Lewis, T., Ahn, N., Shaw, P. E., and Cobb, M. H. (1997). Cross-cascade activation of ERKs and ternary complex factors by Rho family proteins. *Embo J* 16, 6426-6438.

Fukuda, M., Asano, S., Nakamura, T., Adachi, M., Yoshida, M., Yanagida, M., and Nishida, E. (1997). CRM1 is responsible for intracellular transport mediated by the nuclear export signal. *Nature* 390, 308-311.

Fukuda, M., Gotoh, I., Gotoh, Y., and Nishida, E. (1996). Cytoplasmic localization of mitogen-activated protein kinase kinase directed by its NH₂-terminal, leucine-rich short amino acid sequence, which acts as a nuclear export signal. *J Biol Chem* 271, 20024-20028.

Fukuda, M., Gotoh, Y., and Nishida, E. (1997). Interaction of MAP kinase with MAP kinase kinase: its possible role in the control of nucleocytoplasmic transport of MAP kinase. *Embo J* 16, 1901-1908.

Furthauer, M., Lin, W., Ang, S. L., Thisse, B., and Thisse, C. (2002). Sef is a feedback-induced antagonist of Ras/MAPK-mediated FGF signalling. *Nat Cell Biol* 4, 170-174.

Galaktionov, K., Jessus, C., and Beach, D. (1995). Raf1 interaction with Cdc25 phosphatase ties mitogenic signal transduction to cell cycle activation. *Genes Dev* 9, 1046-1058.

Galanis, A., Yang, S. H., and Sharrocks, A. D. (2001). Selective targeting of MAPKs to the ETS domain transcription factor SAP-1. *J Biol Chem* 276, 965-973.

Gardner, A. M., Vaillancourt, R. R., Lange-Carter, C. A., and Johnson, G. L. (1994). MEK-1 phosphorylation by MEK kinase, Raf, and mitogen-activated protein kinase: analysis of phosphopeptides and regulation of activity. *Mol Biol Cell* 5, 193-201.

Garnett, M. J., and Marais, R. (2004). Guilty as charged: B-RAF is a human oncogene. *Cancer Cell* 6, 313-319.

Garrington, T. P., and Johnson, G. L. (1999). Organization and regulation of mitogen-activated protein kinase signaling pathways. *Curr Opin Cell Biol* 11, 211-218.

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

Gelb, M. H., Scholten, J. D., and Sebolt-Leopold, J. S. (1998). Protein prenylation: from discovery to prospects for cancer treatment. *Curr Opin Chem Biol* 2, 40-48.

Geyer, M., and Wittinghofer, A. (1997). GEFs, GAPs, GDIs and effectors: taking a closer (3D) look at the regulation of Ras-related GTP-binding proteins. *Curr Opin Struct Biol* 7, 786-792.

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

- Gille, H., and Downward, J. (1999). Multiple ras effector pathways contribute to G(1) cell cycle progression. *J Biol Chem* 274, 22033-22040.
- Giroux, S., Tremblay, M., Bernard, D., Cardin-Girard, J. F., Aubry, S., Larouche, L., Rousseau, S., Huot, J., Landry, J., Jeannotte, L., and Charron, J. (1999). Embryonic death of Mek1-deficient mice reveals a role for this kinase in angiogenesis in the labyrinthine region of the placenta. *Curr Biol* 9, 369-372.
- Goetz, C. A., O'Neil, J. J., and Farrar, M. A. (2003). Membrane localization, oligomerization, and phosphorylation are required for optimal raf activation. *J Biol Chem* 278, 51184-51189.
- Goldberg, J., Nairn, A. C., and Kuriyan, J. (1996). Structural basis for the autoinhibition of calcium/calmodulin-dependent protein kinase I. *Cell* 84, 875-887.
- Gray-Schopfer, V. C., da Rocha Dias, S., and Marais, R. (2005). The role of B-RAF in melanoma. *Cancer Metastasis Rev* 24, 165-183.
- Guan, K. L., Figueroa, C., Brtva, T. R., Zhu, T., Taylor, J., Barber, T. D., and Vojtek, A. B. (2000). Negative regulation of the serine/threonine kinase B-Raf by Akt. *J Biol Chem* 275, 27354-27359.
- Guy, G. R., Yusoff, P., Bangarusamy, D., Fong, C. W., and Wong, E. S. (2002). Dockers at the crossroads. *Cell Signal* 14, 11-20.
- Hacohen, N., Kramer, S., Sutherland, D., Hiromi, Y., and Krasnow, M. A. (1998). sprouty encodes a novel antagonist of FGF signaling that patterns apical branching of the *Drosophila* airways. *Cell* 92, 253-263.
- Hagemann, C., and Blank, J. L. (2001). The ups and downs of MEK kinase interactions. *Cell Signal* 13, 863-875.
- Hagemann, C., and Rapp, U. R. (1999). Isotype-specific functions of Raf kinases. *Exp Cell Res* 253, 34-46.
- Hamilton, M., and Wolfman, A. (1998). Oncogenic Ha-Ras-dependent mitogen-activated protein kinase activity requires signaling through the epidermal growth factor receptor. *J Biol Chem* 273, 28155-28162.
- Hanafusa, H., Torii, S., Yasunaga, T., and Nishida, E. (2002). Sprouty1 and Sprouty2 provide a control mechanism for the Ras/MAPK signalling pathway. *Nat Cell Biol* 4, 850-858.
- Hanahan, D., and Weinberg, R. A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* 100, 57-70.
- Hancock, J. F. (2003). Ras proteins: different signals from different locations. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4, 373-384.

Hanks, S. K., and Hunter, T. (1995). Protein kinases 6. The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification. *Faseb J* 9, 576-596.

Hanks, S. K., Quinn, A. M., and Hunter, T. (1988). The protein kinase family: conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains. *Science* 241, 42-52.

Harding, A., Tian, T., Westbury, E., Frische, E., and Hancock, J.F. (2005) Subcellular localization determines MAP kinase signal output. *Curr Biol* 15, 869-73.

Hariharan, I. K., and Haber, D. A. (2003). Yeast, flies, worms, and fish in the study of human disease. *N Engl J Med* 348, 2457-2463.

Harris, K., Lamson, R. E., Nelson, B., Hughes, T. R., Marton, M. J., Roberts, C. J., Boone, C., and Pryciak, P. M. (2001). Role of scaffolds in MAP kinase pathway specificity revealed by custom design of pathway-dedicated signaling proteins. *Curr Biol* 11, 1815-1824.

Harvey, K. F., Pflieger, C. M., and Hariharan, I. K. (2003). The *Drosophila* Mst ortholog, hippo, restricts growth and cell proliferation and promotes apoptosis. *Cell* 114, 457-467.

Hekman, M., Fischer, A., Wennogle, L. P., Wang, Y. K., Campbell, S. L., and Rapp, U. R. (2005). Novel C-Raf phosphorylation sites: serine 296 and 301 participate in Raf regulation. *FEBS Lett* 579, 464-468.

Hekman, M., Wiese, S., Metz, R., Albert, S., Troppmair, J., Nickel, J., Sendtner, M., and Rapp, U. R. (2004). Dynamic changes in C-Raf phosphorylation and 14-3-3 protein binding in response to growth factor stimulation: differential roles of 14-3-3 protein binding sites. *J Biol Chem* 279, 14074-14086.

Higgs, H. N., and Pollard, T. D. (2000). Activation by Cdc42 and PIP(2) of Wiskott-Aldrich syndrome protein (WASp) stimulates actin nucleation by Arp2/3 complex. *J Cell Biol* 150, 1311-1320.

Hindley, A., and Kolch, W. (2002). Extracellular signal regulated kinase (ERK)/mitogen activated protein kinase (MAPK)-independent functions of Raf kinases. *J Cell Sci* 115, 1575-1581.

Hingorani, S. R., and Tuveson, D. A. (2003). Ras redux: rethinking how and where Ras acts. *Curr Opin Genet Dev* 13, 6-13.

Hoshino, R., Chatani, Y., Yamori, T., Tsuruo, T., Oka, H., Yoshida, O., Shimada, Y., Ari-i, S., Wada, H., Fujimoto, J., and Kohno, M. (1999). Constitutive activation of the 41-/43-kDa mitogen-activated protein kinase signaling pathway in human tumors. *Oncogene* 18, 813-822.

Houslay, M. D., and Kolch, W. (2000). Cell-type specific integration of cross-talk between extracellular signal-regulated kinase and cAMP signaling. *Mol Pharmacol* 58, 659-668.

- Hsu, V., Zobel, C. L., Lambie, E. J., Schedl, T., and Kornfeld, K. (2002). *Caenorhabditis elegans* lin-45 raf is essential for larval viability, fertility and the induction of vulval cell fates. *Genetics* 160, 481-492.
- Hu, S. H., Parker, M. W., Lei, J. Y., Wilce, M. C., Benian, G. M., and Kemp, B. E. (1994). Insights into autoregulation from the crystal structure of twitchin kinase. *Nature* 369, 581-584.
- Hubbard, S. R. (1997). Crystal structure of the activated insulin receptor tyrosine kinase in complex with peptide substrate and ATP analog. *Embo J* 16, 5572-5581.
- Hubbard, S. R. (2002). Protein tyrosine kinases: autoregulation and small-molecule inhibition. *Curr Opin Struct Biol* 12, 735-741.
- Hubbard, S. R. (2004). Oncogenic mutations in B-Raf: some losses yield gains. *Cell* 116, 764-766.
- Hubbard, S. R., Mohammadi, M., and Schlessinger, J. (1998). Autoregulatory mechanisms in protein-tyrosine kinases. *J Biol Chem* 273, 11987-11990.
- Hunter, T. (2000). Signaling--2000 and beyond. *Cell* 100, 113-127.
- Huse, M., and Kuriyan, J. (2002). The conformational plasticity of protein kinases. *Cell* 109, 275-282.
- Huser, M., Luckett, J., Chiloeches, A., Mercer, K., Iwobi, M., Giblett, S., Sun, X. M., Brown, J., Marais, R., and Pritchard, C. (2001). MEK kinase activity is not necessary for Raf-1 function. *Embo J* 20, 1940-1951.
- Iida, J., Nishimura, W., Yao, I., and Hata, Y. (2002). Synaptic localization of membrane-associated guanylate kinase-interacting protein mediated by the pleckstrin homology domain. *Eur J Neurosci* 15, 1493-1498.
- Ikenoue, T., Hikiba, Y., Kanai, F., Tanaka, Y., Imamura, J., Imamura, T., Ohta, M., Ijichi, H., Tateishi, K., Kawakami, T., *et al.* (2003). Functional analysis of mutations within the kinase activation segment of B-Raf in human colorectal tumors. *Cancer Res* 63, 8132-8137.
- Inouye, K., Mizutani, S., Koide, H., and Kaziro, Y. (2000). Formation of the Ras dimer is essential for Raf-1 activation. *J Biol Chem* 275, 3737-3740.
- Jacobs, D., Glossip, D., Xing, H., Muslin, A. J., and Kornfeld, K. (1999). Multiple docking sites on substrate proteins form a modular system that mediates recognition by ERK MAP kinase. *Genes Dev* 13, 163-175.
- Jaffe, A. B., Aspenstrom, P., and Hall, A. (2004). Human CNK1 acts as a scaffold protein, linking Rho and Ras signal transduction pathways. *Mol Cell Biol* 24, 1736-1746.

- Jaffe, A. B., Hall, A., and Schmidt, A. (2005). Association of CNK1 with Rho guanine nucleotide exchange factors controls signaling specificity downstream of Rho. *Curr Biol* *15*, 405-412.
- Jaumot, M., and Hancock, J. F. (2001). Protein phosphatases 1 and 2A promote Raf-1 activation by regulating 14-3-3 interactions. *Oncogene* *20*, 3949-3958.
- Jaumot, M., Yan, J., Clyde-Smith, J., Sluimer, J., and Hancock, J. F. (2002). The linker domain of the Ha-Ras hypervariable region regulates interactions with exchange factors, Raf-1 and phosphoinositide 3-kinase. *J Biol Chem* *277*, 272-278.
- Jiang, G., and Hunter, T. (1999). Receptor signaling: when dimerization is not enough. *Curr Biol* *9*, R568-571.
- Johnson, L., Greenbaum, D., Cichowski, K., Mercer, K., Murphy, E., Schmitt, E., Bronson, R. T., Umanoff, H., Edelmann, W., Kucherlapati, R., and Jacks, T. (1997). K-ras is an essential gene in the mouse with partial functional overlap with N-ras. *Genes Dev* *11*, 2468-2481.
- Johnson, L. N., Lowe, E. D., Noble, M. E., and Owen, D. J. (1998). The Eleventh Datta Lecture. The structural basis for substrate recognition and control by protein kinases. *FEBS Lett* *430*, 1-11.
- Johnson, L. N., Noble, M. E., and Owen, D. J. (1996). Active and inactive protein kinases: structural basis for regulation. *Cell* *85*, 149-158.
- Jousset, C., Carron, C., Boureux, A., Quang, C. T., Oury, C., Dusanter-Fourt, I., Charon, M., Levin, J., Bernard, O., and Ghysdael, J. (1997). A domain of TEL conserved in a subset of ETS proteins defines a specific oligomerization interface essential to the mitogenic properties of the TEL-PDGFR beta oncoprotein. *Embo J* *16*, 69-82.
- Julien, C., Coulombe, P., and Meloche, S. (2003). Nuclear export of ERK3 by a CRM1-dependent mechanism regulates its inhibitory action on cell cycle progression. *J Biol Chem* *278*, 42615-42624.
- Kalderon, D. (2004). Hedgehog signaling: Costal-2 bridges the transduction gap. *Curr Biol* *14*, R67-69.
- Kamakura, S., Moriguchi, T., and Nishida, E. (1999). Activation of the protein kinase ERK5/BMK1 by receptor tyrosine kinases. Identification and characterization of a signaling pathway to the nucleus. *J Biol Chem* *274*, 26563-26571.
- Kammerer, R. A. (1997). Alpha-helical coiled-coil oligomerization domains in extracellular proteins. *Matrix Biol* *15*, 555-565; discussion 567-558.
- Karandikar, M., Xu, S., and Cobb, M. H. (2000). MEKK1 binds raf-1 and the ERK2 cascade components. *J Biol Chem* *275*, 40120-40127.

- Karasarides, M., Chiloechos, A., Hayward, R., Niculescu-Duvaz, D., Scanlon, I., Friedlos, F., Ogilvie, L., Hedley, D., Martin, J., Marshall, C. J., *et al.* (2004). B-RAF is a therapeutic target in melanoma. *Oncogene* 23, 6292-6298.
- Karlsson, M., Mathers, J., Dickinson, R. J., Mandl, M., and Keyse, S. M. (2004). Both nuclear-cytoplasmic shuttling of the dual specificity phosphatase MKP-3 and its ability to anchor MAP kinase in the cytoplasm are mediated by a conserved nuclear export signal. *J Biol Chem* 279, 41882-41891.
- Keller, E. T., Fu, Z., and Brennan, M. (2004). The role of Raf kinase inhibitor protein (RKIP) in health and disease. *Biochem Pharmacol* 68, 1049-1053.
- Khokhlatchev, A., Rabizadeh, S., Xavier, R., Nedwidek, M., Chen, T., Zhang, X. F., Seed, B., and Avruch, J. (2002). Identification of a novel Ras-regulated proapoptotic pathway. *Curr Biol* 12, 253-265.
- Khokhlatchev, A. V., Canagarajah, B., Wilsbacher, J., Robinson, M., Atkinson, M., Goldsmith, E., and Cobb, M. H. (1998). Phosphorylation of the MAP kinase ERK2 promotes its homodimerization and nuclear translocation. *Cell* 93, 605-615.
- Kim, A. S., Kakalis, L. T., Abdul-Manan, N., Liu, G. A., and Rosen, M. K. (2000). Autoinhibition and activation mechanisms of the Wiskott-Aldrich syndrome protein. *Nature* 404, 151-158.
- Kim, C., Xuong, N. H., and Taylor, S. S. (2005). Crystal structure of a complex between the catalytic and regulatory (RIalpha) subunits of PKA. *Science* 307, 690-696.
- Kim, C. A., Phillips, M. L., Kim, W., Gingery, M., Tran, H. H., Robinson, M. A., Faham, S., and Bowie, J. U. (2001). Polymerization of the SAM domain of TEL in leukemogenesis and transcriptional repression. *Embo J* 20, 4173-4182.
- Kim, H. J., and Bar-Sagi, D. (2004). Modulation of signalling by Sprouty: a developing story. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5, 441-450.
- King, A. J., Sun, H., Diaz, B., Barnard, D., Miao, W., Bagrodia, S., and Marshall, M. S. (1998). The protein kinase Pak3 positively regulates Raf-1 activity through phosphorylation of serine 338. *Nature* 396, 180-183.
- King, A. J., Wireman, R. S., Hamilton, M., and Marshall, M. S. (2001). Phosphorylation site specificity of the Pak-mediated regulation of Raf-1 and cooperativity with Src. *FEBS Lett* 497, 6-14.
- Klockow, B., Ahmadian, M. R., Block, C., and Wittinghofer, A. (2000). Oncogenic insertional mutations in the P-loop of Ras are overactive in MAP kinase signaling. *Oncogene* 19, 5367-5376.

- Kobe, B., Heierhorst, J., Feil, S. C., Parker, M. W., Benian, G. M., Weiss, K. R., and Kemp, B. E. (1996). Giant protein kinases: domain interactions and structural basis of autoregulation. *Embo J* 15, 6810-6821.
- Kobe, B., and Kajava, A. V. (2001). The leucine-rich repeat as a protein recognition motif. *Curr Opin Struct Biol* 11, 725-732.
- Kobe, B., and Kemp, B. E. (1999). Active site-directed protein regulation. *Nature* 402, 373-376.
- Kolch, W. (2000). Meaningful relationships: the regulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by protein interactions. *Biochem J* 351 Pt 2, 289-305.
- Kolch, W., Calder, M., and Gilbert, D. (2005). When kinases meet mathematics: the systems biology of MAPK signalling. *FEBS Lett* 579, 1891-1895.
- Kornfeld, K., Hom, D. B., and Horvitz, H. R. (1995). The *ksr-1* gene encodes a novel protein kinase involved in Ras-mediated signaling in *C. elegans*. *Cell* 83, 903-913.
- Kovalenko, D., Yang, X., Nadeau, R. J., Harkins, L. K., and Friesel, R. (2003). Sef inhibits fibroblast growth factor signaling by inhibiting FGFR1 tyrosine phosphorylation and subsequent ERK activation. *J Biol Chem* 278, 14087-14091.
- Krupa, A., Preethi, G., and Srinivasan, N. (2004). Structural modes of stabilization of permissive phosphorylation sites in protein kinases: distinct strategies in Ser/Thr and Tyr kinases. *J Mol Biol* 339, 1025-1039.
- Kuan, C. Y., Yang, D. D., Samanta Roy, D. R., Davis, R. J., Rakic, P., and Flavell, R. A. (1999). The *Jnk1* and *Jnk2* protein kinases are required for regional specific apoptosis during early brain development. *Neuron* 22, 667-676.
- Kubicek, M., Pacher, M., Abraham, D., Podar, K., Eulitz, M., and Baccarini, M. (2002). Dephosphorylation of Ser-259 regulates Raf-1 membrane association. *J Biol Chem* 277, 7913-7919.
- Kwan, J. J., Warner, N., Pawson, T., and Donaldson, L. W. (2004). The solution structure of the *S.cerevisiae* Ste11 MAPKKK SAM domain and its partnership with Ste50. *J Mol Biol* 342, 681-693.
- Laberge, G., Douziech, M., and Therrien, M. (2005). Src42 binding activity regulates *Drosophila* RAF by a novel CNK-dependent derepression mechanism. *Embo J* 24, 487-498.
- Ladbury, J. E., and Arold, S. (2000). Searching for specificity in SH domains. *Chem Biol* 7, R3-8.

- Lanigan, T. M., Liu, A., Huang, Y. Z., Mei, L., Margolis, B., and Guan, K. L. (2003). Human homologue of *Drosophila* CNK interacts with Ras effector proteins Raf and Rlf. *Faseb J* 17, 2048-2060.
- Lavoie, J. N., L'Allemain, G., Brunet, A., Muller, R., and Pouyssegur, J. (1996). Cyclin D1 expression is regulated positively by the p42/p44MAPK and negatively by the p38/HOGMAPK pathway. *J Biol Chem* 271, 20608-20616.
- Le Mellay, V., Troppmair, J., Benz, R., and Rapp, U. R. (2002). Negative regulation of mitochondrial VDAC channels by C-Raf kinase. *BMC Cell Biol* 3, 14.
- Lee, J. W., Soung, Y. H., Kim, S. Y., Park, W. S., Nam, S. W., Min, W. S., Kim, S. H., Lee, J. Y., Yoo, N. J., and Lee, S. H. (2005). Mutational analysis of the ARAF gene in human cancers. *Apmis* 113, 54-57.
- Lemaire, P. A., Lary, J., and Cole, J. L. (2005). Mechanism of PKR activation: dimerization and kinase activation in the absence of double-stranded RNA. *J Mol Biol* 345, 81-90.
- Lenormand, P., Brondello, J. M., Brunet, A., and Pouyssegur, J. (1998). Growth factor-induced p42/p44 MAPK nuclear translocation and retention requires both MAPK activation and neosynthesis of nuclear anchoring proteins. *J Cell Biol* 142, 625-633.
- Lew, J. (2003). MAP kinases and CDKs: kinetic basis for catalytic activation. *Biochemistry* 42, 849-856.
- Li, W., Chong, H., and Guan, K. L. (2001). Function of the Rho family GTPases in Ras-stimulated Raf activation. *J Biol Chem* 276, 34728-34737.
- Li, W., Han, M., and Guan, K. L. (2000). The leucine-rich repeat protein SUR-8 enhances MAP kinase activation and forms a complex with Ras and Raf. *Genes Dev* 14, 895-900.
- Li, X., Wheldon, L., and Heath, J. K. (2003). Sprouty: a controversial role in receptor tyrosine kinase signalling pathways. *Biochem Soc Trans* 31, 1445-1446.
- Light, Y., Paterson, H., and Marais, R. (2002). 14-3-3 antagonizes Ras-mediated Raf-1 recruitment to the plasma membrane to maintain signaling fidelity. *Mol Cell Biol* 22, 4984-4996.
- Lim, J., Yusoff, P., Wong, E. S., Chandramouli, S., Lao, D. H., Fong, C. W., and Guy, G. R. (2002). The cysteine-rich sprouty translocation domain targets mitogen-activated protein kinase inhibitory proteins to phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate in plasma membranes. *Mol Cell Biol* 22, 7953-7966.
- Lim, W. A. (2002). The modular logic of signaling proteins: building allosteric switches from simple binding domains. *Curr Opin Struct Biol* 12, 61-68.

- Livnah, O., Stura, E. A., Middleton, S. A., Johnson, D. L., Jolliffe, L. K., and Wilson, I. A. (1999). Crystallographic evidence for preformed dimers of erythropoietin receptor before ligand activation. *Science* 283, 987-990.
- Lopez-Illasaca, M. A., Bernabe-Ortiz, J. C., Na, S. Y., Dzau, V. J., and Xavier, R. J. (2005). Bioluminescence resonance energy transfer identify scaffold protein CNK1 interactions in intact cells. *FEBS Lett* 579, 648-654.
- Lorenzen, J. A., Baker, S. E., Denhez, F., Melnick, M. B., Brower, D. L., and Perkins, L. A. (2001). Nuclear import of activated D-ERK by DIM-7, an importin family member encoded by the gene moleskin. *Development* 128, 1403-1414.
- Lozano, J., Xing, R., Cai, Z., Jensen, H. L., Trempus, C., Mark, W., Cannon, R., and Kolesnick, R. (2003). Deficiency of kinase suppressor of Ras1 prevents oncogenic ras signaling in mice. *Cancer Res* 63, 4232-4238.
- Lu, K. P. (2004). Pinning down cell signaling, cancer and Alzheimer's disease. *Trends Biochem Sci* 29, 200-209.
- Lum, L., Zhang, C., Oh, S., Mann, R. K., von Kessler, D. P., Taipale, J., Weis-Garcia, F., Gong, R., Wang, B., and Beachy, P. A. (2003). Hedgehog signal transduction via Smoothed association with a cytoplasmic complex scaffolded by the atypical kinesin, Costal-2. *Mol Cell* 12, 1261-1274.
- Luo, Z., Tzivion, G., Belshaw, P. J., Vavvas, D., Marshall, M., and Avruch, J. (1996). Oligomerization activates c-Raf-1 through a Ras-dependent mechanism. *Nature* 383, 181-185.
- Lynch, D. K., Ellis, C. A., Edwards, P. A., and Hiles, I. D. (1999). Integrin-linked kinase regulates phosphorylation of serine 473 of protein kinase B by an indirect mechanism. *Oncogene* 18, 8024-8032.
- Mackinnon, A. C., Qadota, H., Norman, K. R., Moerman, D. G., and Williams, B. D. (2002). C. elegans PAT-4/ILK functions as an adaptor protein within integrin adhesion complexes. *Curr Biol* 12, 787-797.
- Magee, T., and Marshall, C. (1999). New insights into the interaction of Ras with the plasma membrane. *Cell* 98, 9-12.
- Manning, G., Whyte, D. B., Martinez, R., Hunter, T., and Sudarsanam, S. (2002). The protein kinase complement of the human genome. *Science* 298, 1912-1934.
- Marais, R., Light, Y., Paterson, H. F., Mason, C. S., and Marshall, C. J. (1997). Differential regulation of Raf-1, A-Raf, and B-Raf by oncogenic ras and tyrosine kinases. *J Biol Chem* 272, 4378-4383.
- Marshall, C. J. (1995). Specificity of receptor tyrosine kinase signaling: transient versus sustained extracellular signal-regulated kinase activation. *Cell* 80, 179-185.

- Martin, G. S. (2003). Cell signaling and cancer. *Cancer Cell* 4, 167-174.
- Mason, C. S., Springer, C. J., Cooper, R. G., Superti-Furga, G., Marshall, C. J., and Marais, R. (1999). Serine and tyrosine phosphorylations cooperate in Raf-1, but not B-Raf activation. *Embo J* 18, 2137-2148.
- Matheny, S. A., Chen, C., Kortum, R. L., Razidlo, G. L., Lewis, R. E., and White, M. A. (2004). Ras regulates assembly of mitogenic signalling complexes through the effector protein IMP. *Nature* 427, 256-260.
- Matsubayashi, Y., Fukuda, M., and Nishida, E. (2001). Evidence for existence of a nuclear pore complex-mediated, cytosol-independent pathway of nuclear translocation of ERK MAP kinase in permeabilized cells. *J Biol Chem* 276, 41755-41760.
- Matsushita, M., and Nairn, A. C. (1998). Characterization of the mechanism of regulation of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase I by calmodulin and by Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase kinase. *J Biol Chem* 273, 21473-21481.
- Mattison, C. P., and Ota, I. M. (2000). Two protein tyrosine phosphatases, Ptp2 and Ptp3, modulate the subcellular localization of the Hog1 MAP kinase in yeast. *Genes Dev* 14, 1229-1235.
- Mattison, C. P., Spencer, S. S., Kresge, K. A., Lee, J., and Ota, I. M. (1999). Differential regulation of the cell wall integrity mitogen-activated protein kinase pathway in budding yeast by the protein tyrosine phosphatases Ptp2 and Ptp3. *Mol Cell Biol* 19, 7651-7660.
- Mazieres, J., Pradines, A., and Favre, G. (2004). Perspectives on farnesyl transferase inhibitors in cancer therapy. *Cancer Lett* 206, 159-167.
- McPhee, I., Yarwood, S. J., Scotland, G., Huston, E., Beard, M. B., Ross, A. H., Houslay, E. S., and Houslay, M. D. (1999). Association with the SRC family tyrosyl kinase LYN triggers a conformational change in the catalytic region of human cAMP-specific phosphodiesterase HSPDE4A4B. Consequences for rolipram inhibition. *J Biol Chem* 274, 11796-11810.
- Mercer, K., Chiloeches, A., Huser, M., Kiernan, M., Marais, R., and Pritchard, C. (2002). ERK signalling and oncogene transformation are not impaired in cells lacking A-Raf. *Oncogene* 21, 347-355.
- Mercer, K. E., and Pritchard, C. A. (2003). Raf proteins and cancer: B-Raf is identified as a mutational target. *Biochim Biophys Acta* 1653, 25-40.
- Michaud, N. R., Fabian, J. R., Mathes, K. D., and Morrison, D. K. (1995). 14-3-3 is not essential for Raf-1 function: identification of Raf-1 proteins that are biologically activated in a 14-3-3- and Ras-independent manner. *Mol Cell Biol* 15, 3390-3397.

- Michaud, N. R., Therrien, M., Cacace, A., Edsall, L. C., Spiegel, S., Rubin, G. M., and Morrison, D. K. (1997). KSR stimulates Raf-1 activity in a kinase-independent manner. *Proc Natl Acad Sci U S A* *94*, 12792-12796.
- Mikula, M., Schreiber, M., Husak, Z., Kucerova, L., Ruth, J., Wieser, R., Zatloukal, K., Beug, H., Wagner, E. F., and Baccarini, M. (2001). Embryonic lethality and fetal liver apoptosis in mice lacking the c-raf-1 gene. *Embo J* *20*, 1952-1962.
- Minden, A., Lin, A., McMahon, M., Lange-Carter, C., Derijard, B., Davis, R. J., Johnson, G. L., and Karin, M. (1994). Differential activation of ERK and JNK mitogen-activated protein kinases by Raf-1 and MEKK. *Science* *266*, 1719-1723.
- Mizutani, S., Inouye, K., Koide, H., and Kaziro, Y. (2001). Involvement of B-Raf in Ras-induced Raf-1 activation. *FEBS Lett* *507*, 295-298.
- Moghal, N., and Sternberg, P. W. (2003). The epidermal growth factor system in *Caenorhabditis elegans*. *Exp Cell Res* *284*, 150-159.
- Mollereau, B., and Domingos, P. M. (2005). Photoreceptor differentiation in *Drosophila*: from immature neurons to functional photoreceptors. *Dev Dyn* *232*, 585-592.
- Morrison, D. K. (2001). KSR: a MAPK scaffold of the Ras pathway? *J Cell Sci* *114*, 1609-1612.
- Morrison, D. K. (2004). Cancer: enzymes play molecular tag. *Nature* *428*, 813-815.
- Morrison, D. K., and Cutler, R. E. (1997). The complexity of Raf-1 regulation. *Curr Opin Cell Biol* *9*, 174-179.
- Morrison, D. K., and Davis, R. J. (2003). Regulation of MAP kinase signaling modules by scaffold proteins in mammals. *Annu Rev Cell Dev Biol* *19*, 91-118.
- Morrison, D. K., Heidecker, G., Rapp, U. R., and Copeland, T. D. (1993). Identification of the major phosphorylation sites of the Raf-1 kinase. *J Biol Chem* *268*, 17309-17316.
- Morrison, D. K., Murakami, M. S., and Cleghon, V. (2000). Protein kinases and phosphatases in the *Drosophila* genome. *J Cell Biol* *150*, F57-62.
- Muller, J., Cacace, A. M., Lyons, W. E., McGill, C. B., and Morrison, D. K. (2000). Identification of B-KSR1, a novel brain-specific isoform of KSR1 that functions in neuronal signaling. *Mol Cell Biol* *20*, 5529-5539.
- Muller, J., Ory, S., Copeland, T., Piwnicka-Worms, H., and Morrison, D. K. (2001). C-TAK1 regulates Ras signaling by phosphorylating the MAPK scaffold, KSR1. *Mol Cell* *8*, 983-993.
- Murakami, M. S., and Morrison, D. K. (2001). Raf-1 without MEK? *Sci STKE* *2001*, PE30.

- Murphy, L. O., Smith, S., Chen, R. H., Fingar, D. C., and Blenis, J. (2002). Molecular interpretation of ERK signal duration by immediate early gene products. *Nat Cell Biol* 4, 556-564.
- Nemoto, S., Xiang, J., Huang, S., and Lin, A. (1998). Induction of apoptosis by SB202190 through inhibition of p38beta mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem* 273, 16415-16420.
- Nguyen, A., Burack, W. R., Stock, J. L., Kortum, R., Chaika, O. V., Afkarian, M., Muller, W. J., Murphy, K. M., Morrison, D. K., Lewis, R. E., *et al.* (2002). Kinase suppressor of Ras (KSR) is a scaffold which facilitates mitogen-activated protein kinase activation in vivo. *Mol Cell Biol* 22, 3035-3045.
- Nimnual, A., and Bar-Sagi, D. (2002). The two hats of SOS. *Sci STKE* 2002, PE36.
- Nolen, B., Taylor, S., and Ghosh, G. (2004). Regulation of protein kinases; controlling activity through activation segment conformation. *Mol Cell* 15, 661-675.
- O'Kane, C. J. (2003). Modelling human diseases in *Drosophila* and *Caenorhabditis*. *Semin Cell Dev Biol* 14, 3-10.
- O'Neill, E., and Kolch, W. (2004). Conferring specificity on the ubiquitous Raf/MEK signalling pathway. *Br J Cancer* 90, 283-288.
- O'Neill, E., and Kolch, W. (2005). Taming the Hippo: Raf-1 controls apoptosis by suppressing MST2/Hippo. *Cell Cycle* 4, 365-367.
- O'Neill, E., Rushworth, L., Baccarini, M., and Kolch, W. (2004). Role of the kinase MST2 in suppression of apoptosis by the proto-oncogene product Raf-1. *Science* 306, 2267-2270.
- O'Neill, E. E., Matallanas, D., and Kolch, W. (2005). Mammalian sterile 20-like kinases in tumor suppression: an emerging pathway. *Cancer Res* 65, 5485-5487.
- Ohmachi, M., Rocheleau, C. E., Church, D., Lambie, E., Schedl, T., and Sundaram, M. V. (2002). *C. elegans* ksr-1 and ksr-2 have both unique and redundant functions and are required for MPK-1 ERK phosphorylation. *Curr Biol* 12, 427-433.
- Ohtakara, K., Nishizawa, M., Izawa, I., Hata, Y., Matsushima, S., Taki, W., Inada, H., Takai, Y., and Inagaki, M. (2002). Densin-180, a synaptic protein, links to PSD-95 through its direct interaction with MAGUIN-1. *Genes Cells* 7, 1149-1160.
- Olson, M. F., and Marais, R. (2000). Ras protein signalling. *Semin Immunol* 12, 63-73.
- Ory, S., and Morrison, D. K. (2004). Signal transduction: implications for Ras-dependent ERK signaling. *Curr Biol* 14, R277-278.

- Ory, S., Zhou, M., Conrads, T. P., Veenstra, T. D., and Morrison, D. K. (2003). Protein phosphatase 2A positively regulates Ras signaling by dephosphorylating KSR1 and Raf-1 on critical 14-3-3 binding sites. *Curr Biol* 13, 1356-1364.
- Pages, G., Guerin, S., Grall, D., Bonino, F., Smith, A., Anjuere, F., Auberger, P., and Pouyssegur, J. (1999). Defective thymocyte maturation in p44 MAP kinase (Erk 1) knockout mice. *Science* 286, 1374-1377.
- Park, S. H., Zarrinpar, A., and Lim, W. A. (2003). Rewiring MAP kinase pathways using alternative scaffold assembly mechanisms. *Science* 299, 1061-1064.
- Parrini, M. C., Lei, M., Harrison, S. C., and Mayer, B. J. (2002). Pak1 kinase homodimers are autoinhibited in trans and dissociated upon activation by Cdc42 and Rac1. *Mol Cell* 9, 73-83.
- Pawson, T. (2002). Regulation and targets of receptor tyrosine kinases. *Eur J Cancer* 38 *Suppl* 5, S3-10.
- Pawson, T. (2003). Organization of cell-regulatory systems through modular-protein-interaction domains. *Philos Transact A Math Phys Eng Sci* 361, 1251-1262.
- Pawson, T., and Nash, P. (2003). Assembly of cell regulatory systems through protein interaction domains. *Science* 300, 445-452.
- Pawson, T., Raina, M., and Nash, P. (2002). Interaction domains: from simple binding events to complex cellular behavior. *FEBS Lett* 513, 2-10.
- Pawson, T., and Scott, J. D. (1997). Signaling through scaffold, anchoring, and adaptor proteins. *Science* 278, 2075-2080.
- Pearson, G., Bumeister, R., Henry, D. O., Cobb, M. H., and White, M. A. (2000). Uncoupling Raf1 from MEK1/2 impairs only a subset of cellular responses to Raf activation. *J Biol Chem* 275, 37303-37306.
- Pearson, G., Robinson, F., Beers Gibson, T., Xu, B. E., Karandikar, M., Berman, K., and Cobb, M. H. (2001). Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocr Rev* 22, 153-183.
- Philips, M. R. (2004). Sef: a MEK/ERK catcher on the Golgi. *Mol Cell* 15, 168-169.
- Ponting, C. P. (1995). SAM: a novel motif in yeast sterile and *Drosophila* polyhomeotic proteins. *Protein Sci* 4, 1928-1930.
- Ponting, C. P., Phillips, C., Davies, K. E., and Blake, D. J. (1997). PDZ domains: targeting signalling molecules to sub-membranous sites. *Bioessays* 19, 469-479.

- Potter, L. R., and Hunter, T. (1998). Phosphorylation of the kinase homology domain is essential for activation of the A-type natriuretic peptide receptor. *Mol Cell Biol* 18, 2164-2172.
- Pouyssegur, J., Volmat, V., and Lenormand, P. (2002). Fidelity and spatio-temporal control in MAP kinase (ERKs) signalling. *Biochem Pharmacol* 64, 755-763.
- Prehoda, K. E., Scott, J. A., Mullins, R. D., and Lim, W. A. (2000). Integration of multiple signals through cooperative regulation of the N-WASP-Arp2/3 complex. *Science* 290, 801-806.
- Prior, I. A., Harding, A., Yan, J., Sluimer, J., Parton, R. G., and Hancock, J. F. (2001). GTP-dependent segregation of H-ras from lipid rafts is required for biological activity. *Nat Cell Biol* 3, 368-375.
- Pritchard, C. A., Bolin, L., Slattery, R., Murray, R., and McMahon, M. (1996). Post-natal lethality and neurological and gastrointestinal defects in mice with targeted disruption of the A-Raf protein kinase gene. *Curr Biol* 6, 614-617.
- Pritchard, C. A., Samuels, M. L., Bosch, E., and McMahon, M. (1995). Conditionally oncogenic forms of the A-Raf and B-Raf protein kinases display different biological and biochemical properties in NIH 3T3 cells. *Mol Cell Biol* 15, 6430-6442.
- Qian, Z., Okuhara, D., Abe, M. K., and Rosner, M. R. (1999). Molecular cloning and characterization of a mitogen-activated protein kinase-associated intracellular chloride channel. *J Biol Chem* 274, 1621-1627.
- Qiao, F., and Bowie, J. U. (2005). The many faces of SAM. *Sci STKE* 2005, re7.
- Qiao, F., Song, H., Kim, C. A., Sawaya, M. R., Hunter, J. B., Gingery, M., Rebay, I., Courey, A. J., and Bowie, J. U. (2004). Derepression by depolymerization; structural insights into the regulation of Yan by Mae. *Cell* 118, 163-173.
- Raabe, T., and Rapp, U. R. (2002). KSR--a regulator and scaffold protein of the MAPK pathway. *Sci STKE* 2002, PE28.
- Raabe, T., and Rapp, U. R. (2003). Ras signaling: PP2A puts Ksr and Raf in the right place. *Curr Biol* 13, R635-637.
- Rabizadeh, S., Xavier, R. J., Ishiguro, K., Bernabeortiz, J., Lopez-Illasaca, M., Khokhlatchev, A., Mollahan, P., Pfeifer, G. P., Avruch, J., and Seed, B. (2004). The scaffold protein CNK1 interacts with the tumor suppressor RASSF1A and augments RASSF1A-induced cell death. *J Biol Chem* 279, 29247-29254.
- Radke, K., Johnson, K., Guo, R., Davidson, A., and Ambrosio, L. (2001). *Drosophila*-raf acts to elaborate dorsoventral pattern in the ectoderm of developing embryos. *Genetics* 159, 1031-1044.

- Raman, M., and Cobb, M. H. (2003). MAP kinase modules: many roads home. *Curr Biol* 13, R886-888.
- Rebay, I. (2002). Keeping the receptor tyrosine kinase signaling pathway in check: lessons from *Drosophila*. *Dev Biol* 251, 1-17.
- Reddy, K. B., Nabha, S. M., and Atanaskova, N. (2003). Role of MAP kinase in tumor progression and invasion. *Cancer Metastasis Rev* 22, 395-403.
- Remy, I., Wilson, I. A., and Michnick, S. W. (1999). Erythropoietin receptor activation by a ligand-induced conformation change. *Science* 283, 990-993.
- Resat, H., Straatsma, T.P., Dixon, D.A., and Miller, J.H. (2001). The arginine finger of RasGAP helps Gln-61 align the nucleophilic water in GAP-stimulated hydrolysis of GTP. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 98, 6033-8.
- Resh, M. D. (1996). Regulation of cellular signalling by fatty acid acylation and prenylation of signal transduction proteins. *Cell Signal* 8, 403-412.
- Reuther, G. W., and Der, C. J. (2000). The Ras branch of small GTPases: Ras family members don't fall far from the tree. *Curr Opin Cell Biol* 12, 157-165.
- Ridley, A. J. (2004). Rho proteins and cancer. *Breast Cancer Res Treat* 84, 13-19.
- Rizzo, M. A., Shome, K., Vasudevan, C., Stolz, D. B., Sung, T. C., Frohman, M. A., Watkins, S. C., and Romero, G. (1999). Phospholipase D and its product, phosphatidic acid, mediate agonist-dependent raf-1 translocation to the plasma membrane and the activation of the mitogen-activated protein kinase pathway. *J Biol Chem* 274, 1131-1139.
- Rizzo, M. A., Shome, K., Watkins, S. C., and Romero, G. (2000). The recruitment of Raf-1 to membranes is mediated by direct interaction with phosphatidic acid and is independent of association with Ras. *J Biol Chem* 275, 23911-23918.
- Rocheleau, C. E., Ronnlund, A., Tuck, S., and Sundaram, M. V. (2005). *Caenorhabditis elegans* CNK-1 promotes Raf activation but is not essential for Ras/Raf signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*.
- Rohatgi, R., Ho, H. Y., and Kirschner, M. W. (2000). Mechanism of N-WASP activation by CDC42 and phosphatidylinositol 4, 5-bisphosphate. *J Cell Biol* 150, 1299-1310.
- Rommel, C., Radziwill, G., Moelling, K., and Hafen, E. (1997). Negative regulation of Raf activity by binding of 14-3-3 to the amino terminus of Raf in vivo. *Mech Dev* 64, 95-104.
- Rossomando, A. J., Dent, P., Sturgill, T. W., and Marshak, D. R. (1994). Mitogen-activated protein kinase kinase 1 (MKK1) is negatively regulated by threonine phosphorylation. *Mol Cell Biol* 14, 1594-1602.

- Roy, F., Laberge, G., Douziech, M., Ferland-McCollough, D., and Therrien, M. (2002). KSR is a scaffold required for activation of the ERK/MAPK module. *Genes Dev* 16, 427-438.
- Roy, F., and Therrien, M. (2002). MAP kinase module: the Ksr connection. *Curr Biol* 12, R325-327.
- Russo, A. A., Jeffrey, P. D., Patten, A. K., Massague, J., and Pavletich, N. P. (1996). Crystal structure of the p27Kip1 cyclin-dependent-kinase inhibitor bound to the cyclin A-Cdk2 complex. *Nature* 382, 325-331.
- Saba-El-Leil, M. K., Vella, F. D., Vernay, B., Voisin, L., Chen, L., Labrecque, N., Ang, S. L., and Meloche, S. (2003). An essential function of the mitogen-activated protein kinase Erk2 in mouse trophoblast development. *EMBO Rep* 4, 964-968.
- Sakaguchi, A., Matsumoto, K., and Hisamoto, N. (2004). Roles of MAP kinase cascades in *Caenorhabditis elegans*. *J Biochem (Tokyo)* 136, 7-11.
- Sakurai, H., Miyoshi, H., Mizukami, J., and Sugita, T. (2000). Phosphorylation-dependent activation of TAK1 mitogen-activated protein kinase kinase kinase by TAB1. *FEBS Lett* 474, 141-145.
- Sasaki, A., Taketomi, T., Kato, R., Saeki, K., Nonami, A., Sasaki, M., Kuriyama, M., Saito, N., Shibuya, M., and Yoshimura, A. (2003). Mammalian Sprouty4 suppresses Ras-independent ERK activation by binding to Raf1. *Nat Cell Biol* 5, 427-432.
- Schaeffer, H. J., Catling, A. D., Eblen, S. T., Collier, L. S., Krauss, A., and Weber, M. J. (1998). MP1: a MEK binding partner that enhances enzymatic activation of the MAP kinase cascade. *Science* 281, 1668-1671.
- Schaeffer, H. J., and Weber, M. J. (1999). Mitogen-activated protein kinases: specific messages from ubiquitous messengers. *Mol Cell Biol* 19, 2435-2444.
- Scheffzek, K., Ahmadian, M. R., Kabsch, W., Wiesmuller, L., Lautwein, A., Schmitz, F., and Wittinghofer, A. (1997). The Ras-RasGAP complex: structural basis for GTPase activation and its loss in oncogenic Ras mutants. *Science* 277, 333-338.
- Scheffzek, K., Ahmadian, M. R., and Wittinghofer, A. (1998). GTPase-activating proteins: helping hands to complement an active site. *Trends Biochem Sci* 23, 257-262.
- Scheid, M. P., Schubert, K. M., and Duronio, V. (1999). Regulation of bad phosphorylation and association with Bcl-x(L) by the MAPK/Erk kinase. *J Biol Chem* 274, 31108-31113.
- Schlessinger, J. (2000). Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* 103, 211-225.
- Schumacher, S., Laass, K., Kant, S., Shi, Y., Visel, A., Gruber, A. D., Kotlyarov, A., and Gaestel, M. (2004). Scaffolding by ERK3 regulates MK5 in development. *Embo J* 23, 4770-4779.

- Sebolt-Leopold, J. S., and Herrera, R. (2004). Targeting the mitogen-activated protein kinase cascade to treat cancer. *Nat Rev Cancer* 4, 937-947.
- Seidel, J. J., and Graves, B. J. (2002). An ERK2 docking site in the Pointed domain distinguishes a subset of ETS transcription factors. *Genes Dev* 16, 127-137.
- Selfors, L. M., Schutzman, J. L., Borland, C. Z., and Stern, M. J. (1998). soc-2 encodes a leucine-rich repeat protein implicated in fibroblast growth factor receptor signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 6903-6908.
- Sendoh, H., Hu, C. D., Wu, D., Song, C., Yamawaki-Kataoka, Y., Kotani, J., Okada, T., Shima, F., Kariya, K., and Kataoka, T. (2000). Role of Raf-1 conserved region 2 in regulation of Ras-dependent Raf-1 activation. *Biochem Biophys Res Commun* 271, 596-602.
- Seternes, O. M., Mikalsen, T., Johansen, B., Michaelsen, E., Armstrong, C. G., Morrice, N. A., Turgeon, B., Meloche, S., Moens, U., and Keyse, S. M. (2004). Activation of MK5/PRAK by the atypical MAP kinase ERK3 defines a novel signal transduction pathway. *Embo J* 23, 4780-4791.
- Sette, C., Inouye, C. J., Stroschein, S. L., Iaquinta, P. J., and Thorner, J. (2000). Mutational analysis suggests that activation of the yeast pheromone response mitogen-activated protein kinase pathway involves conformational changes in the Ste5 scaffold protein. *Mol Biol Cell* 11, 4033-4049.
- Sharma, C., Vomastek, T., Tarcsafalvi, A., Catling, A. D., Schaeffer, H. J., Eblen, S. T., and Weber, M. J. (2005). MEK partner 1 (MP1): regulation of oligomerization in MAP kinase signaling. *J Cell Biochem* 94, 708-719.
- Sharma, R. K., Yadav, P., and Duda, T. (2001). Allosteric regulatory step and configuration of the ATP-binding pocket in atrial natriuretic factor receptor guanylate cyclase transduction mechanism. *Can J Physiol Pharmacol* 79, 682-691.
- Sharrocks, A. D., Yang, S. H., and Galanis, A. (2000). Docking domains and substrate-specificity determination for MAP kinases. *Trends Biochem Sci* 25, 448-453.
- Shields, J. M., Pruitt, K., McFall, A., Shaub, A., and Der, C. J. (2000). Understanding Ras: 'it ain't over 'til it's over'. *Trends Cell Biol* 10, 147-154.
- Shimamura, A., Ballif, B. A., Richards, S. A., and Blenis, J. (2000). Rsk1 mediates a MEK-MAP kinase cell survival signal. *Curr Biol* 10, 127-135.
- Sidovar, M. F., Kozlowski, P., Lee, J. W., Collins, M. A., He, Y., and Graves, L. M. (2000). Phosphorylation of serine 43 is not required for inhibition of c-Raf kinase by the cAMP-dependent protein kinase. *J Biol Chem* 275, 28688-28694.

- Sieburth, D. S., Sun, Q., and Han, M. (1998). SUR-8, a conserved Ras-binding protein with leucine-rich repeats, positively regulates Ras-mediated signaling in *C. elegans*. *Cell* *94*, 119-130.
- Sieburth, D. S., Sundaram, M., Howard, R. M., and Han, M. (1999). A PP2A regulatory subunit positively regulates Ras-mediated signaling during *Caenorhabditis elegans* vulval induction. *Genes Dev* *13*, 2562-2569.
- Silvius, J. R. (2002). Mechanisms of Ras protein targeting in mammalian cells. *J Membr Biol* *190*, 83-92.
- Slack-Davis, J. K., Eblen, S. T., Zecevic, M., Boerner, S. A., Tarcsafalvi, A., Diaz, H. B., Marshall, M. S., Weber, M. J., Parsons, J. T., and Catling, A. D. (2003). PAK1 phosphorylation of MEK1 regulates fibronectin-stimulated MAPK activation. *J Cell Biol* *162*, 281-291.
- Smalley, K. S. (2003). A pivotal role for ERK in the oncogenic behaviour of malignant melanoma? *Int J Cancer* *104*, 527-532.
- Smith, F. D., and Scott, J. D. (2002). Signaling complexes: junctions on the intracellular information super highway. *Curr Biol* *12*, R32-40.
- Spoerner, M., Herrmann, C., Vetter, I. R., Kalbitzer, H. R., and Wittinghofer, A. (2001). Dynamic properties of the Ras switch I region and its importance for binding to effectors. *Proc Natl Acad Sci U S A* *98*, 4944-4949.
- Sprang, S. R. (1997). GAP into the breach. *Science* *277*, 329-330.
- St Johnston, D. (2002). The art and design of genetic screens: *Drosophila melanogaster*. *Nat Rev Genet* *3*, 176-188.
- Stapleton, D., Balan, I., Pawson, T., and Sicheri, F. (1999). The crystal structure of an Eph receptor SAM domain reveals a mechanism for modular dimerization. *Nat Struct Biol* *6*, 44-49.
- Stewart, S., Sundaram, M., Zhang, Y., Lee, J., Han, M., and Guan, K. L. (1999). Kinase suppressor of Ras forms a multiprotein signaling complex and modulates MEK localization. *Mol Cell Biol* *19*, 5523-5534.
- Stokoe, D., and McCormick, F. (1997). Activation of c-Raf-1 by Ras and Src through different mechanisms: activation in vivo and in vitro. *Embo J* *16*, 2384-2396.
- Stork, P. J. (2005). Directing NGF's actions: it's a Rap. *Nat Cell Biol* *7*, 338-339.
- Sugimoto, T., Stewart, S., Han, M., and Guan, K. L. (1998). The kinase suppressor of Ras (KSR) modulates growth factor and Ras signaling by uncoupling Elk-1 phosphorylation from MAP kinase activation. *Embo J* *17*, 1717-1727.

- Sun, H., King, A. J., Diaz, H. B., and Marshall, M. S. (2000). Regulation of the protein kinase Raf-1 by oncogenic Ras through phosphatidylinositol 3-kinase, Cdc42/Rac and Pak. *Curr Biol* 10, 281-284.
- Sundaram, M., and Han, M. (1995). The *C. elegans* ksr-1 gene encodes a novel Raf-related kinase involved in Ras-mediated signal transduction. *Cell* 83, 889-901.
- Sundaram, M. V. (2004). Vulval development: the battle between Ras and Notch. *Curr Biol* 14, R311-313.
- Symons, M., and Takai, Y. (2001). Ras GTPases: singing in tune. *Sci STKE* 2001, PE1.
- Takai, Y., Sasaki, T., and Matozaki, T. (2001). Small GTP-binding proteins. *Physiol Rev* 81, 153-208.
- Takekawa, M., Tatebayashi, K., and Saito, H. (2005). Conserved docking site is essential for activation of mammalian MAP kinase kinases by specific MAP kinase kinase kinases. *Mol Cell* 18, 295-306.
- Tan, P. B., and Kim, S. K. (1999). Signaling specificity: the RTK/RAS/MAP kinase pathway in metazoans. *Trends Genet* 15, 145-149.
- Tanoue, T., Adachi, M., Moriguchi, T., and Nishida, E. (2000). A conserved docking motif in MAP kinases common to substrates, activators and regulators. *Nat Cell Biol* 2, 110-116.
- Tanoue, T., Maeda, R., Adachi, M., and Nishida, E. (2001). Identification of a docking groove on ERK and p38 MAP kinases that regulates the specificity of docking interactions. *Embo J* 20, 466-479.
- Tanoue, T., and Nishida, E. (2002). Docking interactions in the mitogen-activated protein kinase cascades. *Pharmacol Ther* 93, 193-202.
- Tanoue, T., and Nishida, E. (2003). Molecular recognitions in the MAP kinase cascades. *Cell Signal* 15, 455-462.
- Taylor, S. S., and Radzio-Andzelm, E. (1997). Protein kinase inhibition: natural and synthetic variations on a theme. *Curr Opin Chem Biol* 1, 219-226.
- Taylor, S. S., Radzio-Andzelm, E., and Hunter, T. (1995). How do protein kinases discriminate between serine/threonine and tyrosine? Structural insights from the insulin receptor protein-tyrosine kinase. *Faseb J* 9, 1255-1266.
- Teis, D., Wunderlich, W., and Huber, L. A. (2002). Localization of the MP1-MAPK scaffold complex to endosomes is mediated by p14 and required for signal transduction. *Dev Cell* 3, 803-814.

- Therrien, M., Chang, H. C., Solomon, N. M., Karim, F. D., Wassarman, D. A., and Rubin, G. M. (1995). KSR, a novel protein kinase required for RAS signal transduction. *Cell* *83*, 879-888.
- Therrien, M., Michaud, N. R., Rubin, G. M., and Morrison, D. K. (1996). KSR modulates signal propagation within the MAPK cascade. *Genes Dev* *10*, 2684-2695.
- Therrien, M., Wong, A. M., Kwan, E., and Rubin, G. M. (1999). Functional analysis of CNK in RAS signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* *96*, 13259-13263.
- Therrien, M., Wong, A. M., and Rubin, G. M. (1998). CNK, a RAF-binding multidomain protein required for RAS signaling. *Cell* *95*, 343-353.
- Thomas, G., de Pablo, F., Schlessinger, J., and Moscat, J. (2000). The ins and outs of protein phosphorylation. Workshop report: control of signaling by protein phosphorylation. *EMBO Rep* *1*, 11-15.
- Thompson, N., and Lyons, J. (2005). Recent progress in targeting the Raf/MEK/ERK pathway with inhibitors in cancer drug discovery. *Curr Opin Pharmacol* *5*, 350-356.
- Thorson, J. A., Yu, L. W., Hsu, A. L., Shih, N. Y., Graves, P. R., Tanner, J. W., Allen, P. M., Piwnicka-Worms, H., and Shaw, A. S. (1998). 14-3-3 proteins are required for maintenance of Raf-1 phosphorylation and kinase activity. *Mol Cell Biol* *18*, 5229-5238.
- Tognon, C. E., Mackereth, C. D., Somasiri, A. M., McIntosh, L. P., and Sorensen, P. H. (2004). Mutations in the SAM domain of the ETV6-NTRK3 chimeric tyrosine kinase block polymerization and transformation activity. *Mol Cell Biol* *24*, 4636-4650.
- Torii, S., Kusakabe, M., Yamamoto, T., Maekawa, M., and Nishida, E. (2004). Sef is a spatial regulator for Ras/MAP kinase signaling. *Dev Cell* *7*, 33-44.
- Torii, S., Nakayama, K., Yamamoto, T., and Nishida, E. (2004). Regulatory mechanisms and function of ERK MAP kinases. *J Biochem (Tokyo)* *136*, 557-561.
- Trakul, N., and Rosner, M. R. (2005). Modulation of the MAP kinase signaling cascade by Raf kinase inhibitory protein. *Cell Res* *15*, 19-23.
- Tran, N. H., and Frost, J. A. (2003). Phosphorylation of Raf-1 by p21-activated kinase 1 and Src regulates Raf-1 autoinhibition. *J Biol Chem* *278*, 11221-11226.
- Tran, N. H., Wu, X., and Frost, J. A. (2005). B-Raf and Raf-1 are regulated by distinct autoregulatory mechanisms. *J Biol Chem* *280*, 16244-16253.
- Traverse, S., Seedorf, K., Paterson, H., Marshall, C. J., Cohen, P., and Ullrich, A. (1994). EGF triggers neuronal differentiation of PC12 cells that overexpress the EGF receptor. *Curr Biol* *4*, 694-701.

- Troppmair, J., and Rapp, U. R. (2003). Raf and the road to cell survival: a tale of bad spells, ring bearers and detours. *Biochem Pharmacol* 66, 1341-1345.
- Tsang, M., and Dawid, I. B. (2004). Promotion and attenuation of FGF signaling through the Ras-MAPK pathway. *Sci STKE* 2004, pe17.
- Tsang, M., Friesel, R., Kudoh, T., and Dawid, I. B. (2002). Identification of Sef, a novel modulator of FGF signalling. *Nat Cell Biol* 4, 165-169.
- Tsavachidou, D., Coleman, M. L., Athanasiadis, G., Li, S., Licht, J. D., Olson, M. F., and Weber, B. L. (2004). SPRY2 is an inhibitor of the ras/extracellular signal-regulated kinase pathway in melanocytes and melanoma cells with wild-type BRAF but not with the V599E mutant. *Cancer Res* 64, 5556-5559.
- Tsunoda, S., Sierralta, J., Sun, Y., Bodner, R., Suzuki, E., Becker, A., Socolich, M., and Zuker, C. S. (1997). A multivalent PDZ-domain protein assembles signalling complexes in a G-protein-coupled cascade. *Nature* 388, 243-249.
- Tsunoda, S., and Zuker, C. S. (1999). The organization of INAD-signaling complexes by a multivalent PDZ domain protein in *Drosophila* photoreceptor cells ensures sensitivity and speed of signaling. *Cell Calcium* 26, 165-171.
- Urano, T., Emkey, R., and Feig, L. A. (1996). Ral-GTPases mediate a distinct downstream signaling pathway from Ras that facilitates cellular transformation. *Embo J* 15, 810-816.
- van Haften, G., Plasterk, R. H., and Tijsterman, M. (2004). Genomic instability and cancer: scanning the *Caenorhabditis elegans* genome for tumor suppressors. *Oncogene* 23, 8366-8375.
- Voas, M. G., and Rebay, I. (2004). Signal integration during development: insights from the *Drosophila* eye. *Dev Dyn* 229, 162-175.
- Vogelstein, B., and Kinzler, K. W. (2004). Cancer genes and the pathways they control. *Nat Med* 10, 789-799.
- Vojtek, A. B., and Der, C. J. (1998). Increasing complexity of the Ras signaling pathway. *J Biol Chem* 273, 19925-19928.
- Volmat, V., Camps, M., Arkinstall, S., Pouyssegur, J., and Lenormand, P. (2001). The nucleus, a site for signal termination by sequestration and inactivation of p42/p44 MAP kinases. *J Cell Sci* 114, 3433-3443.
- Vomastek, T., Schaeffer, H. J., Tarcsafalvi, A., Smolkin, M. E., Bissonette, E. A., and Weber, M. J. (2004). Modular construction of a signaling scaffold: MORG1 interacts with components of the ERK cascade and links ERK signaling to specific agonists. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 6981-6986.

- Vondriska, T. M., Pass, J. M., and Ping, P. (2004). Scaffold proteins and assembly of multiprotein signaling complexes. *J Mol Cell Cardiol* 37, 391-397.
- Vossler, M. R., Yao, H., York, R. D., Pan, M. G., Rim, C. S., and Stork, P. J. (1997). cAMP activates MAP kinase and Elk-1 through a B-Raf- and Rap1-dependent pathway. *Cell* 89, 73-82.
- Wakioka, T., Sasaki, A., Kato, R., Shouda, T., Matsumoto, A., Miyoshi, K., Tsuneoka, M., Komiya, S., Baron, R., and Yoshimura, A. (2001). Spred is a Sprouty-related suppressor of Ras signalling. *Nature* 412, 647-651.
- Walker, S. A., Cullen, P. J., Taylor, J. A., and Lockyer, P. J. (2003). Control of Ras cycling by Ca²⁺. *FEBS Lett* 546, 6-10.
- Wan, P. T., Garnett, M. J., Roe, S. M., Lee, S., Niculescu-Duvaz, D., Good, V. M., Jones, C. M., Marshall, C. J., Springer, C. J., Barford, D., and Marais, R. (2004). Mechanism of activation of the RAF-ERK signaling pathway by oncogenic mutations of B-RAF. *Cell* 116, 855-867.
- Wang, H. G., Rapp, U. R., and Reed, J. C. (1996). Bcl-2 targets the protein kinase Raf-1 to mitochondria. *Cell* 87, 629-638.
- Wang, H. G., Takayama, S., Rapp, U. R., and Reed, J. C. (1996). Bcl-2 interacting protein, BAG-1, binds to and activates the kinase Raf-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 7063-7068.
- Wang, S., Ghosh, R. N., and Chellappan, S. P. (1998). Raf-1 physically interacts with Rb and regulates its function: a link between mitogenic signaling and cell cycle regulation. *Mol Cell Biol* 18, 7487-7498.
- Wang, Z., Harkins, P. C., Ulevitch, R. J., Han, J., Cobb, M. H., and Goldsmith, E. J. (1997). The structure of mitogen-activated protein kinase p38 at 2.1-Å resolution. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 2327-2332.
- Wassarman, D. A., Solomon, N. M., Chang, H. C., Karim, F. D., Therrien, M., and Rubin, G. M. (1996). Protein phosphatase 2A positively and negatively regulates Ras1-mediated photoreceptor development in *Drosophila*. *Genes Dev* 10, 272-278.
- Weber, C. K., Slupsky, J. R., Herrmann, C., Schuler, M., Rapp, U. R., and Block, C. (2000). Mitogenic signaling of Ras is regulated by differential interaction with Raf isozymes. *Oncogene* 19, 169-176.
- Wellbrock, C., Karasarides, M., and Marais, R. (2004). The RAF proteins take centre stage. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5, 875-885.
- Wellbrock, C., Ogilvie, L., Hedley, D., Karasarides, M., Martin, J., Niculescu-Duvaz, D., Springer, C. J., and Marais, R. (2004). V599EB-RAF is an oncogene in melanocytes. *Cancer Res* 64, 2338-2342.

- White, M. A., Nicolette, C., Minden, A., Polverino, A., Van Aelst, L., Karin, M., and Wigler, M. H. (1995). Multiple Ras functions can contribute to mammalian cell transformation. *Cell* 80, 533-541.
- Whitmarsh, A. J., and Davis, R. J. (1996). Transcription factor AP-1 regulation by mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways. *J Mol Med* 74, 589-607.
- Wick, M. J., Ramos, F. J., Chen, H., Quon, M. J., Dong, L. Q., and Liu, F. (2003). Mouse 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 undergoes dimerization and transphosphorylation in the activation loop. *J Biol Chem* 278, 42913-42919.
- Widmann, C., Gibson, S., Jarpe, M. B., and Johnson, G. L. (1999). Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human. *Physiol Rev* 79, 143-180.
- Wilsbacher, J. L., Goldsmith, E. J., and Cobb, M. H. (1999). Phosphorylation of MAP kinases by MAP/ERK involves multiple regions of MAP kinases. *J Biol Chem* 274, 16988-16994.
- Wittinghofer, F. (1998). Ras signalling. Caught in the act of the switch-on. *Nature* 394, 317, 319-320.
- Wixler, V., Smola, U., Schuler, M., and Rapp, U. (1996). Differential regulation of Raf isozymes by growth versus differentiation inducing factors in PC12 pheochromocytoma cells. *FEBS Lett* 385, 131-137.
- Wojnowski, L., Stancato, L. F., Lerner, A. C., Rapp, U. R., and Zimmer, A. (2000). Overlapping and specific functions of Braf and Craf-1 proto-oncogenes during mouse embryogenesis. *Mech Dev* 91, 97-104.
- Wojnowski, L., Stancato, L. F., Zimmer, A. M., Hahn, H., Beck, T. W., Lerner, A. C., Rapp, U. R., and Zimmer, A. (1998). Craf-1 protein kinase is essential for mouse development. *Mech Dev* 76, 141-149.
- Wojnowski, L., Zimmer, A. M., Beck, T. W., Hahn, H., Bernal, R., Rapp, U. R., and Zimmer, A. (1997). Endothelial apoptosis in Braf-deficient mice. *Nat Genet* 16, 293-297.
- Woods, D., Parry, D., Cherwinski, H., Bosch, E., Lees, E., and McMahon, M. (1997). Raf-induced proliferation or cell cycle arrest is determined by the level of Raf activity with arrest mediated by p21Cip1. *Mol Cell Biol* 17, 5598-5611.
- Wu, C., Leberer, E., Thomas, D. Y., and Whiteway, M. (1999). Functional characterization of the interaction of Ste50p with Ste11p MAPKKK in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* 10, 2425-2440.
- Wu, S., Huang, J., Dong, J., and Pan, D. (2003). hippo encodes a Ste-20 family protein kinase that restricts cell proliferation and promotes apoptosis in conjunction with salvador and warts. *Cell* 114, 445-456.

Wunderlich, W., Fialka, I., Teis, D., Alpi, A., Pfeifer, A., Parton, R. G., Lottspeich, F., and Huber, L. A. (2001). A novel 14-kilodalton protein interacts with the mitogen-activated protein kinase scaffold mp1 on a late endosomal/lysosomal compartment. *J Cell Biol* 152, 765-776.

Wybenga-Groot, L.E., Baskin, B., Ong, S.H., Tong, J., Pawson, T., and Sicheri, F.(2001). Structural basis for autoinhibition of the Ephb2 receptor tyrosine kinase by the unphosphorylated juxtamembrane region. *Cell* 106, 745-57.

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

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

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

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

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

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

Xu, B., Stippec, S., Robinson, F. L., and Cobb, M. H. (2001). Hydrophobic as well as charged residues in both MEK1 and ERK2 are important for their proper docking. *J Biol Chem* 276, 26509-26515.

Xu, B., Wilsbacher, J. L., Collisson, T., and Cobb, M. H. (1999). The N-terminal ERK-binding site of MEK1 is required for efficient feedback phosphorylation by ERK2 in vitro and ERK activation in vivo. *J Biol Chem* 274, 34029-34035.

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

Yan, J., Roy, S., Apolloni, A., Lane, A., and Hancock, J. F. (1998). Ras isoforms vary in their ability to activate Raf-1 and phosphoinositide 3-kinase. *J Biol Chem* 273, 24052-24056.

- Yan, M., Dai, T., Deak, J. C., Kyriakis, J. M., Zon, L. I., Woodgett, J. R., and Templeton, D. J. (1994). Activation of stress-activated protein kinase by MEKK1 phosphorylation of its activator SEK1. *Nature* *372*, 798-800.
- Yan, M., and Templeton, D. J. (1994). Identification of 2 serine residues of MEK-1 that are differentially phosphorylated during activation by raf and MEK kinase. *J Biol Chem* *269*, 19067-19073.
- Yang, S. H., Whitmarsh, A. J., Davis, R. J., and Sharrocks, A. D. (1998). Differential targeting of MAP kinases to the ETS-domain transcription factor Elk-1. *Embo J* *17*, 1740-1749.
- Yao, I., Hata, Y., Ide, N., Hirao, K., Deguchi, M., Nishioka, H., Mizoguchi, A., and Takai, Y. (1999). MAGUIN, a novel neuronal membrane-associated guanylate kinase-interacting protein. *J Biol Chem* *274*, 11889-11896.
- Yao, I., Ohtsuka, T., Kawabe, H., Matsuura, Y., Takai, Y., and Hata, Y. (2000). Association of membrane-associated guanylate kinase-interacting protein-1 with Raf-1. *Biochem Biophys Res Commun* *270*, 538-542.
- Yasuda, J., Whitmarsh, A. J., Cavanagh, J., Sharma, M., and Davis, R. J. (1999). The JIP group of mitogen-activated protein kinase scaffold proteins. *Mol Cell Biol* *19*, 7245-7254.
- Yeung, K., Janosch, P., McFerran, B., Rose, D. W., Mischak, H., Sedivy, J. M., and Kolch, W. (2000). Mechanism of suppression of the Raf/MEK/extracellular signal-regulated kinase pathway by the raf kinase inhibitor protein. *Mol Cell Biol* *20*, 3079-3085.
- Yeung, K., Seitz, T., Li, S., Janosch, P., McFerran, B., Kaiser, C., Fee, F., Katsanakis, K. D., Rose, D. W., Mischak, H., *et al.* (1999). Suppression of Raf-1 kinase activity and MAP kinase signalling by RKIP. *Nature* *401*, 173-177.
- Yip-Schneider, M. T., Miao, W., Lin, A., Barnard, D. S., Tzivion, G., and Marshall, M. S. (2000). Regulation of the Raf-1 kinase domain by phosphorylation and 14-3-3 association. *Biochem J* *351*, 151-159.
- York, R. D., Yao, H., Dillon, T., Ellig, C. L., Eckert, S. P., McCleskey, E. W., and Stork, P. J. (1998). Rap1 mediates sustained MAP kinase activation induced by nerve growth factor. *Nature* *392*, 622-626.
- Yoshioka, K. (2004). Scaffold proteins in mammalian MAP kinase cascades. *J Biochem (Tokyo)* *135*, 657-661.
- Yu, W., Fantl, W. J., Harrowe, G., and Williams, L. T. (1998). Regulation of the MAP kinase pathway by mammalian Ksr through direct interaction with MEK and ERK. *Curr Biol* *8*, 56-64.
- Yuen, S. T., Davies, H., Chan, T. L., Ho, J. W., Bignell, G. R., Cox, C., Stephens, P., Edkins, S., Tsui, W. W., Chan, A. S., *et al.* (2002). Similarity of the phenotypic patterns

- associated with BRAF and KRAS mutations in colorectal neoplasia. *Cancer Res* 62, 6451-6455.
- Yujiri, T., Sather, S., Fanger, G. R., and Johnson, G. L. (1998). Role of MEKK1 in cell survival and activation of JNK and ERK pathways defined by targeted gene disruption. *Science* 282, 1911-1914.
- Zang, M., Hayne, C., and Luo, Z. (2002). Interaction between active Pak1 and Raf-1 is necessary for phosphorylation and activation of Raf-1. *J Biol Chem* 277, 4395-4405.
- Zervas, C. G., and Brown, N. H. (2002). Integrin adhesion: when is a kinase a kinase? *Curr Biol* 12, R350-351.
- Zervas, C. G., Gregory, S. L., and Brown, N. H. (2001). *Drosophila* integrin-linked kinase is required at sites of integrin adhesion to link the cytoskeleton to the plasma membrane. *J Cell Biol* 152, 1007-1018.
- Zha, J., Harada, H., Yang, E., Jockel, J., and Korsmeyer, S. J. (1996). Serine phosphorylation of death agonist BAD in response to survival factor results in binding to 14-3-3 not BCL-X(L). *Cell* 87, 619-628.
- Zhang, B. H., and Guan, K. L. (2000). Activation of B-Raf kinase requires phosphorylation of the conserved residues Thr598 and Ser601. *Embo J* 19, 5429-5439.
- Zhang, B. H., Tang, E. D., Zhu, T., Greenberg, M. E., Vojtek, A. B., and Guan, K. L. (2001). Serum- and glucocorticoid-inducible kinase SGK phosphorylates and negatively regulates B-Raf. *J Biol Chem* 276, 31620-31626.
- Zhang, F., Strand, A., Robbins, D., Cobb, M. H., and Goldsmith, E. J. (1994). Atomic structure of the MAP kinase ERK2 at 2.3 Å resolution. *Nature* 367, 704-711.
- Zhang, F. L., and Casey, P. J. (1996). Protein prenylation: molecular mechanisms and functional consequences. *Annu Rev Biochem* 65, 241-269.
- Zhang, Y., Yao, B., Delikat, S., Bayoumy, S., Lin, X. H., Basu, S., McGinley, M., Chan-Hui, P. Y., Lichenstein, H., and Kolesnick, R. (1997). Kinase suppressor of Ras is ceramide-activated protein kinase. *Cell* 89, 63-72.
- Zhong, J., Troppmair, J., and Rapp, U. R. (2001). Independent control of cell survival by Raf-1 and Bcl-2 at the mitochondria. *Oncogene* 20, 4807-4816.
- Zhou, B., Wu, L., Shen, K., Zhang, J., Lawrence, D. S., and Zhang, Z. Y. (2001). Multiple regions of MAP kinase phosphatase 3 are involved in its recognition and activation by ERK2. *J Biol Chem* 276, 6506-6515.
- Ziogas, A., Moelling, K., and Radziwill, G. (2005). CNK1 is a scaffold protein that regulates Src-mediated Raf-1 activation. *J Biol Chem* 280, 24205-24211.

Zwartkruis, F. J., and Bos, J. L. (1999). Ras and Rap1: two highly related small GTPases with distinct function. *Exp Cell Res* 253, 157-165.

Annexe 1

Src42 binding activity regulates *Drosophila* RAF by a novel CNK-dependent derepression mechanism

Gino Laberge, Mélanie Douziech and Marc Therrien*

Institut de Recherche en Immunologie et en Cancérologie, Laboratory of Intracellular Signaling, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada

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

The EMBO Journal advance online publication, 20 January 2005; doi:10.1038/sj.emboj.7600558

Subject Categories: signal transduction

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

Introduction

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

Given its position in the module, RAF is the entry point for RTK-induced upstream events. Three RAF proteins exist in mammals, namely, A-RAF, B-RAF and Raf-1/C-RAF, and one member is present in *Drosophila* or *Caenorhabditis elegans*

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

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

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

*Corresponding author. Institut de Recherche en Immunologie et en Cancérologie, Laboratory of Intracellular Signaling, Université de Montréal, CP 6128 Succursale Centre-Ville, Montreal, Quebec, Canada H3C 3J7. Tel.: +1 514 343 7837; Fax: +1 514 343 6965;

Received: 11 August 2004; accepted: 15 December 2004

signals, hence resulting in lower RAS-induced MAPK signaling output.

Here, we show that the inhibitory effect of the RIR is relieved by an RTK-induced SFK signal. Specifically, we have identified a region located immediately C-terminal to the RIR including tyrosine 1163 (Y1163) that is essential for CNK's positive function *in vivo* and for Sevenless (SEV) RTK-dependent MAPK activation. We found that upon SEV expression, one of the two SFKs found in *Drosophila*, Src42 (Takahashi *et al*, 1996), associates and mediates, through the Y1163 region of CNK, RTK positive effects on the MAPK module. Remarkably, *cnk* loss-of-function mutations affecting the Y1163 region are fully compensated by inactivation of the RIR, thereby arguing that the Y1163 region is integrating the RTK-induced Src42 signal to counteract the RIR inhibitory function. Unexpectedly, genetic and molecular evidence revealed that it is not Src42 catalytic function *per se*, but rather its binding capacity that is the key event in this process. Taken together, these results provide compelling evidence that CNK regulates RAF function by integrating both RAS and Src42 signals elicited by an RTK.

Results and discussion

Endogenous CNK is tyrosine phosphorylated upon RTK activation

Coexpression of a CNK construct and activated Sevenless (SEV^{S11}) in S2 cells was previously shown to induce tyrosine phosphorylation of CNK (Therrien *et al*, 1998). To assess the specificity of this event, we verified whether endogenous CNK also becomes tyrosine phosphorylated upon SEV^{S11} expression. As shown in Figure 1A (left panel), SEV^{S11} expression led to sustained tyrosine phosphorylation of endogenous CNK, which paralleled MAPK kinase activation. Similar results were obtained by stimulating the *Drosophila* Egf or insulin RTKs (Figure 1A, center and right panels).

Together, these results indicated that CNK is a *bona fide* and common RTK-dependent tyrosine phosphorylation target.

CNK tyrosine phosphorylation and activity depend on its Y1163 region

To map the region(s) associated with tyrosine phosphorylation, we transfected S2 cells with SEV^{S11} and various Flag-tagged CNK deletion constructs (Figure 1B). A C-terminal (CT) CNK variant was almost as efficiently phosphorylated as full-length (FL) CNK, whereas an N-terminal (NT) CNK protein was three to five times less efficiently phosphorylated (Supplementary Figure S1). Because of its apparently greater phosphorylation stoichiometry, we decided to narrow down the region(s) of CT-CNK associated with tyrosine phosphorylation. Five additional CT-CNK truncations (CT1–CT5; Figure 1B) were coexpressed with SEV^{S11} and their respective tyrosine phosphorylation level was determined. These experiments revealed that sequences between amino-acid positions 1059 and 1271 are the most critical for CNK tyrosine phosphorylation (Figure 1B and Supplementary Figure S1).

The 1059–1271 area contains three tyrosine residues. Interestingly, these residues are located within an ~90-amino-acid stretch that is highly conserved between *Drosophila melanogaster* and *Anopheles gambiae* CNK (Figure 2A). The conserved stretch has two other striking features: (1) the first half corresponds to the so-called RIR that associates with the kinase domain of RAF and inhibits its catalytic function (Douziech *et al*, 2003); (2) two previously characterized alleles of *cnk* (E-1222 and E-1756) have amino-acid changes within the second half of conservation (Therrien *et al*, 1998; Figure 2). As these are loss-of-function alleles (Therrien *et al*, 1998, and data not shown), it suggested that the second half of homology plays a positive role in signaling. During the course of this work, we characterized other *cnk* alleles to identify additional functionally relevant areas. Remarkably, of the 11 alleles that were sequenced,

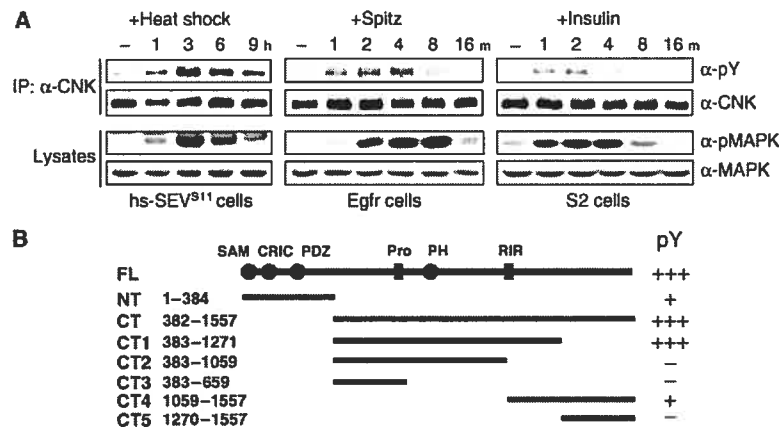


Figure 1 Activation of RTKs induces tyrosine phosphorylation of endogenous CNK. (A) Stable S2 cells expressing heat-inducible SEV^{S11} (left panel), WT Egfr (middle panel) or plain S2 cells (right panel) were stimulated by heat shock, Spitz or human insulin (10 µg/ml), respectively, and harvested at the indicated time (h (hours) or m (minutes)). Total and tyrosine-phosphorylated CNK levels were assessed by immunoblots following immunoprecipitation (IP) of endogenous CNK. Total and activated MAPK (pMAPK) levels were determined from cell lysates. Results presented here and thereafter are representative of at least three similar experiments. (B) Schematic (top line) of FL-CNK (1557 amino acid) and its conserved domains/elements (Douziech *et al*, 2003). Representations and amino-acid position of various Flag-tagged CNK variants are shown below, and arbitrary + or – signs to the right indicate their relative SEV^{S11}-dependent tyrosine phosphorylation levels.

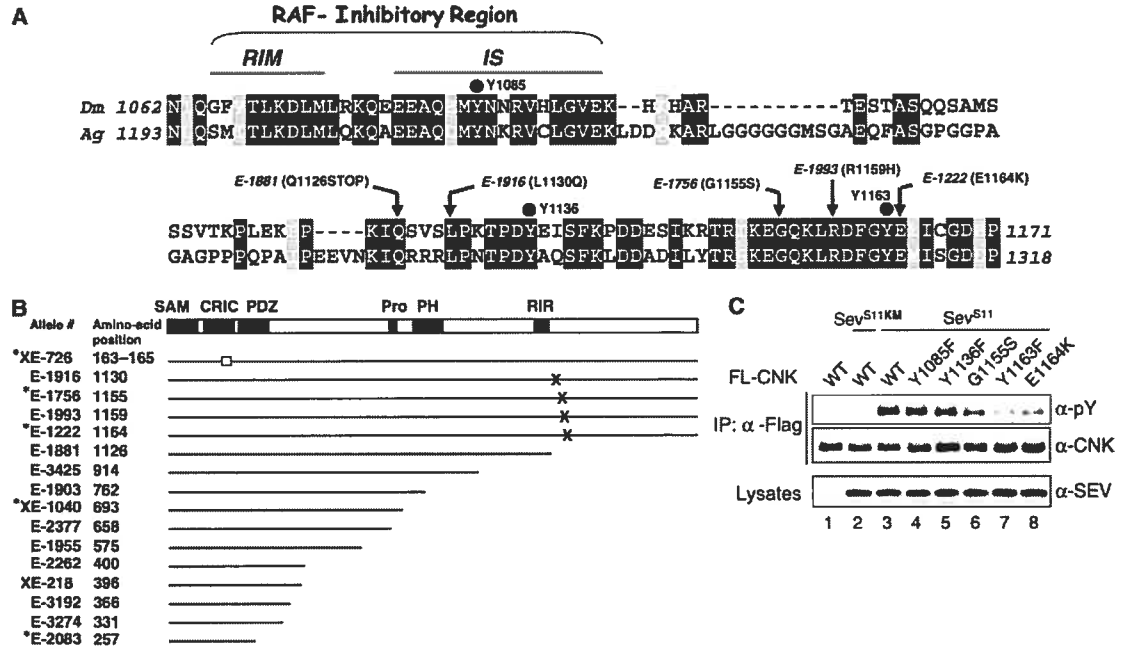


Figure 2 The Y1163 region is essential for CNK function and tyrosine phosphorylation. (A) Amino-acid comparison of the 1062–1171 region of *D. melanogaster* (*Dm*) CNK to an equivalent region (positions 1193–1318) in *A. gambiae* (*Ag*) CNK. Identical and conserved residues are in black and gray boxes, respectively. The RIR is a negatively acting bipartite region made of a RAF-interacting motif (RIM) and an adjacent inhibitory sequence (IS; Douziech *et al*, 2003). Black dots highlight the three tyrosine residues of the area. The position and amino-acid change found in five *cnk* alleles are also indicated. (B) Schematic representation of CNK is shown as a reference to position *cnk* mutations characterized in this study, or previously (Therrien *et al*, 1998; denoted by a star). Allele numbers and affected amino-acid positions are shown to the left. The hollow square indicates a three-amino-acid in-frame deletion. X denotes missense mutations, whereas a truncated line indicates premature ORF termination caused by either a frame-shift mutation (XE-1040 and XE-218) or by a nonsense mutation (remaining alleles). (C) S2 cells were transfected with the indicated FL-CNK variants (0.5–0.7 μg), kinase-inactivated SEV^{S11KM} (0.5 μg) or SEV^{S11} (0.5 μg). The CNK variants were expressed for a total of 36 h under the control of the constitutive *cnk* promoter. WT denotes wild type.

three (one stop codon and two amino-acid changes) were specifically found in this area (Figure 2A and B).

To examine the relevance of each tyrosine within the 1059–1271 area, we independently changed them to a phenylalanine residue and tested their respective impact on SEV^{S11}-induced CNK tyrosine phosphorylation. We also tested CNK variants that carried the mutation found in *cnk*^{E-1756} (G1155S) and *cnk*^{E-1222} (E1164K). Mutagenesis of the first two tyrosines (Y1085 and Y1136) did not affect phosphorylation (Figure 2C, lanes 4 and 5). However, mutation of Y1163 severely decreased it (Figure 2C, lane 7), thus identifying Y1163 as a critical residue in this event. Interestingly, the G1155S and E1164K mutations also impaired, albeit to a lesser degree, CNK phosphorylation, thus suggesting that not only the Y1163 residue, but also the second half of homology is involved in this event.

The fact that *cnk*^{E-1756} and *cnk*^{E-1222} are loss-of-function alleles and that their associated amino-acid change correlates with reduced CNK phosphorylation (Figure 2C) suggested that this or a related event is required for CNK function. We investigated this possibility by first verifying whether mutagenesis of the Y1163 residue also affected CNK activity. Overexpression of FL-CNK during *Drosophila* eye development was previously shown to weakly antagonize RAS signaling, apparently owing to its ability to inhibit RAF catalytic function (Douziech *et al*, 2003). We reasoned that

if the Y1163 residue is normally integrating an RTK-dependent signal, then its mutagenesis should increase CNK dominant-negative effect. To verify this, we overexpressed FL-CNK^{Y1163F} during eye development. In contrast to wild-type (WT) FL-CNK (Figure 3A and C), overexpression of one copy of the FL-CNK^{Y1163F} transgene potentially antagonized normal eye development (Figure 3B and D), therefore arguing that the Y1163 residue is important for CNK activity.

To show that the Y1163 residue is genuinely required for CNK function, distinct *cnk* genomic rescue constructs were generated and tested in transgenic flies for their ability to rescue the recessive lethality associated with *cnk* loss-of-function. While the WT CNK construct fully restored viability to a lethal *cnk* allelic combination, the CNK^{Y1163F} construct was devoid of activity (Table 1, and data not shown), thus confirming the functional importance of that residue. The inhibitory activity of CNK has been shown to be mediated by the RIR (Douziech *et al*, 2003). Because the Y1163F mutation elevated CNK's dominant-negative effect (Figure 3), we suspected that in that context, the RIR has an increased inhibitory potential. If that was the case, then mutagenesis of the RIR should counteract the effect of the Y1163F mutation. To test this, we inactivated the RIR in the Y1163F context by introducing a three-amino-acid change in the inhibitory sequence (IS) of the RIR (RIR^{mut}; Douziech *et al*, 2003). Remarkably, the CNK^{RIRmut-Y1163F} double-mutant construct

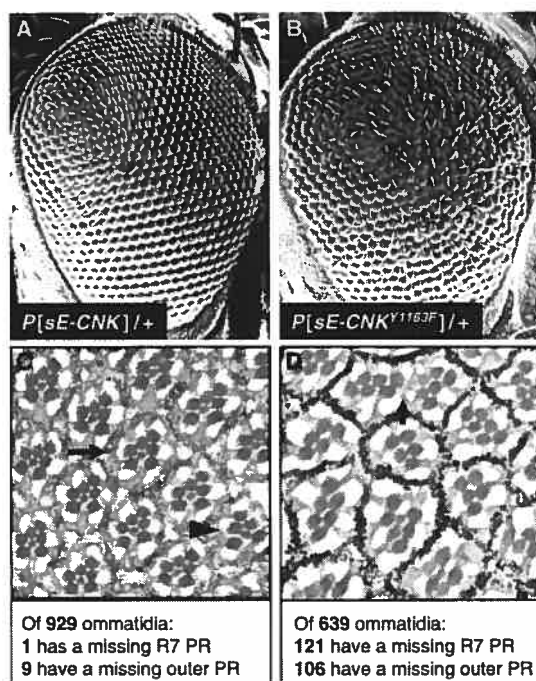


Figure 3 Forced expression of *cnk*^{Y1163F} interferes with *Drosophila* eye development. (A, B) Scanning electron micrographs of adult eyes. Anterior is to the right. (C, D) Apical eye sections at the plane of photoreceptor cells for the following genotypes: (C) *P[sE-CNK]/+*; (D) *P[sE-CNK^{Y1163F}]/+*. An example of a normal ommatidium is indicated by the arrow in (C): it comprises six large rhabdomeres (one for each outer photoreceptor (PR) cell) surrounding a smaller rhabdomere associated with the R7 PR cell. Dark staining granules around each ommatidium are produced by pigment cells. The arrowhead in (C) highlights one ommatidium missing an outer PR cell. Expression of *CNK^{Y1163F}* also affects pigment cells (arrow in (D)). Number of ommatidia analyzed and missing PR cells are indicated at the bottom.

rescued the recessive lethality associated with *cnk* loss-of-function alleles to the same extent as *CNK^{WT}* (Table I, and data not shown) thereby demonstrating that disruption of the RIR can reverse the *cnk^{Y1163F}* mutation. Together, these findings revealed that the two conserved regions within the 1059–1271 area act oppositely and that the Y1163 region is integrating an RTK-produced signal that apparently releases the RIR inhibitory effect.

Src42 associates with CNK and mediates CNK tyrosine phosphorylation in an RTK-dependent manner

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

Drosophila has two SFKs, *Src42* and *Src64* (Simon *et al*, 1985; Takahashi *et al*, 1996). To verify their involvement, we separately eliminated their contribution by RNAi. In addition, we tested the effect of removing endogenous RAS as well as *Tec29*, a nonreceptor tyrosine kinase of the Tec family (TFKs;

Table I Genomic rescue experiments revealed the RIR/Y1163 region interplay within CNK

Genotype	Percent of <i>cnk^{E-1089/cnk^{Δ(2)k1631-4}}</i> adult flies ^a	No. of flies scored ^b
<i>cnk^{E-1089/cnk^{Δ(2)k1631-4}}</i>	0	315
<i>cnk^{E-1089/cnk^{Δ(2)k1631-4}; pcnk-cnk^{WT}}</i>	19.6	825
<i>cnk^{E-1089/cnk^{Δ(2)k1631-4}; pcnk-cnk^{Y1163F}}</i>	0	578
<i>cnk^{E-1089/cnk^{Δ(2)k1631-4}; pcnk-cnk^{RIRmut}}</i>	21.2	663
<i>cnk^{E-1089/cnk^{Δ(2)k1631-4}; pcnk-cnk^{RIRmut Y1163F}}</i>	19.5	619

The fully penetrant larval lethality associated with *cnk^{E-1089/cnk^{Δ(2)k1631-4}}* trans-heterozygous flies is completely rescued by introduction of one copy of a WT *cnk* genomic rescue construct (*pcnk-cnk^{WT}*).

^aFor a full rescue, the expected ratio of viable *cnk^{E-1089/cnk^{Δ(2)k1631-4}}* flies over total progeny is 20%.

^bThe number of flies scored represents a compilation of two independent transgenic lines.

Smith *et al*, 2001). Interestingly, depletion of endogenous *Src42* reduced SEV^{S11}-induced CNK phosphorylation, whereas none of the other targets had an effect (Figure 4A). To investigate whether the inability of RAS depletion to affect CNK phosphorylation could be due to residual but sufficient RAS activity, we depleted concomitantly endogenous RAS and its exchange factor SOS to further lower the RAS-dependent signaling branch regulating MAPK. As shown in Supplementary Figure S2A, simultaneous depletion of both proteins almost eliminated SEV-induced MAPK activation, but did not decrease CNK tyrosine phosphorylation. Moreover, to determine whether *Src64* or *Tec29* could contribute, yet to a lower extent than *Src42*, to the total phosphorylation level of CNK, we verified whether removing concomitantly the two SFKs and *Tec29* had a greater impact than *Src42* depletion alone. As shown in Supplementary Figure S2B, no further decrease was observed. Therefore, these data indicated that *Src42* acts as an intermediate kinase linking activated SEV to CNK tyrosine phosphorylation and suggested that this event is RAS-independent. Consistent with this, coexpression of activated *Src42* (*Src42^{Y511F}*) and the FL-CNK variants recapitulated the Y1163-dependent phosphorylation of CNK (Supplementary Figure S3). However, these results taken together are not sufficient to conclude that *Src42* is specifically phosphorylating the Y1163 residue of CNK. Among various scenarios, it is possible that this residue is first phosphorylated by another kinase and then serves as a docking site for *Src42* SH2 domain, thereby allowing *Src42* to phosphorylate (an)other tyrosine residue(s) on CNK. Incidentally, this model turned out to be the most likely (see below).

To determine whether *Src42* associates with CNK, we immunoprecipitated endogenous CNK from lysates of untreated or heat-treated hs-SEV^{S11} cells and probed the immunoprecipitates for the presence of *Src42*. Indeed, *Src42* was found to interact with CNK, but only upon SEV expression (Figure 4B, top panel, compare lanes 1 and 2). Immunoprecipitation of endogenous *Src42* also co-precipitated CNK upon SEV expression (data not shown). Consistent with the fact that RAS is apparently not involved in SEV-induced tyrosine phosphorylation of CNK, elimination of endogenous

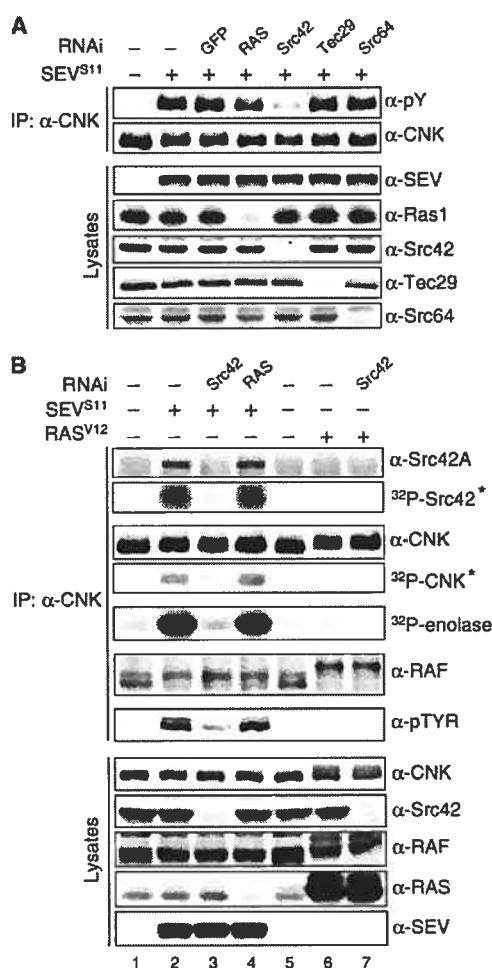


Figure 4 Src42 associates and mediates CNK tyrosine phosphorylation in an RTK-dependent manner. (A) SEV^{S11} stable cells were incubated \pm the indicated double-stranded RNAs (dsRNAs) (15 μ g/ml) for 4 days prior to inducing SEV^{S11} expression. (B) SEV^{S11} or RAS^{V12} stable cells were cultured as in (A) and treated as indicated. Endogenous CNK was then immunoprecipitated (IP) using α -CNK and subjected to an *in vitro* kinase assay. Samples were resolved by SDS-PAGE and analyzed by autoradiography and immunoblotting. A star indicates the putative identity of the radioactive band. Src42 RNAi reversed the effects of SEV^{S11} expression (lane 3), thus demonstrating the involvement of Src42 in mediating the effects of SEV on CNK.

RAS did not affect the Src42/CNK association (lane 4). Furthermore, expression of activated RAS (RAS^{V12}) did not stimulate CNK tyrosine phosphorylation nor did it induce its association with Src42 (compare lanes 5 and 6). Together, these findings demonstrated that CNK and Src42 form a complex *in vivo* and that their association is SEV-dependent, but RAS-independent. As expected, no SEV-induced association with CNK has been detected with either endogenous Src64 or Tec29 (data not shown).

The presence of endogenous Src42 in the CNK immunoprecipitates prompted us to ask if it was catalytically active, and if so, whether it could promote CNK phosphorylation

de novo. We thus prepared anti-CNK immunoprecipitates as above and incubated them in a kinase assay cocktail containing [γ -³²P]ATP and the Src substrate enolase. As shown in Figure 4B, strong phosphorylation of enolase was detected (fifth panel from the top) as well as in a band migrating at the position of Src42 (second panel from the top), which most likely corresponds to autophosphorylated Src42. Interestingly, another major radioactive band was observed at the position of CNK (fourth panel from the top) that we believe is CNK, although it is possible that this signal represents an irrelevant protein comigrating with CNK. Taken together, these results provide compelling evidence that CNK-associated Src42 is catalytically active. Furthermore, although we cannot rule out the involvement of intermediate kinase(s), these data suggest that Src42 phosphorylates CNK.

Src42 regulates positively MAPK activation through the Y1163 region of CNK

We next wanted to investigate the relationship linking Src42 and CNK and its relevance with respect to RTK-dependent MAPK activation. Using RNAi, we first depleted endogenous Src42 levels from SEV^{S11} cells and tested the ability of SEV^{S11} to activate endogenous MAPK. Similar to decreasing endogenous SOS, RAS or CNK by RNAi (Figure 5A, lanes 4, 6 and 7), depletion of Src42 impaired MAPK activation (lane 5), thus showing that Src42 plays a positive role in RTK-mediated MAPK activation. In contrast, removal of endogenous Src64 (or Tec29) had no effect (Supplementary Figure S2B, and data not shown), which suggests that the two *Drosophila* SFKs perform distinct roles downstream of the RTKs or respond differently depending on the RTK. Consistent with these possibilities, depletion of endogenous Src42 also affected EGFR- and InsR-dependent MAPK activation, whereas elimination of endogenous Src64 (or Tec29) had no effect (data not shown). Finally, removal of endogenous Src42 had no effect on RAS^{V12}-induced MAPK activation (Figure 5B, lane 5), thus implying that Src42 is acting upstream and/or in parallel to RAS.

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

We then reasoned that if the RTK-induced signal integrated by the Y1163 region is mediated by Src42, then removing endogenous Src42 and CNK concomitantly should abolish

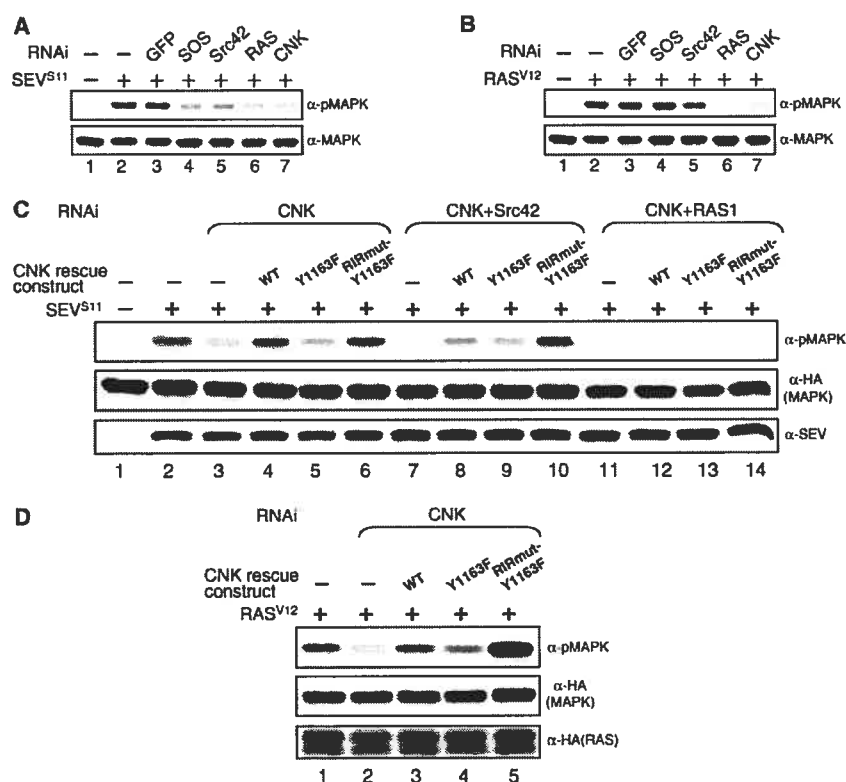


Figure 5 Src42 is a positive component of the MAPK pathway that acts through the Y1163 region of CNK. (A, B) SEV^{S11} or RAS^{V12} stable cells were incubated \pm the indicated dsRNAs (15 μ g/ml) for 4 days prior to inducing SEV^{S11} or RAS^{V12} expression. (C, D) Rescue of MAPK activation caused by depletion of endogenous CNK in S2 cells. For these experiments, cells were preplated \pm RNAi (10 μ g/ml) and then transfected 24 h later with the indicated constructs. (C) HA-tagged MAPK (0.15 μ g), SEV^{S11} (0.1 μ g) and the CNK rescue constructs (0.04 μ g). SEV expression was induced 48 h post-transfection. (D) HA-MAPK (0.15 μ g), HA-RAS^{V12} (0.1 μ g) and the CNK rescue constructs (0.01 μ g). Transgene expression was induced 48 h post-transfection. CNK rescue constructs produced identical protein levels (not shown).

CNK^{WT} rescuing activity to the same extent as CNK^{Y1163F}, but should not affect the rescuing potential of CNK^{RIRmut-Y1163F} as this construct should bypass the need in Src42 activity. Interestingly, we found that CNK^{WT} was not totally devoid of activity, but could somewhat rescue Src42 depletion (Figure 5C, compare lanes 7 and 8) probably because endogenous RAS activated by SEV^{S11} plays a dominant role in RAF activation and as CNK^{WT} still integrates RAS activity through its N-terminal domains, this leads to detectable phospho-MAPK. Nonetheless, the CNK^{Y1163F} construct was as active as CNK^{WT} in this context (lane 9), which strongly suggested that Src42 effect is indeed mediated by the Y1163 region. Furthermore and as predicted, the CNK^{RIRmut-Y1163F} construct was not affected by Src42 depletion (lane 10), thus demonstrating its ability to circumvent the need for Src42. Finally, in support of the view that RAS plays a major role in these events, abrogation of MAPK activation by depleting both endogenous CNK and RAS could not be rescued by any of the CNK constructs (Figure 5C, lanes 11–14).

Taken together, the results presented above suggest that the Y1163 region is integrating an Src42-dependent but RAS-independent signal. If this view is correct, then RAS^{V12}-induced MAPK activation should not depend on the Y1163 residue. Moreover, as the RIR is inhibitory in a RAS^{V12}-only

context (Douziech *et al*, 2003), its inactivation should promote a stronger MAPK activation, as it would imitate the reception of an Src42 signal. This is indeed what we observed. As shown in Figure 5D, CNK^{Y1163F} was as active as CNK^{WT} in a RAS^{V12} context (compare lanes 2–4), whereas CNK^{RIRmut-Y1163F} elevated RAS^{V12}-induced MAPK activation to a much greater extent (lane 5).

CNK-integrated Src42 effect on the MAPK pathway primarily depends on its binding function

Intriguingly, two previous studies suggested that Src42 negatively regulates the RAS/MAPK pathway (Therrien *et al*, 1998; Lu and Li, 1999). Because we found no such role in S2 cells, it is possible that these observations were cell specific and/or RTK specific. A more trivial explanation would be that the Src42 alleles used in those genetic studies were not loss-of-function, but instead had gain-of-function activity with respect to the RAS/MAPK pathway. To explore the second possibility, we compared some of the Src42 alleles used to conclude a negative role for Src42, namely Src42^{S-382} and Src42^{S-527} (Therrien *et al*, 1998), as well as a *bona fide* Src42 loss-of-function (Src42^{(2)K10108}), for their ability to modify dominantly a RAS^{V12} rough eye phenotype. Surprisingly, in contrast to Src42^{S-382}, which strongly enhanced

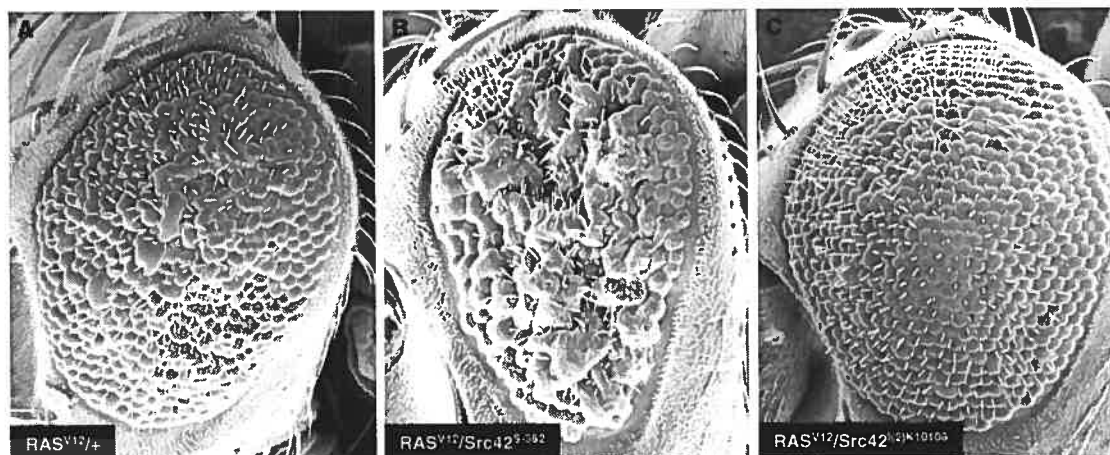


Figure 6 *Src42^{S382}* acts as a gain-of-function allele in the presence of *RAS^{V12}*. Scanning electron micrographs of adult eyes of the following genotypes: (A) *CyO, P[sev-RAS^{V12}]/+*; (B) *CyO, P[sev-RAS^{V12}]/Src42^{S382}*; (C) *CyO, P[sev-RAS^{V12}]/Src42^{I(2)K10108}*. Anterior is to the left.

the *RAS^{V12}* rough eye phenotype (Figure 6, compare A and B), *Src42^{I(2)K10108}* did not enhance the phenotype (Figure 6, compare A and C). *Src42^{S527}* also behaved like *Src42^{S382}* (data not shown). Therefore, these findings suggest that the alleles used to conclude a negative function for *Src42* are not loss-of-function, but act as activated alleles with respect to the RAS/MAPK pathway. In support of this claim, we found that the *Src42^{S382}* and *Src42^{S527}* alleles efficiently rescued the lethality associated with two independent hypomorphic alleles of *raf*, whereas the *Src42^{I(2)K10108}* allele could not (Supplementary Table S1). These results not only provide additional evidence that *Src42^{S382}* and *Src42^{S527}* act as gain-of-functions with respect to the RAS/MAPK pathway, but also suggest that the role of *Src42* in this pathway is not restricted to the eye.

To determine the molecular basis responsible for the apparent gain-of-function effect of *Src42^{S382}* and *Src42^{S527}*, we isolated their genomic DNA and sequenced the *Src42* exons. *Src42^{S382}* has a point mutation that changes tryptophan 241 to an arginine (W241R). Strikingly, the equivalent residue (W260) in mammalian *Src* and *Hck*, which resides at the junction between the SH2 domain-kinase domain (SH2-KD) linker and the kinase domain (Figure 7A), has been predicted from crystallographic and functional studies to be structurally important for maintaining SFKs in an autoinhibited conformation (for review, see Hubbard, 1999), thus supporting the possibility that the W241R mutation is a gain-of-function. Unexpectedly, however, the *Src42^{S527}* allele has a single point mutation that changes aspartate 370 (D370) to a valine residue. As D370 corresponds to the critical 'catalytic base' found in kinase subdomain VI, this mutation should destroy *Src42* catalytic function. An *in vitro* kinase assay confirmed this prediction, whereas the W241R mutation was found to be nearly as active as WT *Src42* (Supplementary Figure S4). Given that the D370V mutation impairs *Src42* catalytic function, it suggested that catalytic activity *per se* is not critical for *Src42* effect on the pathway and that structural changes imposed by the W241R or D370V mutations are activating other aspects of *Src42* function, such as its capacity to associate with specific targets. This possibility is

likely considering that even mutations affecting catalytic function can have gain-of-function consequences provided that they disrupt the overall autoinhibited configuration and make available the SH3 and SH2 domains. As the catalytic center of SFK also appears to stabilize the global autoinhibited state (Hubbard, 1999), it is possible that not only the W241R mutation, but also the D370V mutation destabilizes *Src42* autoinhibited state thereby increasing the ratio of *Src42* molecules bound to some targets, including CNK.

The observation that one of the *Src42* gain-of-function alleles is a kinase-dead variant was intriguing given the correlation that we observed between CNK positive function on the pathway and *Src42*-mediated CNK tyrosine phosphorylation. To investigate this issue, we first used a simple cotransfection assay that monitored the ability of *Src42* constructs to augment *RAS^{V12}*-induced MAPK activation. As shown in Figure 7B, kinase-inactive *Src42^{D370V}* and *Src42^{R2276R}* variants (lanes 5 and 6) were found to be as competent to collaborate with *RAS^{V12}* as *Src42^{Y511F}* and *Src42^{W241R}* (lanes 3 and 4). Interestingly, even an N-terminal (NT) *Src42* protein (including only the SH3 and SH2 domains) was active as the full-length constructs (lane 7). In contrast, a construct corresponding to the catalytic domain alone was inert (data not shown). To ensure that the activity of these mutants was not caused by endogenous *Src42*, we tested their activity in a context where endogenous *Src42* has been depleted by RNAi. As shown in Figure 7B (lanes 9–13), none of the mutants was affected. We showed above that, unlike *RAS* activity, *Src42* activity is integrated by the Y1163 residue of CNK (Figure 5C and D). To verify the relevance of this residue with respect to the ability of kinase-impaired *Src42* to collaborate with *RAS^{V12}*, we depleted endogenous CNK and rescued its contribution with CNK^{Y1163}. Remarkably, we found that the positive effect of the *Src42* mutants strictly depended on the integrity of the Y1163 residue (Supplementary Figure S5). Together, these results are consistent with the idea that *Src42* kinase activity is not critical for the positive effect of *Src42* on the MAPK pathway and further suggest that Y1163-dependent CNK activity and *Src42*-mediated CNK tyrosine phosphorylation are not functionally

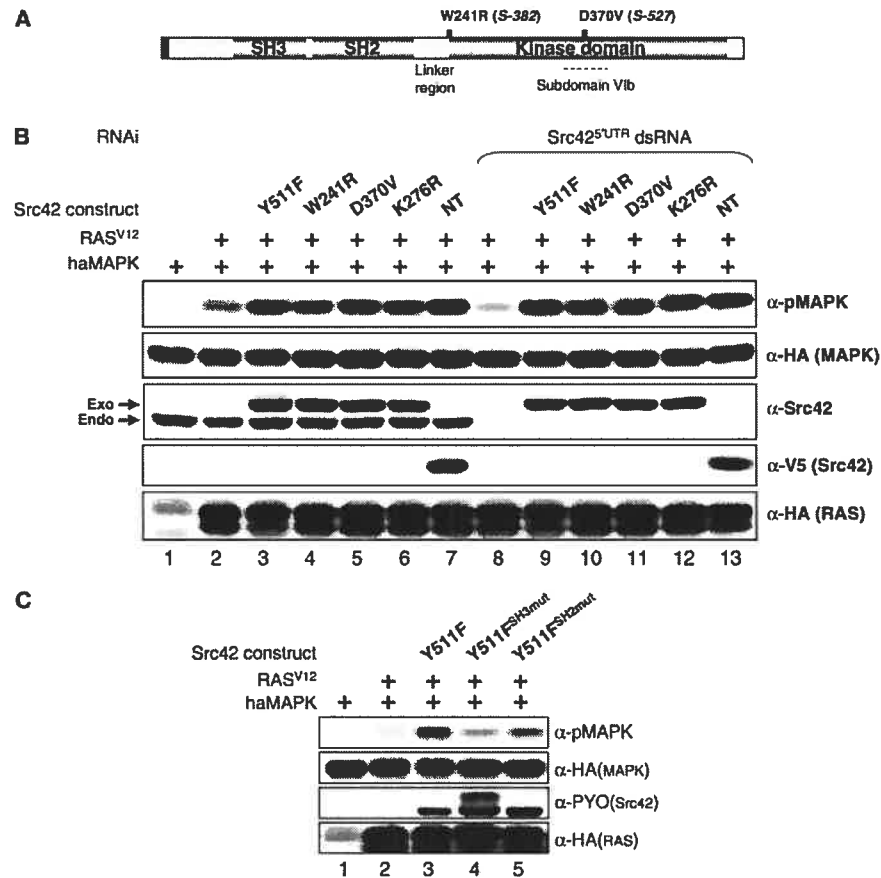


Figure 7 Molecular characterization of Src42 gain-of-function alleles. (A) Schematic structure of Src42. Like mammalian SFKs, the 517-amino-acid-long Src42 contains a myristoylation signal (black box), followed by an SH3, SH2 and kinase domain. Relative positions of amino-acid change found in Src42^{S-382} and Src42^{S-527} are shown. (B) S2 cells were first incubated \pm the Src42 dsRNA (15 μ g/ml) 1 day prior to transfection and then transfected with the HA-MAPK reporter construct (0.15 μ g) either alone (lane 1) or with the indicated combinations of HA-RAS^{V12} (0.1 μ g) and PYO-Src42 (0.075–0.175 μ g) constructs or the truncated V5-tagged NT-Src42 construct (0.075 μ g). Endo and exo denote the position of the endogenous and exogenous Src42 proteins, respectively. (C) S2 cells were transfected as in (B). The amount of Src42 constructs used (0.065–0.3 μ g) was adjusted to obtain similar protein levels.

related. In support for these conclusions, we found that kinase-inactive Src42^{K276R} is as competent as WT Src42 to rescue a decrease of SEV-dependent MAPK activation caused by depletion of endogenous Src42 (data not shown).

In addition to their catalytic function, SFKs are known to mediate positive signaling by the binding properties of their SH3 and SH2 domains (Kaplan *et al*, 1995; Schlaepfer *et al*, 1997). To verify their respective relevance, we mutagenized them individually in Src42^{Y511F} and tested their ability to augment RAS-mediated MAPK activation. As shown in Figure 7C, inactivation of either domain impaired Src42 activity (lanes 4 and 5). Similar findings were obtained with Src42^{K276R} or NT-Src42 (data not shown), thereby suggesting that Src42 binding was critical for its function through CNK. We then investigated whether the Src42 variants could associate with CNK through its Y1163 region. As shown in Figure 8A, co-immunoprecipitation experiments revealed that NT-Src42 indeed interacted with CNK (lane 1), and this independently of a coexpressed activated RTK. Similar results

were obtained with the full-length Src42 constructs (data not shown), thereby possibly explaining their ability to collaborate with RAS^{V12}. Nonetheless, as expected, SEV expression greatly increased the interaction (lane 2), which suggested that binding is normally signal-dependent (see below). Using this simple binding assay, we next verified the relevance of the Y1163 region in this interaction. Remarkably, we found that not only the Y1163 residue is critical for binding (lanes 11 and 12), but also the four missense mutations found in this region affected the association (lanes 3–10). Therefore, these results confirm the relevance of this area for Src42 binding and provide a common molecular explanation for the various loss-of-function mutations found in this area. Although it remains to be verified, the correlation between Src42 binding to CNK and its positive effect on the pathway is consistent with the type of mutations found in the two putative Src42 gain-of-function alleles.

The ability of full-length or NT-Src42 variants to bind CNK without SEV expression was intriguing as it depended on the

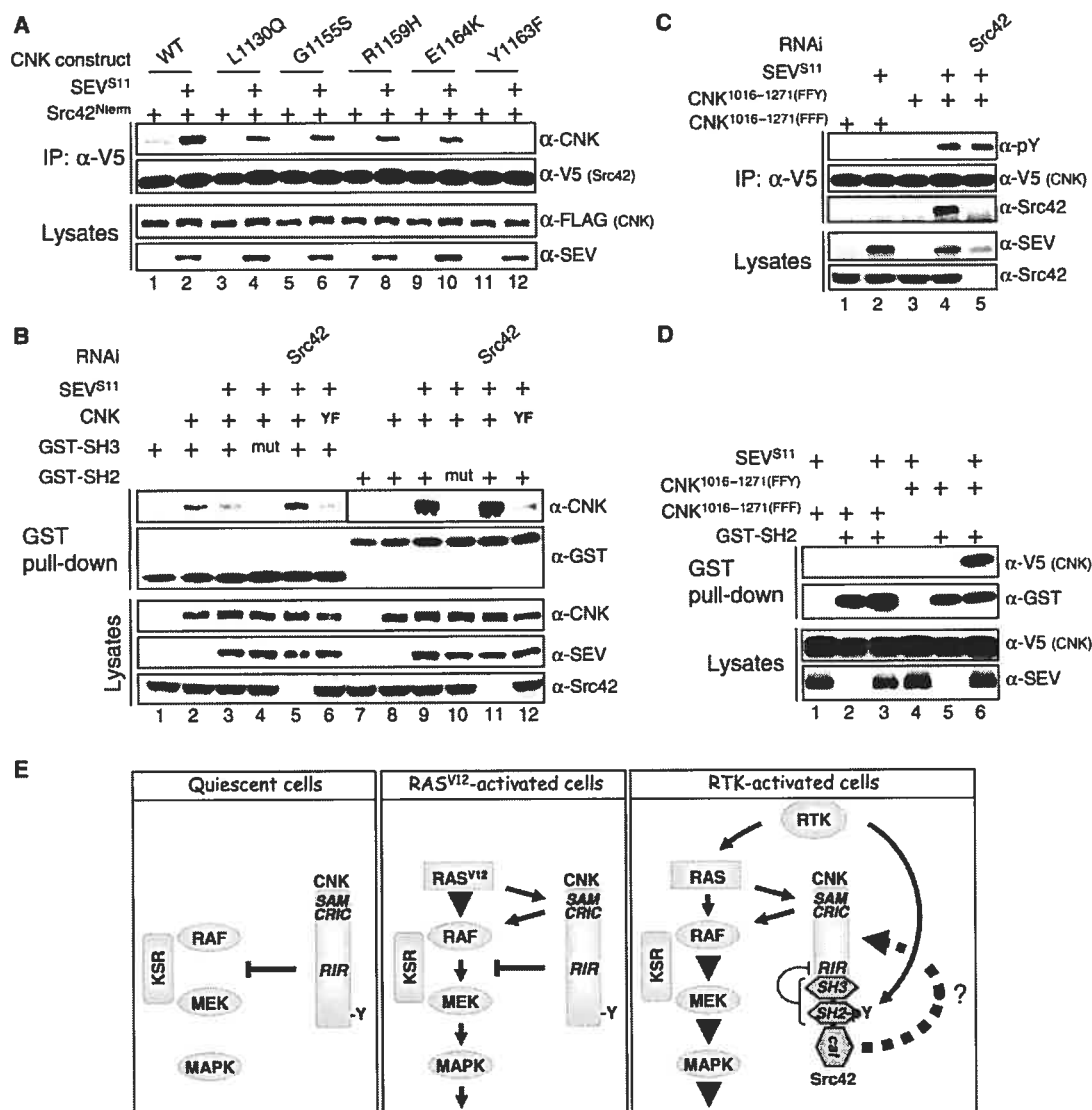


Figure 8 Characterization of the Src42 binding function on CNK. (A) S2 cells were transfected with the indicated FL-CNK variants (0.55–0.8 μ g) and the NT-Src42 construct (0.09–0.25 μ g) \pm SEV^{S11} (0.6 μ g). The CNK variants were expressed for a total of 36 h under the control of the constitutive *cnk* promoter, whereas NT-Src42 and SEV^{S11} expressions were induced 16 and 3 h, respectively, prior to harvesting the cells. (B) S2 cells were first incubated \pm the Src42 dsRNA (15 μ g/ml) 1 day prior to transfection and then transfected with the indicated combinations of CNK (0.5 μ g), SEV^{S11} (0.6 μ g) or GST constructs (0.1–0.3 μ g). CNK and SEV^{S11} expression time was as in (A), whereas GST constructs were expressed for 16 h prior to cell lysis. GST-fused proteins were collected using glutathione-Sepharose beads. YF denotes the CNK^{Y1163F} variant. Interestingly, depletion of endogenous Src42 slightly increased GST-SH3 binding to CNK (lane 5). (C) The short CNK mutant variants (0.35–0.8 μ g) were cotransfected \pm SEV^{S11} (0.5 μ g) as indicated and expressed for 16 h prior to cell lysis. RNAi treatment was as in (B). (D) Transfections, including the GST-SH2 construct (0.15–0.8 μ g), were conducted as in (C). (E) Model depicting the integration of RAS and Src42 signals by CNK. See text for details.

Y1163 residue (Figure 8B, compare lanes 1 and 11, and data not shown) as well as on the SH3 and SH2 domains (data not shown). Moreover, it occurred independently of endogenous Src42 (data not shown). These observations suggested that both domains are engaged in binding CNK and that either the Y1163 residue is phosphorylated at an undetectable level or binding of the SH3 domain somehow stabilizes the SH2 domain to its unphosphorylated binding site. To eliminate a

possible interdependency between the two domains with respect to CNK binding, we separately fused them to GST and directly assessed their respective binding ability. As shown in Figure 8B, the SH3 domain associated with CNK independently of SEV (compare lanes 2 and 3) and of the Y1163 residue (lane 6). In sharp contrast, the SH2 domain associated with CNK in a strict SEV-dependent manner (compare lanes 8 and 9) that required the integrity of the

Y1163 residue (lane 12). Therefore, given that the SH2 domain cannot bind CNK when tested alone in the absence of SEV, but is involved when the SH3 domain is present, it suggested that binding of the SH3 domain to CNK stabilizes the SH2 domain to its binding site thereby allowing it to participate in CNK binding in the absence of Y1163 phosphorylation. This phenomenon, possibly magnified by the artificial setup used to test the constructs, might explain why the collaboration between Src42 and RAS^{V12} depends on the SH3 and SH2 domains of Src42 as well as on the Y1163 residue of CNK.

Src42 does not phosphorylate the Y1163 residue of CNK

The strong SEV dependency of Src42 SH2 domain binding to CNK suggests that in normal conditions, binding of this domain requires the phosphorylation of at least one tyrosine residue in CNK. Because we found that endogenous Src42 is mediating SEV-induced CNK tyrosine phosphorylation, it is conceivable that upon activation by SEV, Src42 phosphorylates its own binding site on CNK thereby inducing normal binding. However, this would be inconsistent with the functional data that suggest that Src42 kinase activity is not involved in the regulation of MAPK activation through CNK. To verify this, we eliminated endogenous Src42 by RNAi and tested the impact on SEV-dependent GST-SH2 domain binding to CNK. As shown in Figure 8B (compare lanes 9 and 11), Src42 depletion did not reduce the interaction. Identical results were obtained with NT-Src42 (data not shown). Therefore, in agreement with our functional results, these findings indicate that the kinase activity of Src42 is not involved in generating a high-affinity binding site on CNK for its SH2 domain.

The binding data presented thus far strongly suggest that the Y1163 residue is part of an Src42 SH2 domain binding site. Furthermore, this residue is probably specifically phosphorylated in response to SEV expression, but this event should not be mediated by Src42. To monitor specifically the phosphorylation status of the Y1163 residue, we generated a short V5-tagged CNK construct (positions 1016–1271) that encompassed the Y1163 region and included only three tyrosine residues (Y1085, Y1136 and Y1163; Figure 2). We tested two versions of it: one had the three tyrosine residues changed to phenylalanine (FFF), while the other (FFY) only kept intact the Y1163 residue. As shown in Figure 8C, we found that the FFY protein, but not the FFF variant, was tyrosine phosphorylated upon SEV^{S11} expression and associated with endogenous Src42, therefore demonstrating that the Y1163 residue is genuinely phosphorylated upon SEV expression and that this event is critical for endogenous Src42 association. Consistent with the results shown above, depletion of endogenous Src42 did not affect the tyrosine phosphorylation of the FFY protein, thus providing strong evidence that a tyrosine kinase other than Src42 is phosphorylating the Y1163 residue. Finally, to show that the SH2 domain of Src42 is most likely interacting with the phosphorylated Y1163 residue, we tested the ability of the GST-SH2 domain protein to associate with the short CNK variants in a SEV-dependent manner. As shown in Figure 8D, the SH2 domain specifically associated with the FFY variant and this occurred only upon SEV coexpression (lane 6). Therefore, these results provide compelling evidence that the Y1163 residue is indeed phosphorylated in a SEV-dependent but Src42-independent manner, and

serves as a binding site for the SH2 domain of Src42. Given that Src42 is apparently not phosphorylating the Y1163 residue, it remains possible that the receptor itself is performing this event and that inappropriate *in vitro* enzymatic condition explains our failure to detect it. Alternatively, another tyrosine kinase could be involved.

Concluding remarks

In this study, we showed that CNK integrates RAS and Src42 signals as a binary input, thereby allowing RAF to send signals to MEK (Figure 8E). The RAS signal is received by the SAM and CRIC domains of CNK, which appears to enhance RAF catalytic function (Douziech *et al*, 2003), whereas Src42 activity is integrated by the Y1163 region of CNK and seems to relieve the inhibitory effect that the RIR imposes on RAF's ability to phosphorylate MEK (Douziech *et al*, 2003). Why would RAF activation depend on two distinct but corequired signals emitted by the same RTK? One possibility is that this requirement generates specificity downstream of an RTK. For example, only receptors that activate both RAS and Src42 would lead to activation of the MAPK module within discretely localized CNK complexes. Consequently, the combinatorial use of multifunctional signals might be a means to produce a specific output from generic signals.

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

The mechanism by which the binding of Src42 to CNK deactivates the RIR is currently unknown and a number of scenarios can be envisioned. For example, it might induce a conformational change that suppresses the inhibitory effect that the RIR imposes on RAF catalytic activity. Alternatively, it is possible that Src42 binding displaces an inhibitory protein interacting with CNK or facilitates the relocalization of a CNK/RAF complex to a subcellular compartment that is required for RAS-dependent RAF activation. However, we do not believe that this mechanism involves displacing CNK away from RAF as neither SEV expression nor Src42 depletion altered the CNK/RAF interaction (Figure 4B, and data not shown).

Although several questions are left unanswered regarding the Src42/CNK association, collectively, our data suggest a subtle binding mode reminiscent of the mammalian Src/FAK interaction (Thomas *et al*, 1998). Indeed, it appears that CNK is phosphorylated on the Y1163 residue not by Src42 itself, but either by the receptor or by another kinase (Figure 8E) and that this step generates a high-affinity binding site for the SH2 domain of Src42 thereby triggering its recruitment. This event is presumably not sufficient for a stable association and/or derepression of the RIR, but also requires the binding of the SH3 domain to an unidentified sequence element within CNK. The engagement of the SH3 and SH2 domains

of Src42 on CNK would not only relieve the RIR's inhibitory effect, but would also derepress Src42 autoinhibited configuration and possibly orient favorably Src42 to phosphorylate one or a few specific tyrosine residues on CNK (dotted arrow in Figure 8E). This scenario is certainly plausible considering that CNK has a total of 39 tyrosine residues. This would explain why depletion of endogenous Src42 led to a reduction, but not a complete elimination, of SEV-induced CNK tyrosine phosphorylation (Figure 4) or why the Y1163F mutation impaired CNK phosphorylation mediated by Src42^{Y511F} (Supplementary Figure S3) as a disruption of the Src42/CNK association would prevent Src42 from phosphorylating the other sites. Although these Src42-dependent phosphorylated residues do not appear to play a role in activating the MAPK module, their concerted regulation suggests that CNK is coordinating signaling between the MAPK module and at least another pathway.

Materials and methods

Plasmids

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

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

The Sev^{S11} constructs have been described by Therrien *et al* (1998), whereas the RAS^{V12} and MAPK constructs have been described by Douzdech *et al* (2003).

Genetics, molecular analysis and histology

Fly culture, crosses and P-element-mediated germline transformations were conducted according to standard procedures. The *sE-CNK*^{WT} and RAS^{V12} transgenic flies have been described by Therrien *et al* (1998). At least two independent lines were characterized for

each construct (*sE-cnk*^{Y1163F} and *cnk* genomic rescue constructs). The Src42^{(2)k10108} allele has a P-element inserted in the 5'UTR of the Src42 locus, which obliterates expression (data not shown).

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

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

Cell culture and transfections

Plain and stable S2 cell lines were maintained and transfected as described by Roy *et al* (2002). Heat-inducible Sev^{S11} and copper-inducible RAS^{V12}-expressing stable cell lines have been described previously (Therrien *et al*, 1998; Roy *et al*, 2002). Unless specified otherwise, Sev^{S11} expression (in stable cells or following hs-Sev^{S11} transfection) was induced by a 30 min heat treatment at 37 °C and cells were harvested 2 h later. For Egfr activation, an Egfr-expressing S2 cell line was stimulated with the supernatant from Spitz-secreting cells (Schweitzer *et al*, 1995). RAS^{V12} expression or other copper-inducible expression constructs were induced 48 h post-transfection by adding 0.7 mM CuSO₄ to the cell medium and cells were harvested 16 h later. The amount of transfected plasmids was always adjusted among related constructs to obtain similar protein levels. RNAi experiments were conducted essentially as described by Douzdech *et al* (2003).

Protein analysis and antibodies

NP-40 cell lysates were prepared and analyzed either directly or following immunoprecipitation as described by Roy *et al* (2002). Sources for α -CNK, α -SEV, α -RAS1, α -pMAPK, α -FLAG, α -PYO, α -MYC and α -HA antibodies (Ab) have been mentioned by Douzdech *et al* (2003). α -MAPK and α -pY (clone 4G10) Ab were from Chemicon and USB, respectively, whereas the α -V5 and α -GST Ab were from Invitrogen and Oncogene Research Products, respectively. α -Src42 and α -Src64 polyclonal Ab were generously provided by J Dixon, and the α -Tec29 monoclonal Ab (clone I19) was a kind gift of S Beckendorf. Glutathione-Sepharose beads were from Amersham Biosciences.

For *in vitro* kinase assays, NP-40 cell lysates were immunoprecipitated using α -CNK or α -PYO (Src42) and immunoprecipitates were washed three times in NP-40 lysis buffer and once in kinase buffer (25 mM Hepes pH 7.2, 150 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 5 mM MnCl₂, 1 mM DTT and 1 mM Na₂VO₄). Kinase reactions were initiated by adding 10 μ Ci of [γ -³²P]ATP, 5 μ M ATP and 2 μ g of acid-treated enolase (Roche) and incubated for 20 min at 30 °C.

Supplementary data

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

Acknowledgements

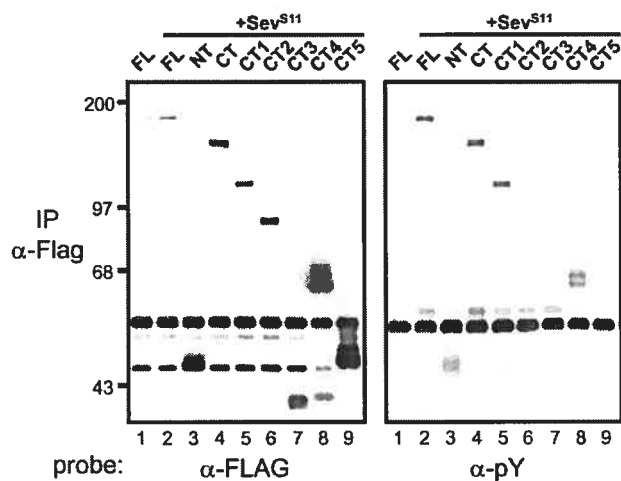
We are grateful to David Wassarman and Caroline Baril for critical reading of the manuscript and Frank Sicherl for helpful discussions. We thank S Beckendorf, J Dixon, S Katzav and B Shilo for providing reagents. We also thank Allan Wong for generating a number of Src42 constructs, Alexandre Viau for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

References

- Anselmo AN, Bumeister R, Thomas JM, White MA (2002) Critical contribution of linker proteins to Raf kinase activation. *J Biol Chem* 277: 5940–5943
- Bumeister R, Rosse C, Anselmo A, Camonis J, White MA (2004) CNK2 couples NGF signal propagation to multiple regulatory cascades driving cell differentiation. *Curr Biol* 14: 439–445
- Chong H, Vikis HG, Guan KL (2003) Mechanisms of regulating the Raf kinase family. *Cell Signal* 15: 463–469
- Dhillon AS, Kolch W (2002) Untying the regulation of the Raf-1 kinase. *Arch Biochem Biophys* 404: 3–9
- Douzdech M, Roy F, Laberge G, Lefrancois M, Armengod AV, Therrien M (2003) Bimodal regulation of RAF by CNK in *Drosophila*. *EMBO J* 22: 5068–5078
- Hou XS, Chou TB, Melnick MB, Perrimon N (1995) The torso receptor tyrosine kinase can activate Raf in a Ras-independent pathway. *Cell* 81: 63–71

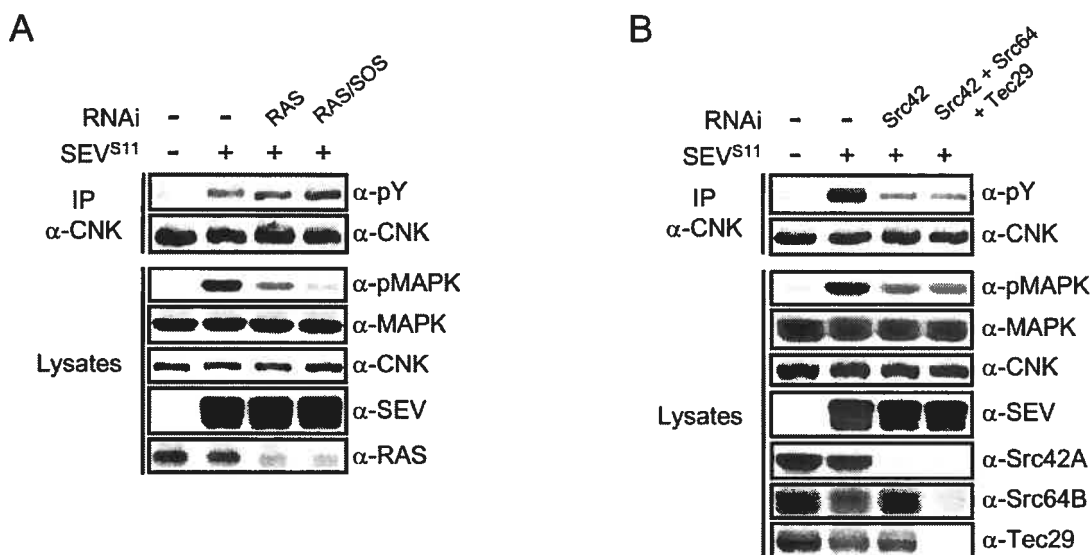
Regulation of RAF activation
G Laberge *et al*

- Hubbard SR (1999) Src autoinhibition: let us count the ways. *Nat Struct Biol* 6: 711–714
- Jaffe AB, Aspenstrom P, Hall A (2004) Human CNK1 acts as a scaffold protein, linking Rho and Ras signal transduction pathways. *Mol Cell Biol* 24: 1736–1746
- Kaplan KB, Swedlow JR, Morgan DO, Varmus HE (1995) c-Src enhances the spreading of src^{-/-} fibroblasts on fibronectin by a kinase-independent mechanism. *Genes Dev* 9: 1505–1517
- Lanigan TM, Liu A, Huang YZ, Mei L, Margolis B, Guan KL (2003) Human homologue of *Drosophila* CNK interacts with Ras effector proteins Raf and Rlf. *FASEB J* 17: 2048–2060
- Li W, Noll E, Perrimon N (2000) Identification of autosomal regions involved in *Drosophila* Raf function. *Genetics* 156: 763–774
- Lu X, Li Y (1999) *Drosophila* Src42A is a negative regulator of RTK signaling. *Dev Biol* 208: 233–243
- Rabizadeh S, Xavier RJ, Ishiguro K, Bernabeortiz J, Lopez-Illasaca M, Khokhlatchev A, Mollahan P, Pfeifer GP, Avruch J, Seed B (2004) The scaffold protein CNK1 interacts with the tumor suppressor RASSF1A and augments RASSF1A-induced cell death. *J Biol Chem* 279: 29247–29254
- Roy F, Laberge G, Douziech M, Ferland-McCollough D, Therrien M (2002) KSR is a scaffold required for activation of the ERK/MAPK module. *Genes Dev* 16: 427–438
- Schlaepfer DD, Broome MA, Hunter T (1997) Fibronectin-stimulated signaling from a focal adhesion kinase-c-Src complex: involvement of the Grb2, p130cas, and Nck adaptor proteins. *Mol Cell Biol* 17: 1702–1713
- Schweitzer R, Shaharabany M, Seger R, Shilo BZ (1995) Secreted spitz triggers the DER signaling pathway and is a limiting component in embryonic ventral ectoderm determination. *Genes Dev* 9: 1518–1529
- Simon MA, Drees B, Kornberg T, Bishop JM (1985) The nucleotide sequence and the tissue-specific expression of *Drosophila* c-src. *Cell* 42: 831–840
- Smith CI, Islam TC, Mattsson PT, Mohamed AJ, Nore BF, Vihinen M (2001) The Tec family of cytoplasmic tyrosine kinases: mammalian Btk, Bmx, Itk, Tec, Txk and homologs in other species. *BioEssays* 23: 436–446
- Takahashi F, Endo S, Kojima T, Saigo K (1996) Regulation of cell-cell contacts in developing *Drosophila* eyes by Dsrc41, a new, close relative of vertebrate c-src. *Genes Dev* 10: 1645–1656
- Therrien M, Morrison DK, Wong AM, Rubin GM (2000) A genetic screen for modifiers of a kinase suppressor of Ras-dependent rough eye phenotype in *Drosophila*. *Genetics* 156: 1231–1242
- Therrien M, Wong AM, Rubin GM (1998) CNK, a RAF-binding multidomain protein required for RAS signaling. *Cell* 95: 343–353
- Thomas JW, Ellis B, Boerner RJ, Knight WB, White II GC, Schaller MD (1998) SH2- and SH3-mediated interactions between focal adhesion kinase and Src. *J Biol Chem* 273: 577–583
- Tomlinson A, Ready DF (1987) Neuronal differentiation in the *Drosophila* ommatidium. *Dev Biol* 120: 366–376
- Wassarman DA, Aoyagi N, Pile LA, Schlag EM (2000) TAF250 is required for multiple developmental events in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 1154–1159
- Widmann C, Gibson S, Jarpe MB, Johnson CL (1999) Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human. *Physiol Rev* 79: 143–180



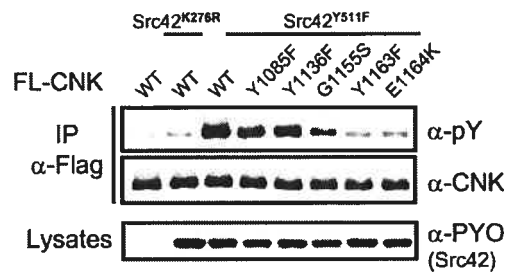
Supplemental Figure S1. Mapping of CNK Tyrosine Phosphorylation
 CNK constructs shown in Figure 1B were transfected (3.5 – 7.5 μ g) in S2 cells and expressed for 72 hours. SEV^{S11} expression was induced in lanes 2 to 9. Cells lysates were immunoprecipitated (IP) using α -Flag. Total and tyrosine phosphorylation levels of the CNK variants were determined using α -Flag (left panel) and α -pY (right panel) antibodies, respectively.

Supplemental Figure S1
 Laberge et al., 2004



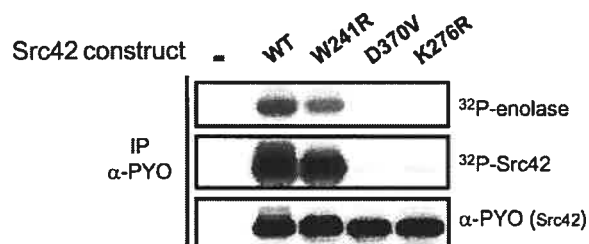
Supplemental Figure S2. SEV-induced tyrosine phosphorylation of CNK is RAS-, Src64- and Tec29-independent

(A and B) SEV^{S11} stable cells were plated with or without the indicated dsRNAs (15 μ g/ml) for four days prior to inducing SEV^{S11} expression. Cell lysates or immunoprecipitated (IP) lysates were analyzed by immunoblots with the indicated antibodies.



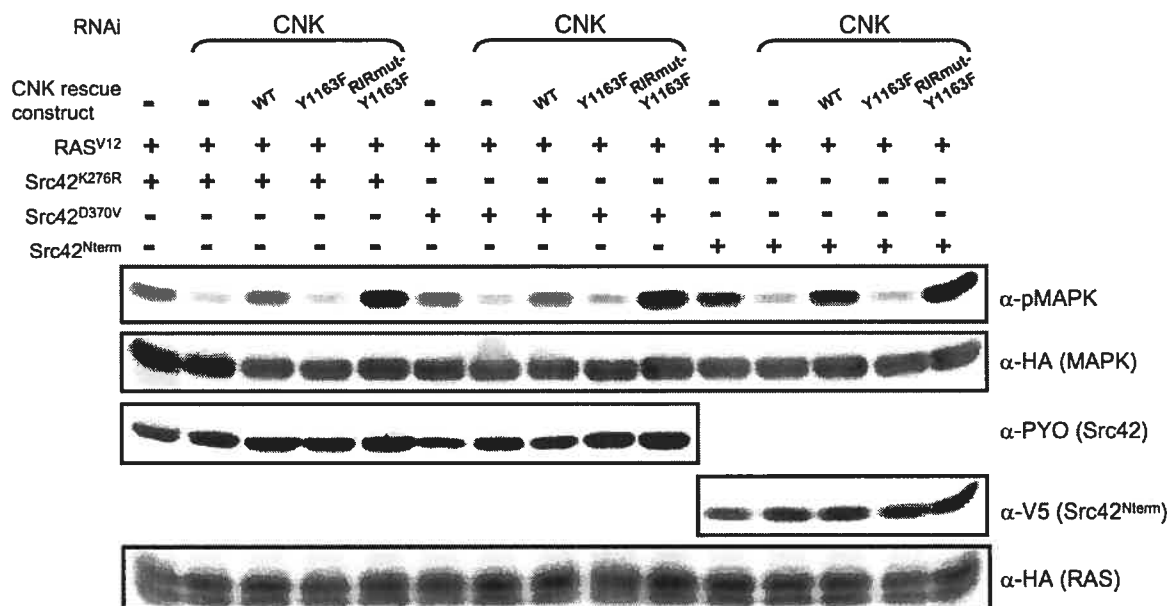
Supplemental Figure S3. Src-mediated CNK Tyrosine Phosphorylation
 S2 cells were transfected with the indicated combinations of Flag-tagged FL-CNK variants (0.5 – 0.7 μ g), kinase-inactivated Src42^{K276R} (0.35 μ g) or constitutively activated Src42^{Y511F} (0.5 μ g). Expression of pyo-Src42 constructs were induced 2.5 hours prior to harvesting the cells. The CNK variants were expressed for a total of 36 hours under the control of the constitutive *cnk* promoter. WT denotes wild-type. Cell lysates were immunoprecipitated and analyzed using indicated antibodies.

Supplemental Figure S3
 Laberge et al., 2004



Supplemental Figure S4. Assessment of Catalytic Activity of Src42 Mutations Identified *in vivo*
S2 cells were left alone (-) or transfected with the indicated of Pyo-tagged Src42 variants (0.4 – 0.6 μg). Expression of pyo-Src42 constructs was induced 48 hr post-transfection and the cells were harvested 24 hr later. Cell lysates were immunoprecipitated using α-PYO and Src42 kinase activity was detected in the immunoprecipitates as described in the Experimental Procedures. Src42 levels were monitored by immunoblots. The W241R mutant has an activity comparable to wild-type Src42 in its ability to phosphorylate enolase (³²P-enolase) or to autophosphorylate (³²P-Src42). In contrast, the D370V mutant is completely inert as the catalytically-inactivated K276R mutant.

Supplemental Figure S4
Laberge et al., 2004



Supplemental Figure S5. Src42 Scaffolding Effect is Integrated by the Y1163 Residue of CNK

Cells were pre-plated with or without RNAi (10 μ g/ml) and then transfected 24 hours later with the indicated construct combinations: HA-MAPK (150 ng), HA-RAS^{V12} (100 ng), PYO-Src42 variants (25 ng) and the CNK rescue constructs (10 ng). RAS and Src42 transgene expression was induced 48 hours post-transfection and cells were cultured for an additional 16 hours prior to harvest. Cell lysates were analyzed by immunoblots using the indicated antibodies.

Supplementary Table I. *Src42*^{S-382} and *Src42*^{S-527} alleles suppress *raf*^{HM7} and *raf*^{C110} male hemizygous lethality

♀ ♂		<i>raf</i> ^{HM7} / <i>FM6K</i> ; +/+		<i>raf</i> ^{C110} / <i>FM7</i> ; +/+	
		# of <i>raf</i> ^{HM7} males	# of non-CyO <i>FM6K</i> males	# of <i>raf</i> ^{C110} males	# of non-CyO <i>FM7</i> males
<i>w</i> ⁻ ; +/+		0	76	0	34
<i>w</i> ⁻ ; <i>Src42</i> ^{S-382} / <i>Cyo</i>		29	36	25	31
<i>w</i> ⁻ ; <i>Src42</i> ^{S-527} / <i>Cyo</i>		15	32	14	11
<i>w</i> ⁻ ; <i>Src42</i> ^{l(2)k10108} / <i>Cyo</i>		0	58	0	25

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

Annexe 2

KSR is a scaffold required for activation of the ERK/MAPK module

François Roy, Gino Laberge, Mélanie Douziech, David Ferland-McCollough, and Marc Therrien¹

Clinical Research Institute of Montreal, Laboratory of Intracellular Signaling, Montreal, PQ Canada H2W 1R7

Mechanisms that regulate signal propagation through the ERK/MAPK pathway are still poorly understood. Several proteins are suspected to play critical roles in this process. One of these is Kinase Suppressor of Ras (KSR), a component previously identified in RAS-dependent genetic screens in *Drosophila* and *Caenorhabditis elegans*. Here, we show that KSR functions upstream of MEK within the ERK/MAPK module. In agreement with this, we found that KSR facilitates the phosphorylation of MEK by RAF. We further show that KSR associates independently with RAF and MEK, and that these interactions lead to the formation of a RAF/MEK complex, thereby positioning RAF in close proximity to its substrate MEK. These findings suggest that KSR functions as a scaffold that assembles the RAF/MEK functional pair.

[Key Words: KSR; MEK; RAF; RAS; MAPK; signal transduction]

Received November 15, 2001; revised version accepted December 21, 2001.

Cells use a range of signaling pathways to convey distinct information to appropriate intracellular targets. The evolutionarily conserved mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathways are among the best described examples (for review, see Schaeffer and Weber 1999). The prototypical MAPK pathway is a three-kinase module that transmits signals through a phosphorylation cascade. At least five groups of MAPK pathways have been distinguished in mammals, which include the extensively studied extracellular-regulated kinase (ERK) pathway. This pathway is composed of specific combinations of RAF, MEK, and ERK/MAPK isoforms and is one of the principal mediators of signals emanating from the small GTPase RAS, thereby influencing multiple aspects of cell physiology such as cell growth, proliferation, differentiation, and survival (for review, see English et al. 1999; Kolch 2000).

As for the ERK pathway, most groups of MAPK pathways comprise multiple and closely related kinase isoforms that are often expressed in the same cells (Garrington and Johnson 1999). This raised questions early on about how signal transmission specificity could be achieved. The identification of proteins capable of binding at the same time to at least two of the three kinases of the module, thereby physically linking them together, provided a framework to explain signal transmission specificity and possibly efficiency (for review, see Whitmarsh and Davis 1998). The prototype for such scaffolding proteins is STE5, which simultaneously binds to

STE11, STE7, and FUS3, the three-kinase module required for mating in *Saccharomyces cerevisiae* (Choi et al. 1994). Ever since the discovery of STE5, only a handful of potential scaffolding proteins with respect to specific MAPK pathways have been identified (for review, see Garrington and Johnson 1999; Schaeffer and Weber 1999). The clearest examples include the yeast protein PBS2 required in the osmosensing-response MAPK pathway in *S. cerevisiae* (Posas and Saito 1997); the JNK-interacting proteins (JIP-1/2; Whitmarsh et al. 1998; Yasuda et al. 1999), which function in the JNK pathway; and finally MEK partner 1 (MP1), which apparently bridges MEK1 and ERK1 (Schaeffer et al. 1998).

Other proteins have been suggested to function as scaffolds in specific MAPK pathways (for review, see Garrington and Johnson 1999); however, their precise molecular function remains ambiguous. One of these is Kinase Suppressor of RAS (KSR), whose activity appears to be required in the ERK/MAPK pathway (for review, see Morrison 2001). KSR was originally identified in RAS-dependent genetic screens in *Drosophila* and *C. elegans* (Kornfeld et al. 1995; Sundaram and Han 1995; Therrien et al. 1995). Interestingly, KSR proteins are mostly related to RAF serine/threonine kinase family members (Therrien et al. 1995), but differ in at least three main aspects: (1) they do not contain the so-called RAS-binding domain found in RAF proteins; (2) they contain a conserved region of ~40 amino acids at their N terminus called Conserved Area 1 (CA1) that is unique to them; and (3) the mammalian homologs contain an arginine residue instead of an invariant lysine residue in kinase subdomain II that is thought to be critical for the phosphotransfer reaction. This peculiarity suggests that KSR proteins might be devoid of kinase activity.

¹Corresponding author.
E-MAIL therim@ircm.qc.ca; FAX (514) 987-5591.
Article and publication are at <http://www.genesdev.org/cgi/doi/10.1101/gad.962902>.

The characterization of KSR with respect to the ERK/MAPK pathway has been undertaken by a number of groups using mKSR1, a murine isoform (for review, see Morrison 2001). Like RAF, mKSR1 associates with HSP90 and p55/CDC37 as well as with 14-3-3 proteins (Xing et al. 1997; Stewart et al. 1999; Cacace et al. 1999). Interestingly, mKSR1 has also been shown to interact constitutively with MEK (Denouel-Galy et al. 1997; Yu et al. 1997; Muller et al. 2000) and in a RAS-dependent manner with RAF and ERK/MAPK (Therrien et al. 1996; Xing et al. 1997; Cacace et al. 1999). These results led different groups to propose that mKSR1 might coordinate the assembly of the ERK/MAPK module (for review, see Morrison 2001). However, this hypothesis remains to be tested because the molecular relationship between mKSR1 and the three kinase components of the ERK/MAPK module is currently unknown. Furthermore, functional assays conducted by different groups produced contradictory results, which resulted in a fragmented and somewhat controversial view of the role of KSR. A notable case regards the catalytic function of mKSR1. Kolesnick and colleagues reported that mKSR1 can phosphorylate and activate RAF in a TNF α - or EGF-dependent manner (Zhang et al. 1997; Xing et al. 2000). Intriguingly, however, these results could not be reproduced by other laboratories (Denouel-Galy et al. 1997; Michaud et al. 1997; Yu et al. 1997; Sugimoto et al. 1998). Instead, mKSR1 activity was reported to be independent of its putative catalytic function (Michaud et al. 1997; Stewart et al. 1999). Another discrepancy is the observation made by a number of groups that forced expression of mKSR1 strongly and specifically blocked signaling through the ERK/MAPK pathway (Denouel-Galy et al. 1997; Yu et al. 1997; Joneson et al. 1998; Sugimoto et al. 1998), whereas others showed that mKSR1 strongly cooperated with activated RAS to induce meiotic maturation of *Xenopus* oocytes (Therrien et al. 1996). As suggested by Cacace et al. (1999), this contradiction might be attributable to differences in mKSR1 expression levels. Given that mKSR1 interacts with several components of the ERK/MAPK module, it is possible that these components are sequestered from each other when mKSR1 levels are in excess. In any event, it remains unclear whether the information obtained using mKSR1 truly reflects the function of KSR as it had been genetically defined. It is possible that the experimental systems used could simply not support normal mKSR1 function. For example, it is intriguing that in the *Xenopus* oocyte maturation assay, mKSR1 activity mainly depended on its cysteine-rich motif (CRM; Therrien et al. 1996; Michaud et al. 1997), whereas several loss-of-function mutations affecting other parts of the KSR protein have been identified in *Drosophila* and *C. elegans* (Kornfeld et al. 1995; Sundaram and Han 1995; Therrien et al. 1995).

A major problem hindering the elucidation of the role of KSR is the lack of an assay that faithfully recapitulates its function. Here, using a simple transfection protocol, we reconstituted a KSR-dependent functional assay in a homologous system, that is, in Schneider (S2) cells using

only *Drosophila*-derived components. We found that KSR strongly promoted MEK phosphorylation by RAF in a RAS-dependent manner. Strikingly, KSR activity appeared to depend mainly on its ability to associate independently with RAF and MEK, thereby allowing it to link the two kinases. Together, our findings suggest that KSR promotes signal propagation through the ERK/MAPK module by coordinating the assembly of a RAF/MEK complex.

Results

Forced association between KSR and RAF kinase domains induces MEK phosphorylation

The KSR kinase domain has been reported to interact with MEK but not phosphorylate MEK (see above). KSR has also been found to interact with RAF, but the regions involved have not been identified. We wanted to verify whether forced association between KSR and RAF catalytic domains (KSRc and RAFc) would affect MEK activity. We took advantage of two previously described *Drosophila* transgenic lines that express, during eye development, either RAFc or KSRc fused to the N-terminal portion of Torso⁴⁰²¹, which comprises the extracellular and transmembrane regions of the Torso receptor tyrosine kinase (N-Tor⁴⁰²¹). Tor⁴⁰²¹ is a gain-of-function allele of *torso*. The aberrant Torso⁴⁰²¹ protein has a Y327C change in the extracellular portion that is thought to promote ligand-independent receptor oligomerization (Sprengrer and Nusslein-Volhard 1992).

N-Tor⁴⁰²¹RAFc behaves as an activated form of RAF and transforms cone cells into additional R7 photoreceptor cells when expressed in the developing *Drosophila* eye (Dickson et al. 1992). In contrast, N-Tor⁴⁰²¹KSRc is a potent dominant-negative form of KSR that blocks signaling through the MAPK pathway, presumably by sequestering MEK. It strongly antagonizes photoreceptor cell differentiation (Therrien et al. 1996). We reasoned that crossing flies expressing N-Tor⁴⁰²¹RAFc (*BT98*) to flies expressing N-Tor⁴⁰²¹KSRc (*KDN*) should lead to the formation of hetero-oligomers, which might result in activation of endogenous MEK and MAPK. We crossed *BT98* and *KDN* transgenic flies to a wild-type strain or to each other to assess the effect on MAPK compared with wild-type flies (Fig. 1). We stained third instar eye discs of the different genotypes with an anti-phospho-MAPK (anti-pMAPK) antibody and found that, compared with wild-type pMAPK levels, *BT98/+* flies had slightly elevated pMAPK levels posterior to the morphogenetic furrow at a position consistent with the expected transgene expression pattern (Fig. 1C). In agreement with elevated pMAPK, *BT98/+* adult eyes had additional R7 photoreceptor cells (data not shown) that resulted in a rough eye phenotype (Fig. 1D; Dickson et al. 1992). In contrast, the *KDN/+* flies had reduced pMAPK levels (Fig. 1E), which is also consistent with the roughening of the external adult eye surface (Fig. 1F) due to a block in photoreceptor cell differentiation (data not shown; Therrien et al. 1996). Strikingly, the *BT98/KDN* flies showed

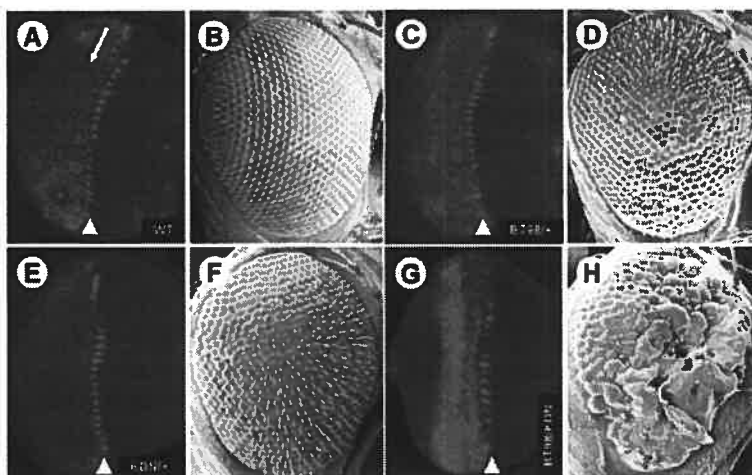


Figure 1. TorKSRC, a dominant-negative form of KSR, strongly cooperates with TorRAFc, an activated form of RAF, to activate the MAPK pathway during *Drosophila* eye development. (A,C,E,G) Anti-pMAPK staining of *Drosophila* third instar eye imaginal discs and (B,D,F,H) scanning electron micrographs of adult *Drosophila* eyes of the following genotypes: (A,B) wild type (WT); (C,D) *BT98/+*; (E,F) *KDN/+*; (G,H) *BT98/KDN*. Anterior is to the right. During normal eye disc development (A), activation of MAPK first appears in groups of cells in the morphogenetic furrow (arrowhead). Posterior (left) to the morphogenetic furrow, pMAPK staining is restricted to individual cells undergoing cell fate specification. The RAFC and KSRC constructs have been expressed under the *sevenless* enhancer sequences, which drives transgene expression in a subset of cells posterior to the morphogenetic furrow: arrow in A marks approximately the rows of ommatidial clusters where transgene expression occurs.

a massive accumulation of pMAPK posterior to the morphogenetic furrow (Fig. 1G) that correlated with a robust enhancement of activated RAF rough eye phenotype (Fig. 1H). These findings strongly suggest that N-Tor⁴⁰²¹KSRC brings endogenous MEK to N-Tor⁴⁰²¹RAFc, thus strongly enhancing endogenous MEK and MAPK activation.

To verify that the association between RAFC and KSRC is responsible for the results shown above, we fused RAFC and KSRC to the FK506-binding protein (FKBP) and FKBP-rapamycin-binding domain (FRB), respectively, to allow their heterodimerization in a rapamycin-dependent manner (Fig. 2A; Muthuswamy et al. 1999). We also introduced a functional or inactivated myristoylation signal to examine the influence of membrane localization. RAFC and KSRC derivatives were tagged with the polyoma (pyo) and the Flag epitopes, respectively, to allow their detection.

The FKBP-RAFC and FRB-KSRC fusion proteins were expressed separately or together along with myc-epitope-tagged MEK^{DA} in the absence or the presence of rapamycin (Fig. 2B). Expression of KSRC or RAFC variants alone or together did not result in MEK phosphorylation in the absence of rapamycin (Fig. 2B, lanes 2–4; top panel; α -pMEK). As expected, FRB-KSRC physically interacted with MEK as revealed by the associated mycMEK^{DA} in anti-Flag immunoprecipitates (Fig. 2B, lanes 2,4; bottom panel; α -MYC), whereas the FKBP-RAFC did not interact with MEK (Fig. 2B, lanes 3,4; middle panel; α -MYC). Rapamycin treatment did not affect the behavior of the KSRC and RAFC constructs expressed alone (Fig. 2B, lanes 6,7), but promoted their heterodimerization when expressed together (data not shown). This resulted in complex formation between RAF and MEK and led to MEK phosphorylation (Fig. 2B, lane 8). Interestingly, this

effect was accompanied by a clear and strong mobility shift of FKBP-RAFC. Permutation of the myristoylation signal or no myristoylation signal on the two types of fusion proteins gave identical results (data not shown), which suggested that no additional membrane components are required in this event. Together, these results showed that induced association between RAFC and KSRC results in MEK phosphorylation.

To address whether MEK phosphorylation depended on the catalytic function of RAFC or KSRC, we tested the activity of two kinase-inactivated mutants, RAFC^{K498S} and KSRC^{K705M} (Fig. 2A). As expected, kinase-inactivated RAFC did not support rapamycin-dependent MEK phosphorylation (Fig. 2C, lane 2). Interestingly, this mutant did not display a mobility shift. In contrast, KSRC^{K705M}, which interacted normally with MEK, did promote MEK phosphorylation (Fig. 2C, lane 4), although not as efficiently as wild-type KSR. These results suggest that the ability of KSR to promote MEK phosphorylation does not absolutely require a catalytically intact function (see Discussion).

KSR activity is naturally required for RAS-dependent activation of MAPK in S2 cells

The data shown above provide compelling evidence that KSR facilitates signaling between RAF and MEK. Before characterizing further the mechanism by which KSR carries out this function, we wanted to make sure that KSR is genuinely required in S2 cells for activation of the MAPK pathway. Although previous genetic and biochemical data on KSR have suggested its involvement in the MAPK module, they have never demonstrated it. We used the RNAi technique (Clemens et al. 2000) to deplete endogenous KSR levels in S2 cells as well as the

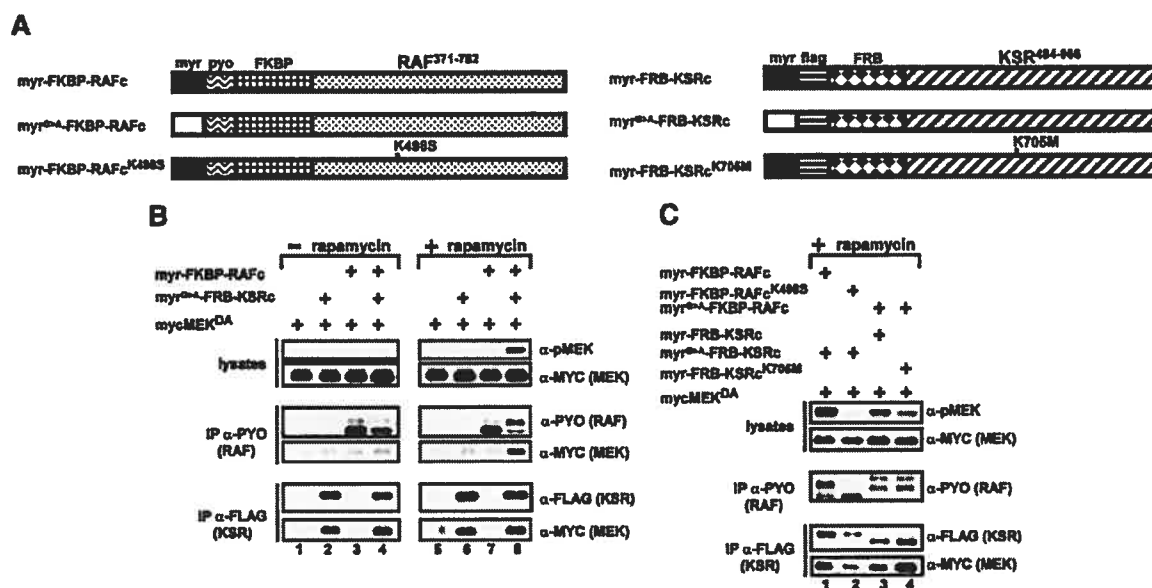


Figure 2. Induced association between KSR and RAF catalytic domains triggers MEK phosphorylation. (A) Schematic of the FKBP-RAF and FRB-KSR fusion proteins used in this study. (B) S2 cells were transfected with mycMEK^{DA} (1 μ g) alone or with the indicated combinations of KSRc (0.2 μ g) and RAfc (0.3 μ g) constructs. Twenty-four hours postinduction of expression, cells were treated with either vehicle (ethanol, -rapamycin) or with 1 μ M rapamycin (+rapamycin) for 2 h prior to harvest. Cell lysates were prepared, and small fractions were used to evaluate pMEK and mycMEK^{DA} levels by immunoblot analysis. The remaining portion of the lysates was split and immunoprecipitated with either anti-py0 or anti-Flag antibody to monitor RAfc or KSRc protein levels, associated mycMEK^{DA}, and heterodimerization with the opposite FRB or FKBP fusion proteins. Heterodimerization data are not shown, for simplicity. The results shown here and in Figures 3–6 are representative of at least three similar experiments. (C) The experiments were conducted essentially as described in B to evaluate the ability of myr-FKBP-RAfc^{K498M} and myr-FRB-KSRc^{K705M} to induce MEK phosphorylation. Because of the posttranslational modification, the myristoylated fusion proteins show faster mobility. We noticed that the dimerization of different fusion proteins was less rapamycin-dependent when they were either both membrane-targeted or not. This was presumably caused by the tendency of these proteins to associate together. However, dimerization was strictly rapamycin-dependent when RAfc proteins were membrane-targeted, but not the KSRc proteins or vice versa. Therefore, we presented only the data for which either RAfc or KSRc is membrane-targeted.

levels of the other major components and examine the effect on MAPK activation. A stable S2 cell line expressing RAS^{V12} under the control of a heavy metal-inducible promoter was used to activate the MAPK pathway. Addition of copper to cell culture media augmented total RAS1 levels, which resulted in a modest increase in phospho-MEK (pMEK) and a robust elevation of pMAPK (Fig. 3, cf. lanes 1 and 2).

In contrast to the double-stranded green-fluorescent protein (dsGFP) control RNA, incubation of cells with dsRAS1 RNA prevented MEK and MAPK activation (Fig. 3, cf. lanes 3 and 4). dsRAS1 RNA specifically decreased the levels of RAS1, but did not affect the levels of endogenous RAF, MEK, and MAPK. Specific removal of the three kinases of the module also impaired signal transduction (Fig. 3, lanes 5, 6, and 7, respectively). However, as previously reported (Clemens et al. 2000), elimination of MAPK in S2 cells led to an increase in pMEK levels (Fig. 3, lane 7), which suggests the presence of a MAPK-dependent negative-feedback mechanism. Interestingly, ablation of endogenous KSR also precluded activation of MEK and MAPK by RAS^{V12} (Fig. 3, lane 8), and similar

results were obtained when the pathway was activated using an activated form of the Sevenless receptor tyrosine kinase (data not shown), which indicates that KSR plays a critical role as well in situation where RAS has not been overexpressed. Therefore, these results show that KSR is a bona fide component of the MAPK pathway. In addition, given that dsKSR RNA inhibited MEK activation, it implies that it is required at a step upstream of MEK, which is consistent with its ability to promote MEK phosphorylation.

KSR promotes MEK phosphorylation by RAF in a RAS-dependent manner

To further unravel the molecular function of KSR, we wanted to reconstitute a KSR-dependent MEK phosphorylation assay using native KSR and RAF proteins. However, mouse KSR1 has been previously reported to block signaling through the ERK/MAPK pathway when overexpressed in various cell lines (see above). This effect is likely owing to sequestration of specific components of the pathway that are in limiting amounts. RAF

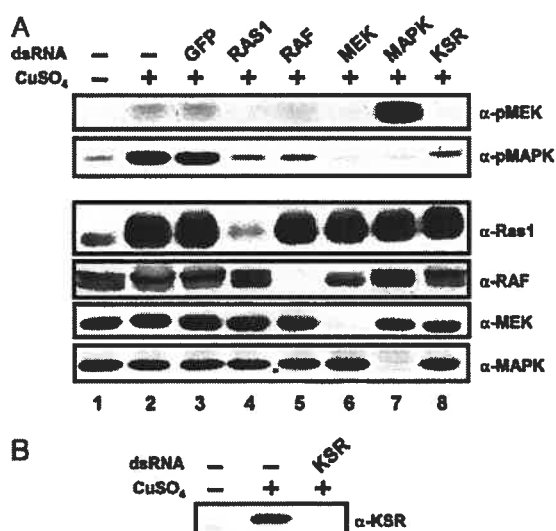


Figure 3. KSR is a bona fide component of the MAPK pathway. (A) Untreated (-) or CuSO₄-treated (+) RAS^{V12} cells were either incubated alone (-) or with (+) 10 μg of the indicated dsRNAs. After incubation, cells were lysed and pMEK or pMAPK levels, or protein levels for RAS1, RAF, MEK, and MAPK, were analyzed by immunoblot analysis using the indicated antibodies. Endogenous KSR protein levels were under the detection limit of our KSR antibody. Immunoprecipitation from ~25× more cells is required to detect endogenous KSR, which is incompatible with the RNAi protocol. (B) S2 cells were transfected with pMet-KSR and were either untreated (-) or CuSO₄-treated (+) to induce KSR expression. Cotransfection of pMet-KSR with 0.5 μg of dsKSR RNA prevented KSR accumulation, thus showing the effectiveness of dsKSR RNA.

and MEK are prime candidates as they have been reported to interact with mKSR1. To circumvent this problem, we coexpressed KSR together with RAF and MEK. RAS^{V12} was also used to activate the MAPK pathway. To prevent possible MAPK-dependent negative-feedback effects, as suggested by the RNAi result shown in Figure 3 (lane 7), we used a kinase-inactivated version of MEK (MEK^{DA}) throughout this work. Compared with myc-epitope-tagged MEK^{DA} expressed alone (Fig. 4A, lane 1), RAS^{V12} coexpression slightly increased pMEK levels (Fig. 4A, lane 2). Coexpression of KSR or pyo-epitope-tagged RAF in those two conditions (absence or presence of RAS^{V12}) did not significantly alter the pMEK profiles (Fig. 4A, cf. lanes 3–6 to lanes 1 and 2). Strikingly, coexpression of MEK with KSR and RAF without RAS^{V12} induced MEK phosphorylation (Fig. 4A, lane 7), which strongly increased upon addition of RAS^{V12} (Fig. 4A, lane 8). These results suggest that native KSR promotes the ability of RAF to phosphorylate MEK. Although RAS activity strongly increased the effect of KSR, the fact that we detected an effect of KSR in the absence of RAS^{V12} (Fig. 4A, lane 7) suggests among different possibilities that either endogenous RAS activity contributed to that effect or that the higher levels of the transiently ex-

pressed proteins somewhat bypassed the normal RAS-dependency of MEK phosphorylation by RAF.

We next examined whether the kinase function of RAF and the putative kinase function of KSR are required for MEK phosphorylation in this assay. We generated kinase-inactivated mutants for pyoRAF (K498M) and KSR (K705M), and tested their respective effect as described above. As expected, RAF kinase function was absolutely required for MEK phosphorylation (Fig. 4B, lane 3). In contrast, KSR^{K705M} still promoted MEK phosphorylation, although slightly less efficiently than wild-type KSR (Fig. 4B, lane 4). As for the FRB-KSRc construct, the ability of KSR to stimulate MEK phosphorylation does not absolutely depend on its putative kinase function.

KSR activity correlates with its ability to associate with MEK

We took advantage of the simple cotransfection assay in S2 cells to examine the effect of five additional mutations in KSR (Fig. 5A). Kolesnick and colleagues presented evidence that mKSR1 can phosphorylate RAF (Zhang et al. 1997; Xing et al. 2000). As a kinase-inactive mutant, they changed two conserved aspartic residues in subdomains VI and VII to alanine residues. Because the KSR^{K705M} mutant is still active (Fig. 3B), we generated a

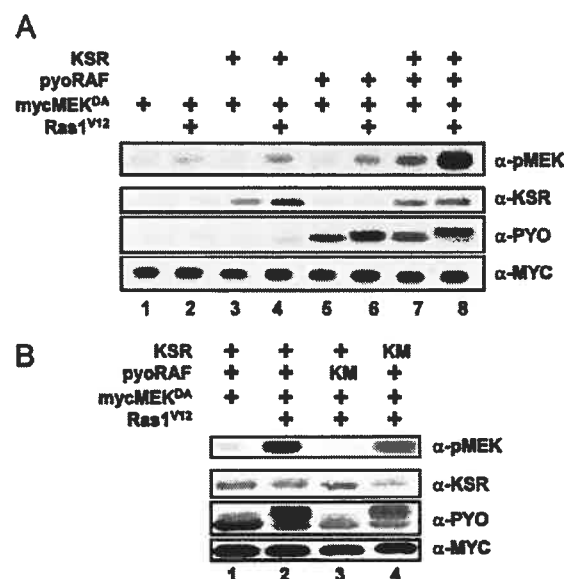


Figure 4. KSR enhances MEK phosphorylation by RAF in a RAS-dependent manner. (A) S2 cells were transfected with the mycMEK^{DA} reporter construct (0.3 μg) either alone (lane 1) or together with the indicated combinations of RAS^{V12} (0.6 μg), KSR (0.1 μg), and pyoRAF (0.03 μg) constructs. Cells were lysed 36 h postinduction of expression, and pMEK levels were examined by immunoblot analysis. Protein levels were evaluated for KSR, pyoRAF, and mycMEK^{DA} as indicated. (B) S2 cells were transfected as in A with the indicated combinations of expression plasmids. KM denotes pyoRAF^{K498M} or KSR^{K705M}.

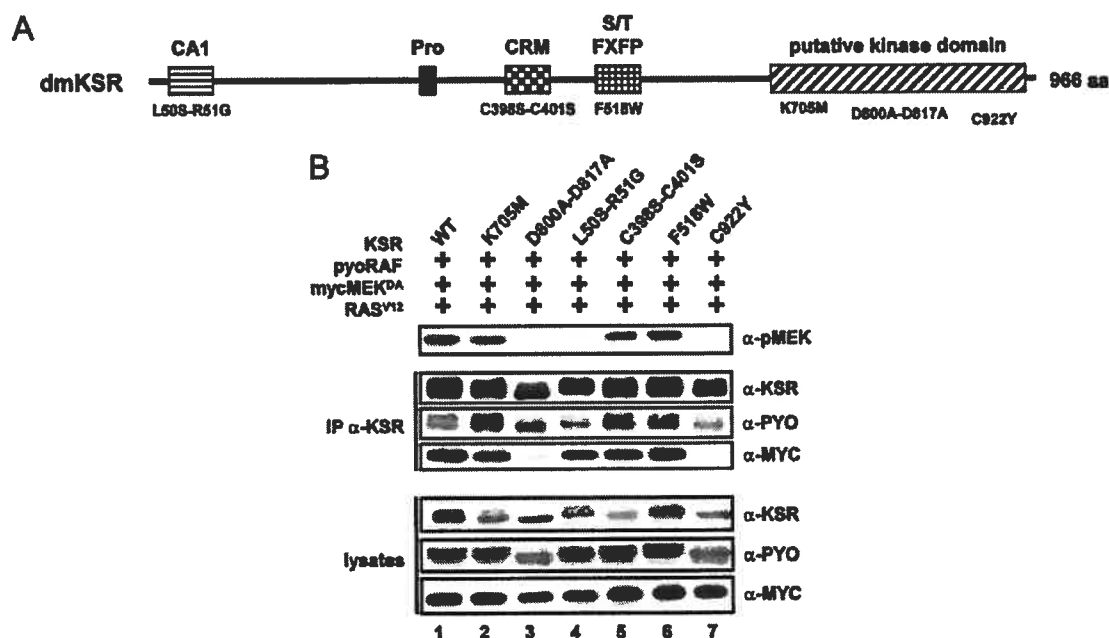


Figure 5. KSR activity depends on multiple regions of the KSR protein. (A) Structure of KSR and amino acid positions of various mutants used in this study. In addition to a putative kinase domain, the conserved area 1 (CA1), the proline-rich stretch (Pro), the cysteine-rich motif (CRM), and the serine/threonine-rich stretch/FXFP motif (S/T FXFP) are other features of the KSR proteins (Therrien et al. 1995). (B) S2 cells were transfected with the indicated combinations of mycMEK^{DA} (0.6 μ g), RAS^{V12} (0.6 μ g), pyoRAF (0.2 μ g), and wild-type (WT) KSR (0.7 μ g) or one of the indicated KSR mutants (0.7 μ g). Cells lysates were prepared 36 h postinduction of expression and either directly used to determine pMEK levels or immunoprecipitated with a monoclonal anti-KSR antibody to examine the amounts of mycMEK^{DA} and pyoRAF associated with KSR. Protein levels for KSR, mycMEK^{DA}, and pyoRAF were also evaluated.

KSR kinase-defective mutant similar to theirs (D800A–D817A) to test its effect. The four other mutants affected independent regions of KSR. KSR^{L50S–R51G} lies within the CA1 domain. This mutation has been recovered as a hypomorphic loss-of-function allele in a RAS-dependent genetic screen in *Drosophila* (Therrien et al. 1995). KSR^{C398S–C401S} disrupts the integrity of the cysteine-rich motif. A similar mutation in mKSR1 has been shown to abrogate its ability to promote RAS-dependent *Xenopus* oocyte maturation (Michaud et al. 1997). KSR contains an FXFP motif that has been proposed to function as a MAPK docking site (Jacobs et al. 1999). The function of this motif in KSR is unknown. We changed the first phenylalanine residue of the motif, KSR^{F518W}, to verify its functional relevance. Finally, a mutation in KSR isolated in a RAS-dependent genetic screen in *C. elegans* (Sundaram and Han 1995) has been reported to prevent the association between KSR and MEK (Stewart et al. 1999). A similar mutation was generated, KSR^{C922Y}, to examine the effect of impairing the KSR/MEK interaction. The effect of these mutations is shown in Figure 5B. Interestingly, in contrast to KSR^{K705M}, which still supported MEK phosphorylation, KSR^{D800A–D817A} and KSR^{C922Y} completely abrogated KSR activity (Fig. 5A, cf. lanes 2, 3, and 7). In addition, KSR^{L50S–R51G} showed a severe reduction of activity (Fig. 5A, lane 4), whereas

KSR^{C398S–C401S} showed only a slight, but reproducible reduction in KSR activity (Fig. 5A, lane 5), and KSR^{F518W} was as active as wild-type KSR (Fig. 5A, lane 6). Given that the two KSR mutations (L50S–R51G and C922Y) corresponding to loss-of-function mutations isolated in genetic screens also disrupted the ability of KSR to induce MEK phosphorylation by RAF, it strongly suggests that the assay recapitulates the normal function of KSR.

We then investigated whether the effect of the mutations could be caused by defects in their ability to associate with MEK and/or RAF. To verify this, we immunoprecipitated KSR or the mutant variants from cell lysates used to analyze pMEK levels (Fig. 5B) and examined the amount of coimmunoprecipitated mycMEK^{DA} and pyoRAF (Fig. 5B, middle part of the panel). As reported for mKSR1 (see above), *Drosophila* KSR also associated with MEK and RAF (Fig. 5B, lane 1). Two mutants, KSR^{D800A–D817A} and KSR^{C922Y}, did not interact with MEK (Fig. 5B, lanes 3, 7). Interestingly, they also failed to stimulate MEK phosphorylation. In contrast, KSR^{K705M}, which is almost as active as wild-type KSR, was not significantly affected in its association with MEK (Fig. 5B, lane 2). These results suggest that the ability of KSR to interact with MEK is critical to stimulate MEK phosphorylation. Intriguingly, KSR^{L50S–R51G} associated normally with MEK, yet was severely diminished in its ca-

capacity to promote MEK phosphorylation (Fig. 5B, lane 4). Although we did not observe a drastic effect regarding the binding properties of this mutant, it very reproducibly showed an approximately twofold decrease in its capacity to associate with RAF. This observation suggests that the CA1 domain mediates an association with RAF. KSR^{D800A-D817A} and KSR^{C922Y} also showed a similar RAF-association defect (Fig. 5B, lanes 3 and 7, respectively). Their reduced interaction with RAF might be caused by their inability to bind MEK, which normally might stabilize the KSR/RAF interaction. Alternatively, these mutations might induce structural perturbations that reduce the KSR/RAF association independently of the inability of MEK to bind KSR. Taken together, these data indicate that KSR associates independently with MEK and RAF, and that these interactions appear to be critical for KSR activity.

KSR allows the formation of a RAF/MEK complex

Previous work reported that the association between mKSR1 and RAF is RAS-dependent [Therrien et al. 1996; Xing et al. 1997]. Interestingly, we found that *Drosophila* KSR can associate with RAF without coexpressing an activated form of RAS (Fig. 4A; data not shown). We therefore wanted to determine whether endogenous RAS1 activity might contribute to this interaction. To verify this, we coexpressed pyoRAF and KSR in the presence of dsRNA for GFP, RAS1, MEK, or MAPK, immunoprecipitated RAF, and measured the levels of associated KSR. As for the negative controls, addition of dsRAS1 RNA did not perturb the KSR/RAF association (Fig. 6A, lane 3), which suggests that the *Drosophila* KSR/RAF interaction can occur in the absence of RAS-

mediated signals. The inability of dsMEK RNA to alter the KSR/RAF association (Fig. 6A, lane 4) is another indication that KSR interacts with RAF independently of MEK.

Given that KSR appears to associate independently with RAF and MEK, we tested whether KSR might physically link RAF and MEK together. We coexpressed fixed amounts of RAF and MEK alone or in the presence of increasing amounts of KSR, and evaluated the levels of associated MEK by probing the anti-pyo immunoprecipitates with anti-myc. As shown in Figure 6B, coexpression of RAF and MEK alone did not result in the formation of a stable RAF/MEK association (Fig. 6A, lane 3). In sharp contrast, expression of KSR allowed the formation of a RAF/MEK complex (Fig. 6A, lanes 4–6). The levels of MEK associated with RAF increased upon augmenting the expression levels of KSR as predicted if KSR physically connects RAF and MEK. If this model is correct, KSR^{C922Y} should not induce the formation of a RAF/MEK complex because it no longer binds to MEK (Fig. 5B, lane 7). Interestingly, when coexpressed with RAF and MEK, wild-type KSR showed greater protein stability compared with KSR^{C922Y}. We therefore transfected more DNA for the mutant construct to compare the effect of equal amounts of proteins. As predicted, KSR^{C922Y} could not promote the formation of a RAF/MEK complex (Fig. 6B, lanes 7–10).

We were intrigued by the fact that KSR induced the formation of a RAF/MEK complex in the absence of co-transfected RAS^{V12}. We therefore verified whether endogenous RAS1 activity was involved in the RAF/MEK complex formation by eliminating its contribution using dsRAS1 RNA. Surprisingly, as shown in Figure 6C, dsRAS1 RNA did not affect the complex [Fig. 6C, cf.

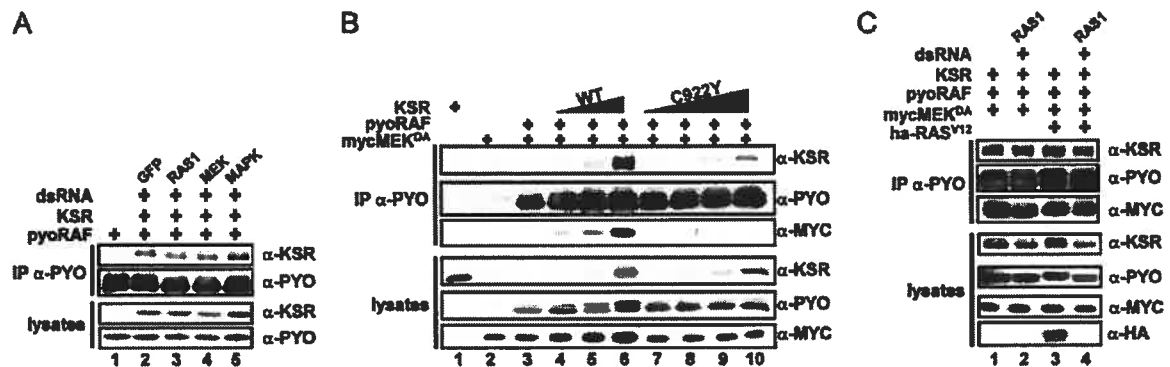


Figure 6. KSR interacts independently with RAF and MEK and induces the formation of a RAF/MEK complex. (A) S2 cells were transfected with pyoRAF alone or together with KSR in the presence of the indicated dsRNAs (0.5 μ g; lanes 2–5). Cell lysates were prepared and immunoprecipitated 36 h postinduction as indicated. Levels of associated proteins and their relative amounts were evaluated by immunoblot analysis. (B) S2 cells were transfected with mycMEK^{DA} (0.2 μ g) and pyoRAF (0.2 μ g) constructs either alone (lane 3) or with increasing quantities for wild-type (WT) KSR (0.02 μ g, 0.08 μ g, and 0.325 μ g) or for KSR^{L505-R51C} or KSR^{C922Y} (0.02 μ g, 0.08 μ g, 0.325 μ g, and 1.3 μ g), as indicated, control (lane 1) used 1.3 μ g of wild-type KSR. Cell lysates were prepared 36 h postinduction and immunoprecipitated by the anti-pyo antibody to measure associated MEK and KSR levels by immunoblot analysis. Protein levels in lysates were also determined. (C) S2 cells were transfected with mycMEK^{DA} (0.2 μ g), pyoRAF (0.2 μ g), or KSR (0.7 μ g) without or with 0.6 μ g of HA-epitope-tagged RAS^{V12} or 0.5 μ g of dsRAS1 RNA as indicated. Cell lysates were prepared as in C. ha-RAS^{V12} levels were examined using anti-HA antibody. Note that addition of dsRAS1 RNA eliminates ha-RAS^{V12} completely.

lanes 1 and 2). Similarly, coexpression of RAS^{V12} did not significantly enhance its formation (Fig. 6C, lane 3). Together, these findings strongly suggest that KSR connects RAF and MEK and that the assembly does not require RAS activity.

Discussion

KSR was originally recognized as an essential component of RAS-mediated signaling pathways in *Drosophila* and *C. elegans* (Kornfeld et al. 1995; Sundaram and Han 1995; Therrien et al. 1995). Although the characterization of mouse KSR1 linked it to the ERK module (Morrison 2001), its precise molecular function has not heretofore been elucidated. Here, we show that *Drosophila* KSR is genuinely required for signal transmission through the MAPK pathway at a step upstream of MEK. In agreement with this, we found that KSR directly participates in the phosphorylation of MEK by RAF and that this event does not absolutely require the putative catalytic function of KSR. We further show that KSR associates independently with MEK and with RAF. These independent interactions lead to the formation of a stable RAF/MEK complex, thereby positioning the activator RAF in close proximity to its substrate MEK. Hence, KSR operationally behaves as a molecular scaffold that assembles the RAF/MEK functional pair (Fig. 7A). Given that MP1 apparently coordinates the formation of MEK/ERK complexes (Schaeffer et al. 1998), it will certainly be interesting to investigate whether KSR and MP1 function together to orchestrate the formation of a complete ERK/MAPK module.

Mouse KSR1 had been previously reported to associate constitutively with MEK and in a RAS-dependent manner with RAF (see above). However, the physical consequences of these associations had not been explored further. We found here that *Drosophila* KSR also interacts with MEK and RAF, but, in contrast to mKSR1, the *Drosophila* KSR/RAF association did not appear to depend on RAS activity. A reason for this difference might be that the association between mKSR1 and c-RAF did not resist the immunoprecipitation procedure. However, in the presence of activated RAS other contacts might have

formed, which could stabilize the complex. RAS-induced oligomerization and/or other proteins might be involved in stabilizing the mKSR1/c-RAF complex. Regardless of the exact mechanism, our results clearly show that the associations between KSR and RAF and between KSR and MEK are mediated by independent parts of KSR and result in the association of RAF and MEK. Given that our data suggest that RAS is dispensable for these interactions, this implies that an inactive KSR/MEK/RAF ternary complex might exist in nonstimulated cells (Fig. 7B). Interestingly, STE5 has also been shown to assemble a three-kinase MAPK complex prior to signal transduction (Choi et al. 1994). This might be a general mechanism used by scaffolding proteins to allow highly efficient switch-like signal transmission. Consistent with this possibility, we found that endogenous KSR, which apparently represents <1% of endogenous RAF and MEK protein levels, is predominantly associated with RAF and MEK in S2 cells (data not shown).

The CA1 domain appears to be involved in connecting the KSR/MEK complex to RAF. It is still unclear whether the interaction is direct or not. Although the mutation affecting the CA1 domain reduced the KSR/RAF association, it did not abrogate it (Fig. 5B; data not shown). This suggests that either the mutation does not fully disrupt the interaction with RAF or that another region(s) of KSR makes contact with RAF. This is consistent with the fact that this mutation allowed to some extent the formation of a RAF/MEK association, albeit not as effectively as wild-type KSR (data not shown) and that it genetically behaved as a weak loss-of-function mutation (Therrien et al. 1995). Alternatively, it is possible that the mutation does not affect RAF binding per se, but localizes the mutant KSR protein aberrantly. Although MEK might stabilize the RAF/KSR interaction (Fig. 5B), it is not primarily mediating it. Indeed, dsMEK RNA did not perturb the KSR/RAF association (Fig. 6A), and the two mutants, KSR^{D800A-D817A} and KSR^{C922Y}, which no longer interacted with MEK, still associated with RAF (Figs. 5B and 6B). Systematic mutagenesis and deletion mutants of KSR should allow the identification of additional regions, if any, involved in the formation of the RAF/MEK complex. Given that mKSR1, like the

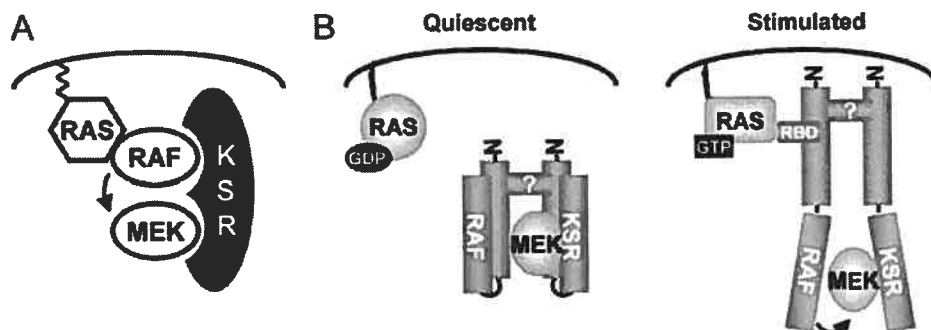


Figure 7. Model accounting for KSR function. See text for details.

RAF isozymes, interacts with the 14-3-3 proteins, HSP90, and p55/CDC37 [Xing et al. 1997; Cacace et al. 1999; Stewart et al. 1999], it will be interesting to discover the contribution of these proteins in the KSR/RAF association and in the regulation of the KSR-dependent RAF/MEK complex.

Previous work in *Drosophila* showed that *ksr* loss-of-function mutations suppressed activated RAS-mediated signaling, but did not alter activated RAF function [Therrien et al. 1995]. These observations led the authors to propose that KSR is required at a step between RAS and RAF or in a pathway that acts in parallel. However, as they mentioned, the data were also consistent with the possibility that the activated RAF transgene was expressed to high levels, thereby bypassing the requirement for KSR function. Our results are consistent with the second interpretation. We found that KSR promoted MEK phosphorylation when low amounts of the RAF construct were transfected (Fig. 2A), but that this effect declined upon increasing the amounts of transfected RAF (data not shown). The genetic data also raised the possibility that KSR is involved in the RAS-dependent RAF activation mechanism. This latter process has been the subject of numerous studies, but remains largely enigmatic [Kolch 2000]. A number of laboratories have tested the possibility that KSR directly phosphorylates RAF (see above). Most of these attempts have failed to show catalytic function for KSR, except for Kolesnick and colleagues, who did report that KSR can phosphorylate and activate RAF [Zhang et al. 1997]. Our data do not support their findings, but may provide an explanation for the apparent contradiction. Interestingly, there is a correlation between the ability of KSR to bind MEK and the appearance of a mobility shift in transfected RAF (Fig. 5B), which appears to be caused by phosphorylation (data not shown). KSR^{D800A-D817A} and KSR^{C922Y} did not induce the mobility shift, whereas KSR^{K705M} did. This suggests that this event does not depend on the putative catalytic function of KSR, but, rather, on its ability to interact with MEK. Moreover, the mobility shift observed for FKBP-RAF_c appeared to depend on its autocatalytic function because FKBP-RAF_c^{K498S} did not display the mobility shift, even though it heterodimerized with the FRB-KSR_c/MEK complex upon rapamycin treatment (Fig. 2C, lane 2; data not shown). Together, these data suggest that RAF autophosphorylation is strongly stimulated when MEK is brought to RAF by KSR, and thus KSR might be involved indirectly in RAF activation, not by virtue of its catalytic function, but rather by the effect of recruiting MEK to RAF. Given that the Kolesnick group used KSR^{D800A-D817A} as a kinase-inactivated mutant, which does not bind to MEK, it raises the possibility that their results correspond, in fact, to a KSR-dependent RAF autophosphorylation. Consistent with this, the only KSR-dependent phosphorylated residues that they identified correspond to RAF autophosphorylation sites [Zhang et al. 1997; Xing and Kolesnick 2001].

Surprisingly, the simple coexpression of KSR with MEK, RAF, and activated RAS, is sufficient to reconsti-

tute a KSR-dependent assay. The reliability of the assay is supported by the observation that wild-type KSR behaved as a positive component of the pathway, as genetics predicted, and KSR mutations corresponding to previously identified *ksr* loss-of-function alleles were inert. The critical aspect of the assay is the simultaneous expression of RAF and MEK with KSR. When KSR is overexpressed in a cell line, RAF and MEK also need to be coexpressed to high enough levels to prevent their uncoupling on separate KSR molecules. A similar situation has been observed for JIP-1, which was first thought to be an inhibitor of the JNK pathway [Dickens et al. 1997]. Our results thus provide an explanation as to why many laboratories found that KSR inhibited signaling through the ERK pathway when overexpressed in various cell lines. When expressed at very low levels, mKSR1 has been shown to accelerate RAS-dependent *Xenopus* oocyte meiotic maturation [Therrien et al. 1996; Cacace et al. 1999], a process that depends on activation of the ERK module [Birchmeier et al. 1985]. Intriguingly, mKSR1 activity in this system appeared to be mediated mainly by the cysteine-rich motif [CRM; Therrien et al. 1996; Michaud et al. 1997]. Although this region is probably required for normal KSR activity, it does not account for its entire function. Therefore, this assay probably recapitulated only partially the normal function of KSR. Biochemical analysis of the CRM revealed that it is involved in targeting mKSR1 to the plasma membrane in a RAS-dependent manner [Michaud et al. 1997]. Nonetheless, it is unclear why the CRM alone was capable of stimulating RAS-dependent *Xenopus* oocyte maturation. KSR^{C398S-C401S} was reproducibly less active than wild-type KSR in the S2 cell assay, thus confirming the functional relevance of the CRM. However, the effect was weak (Fig. 5B). This could be caused by the fact that the main participants were overexpressed, thereby making the system less dependent on signals normally concentrating the various components to the plasma membrane.

Intriguingly, besides the lysine to arginine change in subdomain II of the mammalian homologs, KSR proteins have a highly conserved kinase domain [Therrien et al. 1995]. It is formally possible that this domain is enzymatically active, but that we have not found the proper conditions and/or substrates to detect its activity. The observation that the two KSR^{K705M} mutants used in this study are slightly less active than their wild-type counterparts, even though they associate with MEK to the same extent as wild-type KSR, suggests that KSR might possess a catalytic function that is required in concert with its scaffolding property for full activity. Alternatively, it is possible that their lesser activity is owing to structural changes in KSR that do not perturb the KSR-MEK interaction but affect the way KSR presents MEK to RAF. Stringent sequence conservation might thus be required to maintain a particular kinase domain conformation to allow highly specific and robust interaction with MEK for the sole purpose of presenting a particular portion of MEK to RAF. Given their structural relatedness and the good homology between their kinase do-

mains, RAF and KSR probably evolved from a common ancestral kinase by gene duplication. One of the descendants of this hypothetical duplication event might have given rise to the three RAF kinase family members, which retained catalytic function, whereas the other descendant might have eventually led to the two KSR genes found in mammals (M.T., unpubl.) that evolved as scaffolds specialized in bridging RAF and MEK proteins together. Although it is currently unclear whether the functional shift observed for the KSR kinase domain will also be observed in other uncharacterized kinases for a similar purpose, this certainly highlights the importance of showing the catalytic activity of a kinase or any other enzyme before assuming it performs an enzymatic step in a given process.

It is becoming increasingly clear that components for several signaling pathways are specifically organized by scaffolding proteins [for review, see Pawson and Scott 1997]. However, we still know very little about the way they operate. The genetic and molecular data gathered so far on *Drosophila* KSR are consistent with its involvement in signaling efficiency, that is, when KSR is non-functional, low amounts of signal reach MAPK. The chain of events is, however, not severed because activated RAF can rescue *ksr* loss-of-function phenotypes in *Drosophila* [Therrien et al. 1995]. Our results show a role for KSR as a molecular scaffold coordinating the RAF/MEK interaction. This is, however, one part of the signal propagation mechanism through the ERK/MAPK module. Once MEK is activated, it must relay the signal to MAPK. It will be interesting to determine whether KSR also participates in this process or whether another molecule, such as MP1, executes that step independently.

Materials and methods

Plasmids

pMet-KSR was made by inserting a 2.9-kb *NotI* cDNA insert encoding full-length *Drosophila* KSR [Therrien et al. 1995] into pMet, a vector containing the *metallothionein* promoter inducible by heavy metals. Mutant KSR constructs and other mutants mentioned below were generated using the QuickChange mutagenesis kit [Stratagene]. All constructs were verified by sequencing.

pMet-pyoRAF was generated in three steps. First, an *EcoRI/XhoI* PCR product corresponding to *Drosophila* RAF full-length cDNA was inserted into pBlueScript [Stratagene]. Second, an oligonucleotide encoding two polyoma epitope tags (MEYMPME) was inserted into the *EcoRI* site in place of the first methionine. The *EcoRI/XhoI* insert was then moved into the pMet *EcoRI/SalI* sites. pMet-pyoRAF^{K40/RM} was generated by mutating the indicated codon in pMet-pyoRAF.

pMet-mycMEK^{DA} was generated in two steps. First, a PCR product corresponding to *Drosophila* MEK full-length cDNA with *EcoRI* extremities and a myc-epitope tag (EQKLISEEDLN) at the 5' end was inserted into a pBlueScript II vector. The resulting pBS-mycMEK was then mutagenized to change aspartic acid residue 224 in kinase subdomain VII to an alanine residue (DA). The mycMEK^{DA} insert was then moved into the *EcoRI* site of pMet.

pMet-RAS^{V12} was previously described [Therrien et al. 1999]. pMet-haRAS^{V12} was made by inserting an oligonucleotide encoding three HA epitopes (YPYDVPDYA) into the *EcoRI* site of pMet-RAS^{V12} in place of the first methionine.

The FKBP and FRB fusion constructs were assembled as follows: oligonucleotides encoding either the *Drosophila* SRC myristoylation signal (first 16 amino acids) or a nonmyristoylatable version (Gly 2 changed to Ala), were inserted into the *KpnI/EcoRI* sites of pBlueScript; a *BstEII* site has been included immediately upstream of the *EcoRI* site in the oligonucleotides. For the RAFC derivatives, a *BstEII/EcoRI* fragment encompassing the RAF catalytic domain (wild type or kinase-inactivated; amino acids 371–782) was inserted into the *BstEII/EcoRI* sites of pBS-Myr or pBS-Myr^{GA}. A PCR product corresponding to pyro-tagged mouse FK506-binding protein cDNA was then inserted into the *BstEII* site of the Myr or non-Myr RAFC constructs. *KpnI/NotI* complete inserts were then transferred into a pMet vector. For the KSRc derivatives, an *EcoRI/XbaI* fragment encompassing the KSR catalytic domain (wild type or mutated versions; amino acids 484–966) was inserted into the equivalent sites of pBS-Myr or pBS-Myr^{GA}. A PCR product corresponding to Flag epitope (DYKDDDDK)-tagged rat FKBP-rapamycin-binding domain (FRB; amino acids 2025–2114 of rat FRAP) was inserted into the *BstEII/EcoRI* sites of the Myr or non-Myr KSRc constructs. *KpnI/NotI* complete inserts were then transferred into a pMet vector.

Cell transfection, cell lysates, and immunoprecipitations

For transfection experiments, 10⁷ S2 cells were plated per 100-mm-diameter dish (Nunc) and incubated overnight. Cells were transfected with different combinations of plasmids (2 µg total) using the Effectene reagent (QIAGEN). Protein expression was induced 36 h after transfection by addition of 0.7 mM CuSO₄.

Cells were harvested in Nonidet P-40 lysis buffer [Therrien et al. 1996] at 36 h postinduction. Immunoprecipitations were performed by incubating cell lysates with antibody supernatants at 4°C for 1 h. Protein A/G agarose beads (Santa Cruz Biotechnology) were then added, and gently rocked at 4°C for an additional 3 h. Immunoprecipitates were washed three times with cold lysis buffer before analysis.

Western blot analysis and antibodies

Cell lysates or immunoprecipitated proteins were resolved on 8% SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose membranes. Proteins were probed using appropriate primary antibodies from the following sources: α-KSR monoclonal antibody (mAb) was previously described [Therrien et al. 1996]; α-RAS1, α-PYO epitope, and α-HA epitope (12CA5) mAbs were kindly provided by Gerry Rubin (University of California, Berkeley); α-*Drosophila* RAF polyclonal antibody was a kind gift from Debbie Morrison (National Cancer Institute, Frederick, MD); α-MYC epitope mAb (9E10) was from Santa Cruz Biotechnology; α-MEK-1&2 and α-pMEK-1&2 polyclonal antibodies were from Cell Signaling; and α-ERK-1&2 and α-dpERK-1&2 mAbs were from Sigma.

RNAi experiments

DsRNAs were generated as previously described [Clemens et al. 2000] with slight modifications. DNA fragments (~700 bp) containing coding sequences for the targeted proteins were amplified by PCR. Each PCR primer contained a 5'-T7 RNA polymerase binding site (GAATTAATACGACTCACTATAGGGAGA) followed by 21 nucleotides corresponding to the targeted sequence. The PCR products were purified using the QIAquick PCR purification kit (QIAGEN). One microgram of PCR prod-

uct was used per in vitro transcription reaction. RNAs were phenol-chloroform-extracted, ethanol-precipitated, and resuspended in TE buffer. DsRNAs were generated by heating RNA samples to 95°C and annealed by slow cooling to room temperature. DsRNA quality was verified on 1% agarose gels.

For RNAi experiments, 2×10^6 RAS^{V12} cells were plated per well of six-well tissue culture dishes (Nunc) and incubated overnight. Media were changed for 2 mL of complete medium with or without 10 µg of dsRNA. Cells were incubated for 5 d. RAS^{V12} expression was induced by adding 0.7 mM CuSO₄ to the cell culture 10 h prior to harvest. Given that much less dsRNA was used in transfection experiments (0.5 µg), interference was essentially restricted to the transfected cells.

Genetics, histology, and immunohistochemistry

Fly culture and crosses were performed according to standard procedures. Scanning electron microscopy was conducted as previously described (Kimmel et al. 1990). Staining of third instar eye imaginal disc was performed according to Gabay et al. (1997).

Acknowledgments

We are grateful to Morag Park, André Veillette, and David Wasserman for critical reading of the manuscript. We thank Gerry Rubin for fly stocks and anti-RAS1, anti-PYO, and anti-HA antibodies, and Debbie Morrison for anti-*Drosophila* RAF antibody. M.T. is the recipient of a Canadian Institute of Health Research Scholarship. This work was supported by the National Cancer Institute of Canada with funds from the Terry Fox Run to M.T.

The publication costs of this article were defrayed in part by payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 USC section 1734 solely to indicate this fact.

References

- Birchmeier, C., Broek, D., and Wigler, M. 1985. Ras proteins can induce meiosis in *Xenopus* oocytes. *Cell* 43: 615–621.
- Cacace, A.M., Michaud, N.R., Therrien, M., Mathes, K., Copeland, T., Rubin, G.M., and Morrison, D.K. 1999. Identification of constitutive and ras-inducible phosphorylation sites of KSR: Implications for 14–3–3 binding, mitogen-activated protein kinase binding, and KSR overexpression. *Mol. Cell. Biol.* 19: 229–240.
- Choi, K.Y., Satterberg, B., Lyons, D.M., and Elion, E.A. 1994. Ste5 tethers multiple protein kinases in the MAP kinase cascade required for mating in *S. cerevisiae*. *Cell* 78: 499–512.
- Clemens, J.C., Worby, C.A., Simonson-Lef, N., Muda, M., Machama, T., Hemmings, B.A., and Dixon, J.E. 2000. Use of double-stranded RNA interference in *Drosophila* cell lines to dissect signal transduction pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97: 6499–6503.
- Denouel-Galy, A., Douville, E.M., Warne, P.H., Papin, C., Laugier, D., Calothy, G., Downward, J., and Eychene, A. 1997. Murine Ksr interacts with MEK and inhibits Ras-induced transformation. *Curr. Biol.* 8: 46–55.
- Dickens, M., Rogers, J.S., Cavanagh, J., Raitano, A., Xia, Z., Halpern, J.R., Greenberg, M.E., Sawyers, C.L., and Davis, R.J. 1997. A cytoplasmic inhibitor of the JNK signal transduction pathway. *Science* 277: 693–696.
- Dickson, B., Sprenger, F., Morrison, D., and Hafen, E. 1992. Raf functions downstream of Ras1 in the Sevenless signal transduction pathway. *Nature* 360: 600–603.
- English, J., Pearson, G., Wilsbacher, J., Swantek, J., Karandikar, M., Xu, S., and Cobb, M.H. 1999. New insights into the control of MAP kinase pathways. *Exp. Cell. Res.* 253: 255–270.
- Gabay, L., Seger, R., and Shilo, B.Z. 1997. In situ activation pattern of *Drosophila* EGF receptor pathway during development. *Science* 277: 1103–1106.
- Garrington, T.P. and Johnson, G.L. 1999. Organization and regulation of mitogen-activated protein kinase signaling pathways. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 11: 211–218.
- Jacobs, D., Glossip, D., Xing, H., Muslin, A.J., and Kornfeld, K. 1999. Multiple docking sites on substrate proteins form a modular system that mediates recognition by ERK MAP kinase. *Genes & Dev.* 13: 163–175.
- Jonsson, T., Fulton, J.A., Volle, D.J., Chaika, O.V., Bar-Sagi, D., and Lewis, R.E. 1998. Kinase suppressor of Ras inhibits the activation of extracellular ligand-regulated (ERK) mitogen-activated protein (MAP) kinase by growth factors, activated Ras, and Ras effectors. *J. Biol. Chem.* 273: 7743–7748.
- Kimmel, B.E., Heberlein, U., and Rubin, G.M. 1990. The homeo domain protein rough is expressed in a subset of cells in the developing *Drosophila* eye where it can specify photoreceptor cell subtype. *Genes & Dev.* 4: 712–727.
- Kolch, W. 2000. Meaningful relationships: The regulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by protein interactions. *Biochem. J.* 351: 289–305.
- Kornfeld, K., Hom, D.B., and Horvitz, H.R. 1995. The ksr-1 gene encodes a novel protein kinase involved in Ras-mediated signaling in *C. elegans*. *Cell* 83: 903–913.
- Michaud, N.R., Therrien, M., Cacace, A., Edsall, L.C., Spiegel, S., Rubin, G.M., and Morrison, D.K. 1997. KSR stimulates Raf-1 activity in a kinase-independent manner. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94: 12792–12796.
- Morrison, D.K. 2001. KSR: A MAPK scaffold of the Ras pathway? *J. Cell Sci.* 114: 1609–1612.
- Muller, J., Cacace, A.M., Lyons, W.E., McGill, C.B., and Morrison, D.K. 2000. Identification of B-KSR1, a novel brain-specific isoform of KSR1 that functions in neuronal signaling. *Mol. Cell. Biol.* 20: 5529–5539.
- Muthuswamy, S.K., Gilman, M., and Brugge, J.S. 1999. Controlled dimerization of ErbB receptors provides evidence for differential signaling by homo- and heterodimers. *Mol. Cell. Biol.* 19: 6845–6857.
- Pawson, T. and Scott, J.D. 1997. Signaling through scaffold, anchoring, and adaptor proteins. *Science* 278: 2075–2080.
- Posas, F. and Saito, H. 1997. Osmotic activation of the HOG MAPK pathway via Ste11p MAPKKK: Scaffold role of Pbs2p MAPKK. *Science* 276: 1702–1705.
- Schaeffer, H.J. and Weber, M.J. 1999. Mitogen-activated protein kinases: Specific messages from ubiquitous messengers. *Mol. Cell. Biol.* 19: 2435–2444.
- Schaeffer, H.J., Catling, A.D., Eblen, S.T., Collier, L.S., Krauss, A., and Weber, M.J. 1998. MP1: A MEK binding partner that enhances enzymatic activation of the MAP kinase cascade. *Science* 281: 1668–1671.
- Sprenger, F. and Nusslein-Volhard, C. 1992. Torso receptor activity is regulated by a diffusible ligand produced at the extracellular terminal regions of the *Drosophila* egg. *Cell* 71: 987–1001.
- Stewart, S., Sundaram, M., Zhang, Y., Lee, J., Han, M., and Guan, K.L. 1999. Kinase suppressor of Ras forms a multiprotein signaling complex and modulates MEK localization. *Mol. Cell. Biol.* 19: 5523–5534.
- Sugimoto, T., Stewart, S., Han, M., and Guan, K.L. 1998. The

Roy et al.

- kinase suppressor of Ras (KSR) modulates growth factor and Ras signaling by uncoupling Elk-1 phosphorylation from MAP kinase activation. *EMBO J.* **17**: 1717-1727.
- Sundaram, M. and Han, M. 1995. The *C. elegans* ksr-1 gene encodes a novel Raf-related kinase involved in Ras-mediated signal transduction. *Cell* **83**: 889-901.
- Therrien, M., Chang, H.C., Solomon, N.M., Karim, F.D., Wasarman, D.A., and Rubin, G.M. 1995. KSR, a novel protein kinase required for RAS signal transduction. *Cell* **83**: 879-888.
- Therrien, M., Michaud, N.R., Rubin, G.M., and Morrison, D.K. 1996. KSR modulates signal propagation within the MAPK cascade. *Genes & Dev.* **10**: 2684-2695.
- Therrien, M., Wong, A.M., Kwan, E., and Rubin, G.M. 1999. Functional analysis of CNK in RAS signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **96**: 13259-13263.
- Whitmarsh, A.J. and Davis, R.J. 1998. Structural organization of MAP-kinase signaling modules by scaffold proteins in yeast and mammals. *Trends Biochem. Sci.* **23**: 481-485.
- Whitmarsh, A.J., Cavanagh, J., Tournier, C., Yasuda, J., and Davis, R.J. 1998. A mammalian scaffold complex that selectively mediates MAP kinase activation. *Science* **281**: 1671-1674.
- Xing, H.R. and Kolesnick, R. 2001. Kinase suppressor of Ras signals through Thr269 of c-Raf-1. *J. Biol. Chem.* **276**: 9733-9741.
- Xing, H., Kornfeld, K., and Muslin, A.J. 1997. The protein kinase KSR interacts with 14-3-3 protein and Raf. *Curr. Biol.* **7**: 294-300.
- Xing, H.R., Lozano, J., and Kolesnick, R. 2000. Epidermal growth factor treatment enhances the kinase activity of kinase suppressor of Ras. *J. Biol. Chem.* **275**: 17276-17280.
- Yasuda, J., Whitmarsh, A.J., Cavanagh, J., Sharma, M., and Davis, R.J. 1999. The JIP group of mitogen-activated protein kinase scaffold proteins. *Mol. Cell. Biol.* **19**: 7245-7254.
- Yu, W., Fantl, W.J., Harrowe, G., and Williams, L.T. 1997. Regulation of the MAP kinase pathway by mammalian Ksr through direct interaction with MEK and ERK. *Curr. Biol.* **8**: 56-64.
- Zhang, Y., Yao, B., Delikat, S., Bayoumy, S., Lin, X.H., Basu, S., McGinley, M., Chan-Hui, P.Y., Lichenstein, H., and Kolesnick, R. 1997. Kinase suppressor of Ras is ceramide-activated protein kinase. *Cell* **89**: 63-72.